



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI  
FAKULTET BIOLOŠKI ODSJEK

Maja Kesić

**NEUROKEMIJSKI, MOLEKULARNI I  
BIHEVIORALNI ODGOVOR NA FARMAKOLOŠKU  
AKTIVACIJU SEROTONINSKOGA SUSTAVA U  
ŠTAKORA S PROMIJENJENOM HOMEOSTAZOM  
SEROTONINA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.





University of Zagreb

FACULTY OF  
SCIENCE DIVISION OF  
BIOLOGY

Maja Kesic

**NEUROCHEMICAL, MOLECULAR AND  
BEHAVIORAL RESPONSE TO  
PHARMACOLOGICAL ACTIVATION OF  
SEROTONIN SYSTEM IN RATS WITH ALTERED  
SEROTONIN HOMEOSTASIS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Ovaj je doktorski rad izrađen u  
Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju  
Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu,  
pod vodstvom dr. sc. Lipe Čičin-Šain i dr. sc. Jasminke Štefulj,  
u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije  
pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu.



## Zahvale

Veliko hvala prof. dr. sc. Branimiru Jerneju što mi je pružio priliku da budem dio Laboratorija za neurokemiju i molekularnu biologiju i što me uveo u svijet serotonina. ☺ Nadam se da sam na ovom putu opravdala Vaše povjerenje.

Iskrene zahvale mojim mentoricama dr. sc. Lipi Čičin-Šain i dr. sc. Jasminki Štefulj na konstruktivnim razgovorima, pomoći u provedbi eksperimenata i pisanju ovog doktorskog rada. Zahvaljujem na voditeljstvu, pruženom znanju i savjetima tijekom ovog putovanja.

Zahvaljujem i svojim dragim tehničarima Katarini Karlo i Vladi Vraneši na pomoći u eksperimentalnom radu, svim pripremljenim puferima i kemikalijama, kao i slatkišima kada su bili najpotrebniji. ☺

Zahvaljujem i kolegicama Tatjani Bordukalo-Nikšić i Gordani Mokrović na pomoći tijekom učenja novih eksperimentalnih tehnika.

Zahvaljujem i svojim prijateljima koji su bili uz mene u svim mojim životnim situacijama i što ste svojom pojavom uveseljavali moje dane. Uz vas je sve lakše teklo. "Mnogo je malih stvari koje su vrijedne poštovanja. Malo je velikih stvari koje su vrijedne divljenja."

Najveće zahvale idu mojoj obitelji, mami Đani, tati Slavku, seki Aniti, i našoj maloj rastućoj obitelji – Adori i Vigu. Vama zahvaljujem na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju, razumijevanju, podršci i vjeri u mene. Zbog vas sam osoba koja sam danas. Hvala vam na tome.



"Ciljajte prema mjesecu! Čak i ako promašite završit ćete među zvijezdama." (Les Brown)





**NEUROKEMIJSKI, MOLEKULARNI I BIHEVIORALNI ODGOVOR NA FARMAKOLOŠKU  
AKTIVACIJU SEROTONINSKOGA SUSTAVA U ŠTAKORA S PROMIJENJENOM  
HOMEOSTAZOM SEROTONINA**

MAJA KESIĆ

Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju,  
Institut "Ruđer Bošković", Bijenička cesta 54, HR-10000 Zagreb

Serotoninski prijenosnik (5HT prijenosnik, 5HTT) predstavlja ciljnu molekulu djelovanja antidepresivnih lijekova iz skupine selektivnih inhibitora povratnog unosa serotonina (SSRI). Iako često korišteni, ovi lijekovi ostvaruju terapijski učinak samo kod manjeg broja (do 50 %) bolesnika, a razlozi za to nisu poznati. Nalaz povezanosti terapijskog odgovora s polimorfizmom gena za 5HTT uputio je na moguću ulogu konstitucijske serotoninske homeostaze u kliničkom odgovoru na SSRI.

Primjenom originalnog životinjskog modela, Wistar-Zagreb 5HT štakor, čije sublinije imaju konstitucijski pojačanu (5HT-visoki) ili smanjenu (5HT-niski) aktivnost trombocitnog 5HTT, u ovom radu je istražen odnos između konstitucijske 5HT homeostaze i odgovora na tretman SSRI-om. Farmakološka aktivacija 5HT sustava izazvana je jednokratnom ili kroničnom primjenom SSRI-a fluoksetina, a cilj je bio usporediti sublinije s obzirom na učinke fluoksetina na (i) aktivnost 5HTT i razinu 5HT u mozgu i na periferiji, (ii) razinu mRNA za 5HTT i receptor 5HT1A u mozgu te (iii) odabrana ponašanja modulirana serotoninom.

Jednokratni tretman fluoksetinom doveo je do inhibicije aktivnosti trombocitnog 5HTT, koja je bila jače izražena kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, te do porasta razine plazmatskog 5HT, koji je bio veći kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Kronična primjena lijeka dovela je do značajnog pada razine trombocitnog serotonina, koji je bio veći kod životinja iz 5HT-niske sublinije, te do pada plazmatskog serotonina, koji je bio veći kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Smanjenje ponašanja nalik na anksioznost, kao i porast istraživačke i lokomotorne aktivnosti nakon kroničnog tretmana fluoksetinom bilo je prisutno samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, a praćeno je promjenama u mozgu koje su bile vidljive kao tendencija povećanja ekspresije gena za 5HT1A receptor u hipokampusu te ekspresije gena za 5HTT u regiji jezgara rafe. S druge strane, kod životinja iz 5HT-niske sublinije, kronična primjena fluoksetina dovela je do pada kortikalne ekspresije mRNA za 5HTT i receptor 5HT1A, te tendencije pada razine 5HT u moždanoj kori, dok učinci na ponašanje nisu bili značajni.

Rezultati istraživanja pokazuju da je konstitucijska serotoninska homeostaza važan čimbenik odgovora na tretman fluoksetinom. Sublinije Wistar-Zagreb 5HT štakora mogu biti koristan model u istraživanju neurobiološke osnove različitog odgovora pojedinaca na terapiju antidepresivima, kao i za vrednovanje trombocita kao perifernog modela za predviđanje terapijskog odgovora.

(143 stranica, 35 slika, 22 tablica, 242 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

**Ključne riječi:** serotonin / serotoninski prijenosnik / 5HT1A receptor / anksioznost / fluoksetin / Wistar-Zagreb 5HT štakor

**Mentori:** Dr. sc. Lipa Čičin-Šain, znanstvena savjetnica  
Dr. sc. Jasminka Štefulj, viša znanstvena suradnica

**Ocjenjivači:** Dr. sc. Tatjana Bordukalo-Nikšić, Medicinski fakultet, Zagreb  
Izv. prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb  
Prof. dr. sc. Ante Tvrdeić, Medicinski fakultet, Zagreb



## NEUROCHEMICAL, MOLECULAR AND BEHAVIORAL RESPONSE TO PHARMACOLOGICAL ACTIVATION OF SEROTONIN SYSTEM IN RATS WITH ALTERED SEROTONIN HOMEOSTASIS

MAJA KESIĆ

Laboratory of Neurochemistry and Molecular Neurobiology,  
"Ruđer Bošković" Institute, Bijenička cesta 54, HR-10000 Zagreb

Serotonin transporter (5HT transporter, 5HTT) represents the target molecule of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) acting as antidepressant drugs. Although commonly used, these drugs produce a therapeutic effect only in a small number of patients (up to 50 %), and the reasons for that are not known. The association between therapeutic response and 5HTT gene polymorphism has pointed out to possible role of the constitutional serotonin homeostasis in clinical response to SSRI.

Using the original animal model, Wistar-Zagreb 5HT rats, whose sublines have constitutional high (high-5HT) or low (low-5HT) of platelet 5HTT activity, we have investigated the relationship between constitutional 5HT homeostasis and responses to SSRI treatment. Following pharmacological activation of 5HT system, induced by single or repeated doses of SSRI fluoxetine, we have compared these sublines with respect to (i) the 5HTT activity and the 5HT levels in the brain and blood, (ii) the expression of 5HTT and 5HT1A receptor genes in the brain, and (iii) the selected behaviors modulated by serotonin.

Acute treatment with fluoxetine led to inhibition of platelet 5HTT activity, which was more pronounced in animals from the high-5HT subline, and to increase of plasma 5HT level, which was higher in animals from the low-5HT subline. Chronic administration of the drug caused a significant decrease of platelet serotonin levels, which was higher in animals from the low-5HT subline, and a decrease of plasma 5HT levels, which was higher in animals from the high-5HT subline. The reduction of anxiety-like behavior, along with the increase of exploratory and locomotor activity after chronic treatment with fluoxetine was observed only in animals from the high-5HT subline, and was accompanied by the tendency towards increase of 5HT1A receptor gene expression in hippocampus and the tendency towards increased expression of 5HTT gene in raphe nuclei. On the other hand, in animals from the low-5HT subline, chronic application of fluoxetine led to decrease in 5HTT and 5HT1A receptor mRNA levels and tendency towards decrease in 5HT in the cerebral cortex.

The obtained results show that constitutional serotonin homeostasis is an important factor in response to fluoxetine treatment. Furthermore, Wistar-Zagreb 5HT sublines may represent a useful model in studying the neurobiological basis of a different individual response to antidepressants, as well as in evaluating platelets as a peripheral model for predicting the therapeutic response.

(143 pages, 35 figures, 22 tables, 242 references, original in: Croatian)

**Keywords:** serotonin / serotonin transporter / 5HT1A receptor / anxiety / fluoxetine / Wistar-Zagreb 5HT rats

**Supervisor:** ScD Lipa Čičin-Šain, Senior Scientist  
ScD Jasminka Štefulj, Senior Research Associate

**Reviewers:** ScD Tatjana Bordukalo-Nikšić, Research Associate, Medical Faculty, Zagreb  
ScD Dubravka Hranilović, associate professor, Faculty of Science, Zagreb  
ScD Ante Tvrdeić, associate professor, Medical Faculty, Zagreb



<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	3
<b>2.1. Serotonin (5HT)</b> .....	3
<b>2.2. Regulacija aktivnosti serotoniniskog sustava</b> .....	6
2.2.1. Serotoninski receptor tipa 1A (5HT1A).....	6
2.2.2. Serotoninski prijenosnik (5HTT).....	8
<b>2.3. Serotonin i ponašanje</b> .....	11
2.3.1. Emotivne funkcije: anksioznost, istraživačka aktivnost.....	11
2.3.2. Kognitivne funkcije: učenje i pamćenje.....	13
<b>2.4. Farmakološka manipulacija serotoniniskog sustava</b> .....	17
2.4.1. Selektivni inhibitori povratnog unosa serotonina (SSRI).....	18
2.4.2. Mehanizam djelovanja fluoksetina.....	19
2.4.3. Bihevioralni učinci fluoksetina.....	20
2.4.4. Farmakogenetika SSRI: uloga polimorfizama gena za 5HTT.....	23
2.4.5. Farmakokinetika fluoksetina.....	25
<b>2.5. Genetička manipulacija serotoniniskog sustava</b> .....	25
2.5.1. <i>Knock-out</i> i transgenične životinje.....	25
2.5.2. Životinje uzgojene prema fenotipu ponašanja.....	28
<b>2.6. Wistar-Zagreb 5HT štakor</b> .....	29
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	32
<b>3.1. Materijal</b> .....	32
3.1.1. Pokusne životinje.....	32
3.1.2. Kemikalije i otopine.....	32
3.1.3. Tehnička oprema i pribor.....	35
<b>3.2. Metode</b> .....	37
3.2.1. Selektivni odabir životinja.....	37
3.2.2. Koncept farmakoloških pokusa.....	37
3.2.3. Priprava uzoraka.....	39
3.2.3.1. Uzimanje uzoraka krvi.....	39
3.2.3.2. Priprava plazme bogate trombocitima i plazme bez trombocita.....	39
3.2.3.3. Uzimanje uzoraka mozga.....	40
3.2.3.4. Priprava sinaptosoma.....	41
3.2.4. Biokemijska određivanja.....	41
3.2.4.1. Mjerenje razine serotonina u trombocitima.....	41
3.2.4.2. Mjerenje razine slobodnog serotonina u plazmi.....	42
3.2.4.3. Mjerenje razine serotonina u mozgu.....	43
3.2.4.4. Mjerenje aktivnog unosa serotonina u trombocite.....	43
3.2.4.5. Mjerenje aktivnog unosa serotonina u sinaptosome.....	44
3.2.5. Ekspresija gena za serotoninski prijenosnik i serotoninski receptor tipa 1A.....	44
3.2.5.1. Izolacija RNA.....	44
3.2.5.2. Reverzna transkripcija.....	45
3.2.5.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	46
3.2.6. Testovi ponašanja.....	47
3.2.6.1. Test otvorenog prostora.....	47
3.2.6.2. Ploča sa rupama.....	48
3.2.6.3. Uzdignuti križni labirint.....	49
3.2.6.4. Test pasivnog izbjegavanja.....	49
3.2.6.5. Morris-ov vodeni labirint.....	50
3.2.6.6. Analiza testova ponašanja.....	51
3.2.7. Statistička obrada podataka.....	51



<b>4. REZULTATI</b> .....	53
<b>4.1. Selektivni odabir životinja iz 5HT sublinija WZ-5HT modela</b> .....	53
<b>4.2. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u krvi WZ-5HT štakora</b> .....	53
4.2.1. Koncentracija serotonina u trombocitima.....	54
4.2.2. Aktivnost 5HT prijenosnika na trombocitima.....	56
4.2.3. Koncentracija slobodnog serotonina u krvnoj plazmi.....	58
4.2.3.1. Bazalne vrijednosti.....	58
4.2.3.2. Učinak fluoksetina.....	59
<b>4.3. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u mozgu WZ-5HT štakora</b> .....	63
4.3.1. Koncentracija serotonina u moždanoj kori.....	63
4.3.2. Aktivnost 5HT prijenosnika u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe.....	64
4.3.2.1. Bazalne vrijednosti.....	64
4.3.2.2. Učinak fluoksetina.....	66
4.3.3. Ekspresija mRNA za serotoninski prijenosnik i serotoninski receptor tipa 1A u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe.....	68
4.3.3.1. 5HT prijenosnik.....	69
4.3.3.2. Serotoninski receptor tipa 1A.....	72
<b>4.4. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na ponašanje životinja iz WZ-5HT sublinija</b> .....	75
4.4.1. Emotivno ponašanje.....	75
4.4.1.1. Test otvorenog prostora.....	75
4.4.1.2. Ploča sa rupama.....	79
4.4.1.3. Uzdignuti križni labirint.....	83
4.4.2. Kognitivne funkcije.....	87
4.4.2.1. Test pasivnog izbjegavanja.....	87
4.4.2.2. Morris-ov vodeni labirint.....	89
<b>4.5. Tjelesna težina životinja tijekom kronične primjene fluoksetina</b> .....	92
<b>5. RASPRAVA</b> .....	94
<b>5.1. Wistar-Zagreb 5HT štakor</b> .....	95
<b>5.2. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u krvi WZ-5HT štakora</b> .....	98
<b>5.3. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u mozgu WZ-5HT štakora</b> .....	101
<b>5.4. Ekspresija mRNA za serotoninski prijenosnik i serotoninski receptor tipa 1A u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe</b> .....	106
<b>5.5. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na ponašanje životinja iz WZ-5HT sublinija</b> .....	109
<b>5.6. Tjelesna težina životinja tijekom kronične primjene fluoksetina</b> .....	115
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	116
<b>7. CITIRANA LITERATURA</b> .....	118
<b>8. PRILOG</b> .....	137
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	142





*Uvod*



Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biogeni amin koji ima ulogu neurotransmitera i neuromodulatora u brojnim fiziološkim funkcijama, uključujući emotivno-kognitivne procese. Također je uključen u mehanizme djelovanja različitih psihoaktivnih tvari i lijekova. Sintetizira se u enterokromafinim stanicama tankog crijeva, te serotonergičnim neuronima moždanih jezgara rafa. Poremećaji funkcije serotoninskog sustava povezuju se s etiopatogenezom brojnih neuropsihijatrijskih poremećaja, uključujući depresivni poremećaj i anksioznost.

Aktivnost serotoninske neurotransmisije regulirana je djelovanjem metaboličkih enzima serotonina, aktivnošću i gustoćom 5HT receptora te uklanjanjem serotonina iz sinaptičke pukotine natrag u presinaptički neuron pomoću serotoninskog prijenosnika (5HTT). Na periferiji, glavni mehanizam regulacije plazmatskog serotonina odvija se preko 5HTT na membrani trombocita, koji je zadužen za uklanjanje slobodnog serotonina iz plazme. Promjene u aktivnosti 5HTT mijenjaju učinkovitost uklanjanja 5HT iz izvanstaničnog prostora te posredno dovode do kompenzacijskih promjena u aktivnosti 5HT receptora i metabolizmu serotonina.

5HTT predstavlja ciljno mjesto djelovanja lijekova iz skupine selektivnih inhibitora povratnog unosa serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI), koji se široko primjenjuju u liječenju psihijatrijskih bolesti poput depresije i anksioznosti. Svoj antidepresivni učinak SSRI ostvaruju blokirajući aktivnost serotoninskog prijenosnika na membrani presinaptičkog neurona, što dovodi do porasta izvanstanične koncentracije 5HT te posljedično do povećanja njegovog djelovanja na postsinaptičke receptore. Iako SSRI djeluju prvenstveno na 5HT prijenosnik, eksperimentalno je pokazano da antagonisti receptora 5HT1A ubrzavaju njihov učinak, što je dovelo do zaključka da je za postizanje kliničkog učinka važna desenzitizacija somatodendričkih autoreceptora 5HT1A. Unatoč široke primjene SSRI-a, iz kliničke prakse poznato je da samo dio bolesnika (do 50 %) pozitivno odgovara na terapiju. Kliničke studije pokazale su povezanost farmakoterapijskog odgovora na SSRI s polimorfizmom u promotoru gena za 5HTT, što upućuje na ulogu konstitucijske serotoninske homeostaze u odgovoru pojedinca na terapiju. Razumijevanje povezanosti konstitucijskih razlika u homeostazi serotonina i varijabilnosti odgovora na terapiju antidepresivima iz skupine SSRI od značaja je za mogućnost uvođenja individualizirane terapije u kliničku praksu.

Animalni modeli predstavljaju važan alat u istraživanju uloge serotonina u različitim (pato)fiziološkim procesima. Uz brojne farmakološke modele kod kojih se primjenom specifičnih serotonergičnih lijekova postiže pojačanje ili smanjenje 5HT transmisije, posljednjih je petnaestak godina manipulacijom gena koji kodiraju regulatorne proteine 5HT

sinapse (prijenosnik, receptore i metaboličke enzime) razvijeno više genetičkih modela glodavaca sa promijenjenom homeostazom serotonina.

Jedan od genetičkih modela štakora sa promijenjenom 5HT homeostazom je i model razvijen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković. Usmjerenom selekcijom životinja prema ekstremnim vrijednostima razine trombocitnog serotonina i brzine unosa serotonina u trombocite, dobivene su dvije sublinije s konstitucijski visokom odnosno niskom aktivnošću trombocitnog 5HTT. Sublinije, nazvane 5HT-visoka i 5HT-niska, čine model Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakor. Dosadašnja neurofarmakološka i bihevioralna istraživanja upućuju da životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju povećanu aktivnost središnjeg serotoninskog sustava u usporedbi sa životinjama iz 5HT-niske sublinije. Naša je pretpostavka da bi WZ-5HT štakor mogao predstavljati koristan animalni model za istraživanje uloge konstitucijske serotoninske homeostaze u odgovoru na terapiju antidepresivima.

Glavni cilj rada je karakterizacija WZ-5HT sublinija štakora sa promijenjenom serotoninskom homeostazom s obzirom na odabrane biokemijsko-molekularne i bihevioralne parametre, manjim dijelom bazalno, a prvenstveno nakon farmakološki izazvanog porasta serotonergične aktivnosti sistemskom primjenom SSRI-a fluoksetina.

U skladu s tim, specifični ciljevi rada su usporedba 5HT-sublinija s obzirom na:

- aktivnost 5HTT i razinu 5HT u perifernom (trombociti, plazma) i središnjem (mozak) odjeljku (biokemijske promjene)
- ekspresiju gena koji kodiraju 5HTT i receptor 5HT1A u odabranim regijama mozga
- emotivno-kognitivne, lokomotorne i istraživačke aspekte ponašanja životinja korištenjem specifičnih bihevioralnih testova.

Rezultati usporedbe učinka fluoksetina na životinje iz 5HT-sublinija trebali bi omogućiti bolje razumijevanje neurobioloških mehanizama koji stoje u podlozi individualnih razlika u terapijskom učinku lijekova koji djeluju putem inhibicije serotoninskog prijenosnika. Pored toga, farmakološka karakterizacija WZ-5HT sublinija štakora od značaja je za daljnje vrednovanje našeg eksperimentalnog modela kao oruđa za translacijska istraživanja fokusirana na ulogu serotoninskog sustava u zdravlju i bolesti.

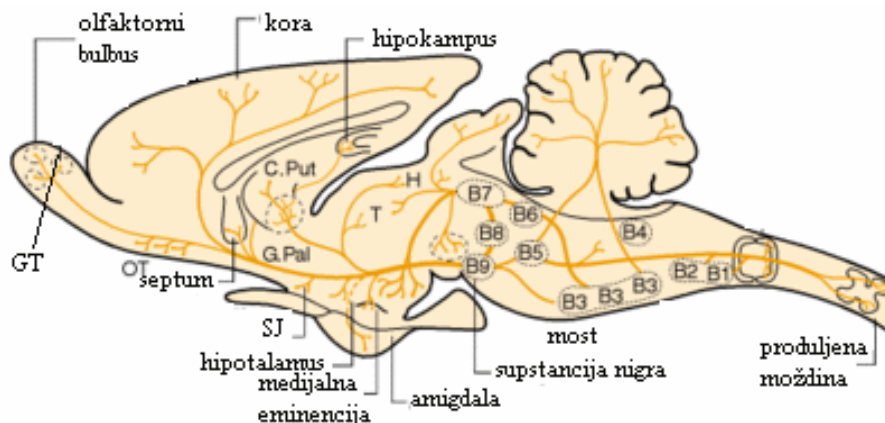
*Literaturni pregled*



## 2.1. Serotonin (5HT)

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biogeni amin uključen u regulaciju različitih vrsta ponašanja i fizioloških funkcija, poput spavanja, seksualnog ponašanja, pažnje, pamćenja, hranjenja, motoričkih funkcija, agresije, disanja, termoregulacije, te funkcija kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sustava (Varga i sur., 2011.). Poremećaji serotoninске homeostaze povezuju se sa velikim brojem psihijatrijskih poremećaja, poput depresije, anksioznosti, shizofrenije, anoreksije te različitih vrsta ovisnosti (Lucki, 1998.; Hensler, 2006.).

Tijela serotonergičnih neurona grupirana su u jezgrama rafe (lat./grč. *nuclei raphe*, B<sub>1</sub>-B<sub>9</sub>) smještenima u moždanom deblu. Rostralni serotonergični sustav čine dorzalne (B<sub>6</sub> i B<sub>7</sub>) i medijalne jezgre rafe (B<sub>5</sub>, B<sub>8</sub> i B<sub>9</sub>), koje šalju svoje projekcije u veliki mozak gdje inerviraju gotovo sve njegove regije, i kao takav sudjeluje u percepciji, kogniciji, cirkadijalnim ritmovima, reprodukciji te unosu hrane. Kaudalni serotonergični sustav kojeg čine B<sub>1</sub>-B<sub>4</sub> jezgre rafe šalje svoje projekcije u kralježničku moždinu te je uključen u regulaciju autonomnog živčanog sustava, motorne aktivnosti te kontrole boli (Jacobs i Azmitia, 1992.; Lesch i Waider, 2012.). Smještaj i projekcijska područja serotonergičnih jezgara prikazana su na slici 2.1.



**Slika 2.1.** Smještaj serotonergičnih jezgara i njihova projekcijska područja u mozgu štakora (izvor: neurobank.org). OT: olfaktorni tuberkul, T: talamus, H: habenula, G. Pal: globus palidus, C. Put: putamen, GT: glomerularni sloj, SJ: suprahijazmatska jezgra.

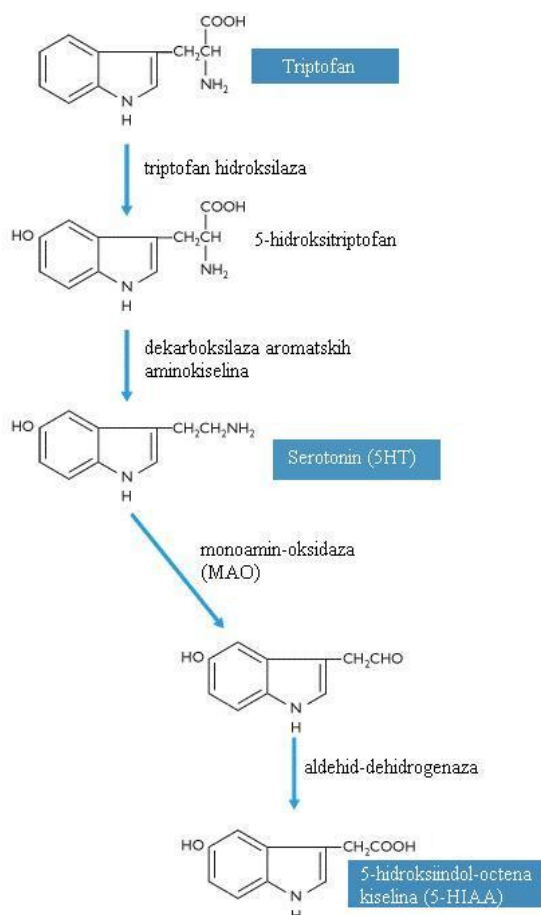
Osim što djeluje kao neurotransmiter, serotonin ima važnu ulogu i u plastičnosti mozga djelovanjem na rast i formiranje neurona, njihovu migraciju, proliferaciju i apoptozu. Serotoninski neuroni među prvima su koji se formiraju tijekom razvoja živčanog sustava te šalju svoje projekcije u udaljene dijelove mozga gdje djeluju na razvitak pojedinih njegovih regija (Azmitia, 2001.; Homberg i sur., 2010.). Kod štakora, prva serotonergična vlakna

pojavljaju se već 12.-13. gestacijskog dana, kada se počinju razvijati jezgre rafe. Čak i prije razvoja jezgara rafe, u mozgu fetusa prisutan je serotonin koji se sintetizira izravno u placenti iz egzogenog izvora. Pokazano je da taj egzogeni izvor prekursor serotonina triptofan, koji potječe od majke te se u placenti pretvara u serotonin i ulazi u cirkulaciju fetusa. Uz to, funkcionalni proteini serotonergične sinapse, 5HT receptori te serotoniniski prijenosnik izraženi su u mozgu prije formiranja serotoniniskih neurona (Bonnin i sur., 2011.). Zbog važnosti serotonina tijekom razvoja mozga, promjene homeostaze serotoniniskog sustava povezuju se s nastankom nekih psihijatrijskih poremećaja, te neurorazvojnih bolesti, poput autizma (Whitaker-Azmitia, 2001.).

Serotonin se sintetizira iz esencijalne aminokiseline L-triptofana (Slika 2.2.). Prvi korak u sintezi je hidroksilacija triptofana do 5-hidroksitriptofana (5HTP) pomoću enzima triptofan hidroksilaze (TPH). Ovaj enzim je prisutan u dvije izoforme, TPH1 i TPH2, koje su odgovorne za sintezu serotonina u različitim serotonergičnim odjeljcima, enterokromafinim stanicama tankog crijeva odnosno serotonergičnim neuronima jezgara rafa. Ovaj korak je ujedno i ograničavajući faktor u sintezi serotonina. 5HTP se djelovanjem dekarboksilaze aromatskih aminokiselina prevodi do samog amina, 5-hidroksitriptamina. Serotonin se metabolizira pomoću enzima monoamin-oksidge (MAO), čijim djelovanjem nastaje 5-hidroksiindol-octena kiselina (5HIAA). Glavno mjesto razgradnje serotonina na periferiji su jetra i pluća (Jonnakuty i Gragnoli, 2008.).

Sinteza serotonina u organizmu odvija se u dva metabolički odvojena sustava/odjeljka, centralnom kojeg čini središnji živčani sustav, te perifernom odjeljku. Centralni i periferni odjeljak odvojeni su, za serotonin nepropusnom, krvno-moždanom barijerom koja propušta prekursor serotonina L-triptofan i tako omogućava sintezu serotonina u serotoniniskim neuronima. Zbog toga, količina serotonina koja se stvara u centralnom odjeljku ovisi o količini perifernog triptofana koji je slobodan da prođe krvno-moždanu barijeru. Osim za triptofan, krvno-moždana barijera propusna je i za 5-hidroksitriptofan te 5-hidroksiindol-octenu kiselinu (Jonnakuty i Gragnoli, 2008.).





**Slika 2.2.** Sinteza i razgradnja serotonina

Otprilike 95 % perifernog serotonina sintetizira se i pohranjuje u enterokromafine stanice gastrointestinalnog trakta. Serotonin otpušten iz enterokromafinih stanica u cirkulaciju brzo se unosi u trombocite pomoću serotoninskog prijenosnika na membrani trombocita i pohranjuje u gusta granula. Trombocitni serotoninski sustav je biokemijski i farmakološki sličan onom u serotonergičnim neuronima mozga, i kao takav se više ili manje uspješno koristi kao periferni model centralnog serotoninskog sustava (Camacho i Dimsdale, 2000.). Zajednički elementi oba sustava su serotoninski prijenosnik, serotoninski receptor 2A (5HT<sub>2A</sub>), razgradni enzim serotonina - monoamin-oksidaza B (MAO-B izoforma; samo kod ljudi), te gusta granula u kojima se serotonin pohranjuje. Sva tri navedena proteina su u mozgu i na periferiji kodirana istim genima. Razlika između ova dva sustava je ta što trombociti nemaju enzim triptofan hidroksilazu i kao takvi ne mogu sintetizirati serotonin, već ga unose isključivo putem serotoninskog prijenosnika na svojim membranama (Lesch i sur., 1993.; Jonnakuty i Gragnoli, 2008.).

## 2.2. Regulacija aktivnosti serotoninskog sustava

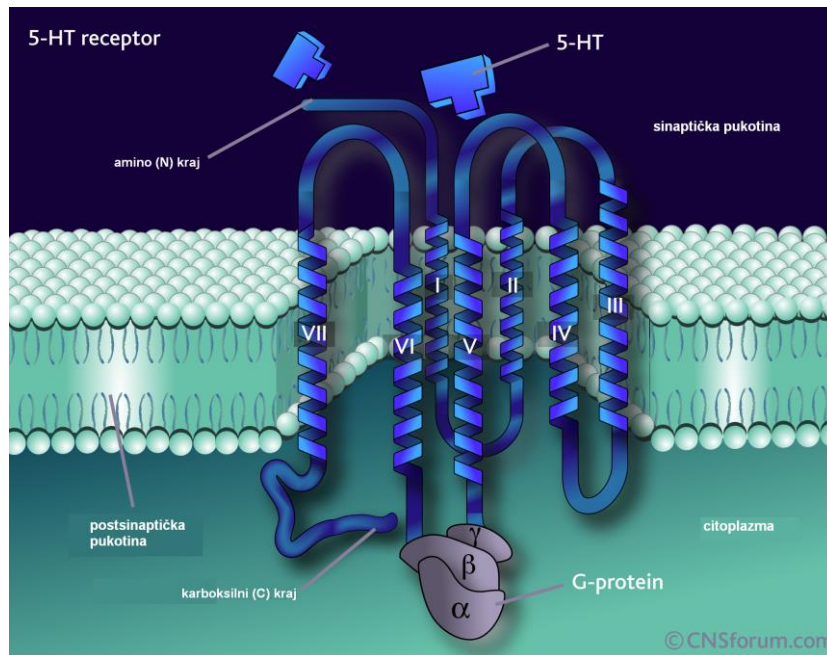
Aktivnost serotoninske neurotransmisije regulirana je putem tri osnovna mehanizma/procesa koji određuju raspoloživost serotonina u sinaptičkoj pukotini: (1) sinteza i razgradnja serotonina, regulirani djelovanjem sintetskog enzima triptofan hidroksilaze i razgradnog enzima monoamin-oksidge, (2) aktivnost i gustoća 5HT presinaptičkih autoreceptora, te postsinaptičkih 5HT receptora, i (3) uklanjanje serotonina iz sinaptičke pukotine natrag u presinaptički neuron pomoću serotoninskog prijenosnika visokog afiniteta (Holmes, 2008.).

Na periferiji, glavni mehanizam regulacije razine plazmatskog serotonina odvija se preko serotoninskog prijenosnika na membrani trombocita, koji je zadužen za uklanjanje slobodnog serotonina iz plazme (Jonnakuty i Grangoli, 2008.).

Aktivacija pojedinih 5HT receptora u središnjem živčanom sustavu povezuje se s velikim brojem fizioloških funkcija i određenih oblika ponašanja. Tako su 5HT1B receptori uključeni u regulaciju agresivnog ponašanja, migrene, te bolesti povezanih s aktivnošću bazalnih ganglija, poput Parkinsonove bolesti, dok se 5HT2A receptori povezuju s anksiolitičkim, antidepresivnim i antipsihotičnim učinkom psihoaktivnih supstanci, te imaju ulogu u kognitivnim procesima. 5HT1A receptori moduliraju ishranu, seksualno ponašanje i tjelesnu temperaturu, te imaju ulogu u emotivno-kognitivnim procesima, poput depresije i anksioznosti (Barnes i Sharp, 1999.; Hannon i Hoyer, 2008.; Holmes, 2008.; Artigas, 2013.).

### 2.2.1. Serotoninski receptor tipa 1A (5HT1A)

Serotonin svoju ulogu ostvaruje vezivanjem na membranske 5HT receptore. Do sada je opisano 14 podtipova 5HT receptora koji su grupirani u sedam obitelji, od 5HT1 do 5HT7, ovisno o njihovim farmakološkim svojstvima, aminokiselinskom slijedu, genskoj strukturi i mehanizmima prijenosa signala. Osim 5HT3 receptora, koji su ionski kanali, svi ostali serotoninski receptori su G-protein spregnuti receptori (eng. *G protein coupled*, GPC), djeluju putem proteina koji vežu gvanin-nukleotid (G-proteina), imaju visoki afinitet za serotonin, sadrže sedam hidrofobnih transmembranskih domena, s tri izvanstanične i tri unutarstanične petlje, izvanstanični amino-kraj i unutarstanični karboksilni kraj (Slika 2.3.). S druge strane, 5HT3 receptori imaju nizak afinitet za 5HT, te sadrže četiri transmembranske domene (Kroeze i Roth, 1998.).



**Slika 2.3.** Struktura i položaj G-protein spregnutog serotoniniskog receptora u staničnoj membrani (izvor: [www.cnsforum.com](http://www.cnsforum.com))

Od svih 5HT receptora, 5HT1A receptori su najšire raspoređeni. Prisutni su u velikoj gustoći u kortikalnim i limbičkim moždanim strukturama, poput hipokampusa, entorinalnog korteksa, septuma, jezgara amigdala, hipotalamusa i prefrontalnog korteksa, a njihova distribucija sugerira da imaju važnu ulogu u emotivno-kognitivnim procesima. U ovim regijama mozga, 5HT1A receptori smješteni su postsinaptički i kao heteroreceptori reguliraju aktivnost ostalih, neseserotonergičnih, neurona. Velika gustoća 5HT1A receptora postoji i u regiji tijela serotonergičnih neurona, posebice dorzalnim i medijalnim jezgrama rafe, gdje su smješteni presinaptički te kao autoreceptori sudjeluju u inhibiciji aktivnosti serotonergičnih neurona. Somatodendritični 5HT1A receptori imaju važnu ulogu u reguliranju serotonergične transmisije na način da njihova aktivacija smanjuje podražljivost serotonergičnih neurona i samim time reducira otpuštanje serotonina iz presinapse (Barnes i Sharp, 1999.; Hannon i Hoyer, 2008.; Pytliak i sur., 2011.).

Promjene u gustoći i funkciji 5HT1A receptora povezuju se sa različitim psihičkim bolestima, poput shizofrenije, depresije, suicida, paničnog poremećaja, te anksioznosti. Osim toga, novija istraživanja pokazuju da 5HT1A receptori imaju ulogu i u migraciji neurona, njihovom sazrijevanju i formiranju sinapsi, te u zaštiti živčanih stanica koje, uslijed stresa, prolaze kroz degeneraciju i apoptozu (Parks i sur., 1998.; Savitz i sur., 2009.).

5HT1A receptori uključeni su u mehanizam djelovanja antidepresivnih lijekova kao što su selektivni inhibitori povratnog unosa serotonina (SSRI) čiji učinak se povezuje sa desenzitizacijom 5HT1A receptora (Romero i Artigas, 1997., Albert, 2012.).

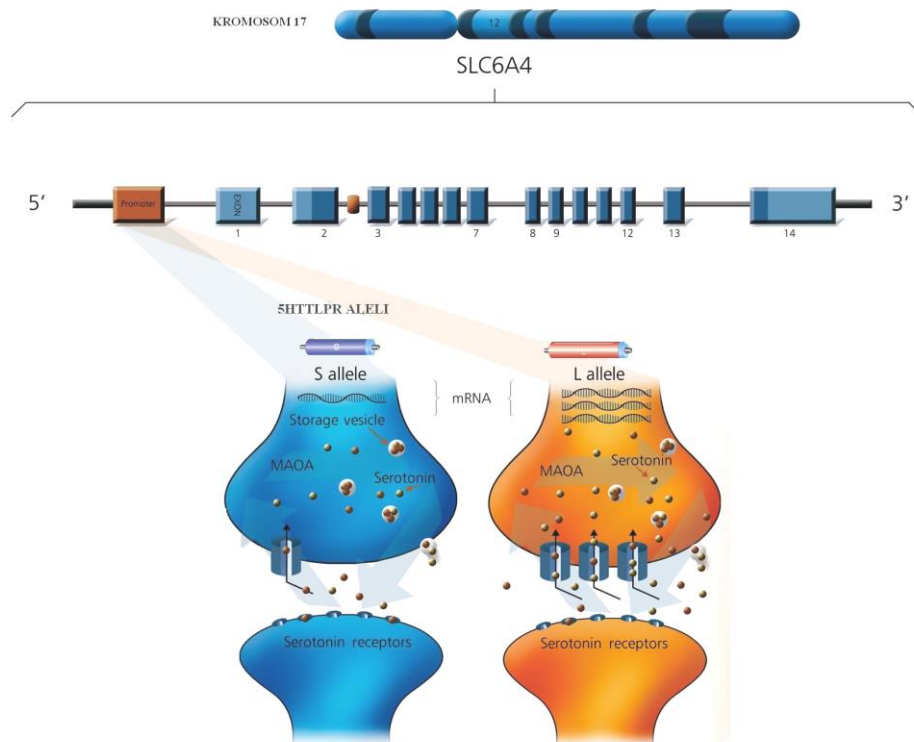
### 2.2.2. Serotoninski prijenosnik (5HTT)

Serotoninski prijenosnik (5HTT, SERT) ima vrlo važnu ulogu u reguliranju serotonergične neurotransmisije i općenito serotoninske homeostaze organizma. Njegova glavna funkcija je uklanjanje serotonina iz sinaptičke pukotine natrag u presinaptički neuron, te na taj način reguliranje dostupnosti serotonina njegovim pre- i post-sinaptičkim receptorima. 5HTT sudjeluje u modulaciji brojnih fizioloških funkcija (npr. spavanje, održavanje tjelesne temperature, itd.) i etiopatogenezi bolesti poput depresije, anksioznosti, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, bipolarnog poremećaja i dr. (Meneses i sur., 2011.). Također, 5HTT predstavlja mjesto djelovanja antidepresiva i drugih psihoaktivnih supstanci (kokain, derivati amfetamina) (Zahniser i Doolen, 2001.).

5HTT pripada velikoj obitelji integralnih membranskih proteina, s 12 transmembranskih domena, te amino- i karboksilnim-krajevima polipeptida koji se nalaze unutar stanice. Pri unosu serotonina u stanicu mijenja se konformacija prijenosnika, te se osim serotonina u stanicu unose  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  ioni, a u zamjenu iz stanica izlaze  $\text{K}^+$  ili  $\text{H}^+$  ioni, u smjeru njihovih elektrokemijskih gradijenata. Elektrokemijski gradijent  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  održava  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATP-aza. Ligand se otpušta u citoplazmu, a za 5HTT se veže stanični  $\text{K}^+$  ili  $\text{H}^+$  koji se, ponovnom promjenom konformacije, otpuštaju izvan stanice (Kristensen i sur., 2011.).

U ljudi, gen za 5HTT (SLC6A4) nalazi se na 17. kromosomu (17q11.1-17q12), a sastoji se od 14 egzona i jednog promotora. Opisano je nekoliko polimorfničkih varijanti gena, a najčešće je proučavan polimorfizam u njegovoj kontrolnoj regiji (eng. *5HTT gene-linked polymorphic region*, 5HTTLPR) lociranoj uzvodno od mjesta početka transkripcije. Identificirane su dvije forme 5HTTLPR, kratka (eng. *short*, S) i duga (eng. *long*, L) varijanta koje se međusobno razlikuju za 44 nukleotida (Lesch i sur., 1996.) (Slika 2.4.). Varijanta S 5HTTLPR je manje aktivna, što reducira transkripcijsku učinkovitost 5HTT gena, smanjuje ekspresiju 5HTT te reducira aktivan unos serotonina. Alel G funkcionalnog A/G polimorfizma jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) smještenog unutar insercijskog fragmenta alela L (rs25531) povezan je sa smanjenom transkripcijskom učinkovitosti promotora gena za 5HTT. Stoga, 5HTTLPR i rs25531 zajedno čine funkcionalni trialelni oblik polimorfizma promotorske regije gena za 5HTT. Alel L 5HTTLPR možemo

tako podijeliti na  $L_G$  i  $L_A$ , gdje je alel  $L_G$  funkcionalno ekvivalentan manje aktivnoj formi S 5HTTLPR (Hu i sur., 2006.).



**Slika 2.4.** Položaj 5HTTLPR polimorfizma u genu za serotonininski prijenosnik i učinak pojedinih alela na aktivnost sinapse (donji dio slike) (izvor: www.dialogues-cns.com)

Osim kod ljudi, postojanje 5HTTLPR polimorfizma potvrđeno je i kod nekih majmuna staroga (pavijan, makaki) i novoga svijeta (marmozet), te hominoida (orangutan, čimpanza, gorila), ali ne i u nekim drugim sisavcima poput rovk, miševa i štakora. Kod ljudi, alel S sastoji se od 14, a alel L od 16 ponavljajućih elemenata, dok su ona od 18 ili 20 ponavljajućih elemenata rijetki. Nasuprot tome, hominoidni majmuni pokazuju visoku učestalost alela s 18 i 20 ponavljajućih elemenata. Kod rezus majmuna potvrđeno je postojanje polimorfizma u 5HTTLPR regiji (rh5-HTTLPR), s dvije forme, kratkom (rhS) i dugom (rhL) varijantom, te alternativni lokus za varijaciju duljine (eng. *polymorphic locus 2*) dobiven insercijom ili delecijom 21-pb ponavljajućeg elementa (Lesch i sur., 1997.).

Drugi česti funkcionalni polimorfizam gena za 5HTT, varijabilni broj ponavljajućih ulomaka (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR), nađen je u njegovoj nekodirajućoj regiji u drugom intronu (STin2), te se sastoji od četiri varijante s 9 (STin2.9), 10 (STin2.10), 11 (STin2.11) ili 12 (STin2.12) kopija 16-17-pb ponavljajućeg elementa

(Fiskerstrand i sur., 1999.). STin2.12 označen je kao *l* varijanta, dok su sve ostale varijante alela označene kao *s* (Kim i sur., 2000.).

Polimorfizmi 5HTT gena povezuju se s neuropsihijatrijskim poremećajima poput unipolarne depresije, bipolarnog poremećaja, anksioznosti, shizofrenije i migrene (Søeby i sur., 2005.; Haddley i sur., 2008.), te s terapijskim odgovorom na antidepresive (Porcelli i sur., 2012.).

Regulacija aktivnosti serotonininskog prijenosnika može biti kratkotrajna i dugotrajna. Kratkotrajnu regulaciju aktivnosti 5HTT predstavljaju posttranslacijske modifikacije, kao što je fosforilacija koja dovodi do internalizacije 5HTT. Fosforilacija 5HTT odvija se aktivacijom protein-kinaze C ili inaktivacijom protein fosfataze 2A, pri čemu dolazi do inhibicije njegove aktivnosti (Steiner i sur., 2008.). S druge strane, mitogenom-aktivirane proteinske kinaze aktiviraju 5HTT. Tako npr., inhibicija p38 MAPK dovodi do inhibicije aktivnosti 5HTT (Ramamoorthy i sur., 2011.).

Dugotrajna regulacija aktivnosti 5HTT odnosi se na promjenu u njegovoj ekspresiji, u čemu ulogu mogu imati i genski polimorfizmi. Dodatni mehanizam regulacije aktivnosti 5HTT predstavljaju posttranskripcijske modifikacije (npr. alternativno prekrajanje gena za 5HTT pri čemu nastaju transkripti s različitim nekodirajućim sekvencama; alternativna poliadenilacija pri čemu nastaju mRNA koje na 3' kraju imaju različite netranslatirajuće regije) koje mogu dovesti do povećanog ili smanjenog broja molekula prijenosnika na membrani (Blakely i sur., 1998.).

Osim u mozgu, 5HTT možemo naći i u različitim perifernim tkivima, uključujući endotel plućnih kapilara, epitelne stanice mukoze crijeva, parafolikularne stanice štitnjače, te na trombocitnoj membrani gdje uklanja fiziološki aktivan serotonin iz krvne plazme i sudjeluje u aktivaciji trombocita (Murphy i sur., 2008.). Trombocitni i neuronski 5HTT proteini strukturno su identični, kodirani su istim genom te dijele biokemijske i farmakološke karakteristike kinetike unosa serotonina, što omogućuje da se trombocitni 5HTT koristi kao parcijalni model za istraživanje moždanog 5HTT.

Najveći dio serotonina u krvi pohranjuje se u gusta granula trombocita. Kako trombocitima nedostaje sintetski enzim triptofan hidroksilaza, njihov sadržaj serotonina ovisi o koncentraciji slobodnog serotonina u krvnoj plazmi, aktivnosti 5HT prijenosnika na membrani trombocita, te mehanizmima pohrane serotonina u gusta granula (Čičin-Šain i sur., 2005.; Jonnakuty i Grangoli, 2008.). Promjene u razini plazmatskog serotonina povezane su sa nekim poremećajima i bolestima, poput kardiovaskularnih bolesti (npr. hipertenzija, aterotromboza, koronarna arterijska bolest, i dr.), te je nužno poznavanje regulacije aktivnosti 5HTT kao glavnog mehanizma kontrole razine plazmatskog serotonina. Ova regulacija 5HT

prijenosnika odvija se u dvije faze. Na početku, kako raste razina plazmatskog serotonina, raste i aktivnost 5HTT te unos serotonina u trombocite. Nakon ovog prvotnog odgovora, kako se razina plazmatskog serotonina nastavlja povećavati, aktivnost 5HTT pada ispod bazalne vrijednosti. Na ovaj način, rast koncentracije plazmatskog serotonina ograničava svoj unos u trombocite smanjenjem aktivnosti serotoninskog prijenosnika (Mercado i Kilic, 2010.; Ziu i sur., 2012.).

### **2.3. Serotonin i ponašanje**

Serotonergična neurotransmisija modulator je različitih oblika ponašanja jedinke, uključujući emocionalno ponašanje poput straha, anksioznosti, agresije, ali i pozitivnih emocija koji rezultiraju osjećajem ugođe kao što je npr. odgovor na psihostimulanse. Osim toga, serotoninski sustav modulira složene moždane funkcije, kao što su spoznaja, senzorna obrada, te motorička aktivnost (Lesch i sur., 2003.; Albert i sur., 2012., Bagdy i sur., 2012.). Poznavanje regulacije serotoninskog sustava nužno je za razumijevanje etiopatogeneze mnogih poremećaja ponašanja.

#### **2.3.1. Emotivne funkcije: anksioznost, istraživačka aktivnost**

Kod ljudi, strah i tjeskoba predstavljaju normalno emotivno stanje i javljaju se kada se pojedinac suočava s percepcijom opasne situacije, ali ako tjeskoba potraje može dovesti do bolesti (Lesch i sur., 2003.; Bourin i sur., 2007.). Anksiozni poremećaji uključuju panični poremećaj, opsesivno-kompulzivni poremećaj, generalizirani anksiozni poremećaj, različite vrste fobija, te post-traumatski stresni poremećaj (Olivier i sur., 2013.).

Moždana područja koja su uključena u nastanak emocionalnih poremećaja su prefrontalni korteks i stražnji cingularni korteks, za koje se smatra da su uključeni u doživljavanje i obradu emocija, te hipokampus i jezgre amigdala, koji su uključeni u stvaranje i pamćenje emocija (Ressler i Mayberg, 2007.). Sva su ta područja bogato inervirana serotonergičnim neuronima.

Pokazano je da genetski čimbenici zajedno sa faktorima okoliša pridonose nastanku neuropsihijatrijskih poremećaja, uključujući anksioznost. Neki od tih okolišnih faktora su psihosocijalni faktori, interakcije u djetinjstvu, te prehrana (Razafsha i sur., 2013.). Genetski čimbenici koji su od interesa uključuju gene vezane uz nekoliko neurotransmiterskih sustava, poput serotoninskog, noradrenalinskog, dopaminskog, glutamatnog i GABA sustava; zatim uz neke peptide poput neuropeptida  $\gamma$  i opioidnih peptida; te hormone poput kortikotropin-

otpuštajućeg hormona (Kent i sur., 2002.; Olivier i sur., 2013.). Varijacije u genima koji kodiraju proteine vezane uz navedene sustave mogu pridonositi nastanku anksioznosti i srodnih poremećaja.

Nastanak anksioznosti povezuje se s poremećenom serotonergičnom neurotransmisijom koja je primarno regulirana aktivnošću 5HTT. Sve je više dokaza o povezanosti polimorfničkih varijanti gena za 5HTT i nastanka anksioznih poremećaja. Tako se genotipovi S/S i L/S polimorfizma 5HTTLPR (koji dovodi do smanjene transkripcijske aktivnosti gena za 5HTT) kod ljudi povezuju s povećanom anksioznošću (Lesch i Mössner, 1998.; Jennings i sur., 2008.; Olivier i sur., 2013.). Slični rezultati dobiveni su i na animalnim modelima. Transgenični miševi s prekomjernom ekspresijom 5HTT pokazuju smanjenu anksioznost u nekoliko različitih testova (Jennings i sur., 2006.). Životinje s inaktiviranim genom za 5HTT pokazuju promjenu u odgovoru na stres, te povećanu anksioznost i depresiju (Olivier i sur., 2013.).

Osim gena za 5HTT, polimorfizam u transkripcijskoj kontrolnoj regiji gena za 5HT1A receptor, TPH2 ili MAO-A dovodi do neravnoteže u dostupnosti serotonina, i na taj način do smanjene prilagodbe na stres i nastanka anksioznosti (Lesch i sur., 2003.; Holmes i sur., 2008.).

U istraživanjima uloge serotoninske transmisije u anksioznom poremećaju često se koriste animalni modeli pri čemu se susreću tri osnovne strategije razvoja takovih modela - genetička manipulacija, selektivni uzgoj životinja prema određenom fenotipu, te okolišne manipulacije (npr. rana izloženost stresu, kronični stres u odrasloj dobi) (Neumann i sur., 2011.) (detaljnije vidi u poglavlju 2.5.).

Tako su molekularno-genetičkim metodama razvijeni modeli glodavaca s inaktiviranim ili prekomjerno ekspimiranim genima za pojedine elemente serotonergične sinapse. Najčešće se radi o genima za koje se zna da sudjeluju u regulaciji anksioznog ponašanja, poput gena za 5HTT i receptor 1A, 1B i 2A (Lesch i sur., 2003.; Olivier i sur., 2013.).

Selektivnim uzgojem životinja prema učestalosti određenog ponašanja u testovima anksioznosti dobivene su sublinije kod kojih je, kroz nekoliko generacija, promijenjen udio gena (alela) koji su u podlozi određenog fenotipa. Kada se selekcija odvija i prema visokoj i prema niskoj razini fenotipa od interesa, dvije linije će tijekom generacija pokazivati progresivnu divergenciju, s obzirom na svojstvo od interesa kao i gene koji su u podlozi tog fenotipa, dok bi obzirom na druge osobine i gene koji su u njihovoj podlozi dvije sublinije trebale biti jednake (npr. boja krzna). Tako su selekcijom prema broju fecesa izlučenih u testu



otvorenog prostora, prema lokomotornoj aktivnosti u istom testu, prema broju ulazaka u otvorene grane uzdignutog križnog labirinta i dr. dobiveni štakori sa pojačanim anksioznim ponašanjem (Neumann i sur., 2011.; de Castro Gomes i sur., 2013.).

Anksioznost kod glodavaca definirana je kao visoka razina izbjegavanja nove i nepoznate okoline/situacije i povećana reakcija straha, te se u testovima za procjenu anksioznosti životinja najčešće mjere ti bihevioralni parametri. Većina korištenih testova bazira se na prirodnom sukobu oprečnih nagona životinje između želje za istraživanjem i nagona za izbjegavanjem nove okoline, dok se manja skupina testova bazira na uvjetovanom odgovoru na neugodni podražaj.

Prva skupina testova temelji se na prirodnoj i spontanoj reakciji životinje na stresnu situaciju kao što je npr. izlaganje životinje osvijetljenoj novoj okolini ili predatoru. U ove testove ubrajamo testove istraživanja (test otvorenog prostora (eng. *open field test*, OFT), uzdignuti križni labirint (eng. *elevated plus maze*, EPM), test svjetlo-tamne komore (eng. *light/dark box*, LDB)); socijalne testove (ultrasonična vokalizacija izazvana odvajanjem (eng. *separation-induced ultrasonic vocalization*), test socijalne interakcije (eng. *social interaction*)); te druge poput ultrasonične vokalizacije uzrokovane šokom (eng. *shock-induced ultrasonic vocalization*) te test vruće ploče (eng. *hot plate*) (Belzung i Griebel, 2001.; Sousa i sur., 2006.). Tako npr. životinja izbjegava stresnu okolinu, tj. centar aparature u OFT, otvorene grane u EPM, te osvijetljenu komoru u LDB.

Druga skupina testova bazira se na mjerenju ponašanja nalik na anksioznost u okolini koja je prethodno bila združena s nekim stresorom, i uključuje testove kondicioniranja straha (eng. *Contextual fear conditioning*, *Cued fear conditioning*, *Fear potentiated startle*), te testove izazivanja konflikta poput Vogel-ovog testa u kojem se pijenje vode povezuje sa bolnim i neugodnim stimulansom i Geller-Seifter-ovog testa u kojem životinje prethodno lišene hrane moraju birati između konzumiranja hrane i izbjegavanja bolnog stimulansa povezanog s konzumacijom hrane (Belzung i Griebel, 2001.; Sousa i sur., 2006.; Bourin i sur., 2007.; Olivier i sur., 2013.; Razafsha i sur., 2013.)

### 2.3.2. Kognitivne funkcije: učenje i pamćenje

Učenje i pamćenje (memorija) usko su povezani pojmovi. Učenje je stjecanje vještina i znanja, a pamćenje je sposobnost pohrane, klasifikacije i prizivanja naučenih znanja ili iskustva. U podlozi učenja i pamćenja nalaze se različiti oblici sinaptičke plastičnosti što podrazumijeva da uslijed strukturnih i/ili biokemijskih prilagodbi neurona dolazi do trajnih promjena sinaptičkih odnosa među njima. Postoje različiti oblici memorije i različite regije

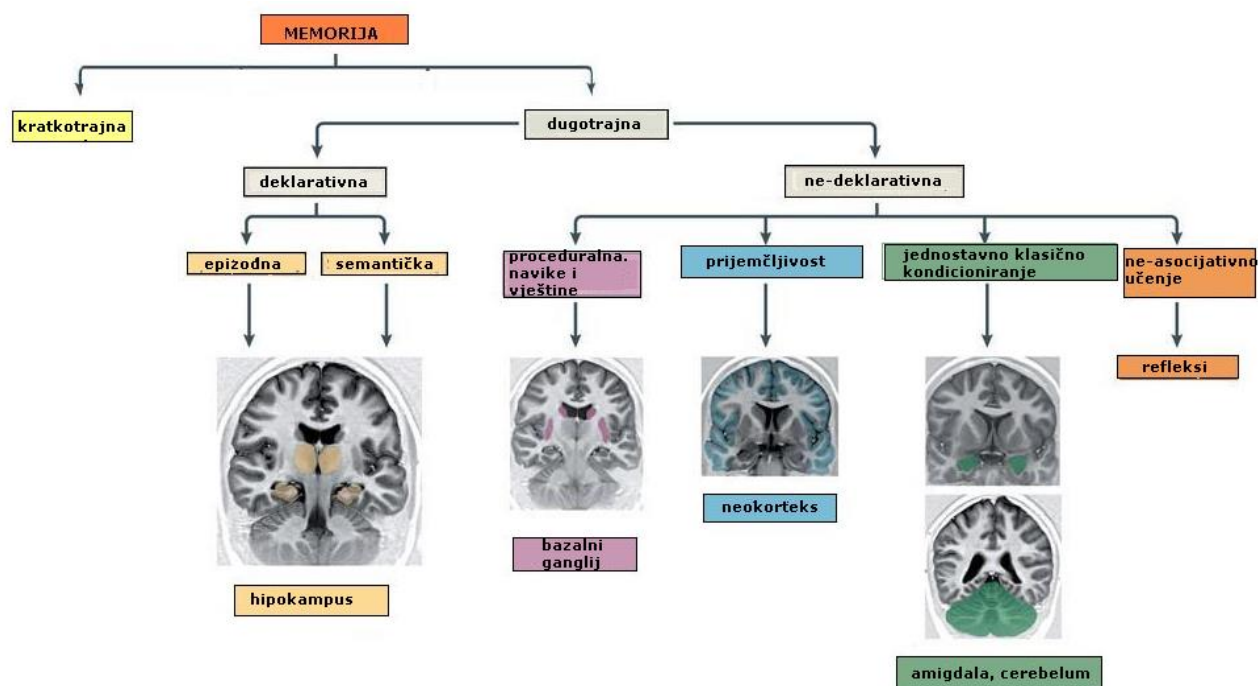
mozga sudjeluju u indukciji, skladištenju i prizivanju tih sjećanja. Slika 2.6. prikazuje općenitu podjelu memorije.

Kratkotrajna memorija brzo se formira i traje minutama ili satima, dok dugotrajna traje od nekoliko sati do nekoliko dana, tjedana ili čak godina (Cavallaro, 2008.).

Proces koji čini molekularnu osnovu dugotrajnog pamćenja naziva se dugoročna potencijacija (eng. *long-term potentiation*, LTP) i nije u potpunosti poznat, ali zna se da LTP nastaje brzo, traje dugo, asocijativna je u smislu da ovisi o zajedničkom djelovanju presinaptičke aktivnosti i postsinaptičke depolarizacije, te se pojavljuje samo u potenciranoj sinapsi, i to prvenstveno u hipokampusu (Drago i sur., 2010.).

Dugotrajna memorija obuhvaća dva osnovna tipa memorije (Slika 2.6.): deklarativnu (eksplicitnu), tj. memoriju za činjenice i događaje, koja podrazumijeva verbalni izričaj, te nedeklarativnu (implicitnu) koja nije vezana uz verbalni izričaj, a odnosi se na motoričke vještine, navike te osjetilnu percepciju događaja. Nedeklarativnu memoriju možemo podijeliti na proceduralnu, klasično kondicioniranje, prijemčljivost (eng. *priming*) i neasocijativno učenje, odnosno navike (Barco i sur., 2006.; Drago i sur., 2010.).

U nastanak različitih oblika memorije uključene su različite regije mozga, poput hipokampusu, amigdala, striatuma i neokorteksa; neurotransmiteri, poput glutamata, serotonina, dopamina i dr.; te različite signalne molekule (Perez-Garcia i Meneses, 2008.).



**Slika 2.5.** Oblici memorije i moždane regije uključene u pojedine oblike (adaptirano prema: Henke, 2010.)

Intenzivnija istraživanja uloge serotoninskog sustava u različitim aspektima kognitivnih funkcija, uključujući učenje i pamćenje započeta su relativno nedavno.

Jedan od razloga pojačanog interesa je taj što se veliki broj različitih serotoninskih receptora (5HT1A, 5HT1B, 5HT2A, 5HT6 i 5HT7) nalazi u regijama mozga povezanim sa kognitivnim funkcijama. Nadalje, pokazano je da farmakološka stimulacija ili blokada pojedinih serotoninskih receptora modulira učenje i pamćenje (Fone, 2008.; Perez-Garcia i Meneses, 2008.; Terry i sur., 2008.; Roberts i Hedlund, 2012.). Tako npr. primjena lijekova koji djeluju na funkcionalnost 5HT1A receptora rezultira modulacijom aktivnosti neurotransmitora ključnih za kogniciju, poput glutamata, GABA, te acetilkolina (Ögren i sur., 2008.).

Osim serotoninskih receptora, i drugi proteini koji sudjeluju u regulaciji homeostaze serotonina mogu modulirati učenje i pamćenje. Ovisno o farmakološkoj manipulaciji 5HTT prije ili poslije treninga, dobiveni su oprečni rezultati. Tako je pokazano da farmakološka inhibicija 5HTT prije treninga dovodi do poboljšane memorije (pregled u Monleón i sur., 2008.), nema utjecaja na memoriju (Arenas i sur., 2006.), ili dovodi do njenog pogoršanja (Monleón i sur., 2002., Arenas i sur., 2006.), dok farmakološka inhibicija nakon treninga poboljšava memoriju ili nema učinka na nju (Monleón i sur., 2002., pregled u Monleón i sur., 2008.).

Genetska manipulacija 5HTT također dovodi do promjena u kognitivnim funkcijama. Tako npr. životinje s inaktiviranim genom za 5HTT pokazuju pojačani strah u testovima kondicioniranja straha, odnosno u nedeklarativnoj memoriji (Homberg, 2012.), dok im je prostorno učenje koje je primarno vezano uz hipokampus lošije u odnosu na divlji tip životinja (Karabeg i sur., 2013.). U testu prepoznavanja novog objekta, koji mjeri deklarativnu memoriju, te životinje također pokazuju lošiji rezultat od divljeg tipa životinja (Olivier i sur., 2009.).

Postoje brojni testovi ponašanja koji se koriste u proučavanju određenih tipova memorije kod laboratorijskih životinja.

Za testiranje nedeklarativne asocijativne memorije često se koriste testovi kondicioniranja straha, te aktivno i pasivno izbjegavanje.

Testovi izbjegavanja motivirani na strahu obično koriste električnu struju kao izvor kazne. U testu pasivnog izbjegavanja, mjeri se latencija životinje da se suzdrži od prethodnog naučenog odgovora, npr. da ne dotakne hranu, da se ne spusti sa povišene platforme, da ne ulazi u sigurniji dio aparature i sl. (Myhrer, 2003.). Za razliku od toga u testu aktivnog izbjegavanja testira se sposobnost životinje da izbjegne averzivan stimulus tako da nauči određeni oblik

ponašanja, poput aktivnog prelaska u drugi odjeljak, kao odgovor na taj stimulus (Narwal i sur., 2012.).

Nedeklarativna asocijativna memorija ovisi o zajedničkom djelovanju različitih regija mozga, poput bazolateralnih jezgara amigdala i dorzalnog hipokampusu, te neurotransmitterskih sustava, poput dopamina, glutamata i serotonina (Myhrer, 2003.; Johansen i sur., 2011.; Wang i sur., 2011.).

Sposobnost pronalaska predmeta, prisjećanje prijašnjih ruta, te navigacija ovise o prostornom učenju i pamćenju, a u podlozi su deklarativne i nedeklarativne memorije, te kratkotrajne i dugotrajne memorije. Morrisov vodeni labirint jedan je od najčešće korištenih testova za testiranje prostorne memorije. Sastoji se od bazena napunjenog vodom u kojem se nalazi platforma ispod razine vode. Životinja pomoću vizualnih oznaka na okolnim zidovima pamtí položaj platforme. U podlozi ovog memorijskog sustava nalazi se hipokampus, striatum, cerebellum, amigdala, jezgre rafe i neokorteks. Glutamatni i kolinergični receptori predstavljaju najvažnije neurokemijske molekule uključene u prostorno pamćenje i obavljanje zadataka u Morrisovom vodenom labirintu, ali sve je više dokaza o ulozi serotonina u tom procesu (D'Hooge i De Deyn, 2001.; Buhot i sur., 2003; Myhrer, 2003.; Lynch, 2004.).

I drugi testovi ponašanja koriste labirinte u svrhu procjene prostorne memorije kod glodavaca. Neki od najčešće korištenih su zvjezdasti labirint (eng. *radial arm maze*), Barnesov kružni labirint (eng. *Barnes' circular maze*), te različiti oblici T-labirinta (eng. *T-maze*). U ovim testovima životinja je obično lišena hrane, te u krakovima labirinta traži hranu i pamtí njezin položaj, čime se testira prostorna i radna memorija (Carrillo-Mora i sur., 2009.; Sharma i sur., 2010.).

U podlozi deklarativne ili eksplicitne memorije nalaze se procesi u hipokampusu i strukturama medijalnog temporalnog režnja (peririnalni, entorinalni, parahipokampalni) korteksa, jezgrama amigdala, talamusu i bazalnim ganglijima (Eichenbaum i sur., 1996.; Squire i Zola, 1996., Cahill i McGaugh, 1998.). Jedan od najčešće korištenih testova za testiranje deklarativne memorije je test prepoznavanja novog objekta (eng. *novel object recognition task*), koji se temelji na spontanoj tendenciji glodavca da provodi više vremena istražujući novi objekt od već poznatoga (Eacott i Easton, 2010.).

Za testiranje proceduralne memorije, odnosno navika i vještina, koristi se npr. test dostizanja prednjom šapom (eng. *forelimb reaching*), u kojem glodavac mora naučiti dosegnuti hranu kroz uski otvor na aparaturi (Scullion i sur., 2013.).

## 2.4. Farmakološka manipulacija serotoninskog sustava

Primjenom tvari koje inhibiraju ili stimuliraju pojedine molekule/procese serotoninskog sustava moguće je manipulirati njegovu aktivnost *in vivo* te se takav pristup često koristi za istraživanje uloge i mehanizama djelovanja serotonina. Smanjenje aktivnosti 5HT sustava postiže se inhibicijom 5HT sinteze, destrukcijom 5HT neurona, blokadom 5HT receptora pomoću antagonista te blokadom pohrane u vezikule inhibicijom vezikularnog prijenosnika. S druge strane, aktivacija serotonergičke transmisije provodi primjenom prekursora u sintezi 5HT, blokadom 5HT prijenosnika, blokadom razgradnje 5HT, te aktivacijom receptora pomoću agonista.

Kao što je već ranije navedeno, serotonin se sintetizira iz L-triptofana pomoću enzima triptofan hidroksilaze (TPH). Inhibicija TPH pomoću selektivnog inhibitora paraklorofenilalanina dovodi do značajnog smanjenja serotonergične transmisije. Porast količine triptofana u prehrani može dovesti do povećanja sinteze serotonina u mozgu, dok smanjenje raspoloživosti triptofana dovodi do redukcije u sintezi serotonina. Davanjem ispitanicima smjese aminokiselina koje ne sadrže triptofan dolazi do sinteze proteina, a kako je glavna uloga triptofana izgradnja proteina, njegova razina u krvi i tkivima značajno se smanjuje. Ovo rezultira smanjenjem 5HT sinteze u mozgu i kod ljudi i kod životinja (Young i Leyton, 2002.; O'Leary i sur., 2007.). Lezije serotonergičnih neurona nakon injekcije neurotoksina 5,7-dihidroksitriptamina u jezgre rafe dovode do smanjenja serotonina i njegova metabolita 5HIAA u mozgu (Di Cara i sur., 2001.).

Inhibicijom razgradnog enzima monoamin-oksidade (MAO) sprečava se metabolizam serotonina, te se samim time povećava njegova razina, vezanje za receptore i serotonergična transmisija. Inhibicija serotoninskog prijenosnika (5HTT) također dovodi do povećanja izvanstanične koncentracije serotonina te on postaje slobodan da reagira sa obližnjim receptorima (Monleón i sur., 2008.; Horstmann i Binder, 2009.). Osim za eksperimentalna istraživanja, inhibitori monoamin-oksidade (eng. *monoamine oxidase inhibitor*, MAOI), triciklički antidepresivi, selektivni inhibitori povratnog unosa serotonina, te selektivni dualni inhibitori povratnog unosa serotonina i noradrenalina (eng. *serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor*, SNRI) primjenjuju se u liječenju različitih neuropsihijatrijskih poremećaja (Monleón i sur., 2008.; Horstmann i Binder, 2009.).

### 2.4.1. Selektivni inhibitori povratnog unosa serotonina (SSRI)

Selektivni inhibitori povratnog unosa serotonina danas su najčešće propisivani lijekovi sa antidepresivnim djelovanjem (antidepresivi, AD) zahvaljujući svojoj selektivnosti prema 5HTT i odsutnosti afiniteta prema drugim prijenosnicima za monoamine (dopamin i noradrenalin) i receptorima (muskarinski, histaminski, alfa-adrenalinski). Upravo je selektivnost razlog smanjenih nuspojava u odnosu na druge antidepresive (tricikličke, inhibitore MAO). Kao što je već spomenuto, SSRI svoju aktivnost vrše vezujući se za 5HTT i povećavajući izvanstaničnu koncentraciju serotonina i njegovu dostupnost pre- i post-sinaptičkim 5HT receptorima.

SSRI se koriste u liječenju unipolarne depresije, anksioznih poremećaja (panični napadaj, posttraumatski stresni poremećaj, opsesivno-kompulzivni poremećaj, generalizirana anksioznost, fobije, socijalna anksioznost), poremećaja prehrane (bulimija) i kronične boli (Kent i sur., 1998.; Kroeze i sur., 2012.). U ovu skupinu lijekova ubrajaju se paroksetin, sertralin, citalopram, fluoksetin i fluvoksamin, a najčešće propisivan u toj grupi lijekova je fluoksetin, poznatiji pod svojim tvorničkim imenom Prozac.

Kod glodavaca, kao i kod ljudi, kronični tretman fluoksetinom povezan je sa smanjivanjem simptoma anksioznosti i depresije, redukcijom agresije i smanjenog libida, te redukcijom u REM spavanju. Također je pokazano da prenatalno i neonatalno izlaganje fluoksetinu kod životinja dovodi do učinaka usporedivih s onima uočenim kod ljudi. Fluoksetin prelazi placentu i ulazi u fetalnu cirkulaciju što dovodi do pojačane izvanstanične razine serotonina i, potencijalno, do neurorazvojnih promjena u fetusu. Pojačanje 5HT signalizacije tijekom razvoja može kod glodavaca dovesti do prijevremenog poroda, povećane neonatalne smrtnosti uslijed kardiovaskularnih poremećaja, te smanjene porođajne težine (Olivier i sur., 2011.a). Osim ovih neonatalnih posljedica vezanih uz težinu i kardiovaskularne poremećaje, izlaganje glodavaca fluoksetinu u ranoj životnoj dobi dovodi i do promjena u ponašanju. Tako oni pokazuju povećanu imobilnost u testu prisilnog plivanja (eng. *forced swim test*), smanjeno istraživačko ponašanje i povećano ponašanje nalik na anksioznost tijekom odrasle dobi (Homborg i sur., 2011.b; Olivier i sur., 2011.b). Prenatalno izlaganje glodavaca fluoksetinu dovodi i do nekih pozitivnih ishoda, poput smanjene impulzivnosti, poboljšanog učenja i pamćenja u Morrisovom vodenom labirintu, te boljeg učenja u testovima pasivnog izbjegavanja. Izlaganje fluoksetinu u adolescentskoj dobi dovodi do ponašanja nalik na depresiju i anksioznost kod odraslih životinja (Olivier i sur., 2011.a).

U našim istraživanjima na Wistar-Zagreb 5HT modelu štakora fluoksetin je korišten za aktivaciju serotoninskog sustava.

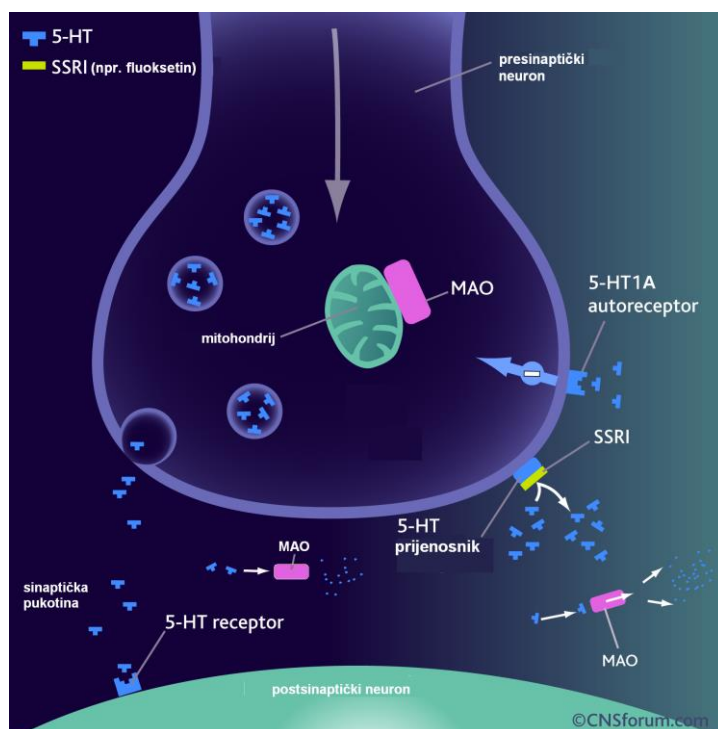
### 2.4.2. Mehanizam djelovanja fluoksetina

Fluoksetin je vrlo potentan inhibitor povratnog unosa 5HT *in vitro* i *in vivo*. Komercijalno dostupan lijek sadrži jednaku količinu S i R enantiomera, a oba inhibiraju povratan unos serotonina i učinkovito dovode do funkcionalnog odgovora vezanog uz povećanu serotonergičnu transmisiju. Glavni metabolit fluoksetina je norfluoksetin koji se također pojavljuje u obliku dva enantiomera, S i R. Norfluoksetin je također potentan inhibitor povratnog unosa serotonina, no, za razliku od R i S enantiomera fluoksetina koji su podjednako potentni, S norfluoksetin je 20 puta potentniji od R oblika i *in vitro* i *in vivo*. Fluoksetin i norfluoksetin inhibiraju *in vitro* povratni unos 5HT u trombocite štakora s IC50 od 70 i 100 nM, i u trombocite ljudi s IC50 od 54 i 370 nM (Wong i sur., 1993.; Wong i sur., 1995.).

Fluoksetin, kao i većina danas dostupnih antidepresiva, svoj prvotni farmakološki učinak vrši unutar nekoliko sati, ali je za postizanje značajnog kliničkog napretka potrebno 2-3 tjedna primjene ovih lijekova, što je dovelo do zaključka da vezanje na 5HTT nije jedini mehanizam njihovog djelovanja. Vezivanje fluoksetina na 5HT prijenosnik dovodi do negativnih alosteričkih modulacija prijenosnika uslijed čega u sinaptičkoj pukotini ostaje više serotonina koji je slobodan da reagira sa obližnjim receptorima i da putuje do udaljenijih receptora (Romero i Artigas, 1997.).

Akutni tretman fluoksetinom dovodi do porasta razine izvanstaničnog serotonina u jezgrama rafe, što aktivira presinaptičke 5HT1A, 1B i 1D receptore te na taj način smanjuje podražljivost serotonergičnih neurona i reducira otpuštanje dodatnog serotonina. Nakon otprilike četiri tjedna, dolazi do desenzitizacije (smanjenja osjetljivosti) presinaptičkih inhibitornih 5HT receptora te porasta koncentracije serotonina u sinaptičkoj pukotini koja postiže terapijski učinak (Stahl, 1998.; Dawson i Nguyen, 2000.; Nutt i sur., 1999.; Le Poul i sur., 2000.) (Slika 2.6.).

Razumijevanje ovog mehanizma omogućilo je brže ostvarivanje terapijskih učinaka SSRI sprečavanjem aktivnosti inhibicijskih 5HT1A receptora. Npr., zajednička primjena pindolola, inhibitora 5HT1A receptora, i SSRI dovodi do bržeg postizanja potrebne razine serotonina u sinaptičkoj pukotini i terapijskog učinka (Nutt i sur., 1999.).



**Slika 2.6.** Mehanizam djelovanja SSRI (izvor: [www.cnsforum.com](http://www.cnsforum.com))

### 2.4.3. Bihevioralni učinci fluoksetina

Primjena 5HTT inhibitora, uključujući fluoksetin, dovodi do niza bihevioralnih promjena koje se povezuju sa porastom serotonergične transmisije i pokazuju ovisnost o vremenu i primijenjenoj dozi (Tablica 2.1.). Brojni podaci na životinjama pokazuju npr. da SSRI mogu utjecati na ponašanja nalik na anksioznost kod glodavaca, što je u skladu s ulogom središnjeg 5HT u modulaciji tih ponašanja. Međutim, studije često daju kontradiktorne rezultate, odnosno pokazuju anksiolitičke učinke (SSRI smanjuje anksioznost), anksiozene učinke (SSRI povećava anksioznost) ili pak odsutnost učinka. Pomoću EPM i OFT, koji omogućavaju razlikovanje između ponašanja nalik na anksioznost i lokomotornog ponašanja, uočeno je da jednokratni tretman fluoksetinom u OFT nema učinka na anksioznost (Liu i sur., 2010.); dok u EPM testu životinje nakon jednokratne injekcije fluoksetina pokazuju anksiozene učinke (smanjuje broj ulazaka u otvorene krake, te vrijeme provedeno u njima) (Silva i Brandão, 2000.; Drapier i sur., 2007.; Liu i sur., 2010.; Ravinder i sur., 2011.), anksiolitične učinke (Griebel i sur., 1999.), ili da nema učinka (Griebel i sur., 1997.). Višekratni tretman fluoksetinom dovodi do anksioznog učinka (File i sur., 1999.); ili je bez učinka (Durand i sur., 1999.; Silva i Brandão, 2000.; Dulawa i sur., 2004.; Norcross i sur., 2008.) u oba ova testa. U testu na ploči sa rupama, broj koliko puta životinja gurne glavu u



centralne u odnosu na periferne rupe mjera je koja se tumači kao razina anksioznog ponašanja. U istraživanjima učinka fluoksetina na ovaj oblik ponašanja, pokazano je da kod štakora fluoksetin ima anksiogeni učinak (smanjuje broj koliko puta životinja gurne glavu u centralne u odnosu na periferne rupe), ali nema učinka na njezino lokomotorno ponašanje (Enginar i sur., 2008.), dok kod miševa samo veće doze fluoksetina dovode do smanjenog broja guranja glave u centralne u odnosu na periferne rupe, ali i do smanjene lokomocije (Kliethermes i Crabbe, 2006.).

Osim emotivnog ponašanja, sistemska primjena SSRI modulira i različite aspekte kognitivnog ponašanja, no ni u tom slučaju nema jednoznačnih zaključaka. Tako npr. u Morrisovom vodenom labirintu kronični tretman fluoksetinom ne dovodi do razlika u učenju položaja skrivene platforme kod štakora, kao ni u prostornoj memoriji (Yau i sur., 2002.; Ampuero i sur., 2013.); dok su Sass i Wörtwein (2012.) pokazali da kronični tretman fluoksetinom nije doveo do razlika u učenju, ali fluoksetinom tretirani štakori imaju umanjeno pamćenje (prizivanje položaja platforme) u usporedbi sa štakorima tretiranim fiziološkom otopinom. Monleón i sur. (2001.) pokazali su da akutni tretman fluoksetinom kod miševa ne narušava inhibitorno učenje izbjegavanja, dok je kronični tretman doveo do pogoršanja nedeklarativne asocijativne memorije (Monleón i sur., 2002.).

## 2. LITERATURNI PREGLED

**Tablica 2.1.** Literaturni pregled koji opisuje učinak primjene fluoksetina na bihevioralni odgovor životinja u različitim testovima ponašanja.

Referenca	Animalni model	Doza/trajanje tretmana/način primjene	Korišteni test	Učinak
Griebel i sur., 1997.	Sprague-Dawley štakor	1, 3 ili 10 mg/kg tt/ 30 min prije testa/s.c.	Uzdignuti križni labirint	∅
File i sur., 1999.	HDS i LDS štakori	10 mg/kg tt/ 14 dana/i.p.	Uzdignuti križni labirint	Anksiogeni učinak kod HDS štakora
Durand i sur., 1999.	Wistar-Kyoto i SHR štakori	5 ili 10 mg/kg tt/ 14 dana/i.p.	Uzdignuti križni labirint/ Test otvorenog prostora	∅
Griebel i sur., 1999.	Wistar-Kyoto štakor	20 mg/kg tt/1 injekcija 24 sata prije testa/i.p.	Uzdignuti križni labirint	Anksiolitički učinak
Silva i Brandão, 2000.	Wistar štakor	5.6 ili 10 mg/kg tt/ 30 min prije testa/i.p. 10 mg/kg tt/14 dana/p.o.	Uzdignuti križni labirint	Anksiogeni učinak- jednokratna primjena ∅-višekratna primjena
Monleón i sur., 2001.	OF1 miš	5, 10 ili 20 mg/kg tt/4 dana nakon 1injekcije/i.p.	Test inhibitornog izbjegavanja	∅
Monleón i sur., 2002.	CD1 miš	20 mg/kg tt/21 dan/i.p.	Test inhibitornog izbjegavanja	↓ nedeklarativnu asocijativnu memoriju
Yau i sur., 2002.	Lister Hooded štakor	10 mg/kg tt/ 28 dana/p.o.	Morrisov vodeni labirint	∅
Dulawa i sur., 2004.	BALB/cJ, DBA/2J i C57BL/6J miševi	0, 5 ili 10 mg/kg tt/ 30-33 dana/p.o.	Test otvorenog prostora	∅
Kliethermes i Crabbe, 2006.	WSC miš	5, 15 ili 25 mg/kg tt/ 30 min prije testa/i.p.	Ploča s rupama	∅-5 i 15 mg/kg tt Anksiogeni učinak-25 mg/kg tt
Drapier i sur., 2007.	Wistar štakor	5 ili 10 mg/kg tt/ 30 min prije testa/i.p.	Uzdignuti križni labirint	Anksiogeni učinak

Referenca	Animalni model	Doza/trajanje tretmana/način primjene	Korišteni test	Učinak
Enginar i sur., 2008.	Wistar štakor	5 ili 10 mg/kg tt/ 30 min prije testa/i.p.	Ploča s rupama	Anksiogeni učinak
Norcross, 2008.	BALB/cJ i C57BL/6J miševi	9-10 ili 17-18 mg/kg tt/ 28 dana/p.o.	Uzdignuti križni labirint/ Test otvorenog prostora	Ø
Liu i sur., 2010.	C57BL/6J miš	10 mg/kg tt/30 min prije testa/i.p.	Uzdignuti križni labirint/ Test otvorenog prostora	Anksiogeni učinak-EPM Ø-OFT
Ravinder i sur., 2011.	Wistar štakor	10 mg/kg tt/60 min prije testa/i.p.	Uzdignuti križni labirint	Anksiogeni učinak
Sass i Wörtwein, 2012.	Wistar štakor	10 mg/kg tt/21 dan/i.p.	Morrisov vodeni labirint	↓ prizivanje položaja platforme
Ampuero i sur., 2013.	Sprague-Dawley štakor	0.7 mg/kg tt/28 dana/i.p.	Morrisov vodeni labirint	Ø

HDS i LDS štakori (eng. *high and low sensitive to the hypothermic effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT*), SHR štakor (eng. *spontaneously hypertensive rat*), WSC miš (soj miša dobiven od 8 različitih sojeva: A, AKR, BALB/c, C3H/2, C57BL, DBA/2, Is/Bi, i RIII), i.p. = intraperitonealno, p.o. = oralno, s.c. = subkutano, Ø = nema učinka

#### 2.4.4. Farmakogenetika SSRI: uloga polimorfizama gena za 5HTT

U liječenju depresije, čak 30-40 % svih oboljelih ne pokazuje zadovoljavajući odgovor na početni izbor lijeka, i ponekad je potrebno čak i do 6 tjedana kako bi identificirali te pacijente. Individualna varijabilnost u odgovoru na farmakoterapiju može biti rezultat prisutnosti različitih genetskih polimorfizama. Farmakogenetika proučava genetske osnove sposobnosti pojedinca da odgovori na farmakoterapiju. Njezina primjena u praksi dovodi do poboljšanog ishoda farmakoterapije pružajući individualiziranu i znanstveno utemeljenu odluku o liječenju. Među genima prepoznatim kao relevantnim za učinak antidepresiva, gen za 5HTT vjerojatno je najvažniji, budući da se polimorfizam ovog gena u brojnim kliničkim istraživanjima povezuje s odgovorom pojedinca na farmakoterapiju (Steimer i sur., 2001.; Seretti i sur., 2002.; Rausch, 2005.).

Pojedinci sa jednom ili dvije kopije alela S polimorfizma 5HTTLPR (40-70 % populacije) pokazuju višu razinu anksioznosti, veći unos alkohola, skloniji su debljanju, pušenju i kockanju, osjetljiviji su na traume iz djetinjstva, pokazuju socijalnu agresiju ali i crvenilo od stida, u usporedbi sa pojedincima sa genotipom LL. S varijanta 5HTTLPR polimorfizma povezana je sa poboljšanjem u velikom broju spoznajnih funkcija, poput donošenja odluka, pasivnog izbjegavanja, te nesklonosti riziku (Lesch i sur., 1996.; pregled u Homberg i Lesch, 2011.).

Osim sa emotivnim i kognitivnim funkcijama, 5HTTLPR polimorfizam povezuje se i s drugačijim odgovorom pojedinaca na pojedine antidepresive. Tako osobe sa genotipom LL imaju bolji odgovor na tretman sa fluoksetinom, kao i sa nekim drugim SSRI (Rausch i sur., 2002.; pregled u Lesch i Gutknecht, 2005.; Porcelli i sur., 2012.).

Ispitivanja utjecaja VNTR polimorfizma na učinkovitost terapije antidepresivima imaju proturječne rezultate, gdje je jedna studija pokazala da nema povezanosti između *l* alela i boljeg odgovora na terapiju SSRI (Ito i sur., 2002.), a druga je izvijestila o boljem učinku SSRI u osoba nosioca *l* alela VNTR (Kim i sur., 2000.).

Danas je moguće proučavati ulogu 5HTT koristeći metode za funkcionalno oslikavanje mozga, poput pozitronske emisijske tomografije (eng. *positron emission tomography*, PET), jednofotonske emisijske računalne tomografije (eng. *single photon emission computed tomography*, SPECT), te tehnike magnetne rezonancije (eng. *magnetic resonance imaging*, MRI). Takve studije pokazale su da, ili nema povezanosti između odgovora na liječenje i popunjenosti 5HTT nakon liječenja (Catafau i sur., 2006.; Cavanagh i sur., 2006.; Herold i sur., 2006.), ili je kod bolesnika s boljim odgovorom na farmakoterapiju sa SSRI došlo do povećane dostupnosti ili vezivanja radioliganda na serotoninški prijenosnik (Carey i sur., 2004.; Kugaya i sur., 2004.; Miller i sur., 2008.; Lanzenberger i sur., 2012.; Baldinger i sur., 2014.). Razlog za to vjerojatno proizlazi iz različitih metodoloških pristupa koji se primjenjuju, poput korištenja različitih radioliganada, njihovom specifičnošću za pojedini prijenosnik, te kvaliteta slika koje nastaju njihovim korištenjem.

Osim kod ljudi, tehnike oslikavanja mozga primjenjuju se i kod životinja. Rezultati dobiveni na štakorima pokazuju smanjenu aktivnost 5HTT u hipotalamusu, hipokampusu, te kortikalnim regijama mozga nakon tretmana fluoksetinom (Bouet i sur., 2012.). Kod majmuna, višekratni tretman fluoksetinom dovodi do povišenog vezivanja radioliganda [<sup>11</sup>C]DASB na serotoninški prijenosnik u regijama kao što su lateralno temporalni režanj, cingulorni te orbitofrontalni korteks (Shrestha i sur., 2014.).

### 2.4.5. Farmakokinetika fluoksetina

Fluoksetin je najčešće korišten lijek u terapiji neuropsihijatrijskih bolesti. Dobro se absorbira iz gastrointestinalnog trakta, bioraspoloživost mu je oko 70 % a kod ljudi maksimalna koncentracije u plazmi postiže se 6-8 sati nakon primjene. U minimalnoj terapijskoj dozi fluoksetin zauzima preko 80 % molekula 5HT prijenosnika, a trajanje njihove zauzetosti iznosi oko 50 sati. Smatra se da je značajan dio terapijskog djelovanja fluoksetina povezan s djelovanjem njegovog aktivnog metabolita, budući da je pokazano da je razina norfluoksetina u plazmi 100-130 % veća od fluoksetina (Qu i sur., 2009.). Kod ljudi, poluvrijeme eliminacije ( $t_{1/2}$ ) fluoksetina iznosi 1-4 dana te se metabolizira u jetri pomoću enzima citokroma P450 (CYP2D6 izoforma), dok je norfluoksetin N-demetilirani metabolit s dužim vremenom poluraspada od 7-15 dana (Sawyer i Howell, 2011.).

Farmakokinetika fluoksetina razlikuje se ovisno o načinu primjene lijeka, kao i o vrsti na koju se lijek primjenjuje. Poluvrijeme eliminacije fluoksetina kod štakora je puno kraće nego kod ljudi, bez obzira na način primjene lijeka, te iznosi 2-3 sata nakon subkutane injekcije, ili 4-7 sati nakon intravenske ili oralne primjene fluoksetina. Norfluoksetin se eliminira puno sporije od fluoksetina, i opet, kod štakora to je vrijeme puno kraće nego kod ljudi i iznosi 6.5-10 sati nakon subkutane injekcije, odnosno 15 sati nakon intravenske ili oralne primjene (Caccia i sur., 1990.; Qu i sur., 2009.).

## 2.5. Genetička manipulacija serotoninskog sustava

U istraživanjima mehanizama koji su u podlozi regulacije serotonergične transmisije, vrlo važnu ulogu imaju specifični animalni modeli. Najčešće se radi o miševima s trajno inaktiviranim genom za neki od elemenata serotonergične sinapse (eng. *knock-out*, KO, miševi). Osim genetički modificiranih životinja u navedenim istraživanjima koriste se i sublinije glodavaca uzgojene prema odabranom fenotipu, najčešće određenoj bihevioralnoj osobini.

### 2.5.1. *Knock-out* i transgenične životinje

Danas postoji čitav niz genetički modificiranih glodavaca koji se koriste kao modeli za istraživanje uloge serotoninskog sustava - kao što su miševi i/ili štakori s inaktiviranim genom za 5HTT (Bengel i sur., 1998.; Homberg i sur., 2007.; Kalueff i sur., 2007. a, b; Olivier i sur., 2008.), TPH (Lesch i sur., 2012.), MAO A i B (Gingrich i Hen, 2001.; Lesch i sur., 2003.), te neki od serotoninskih receptora (Parks i sur., 1998.; Heisler i sur., 1998.; Gingrich i Hen,

2001.; Lesch i sur., 2003.; Toth, 2003.). Genetičkim manipulacijama dobiveni su i miševi s pojačanom ekspresijom gena za npr. 5HT prijenosnik (Jennings i sur., 2006.) ili 5HT1A receptor (Kusserow i sur., 2004.).

5HTT-KO miševi nemaju mogućnost povratnog unosa serotonina, što dovodi do smanjene brzine uklanjanja 5HT iz sinaptičke pukotine, te približno do peterostruko povećanja koncentracije izvanstaničnog 5HT u regijama prednjeg mozga (striatum, amigdala i hipokampus) (Bengel i sur., 1998.; Holmes i sur., 2003.b; Homberg i sur., 2007.) u odnosu na divlji tip miševa. U hipokampusu, korteksu i regiji amigdala 5HTT-KO štakora, razine 5HT i 5HIAA smanjene su približno za 50-75 %, odnosno 45-55 %, dok je u istim regijama prednjeg mozga 5HTT-KO miševa razina 5HT smanjena za 60-80 %, te također pokazano statistički značajno, ali ipak manje smanjenje razine 5HIAA (Bengel i sur., 1998., Homberg i sur., 2007.). Aktivnost sintetskog, TPH, i razgradnog, MAO-A, enzima serotonina u korteksu, striatumu i jezgrama rafe, nepromijenjena je kod ovih životinja, što pokazuje da je smanjena razina tkivnog 5HT posljedica njegovog smanjenog unosa (Homberg i sur., 2007.). Sinteza 5HT negativno je kontrolirana presinaptičkim 5HT1B autoreceptorima u terminalnim regijama, kao i somatodendričkim 5HT1A receptorima u regiji rafa. Uslijed smanjenog unutarstaničnog, i povećanog izvanstaničnog 5HT kod 5HTT-KO životinja, došlo je i do redukcije u gustoći, ekspresiji i funkciji ovih receptora u regijama mozga poput regije rafa, amigdala, hipotalamusa, ali ne i u frontalnom korteksu i hipokampusu (Li i sur., 1999.; Fabre sur., 2000.; Li i sur., 2000.; Mannoury la Cour i sur., 2001.; Jennings i sur., 2008.). Regionalno-specifična promjena vidljiva je i kod 5HT2A i 2C receptora (Holmes i sur., 2003.b; Moya i sur., 2011.). Dobiveni rezultati pokazuju da je genetička inaktivacija 5HTT dovela do selektivnih promjena u aktivnosti centralnog 5HT, te potvrđuju ulogu 5HTT u uklanjanju otpuštenog 5HT i održavanju serotonergične homeostaze.

Inaktivacija gena za 5HTT dovela je do potpunog gubitka 5HTT i u crijevu i u trombocitima ovih životinja. Kao i u mozgu, i na periferiji je sinteza 5HT ostala nepromijenjena. Razina serotonina u crijevu 5HTT-KO životinja u usporedbi sa divljim tipom je nepromijenjena, dok u trombocitima i plazmi ovih životinja gotovo i nema serotonina. Ovi podaci pokazuju da trombociti ne posjeduju alternativni prijenosnik koji bi mogao nadoknaditi gubitak 5HTT, dok u crijevu postoji alternativni putovi uklanjanja slobodnog serotonina kako ne bi došlo do toksične razine 5HT u cirkulaciji, a samim time i smrti organizma (Chen i sur., 2001.).

5HTT-KO životinje pokazuju u nekim aspektima ponašanje slično onome viđenom kod ljudi sa oblikom S polimorfizma 5HTTLPR. Inaktivacija 5HTT gena dovodi do

povećanog anksioznog i depresivnog ponašanja, smanjenog lokomotornog i istraživačkog ponašanja, ali i do poboljšavanja kognitivnih funkcija. Međutim, abnormalno ponašanje 5HTT-KO životinja varira ovisno o korištenim testovima, ali i o njihovoj genetskoj podlozi (Holmes i sur., 2003.a). Tako miševi sa C57BL/6 podlogom pokazuju ponašanje nalik na anksioznost u testovima poput OFT i EPM; dok kod miševa sa 129 podlogom nisu uočene promjene u ponašanju. Kada se 5HTT-KO miševi sa 129/Sv podlogom ispituju u testu prisilnog plivanja, pokazuju veću imobilnost od divljeg tipa, dok u testu vješanja o rep (eng. *tail suspension test*) pokazuju suprotno, odnosno antidepresivno ponašanje (Holmes i sur., 2002.; Brigman i sur., 2010.). S druge strane, miševi sa prekomjernom ekspresijom 5HTT koji imaju smanjenu izvanstaničnu koncentraciju 5HT pokazuju manju anksioznost (Jennings i sur., 2006.).

5HT1A receptor široko je rasprostranjen u mozgu sisavaca. Istraživanja na životinjama sa inaktiviranim genom za 5HT1A receptor otkrila su njegovu ulogu u ponašanjima povezanima s anksioznošću. Inaktivacija gena za 5HT1A receptor dovodi do veće anksioznosti kod takvih životinja. Ove životinje provode manje vremena u nesigurnim, otvorenim kracima testa uzdignutog labirinta, u centru uređaja za test otvorenog prostora, te u istraživanju novog objekta (Parks i sur., 1998.). Farmakološka inaktivacija 5HT1A receptora u ranom postnatalnom razvoju također dovodi do pojačanog anksioznog fenotipa, dok pojačanje ekspresije 5HT1A receptora prednjeg mozga u ranom postnatalnom razdoblju dovodi do smanjenog anksioznog fenotipa 5HT1A-KO miševa (pregled u Albert, 2012.). Miševi s prekomjernom ekspresijom 5HT1A receptora pokazuju smanjenu anksioznost, što ide u prilog pretpostavci da 5HT1A receptori imaju ključnu ulogu u kontroli anksioznog ponašanja (Kusserow i sur., 2004.). Lütgen i sur. (2005.) su pokazali da agonisti i antagonisti 5HT1A receptora imaju suprotan učinak u dva kognitivna testa, Morrisov vodeni labirint i test pasivnog izbjegavanja, gdje blokada 5HT1A receptora može dovesti do poboljšanja nekih aspekata kognitivne funkcije.

Ovisno o genetskoj podlozi, kod 5HT1A-KO životinja nađene su ili znatno povišene razine izvanstaničnog serotonina u frontalnom korteksu i hipokampusu (životinje s C57 podlogom), ili je razina izvanstaničnog serotonina ostala nepromijenjena u striatumu i hipokampusu (životinja sa 129 i Swiss Webster podlogom). Sistemska primjena fluoksetina dovodi do znatnog povišenja izvanstanične razine serotonina u mnogim regijama mozga ovih životinja u usporedbi sa divljim tipom, što sugerira da adaptivni mehanizmi koji nadoknađuju nedostatak 5HT1A receptora pod normalnim fiziološkim uvjetima nisu dovoljni da se suprotstave povišenju razine 5HT uslijed inhibicije povratnog unosa serotonina. Uz to,

primjena fluoksetina nije dovela do smanjene imobilnosti u testu vješanja o rep, što sugerira da su 5HT1A receptori potrebni za antidepresivni učinak SSRI (Toth, 2003.).

Kao što je već spomenuto, aktivnost serotoninske neurotransmisije regulirana je djelovanjem sintetskog enzima triptofan hidroksilaze. Postoje dvije izoforme, TPH1 i TPH2, koje su odgovorne za sintezu serotonina u različitim serotoninskim odjeljcima. TPH1-KO miševi pokazuju 94-96 % smanjenu količinu serotonina u krvi i gastrointestinalnom traktu, dok im je razina 5HT u mozgu u odnosu na divlji tip miševa u okviru normalnih vrijednosti. Isto tako, razina 5HIAA, mjerena u urinu sakupljenom tijekom 24 sata, kod ovih životinja smanjena je za 80 % (Liu i sur., 2008.). Ove životinje ne pokazuju razliku u različitim bihevioralnim testovima u usporedbi sa divljim tipom životinja (Savelieva i sur., 2008.). S druge strane, kod TPH2-KO miševa razina 5HT i 5HIAA smanjena je u svim regijama mozga i do 97 % u odnosu na divlji tip miševa. Čini se da mala količina 5HT dolazi iz trombocita unutar kapilara mozga. 5HT neuroni i procesi u mozgu ovih životinja su nepromijenjeni, te one pokazuju normalnu ekspresiju 5HTT i 5HT receptora. Razina 5HT na periferiji ovih životinja nepromijenjena je u odnosu na divlji tip miševa (Savelieva i sur., 2008.; Gutknecht i sur., 2012.). U odnosu na divlji tip miševa, TPH2-KO miševi imaju normalno lokomotorno i istraživačko ponašanje u različitim bihevioralnim testovima (Savelieva i sur., 2008.). TPH2-KO mužjaci pokazuju smanjenu anksioznost u OFT i EPM, dok ženke pokazuju različiti smjer ovisno o korištenom testu (Araragi i Lesch, 2013.; Gutknecht i sur., 2015.). U odnosu na divlji tip miševa, TPH2-KO miševi pokazuju blagi antidepresivni fenotip (Savelieva i sur., 2008.; Gutknecht i sur., 2015.).

U istraživanjima uloge serotonina u emotivno-kognitivnim procesima koriste se i modeli glodavaca s inaktiviranim genom za neke druge od elemenata serotonergične sinapse: 5HT1B-KO (Zhuang i sur., 1999.; Mayorga i sur., 2001.; Malagié i sur., 2002.; Buhot i sur., 2003.; Gardier i sur., 2003.; De Groote i sur., 2002.); 5HT7-KO (Sarkisyan i sur., 2010.; Roberts i Hedlund, 2012.), MAOA-KO (Lesch i sur., 2003.; Bortolato i sur., 2008.; Fox i sur., 2013.) i dr..

### **2.5.2. Životinje uzgojene prema fenotipu ponašanja**

Do danas je razvijen veliki broj sojeva miševa i štakora dobivenih selekcijom prema određenom fenotipu. Tako su selektirani sojevi miševa s manjom anksioznosti ovisno o ponašanjima u testovima anksioznosti, kao što su C57BL/6 i CD-1 miševi sa smanjenim ponašanjem nalik na anksioznost, te Balb/c, DBA/2 i A/J sojevi sa pojačanom anksioznošću u usporedbi sa drugim laboratorijski uzgojenim sojevima miševa (Crawley i sur., 1997.;



Michalikova i sur., 2010.). Kod sojeva miševa, poput C57BL/6 i CD-1, nađen je alelni oblik TPH2 gena (1473C alel) povezan s povećanom sintezom serotonina, a samim time i povišenom razinom serotonina, u usporedbi s sojevima poput BALB/c, DBA/2, te A/J kod kojih je nađen alelni oblik TPH2 gena (1473G alel) povezan sa sniženom sintezom serotonina, te čak 40 % sniženom razinom serotonina u frontalnom korteksu, striatumu, cerebelumu te hipokampusu (Guzzetti i sur., 2008.; Siesser i sur., 2010.; Yochum i sur., 2010.; Bach i sur., 2011.; Jiao i sur., 2011.).

Neki od sublinija štakora dobiveni selekcijom prema određenom tipu ponašanja su Maudsley reaktivni/nereaktivni štakori (eng. *Maudsley Reactive/Non-reactive rats*), selektirani prema broju fecesa izlučenih u testu otvorenog prostora, HAB i LAB štakori (eng. *High/Low Anxiety-related Behavior rats*) selektirani prema broju ulazaka u otvorene grane uzdignutog križnog labirinta, te sublinije selektirane prema razini izbjegavanja stresa kao što su Roman HA/LA (eng. *Roman High/Low Avoidance rats*) i Syracuse HA/LA (eng. *Syracuse High/Low Avoidance rats*) štakori (Neumann i sur., 2011.; de Castro Gomes i sur., 2013.). HAB štakori pokazuju povišeni broj 5HTT veznih mjesta i sniženu ekspresiju mRNA za 5HT1A receptor u hipokampusu, ali ne i u medijalnim i dorzalnim jezgrama rafe, u usporedbi sa LAB štakorima (Keck i sur., 2005.); viša razina ekspresije mRNA za 5HTT nađena je u hipokampusu Syracuse HA štakora u usporedbi sa Syracuse LA (Zhang i sur., 2005.); a gustoća 5HTT i 5HT1A receptora značajno je povišena u frontalnom korteksu Roman HA u usporedbi sa Roman LA štakorima (Giorgi i sur., 2003.; Klein i sur., 2014.). Čini se da je genetička selekcija prema određenom fenotipu dovela i do promjena elemenata serotoninskog sustava u određenim regijama mozga uključenih upravo u nastanak tog fenotipa.

## 2.6. Wistar-Zagreb 5HT štakor

Jedan od animalnih modela glodavaca s promijenjenom serotoninskom homeostazom predstavlja model štakora razvijen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković, nazvan Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakor (Čičin-Šain i Jernej, 2010.). Razvoj modela započet je selektivnim parenjem Wistar štakora prema ekstremnim vrijednostima razine trombocitnog serotonina (eng. *platelet serotonin level*, PSL) (Jernej i Čičin-Šain, 1990.). Nakon nekoliko generacija selektivnog parenja dobivene su sublinije koje su se konstitucijski razlikovale u tom parametru. Trombocitima, za razliku od neurona, nedostaje enzim za sintezu serotonina, te je koncentracija 5HT u njima rezultat unosa 5HT iz okolne krvne plazme. Kako je unos 5HT posredovan prijenosnikom na membrani trombocita, ubrzo se pokazalo da je parametar koji se nasljeđuje brzina unosa

serotonina u trombocite (eng. *platelet serotonin uptake*, PSU) (Čičin-Šain i sur., 1998.). Daljnja selekcija životinja odvijala se prema ekstremnim vrijednostima aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika. Kao rezultat selektivnog parenja prema ekstremnim vrijednostima PSU i PSL, dobivene su dvije sublinije štakora sa promijenjenom homeostazom serotonina, nazvane 5HT-visoka i 5HT-niska sublinija. Životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju otprilike dvostruko veće vrijednosti navedenih trombocitnih parametara u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Čičin-Šain i sur., 2005.).

Kako je trombocitni 5HTT kodiran istim genom kao i 5HTT u mozgu pretpostavljeno je da je selektivni uzgoj prema ekstremnim vrijednostima trombocitnih 5HT parametara doveo i do promjena u 5HT sustavu mozga. Daljnja neurokemijska i bihevioralna istraživanja provedena na sublinijama WZ-5HT štakora ukazuju da je zaista došlo do promjena u središnjoj serotoninskoj homeostazi. Tako je u testovima ponašanja pokazano pojačano ponašanje nalik na anksioznost kod životinja iz 5HT-visoke sublinije (Hranilović i sur., 2005.; Bordukalo-Nikšić i sur., 2010.), te pojačano ponašanje nalik na depresiju kod 5HT-niske sublinije, mada ne u svim provedenim testovima (Čičin-Šain i Jernej, 2010.). Obzirom na kognitivne sposobnosti životinja pokazano je brže učenje međuodnosa između pritiskivanja poluge i nagrade, te prostornih odnosa kod 5HT-visoke sublinije (Quevedo i sur., 2002.; Mokrović, 2011.), dok su životinje iz 5HT-niske sublinije u testu neprostorne memorije pokazale trend boljeg pamćenja objekata (Mokrović, 2011.). Osim emotivno-kognitivnih razlika, 5HT-sublinije pokazuju razliku i u sklonosti uzimanju alkohola, gdje 5HT-niska sublinija pokazuje veću sklonost unosa alkohola u dva različita testa, testu voljnog i prisilnog pijenja alkohola, kada se životinjama alkohol daje kao jedini izbor tekućine (Čičin-Šain i sur., 2004.; Mokrović, 2007.).

Mjerenje izvanstanične razine serotonina u ventralnom hipokampusu pokazala su da u bazalnim uvjetima (tendencija), kao i nakon specifičnog farmakološkog izazova (visoko značajno), postoji razlika među 5HT-sublinijama, s time da životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju višu razinu izvanstaničnog serotonina i jači odgovor na citalopram primijenjen izravno u hipokampus. Značajne, ali male razlike, pokazane su i u broju veznih mjesta za <sup>3</sup>H-citalopram u nekoliko različitih regija mozga, pri čemu je veći broj veznih mjesta nađen kod životinja iz 5HT-visoke sublinije (Romero i sur., 1998.). Razlika u ekspresiji serotoninskog prijenosnika potvrđena je kod trombocita, i na razini mRNA (Jernej i sur., 1999.) i na razini proteina (Hranilović i sur., 2001.), no nije bila prisutna u jezgrama rafe u mozgu, iako je postojala tendencija većoj ekspresiji mRNA za 5HTT kod 5HT-visoke sublinije (Bordukalo-Nikšić i sur., 2004.). Nije pronađena ni razlika u ekspresiji gena za dvije izoforme razgradnog

enzima monoamin-oksidge (Bordukalo-Nikšić, 2003.), dok je kod sintetskog enzima triptofan hidrosilaze razlika bila indikativna, ali ne i značajna (Štefulj, 2005.). Mjerenja razine mRNA i proteina za 5HT1A, 5HT1B i 5HT2A receptor u nekoliko moždanih regija pokazala su da nema razlike između sublinija u fiziološkim uvjetima, dok je izlaganje životinja kroničnom stresu dovelo do smanjenja razine mRNA za 5HT1A receptor u moždanoj kori kod 5HT-niske sublinije (Bordukalo-Nikšić, 2008.).

Bihevioralne i neurokemijske razlike među 5HT-sublinijama upućuju na povećanu serotonergičnu transmisiju kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na 5HT-nisku subliniju (Čičin-Šain i Jernej, 2010.). Istraživanja u ovom radu usmjerena su na nastavak karakterizacije sublinija WZ-5HT štakora, u bazalnim uvjetima i nakon farmakološkog izazova koji uključuje jednokratnu i višekratnu primjenu fluoksetina, s obzirom na neurokemijski, molekularni i bihevioralni odgovor ovih životinja.



## *Materijali i metode*



### 3.1. Materijal

#### 3.1.1. Pokusne životinje

U istraživanjima su korišteni štakori soja Wistar iz selektivnog uzgoja Laboratorija za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta "Ruđer Bošković" (Wistar-Zagreb 5HT, WZ-5HT). Wistar-Zagreb 5HT štakori sastoje se od dvije sublinije, 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije, s konstitucijski promijenjenim vrijednostima aktivnosti trombocitnog serotoninog prijenosnika te vrijednostima razine trombocitnog serotonina (v. Uvod, poglavlje 2.6.). Sva istraživanja provedena su paralelno na životinjama iz obje sublinije, a korištene su životinje oba spola iz F11 generacije selektivnog uzgoja. Životinje su tijekom izvođenja pokusa bile stare 2-5,5 mjeseci, a broj životinja koje su sudjelovale u pokusima bio je 6-18 u pojedinoj grupi.

Životinje su uzgajane u standardiziranim laboratorijskim uvjetima, uz slobodan pristup vodi i peletiranoj hrani za laboratorijske životinje (4RF18 GLP, Mucedola, Italija), u uvjetima 12-satnog ciklusa svjetlo-tama, pri temperaturi od  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Svi postupci sa pokusnim životinjama bili su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/19) i Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06), te odobreni od strane Bioetičkog povjerenstva Instituta "Ruđer Bošković" (BP-2339/2-2010) i Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja – Uprave za veterinarstvo (KLASA: UP/i-322-01/10-01/58). U radu s eksperimentalnim životinjama primjenjivana su pravila Europske Unije (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council).

#### 3.1.2. Kemikalije i otopine

##### *Za uzimanje uzoraka krvi*

- Eter za anesteziju životinja
- Otopina limunske kiseline, citrata i dekstroze (Solutio ACD, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska) kao antikoagulans
- Antibiotik u prahu (Geomicin, Pliva, Hrvatska) za prevenciju infekcije rane

##### *Za određivanje trombocitnog serotonina*

- HCl, 0.1 N vodena otopina
- $\text{ZnSO}_4$ , 10 % vodena otopina

### 3. MATERIJALI I METODE

---

- NaOH, 1 N vodena otopina
- L-cistein, 1 % otopina u 0.1 N HCl (Merck, Njemačka)
- O-ftaldialdehid (OPT), 0.1 % otopina u 10 N HCl (Aldrich-Chemie, SAD)
- Serotonin kreatinin sulfat, 20 µg/mL u 0.1 M HCl (Sigma, SAD)

#### *Za određivanje proteina prema M. Bradford*

- Coomassie Brilliant Blue, G-250 (Serva, Njemačka)
- Etanol, 96 %
- Fosfatna kiselina, 85 %
- Goveđi serumski albumin (BSA), 1 mg/mL destilirane vode (Serva, Njemačka)

#### *Za mjerenje aktivnog unosa serotonina u trombocite*

- <sup>14</sup>C-5-hidroksitriptamin-kreatinin-sulfat, specifične aktivnosti 57 mCi/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, Engleska)
- Krebs-Ringerov pufer bez CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 (0.154 M NaCl, 0.154 M KCl, 0.154 M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 M fosfatni pufer)
- Fiziološka otopina (0.9 % NaCl)
- Scintilacijska tekućina – Aquasol (Du Pont, NEN, Njemačka)

#### *Za mjerenje aktivnog unosa serotonina u sinaptosome*

- <sup>14</sup>C-5-hidroksitriptamin-kreatinin-sulfat, specifične aktivnosti 57 mCi/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, Engleska)
- Krebs-Henseleit-ov pufer, pH 7.4 (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.17 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.0 mM D-glukoza, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 mM pargilin)
- 0.32 M saharoza
- Fiziološka otopina (0.9 % NaCl)
- Scintilacijska tekućina – Aquasol (Du Pont, NEN, Njemačka)

#### *Za kvantitativno određivanje serotonina u krvnoj plazmi i homogenatu tkiva mozga*

- Komplet za imunoenzimatski test, ELISA (Serotonin Research EIA, Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka; Serotonin ELISA, IBL International GmbH, Njemačka)



*Za izolaciju RNA*

- Reagens za denaturaciju (G-otopina): 4 M gvanidin-tiocijanat (Sigma, SAD), 20 mM natrijev acetat, 0.5 % N-lauril-sarkozin (Sigma, SAD), 1 mM ditioneitol (Serva, Njemačka)
- Dietil-pirokarbonat (DEPC), 0.1 % otopina (Sigma, SAD)
- Fenol zasićen vodom
- Kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 49:1
- 2-propanol
- Etanol
- Kupovna sterilna voda bez nukleaza (DEPC-treated water, Ambion®, Life Technologies, Beč, Austrija)

*Za pročišćavanje RNA i uklanjanje genomske DNA*

- Komplet za izolaciju RNA (RNeasy® Mini kit, Qiagen, Njemačka)
- Enzim i pufer za digestiju DNA (RNase-Free-Dnase Set, Qiagen, Njemačka)

*Za reverznu transkripciju*

- Komplet za reverznu transkripciju (High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems, SAD)
- Sterilna voda bez ribonukleaza (Promega, SAD)

*Za lančanu reakciju polimerazom*

- Reagens za lančanu reakciju polimerazom (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, SAD)
- Oligonukleotidni početnici

Korišteni su oligonukleotidni početnici za cDNA sljedećih gena štakora: GAPDH, kao referentni gen, te serotoninški prijenosnik i serotoninški receptor 1A (5HT1A). Sekvence početnika preuzete su iz Abumaria i sur. (2006) i prikazane su u Tablici 3.1. Svi početnici nabavljeni su od tvrtke Life Technologies (Beč, Austrija). Iz liofilizata su priređene matične otopine koncentracije 100  $\mu$ M iz kojih su zatim priređene radne otopine koncentracije 10  $\mu$ M. Sve otopine su čuvane na -20 °C.

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

gen	nukleotidni slijed	veličina PCR produkta
GAPDH	5' TGCCCCCATGTTTGTGATG 3' 5' TGGTGGTGCAGGATGCATT 3'	84 pb
5HT1A	5' GTCCTGCCTTTCTGTGAAAGCA 3' 5' TATGGCACCCAACAACGCA 3'	54 pb
5HTT	5' TCTGAAAAGCCCCACTGGACT 3' 5' TAGGACCGTGTCTTCATCAGGC 3'	58 pb

#### *Za elektroforezu na agaroznom gelu*

- Agaroz (LE, analytical grade) (Promega, SAD)
- TAE pufer (0.8 M Tris, 0.2 mM octena kiselina, 0.5 M EDTA)
- Pufer za nanošenje uzoraka (50 % glicerol, 25 % bromfenol-plavo, 1 mM EDTA)
- Molekularna ljestvica: Molecular Weight Marker, 50 bp (Fermentas, Kanada)
- Etidij-bromid, 1 mg/mL (Sigma, SAD)

#### *Za farmakološki tretman*

- Fluoksetin HCl (Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, SAD)
- Fiziološka otopina (0.9 % NaCl)

#### **3.1.3. Tehnička oprema i pribor**

- Ultrazvučni dezintegrator (B. Braun Biotech International, Njemačka)
- Homogenizator (Tehtnica, Slovenija)
- Vorteks miješalica (Tehtnica, Slovenija)
- Centrifuge (Hettich, Njemačka; Superspeed RC2-B, Sorvall, SDA5417C, Eppendorf Research, Njemačka)
- Vage (Tehtnica, Slovenija; Mettler H54AR, Njemačka)
- Laboratorijska giljotina (Ugo Basile, Italija)
- Digestor (Tlos, Hrvatska)
- Naprava za separaciju plazme bogate trombocitima (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Aparatura za mjerenje kinetike serotoninskog prijenosnika (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Filter-papir GF/B i GF/C (Whatman, SAD)

- Scintilacijski brojač (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2810 TR, Perkin Elmer, SAD)
- Spektrofotometar (Ultrospec 2100 pro, Pharmacia Biotech, SAD)
- Spektrofotofluorimetar (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, SAD)
- BioSpec-nano (Spektrofotometer for Life Science, Shimadzu Biotech, Japan)
- Oprema za horizontalu elektroforezu (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- PCR aparat (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, SAD)
- Real-time PCR aparat (Applied Biosystems 7300, Life Technologies, Austria)
- Termostatirana vodena kupelj
- Magnetska mješalica (IKA Combimag RCH, Njemačka)
- Čitač mikrotitarske pločice (Stat Fax-2100, Awarness Technology, Inc., SAD)
- pH metar (pH meter 26, Radiometer, Danska)
- Skener gelova (Image Master VDS, Pharmacia Biotech, SAD)
- Automatske pipete
- Web kamera (Logitech QuickCam Fusion, SAD)
- Otvorena kutija (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Uzdignuti križni labirint (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Bazen (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Ploča sa rupama (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)
- Aparatura za mjerenje pasivnog izbjegavanja (Ugo Basile Passive Avoidance model, Italija)
- Kalup za rezanje mozga na koronalne narezke sa utorima razmaka 1 mm (Alto Brain Matrices, Roboz Surgical Instrument Co., SAD)
- Injekcijske igle za jednokratnu uporabu, 0.6-0.7 mm (Tik, Slovenija; Terumo, Belgija)
- Plastične štrcaljke 2.5 i 5 ml (Terumo, Belgija)
- Kirurški pribor (škare kiruške, iglodržač, skalpel, špatule, pincete, šivajući pribor)
- Operacionalni stolić (NKB Laboratorij, Institut "Ruđer Bošković", Hrvatska)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Selektivni odabir životinja

U postupku selektivnog odabira životinja za dobivanje 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije WZ-5HT štakora svim životinjama iz pojedine generacije u dobi od oko mjesec dana određeni su razina trombocitnog serotonina i brzina unosa serotonina u trombocite prema metodama ranije razrađenima u ovom laboratoriju (Jernej i sur. 1988, Jernej i sur. 1999). Na temelju tih rezultata odabiru se životinje s ekstremnim vrijednostima navedenih biokemijskih parametara koje su parene kako bi dale sljedeću generaciju. Nakon četiri do pet generacija selektivnog uzgoja postiglo se maksimalno moguće razdvajanje sublinija štakora s obzirom na brzinu unosa serotonina u trombocite. Životinje iz 5HT-niske sublinije pokazuju otprilike dvostruko manje vrijednosti navedenih trombocitnih parametara u usporedbi sa životinjama iz 5HT-visoke sublinije.

### 3.2.2. Koncept farmakoloških pokusa

Povezanost konstitucijskih razlika u homeostazi serotonina i učinka farmakološki izazvanog porasta serotonergične transmisije istražena je u nizu pokusa u kojima je aktivacija 5HT sustava izazvana sistemskom primjenom fluoksetina, selektivnog inhibitora povratnog unosa serotonina. Fluoksetin je primjenjivan **jednokratno** (akutno) ili **višekratno** (kronično), nakon čega smo istražili njegove **centralne** i **periferne** učinke: a) biokemijske promjene u mozgu i trombocitima, b) ekspresiju odabranih gena, te c) različite aspekte ponašanja životinja.

Fluoksetin je apliciran intraperitonealnom (i.p.) injekcijom, a ovisno o pokusu korištene su doze od 1-15 mg/kg tjelesne težine (tt) (kod jednokratne primjene), odnosno 6 mg/kg tt (kod višekratne primjene). Kod višekratne primjene, fluoksetin je apliciran svakodnevno tijekom 26 dana, uvijek u isto vrijeme (između 9:00 i 10:00 sati), a vremena uzimanja uzoraka odnosno izvođenja pojedinih testova prikazani su na slici 3.1. Fluoksetin je otapan u fiziološkoj otopini netom prije tretmana, te je životinjama injiciran volumen od 1 mL/100 g tt (kod jednokratne primjene), odnosno 0.5 mL/100 g tt (kod višekratne primjene). Uzorci krvi/tkiva su, ovisno o pokusu, uzimani od 60 minuta do 48 sati nakon zadnje injekcije fluoksetina. Doze fluoksetina, duljina tretmana i vrijeme uzimanja uzoraka, odabrane su na temelju literaturnih podataka i pilot pokusa (v. detaljno u poglavlju Rezultati). Kontrolne skupine tretirane su fiziološkom otopinom (NaCl 0.9 %, 0.5 ili 1.0 mL/100 g tt).

**Biokemijski parametri** mjerili su se nakon jednokratne i/ili višekratne primjene fluoksetina, a uključivali su: razinu serotonina u trombocitima i moždanoj kori, razinu slobodnog serotonina u plazmi, te aktivni unos serotonina u trombocite i sinaptosome izolirane iz pojedinih moždanih regija.

Nakon jednokratnog tretmana uzorci krvi i mozga uzimani su 60 minuta nakon injekcije fluoksetina dok je nakon višekratne primjene fluoksetina vrijeme uzimanja uzoraka variralo ovisno o mjerenim parametrima (Slika 3.1.).

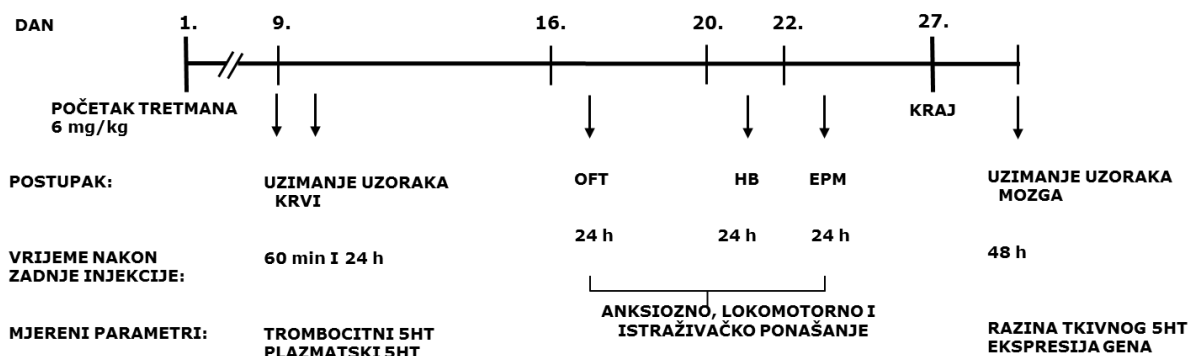
**Ekspresija gena** mjerila se na razini mRNA nakon višekratne primjene fluoksetina. Za mjerenje smo odabrali dva gena koja imaju ključnu ulogu u regulaciji serotonergične transmisije - serotoninski prijenosnik i serotoninski receptor 1A, a njihovu ekspresiju promatrali smo u tri moždane regije - korteks, hipokampus i regija jezgara rafe.

**Ponašanje životinja** koje se promatralo uključivalo je ponašanje nalik na anksioznost, lokomotorno i istraživačko ponašanje (tijekom kroničnog tretmana), te učenje i pamćenje (nakon akutnog tretmana).

Emotivno, lokomotorno i istraživačko ponašanje mjerilo se korištenjem tri različita testa ponašanja u razmacima od po nekoliko dana. Prvi je bio test u otvorenom polju (engl. *open field*), a slijedili su ga ploča sa rupama (engl. *hole board*) i uzdignuti križni labirint (eng. *elevated plus maze*). Duljina tretmana, vrsta testa, njihov redoslijed i vrijeme uzimanje uzoraka prikazano je na slici 3.1.

Asocijativno učenje i pamćenje istražili smo nakon akutne primjene fluoksetina korištenjem testa pasivnog izbjegavanja (eng. *passive avoidance task*). Životinje su primile i.p. injekciju fluoksetina (15 mg/kg tt) 30 minuta prije treninga.

Prostorno učenje i pamćenje ispitali smo koristeći Morrisov vodeni labirint. Životinje su tretirane i.p. injekcijom fluoksetina (15 mg/kg tt) tijekom četiri dana učenja, 30 minuta prije početka učenja, a peti dan se proveo test pamćenja.



**Slika 3.1.** Shematski prikaz pokusa izlaganja životinja višekratnoj primjeni fluoksetina. OFT = test otvorenog prostora; HB = ploča sa rupama; EPM = uzdignuti križni labirint

### 3.2.3. Priprava uzoraka

#### 3.2.3.1. Uzimanje uzoraka krvi

Pod laganom eterskom anestezijom, koža i površinski mišić vrata razrezali su se iznad ključne kosti te se u jugularnu venu ušlo iglom kroz prsni mišić, nakon čega se izvadilo 1 mL krvi u štrcaljke prethodno napunjene s 0.5 mL ACD antikoagulansa.

U pokusima u kojima su se određivali i trombocitni i plazmatski 5HT uzimala su se po dva uzorka krvi. Drugi uzorak uziman je tako da se na iglu ostavljenu u veni stavi nova štrcaljka s 0.5 mL ACD antikoagulansa u koju se navuče 1 mL krvi i taj uzorak uvijek je korišten za određivanje plazmatskog 5HT.

#### 3.2.3.2. Priprava plazme bogate trombocitima i plazme bez trombocita

Uzorci antikoagulirane krvi su centrifugirani u injekcionoj šprici u horizontalnom rotoru na 1050 x g kroz 25 sek. Tako dobivena supernatantna plazma bogata trombocitima (engl. *platelet-rich-plasma*, PRP) istisnuta je, uz pomoć plastičnog nastavka, u epruvete. Dio tako dobivenog PRP-a koristio se za određivanje aktivnog unosa serotonina u trombocite, a od dijela se priredio uzorak za određivanje razine serotonina u trombocitima. 750 µL PRP-a kvantitativno se prebacio u epruvetu prethodno napunjenu sa 1.6 mL fiziološke otopine te se centrifugirao 10 min na 8960 x g, nakon čega se supernatant brzo odlio, dodalo se 3 mL fiziološke otopine i recentrifugiralo, kratko ocijedilo i zamrznilo na -20 °C do daljnjeg određivanja razine trombocitnog serotonina (v. odjeljak 3.2.4.1.).

Plazma bez trombocita (eng. *platelet-free-plasma*, PFP) dobila se tako da se antikoagulirana krv centrifugirala u injekcionoj šprici 4 minute na 1050 x g. Pomoću nastavka za istiskivanje istisne se gornjih 200 µL supernatantne plazme i baci (služi da bi se nastavak

"isprao" plazmom prije uzimanja plazme za određivanje). Slijedećih 400-500  $\mu\text{L}$  plazme istisne se u Eppendorf epruvete, centrifugira 30 min na 1000 x g te se izdvojilo gornjih 100  $\mu\text{L}$  plazme u novu Eppendorf epruvetu i zamrznulo na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do određivanja razine plazmatskog serotonina (v. odjeljak 3.2.4.4.) .

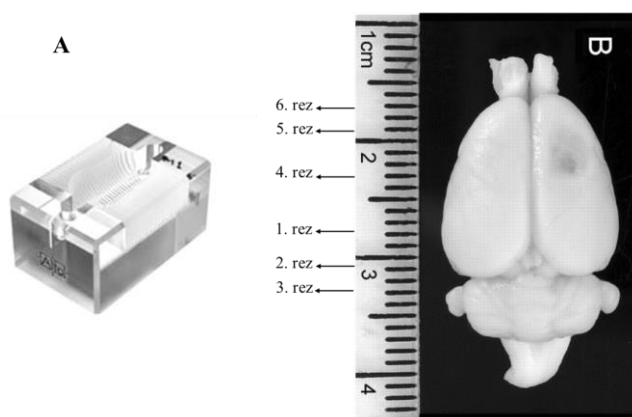
### 3.2.3.3. Uzimanje uzoraka mozga

Životinja se dekapitirala, sagitalnim rezom kože prikazao se gornji dio lubanje, škarama se zarezalo po šavovima pazeći da se ne zahvati mozak, te se odvojila kalota lubanje. Špatulom su se prerezale moždane ovojnice, te se mozak pažljivo izvadio na rashlađenu podlogu nakon čega su se uklonile mirisne lukovice.

U pokusima u kojima se uzimalo tkivo za pripravu sinaptosoma mozak se narezao na koronalne nareške debljine 3 mm te se na hladnoj podlozi sa svakog nareška izoliralo i očistilo odgovarajuće tkivo (moždana kora, hipokampus, regija rafe) koje se odmah dalje koristilo za pripremu sinaptosoma (v. odjeljak 3.2.3.4.).

U pokusima u kojima se uzimalo tkivo za mjerenje ekspresije gena, mozak se odmah nakon vađenja premjestio u kutiju sa suhim ledom gdje je lagano posut suhim ledom, te se inkubirao oko 90 sekundi kako bi se jednoliko zamrznuo. Nakon toga, mozak se stavio u rashlađeni kalup sa utorima u razmacima od 1 mm u koje se postavljaju noževi za rezanje čime je omogućeno precizno rezanje mozga na koronalne nareške. Prvi rez se postavio u regiji hipotalamusa (interaural 3.40 mm; bregma -5.60 mm) (Slika 3.2.). 3 mm iza prvog reza postavio se drugi nož kako bi se zahvatila regija jezgara rafa. 5 mm ispred prvog reza postavio se treći nož i ta regija predstavlja regiju hipokampususa. 4 mm ispred njega se postavio četvrti nož te se iz te regije izolirao korteks. 3 mm ispred četvrtog noža postavio se peti nož i uzeo narezak za prefrontalni korteks. Nakon što se sa svakog nareška izoliralo i očistilo odgovarajuće tkivo, tkivo je preneseno u prethodno izvaganu Eppendorf epruvetu, nakon čega je epruveta ponovno izvagana na analitičkoj vagi (razlika odvaga predstavlja masu tkiva). Odmah potom uzorak je zamrznut u tekućem dušiku. Na tako smrznuto tkivo dodano je 500  $\mu\text{L}$  otopine za denaturaciju (G-otopine) te je uzorak homogeniziran ultrazvukom (20 000 Hz, oko 30 sek). Homogenizirani uzorci pohranjeni su na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje obrade.

Za mjerenje razine serotonina u mozgu, tkivo je uzimano na jednak način kao i za mjerenje ekspresije gena. Nakon vaganja, uzorci su zamrznuti u suhom ledu te potom pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje obrade.



Slika 3.2. Prikaz A) kalupa za rezanje mozga na koronalne narezke i B) položaja noža i narezka mozga

#### 3.2.3.4. Priprava sinaptosoma

Izdvojeno tkivo je preneseno u prethodno izvaganu i ohlađenu Eppendorf epruvetu, nakon čega je epruveta ponovno izvagana na analitičkoj vagi, a razlika odvaga predstavlja masu tkiva. Epruvete s uzorcima se cijelo vrijeme drže na ledu. Nakon toga slijedilo je izdvajanje sinaptosoma iz moždane kore, hipokampusa i regija jezgara rafa metodom homogeniziranja laganim pokretima na homogenizatoru sa teflonskim tučkom u 10 volumena ledene 0.32 M otopine saharoze. Uzorak tkiva centrifugirao se 10 min na 1000 x g, 4 °C. 2/3 supernatanta odvojio se pipetom u novu epruvetu i recentrifugirao 10 min na 20 000 x g, 4 °C. Nakon centrifugiranja talog se pipetom resuspendirao u 8 volumena Krebs-Henseleit-ovog pufera, koji se dodavao u malim obrocima od ~100 µL. Nakon izdvajanja sinaptosoma, proteini su određeni metodom po M. Bradford (v. Materijali i metode, poglavlje 3.2.4.1.) te je preračunat volumen homogenata potreban da bi uzorci kao i prazna proba sadržavali 100 µg proteina (70-100 µL) (sinaptosoma).

#### 3.2.4. Biokemijska određivanja

##### 3.2.4.1. Mjerenje razine serotonina u trombocitima

Određivanje serotonina u trombocitima štakora započeo je dodavanjem 1.5 mL Q H<sub>2</sub>O na trombocitni talog, te stavljanjem uzoraka u ledenu kupelj. Uzorci su sonicirani 30 sek uz frekvenciju 20 kHz i amplitudu 8 µ, te se izdvoje potrebni volumeni sonikata za određivanje proteina i serotonina.

U centrifugalne epruvete redom se dodalo 1000 µL 10 % ZnSO<sub>4</sub>, 1300 µL sonikata, 500 µL 1N NaOH. U epruvete za standarde umjesto sonikata dodalo se po 1300 µL pojedinog



standarda (250, 500, 1000 ng 5HT/mL), dok se u epruvete za praznu probu dodalo 1300  $\mu$ L Q H<sub>2</sub>O. Sadržaj epruveta promiješao se na vorteksu i ostavio 5 min. Nakon toga proteini su istaloženi centrifugiranjem u horizontalnom rotoru 15 min na 1435 x g. Zatim se u nove staklene epruvete dodalo redom 1500  $\mu$ L deproteiniziranog supernatanta, 100  $\mu$ L 1 %-tne otopine L-cisteina i 2000  $\mu$ L OPT u 10 N HCl. Uzorci su se kuhali u vodenoj kupelji 10 min, nakon čega su se ohladili na sobnu temperaturu. Intenzitet fluorescencije mjeren je na spektrofotofluorimetru na valnoj duljini od 485 nm, uz ekscitacijsku vrijednost od 345 nm. Sadržaj serotonina u trombocitima računao se prema standardnoj krivulji i izrazio prema jediničnoj masi trombocitnog proteina.

Količina proteina u uzorcima trombocita određena je metodom po M. Bradford (1976). Metoda se temelji na činjenici da boja Coomassie Brilliant Blue G-250 u prisutnosti proteina prelazi iz crveno-smeđe u plavu čiji intenzitet ovisi o količini proteina u uzorku. Na 70  $\mu$ L sonikata doda se 5 mL otopine boje. Intenzitet apsorpcije uzoraka mjerio se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm 30 min nakon dodatka boje. Količina proteina odredila se pomoću standardne krivulje dobivene s poznatim količinama goveđeg serumskog albumina u koncentracijama 10, 20, 30, 40 i 50  $\mu$ g/ $\mu$ L.

#### **3.2.4.2. Mjerenje razine slobodnog serotonina u plazmi**

Razina serotonina u plazmi bez trombocita (PFP) određena je imunoenzimatskim testom (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) koristeći komplet Serotonin Research EIA (Demeditec Diagnostics GmbH). ELISA je rađena prema uputama proizvođača. Ukratko, kontrolni uzorci, standardi i uzorci štakorske plazme kvantitativno su acilirani. Antigen je vezan za krutu fazu mikrotitarske pločice. Nakon aciliranja, 100  $\mu$ L acilirane kontrole, standarda i uzorka kvantitativno se prebaci na pločicu te je dodano 25  $\mu$ L serotoninskog antiseruma i inkubirano preko noći na temperaturi od 4 °C. Acilirani uzorci i kruta faza nadmeću se za fiksni broj antiserum-vezujućih mjesta. Nakon što sustav dosegne ravnotežu, slobodni antigeni i slobodni antigen-antiserum kompleksi uklonjeni su ispiranjem. Za detekciju antitijela vezanog za krutu fazu koristio se tetrametilbenzidin (TMB) kao supstrat. Produkti reakcije mjereni su pri apsorpciji od 450 nm i referentnoj valnoj duljini od 630 nm. Kvantifikacija uzoraka štakorske plazme ostvarena je usporedbom njihove apsorpcije sa referentnom krivuljom dobivenom iz standardnih uzoraka poznatih koncentracija.

#### 3.2.4.3. Mjerenje razine serotonina u mozgu

Zamrznuto tkivo poznate mase homogenizirano je laganim pokretima na homogenizatoru sa teflonskim tučkom u 6 volumena hladnog 25 nM tris-HCl pufera (+ EDTA 1 mM + natrij metabisulfit, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4 mM, pH 7.3). Nakon toga je homogenat prenesen u novu plastičnu epruvetu i centrifugiran 10 min na 3500 x g i temperaturi od +4 °C, te se supernatant prebaci u novu epruvetu. Svi postupci rađeni su na ledu.

Za određivanje serotonina u moždanoj kori korišten je Serotonin ELISA kit (IBL INTERNATIONAL GmbH, Njemačka) pri čemu su se slijedile upute proizvođača, a korištena je već opisana imunoenzimatska metoda uz male razlike (v. Materijali i metode, poglavlje 3.2.3.4.). Kvantitativna acilacija radila se samo sa uzorcima i kontrolama, ne i sa standardima, nakon čega se u standarde, acilirane uzorke i kontrole dodalo biotin i antiserum. Kao supstrat za detekciju antitijela vezanog za krutu fazu koristio se p-nitrofenil fosfat (PNPP) a produkti reakcije mjereni su pri apsorbciji od 405 nm i referentnoj valnoj duljini od 630 nm. Koncentracija serotonina izražena je po jediničnoj masi tkiva.

#### 3.2.4.4. Mjerenje aktivnog unosa serotonina u trombocite

Aktivnost serotoninskog prijenosnika mjerena je pri koncentraciji supstrata 0.5 μM, pri kojoj brzina unosa (v) u našim uvjetima mjerenja iznosi oko 80 % maksimalne brzine (V<sub>max</sub>).

Mjerenje kinetike serotoninskog prijenosnika temelji se na mjerenju unosa radionuklidom <sup>14</sup>C-obilježenog serotonina u trombocite. U 850 μL Krebs-Ringerovog fosfatnog pufera dodano je 50 μL PRP-a te se uzorci preinkubiraju u vodenoj kupelji na 37 °C uz kontinuirano miješanje. Reakcija je započela dodavanjem 100 μL otopine <sup>14</sup>C-5HT koncentracije 5 μM, tako da su stvarne koncentracije u inkubacijskoj smjesi bile 0.5 μM, nakon čega su uzorci inkubirani 30 sekundi na 37 °C. Reakcija se naglo prekida dodavanjem 2.5 mL ledene fiziološke otopine i brzim odvajanjem trombocita od ostatka medija vakuum filtracijom kroz Whatman GF/C filter papir uz 550 mm Hg. Filter papir se zatim isprao 2 x 5 mL fiziološke otopine te je prenijet u bočicu s 1 mL scintilacijske tekućine. Radioaktivnost vezana na filter-papiru mjerila se na scintilacijskom beta-brojaču kao broj raspada u minuti. Kao prazna proba koriste se uzorci PRP-a inkubirani u ledenoj kupelji na 4 °C te predstavlja radioaktivni serotonin koji zaostaje na membrani trombocita, odnosno filter-papiru. Odbijanjem vrijednosti prazne probe od izmjerenih vrijednosti aktivnosti uzoraka dobije se količina aktivno unesenog serotonina.

Vrijednosti unosa serotonina izražene su po jediničnoj masi trombocitnog proteina, osim u dva pokusa gdje su zbog tehničkih razloga kao referentni oslonac korišteni jedinični broj trombocita odnosno jedinični volumen PRP uzorka. Kako se za pripremu uzoraka štakorskog PRP koristi prethodno detaljno testirana i standardizirana procedura (Jernej i sur., 1988. i 1989.) sva tri navedena načina izražavanja međusobno su ekvivalentna.

#### **3.2.4.5. Mjerenje aktivnog unosa serotonina u sinaptosome**

Uzorci homogenata su preinkubirani u kupelji uz laganu trešnju 10 min na temperaturi od 37 °C u Krebs-Henseleit-ovom puferu (pH 7.4). Volumen pufera koji je potrebno dodati preračuna se tako da konačna inkubacijska smjesa (1 mL) sadrži 100 µg proteina.

Inkubacija je započela dodavanjem 100 µL <sup>14</sup>C-5HT kreatinin sulfata koncentracije 4 µM, tako da su stvarne koncentracije u inkubacijskoj smjesi bile 0.4 µM. Vrijeme inkubacije u kupelji uz laganu trešnju na 37 °C iznosi 2 min. Kao i kod mjerenja unosa serotonina u trombocite, inkubacija se naglo prekida dodavanjem 2.5 mL ledene fiziološke otopine u inkubacijsku smjesu i brzim odvajanjem sinaptosoma od ostatka medija vakuum filtracijom na 550 mmHg kroz Whatman GF/C filter papir. Sinaptosomi su se na filter papiru isprali s 2 x 5 mL fiziološke otopine. Filter papiri sa sinaptosomima su se stavili u bočice s 1 mL scintilacijske tekućine, a radioaktivnost na filter papirima izmjerena je na scintilacijskom beta-brojaču. Usporedno s inkubacijom na 37 °C inkubirali su se istovjetni uzorci u ledenoj kupelji na 4 °C koji predstavljaju praznu probu. Brzina unosa serotonina izražava se u pmol 5HT/mg proteina/min.

#### **3.2.5. Ekspresija gena za serotoninski prijenosnik i serotoninski receptor tipa 1A**

##### **3.2.5.1. Izolacija RNA**

U svrhu inaktivacije RNA-nukleaza, sav pribor i otopine (osim fenola) korišteni pri izolaciji RNA tretirani su preko noći s DEPC (0,1 %) te potom autoklavirani. Ukupna stanična RNA iz homogenata tkiva hipokampusa, moždane kore i jezgara rafe izolirana je metodom kisele fenolne ekstrakcije (Chomczynski i Sacchi, 2006.). Na 500 µL homogenata dodano je redom 50 µL 2 M natrijeva acetata (pH 4.00), 500 µL fenola zasićenog vodom i 200 µL smjese kloroform/izoamilni alkohol (49:1). Nakon dodatka svake komponente, smjesa se snažno promiješa te se ostavi na ledu 20 min. Uzorci su zatim centrifugirani 20 min na 10 000 x g na temperaturi od +4 °C, pri čemu se odvoje organska i vodena faza. Gornja, vodena

faza u kojoj se nalazi RNA pažljivo se prenijela u novu epruvetu, te se dodao jednaki volumen (oko 500  $\mu\text{L}$ ) hladnog izopropanola, promiješalo inverznim okretanjem epruvete te su uzorci inkubirani preko noći na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . RNA se istaložila centrifugiranjem 20 min na  $10\ 000\ \times\ g$  pri temperaturi od  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a talog se nakon toga dva puta ispirao s 500  $\mu\text{L}$  75 % etanola, uz centrifugiranje 10 min na  $10\ 000\ \times\ g$  i  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Talog se osušio u digestoru i otopio u 100  $\mu\text{L}$  sterilnoj vodi bez nukleaza.

Izoliranu RNA dodatno smo pročistili Quiagen-ovog kompleta za pročišćavanje RNA, uz uključivanje koraka digestije genomske DNA enzimom deoksiribonukleaza I, prema uputama proizvođača. RNA je sa kolonice eluirana u konačnom volumenu od 35  $\mu\text{L}$ . Cjelovitost izolirane RNA odredili smo prema izgledu vrpce 18S i 28S ribosomalnih RNA nakon elektroforeze manjeg alikvota RNA na 1 % agaroznom gelu, uz vizualizaciju pomoću etidij-bromida. Koncentracija izolirane RNA određena je spektrofotometrijski na NanoDropu, mjerenjem apsorbancije na 260 nm, a njena čistoća određena je iz omjera  $A_{260}/A_{280}$ . Otopina RNA je čuvana na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a za vrijeme korištenja cijelo vrijeme držana na ledu.

#### 3.2.5.2. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija provedena je koristeći komplet High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) prema upustvima proizvođača. Kako bi se smanjile pogreške u pipetiranju, za sve uzorke pripremi se skupna otopina (eng. *master mix*) zajedničkih sastojaka. Sastav reakcijske smjese i postupak reverzne transkripcije prikazan je u tablici 3.2.. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 20  $\mu\text{L}$ , a količina RNA u svakom uzorku bila je 2  $\mu\text{g}$ . Da bismo provjerili moguću prisutnost zaostale genomske DNA u uzorcima RNA, pripremljena je i kontrolna reakcija bez dodatka enzima reverzna transkriptaza (-RT).

**Tablica 3.2.** Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju i uvjeti reakcije

sastojak	V( $\mu\text{L}$ )/uzorku	V( $\mu\text{L}$ )/uzorku
	+RT	-RT
2X RT pufer	10.0	10.0
20XRT enzim	1.0	-
uzorak	do 9 $\mu\text{L}$	do 9 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O bez ribonukleaza	nadopuniti do 20 $\mu\text{L}$	nadopuniti do 20 $\mu\text{L}$
ukupni volumen	20.0	20.0

Reakcija reverzne transkripcije se odvijala 60 min na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nakon čega je reakcijska smjesa zagrijavana 5 min na  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza. Dobivena

cDNA razrijeđena je do koncentracije od 10 ng/μL te je u nekoliko alikvota pohranjena je na -20 °C.

### 3.2.5.3. 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).

Redni broj ciklusa lančane reakcije polimerazom u kojem dolazi do naglog porasta intenziteta fluorescencije u odnosu na bazne vrijednosti naziva se granični ciklus (Ct, od engl. *threshold cycle*) i mjeri je početne količine kalupa cDNA.

Za pripremu reakcijske smjese korišten je reagens Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) koji sadrži sve reakcijske sastojke osim cDNA i specifičnih početnika. Kako bi se smanjile pogreške u pipetiranju, za sve uzorke pripremi se skupna otopina zajedničkih sastojaka. Sastav reakcijske smjese i postupak reakcije prikazan je u tablici 3.3.. Reakcija za svaki uzorak rađena je u triplikatu.

**Tablica 3.3.** Sastav reakcijske smjese za PCR

sastojak	početna koncentracija	konačna koncentracija	V(μL)/uzorku
SYBR Green Master Mix	2X	1X	10.0
uzvodna početnica	10.0 μM	0.5 μM	1.0
nizvodna početnica	10.0 μM	0.5 μM	1.0
H <sub>2</sub> O			4.0/7.0
uzorak	10.0 ng/μL	40.0/10.0 ng/μL	4.0/1.0
ukupni volumen			20.0

Nakon što su dodane sve komponente reakcije, reakcija se provodi u Real-time PCR uređaju (Applied Biosystems 7300), uz definirani termalni profil:

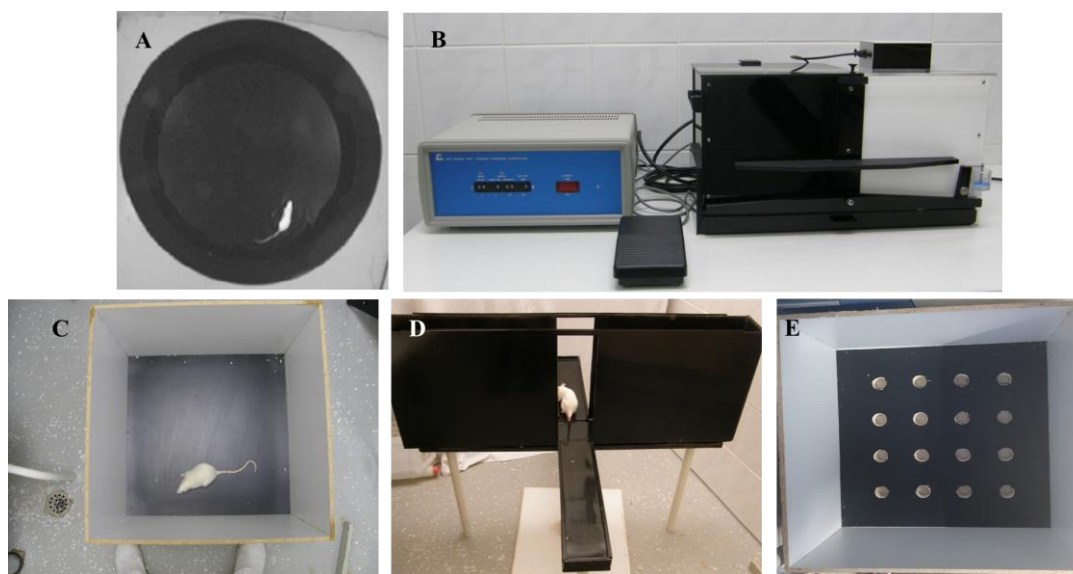
1. korak – 1 ciklus 10 min na 95 °C (denaturacija cDNA i aktivacija Taq polimeraze);
2. korak – 40 ciklusa od 15 sek na 95 °C, 1 min na 60 °C (u ovom koraku prikupljaju se podaci o fluorescenciji);
3. korak – 1 ciklus 15 sek na 95 °C, 1 min na 60 °C, 15 sek na 95 °C, 15 sek na 60 °C.

Specifičnost reakcije provjerena je elektroforezom reprezentativnih produkata na 2 % agaroznom gelu, a nakon svake reakcije i analizom krivulje taljenja (engl. *melting curve analysis*).

Određivanje relativne razine mRNA za serotoniniski prijenosnik i serotoniniski receptor 1A provedeno je metodom standardne krivulje (Larionov i sur., 2005.), a kao referentni gen za normalizaciju korišten je GAPDH.

#### 3.2.6. Testovi ponašanja

Za mjerenje učenja i pamćenja korišteni su Morrisov vodeni labirint (eng. *Morris water maze*) te test izbjegavanja (eng. *passive avoidance task*). Za karakterizaciju lokomotornog i emotivnog ponašanja (ponašanje nalik na anksioznost i istraživačko ponašanje) korišteni su test otvorenog prostora (eng. *open field*), ploča sa rupama (eng. *hole board*) te uzdignuti križni labirint (eng. *elevated plus maze*). Slika 3.3. prikazuje aparature korištene u testovima ponašanja.



Slika 3.3. Prikaz aparatura korištenih u A) Morrisovom vodenom labirintu, B) testu izbjegavanja, C) testu otvorenog prostora, D) testu na uzdignutom križnom labirintu, te E) ploči s rupama

##### 3.2.6.1. Test otvorenog prostora

Test otvorenog prostora proveo se u kutiji dimenzija 60 X 60 X 40 cm bez poklopca, u kojoj je dno virtualno podijeljeno na rubni dio (12.5 cm od ruba) te središnji dio. Prostorija u kojoj se provelo istraživanje bila je osvijetljena halogenom lampom usmjerenom prema stropu kako bi osvjjetljenje bilo difuzno. Jačina svjetla na razini arene iznosila je 300 luksa.

Test se temelji na stavljanju životinje u nepoznatu okolinu kako bi se promatralo niz ponašanja, specifično, tendenciju životinje da ostane na periferiji aparature bez ulaska u njezin centralni dio (što se tumači kao tjeskobno ponašanje), te razinu timarenja (eng. *grooming*) i učestalost defekacije (Kalueff i Tuohimaa, 2005.; O'Leary i sur., 2013.). Životinje su se testirale pojedinačno, uvijek se stavljaju na isto početno mjesto, glavom okrenutom prema stjenci kutije, puštaju se da istražuju kutiju 5 min i nakon toga se vraćaju u matični kavez. Nakon testiranja svake životinje, aparatura se obrisala vlažnom krpom i 70 %-tnim alkoholom kako bi se uklonili mirisi sa stjenki kutije.

Viša razina anksioznosti dovodi do smanjenja vremena koje je životinja provela u centru kutije u odnosu na vrijeme koje je povelu na periferiji, uz zidove kutije (Bourin i sur., 2007.). Mjerenjem prijeđenog puta dobiveni su podaci o lokomotornoj aktivnosti životinje, a uzdizanje na stražnje noge (eng. *rearing*) je mjera istraživačke aktivnosti životinje.

#### **3.2.6.2. Ploča sa rupama**

Za provođenje testa nazvanog ploča sa rupama koristila se kutija dimenzija 60 X 60 X 40 cm bez poklopca, na čijem se podu nalazi 16 rupa (promjera 4 cm, dubine 4 cm, međusobno podjednako udaljene) u konfiguraciji 4 x 4. Dno kutije virtualno je podijeljeno na rubni dio (12.5 cm od ruba) te središnji dio. Prostorija u kojoj se provodilo istraživanje bila je osvijetljena halogenom lampom usmjerenom prema stropu kako bi osvijetljenje bilo difuzno. Jačina svjetla na razini arene iznosila je 300 luksa.

Slično kao i u testu otvorenog prostora, i ovaj test se bazira na izazivanju konflikta između želje za istraživanjem i nagona životinje za izbjegavanjem otvorenih područja. Provođa se tako da se životinja stavlja u aparaturu glavom okrenutom prema stjenci kutije, pušta se da istražuje 5 min i nakon toga se vraća u matični kavez. Nakon svake životinje, aparatura se obrisala vlažnom krpom i 70 %-tnim alkoholom kako bi se uklonili zaostali mirisi.

Kao i u prethodno opisanom testu, mjerenjem prijeđenog puta dobiveni su podaci o lokomotornoj aktivnosti životinje, dok se uzdizanje na stražnje noge smatra mjerom istraživačke aktivnosti životinje. Broj koliko puta životinja gurne glavu (eng. *head dip*) u centralne u odnosu na periferne rupe mjera je koja se tumači kao razina anksioznog ponašanja (Casarrubea i sur., 2010.). Osim što se koristi kao mjera anksioznosti, broj guranja glave u rupu je mjera istraživanja nove okoline (eng. *exploratory behaviour*) (File i Wardill, 1975.).

#### 3.2.6.3. Uzdignuti križni labirint

Test na uzdignutom križnom labirintu je najčešće korišten test za istraživanje psiholoških i neurokemijskih temelja anksioznosti. Aparatura na kojoj se test provodi ima oblik znaka plus (križa) sa dva otvorena kraka (50 x 10 cm), okrenuta jedan nasuprot drugome i dva zatvorena kraka istih dimenzija ali ograđene zidovima visine 40 cm. Labirint je uzdignut 1 m od poda tako da otvorene grane kombiniraju elemente nepoznatosti, otvorenosti i uzdignutosti. Prostorija u kojoj se provelo istraživanje bila je osvijetljena halogenom lampom usmjerenom prema stropu kako bi osvijetljenje bilo difuzno. Jačina osvijetljenja bila je 100 luksa u središnjem dijelu, 125 luksa u otvorenim krakovima i 60 luksa u zatvorenim krakovima. Životinja se stavlja u labirint na središnju platformu tako da je glavom okrenuta prema otvorenom kraku, pušta se da istražuje aparaturu 5 min te se vraća u matični kavez. Okolina oko labirinta mora biti što jednoličnija kako životinji ne bi odvlačila pažnju. Nakon svake životinje, aparatura se obrisala vlažnom krpom i 70 %-tnim alkoholom kako bi se uklonili mirisi sa stjenki kutije.

Test je baziran na prirodnoj averziji glodavaca prema otvorenim prostorima i koristi konflikt između želje za istraživanjem nepoznate okoline i straha od otvorenih uzdignutih mjesta. Za procjenu stanje anksioznosti životinje mjeri se broj ulazaka u otvorene i zatvorene krake aparature i vrijeme provedeno u svakome od njih. Uzdizanje na stražnje noge u zatvorenim krakovima i naginjanje preko ruba otvorenih krakova se boduje kao mjera istraživačke aktivnosti (Bourin i sur., 2007.).

U našim istraživanjima kao mjeru anksioznog ponašanja računali smo % vremena provedenog u otvorenim kracima u odnosu na ukupno vrijeme provedeno u otvorenim i zatvorenim kracima aparature; te % broja ulazaka u otvorene krakove u odnosu na ukupni broj ulazaka u krakove (File, 2001.; Carter i sur., 2011.).

#### 3.2.6.4. Test pasivnog izbjegavanja

Test pasivnog izbjegavanja proveo se u aparaturi koja se sastoji od dva odjeljka povezana kliznim vratima. Odjeljci su iste veličine (22 x 22 x 22) ali različite boje i osvijetljenosti, jedan je bijeli i jarko osvijetljen lampom na poklopcu dok je drugi crni i mračan. U podu crnog odjeljka nalazi se metalna mreža koja je omogućila davanje blagog električnog šoka na šape životinje. Prostorija u kojoj se provelo istraživanje bila je osvijetljena halogenom lampom usmjerenom prema stropu kako bi osvijetljenje bilo difuzno. Jačina svjetla na razini bijelog odjeljka iznosila je 620 luksa.



Prirodno, životinja je sklona boravku u malim mračnim prostorima, a izbjegava otvorena i osvijetljena područja. U ovom testu, životinja nauči izbjegavati crni odjeljak koji je povezan s neugodnim događajem (blagi električni šok) koji je prethodno u njemu iskusila. Pri novom izlaganju aparaturi životinja ne ulazi u crni, njoj prirodniji odjeljak, nego ostaje u osvijetljenom odjeljku.

Habitucija (navikavanje) je započela stavljanjem životinje u bijeli odjeljak, glavom okrenutom od kliznih vrata, spustio se poklopac i pustilo se da istražuje aparaturu 3 min. Životinja obično brzo prelazi u crni odjeljak (ukoliko se to ne dogodi u roku od 2 min rukom je se usmjeri prema vratima). Bilježila se latencija ulaska u crni odjeljak, ukupno vrijeme provedeno u njemu te broj prelazaka natrag (kriterij za prelazak je da su sve četiri šape u bijelom odjeljku).

Pola sata nakon habituacije provodilo se treniranje. Životinja se stavila u bijeli odjeljak i pustilo se da istražuje. Nakon 30 s pritiskom na pedalu aktivira se otvaranje vrata između odjeljaka. Vrata se otvore nakon 20 s, a kada životinja uđe u crni odjeljak automatski se zatvaraju i životinja nakon 5 s dobije električni šok na šape (0.5 mA u trajanju od 5 s). Aparat je zabilježio latenciju od trenutka otvaranja vrata do ulaska životinje u crni odjeljak. Latencija ulaska u crni odjeljak za vrijeme treninga je odraz motoričke aktivnosti i reakcije na stres u novoj okolini. Nakon toga životinja se vratila u matični kavez.

24 sata nakon treniranja provodi se test pamćenja. Životinja se stavila u bijeli odjeljak glavom okrenutom od kliznih vrata. Nakon 30 s pritisnula se pedala i 20 s nakon toga otvaraju se klizna vrata. Kada je životinja ušla u crni odjeljak sa sve 4 šape vrata se automatski zatvaraju, aparat je zabilježio latenciju od trenutka otvaranja vrata do ulaska životinje u crni odjeljak. Nakon toga životinja se vratila u matični kavez. Nakon svake životinje, aparatura se obrisala vlažnom krpom i 70 %-tnim alkoholom kako bi se uklonili zaostali mirisi. Latencija do prelaska životinje iz osvijetljenog ali sigurnog odjeljka u mračni ali nesigurni odjeljak služi kao mjera učenja i pamćenja prethodnih događaja (eng. *retention of learned behavior*, sposobnost prizivanja sjećanja).

#### **3.2.6.5. Morrisov vodeni labirint**

Morrisov vodeni labirint sastoji se od bazena (promjera 160 cm, visina 60 cm) u kojem se nalazi platforma (10 x 10 cm). Bazen je napunjen vodom, temperature od 24-25 °C, visine do 1 cm iznad platforme, a budući da su stjenke bazena, kao i sama platforma crne boje, platforma nije vidljiva. Test se proveo tijekom 5 uzastopnih dana. Tijekom prva 4 dana životinje uče položaj platforme koristeći vizualne znakove na zidovima prostorije u kojoj se provodi pokus. Znakovi služe životinji da se orijentira i zapamti smještaj platforme, te moraju

uvijek biti vidljivi iz bazena, osobito kada su životinje blizu platforme. Treniranje (učenje) se provodi kroz dvije epizode dnevno, a svaka epizoda se sastoji od tri pokušaja u trajanju od 60 s. Životinja se stavila u vodu glavom okrenutom prema zidovima bazena te se pusti da nađe platformu i popne se. Ukoliko životinja nije našla platformu u tih 60 s, usmjerilo ju se prema njoj ili je se rukom stavilo na platformu, te je se ostavi 15 s na platformi. Za svaki pokušaj bilježilo se vrijeme u kojem je životinja pronašla platformu što predstavlja mjeru učenja. Po završetku trećeg pokušaja, životinja se obrisala ručnicima i vratila u matični kavez, voda u bazenu se promiješala te su se izvadili fecesi. Po završetku prve epizode učenja cijela procedura se ponovila još jednom. Vrijeme između dvije epizode učenja iznosilo je 90 min. Tijekom perioda treniranja položaj platforme bio je fiksiran, a startno mjesto s kojeg se životinja puštala u vodu varirao je u svakom od tri pokušaja unutar jedne epizode.

Peti dan se provodi test pamćenja. Životinja se stavila u bazen iz kojega je izvađena platforma i mjerila se prosječna udaljenost životinje od mjesta gdje se prethodnih dana nalazila platforma što predstavlja mjeru pamćenja. Životinje se ispuštala na istom startnom mjestu, nasuprot kvadranta u kojem je bila platforma. Po završetku testa, životinja se obrisala ručnicima i vratila u matični kavez. Maksimalno trajanje testa je 90 s.

#### 3.2.6.6. Analiza testova ponašanja

Ponašanje životinja tijekom testiranja snimano je web-kamerom smještenom iznad same aparature u kojoj se provodi testiranje, na visini dostatnoj da obuhvati sliku cijele aparature, a prikupljeni podaci su kompjutorski obrađeni. *Any-maze (Any-maze™ Video Tracking System, Stoelting Co. Verzija 4.5)* je kompjutorski program za praćenje i analizu ponašanja životinja. Program za svaku životinju zasebno pohranjuje video zapis, te analizira zadane parametre ponašanja. Konačni podaci prebacuju se u tablični program, Excel (*Microsoft Office*), i dalje se statistički obrađuju.

#### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Rezultati mjerenja prikazani su kao individualne vrijednosti ili kao srednje vrijednosti skupina (eng. *mean*, M) pri čemu je kao pokazatelj varijabilnosti korištena standardna devijacija (eng. *standard deviation*, SD) ili standardna pogreška srednje vrijednosti (eng. *standard error of the mean*, SEM).

Za obradu podataka korišten je statističko-grafički program GraphPad Prism, verzija 5.0 (GraphPad Software Inc, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Normalnost distribucije dobivenih podataka testirali smo pomoću D'Agostino i Pearson omnibus testa. Ukoliko je distribucija vrijednosti bila normalna (slijedila Gaussovu razdiobu) rezultati mjerenja dviju skupina uspoređivali su se Studentovim t-testom. U slučaju da podaci nisu bili normalno distribuirani koristio se Mann-Whitney test.

Za analizu utjecaja dviju varijabli (sublinije i tretmana) na mjereni parametar korištena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA, od eng. *analysis of variance*) popraćena Fisherovim LSD testom. U slučajevima kad su se ispitivane skupine značajno razlikovale s obzirom na standardne devijacije (prema Bartlettovom testu), podatke smo dodatno analizirali i neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom uz Dunnov posthoc test.

Za analizu područja ispod krivulje (eng. *area under curve*, AUC) koristili smo trapezoidnu metodu.

Prisutnost vrijednosti koja je značajno odskakala od distribucije ostalih vrijednosti unutar grupe (eng. *outlier*) detektirana je pomoću Grubb's testa uz granicu značajnosti  $p < 0.05$  i takva vrijednost nije bila uključena u daljnju statističku obradu.



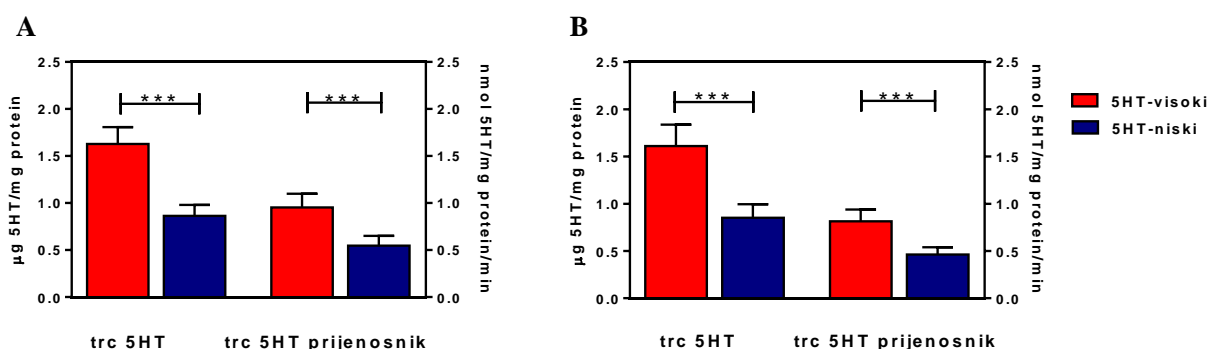
*Rezultati*



#### 4.1. Selektivni odabir životinja iz 5HT sublinija WZ-5HT modela

U eksperimentima su korištene životinje iz F11 generacije odabrane na temelju koncentracije trombocitnog serotonina i aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika. Karakteristične vrijednosti navedenih trombocitnih parametra kod mužjaka iz 5HT-sublinija prikazane su na slici 4.1. B. Na slici je vidljivo da je kod oba mjerena parametra razlika među sublinijama visoko statistički značajna, a podjednake razlike među 5HT-sublinijama prisutne su i kod ženki (Slika 4.1. A).

Pokusi u kojima je istraživana učinak jednokratne primjene fluoksetina provedeni su na ženkama dok su za kronični tretman korišteni mužjaci. Iako svjesni nedostatka takvog koncepta istraživanja odabrali smo ga jer nam je omogućio provedbu većeg broja eksperimenata (manja količina skupog fluoksetina potrebna za tretman životinja). Imajući u vidu da i kod čovjeka i kod životinja među spolovima postoje razlike u serotonergičnom sustavu, u podložnosti psihijatrijskim bolestima, kao i u samom odgovoru na terapiju, rezultati prikazani u slijedećim poglavljima ne dozvoljavaju izravnu usporedbu mužjaka i ženki.



**Slika 4.1.** Trombocitni serotoninski parametri kod A) ženki i B) mužjaka iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije WZ-5HT štakora. trc 5HT: razina trombocitnog serotonina ( $\mu\text{g}$  5HT/mg protein), trc 5HT prijenosnik: brzina unosa serotonina u trombocite (nmol 5HT/mg protein/min). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 36, \*\*\* $p < 0,0001$  (t-test).

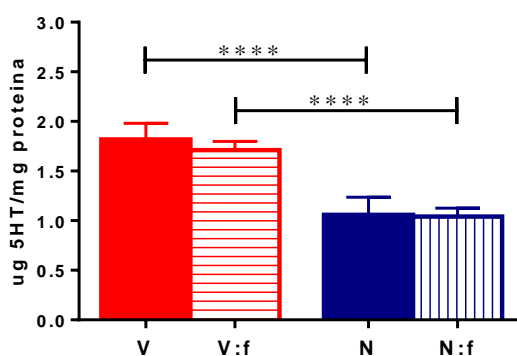
#### 4.2. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u krvi WZ-5HT štakora

U nastavku karakterizacije Wistar-Zagreb 5HT štakora željeli smo utvrditi postoje li razlike u odgovoru životinja iz 5HT-sublinija na egzogeno izazvani porast aktivnosti serotoninskog sustava nastao kao posljedica farmakološke inhibicije 5HT prijenosnika. Aktivaciju serotoninskog sustava izazvali smo jednokratnom ili višekratnim intraperitonealnim (i.p.) injekcijama fluoksetina.

### 4.2.1. Koncentracija serotonina u trombocitima

Razina serotonina u trombocitima 60 min nakon jednokratne primjene fluoksetina u dozi od 1 mg/kg tjelesne težine prikazana je na slici 4.2. U pokusima smo koristili ženke F11 generacije, obje 5HT-sublinije starosti 2,5 mjeseca, tjelesne težine  $232 \pm 14$  g kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, odnosno  $215 \pm 13$  g kod 5HT-niske sublinije.

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajni glavni učinak sublinije ( $F_{(1,20)} = 167$ ,  $p < 0,0001$ ). Nasuprot tome nije opažena ni značajna interakcija između sublinije i tretmana ( $F_{(1,20)} = 0,658$ ,  $p = 0,427$ ), kao ni učinak tretmana na razinu trombocitnog serotonina mjerenu 1 sat nakon injekcije ( $F_{(1,20)} = 1,30$ ,  $p = 0,268$ ), što je u skladu s očekivanim rezultatom (v. Tablicu 8.1. u Prilogu). Budući da su životinje iz obje sublinije analizirane u istim pokusima u ovim i u većini ostalih eksperimenata, provedena je statistička analiza učinka fluoksetina kod pojedine sublinije, kao i usporedba sublinija.



**Slika 4.2.** Razina trombocitnog serotonina kod ženki WZ-5HT sublinija 60 min nakon i.p. injekcije fluoksetina (1 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja po skupini = 6. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Fisherov LSD post hoc test).

Razina serotonina u trombocitima nakon višekratne (devetodnevne) primjene fluoksetina prikazana je u Tablici 4.1. i na slici 4.3. Jednoj skupini životinja krv je uzimana 1 sat, a drugoj skupini 24 sata nakon 9. i.p. injekcije fluoksetina. U pokusima su korišteni mužjaci F11 generacije, tjelesne težine  $360 \pm 20$  g kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, i  $340 \pm 20$  g kod životinja iz 5HT-niske sublinije.

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajni glavni učinak sublinije (1 sat nakon 9. injekcije:  $F_{(1,21)} = 130$ ,  $p < 0,0001$ ; 24 sata nakon 9. injekcije:  $F_{(1,23)} = 256$ ,  $p < 0,0001$ ). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da višekratna primjena fluoksetina u dozi od 6 mg/kg dovodi

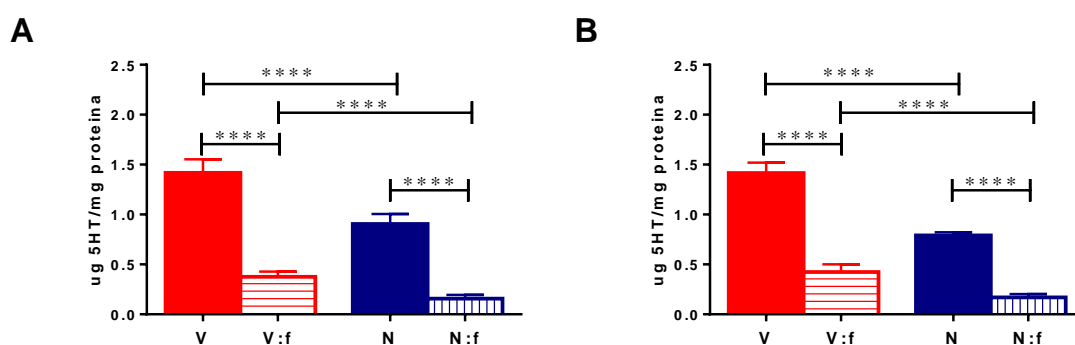


do značajnog smanjenja razine trombocitnog serotonina (glavni učinak tretmana: 1 sat nakon 9. injekcije:  $F_{(1,21)} = 778$ ,  $p < 0,0001$ ; 24 sata nakon 9. injekcije:  $F_{(1,23)} = 867$ ,  $p < 0,0001$ , dvosmjerna ANOVA), a također je vidljiva i značajna interakcija između tretmana i sublinije (1 sat nakon 9. injekcije:  $F_{(1,21)} = 21,4$ ,  $p = 0,0001$ ; 24 sata nakon 9. injekcije:  $F_{(1,23)} = 45,9$ ,  $p < 0,0001$ , dvosmjerna ANOVA). Pad razine serotonina kod životinja iz 5HT-niske sublinije iznosio je oko 80 %, dok je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije iznosio oko 70 %, a razlika između tretiranih i kontrolnih životinja bila je podjednaka 1 sat i 24 sata nakon 9. injekcije (v. Tablicu 8.1. u Prilogu).

**Tablica 4.1.** Razina trombocitnog serotonina kod mužjaka WZ-5HT sublinija 1 sat i 24 sata nakon 9. injekcije fluoksetina u dozi od 6 mg/kg tt, odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Značajnost razlika navedena je na grafičkom prikazu rezultata na slici 4.3.

	RAZINA TROMBOCITNOG SEROTONINA	
	1 sat nakon 9 i.p. injekcije	24 sata nakon 9 i.p. injekcije
V	1,42 ± 0,134 (4)	1,42 ± 0,105 (5)
V:f	0,375 ± 0,054 (9)	0,424 ± 0,077 (9)
N	0,904 ± 0,100 (4)	0,791 ± 0,030 (4)
N:f	0,170 ± 0,032 (8)	0,158 ± 0,038 (8)

µg 5HT/ mg proteina; srednja vrijednost ± SD. Broj životinja po skupini naveden je u zagradi.



**Slika 4.3.** Razina trombocitnog serotonina kod mužjaka WZ-5HT sublinija A) 1 sat i B) 24 sata nakon 9. injekcije fluoksetina u dozi od 6 mg/kg tt, odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. Broj životinja po skupini je naveden u Tablici 4.1., \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Fisherov LSD post hoc test).

#### 4.2.2. Aktivnost 5HT prijenosnika na trombocitima

Doza fluoksetina korištena za istraživanje učinka njegove jednokratne primjene na aktivnost 5HT prijenosnika odabrana je prema rezultatima preliminarnog eksperimenta u kojem su korišteni štakori divljeg tipa soja Wistar. Životinje su bile podijeljene u 3 grupe: grupa tretirana fiziološkom otopinom (kontrolna grupa), grupa tretirana s 0,6 mg fluoksetina/kg tt i grupa tretirana s 2 mg fluoksetina/kg tt. Sat vremena nakon i.p. injekcije životinjama su uzeti uzorci krvi i određen je unos serotonina u trombocite. Iz dobivenih rezultata zaključili smo da fluoksetin u dozi 0,6 mg/kg tt ne dovodi do mjerljive inhibicije trombocitnog 5HT prijenosnika, dok usporedbom kontrolne grupe sa grupom koja je tretirana sa 2 mg fluoksetina/kg tt dobivamo pad aktivnog unosa serotonina za 70 % ( $p = 0,0267$ , t-test) (rezultati nisu prikazani). Za daljnje pokuse odabrana je doza od 1 mg/kg tt kod koje smo, na temelju tih preliminarnih rezultata, očekivali pad aktivnosti 5HT prijenosnika za 40 - 50 %. Učinak jednokratne primjene fluoksetina na aktivnost 5HT prijenosnika istražen je i pri dozi od 6 mg/kg tt koja je, na temelju literaturnih podataka, odabrana za istraživanje učinka višekratne primjene fluoksetina na razinu trombocitnog serotonina (Tablica 4.1. i Slika 4.3.). Vrijednosti brzine unosa serotonina u trombocite izražene su po jediničnom broju trombocita ili jediničnom volumenu plazme bez trombocita. U pokusima smo koristili ženke F11 generacije WZ-5HT štakora starosti 2,5 mjeseci.

**Tablica 4.2.** Aktivnost 5HT prijenosnika na trombocitima kod ženki WZ-5HT sublinija 60 min nakon i.p. injekcije fluoksetina u navedenoj dozi, odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Značajnost razlika navedena je na grafičkom prikazu rezultata na slici 4.4.

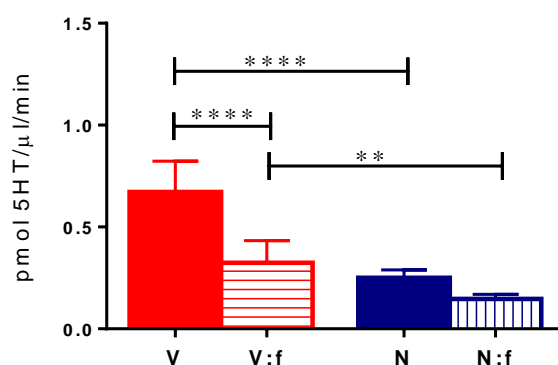
	BRZINA UNOSA SEROTONINA U TROMBOCITE	
	1 mg fluoksetina/kg tt <sup>a</sup>	6 mg fluoksetina/kg tt <sup>b</sup>
V	0,672 ± 0,152 (6)	0,906 ± 0,196 (6)
V:f	0,324 ± 0,108 (6)	0,059 ± 0,019 (5)
N	0,251 ± 0,039 (6)	0,487 ± 0,090 (5)
N:f	0,147 ± 0,022 (6)	0,068 ± 0,038 (4)

<sup>a</sup> pmol 5HT/ $\mu$ l/min; <sup>b</sup> pmol 5HT/ $10^{10}$  trc/min; srednja vrijednost ± SD. Broj životinja po skupini naveden je u zagradi.

Rezultati pokusa u kojem se koristila doza od 1 mg fluoksetina/kg prikazani su u Tablici 4.2. te na slikama 4.4. i 4.6. Dvosmjerna analiza varijance pokazala je prisutnost interakcije između sublinije i tretmana ( $F_{(1,20)} = 9,72$ ,  $p = 0,0054$ ), te značajan učinak oba faktora: sublinije ( $F_{(1,20)} = 57,9$ ,  $p = 0,0001$ ) i tretmana ( $F_{(1,20)} = 33,0$ ,  $p < 0,0001$ ) na aktivnost

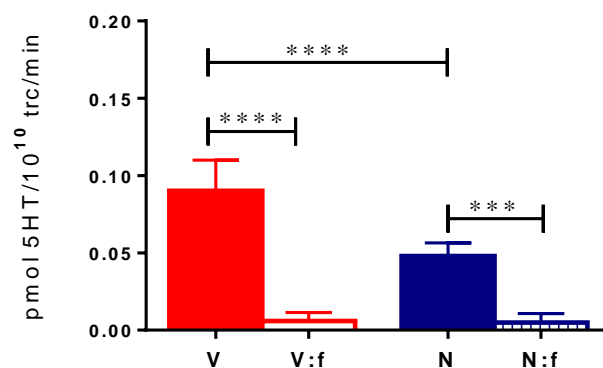
trombocitnog 5HT prijenosnika (v. Tablicu 8.1. u Prilogu). Fisherov LSD post hoc test pokazao je da primijenjena doza fluoksetina dovodi do značajne inhibicije unosa serotonina u trombocite samo kod 5HT-visoke sublinije ( $p < 0,0001$ ), dok je kod 5HT-niske sublinije prisutna tendencija pada aktivnosti ( $p = 0,0778$ ).

Inhibicija aktivnosti 5HT prijenosnika izražena kao % aktivnosti u odnosu na kontrolne životinje (relativna promjena aktivnosti) bila je podjednaka kod obje sublinije (Slika 4.6.). Kod životinja iz 5HT-visoke sublinije pad aktivnosti iznosio je 52 %, a kod životinja iz 5HT-niske sublinije 42 %. Ako promatramo promjenu unesene količine 5HT (izražen kao pmol uneseni u trombocite u jedinici vremena) ona je bila trostruko veća kod životinja iz 5HT-visoke sublinije (0,348 pmol) nego kod životinja iz 5HT-niske sublinije (0,104 pmol).

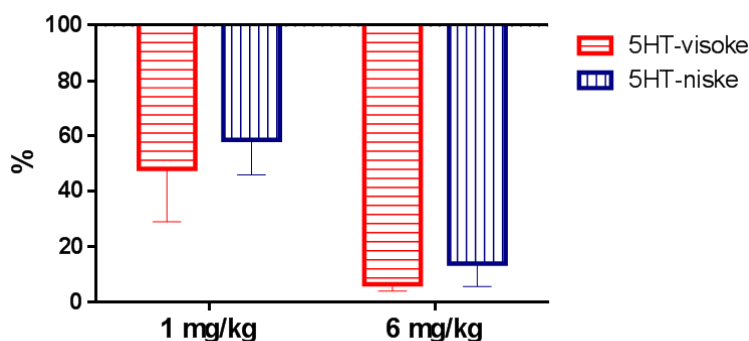


**Slika 4.4.** Aktivnost 5HT prijenosnika na trombocitima (pmol 5HT/μl/min) kod ženki WZ-5HT sublinija 60 min nakon i.p. injekcije fluoksetina (1 mg/kg tt) odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. Broj životinja je naveden u Tablici 4.2., \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (Fisherov LSD post hoc test).

Fluoksetin u dozi 6 mg/kg kod obje sublinije dovodi do gotovo potpune inhibicije unosa serotonina u trombocite (Slika 4.5.). Dvosmjerna analiza varijance otkrila je značajni glavni učinak i sublinije ( $F_{(1,16)} = 14,5$ ,  $p = 0,0016$ ) i tretmana ( $F_{(1,16)} = 126$ ,  $p = 0,0001$ ) na aktivnost trombocitnog 5HT prijenosnika (v. Tablicu 8.1. u Prilogu). Također je pokazana značajna interakcija sublinije i tretmana ( $F_{(1,16)} = 13,2$ ,  $p = 0,0023$ ). Aktivnosti trombocitnog 5HT prijenosnika pala je u odgovoru na fluoksetin za 93 % kod 5HT-visoke sublinije, odnosno za 86 % kod 5HT niske sublinije ( $p < 0,0001$  kod 5HT-visoke sublinije,  $p = 0,0001$  kod 5HT-niske sublinije, Fisherov LSD post hoc test) (Slika 4.6.). Ako se promatra količina unesenog serotonina (pmol u jedinici vremena) pad je dvostruko veći kod životinja iz 5HT-visoke sublinije (0,847 pmol) nego kod životinja iz 5HT-niske sublinije (0,419 pmol).



**Slika 4.5.** Aktivnost 5HT prijenosnika na trombocitima (pmol 5HT/10<sup>10</sup> trc/min) kod ženki WZ-5HT sublinija 60 min nakon i.p. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt) odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. Broj životinja je naveden u Tablici 4.2., \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001 (Fisherov LSD post hoc test).



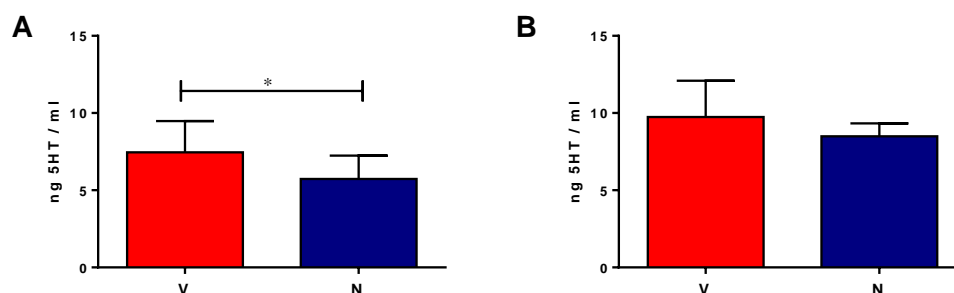
**Slika 4.6.** Aktivnost 5HT prijenosnika kod 5HT-sublinija 60 minuta nakon primjene fluoksetina u dozi 1 mg/kg i 6 mg/kg, izražena kao % promjene (± SD) u odnosu na kontrolne životinje (= 100 %). Analizirani su podaci prikazani na slici 4.4. i 4.5.

### 4.2.3. Koncentracija slobodnog serotonina u krvnoj plazmi

#### 4.2.3.1. Bazalne vrijednosti

Za razliku od bazalnih vrijednosti razine trombocitnog serotonina i aktivnosti trombocitnog 5HTT koje smo kod životinja iz 5HT sublinija usporedili u prijašnjim istraživanjima, za usporedbu sublinija s obzirom na učinak fluoksetina na razinu plazmatskog serotonina bilo je potrebno prvo usporediti njihove bazalne vrijednosti toga parametra. Vrijednosti serotonina u uzorcima plazme bez trombocita (eng. *platelet-free-plasma*, PFP) kod ženki i mužjaka iz 5HT-sublinija u bazalnim uvjetima prikazani su na slici 4.7. Sublinije pokazuju različitu koncentraciju serotonina u PFP s time da je ona veća kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Kod ženki je razlika među sublinijama iznosila 30 % (p = 0,0272, t-test) dok

kod mužjaka postoji tendencija (15 %) u istom smjeru no razlika nije dosegla statističku značajnost.



**Slika 4.7.** Koncentracija serotonina (ng/mL) u plazmi bez trombocita kod A) ženki (12 životinja po skupini) i B) mužjaka (8 – 9 životinja po skupini) WZ-5HT sublinija. V=5HT-visoke, N=5HT-niske. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  (t-test).

#### 4.2.3.2. Učinak fluoksetina

Učinak jednokratne primjene fluoksetina na razinu serotonina u plazmi bez trombocita kod 5HT-sublinija prikazan je u Tablici 4.3. i na slici 4.8. Usporedba učinka provedena je uz dvije doze fluoksetina: 1 mg/kg tt i 6 mg/kg tt. Primijenjena doza i vrijeme trajanja tretmana jednaki su kao i u pokusima usporedbe učinka fluoksetina na aktivnost trombocitnog 5HT prijenosnika. U pokusima smo koristili ženke F11 generacije WZ-5HT štakora starosti 2,5 mjeseci.

**Tablica 4.3.** Koncentracija serotonina u plazmi bez trombocita kod ženki WZ-5HT sublinija 60 min nakon i.p. injekcije fluoksetina, odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Značajnost razlika navedena je na grafičkom prikazu rezultata (slika 4.9.).

	RAZINA PLAZMATSKOG SEROTONINA	
	1 mg fluoksetina/kg tt	6 mg fluoksetina/kg tt
V	13,25 $\pm$ 1,95 (6)	9,11 $\pm$ 1,95 (5)
V:f	13,79 $\pm$ 3,08 (6)	12,03 $\pm$ 1,57 (6)
N	10,40 $\pm$ 1,12 (6)	6,79 $\pm$ 1,48 (6)
N:f	12,05 $\pm$ 1,31 (6)	12,23 $\pm$ 1,38 (5)

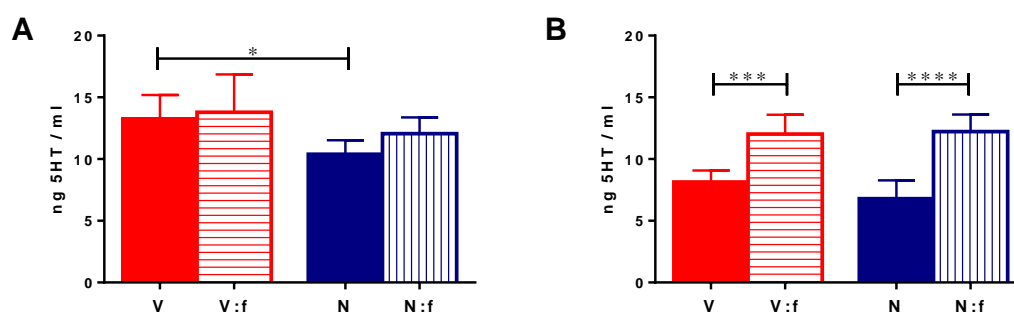
ng 5HT/mL; srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja po skupini naveden je u zagradi.

Dvosmjerna ANOVA pokazala je da postoji značajni glavni učinak sublinije ( $F_{(1,20)} = 7,76$ ,  $p = 0,0014$ ) na razinu plazmatskog serotonina. Bazalno, životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju višu razinu plazmatskog serotonina u odnosu na životinje iz 5HT-niske

#### 4. REZULTATI

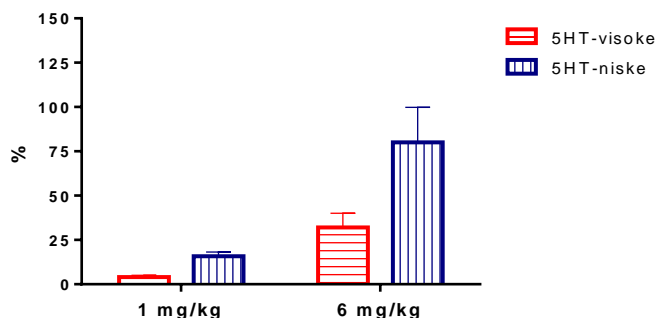
sublinije ( $p = 0,0235$ , Fisherov LSD post hoc test). Analiza je također pokazala da 60 min nakon jednokratne primjene fluoksetina u dozi od 1 mg/kg tt nema značajne interakcije između sublinija i tretmana ( $F_{(1,20)} = 0,468$ ,  $p = 0,502$ ) kao ni značajnog glavnog učinka tretmana ( $F_{(1,20)} = 1,77$ ,  $p = 0,198$ ) (Slika 4.8.) na ispitivani parametar.

Dvosmjerna ANOVA pokazala je nadalje da nakon jednokratne injekcije fluoksetina u dozi od 6 mg/kg tt nema interakcije između tretmana i sublinije ( $F_{(1,18)} = 1,73$ ,  $p = 0,502$ ), te da postoji značajan glavni učinak tretmana ( $F_{(1,18)} = 62,3$ ,  $p < 0,0001$ ) (v. Tablicu 8.1. u Prilogu). Glavni učinak sublinija nije bio uočen ( $F_{(1,18)} = 0,963$ ,  $p = 0,339$ ). Relativni porast serotonina u plazmi nakon 6 mg fluoksetina/kg iznosio je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije 32 %, a kod životinja iz 5HT-niske sublinije 80 % (Slika 4.9.).



**Slika 4.8.** Koncentracija serotonina (ng/mL) u plazmi bez trombocita kod ženki WZ-5HT sublinija 60 min nakon jednokratnog tretmana fluoksetinom u dozi od A) 1 mg/kg tt i B) 6 mg/kg tt. V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja po skupinama je naveden u Tablici 4.3., \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Fisherov LSD post hoc test).

Iz slike 4.9. koja prikazuje postotak promjene koncentracije plazmatskog serotonina kod tretiranih u odnosu na netretirane životinje vidljivo je da fluoksetin akutno ima jače djelovanje na životinje iz 5HT-niske sublinije.



**Slika 4.9.** Razina plazmatskog serotonina kod 5HT-sublinija 60 min nakon tretmana sa 1 mg/kg, odnosno 6 mg/kg tt fluoksetina izražena kao % promjene ( $\pm$  SD) u odnosu na kontrolne životinje. Analizirani su podaci prikazani na slici 4.8.

Rezultati učinka višekratne primjene fluoksetina na razinu plazmatskog serotonina kod 5HT-sublinija prikazani su u Tablici 4.4. i na slici 4.10. i 4.11. Korištena doza i vrijeme trajanja tretmana jednako je kao i u pokusima određivanja razine serotonina u trombocitima. Usporedba je provedena uz dozu fluoksetina od 6 mg/kg. Jednoj skupini životinja krv je uzimana 1 sat nakon 9. i.p. injekcije fluoksetina, dok je drugoj skupini životinja krv uzimana 24 sata nakon 9. i.p. injekcije fluoksetina. U pokusima su korišteni mužjaci F11 generacije.

**Tablica 4.4.** Koncentracija serotonina u plazmi kod mužjaka WZ-5HT sublinija 1 sat i 24 sata nakon 9. i.p. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Značajnost razlika navedena je na grafičkom prikazu rezultata (slika 4.11.).

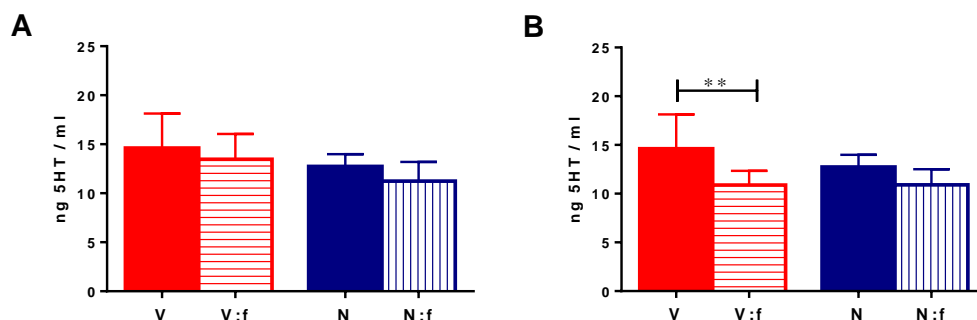
	RAZINA PLAZMATSKOG SEROTONINA	
	1 sat nakon 9 i.p. injekcije	24 sata nakon 9 i.p. injekcije
V	14,62 $\pm$ 3,52 (9)	14,62 $\pm$ 3,52 (9)
V:f	10,89 $\pm$ 1,45 (9)	12,76 $\pm$ 1,58 (9)
N	12,75 $\pm$ 1,24 (8)	12,75 $\pm$ 1,24 (8)
N:f	10,90 $\pm$ 1,76 (8)	11,73 $\pm$ 2,18 (9)

ng 5HT/mL; srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja po skupini naveden je u zagradi.

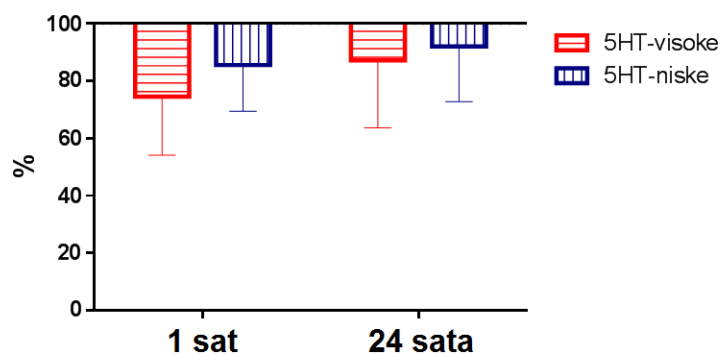
Višekratna primjena fluoksetina dovodi do smanjenja razine plazmatskog serotonina koje je različito ovisno o vremenu uzimanja uzoraka (Tablica 4.4. i Slika 4.10.). Dvosmjerna ANOVA pokazala je postojanje značajnog glavnog učinka sublinije ( $F_{(1,31)} = 5,87$ ,  $p = 0,0214$ ). Nadalje, jedan sat nakon 9. injekcije ne postoji glavni učinak tretmana na razinu plazmatskog serotonina ( $F_{(1,31)} = 2,49$ ,  $p = 0,125$ ), kao ni značajna interakcija između sublinije i tretmana ( $F_{(1,31)} = 0,0463$ ,  $p = 0,831$ ) (v. Tablicu 8.1. u Prilogu). 24 sata nakon zadnje

#### 4. REZULTATI

injekcije vidljiv je značajni glavni učinak tretmana ( $F_{(1,30)} = 13,6$ ,  $p = 0,0009$ ), gdje je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije razina plazmatskog serotonina značajno niža u odnosu na netretirane životinje ( $p = 0,0011$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-niske sublinije razlike nisu statistički značajne (Slika 4.10. B). Analiza je pokazala da nema značajne interakcije između sublinije i tretmana ( $F_{(1,30)} = 1,56$ ,  $p = 0,222$ ), kao ni glavnog učinka sublinije ( $F_{(1,30)} = 1,52$ ,  $p = 0,228$ ).



**Slika 4.10.** Razina plazmatskog serotonina kod mužjaka WZ-5HT sublinija A) 1 sat i B) 24 sata nakon 9. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja je naveden u Tablici 4.4.,  $**p < 0,01$  (Fisherov LSD post hoc test).



**Slika 4.11.** Razina plazmatskog serotonina kod 5HT-sublinija 1 sat i 24 sata nakon 9. injekcije fluoksetina u dozi od 6 mg/kg tt izražena kao % promjene ( $\pm$  SD) u odnosu na kontrolne životinje. Analizirani su podaci prikazani na slici 4.10.

Sumarno, akutna primjena fluoksetina dovodi kod obiju sublinija do inhibicije aktivnosti trombocitnog 5HT prijenosnika i posljedičnog porasta koncentracije slobodnog serotonina u plazmi. Stupanj inhibicije 5HT prijenosnika bio je veći ili indikativno veći kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nego kod životinja iz 5HT-niske sublinije, dok je paralelni



porast koncentracije plazmatskog serotonina bio značajno manji kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije.

Nakon kronične primjene fluoksetina, kod obje sublinije dolazi do pada koncentracije i trombocitnog i plazmatskog serotonina. Pad koncentracije trombocitnog serotonina bio je podjednak ili nešto veći kod životinja iz 5HT-niske sublinije, dok je pad koncentracije plazmatskog serotonina bio izrazitiji kod životinja iz 5HT-visoke sublinije.

### 4.3. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u mozgu WZ-5HT štakora

#### 4.3.1. Koncentracija serotonina u moždanoj kori

Rezultati učinka kronične primjene fluoksetina u dozi od 6 mg/kg tt na razinu serotonina u uzorcima moždane kore 48 sati nakon 27. injekcije prikazani su u Tablici 4.5. i na slici 4.12. Sva istraživanja provedena su paralelno na mužjacima iz obje sublinije, a korištene su životinje iz F11 generacije. Masa izoliranog tkiva moždane kore iznosila je  $65 \pm 25$  mg.

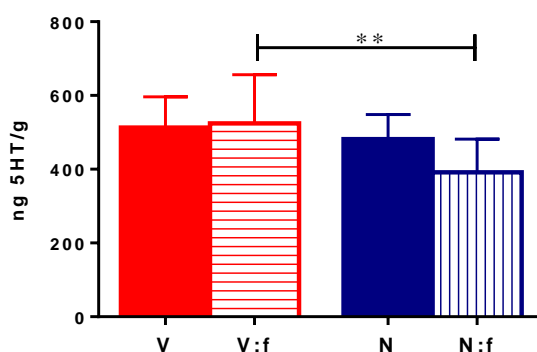
**Tablica 4.5.** Koncentracija serotonina u moždanoj kori mužjaka WZ-5HT sublinija 48 sati nakon 27. injekcije fluoksetina u dozi 6 mg/kg tt, odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Značajnost razlika navedena je na grafičkom prikazu rezultata (slika 4.12.).

RAZINA 5HT U MOŽDANOJ KORI	
V	$513 \pm 83,0$ (8)
V:f	$525 \pm 132$ (8)
N	$482 \pm 66,4$ (8)
N:f	$391 \pm 90,1$ (8)

ng 5HT/g tkiva; srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja naveden je u zagradi.

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je da postoji značajan učinak sublinije ( $F_{(1,28)} = 5,90$ ,  $p = 0,0218$ ), dok učinak tretmana nije pokazan ( $F_{(1,28)} = 1,36$ ,  $p = 0,253$ ), kao ni interakcija između sublinija i tretmana ( $F_{(1,28)} = 2,25$ ,  $p = 0,145$ ) (v. Tablicu 8.2. u Prilogu). Razina serotonina u moždanoj kori kod životinja iz 5HT-niske sublinije tretiranih fluoksetinom niža je za 20 % u odnosu na netretirane životinje no nije dosegnuta statistička

značajnost razlika ( $p = 0,0695$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nije bilo mjerljivih promjena.



**Slika 4.12.** Koncentracija serotonina (ng/g) u uzorcima moždane kore kod mužjaka WZ-5HT sublinija 48 sati nakon 27. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja po skupini = 8, \*\* $p < 0,01$  (Fisherov LSD post hoc test).

### 4.3.2. Aktivnost 5HT prijenosnika u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe

#### 4.3.2.1. Bazalne vrijednosti

Vrijednosti brzine unosa serotonina u uzorcima moždane kore, hipokampusu i regiji jezgara rafe kod ženki i mužjaka iz 5HT-sublinija u bazalnim uvjetima prikazane su u Tablici 4.6. i na slici 4.13. U pokusima smo koristili životinje F11 generacije WZ-5HT štakora.

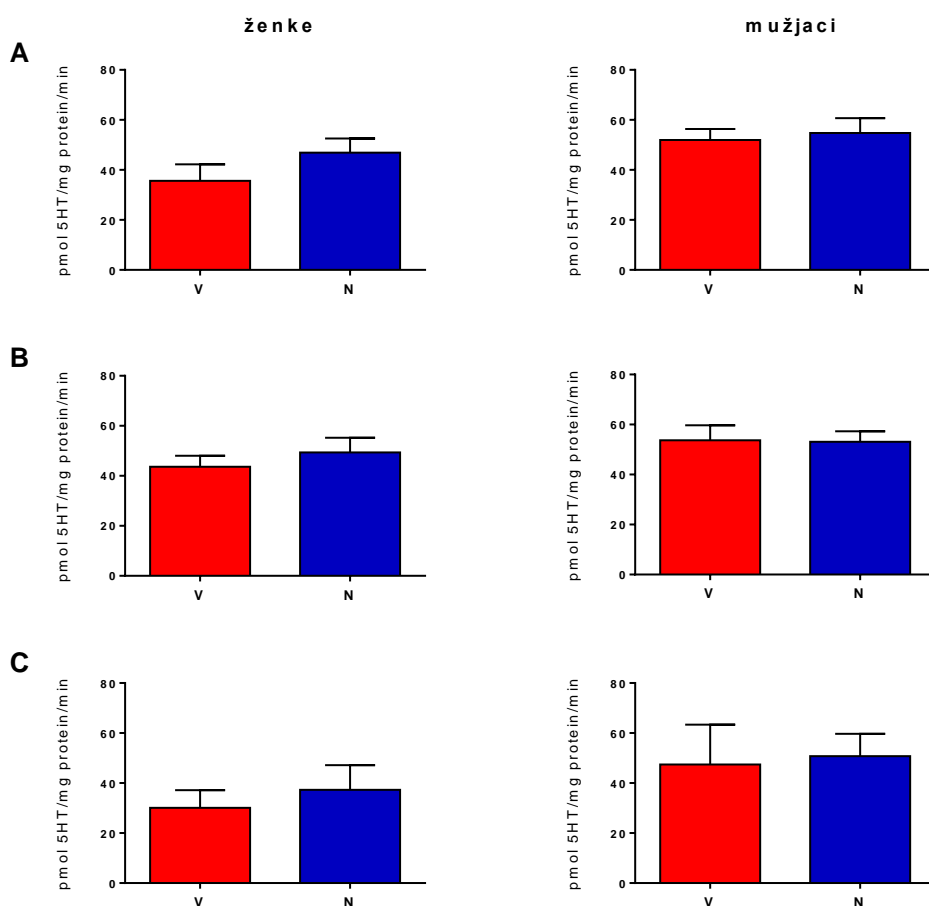
Primarni cilj ovih pokusa bio je istražiti postoje li razlike u brzini unosa 5HT u sinaptosome mozga između 5HT-sublinija. U pojedinom pokusu korištene su samo životinje jednog spola (ženke u 4 pokusa, mužjaci u 2 pokusa, u svakom pokusu po 2 - 4 životinje iz svake sublinije). Samo u jednom pokusu paralelno smo analizirali životinje oba spola i obje 5HT-sublinije (po 2 ženke i 2 mužjaka). Moždana kora i hipokampus uvijek su analizirani individualno dok su, zbog male mase tkiva, 2-3 uzorka regija jezgara rafe različitih životinja sakupljeni u jedan uzorak i tako analizirani. Rezultati pojedinih pokusa nisu se značajno razlikovali te je analiziran zbroj njihovih vrijednosti, što je dovelo do veće varijabilnosti rezultata unutar istraživanih skupina.

**Tablica 4.6.** Brzina unosa 5HT u sinaptosome u uzorcima moždane kore, hipokampusu i jezgara rafe kod životinja WZ-5HT sublinija. V=5HT-visoki, N=5HT-niski.

		BRZINA UNOSA SEROTONINA U SINAPTOSOME		
		moždana kora	hipokampus	jezgre rafe
ženke	V	35,6 ± 6,64 (11)	43,6 ± 4,44 (11)	30,1 ± 7,06 (4)
	N	46,9 ± 5,61 (10)	49,4 ± 6,13 (11)	37,3 ± 11,4 (4)
mužjaci	V	52,0 ± 4,01 (6)	53,7 ± 5,44 (6)	47,4 ± 13,0 (3)
	N	54,8 ± 5,90 (6)	53,1 ± 4,23 (6)	50,8 ± 8,93 (3)

pmol 5HT/mg protein/min; srednja vrijednost ± SEM. Broj životinja/uzoraka po skupini naveden je u zagradi.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da životinje iz 5HT-niske sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije WZ-5HT štakora imaju nešto veće brzine unosa serotonina u sinaptosome, što je u skladu s našim ranijim rezultatima. Razlike su bile prisutne u svakom od 6 napravljenih pokusa, no nisu dosegle statističku značajnost, a u konačnoj analizi izraženije su kod ženki gdje su iznosile 32 % u moždanoj kori, 24 % u regiji jezgara rafe, te 13 % u hipokampusu. Kod mužjaka razlike u moždanoj kori i regiji jezgara rafa iznose do 10 %, a nema ih u hipokampusu, uz napomenu da je analiziran dvostruko manji broj mužjaka (N = 6) nego ženki (N = 11).



**Slika 4.13.** Brzina unosa 5HTT u sinaptosome (pmol 5HT/mg protein/min) u uzorcima A) moždane kore, B) hipokampusa, C) jezgre rafe kod životinja 5HT-visoke (crveno, V) i 5HT-niske (plavo, N) sublinije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. Broj životinja je naveden u Tablici 4.6.

#### 4.3.2.2. Učinak fluoksetina

Rezultat učinka jednokratne primjene fluoksetina na aktivnost serotoninskog prijenosnika na sinaptosomima prikazan je u Tablici 4.7. i na slici 4.14. Prikazane vrijednosti dobivene su u 3 odvojena pokusa u kojima su analizirane po 3 životinje iz svake sublinije. Uzorci regija jezgara rafe iz tri životinje sakupljeni su u jedan zajednički uzorak i tako analizirani.

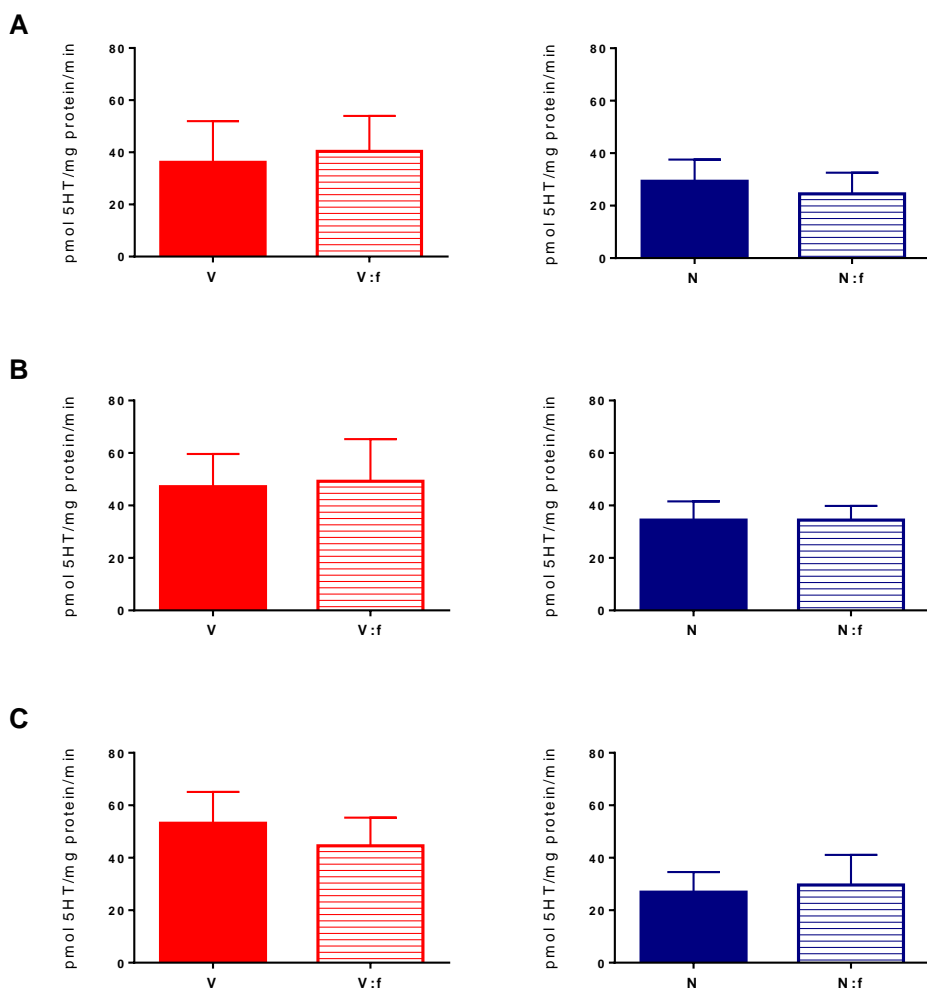
Sva istraživanja provedena su na mužjacima, a korištene su životinje iz F11 generacije, starosti 2,5 mjeseca, tjelesne težine  $266 \pm 18$  g kod 5HT-visoke sublinije, odnosno  $298 \pm 34$  g kod 5HT-niske sublinije. Životinje su tretirane i.p. injekcijom fluoksetina u dozi od 10 mg/kg tt. Sat vremena nakon tretmana životinja je dekapitirana i uzeti su uzorci tkiva mozga (moždana kora, hipokampus i jezgre rafe).

**Tablica 4.7.** Brzina unosa serotonina u sinaptosome u uzorcima moždane kore, hipokampusu i jezgri rafe kod mužjaka WZ-5HT sublinija 60 min nakon i.p. injekcije fluoksetina u dozi 10 mg/kg tt, odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom.

sublinija	BRZINA UNOSA SEROTONINA U SINAPTOSOME		
	moždana kora	hipokampus	jezgre rafe
V	36,2 ± 4,96 (9)	47,2 ± 3,91 (9)	53,2 ± 5,62 (3)
V:f	40,4 ± 4,53 (9)	49,2 ± 5,36 (9)	44,6 ± 6,17 (3)
N	29,3 ± 2,75 (9)	34,4 ± 2,38 (9)	26,9 ± 4,46 (3)
N:f	24,5 ± 2,69 (9)	34,4 ± 1,80 (9)	29,7 ± 6,61 (3)

pmol 5HT/mg protein/min; srednja vrijednost ± SEM. Broj životinja/uzoraka po skupini naveden je u zagradi.

Iz Tablice 4.7. i slike 4.14. vidljivo je da jednokratna primjena fluoksetina ne dovodi do statistički značajnih promjena u brzini unosa serotonina u sinaptosome u ispitivanim regijama mozga, bez obzira na subliniju WZ-5HT štakora ( $p > 0,05$ , t-test). Budući da su 5HT-visoke i 5HT-niske životinje analizirane u različitim pokusima, statistička analiza rezultata provedena je samo s obzirom na učinak fluoksetina kod pojedine sublinije, a sublinije međusobno ovdje nije moguće uspoređivati.

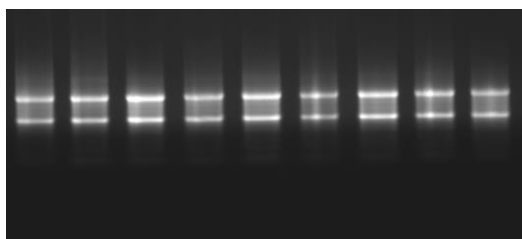


**Slika 4.14.** Brzina unosa serotonina u sinaptosome (pmol 5HT/mg protein/min) u uzorcima A) moždane kore, B) hipokampusu, C) jezgre rafe kod mužjaka WZ-5HT sublinija 60 min nakon primjene fluoksetina (10 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja/uzoraka = 9 (moždana kora, hipokampus) odnosno 3 (jezgre rafe).

### 4.3.3. Ekspresija mRNA za serotoninski prijenosnik i serotoninski receptor tipa 1A u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe

Ekspresija mRNA za serotoninski prijenosnik (5HTT) i serotoninski receptor tipa 1A (5HT1A) analizirana je metodom RT-PCR-a u stvarnom vremenu koja je ranije uhodana u ovom laboratoriju (Bordukalo-Nikšić, 2010). Sva istraživanja provedena su na mužjacima, a korištene su životinje iz F11 generacije. Životinje su tijekom 27 dana bile tretirane fluoksetinom u dozi od 6 mg/kg tt, nakon čega je slijedilo 48 sati perioda ispiranja lijeka prije sakupljanja uzoraka. Kontrolne skupine tretirane su fiziološkom otopinom (NaCl 0.9 %). RNA je analizirana u tri regije: moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe. Ukupna

stanična RNA izolirana je iz 30 - 60 mg tkiva (ovisno o veličini pojedinih regija). Količina izolirane RNA kretala se u rasponu od 16 do 89  $\mu\text{g}$  u moždanoj kori, 10 do 33  $\mu\text{g}$  u regiji jezgara rafa; te 6 do 31  $\mu\text{g}$  u hipokampusu. Cjelovitost izolirane RNA odredili smo prema izgledu vrpce 18S i 28S ribosomalnih RNA (rRNA) (Slika 4.15.). Čistoća izolirane RNA određena je iz omjera apsorbancije na 260 i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ , koji je iznosio  $2,09 \pm 0,050$  u moždanoj kori,  $2,05 \pm 0,019$  u regiji jezgara rafa; te  $2,07 \pm 0,052$  u hipokampusu). PCR je rađen usporedno na kontrolnim životinjama i životinjama tretiranim fluoksetinom iz obje sublinije.



**Slika 4.15.** Reprezentativni izgled RNA razdvojene elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Gornja vrpca odgovara 28S rRNA, a donja 18S rRNA. Podjednaki izgled vrpce rRNA dobiven je u svim uzorcima izolirane RNA.

#### 4.3.3.1. 5HT prijenosnik

Rezultati mjerenja ekspresije mRNA za 5HTT sumarno su prikazani u Tablici 4.8. i na slici 4.16. Razina ekspresije izražena je kao omjer razine mRNA za serotoninški prijenosnik i razine mRNA za referentni gen (GAPDH).

**Tablica 4.8.** Razina mRNA za serotoninški prijenosnik (5HTT) u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe kod mužjaka WZ-5HT sublinija 48 sati nakon 27. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Značajnost razlika među skupinama prikazana je na slici 4.16.

sublinija	5HTT/GAPDH mRNA		
	moždana kora	hipokampus	jezgre rafe
V	$1,00 \pm 0,06$ (8)	$1,00 \pm 0,25$ (7)	$1,00 \pm 0,05$ (7)
V:f	$1,24 \pm 0,14$ (8)	$1,17 \pm 0,23$ (8)	$1,15 \pm 0,06$ (8)
N	$1,70 \pm 0,32$ (8)	$0,90 \pm 0,10$ (8)	$1,11 \pm 0,05$ (8)
N:f	$0,78 \pm 0,12$ (7)	$0,74 \pm 0,06$ (8)	$1,21 \pm 0,07$ (7)

Razina ekspresije gena za 5HTT izražena je kao omjer prema signalu za referentni gen (GAPDH). Srednja vrijednost  $\pm$  SEM. Broj životinja po skupini naveden u zagradi.

Dvosmjerna ANOVA ekspresije mRNA za 5HTT u moždanoj kori pokazala je prisutnost značajne interakcije između sublinije i tretmana ( $F_{(1,27)} = 9,40$ ,  $p = 0,0049$ ) te indikativan glavni učinak tretmana ( $F_{(1,27)} = 3,17$ ,  $p = 0,0864$ ), dok glavni učinak sublinije nije bio statistički značajan (v. Tablicu 8.2. u Prilogu). Tretman je kod životinja iz 5HT-niske sublinije doveo do pada ekspresije mRNA za 5HTT u moždanoj kori ( $p = 0,0023$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nije imao statistički značajan učinak ( $p = 0,3625$ , Fisherov LSD post hoc test). Post hoc analiza pokazala je i statistički značajnu razliku između sublinija u bazalnoj ekspresiji mRNA za 5HTT u moždanoj kori ( $p = 0,0135$ , Fisherov LSD post hoc test), pri čemu su bazalne vrijednosti 5HT-niske sublinije bile za oko 70 % više u odnosu na bazalne vrijednosti 5HT-visoke sublinije. Budući da su se skupine značajno razlikovale s obzirom na standardne devijacije ( $p = 0,0005$ , Bartlettov test), podatke smo dodatno analizirali i neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom pri čemu smo u post hoc testu analizirali samo učinak fluoksetina kod svake sublinije. Ekspresija mRNA za 5HTT u moždanoj kori značajno se razlikovala između četiri ispitivane skupine ( $p = 0,0199$ , Kruskal-Wallisov test), a statistički značajan učinak fluoksetina opažen je, kao i u prethodnoj analizi, samo u 5HT-niskoj ( $p < 0,01$ , Dunnov post hoc test), ali ne i u 5HT-visokoj ( $p > 0,05$ , Dunnov post hoc test) subliniji.

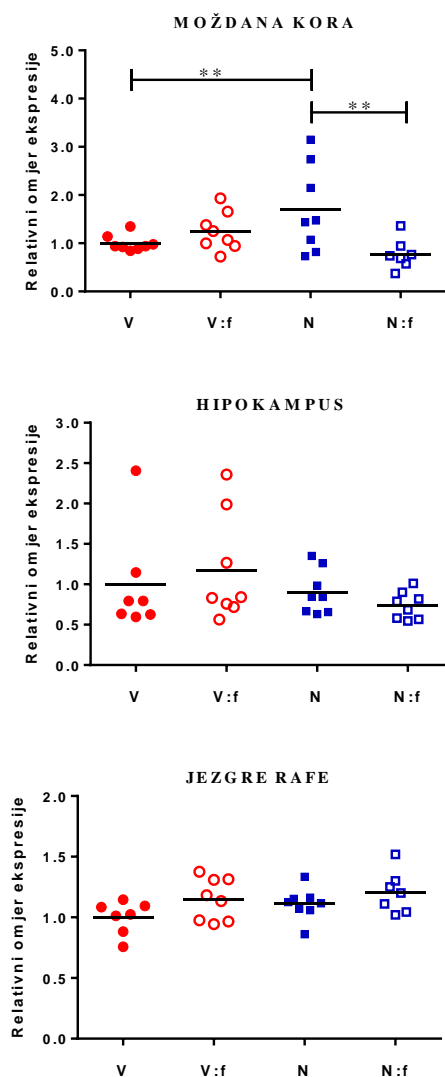
Dvosmjerna analiza varijance ekspresije mRNA za 5HTT u hipokampusu nije pokazala značajnu interakciju između sublinije i tretmana ( $F_{(1,27)} = 0,919$ ,  $p = 0,346$ ), kao ni učinak sublinija ( $F_{(1,27)} = 2,27$ ,  $p = 0,144$ ), ni učinak tretmana ( $F_{(1,27)} = 2,99 \times 10^{-5}$ ,  $p = 0,996$ ) (v. Tablicu 8.2. u Prilogu). Budući da su se skupine značajno razlikovale s obzirom na standardne devijacije ( $p = 0,0034$ , Bartlettov test), podatke smo dodatno analizirali i neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom koji je potvrdio izostanak statistički značajnih razlika između skupina ( $p = 0,4352$ , Kruskal-Wallisov test).

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je da tretman fluoksetinom značajno povećava ekspresiju mRNA za 5HTT u regiji jezgara rafe ( $F_{(1,26)} = 4,76$ ,  $p = 0,0383$ ), dok učinak sublinije ( $F_{(1,26)} = 2,16$ ,  $p = 0,154$ ), kao ni interakcija između tretmana i sublinije ( $F_{(1,26)} = 0,227$ ,  $p = 0,638$ ) nisu bili statistički značajni (v. Tablicu 8.2. u Prilogu). Post hoc analiza učinka fluoksetina pokazala je tendenciju porasta ekspresije mRNA za 5HTT kod životinja iz 5HT visoke sublinije (15 %;  $p=0,0714$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod 5HT-niske sublinije učinak nije bio značajan (9 %;  $p=0,239$ , Fisherov LSD post hoc test).

Sumarno, statistički značajne razlike između sublinija u odgovoru na tretman fluoksetinom nađene su samo za ekspresiju mRNA za 5HTT u moždanoj kori. Specifično, tretman fluoksetinom doveo je kod 5HT-niske sublinije do pada kortikalne ekspresije mRNA



za 5HTT, dok kod 5HT-visoke sublinije nije imao značajan učinak na taj parametar. Dodatna analiza bazalnih vrijednosti kortikalne ekspresije mRNA za 5HTT uputila je na povišenu bazalnu ekspresiju kod životinja iz 5HT-niske sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije. Ekspresija mRNA za 5HTT u hipokampusu nije ovisila o tretmanu, subliniji niti njihovoj interakciji. U regiji jezgra rafe fluoksetin je značajno povećao ekspresiju mRNA za 5HTT, ali nije bilo značajnog učinka sublinije niti interakcije tretmana i sublinije.



**Slika 4.16.** Relativna ekspresija mRNA za serotoninski prijenosnik (5HTT) u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe kod mužjaka WZ-5HT sublinija 48 sati nakon 27. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Horizontalna linija prikazuje srednju vrijednost. Broj životinja je naveden u Tablici 4.8., \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (Fisherov LSD post hoc test).

## 4.3.3.2. Serotoninski receptor tipa 1A

Rezultati mjerenja ekspresije mRNA za receptor 5HT1A sumarno su prikazani u Tablici 4.9. i na slici 4.17. Razina ekspresije izražena je kao omjer razine mRNA za 5HT1A receptor i mRNA za referentni gen (GAPDH).

**Tablica 4.9.** Razina mRNA za serotoninski receptor tipa 1A (5HT1A) u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe kod mužjaka WZ-5HT sublinija 48 sati nakon 27. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Značajnost razlika među skupinama prikazana je na slici 4.17.

sublinija	5HT1A/GAPDH mRNA		
	moždana kora	hipokampus	jezgre rafe
V	1,00 ± 0,08 (8)	1,00 ± 0,04 (8)	1,00 ± 0,05 (8)
V:f	1,00 ± 0,05 (7)	1,19 ± 0,06 (8)	1,06 ± 0,04 (8)
N	1,06 ± 0,05 (8)	1,07 ± 0,05 (8)	1,00 ± 0,06 (8)
N:f	0,86 ± 0,02 (7)	1,19 ± 0,10 (8)	0,97 ± 0,05 (8)

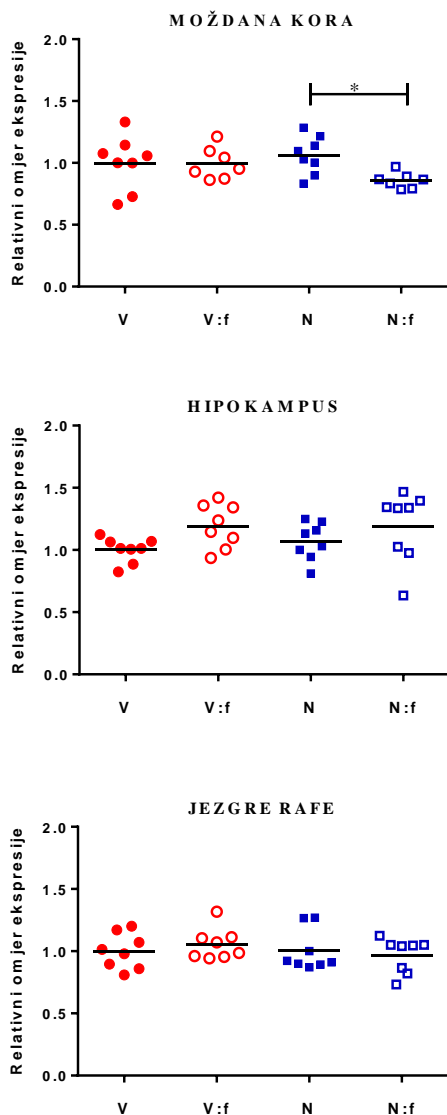
Razina ekspresije gena za 5HT1A receptor izražena je kao omjer prema signalu za referentni gen (GAPDH). Srednja vrijednost ± SEM. Broj životinja po skupini naveden je u zagradi.

Analiza ekspresije mRNA za receptor 5HT1A u moždanoj kori uputila je na indikativnu interakciju sublinija i tretmana ( $F_{(1,26)} = 3,17$ ,  $p = 0,0868$ ) i indikativan glavni učinak tretmana ( $F_{(1,26)} = 3,47$ ,  $p = 0,0737$ ), te pokazala odsutnost glavnog učinka sublinija ( $F_{(1,26)} = 0,449$ ,  $p = 0,509$ ) (v. Tablicu 8.2. u Prilogu). Indikativan nalaz interakcije sublinije i tretmana poduprt je rezultatima post hoc analize učinka fluoksetina kod pojedine sublinije. Konkretno, tretman fluoksetinom doveo je kod životinja iz 5HT-niske sublinije do statistički značajnog pada kortikalne ekspresije mRNA za receptor 5HT1A ( $p = 0,0160$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nije imao statistički značajan učinak (Tablica 8.2. u Prilogu)

Analiza ekspresije mRNA za receptor 5HT1A u hipokampusu pokazala je da tretman fluoksetinom značajno povećava hipokampalnu ekspresiju mRNA za receptor 5HT1A ( $F_{(1,28)} = 5,44$ ,  $p = 0,0271$ ), međutim nije opažen učinak sublinija ( $F_{(1,28)} = 0,243$ ,  $p = 0,626$ ) kao ni interakcija sublinija i tretmana ( $F_{(1,28)} = 0,286$ ,  $p = 0,597$ ). Post hoc analiza učinka fluoksetina kod pojedine sublinije pokazala je tendenciju porasta ekspresije kod životinja iz 5HT-visoke sublinije ( $p = 0,0523$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-niske sublinije učinak nije bio statistički značajan ( $p = 0,214$ , Fisherov LSD post hoc test) (v. Tablicu 8.2. u Prilogu).

Ekspresija mRNA za receptor 5HT1A u regiji jezgara rafe nije bila pod utjecajem ni sublinije ( $F_{(1,28)} = 0,698$ ,  $p = 0,410$ ) niti tretmana ( $F_{(1,28)} = 0,0346$ ,  $p = 0,854$ ). Također nije primijećena interakcija između sublinije i tretmana ( $F_{(1,28)} = 0,833$ ,  $p = 0,369$ ) (v. Tablicu 8.2. u Prilogu).

Sumarno, rezultati ekspresije mRNA za receptor 5HT1A, slično kao i rezultati ekspresije mRNA za 5HTT, upućuju na različit kortikalni odgovor sublinija na tretman fluoksetinom. Specifično, tretman fluoksetinom doveo je kod 5HT-niske sublinije do pada ekspresije mRNA za receptor 5HT1A u moždanoj kori, dok kod 5HT-visoke sublinije nije imao statistički značajan učinak na taj parametar. Hipokampalna ekspresija mRNA za receptor 5HT1A značajno je porasla nakon tretmana fluoksetinom, ali nije uočen glavni učinak sublinije niti interakcija tretmana i sublinije. Ekspresija mRNA za receptor 5HT1A u regiji jezgara rafe nije ovisila o tretmanu, subliniji niti njihovoj međusobnoj interakciji.



**Slika 4.17.** Relativna ekspresija mRNA za serotoniniski receptor tipa 1A (5HT1A) u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe kod mužjaka WZ-5HT sublinija 48 sati nakon 27. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Horizontalna linija prikazuje srednju vrijednost. Broj životinja je naveden u Tablici 4.9., \* $p < 0,05$  (Fisherov LSD post hoc test).

U zaključku, možemo reći da primjena fluoksetina dovodi do promjena u ekspresiji mRNA za receptor 5HT1A i 5HTT u mozgu, a smjer i opseg promjena ovise o subliniji i ispitivanoj regiji mozga.

#### 4.4. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na ponašanje životinja iz WZ-5HT sublinija

U svrhu karakterizacije ponašanja životinja korištena su tri specifična testa koji su provedeni na istim skupinama životinja tretiranim fluoksetinom u dozi od 6 mg/kg tt. Prvi je proveden test u otvorenom polju (24 sata nakon 16. injekcije fluoksetina), a slijedili su ga ploča sa rupama (24 sata nakon 20. injekcije fluoksetina) te uzdignuti križni labirint (24 sata nakon 22. injekcije fluoksetina). Sva istraživanja provedena su na mužjacima iz F11 generacije, starosti 2,5 mjeseca.

##### 4.4.1. Emotivno ponašanje

###### 4.4.1.1. Test otvorenog prostora

Vrijednosti pojedinih parametara ponašanja u testu otvorenog prostora prikazani su u Tablici 4.10. i na slici 4.18. Dva odvojena pokusa pokazala su podjednake rezultate, te su ovdje prikazani u obliku njihove srednje vrijednosti.

Dvosmjerna analiza varijance anksioznog ponašanja pokazala je značajni učinak sublinije (vrijeme provedeno u centralnoj zoni:  $F_{(1,47)} = 5,45$ ,  $p = 0,0239$ ; vrijeme do timarenja u rubnoj zoni:  $F_{(1,48)} = 4,81$ ,  $p = 0,0332$ ), gdje kontrolne životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju tendenciju povećane anksioznosti u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (vrijeme provedeno u centralnoj zoni:  $p = 0,0858$ ; vrijeme do timarenja u rubnoj zoni:  $p = 0,0961$ , Fisherov LSD post hoc test). Analiza nadalje pokazuje značajan učinak tretmana ( $F_{(1,48)} = 6,76$ ,  $p = 0,0124$ ) na vrijeme timarenja u rubnoj zoni, kao i na vrijeme provedeno u centralnoj zoni ( $F_{(1,47)} = 3,84$ ,  $p = 0,0559$ ), dok interakcija između sublinije i tretmana nije bila statistički značajna (v. Tablicu 8.3. u Prilogu). Do smanjenog anksioznog ponašanja tijekom tretmana, mjenog kao vrijeme timarenja u rubnoj zoni, došlo je samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije ( $p = 0,0072$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-niske sublinije učinak tretmana nije bio značajan ( $p = 0,364$ , Fisherov LSD post hoc test). Životinje tretirane fluoksetinom iz 5HT-visoke sublinije pokazuju i jasnu tendenciju duljeg boravka u centru aparature ( $p = 0,0757$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-niske sublinije to nije opaženo ( $p = 0,331$ , Fisherov LSD post hoc test).

Analiza istraživačke aktivnosti mjerene kao vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge pokazala je prisutnost glavnog učinka sublinije ( $F_{(1,47)} = 5,75$ ,  $p = 0,0205$ ). Post hoc analiza pokazala je da kontrolne životinje iz 5HT-niske sublinije provode više vremena u

istraživanju nove okoline u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije ( $p = 0,0029$ , Fisherov LSD post hoc test) (v. Tablicu 8.3. u Prilogu). Nadalje, vidljiva je značajna interakcije između sublinije i tretmana ( $F_{(1,47)} = 7,86$ ,  $p = 0,0073$ ). Post hoc analiza učinka tretmana fluoksetinom kod pojedine sublinije pokazala je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije porast vremena provedenog u uzdizanju na stražnje noge u odnosu na kontrolne životinje ( $p = 0,0039$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-niske sublinije tretman nije imao učinka ( $p = 0,354$ , Fisherov LSD post hoc test).

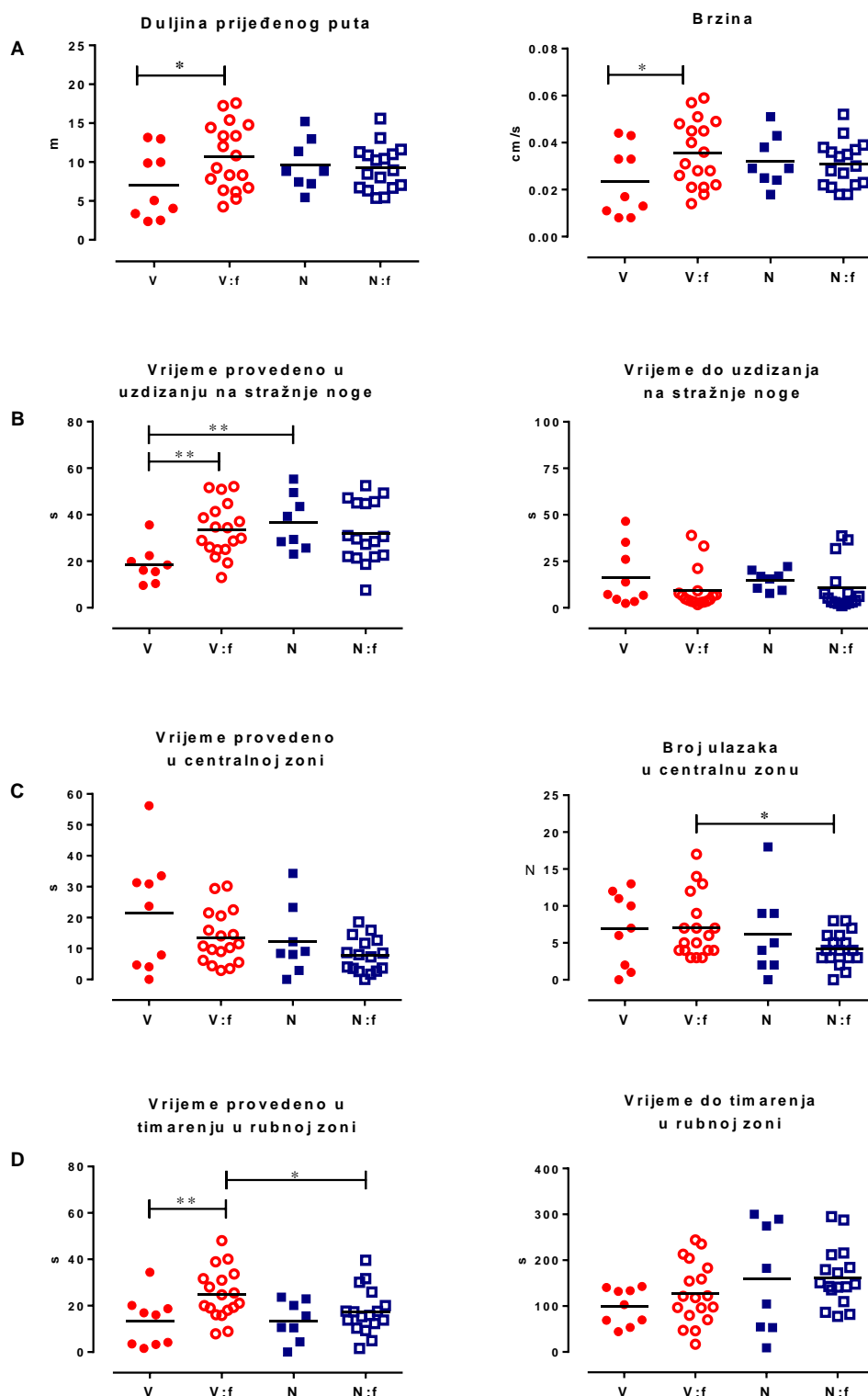
Dvosmjerna ANOVA lokomotorne aktivnosti životinja pokazala je indikativnu interakciju između sublinije i tretmana (duljina prijeđenog puta:  $F_{(1,48)} = 3,29$ ,  $p = 0,0757$ ; brzina kretanja:  $F_{(1,48)} = 3,31$ ,  $p = 0,0750$ ), te odsutnost glavnog učinka sublinije (duljina prijeđenog puta:  $F_{(1,48)} = 0,311$ ,  $p = 0,579$ ; brzina kretanja:  $F_{(1,48)} = 0,309$ ,  $p = 0,581$ ) i tretmana (duljina prijeđenog puta:  $F_{(1,48)} = 2,07$ ,  $p = 0,157$ ; brzina kretanja:  $F_{(1,48)} = 2,16$ ,  $p = 0,149$ ). Indikativan nalaz interakcije sublinije i tretmana poduprt je rezultatima post hoc analize učinka fluoksetina kod pojedine sublinije. Tretman fluoksetinom je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije doveo do značajnog porasta u duljini prijeđenog puta u rubnoj zoni ( $p = 0,0224$ , Fisherov LSD post hoc test), kao i brzini kretanja ( $p = 0,0211$ , Fisherov LSD post hoc test), dok nije značajno utjecao na lokomotornu aktivnost životinja iz 5HT-niske sublinije (v. Tablicu 8.3. u Prilogu).

Sumarno, rezultati učinka tretmana fluoksetinom na pojedine parametre ponašanja u testu otvorenog prostora upućuju na različiti odgovor sublinija. Specifično, tretman fluoksetinom doveo je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije do smanjenog anksioznog ponašanja, te povećane istraživačke i lokomotorne aktivnosti, dok kod 5HT-niske sublinije nije imao značajan učinak na navedene parametre. Analiza bazalnih vrijednosti parametara ponašanja pokazala je da životinje iz 5HT-niske sublinije provode više vremena u istraživanju nove okoline u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije. Uz to, životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju povećanu anksioznost u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije.

**Tablica 4.10.** Vrijednosti pojedinih parametara ponašanja u testu otvorenog prostora kod mužjaka WZ-5HT sublinija 24 sata nakon 16. i.p. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom.

Parametri	5HT-visoka sublinija			5HT-niska sublinija		
	fiziol.otop.	fluoksetin	p	fiziol.otop.	fluoksetin	p
<b>RUBNA ZONA</b>						
Uzdizanje na stražnje noge (s)	18,5 ± 8,19	33,5 ± 11,5	**	36,8 ± 11,9	32,1 ± 13,0	ns
Vrijeme do uzdizanja na stražnje noge (s)	16,2 ± 16,0	11,8 ± 14,5	ns	14,9 ± 5,24	10,6 ± 12,9	ns
Vrijeme provedeno u timarenju (s)	13,2 ± 11,0	24,9 ± 10,8	**	13,5 ± 8,64	17,5 ± 9,74	ns
Vrijeme do početka timarenja (s)	98,8 ± 39,9	128 ± 67,3	ns	159 ± 119	163 ± 63,2	ns
Duljina prijednog puta (m)	5,72 ± 3,32	9,14 ± 3,45	**	8,55 ± 2,46	8,50 ± 2,66	ns
<b>SREDIŠNJA ZONA</b>						
Vrijeme boravka u zoni (s)	21,4 ± 18,6	13,5 ± 8,41	ns	12,3 ± 11,3	7,76 ± 5,59	ns
Vrijeme do ulaska u zonu (s)	108 ± 111	57,0 ± 71,7	ns	41,5 ± 24,3	58,1 ± 84,1	ns
Broj ulazaka u zonu	6,89 ± 4,96	7,06 ± 4,25	ns	6,13 ± 5,79	4,24 ± 2,28	ns
<b>OSTALO</b>						
Duljina ukupno prijednog puta (m)	7,04 ± 4,45	10,6 ± 4,24	*	9,67 ± 3,27	9,25 ± 2,86	ns
Brzina kretanja (cm/s)	0,023±0,015	0,036±0,014	*	0,032±0,011	0,031±0,010	ns
Broj fecesa	2,89 ± 3,44	1,89 ± 2,40	ns	1,63 ± 1,51	2,59 ± 1,87	ns
Težina (g)	352 ± 13,0	359 ± 31,3	ns	346 ± 31,8	334 ± 22,1	ns
Vrijeme mobilnosti (s)	199 ± 54,9	211 ± 42,5	ns	221 ± 34,1	227 ± 26,2	ns

Vrijednosti mjerenja prikazane su kao srednje vrijednosti ± SD. Broj životinja = 8 - 9 (V, N) ili 18 (V:f, N:f). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (Fisherov LSD post hoc test). s = sekunde, m = metar, cm/s = centimetar u sekundi.



**Slika 4.18.** Karakteristični oblici ponašanja kod mužjaka WZ-5HT sublinija u testu otvorenog prostora, 24 sata nakon 16. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). A) lokomotorna aktivnost, B) istraživačka aktivnost, C) i D) ponašanje nalik na anksioznost. V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Horizontalna linija prikazuje srednju vrijednost. Broj životinja = 8 - 9 (V, N) ili 18 (V:f, N:f), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Fisherov LSD post hoc test). s = sekunde, m = metar, cm/s = centimetar u sekundi.



#### 4.4.1.2. Ploča s rupama

Rezultati testa ploče sa rupama prikazani su u Tablici 4.11. i na slici 4.19. Provedena su dva odvojena pokusa na dvije grupe životinja koja su dala slične rezultate, te su ovdje prikazani u obliku njihove srednje vrijednosti.

Dvosmjerna analiza varijance anksioznog ponašanja nije pokazala utjecaj sublinije (vrijeme provedeno u guranju glave u rupe u centralnoj zoni:  $F_{(1,46)} = 0,144$ ;  $p = 0,706$ ; vrijeme do guranja glave u rupe u centralnoj zoni:  $F_{(1,48)} = 2,73$ ;  $p = 0,105$ ), niti tretmana (vrijeme provedeno u guranju glave u rupe u centralnoj zoni:  $F_{(1,46)} = 0,661$ ;  $p = 0,4204$ ; vrijeme do guranja glave u rupe u centralnoj zoni:  $F_{(1,48)} = 1,78$ ;  $p = 0,188$ ). Također nije primijećena interakcija između sublinije i tretmana (vrijeme provedeno u guranju glave u rupe u centralnoj zoni:  $F_{(1,46)} = 1,32$ ;  $p = 0,256$ ; vrijeme do guranja glave u rupe u centralnoj zoni:  $F_{(1,48)} = 0,999$ ;  $p = 0,323$ ) (v. Tablicu 8.3. u Prilogu).

Dvosmjerna ANOVA istraživačke aktivnosti pokazuje značajan glavni učinak tretmana ( $F_{(1,45)} = 6,53$ ,  $p = 0,014$ ), mjereno kao vrijeme do uzdizanja na stražnje noge, dok glavni učinak sublinije, kao ni interakcija između sublinije i tretmana, nije bio statistički značajan (v. Tablicu 8.3. u Prilogu). Tretman je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije doveo do povećane istraživačke aktivnosti, mjerene kao vrijeme do uzdizanja na stražnje noge ( $p = 0,0354$ , Fisherov LSD post hoc test). Kod životinja iz 5HT-niske sublinije višekratni tretman fluoksetinom doveo je do značajnog pada istraživačke aktivnosti mjerene kao vrijeme do guranja glave u rupu u rubnoj zoni ( $p = 0,0418$ , Fisherov LSD test), kao i vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge ( $p = 0,0251$ , Fisherov LSD test). Istraživačka aktivnost u testu ploče s rupama, mjerena kao vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge, bila je pod utjecajem sublinije ( $F_{(1,46)} = 11,8$ ;  $p = 0,0013$ ), gdje životinje iz 5HT-niske sublinije provode više vremena u istraživanju u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije ( $p = 0,0043$ , Fisherov LSD post hoc test).

Lokomotorna aktivnost u testu ploče s rupama nije bila pod utjecajem ni tretmana, niti je primijećena interakcija između sublinije i tretmana (v. Tablicu 8:3. u Prilogu). Analiza lokomotorne aktivnosti pokazala je značajan učinak sublinije (duljina prijeđenog puta:  $F_{(1,48)} = 7,45$ ,  $p = 0,0089$ ; brzina kretanja:  $F_{(1,48)} = 7,58$ ,  $p = 0,0083$ ). Tako u bazalnim uvjetima životinje iz 5HT-niske sublinije prelaze veći put ( $p = 0,0427$ , Fisherov LSD post hoc test) i imaju veću brzinu kretanja tijekom testiranja ( $p = 0,0414$ , Fisherov LSD post hoc test) u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije.

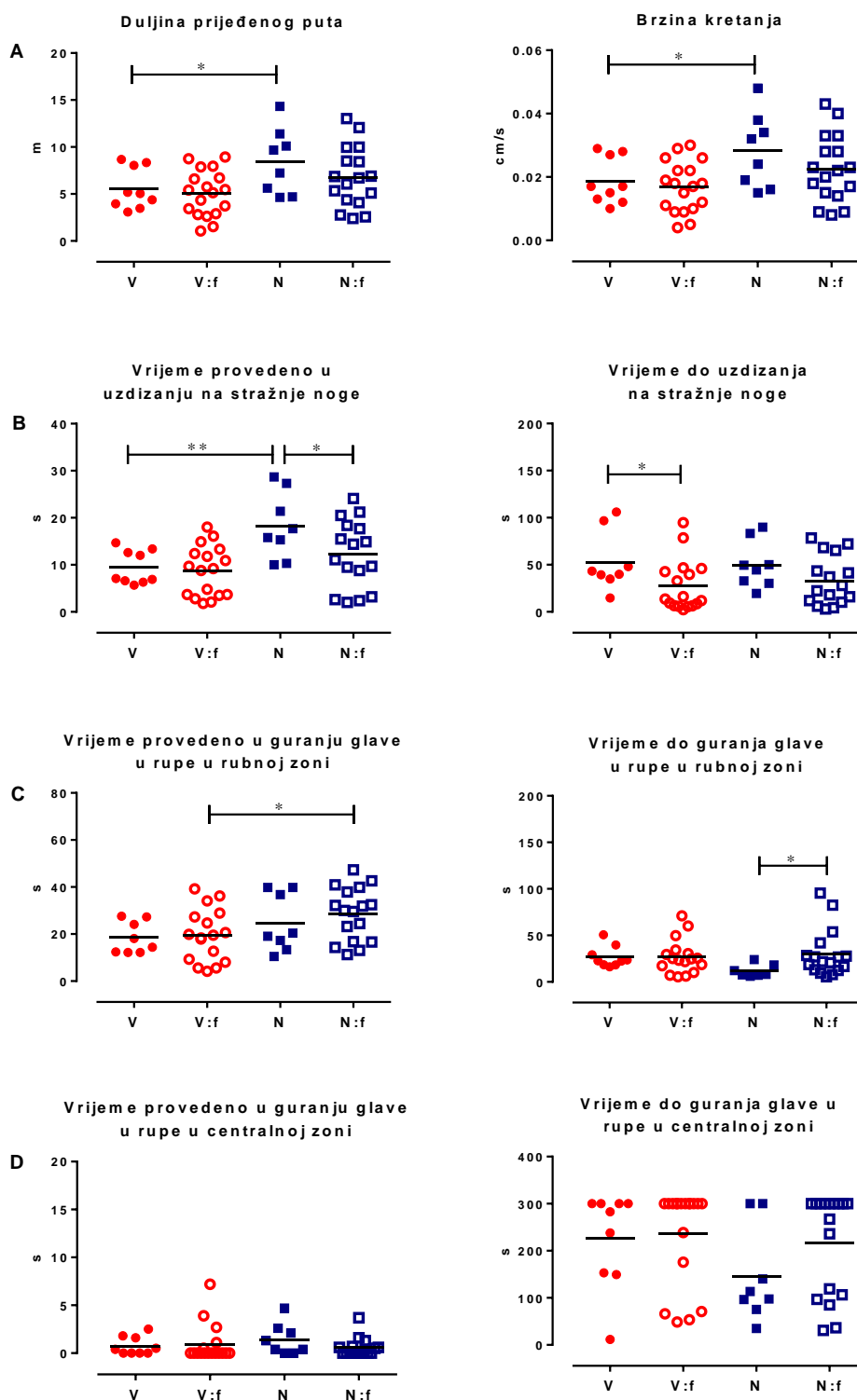
Sumarno, anksiozno ponašanje životinja u testu ploče sa rupama nije ovisilo o subliniji, tretmanu niti njihovoj interakciji. Analiza istraživačkog ponašanja ukazuje na

različiti odgovor sublinija na tretman fluoksetinom ovisno o obliku ponašanja koje se promatra. Specifično, višekratni tretman fluoksetinom doveo je do povećanja nekih od pokazatelja istraživačke aktivnosti kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, dok je kod životinja iz 5HT-niske sublinije doveo do promjene (smanjenja) drugih pokazatelja. Analiza bazalnih vrijednosti ukazala je na povećanu istraživačku aktivnost kod životinja iz 5HT-niske sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije. Lokomotorna aktivnost životinja nije bila pod utjecajem tretmana niti interakcije između sublinije i tretmana. Analiza bazalnih vrijednosti uputila je na povišenu lokomotornu aktivnost kod životinja iz 5HT-niske sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije.

**Tablica 4.11.** Vrijednosti pojedinih parametara ponašanja u ploči sa rupama kod mužjaka WZ-5HT sublinija 24 sata nakon 20. i.p. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom.

Parametri	5HT-visoka sublinija			5HT-niska sublinija		
	fiziol.otop.	fluoksetin	p	fiziol.otop.	fluoksetin	p
<b>RUBNA ZONA</b>						
Vrijeme provedeno u guranju glave u rupe (s)	18,5 ± 6,82	19,5 ± 11,1	ns	24,6 ± 12,2	28,5 ± 11,3	ns
Vrijeme do guranja glave u rupe (s)	26,8 ± 11,4	27,1 ± 18,4	ns	11,8 ± 6,77	30,0 ± 25,4	*
Broj guranja glave u rupe	11,5 ± 3,59	12,0 ± 7,60	ns	13,8 ± 4,86	14,5 ± 5,30	ns
<b>SREDIŠNJA ZONA</b>						
Vrijeme provedeno u guranju glave u rupe (s)	0,756±0,957	0,906±1,97	ns	1,44 ± 1,64	0,563±0,978	ns
Vrijeme do guranja glave u rupe (s)	226 ± 102	236 ± 102	ns	145 ± 101	216 ± 108	ns
Broj guranja glave u rupe	0,778±0,833	0,941±1,89	ns	0,857±0,690	0,625±1,02	ns
<b>OSTALO</b>						
Duljina ukupno prijeđenog puta (m)	5,58 ± 2,19	5,06 ± 2,42	ns	8,46 ± 3,50	6,78 ± 3,21	ns
Brzina kretanja (cm/s)	0,019±0,007	0,017±0,008	ns	0,028±0,012	0,023±0,011	ns
Vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge (s)	9,48 ± 3,60	8,68 ± 5,29	ns	18,3 ± 7,04	12,3 ± 7,22	*
Vrijeme do uzdizanja na stražnje noge (s)	52,9 ± 31,6	27,5 ± 27,4	*	50,0 ± 24,9	32,9 ± 26,0	ns
Broj fecesa	0,625±1,19	0,824±1,47	ns	0,875±1,25	0,750±1,34	ns
Težina (g)	360 ± 13,9	365 ± 32,3	ns	351 ± 31,5	336 ± 21,3	ns
Vrijeme mobilnosti (s)	151 ± 16,1	117 ± 50,2	ns	187 ± 36,0	149 ± 47,5	*
% guranja glave u rupe (broj guranja glave u centralnoj zoni/ukupni broj)	6,32 ± 5,66	3,93 ± 7,05	ns	6,48 ± 4,86	4,10 ± 6,08	ns

Vrijednosti mjerenja prikazane su kao srednje vrijednosti ± SD. Broj životinja = 8 - 9 (V, N) ili 18 (V:f, N:f). \*p<0,05 (Fisherov LSD post hoc test). s = sekunde, m = metar, cm/s = centimetar u sekundi.



**Slika 4.19.** Karakteristični oblici ponašanja kod mužjaka WZ-5HT sublinija u ploči sa rupama, 24 sata nakon 20. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). A) lokomotorna aktivnost, B) i C) istraživačka aktivnost, D) ponašanje nalik na anksioznost. V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Horizontalna linija prikazuje srednju vrijednost. Broj životinja = 8 - 9 (V, N) ili 18 (V:f, N:f), \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (Fisherov LSD post hoc test). s = sekunde, m = metar, cm/s = centimetar u sekundi.

#### 4.4.1.3. Uzdignuti križni labirint

Isti tipovi ponašanja, lokomotorno i istraživačko ponašanje te ponašanje nalik na anksioznost, istraženo je kod mužjaka iz 5HT-sublinija Wistar Zagreb štakora na uzdignutom križnom labirintu. Dva odvojena pokusa pokazala su sličan rezultat, te su rezultati prikazani u obliku njihove srednje vrijednosti. Vrijednosti pojedinih parametara ponašanja uzdignutom križnom labirintu prikazani su u Tablici 4.12. i na slici 4.20.

Dvosmjerna analiza varijance anksioznog ponašanja u uzdignutom križnom labirintu nije pokazala prisutnost značajnog učinka sublinije niti tretmana, dok je prisutna indikativna interakcija između sublinije i tretmana obzirom na % ulazaka životinja u otvorene krakove tijekom testa ( $F_{(1,48)} = 3,69$ ,  $p = 0,0605$ ) (v. Tablicu 8.3. u Prilogu). Indikativan nalaz interakcije sublinije i tretmana poduprt je rezultatima post hoc analize učinka fluoksetina kod pojedine sublinije. Specifično, višekratni tretman fluoksetinom doveo je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije do tendencije smanjenja anksioznosti mjerene kao % vremena proveden u otvorenim kracima ( $p = 0,0503$ , Fisherov LSD post hoc test), kao i % ulazaka u otvorene krakove ( $p = 0,0803$ , Fisherov LSD post hoc test), dok kod životinja iz 5HT-niske sublinije nije imao učinka na mjerene parametre.

Dvosmjerna ANOVA pokazala je prisutnost značajnog glavnog učinka tretmana ( $F_{(1,48)} = 5,89$ ,  $p = 0,0190$ ) na istraživačku aktivnost životinja mjerenu kao vrijeme provedeno u naginjanju preko ruba otvorenih krakova, dok interakcija između sublinije i tretmana nije primijećena (v. Tablicu 8.3. u Prilogu). Post hoc test pokazuje da je kronični tretman fluoksetinom doveo do promjene samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije ( $p = 0,0456$ , Fisherov LSD post hoc test). Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan glavni učinak sublinije na istraživačku aktivnost životinja ( $F_{(1,47)} = 30,9$ ,  $p < 0,0001$ ), a post hoc test upućuje da životinje iz 5HT-niske sublinije pokazuju povećanu istraživačku aktivnost u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije ( $p = 0,0005$ , Fisherov LSD post hoc test), mjerenu kao vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge.

Dvosmjerna ANOVA lokomotorne aktivnosti životinja nije pokazala značajnu interakciju između sublinije i tretmana, kao ni učinak tretmana (v. Tablicu 8.3. u Prilogu). Analiza lokomotorne aktivnosti pokazala je statistički značajnu razliku između sublinija u bazalnim uvjetima (duljina prijeđenog puta:  $F_{(1,46)} = 9,05$ ,  $p = 0,0042$ ; brzina kretanja:  $F_{(1,46)} = 8,73$ ,  $p = 0,0049$ ). Post hoc analiza je pokazala da životinje iz 5HT-niske sublinije pokazuju povećanu lokomotornu aktivnost u usporedbi s životinjama iz 5HT-visoke sublinije, mjerenu kao duljinu prijeđenog puta ( $p = 0,0074$ , Fisherov LSD post hoc test) i brzinu kretanja ( $p = 0,0093$ , Fisherov LSD post hoc test).

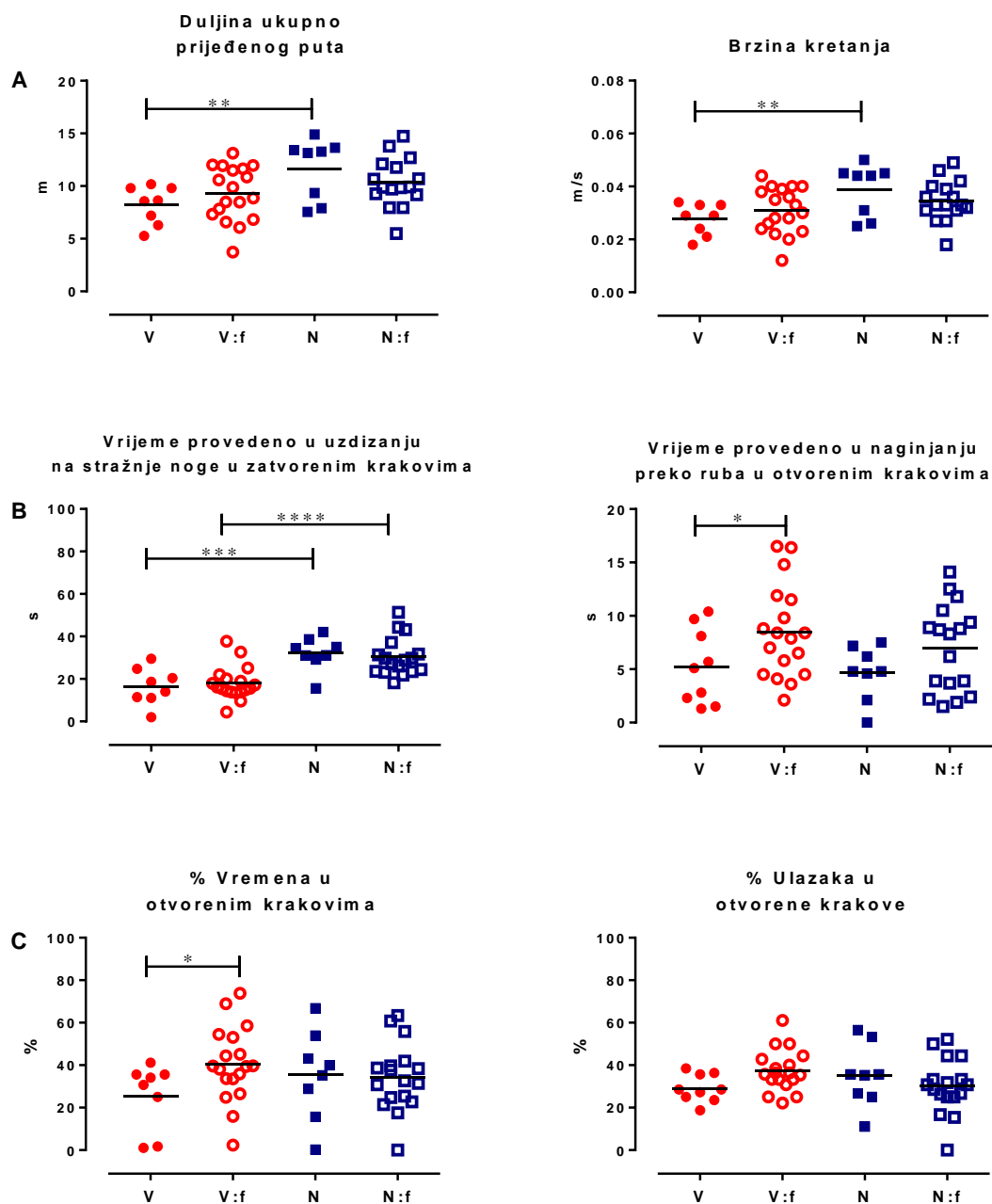
Sumarno, rezultati analize parametara ponašanja u uzdignutom križnom labirintu upućuju na različiti odgovor sublinija na tretman fluoksetinom. Tretman fluoksetinom doveo je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije do povećane istraživačke aktivnosti te smanjenog ponašanja nalik na anksioznost, dok kod 5HT-niske sublinije nije imao značajan učinak na te parametre. Analiza bazalnih vrijednosti pojedinih parametara ponašanja uputila je na povećanu lokomotornu i istraživačku aktivnost kod životinja iz 5HT-niske sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije.

Uzimajući u obzir rezultate sva tri provedena testa, koji mjere iste oblike ponašanja, može se zaključiti da kronično izlaganje fluoksetinu dovodi do promjena u ponašanju životinja, te da su te promjene ili jače izražene ili prisutne samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije kod kojih je došlo do povećane lokomotorne i istraživačke aktivnosti, te smanjenog ponašanja nalik na anksioznost.

**Tablica 4.12.** Vrijednosti pojedinih parametara ponašanja u testu uzdignutog križnog labirinta kod mužjaka WZ-5HT sublinija 24 sata nakon 22. i.p. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom.

Parametri	5HT-visoka sublinija			5HT-niska sublinija		
	fiziol.otop.	fluoksetin	p	fiziol.otop.	fluoksetin	p
<b>ZATVORENI KRAKOVI</b>						
Vrijeme boravka (s)	151 ± 30,4	111 ± 28,4	**	132 ± 37,7	128 ± 30,8	ns
Duljina prijeđenog puta (m)	4,82 ± 1,32	4,90 ± 1,23	ns	6,12 ± 1,12	5,75 ± 1,11	ns
Broj ulazaka u krakove	9,67 ± 3,28	8,06 ± 2,13	ns	9,25 ± 1,39	10,8 ± 2,44	ns
Uzdizanje na stražnje noge (s)	18,9 ± 10,8	18,0 ± 7,75	ns	32,2 ± 7,93	30,3 ± 8,95	ns
<b>OTVORENI KRAKOVI</b>						
Vrijeme boravka (s)	65,4 ± 34,8	81,0 ± 38,3	ns	76,7 ± 51,9	69,0 ± 37,6	ns
Duljina prijeđenog puta (m)	1,69 ± 1,00	2,16 ± 1,40	ns	2,78 ± 2,22	2,48 ± 1,67	ns
Broj ulazaka u krakove	3,89 ± 1,27	5,00 ± 2,17	ns	5,63 ± 3,62	4,50 ± 2,22	ns
Naginjanje preko ruba otvorenih krakova (s)	9,51 ± 6,19	12,7 ± 5,17	*	10,2 ± 6,77	10,2 ± 5,85	ns
<b>OSTALO</b>						
Duljina ukupno prijeđenog puta (m)	8,22 ± 1,80	9,31 ± 2,58	ns	11,6 ± 2,90	10,4 ± 2,32	ns
Brzina kretanja (cm/s)	0,028±0,006	0,0031±0,009	ns	0,039±0,010	0,035±0,028	ns
Broj fecesa	0,00 ± 0,00	1,06 ± 2,04	*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ns
Težina (g)	362 ± 13,9	369 ± 30,2	ns	357 ± 35,7	342 ± 24,2	ns
% Vremena u otvorenim krakovima	25,6 ± 15,7	40,4 ± 17,9	*	35,5 ± 21,0	34,3 ± 16,0	ns
% Ulazaka u otvorene krakove	29,1 ± 6,55	37,4 ± 9,73	ns	34,9 ± 14,8	30,3 ± 13,0	ns

Vrijednosti mjerenja prikazane su kao srednje vrijednosti ± SD. Broj životinja = 8-9 (V, N) ili 18 (V:f, N:f). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 (Fisherov LSD post hoc test). s = sekunde, m = metar, cm/s = centimetar u sekundi.



**Slika 4.20.** Karakteristični oblici ponašanja kod mužjaka WZ-5HT štakora u testu uzdignutog križnog labirinta, 24 sata nakon 22. i.p. injekcije fluoksetina (6 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). A) lokomotorna aktivnost, B) istraživačka aktivnost, C) ponašanje nalik na anksioznost. V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Horizontalna linija prikazuje srednju vrijednost. Broj životinja = 8 - 9 (V, N) ili 18 (V:f, N:f), \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  (Fisherov LSD post hoc test). s = sekunde, m = metar, cm/s = centimetar u sekundi.



#### 4.4.2. Kognitivne funkcije

Strahom motivirano učenje i pamćenje istraženo je korištenjem testa pasivnog izbjegavanja pri kojem su životinje primile fluoksetin (15 mg/kg, i.p.) 30 minuta prije početka treninga.

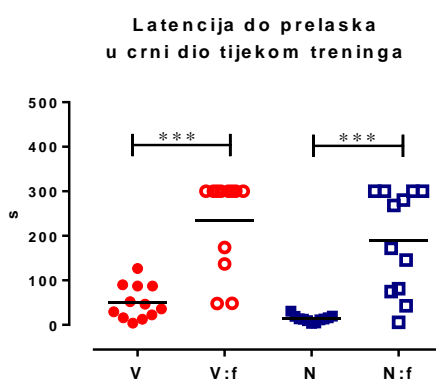
Prostorno učenje i pamćenje ispitali smo koristeći Morrisov vodeni labirint. Životinje su tijekom četiri dana učenja tretirane fluoksetinom (15 mg/kg, i.p.) 30 minuta prije početka učenja, a peti dan se proveo test pamćenja.

U oba pokusa korištene su ženke iz F11 generacije, starosti 4,5 mjeseca.

##### 4.4.2.1. Test pasivnog izbjegavanja

Rezultati pokusa prikazani su u Tablici 4.13. i na slikama 4.21. i 4.22. Kako je primarni cilj bio istražiti parametre učenja i pamćenja kod 5HT-sublinija nakon tretmana fluoksetinom, na svakoj subliniji provedena su po dva neovisna pokusa u kojima su korištene kontrolne životinje i životinje tretirane fluoksetinom. U pokusima su dobiveni podjednaki rezultati, te je ovdje prikazana njihova srednja vrijednost.

Tretman fluoksetinom prije treninga životinja je kod obje 5HT-sublinije značajno utjecao na latenciju ulaska u crni odjeljak. Životinje tretirane fluoksetinom značajno više vremena provedu u bijelom odjeljku prije prelaska u crni nego životinje tretirane fiziološkom otopinom ( $p < 0,0001$ , t-test).



**Slika 4.21.** Latencija ulaska u crni odjeljak tijekom treninga (sekunde) kod ženki WZ-5HT sublinija u testu izbjegavanja mjerena 30 minuta nakon i.p. injekcije fluoksetina (15 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja po skupini = 12. \*\*\* $p < 0,0001$  (t-test).

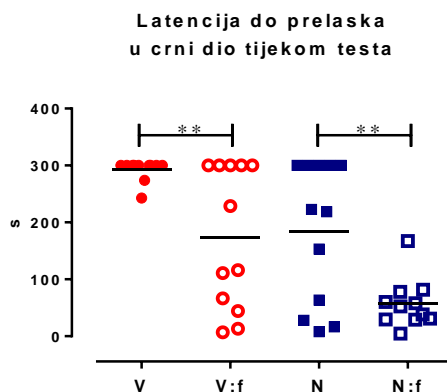
#### 4. REZULTATI

**Tablica 4.13.** Vrijednosti pojedinih parametara ponašanja u testu izbjegavanja kod ženki WZ-5HT sublinija 30 min nakon i.p. injekcije fluoksetina (15 mg/kg tt), odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom.

Parametri	5HT-visoka sublinija			5HT-niska sublinija		
	fiziol.otop.	fluoksetin	p	fiziol.otop.	fluoksetin	p
<b>HABITUACIJA</b>						
Latencija ulaska u crni odjeljak (s)	55,2 ± 27,7	54,7 ± 33,3	ns	21,0 ± 8,32	29,6 ± 16,34	ns
Vrijeme u crnom odjeljku (s)	83,1 ± 18,8	84,1 ± 33,2	ns	132 ± 24,4	129 ± 26,1	ns
Broj prelazaka u crni odjeljak	2,00 ± 0,83	3,00 ± 0,90	ns	2,00 ± 1,16	1,00 ± 10,7	ns
<b>TRENING</b>						
Latencija ulaska u crni odjeljak (s)	50,9 ± 38,6	297 ± 8,29	***	14,0 ± 7,66	189 ± 115	***
<b>TEST</b>						
Latencija ulaska u crni odjeljak (s)	292 ± 18,3	174 ± 125	**	184 ± 124	57,3 ± 43,0	**
Težina	273 ± 19,8	273 ± 13,2	ns	260 ± 17,6	256 ± 15,6	ns

Vrijednosti mjerenja prikazane su kao srednje vrijednosti ± SD. Broj životinja = 12, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,0001 (t-test). s = sekunde.

24 sata nakon injekcije fluoksetina testirano je pamćenje životinja iz sublinija WZ-5HT štakora mjerno kao vrijeme potrebno da životinja prijeđe iz sigurnog, ali osvjetljenog odjeljka, u tamni, ali nesigurni (zbog električnog šoka) odjeljak (Slika 4.22.). Rezultati pokazuju da kod obje 5HT-sublinije životinje tretirane fluoksetinom imaju značajno manju latenciju do ulaska u crni odjeljak. Možemo zaključiti da tretman fluoksetinom smanjuje sposobnost prizivanja sjećanja na neugodni poticaj, a njegov učinak je jednak kod obje sublinije (p = 0,0041 kod 5HT-niske sublinije, p = 0,0053 kod 5HT-visoke sublinije, t-test).



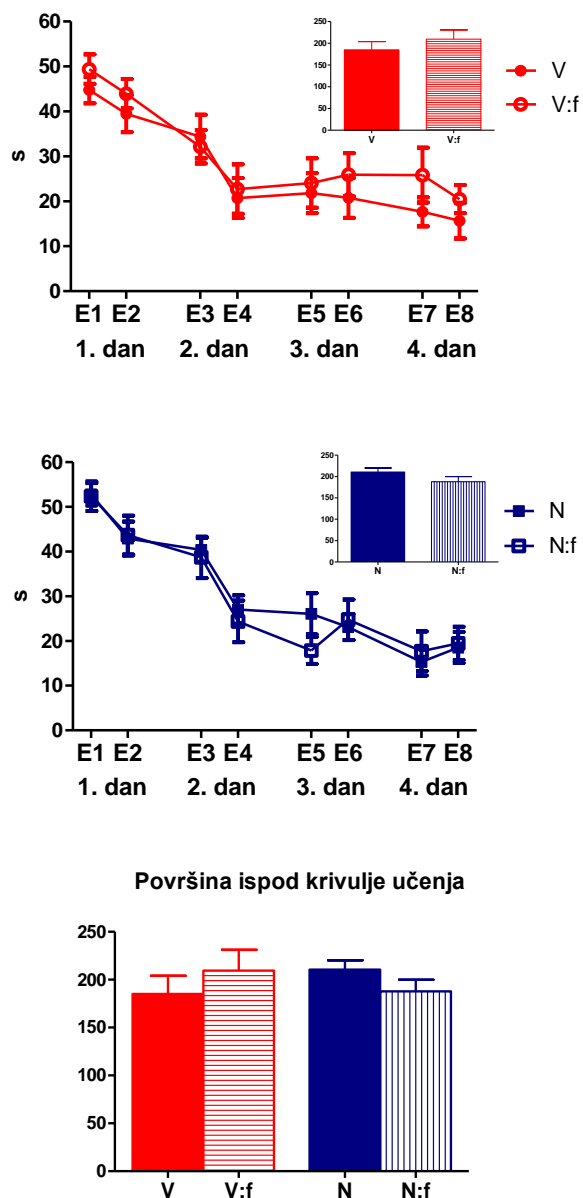
**Slika 4.22.** Latencija ulaska u crni odjeljak tijekom testa (sekunde) kod ženki WZ-5HT sublinija u testu izbjegavanja 24 sata nakon i.p. injekcije fluoksetina, odnosno fiziološke otopine (kontrola). V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Broj životinja po skupini = 12. \*\* $p < 0,01$  (t-test).

#### 4.4.2.2. Morrisov vodeni labirint

Učinak višekratne primjene fluoksetina na kognitivne sposobnosti životinja, (prostorno učenje i pamćenje), kod sublinija WZ-5HT štakora testirano je u Morrisovom vodenom labirintu. S obzirom da su ponašanja 5HT-sublinija u Morrisovom vodenom labirintu već uspoređena u prethodnim pokusima u ovom laboratoriju (Mokrović, 2011.), ovim je pokusima prvenstveno bio cilj međusobno usporediti parametre učenja i pamćenja 5HT-sublinija nakon tretmana fluoksetinom. Provedena su po dva neovisna pokusa na obje sublinije WZ-5HT štakora. U oba pokusa dobiveni su podjednaki rezultati, tako da je prikazana njihova srednja vrijednost.

U prvom dijelu pokusa testirano je prostorno učenje životinja, mjereno kao vrijeme nalaženja platforme u bazenu napunjenom vodom. Rezultati ovog dijela pokusa prikazani su na slici 4.23.

Usporedba površina ispod krivulja učenja (eng. *area under curve*, AUC) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u učenju između tretiranih i kontrolnih životinja niti kod jedne sublinije WZ-5HT štakora.



**Slika 4.23.** Učenje kod ženki WZ-5HT sublinija tretiranih fluoksetinom (15 mg/kg tt), odnosno fiziološkom otopinom (kontrola) tijekom 4 dana 30 min prije učenja, mjereno kao vrijeme (sekunde) potrebno da životinja nađe platformu u Morrisovom vodenom labirintu. V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom.

Vrijednosti mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost pojedine epizode (E1-E8, od kojih se svaka sastoji od 3 pokušaja, interval između pokušaja = 15 s; interval između epizoda u jednom danu = 90 min). Graf prikazuje površinu ispod krivulje učenja, a vrijednosti mjerenja prikazane su kao srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Broj životinja po skupini = 12.

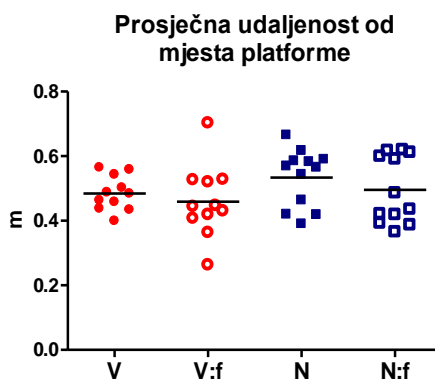
5. dana pokusa testira se pamćenje životinja. Platforma se izvadi iz vode, te se mjeri prosječna udaljenost životinje od mjesta gdje se prijašnjih dana nalazila platforma. U testu pamćenja, svaka životinja ima samo jedan pokušaj. Rezultati pokusa prikazani su u Tablici 4.14. i na slici 4.24.

**Tablica 4.14.** Vrijednosti pojedinih parametara ponašanja u Morrisovom vodenom labirintu kod ženki WZ-5HT sublinija 24 sata nakon 4. i.p. injekcije fluoksetina, odnosno fiziološke otopine (kontrola), V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom.

Parametri	5HT-visoka sublinija			5HT-niska sublinija		
	fiziol.otop.	fluoksetin	p	fiziol.otop.	fluoksetin	p
<b>TEST PAMĆENJA</b>						
Duljina prijednog puta (m)	18,9 ± 3,44	14,3 ± 2,59	**	20,1 ± 1,90	15,6 ± 2,88	***
Brzina plivanja (m/s)	0,211±0,0384	0,159±0,0287	**	0,224±0,0212	0,173±0,0320	***
Prosječna udaljenost od mjesta platforme (m)	0,519±0,0807	0,485±0,0812	ns	0,551±0,0726	0,493±0,0804	ns
Prosječna udaljenost od mjesta platforme (m) u intervalu od 0-60	0,485±0,0535	0,459±0,112	ns	0,534±0,0886	0,495±0,104	ns
Težina	250 ± 12,7	238 ± 21,1	ns	248 ± 17,1	225 ± 15,0	**

Vrijednosti mjerenja prikazane su kao srednje vrijednosti ± SD. Broj životinja = 12, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (t-test). m = metar, m/s = metar u sekundi.

Pamćenje položaja platforme u testu memorije petog dana bilo je podjednako kod životinja tretiranih i.p. injekcijom fluoksetina i kontrolnih životinja tretiranih fiziološkom otopinom kod obje sublinije WZ-5HT štakora. Lokomotorna aktivnost mjerena kao duljina prijednog puta i brzina plivanja kod obje sublinije bila je smanjena kod životinja tretiranih fluoksetinom tijekom 4-dnevnog učenja (Tablica 4.14.).



**Slika 4.24.** Pamćenje, izraženo kao prosječna udaljenost u metrima (m) od mjesta gdje se tijekom učenja nalazila platforma, kod ženki WZ-5HT sublinija 24 sata nakon 4. injekcije fluoksetina. V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom. Prikazane su individualne vrijednosti i srednje vrijednosti skupina. Broj životinja po skupini = 12.

Zaključno, rezultati testiranja kognitivnih sposobnosti kod 5HT-sublinija testovima pasivnog izbjegavanja i vodenog labirinta pokazuju da tretman fluoksetinom utječe na pamćenje neugodnih događaja ali ne i na pamćenje prostornih odnosa. Ni u jednom testu nisu pokazane razlike između 5HT-sublinija obzirom na učinak fluoksetina na kognitivne sposobnosti životinja.

#### 4.4. Tjelesna težina životinja tijekom kronične primjene fluoksetina

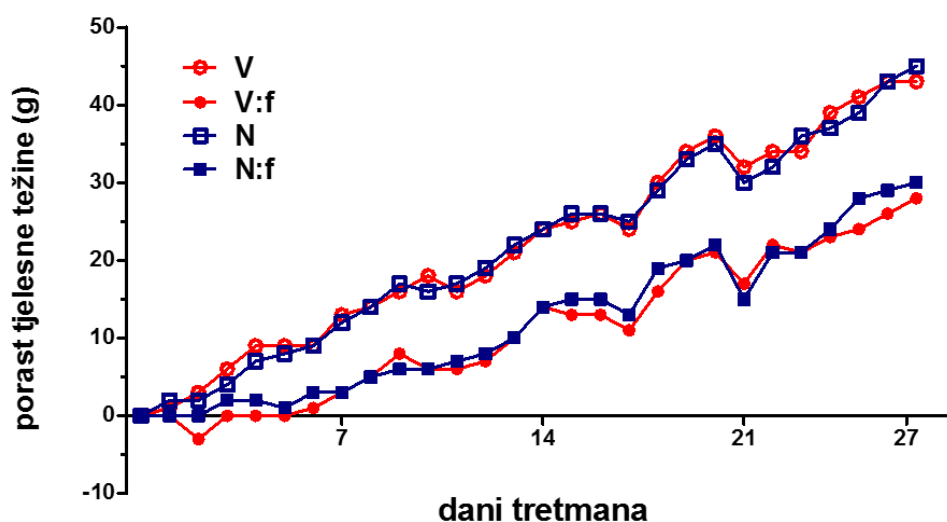
Slika 4.25. prikazuje učinak kroničnog tretmana fluoksetinom na promjenu tjelesne težine usporedno kod sublinija WZ-5HT štakora. Tjelesna težina praćena je dnevno tijekom 27 dana tretmana.

Životinje tretirane fluoksetinom u dozi od 6 mg/kg tt pokazuju značajno sporiji prirast tjelesne težine tijekom 27 dana tretmana (Tablica 4.15.). Smanjenje prirasta težina kod tretiranih u odnosu na kontrolne životinje podjednako je kod obje sublinije (5HT-visoki:  $p = 0,0129$ ; 5HT-niski:  $p = 0,0165$ , t-test).

**Tablica 4.15.** Promjena tjelesne težine kod mužjaka WZ-5HT sublinija tijekom 27 dana tretmana fluoksetinom (6 mg/kg tt), odnosno fiziološkom otopinom (kontrola). V=5HT-visoke (kontrola), V:f=5HT-visoke tretirane fluoksetinom, N=5HT-niske (kontrola), N:f=5HT-niske tretirane fluoksetinom.

	0. dan tretman	27. dan tretmana	prirast tt
V	328 ± 24,5 (9)	371 ± 32,0 (9)	41 ± 6,41 (9)
V:f	348 ± 24,5 (18)	376 ± 32,0 (18)	27 ± 14,9 (18)*
N	321 ± 23,5 (8)	366 ± 32,7 (8)	41 ± 10,4 (8)
N:f	321 ± 19,6 (17)	351 ± 23,3 (17)	29 ± 11,0 (17)*

Vrijednosti mjerenja prikazane su kao srednja vrijednost ± SD. Broj životinja po skupini je naznačen u zagradama. \*p < 0,05 tretirani vs. odgovarajuća kontrola.



**Slika 4.25.** Učinak fluoksetina na porast tjelesne težine kod mužjaka WZ-5HT sublinija tijekom 27 dana tretmana fluoksetinom (6 mg/kg tt), odnosno fiziološkom otopinom (kontrola). V=5HT-visoki (kontrola), V:f=5HT-visoki tretirani fluoksetinom, N=5HT-niski (kontrola), N:f=5HT-niski tretirani fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost. Broj životinja je naznačen u Tablici 4.15.





*Rasprava*



Serotonin (5HT) je uključen u regulaciju brojnih fizioloških funkcija uključujući gotovo sve tipove ponašanja, npr. emocionalno, motoričko, kognitivno, te autonomno, a disfunkcije serotonergične transmisije povezuju se s različitim psihičkim poremećajima, poput depresije i anksioznosti.

I u mozgu i u perifernim tkivima serotonin je homeostatski reguliran (Mercado i Kilic, 2010., Jacobs i Azmitia, 1992.; Lesch i Weider, 2012.), a ključni regulator razine izvanstaničnog serotonina je membranski 5HT prijenosnik na serotonergičnim neuronima, odnosno trombocitima. Sva istraživanja u ovoj disertaciji provedena su na modelu štakora s promijenjenom homeostazom serotonina, nazvanom Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakor, koji je dobiven selekcijom životinja prema aktivnosti trombocitnog 5HT prijenosnika. Kako je selekcija dovela i do promjena serotoninskog sustava u mozgu ovih životinja, WZ-5HT štakor predstavlja originalan pristup istraživanjima serotonergičnih mehanizama na razini integralnog organizma. Ciljevi ovog rada bili su daljnja neurokemijska i bihevioralna karakterizacija sublinija WZ-5HT štakora, s naglaskom na njihovu usporedbu nakon farmakološke aktivacije serotoninskog sustava, koja je uključivala jednokratnu i višekratnu primjenu selektivnog inhibitora povratnog unosa serotonina (SSRI) fluoksetina.

Kao što je spomenuto u Uvodu (pogl. 2.1.), tijela serotonergičnih neurona grupirana su u jezgre rafe, gdje se, posebice u dorzalnim i medijalnim jezgrama rafe, nalazi velika gustoća somatodendritičnih 5HT<sub>1A</sub> autoreceptora koji su uključeni u mehanizme djelovanja antidepressivnih lijekova iz skupine SSRI (Romero i Artigas, 1997., Nutt i sur., 1999.). Vežanjem SSRI za 5HTT dolazi do rasta izvanstanične koncentracije serotonina i njegove povećane dostupnosti pre- i post-sinaptičkim receptorima te do desenzitizacije receptora 5HT<sub>1A</sub> (Romero i Artigas, 1997., Albert, 2012.). Upravo zbog toga odabrali smo jezgre rafe da usporedimo učinak fluoksetina na ekspresiju gena za 5HTT i gena za receptor 5HT<sub>1A</sub> između sublinija WZ-5HT štakora. Osim toga, zanimao nas je i učinak fluoksetina na promjenu ekspresije ovih dvaju gena u frontalnoj moždanoj kori i hipokampusu, regijama koje su gusto inervirane upravo projekcijama iz jezgara rafe.

Moždana područja koja su uključena u nastanak emocionalnih poremećaja (Ressler i Mayberg, 2007.), te nastanak različitih oblika memorije (Perez-Garcia i Meneses, 2008.), bogato su inervirana serotonergičnim neuronima, a sistemska primjena SSRI dovodi do modulacije emotivno-kognitivnih ponašanja (Olivier i sur., 2011.a, File i sur., 1999., Monleón

i sur., 2002., Sass i Wörtwein, 2012.). Stoga smo kod životinja iz WZ-5HT sublinija istražili učinak farmakološke aktivacije serotoninskog sustava na ove oblike ponašanja.

Osim u središnjem živčanom sustavu (mozak), serotonin se sintetizira i pohranjuje i u perifernim tkivima, a ova dva serotoninska sustava/odjeljka odvojena su za serotonin nepropusnom krvno-moždanom barijerom. Trombocitni serotoninski sustav je biokemijski i farmakološki sličan onom u serotonergičnim neuronima mozga i kao takav se koristi kao periferni model za centralni serotoninski sustav (Camacho i Dimsdale, 2000.). Analogno situaciji u mozgu, 5HTT je i u krvi glavni regulator izvanstanične razine 5HT, te posljedično, regulator periferne homeostaze serotonina. Poznato je da farmakološki izazvan porast plazmatskog (izvanstaničnog) serotonina mijenja ekspresiju trombocitnog 5HTT, no dinamika međuodnosa između izvanstanične koncentracije 5HT i ekspresije trombocitnog 5HTT, te značaj tog odnosa za fiziologiju trombocita (i patofiziološke procese u kojima oni sudjeluju) nisu u potpunosti poznati (Mercado i Kilic, 2010.). Stoga je dio istraživanja u ovoj disertaciji bio fokusiran na učinke fluoksetina na 5HT parametre u krvi životinja iz 5HT-sublinija.

### **5.1. Wistar-Zagreb 5HT štakor**

Wistar-Zagreb 5HT štakor dobiven je selektivnim parenjem Wistar štakora prema ekstremnim vrijednostima razine trombocitnog serotonina i brzine unosa 5HTT, dakle procesa koji određuje sadržaj serotonina u trombocitima. Kao rezultat selektivnog parenja prema ekstremnim vrijednostima navedenih trombocitnih parametara, dobivene su dvije sublinije štakora sa promijenjenom homeostazom serotonina, nazvane 5HT-visoka i 5HT-niska sublinija. Životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju otprilike dvostruko veće vrijednosti razine serotonina u trombocitima i brzine unosa serotonina u trombocite u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Slika 4.1.). Za razliku od animalnih modela dobivenih genetskom manipulacijom (npr. inaktivacijom gena za 5HTT), ili farmakološkim tretmanom koji utječe na aktivnost 5HT sustava (npr. primjena SSRI), selektivnim parenjem prema ekstremnim vrijednostima aktivnosti 5HTT dobivene su sublinije kod kojih su promjene 5HT sustava slabije izražene nego kod drugih gore spomenutih modela. Za očekivati je da su razlike serotoninske homeostaze među 5HT-sublinijama bliže fiziološkoj situaciji što predstavlja prednost WZ-5HT štakora u odnosu na druge životinjske modele.

Kako je trombocitni 5HTT kodiran istim genom kao i 5HTT u mozgu (Lesch i sur., 1993.) selektivni je uzgoj prema ekstremnim, ali još uvijek fiziološkim, vrijednostima trombocitnih 5HT parametara doveo do promjena i u 5HT sustavu mozga (Romero i sur., 1998.;

Jernej i sur., 1999.; Bordukalo-Nikšić i sur., 2004.; Quevedo i sur., 2002.; Hranilović i sur., 2005.; Bordukalo-Nikšić i sur., 2010.; Čičin-Šain i Jernej, 2010.; Mokrović, 2011.). Neurokemijske i bihevioralne razlike među 5HT-sublinijama upućuju na povećanu serotonergičnu transmisiju kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na 5HT-nisku subliniju (Čičin-Šain i Jernej, 2010.). Činjenica da WZ-5HT sublinije pokazuju razlike i u centralnom i u perifernom 5HT sustavu predstavlja, s jedne strane, prednost našega modela jer omogućuje donošenje zaključaka na razini integralnog organizma, no s druge strane predstavlja i nedostatak budući da često nije moguće razdvojiti koji učinci su posredovani centralnim a koji perifernim serotonergičnim mehanizmima.

Kao što je ranije rečeno, u istraživanjima posljedica promijenjene serotoninske transmisije često se koriste životinje s inaktiviranim genom za serotoninski prijenosnik (5HTT *knockout*, ili 5HTT-KO miševi i štakori), kod kojih je funkcija 5HTT potpuno ukinuta (Bengel i sur., 1998.; Homberg i sur., 2007.). Inaktivacija gena za 5HTT dovodi do potpunog gubitka 5HTT kako u mozgu tako i u crijevu i punoj krvi (uključuje i trombocite i plazmu) ovih životinja. Pokazano je da je razina serotonina u crijevu 5HTT-KO životinja u usporedbi sa divljim tipom nepromijenjena, dok u punoj krvi ovih životinja gotovo i nema serotonina. Ovi rezultati upućuju na to da biosinteza ili ponovni unos 5HT, posredovan alternativnim prijenosnikom (npr. dopaminski prijenosnik, prijenosnici organskih kationa 1 i 3, OCT-1 i OCT-3), mogu nadoknaditi gubitak 5HTT posredovanog uklanjanja slobodnog serotonina u crijevu 5HTT-KO životinja kako ne bi došlo do toksične razine 5HT u cirkulaciji, a samim time i smrti organizma (Chen i sur., 2001.). Za razliku od 5HTT-KO životinja, sublinije WZ-5HT štakora pokazuju povećanu ili smanjenu aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika, te povećanu ili smanjenu razinu serotonina u trombocitima. Slika 4.1. prikazuje karakteristične vrijednosti razine trombocitnog serotonina kod životinja iz sublinija WZ-5HT štakora, a vidljivo je da razlika između sublinija iznosi oko 100 %. Razina serotonina u nekoliko različitih perifernih tkiva (pluća, slezena, srce, tanko i debelo crijevo) također je povišena kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Čičin-Šain i sur., 1990.). Takav nalaz može biti posljedica razlika u sadržaju trombocitnog serotonina u tim tkivima (npr. u slezeni koja je izrazito bogata trombocitima) ali i različite aktivnosti 5HTT u tkivno-specifičnim stanicama (npr. u plućima gdje je na endotelnim stanicama plućnih kapilara prisutna velika gustoća 5HT prijenosnika). Neovisno o podlozi navedenih razlika među 5HT sublinijama one pokazuju da su kompenzacijske promjene u serotoninskom sustavu kod našeg modela drugačije od onih kod 5HTT-KO životinja.

Korištenjem imunoenzimatskog testa u ovom radu pokazali smo da je koncentracija izvanstaničnog serotonina mjenjenog u uzorcima plazme bez trombocita (eng. *platelet-free-plasma*, PFP) veća kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Slika 4.7.). Kod ženki je razlika među sublinijama iznosila 30 % ( $p = 0,027$ , t-test) dok je kod mužjaka pokazana tendencija (15 %) u istom smjeru koja nije dosegla statističku značajnost. Slični rezultati dobiveni su i na prethodnim generacijama WZ-5HT štakora korištenjem drugih analitičkih metoda (HPLC-ED i RIA) (Čičin-Šain i sur., 1990.). Ako se izuzme mogućnost adaptacijsko-kompenzacijskih promjena u metabolizmu ili otpuštanju serotonina kod 5HT sublinija, a obzirom da je funkcija 5HT prijenosnika da uklanja slobodni serotonin iz izvanstaničnog prostora, za očekivati bi bilo da je kod životinja s povećanom aktivnosti 5HTT, a samim time i povećanim kapacitetom čišćenja plazme od slobodnog serotonina, razina slobodnog izvanstaničnog serotonina snižena u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije, što čini se nije slučaj. Za sada nemamo objašnjenje mehanizma koji je u podlozi povećane razine plazmatskog serotonina kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Jedna od mogućnosti koju prvo treba uzeti u obzir je mogućnost da prilikom pripreme uzoraka dolazi do oslobađanja serotonina iz trombocita koji su vrlo reaktivni, što bi u konačnici dovelo do veće razine slobodnog serotonina u plazmi kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Vjerujemo, međutim, da se to ne događa iz sljedećih razloga: 1) u radu s trombocitima su poduzete sve potrebne mjere predostrožnosti koje sprječavaju otpuštanje serotonina, 2) nema korelacije između izmjerene razine 5HT u plazmi i razine 5HT u trombocitima kod pojedine sublinije, kao niti korelacije između razine 5HT u plazmi i broja trombocita u krvi/plazmi bogatoj trombocitima (nije prikazano), te 3) nakon akutne primjene fluoksetina očekivani porast 5HT u plazmi veći je kod životinja iz 5HT-niske sublinije što indirektno pokazuje da 5HT izmjeren u plazmi nije posljedica njegovog nekontroliranog otpuštanja iz trombocita.

Moguće je da je tijekom selekcije prema vrijednostima trombocitnih parametara došlo do promjena u sintezi, odnosno razgradnji serotonina. Prijašnji pokusi, rađeni na mozgu životinja iz 5HT-sublinija, pokazali su da postoji tendencija smanjene aktivnosti mRNA za MAO-B izoformu razgradnog enzima u moždanoj kori kod životinja iz 5HT-visoke sublinije (Čičin-Šain i Jernej, 2010.), što bi za posljedicu moglo imati višu razinu izvanstaničnog 5HT. Istovremeno razina TPH proteina u jezgrama rafe ima tendenciju (30 %,  $p > 0,05$ ) viših vrijednosti kod životinja iz 5HT-niske sublinije (Štefulj, 2005.).

Za konačne zaključke o adaptacijskim promjenama kod 5HT-sublinija potrebni su daljnji pokusi koji bi uključili analizu razine serotonergičnih elemenata u enterokromafinim stanicama crijeva, gdje se serotonin sintetizira i iz kojih se otpušta u cirkulaciju. Za očekivati je da, kao i

u mozgu, i na periferiji dolazi do kompenzatornih odgovora organizma kojima se nastoji ponovno uspostaviti njegova homeostaza. Pokazno je npr. da hiperserotoninemija izazvana perinatalnom primjenom tranilcipromina (nespecifični inhibitor razgradnje serotonina) dovodi do smanjene ekspresije sintetskog enzima TPH1 u crijevu odrasle životinje (Blažević i sur., 2015.).

Obzirom na spol, kod čovjeka, kao i kod životinja, pokazan je čitav niz, prvenstveno kvantitativnih, razlika, kako u serotonergičnom sustavu, tako i u podložnosti psihijatrijskim bolestima i u samom odgovoru na terapiju (Gorman, 2006.; Olivier i sur., 2008.; Dalla i sur., 2009.). U ovom radu pokusi u kojima je istraživana učinkovitost jednokratne primjene fluoksetina provedeni su na ženama, dok su za kronični tretman korišteni mušjaci. Iako smo svjesni nedostatka takvog koncepta istraživanja koji nam ne dozvoljava izravnu usporedbu mužjaka i ženki, i traži veliku kritičnost pri interpretaciji usporedbe učinaka fluoksetina (akutno vs. kronično), postoji nekoliko razloga odabira takvog koncepta. Jedan od razloga je planiranje i izvođenje pokusa po načelu 3R. Naime, ženke se tradicionalno manje koriste u pokusima (prvenstveno zbog njihove podložnosti hormonalnim promjenama tijekom ciklusa, ali i zbog njihovog držanja za potrebe uzgoja), no danas je preporuka da se i uključuju u pokuse upravo zbog postojanja i važnosti spomenutih spolnih razlika. Korištenjem oba spola u pokusima smanjili smo ukupno potreban broj potomaka u generaciji. Dodatna prednost je da smo pokuse kroničnog i akutnog tretmana fluoksetinom mogli provesti na jednoj te istoj generaciji, a također nam je omogućio provedbu većeg broja eksperimenata (potrebna ukupno manja količina skupog fluoksetina korištena za tretman životinja).

## **5.2. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u krvi WZ-5HT štakora**

Kao što je već spomenuto, 5HTT predstavlja ciljno mjesto djelovanja antidepresiva iz skupine SSRI (Zahniser i Doolen, 2001.). Kod ljudi, varijante gena za 5HTT povezuju se s nastankom emocionalnih poremećaja kao i s razlikama u odgovoru pojedinaca na tretman antidepresivima. Tako se alel S polimorfizma 5HTTLPR povezuje s manjom transkripcijskom učinkovitošću gena za 5HTT, smanjenom aktivnošću 5HTT i nastankom anksioznosti (Lesch i Mössner, 1998.). Uz to, pojedinci s jednom ili dvije kopije alela S polimorfizma 5HTTLPR pokazuju lošiji odgovor na tretman fluoksetinom i nekim drugim lijekovima iz skupine SSRI

(Rausch i sur., 2002.; pregled u Lesch i Gutknecht, 2005.; Porcelli i sur., 2012.). Ti rezultati upućuju na važnost konstitucijske aktivnosti 5HTT u odgovoru na terapiju fluoksetinom i drugim lijekovima iz skupine SSRI. Budući da 5HTT nadgleda ravnotežu između izvanstaničnog i unutarstaničnog 5HT kako u mozgu tako i u krvi, učinci primjene 5HTT inhibitora mogu se pratiti i na periferiji. Za očekivati je da će jednokratna primjena SSRI dovesti do akutnog porasta plazmatskog 5HT (Ortiz i Artigas, 1992., Bianchi i sur., 2002.), te da će nakon njegove višekratne primjene doći do pada trombocitnog 5HT, što je potvrđeno rezultatima brojnih kliničkih i eksperimentalnih studija (Tyrer i sur., 1990.; Wagner i sur., 1990.; Celada i sur., 1992., Alvarez i sur., 1999.a, Alvarez i sur., 1999.b). Moguće razlike u iznosu i dinamici tih promjena u ovisnosti o konstitucijskoj aktivnosti 5HTT, koliko nam je poznato, do sada nisu istraživane.

Jednokratna primjena fluoksetina dovodi do inhibicije trombocitnog 5HTT kod obje sublinije WZ-5HT štakora ali se stupanj inhibicije razlikuje (Slika 4.6. i 5.1 A). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da kod obje sublinije postoji ovisnost učinka o dozi te da je pri dozi od 6 mg/kg tt inhibicija aktivnosti trombocitnog 5HTT gotovo potpuna, dok pri dozi od 1 mg/kg tt dolazi do značajne inhibicije unosa serotonina u trombocite samo kod 5HT-visoke sublinije ( $p < 0,0001$ ), dok je kod 5HT-niske sublinije prisutna tendencija pada aktivnosti ( $p = 0,0778$ ). Pad unesene količine 5HT (pmol u jedinici vremena) je dvostruko (kod doze 6 mg/kg) odnosno trostruko (kod doze 1 mg/kg) veći kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije.

Akutna inhibicija trombocitnog 5HTT dovodi do posljedičnog porasta razine 5HT u krvnoj plazmi (izvanstanični 5HT) koji je kod obje sublinije bio statistički značajan samo kod veće doze fluoksetina (Tablica 4.3. i Slika 4.8.). Iz grafičkog prikaza (Slike 4.9. i 5.1.) se, međutim, može uočiti da postoji ovisnost porasta plazmatskog 5HT o primijenjenoj dozi fluoksetina što nam posredno govori o ispravnosti mjerenja slobodnog 5HT u plazmi (v. Raspravu 5.1.). Porast razine plazmatskog serotonina (apsolutni i relativni) je manji kod životinja iz 5HT-visoke sublinije (Tablica 4.3., Slika 4.9. i 5.1 A), što se čini da je u kontradikciji s jačom inhibicijom unosa serotonina u trombocite kod tih životinja. Za razliku od kroničnog tretmana koji uključuje različite kompenzatorne promjene, akutni učinak lijeka posljedica je izravne blokade 5HTT. Mehanizam koji je u podlozi manjeg porasta plazmatskog 5HT kod 5HT-visoke sublinije za sada nam nije poznat. Moguće je da je zbog većeg broja prijenosnika na membrani i već povišene koncentracije izvanstaničnog serotonina u bazalnim uvjetima kod životinja iz 5HT-visoke sublinije dinamika promjena drugačija nego kod 5HT-



niske sublinije. Ta pretpostavka mogla bi se provjeriti mjerenjem plazmatskog 5HT u različitim vremenskim intervalima nakon primjene fluoksetina. Također, ako pretpostavimo da ista doza fluoksetina blokira isti broj prijenosnika kod obje sublinije, na trombocitima 5HT-visokih životinja ostaje veći broj slobodnih prijenosnih molekula koje mogu unositi slobodni 5HT. To bi značilo da je kod 5HT-visokih životinja potrebna veća doza fluoksetina da se postigne isti porast izvanstaničnog 5HT kao kod 5HT-niskih životinja.

Pokazano je nedavno da se regulacija aktivnosti serotoninskog prijenosnika odvija u dvije faze. Prvo, kako raste razina izvanstaničnog serotonina, raste i aktivnost 5HTT, te unos 5HT u trombocite. Nakon ovog prvotnog odgovora, aktivnost 5HTT pada ispod bazalne vrijednosti te dolazi do smanjene razine 5HT u trombocitima (Mercado i Kilic, 2010.; Ziu i sur., 2012.). Bilo bi od interesa dinamiku toga procesa istražiti usporedno kod životinja iz 5HT-sublinija koje imaju različitu aktivnost 5HTT i koncentraciju serotonina i u plazmi i u trombocitima.

Smanjenje razine serotonina u trombocitima životinja iz WZ-5HT sublinija jasno je vidljivo nakon višekratnog (9 dana) tretmana fluoksetinom (Tablica 4.1. i Slika 4.3.). U oba analizirana vremena pad apsolutnih vrijednosti ( $\mu\text{g}$  5HT/mg proteina, razlika između tretiranih i kontrolnih životinja) veći je kod 5HT-visoke sublinije iako bi bilo za očekivati da ista doza fluoksetina blokira uvijek isti broj 5HT prijenosnika na membrani. Kada se uspoređi relativni pad trombocitnog serotonina (% promjene prema početnim vrijednostima, Slika 5.1.) vidi se da je on veći kod životinja iz 5HT-niske sublinije u usporedbi s životinjama iz 5HT-visoke sublinije. Treba napomenuti da su sve navedene razlike konzistentne u različitim vremenima mjerenja i pokusima, no redovito su malog iznosa (10 – 15 %) pa je upitno koliki je njihov stvarni, funkcionalni značaj. Nadalje, zanimljivo je da višekratna primjena fluoksetina dovodi kod obje sublinije do povratka plazmatskog serotonina prema bazalnim vrijednostima, te, štoviše, postoji tendencija daljnjeg pada plazmatskog 5HT ispod bazalnih vrijednosti (Tablica 4.4. i Slika 4.10.). Pad je izraženiji kod životinja iz 5HT-visoke sublinije gdje doseže statističku značajnost (Slika 4.11. i 5.1.). Ti rezultati govore nam o adaptacijskim mehanizmima koji se aktiviraju *in vivo* i sprečavaju (pre)velik porast slobodnog 5HT koji bi mogao dovesti do neželjenih učinaka na različite organe/sustave. Statistički značajna interakcija između sublinije i tretmana koja je prisutna kod trombocitnih parametara (5HTT aktivnost, 5HT razina) i koja nam govori o važnosti konstitucijske serotonergične aktivnosti u odgovoru na fluoksetin nije, međutim, pokazana i kod plazmatskog 5HT. Imajući u vidu da je promjena plazmatskog 5HT veća kod

životinja iz 5HT-visoke sublinije bilo bi za očekivati da i kod toga parametra postoji interakcija sublinije i tretmana.

Pad izvanstanične koncentracije 5HT nakon kronične primjene fluoksetina pokazan je i ranije u nekima (Alvarez i sur., 1999.b; Bianchi i sur., 2002.), iako ne u svima, studijama (Ortiz i Artigas, 1992.). Taj se pad ne može objasniti izravnim učincima lijeka, koji bi inhibiranjem 5HTT trebali dovesti do porasta koncentracije izvanstaničnog serotonina. Kim i sur. (2005.) pokazali su da je, kao posljedica smanjene učinkovitosti i funkcije 5HTT, metabolizam (sinteza i razgradnja) serotonina povećan u mnogim regijama mozga kod 5HTT-KO životinja. Moguće je da je uslijed inhibicije aktivnosti 5HTT djelovanjem lijeka dolazi do analognih adaptivnih promjena i na periferiji što se potom reflektira i na koncentraciju slobodnog 5HT u plazmi. Obzirom na trombocite inhibitorna učinkovitost fluoksetina i drugih SSRI i posljedični pad koncentracije trombocitnog serotonina tijekom njihove kronične primjene pokazani su u velikom broju eksperimentalnih i kliničkih studija (Alvarez i sur., 1999.a, Alvarez i sur., 1999.b; Tyrer i sur., 1990.; Wagner i sur., 1990.; Celada i sur., 1992.; Ortiz i Artigas, 1992., itd).

Zaključno, iako je učinak akutne inhibicije trombocitnog 5HTT veći kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, učinak na raspoloživost (koncentraciju) slobodnog, biološki aktivnog serotonina u plazmi veći je kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Trombocitni serotonin kojega možemo smatrati sintetskim pokazateljem 5HT događanja/aktivnosti na periferiji, nakon produženog tretmana fluoksetinom pokazuje veći relativni pad kod životinja iz 5HT-niske sublinije, dakle životinja sa konstitucijski manjom serotonergičnom aktivnosti.

### **5.3. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na 5HT parametre u mozgu WZ-5HT štakora**

Razlike u aktivnosti 5HTT u trombocitima (gotovo dvostruko veća brzina unosa 5HT kod 5HT-visoke sublinije) i mozgu (podjednaka brzina unosa 5HT uz tendenciju razlika među sublinijama u suprotnom smjeru) kod životinja iz WZ-5HT sublinija ukazuju na drugačiju regulaciju aktivnosti serotoninskog prijenosnika u ta dva metabolički odvojena odjeljka. Možemo na osnovu toga pretpostaviti da su adaptacijsko-kompenzacijski mehanizmi održavanja 5HT homeostaze u perifernom i centralnom 5HT odjeljku različiti.

Rezultati mjerenja unosa 5HT u sinaptosome kod 5HTT-KO životinja dobiveni istom metodom koju smo i mi koristili, pokazuju da nema razlike između divljeg tipa i heterozigotnih

5HTT (5HTT +/-) miševa, dok u mozgu homozigotnih 5HTT (5HTT -/-) miševa unosa serotonina u sinaptosome gotovo da i nema (Bengel i sur., 1998.). Korištenjem osjetljivije metode, kronoamperometrije, pokazano je da je u mozgu 5HTT +/- životinja brzina unosa serotonina u sinaptosome smanjena za 60 % u usporedbi s divljim tipom životinja, dok u mozgu 5HTT -/- životinja nema aktivnog unosa serotonina (Perez i Andrews, 2005.; Perez i sur., 2006.). U usporedbi sa 5HTT-KO životinjama, kod WZ-5HT štakora mogu se očekivati znatno manji iznosi promjena, pa u tom smislu ne začuđuje nedostatak značajnih razlika među 5HT-sublinijama, odnosno prisutnost samo tendencije razlika među njima. Izostanak statističke značajnosti u slučaju tako malog iznosa razlika može biti posljedica malog broja životinja u grupi, ali i nedovoljne osjetljivosti korištene metode. Tradicionalne radiokemijske metode, koje i mi koristimo, zahtijevaju inkubaciju sinaptosoma sa serotoninom obilježenim radionuklidom  $^{14}\text{C}$  tijekom definiranog vremenskog perioda, nakon čega se određuje brzina unosa neurotransmitera u sinaptosome na temelju mjerenja u jednoj vremenskoj točki. Zbog toga, s ovim metodama nekad nije moguće dokazati skromne promjene u brzini unosa neurotransmitera u sinaptosome (Fox i sur., 2007.).

Za razliku od nalaza na trombocita, jednokratna primjena fluoksetina ne dovodi do značajnih promjena u brzini unosa serotonina u sinaptosome moždane kore, hipokampusa ni jezgara rafe, bez obzira na subliniju WZ-5HT štakora (Tablica 4.7. i Slika 4.14.). Činjenica da fluoksetin akutno izaziva porast izvanstanične koncentracije 5HT u svim istraživanim regijama (Kreiss i Lucki, 1995.; Hervás i Artigas, 1998.) dokazuje da dolazi do inhibicije 5HTT. Eksperimentima *in vitro* na uzorcima tkiva mozga pokazano je da fluoksetin inhibira aktivnost 5HTT, dok podataka o stupnju inhibicije *in vivo* gotovo i da nema. Manias i Taylor (1983.) su pokazali inhibiciju 5HTT 30 min nakon primjene fluoksetina s time da je ta inhibicija bila primarno uzrokovana porastom afiniteta ( $K_m$ ), dok je pad maksimalne brzine unosa ( $V_{max}$ ) iznosio oko 20 % i nije bio statistički značajan. Porast  $K_m$  u skladu je s kompetitivnim tipom inhibicije koji predstavlja način djelovanja većine antidepresiva. Nakon kroničnog tretmana fluoksetinom (10 mg/kg, 3 tjedna) opažen je pad  $V_{max}$  (Hrdina, 1987.), dok je nakon tretmana nekim drugim antidepresivima zabilježen porast  $V_{max}$  (imipramin, fluvoksamin) ili promjena nije bilo (citalopram) (Marcusson i Ross, 1990.). S obzirom na plan pokusa u ovome radu, kao i zahtjevnost mjerenja aktivnog unosa 5HT u sinaptosome koje se mora provesti unutar nekoliko sati od izdvajanja moždanog tkiva, ovdje nismo bili u mogućnosti mjeriti aktivnost 5HTT nakon kronične primjene fluoksetina.

Jedno od mogućih objašnjenja negativnog nalaza nakon jednokratne injekcije fluoksetina je da u mozgu postoji vrlo djelotvoran nadzor regulacije 5HTT sa svrhom očuvanja serotoninske homeostaze. Za očekivati je da je došlo do kratkotrajne inhibicije aktivnosti 5HTT u mozgu, no promjene aktivnosti nisu velike, te je moguće da primijenjena metoda nije dovoljno osjetljiva da ih može uočiti. Objašnjenje negativnog rezultata moglo bi dati i istraživanje Ushijima i sur. (2005.) koji su pokazali da se bihevioralni učinak fluvoksamina razlikuje ovisno o dijelu dana kada se lijek aplicira (9.00 ili 21.00 sat) te da je jača učinkovitost tijekom perioda tame povezana sa značajno većom aktivnosti 5HTT u tom periodu. Moguće je da je i farmakodinamika fluoksetina također vezana uz cirkadijani ritam.

Ranije je spomenuto da primjena fluoksetina (i drugih SSRI) akutno povećava izvanstaničnu koncentraciju 5HT u mozgu. Prethodni pokusi na 5HT sublinijama su pokazali da među 5HT sublinijama postoji značajna razlika u odgovoru na SSRI citalopram apliciran izravno u mozak metodom mikrodijalize (Romero i sur., 1998.). Kod životinja iz 5HT-visoke sublinije infuzija citaloprama je u ventralnom hipokampusu izazvala značajno veći porast 5HT u izvanstaničnom prostoru nego kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Uz to što govori o funkcionalnim razlikama 5HTT između sublinija, taj rezultat pokazuje da je aktivnost serotonergičnih neurona nakon specifičnog farmakološkog izazova veća kod životinja iz 5HT-visoke sublinije.

U bazalnim uvjetima, prisutna je tendencija razlika između 5HT-sublinija u koncentraciji 5HT u kori mozga (oko 10 %, Tablica 4.5. i Slika 4.12.), kao i izvanstaničnog 5HT u ventralnom hipokampusu (oko 100 %) (Romero i sur., 1998.). Oba parametra pokazuju više vrijednosti kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije. Za usporedbu, uslijed potpune inaktivacije 5HTT i gubitka funkcije povratnog unosa serotonina, kod 5HTT-KO životinja dolazi do deveterostrukog povećanja koncentracije izvanstaničnog 5HT u regijama prednjeg mozga (Holmes i sur., 2003.b; Homberg i sur., 2007.) u odnosu na divlji tip životinja. S druge strane, heterozigotni 5HTT +/- miševi imaju nepromijenjenu tkivnu razinu 5HT (Kim i sur., 2005., Homberg i sur., 2007.), trostruko veću koncentraciju izvanstanične razine 5HT (Mathews i sur., 2004.), te, ovisno o korištenoj metodi mjerenja brzine unosa 5HT, ili nemaju promijenjen unos 5HT (Bengel i sur., 1998.) ili imaju 50 - 60 % reducirani unos 5HT (Perez i sur., 2005., Perez i sur., 2006.) u pojedine regije mozga.

Zanimljivo je da ako promatramo promjenu izvanstanične koncentracije 5HT, životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju sličnost s 5HTT-KO životinjama, uz napomenu da su povišene razine izvanstaničnog serotonina kod 5HTT -/- životinja u usporedbi s životinjama iz 5HT-visoke sublinije puno izraženije (Homberg i sur., 2007.), i, za razliku od 5HT-visoke sublinije (Romero

i sur., 1998.), 5HTT -/- miševi pokazuju značajno smanjenu tkivnu koncentraciju serotonina (Kim i sur., 2005.).

Povišena izvanstanična koncentracija 5HT u mozgu životinja iz 5HT-visoke sublinije analogna je situaciji na periferiji, gdje je također razina izvanstaničnog (plazmatskog) serotonina kod 5HT-visokih životinja povišena u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (v. ranije). Kako brzina unosa serotonina u sinaptosome životinja iz 5HT-visoke sublinije pokazuje tendenciju smanjenja u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije, za očekivati bi i bilo da je razina izvanstaničnog 5HT kod tih životinja viša, dok za dobivene rezultate na periferiji za sada nemamo objašnjenje.

Kao što je već spomenuto, u bazalnim uvjetima 5HT-sublinije ne pokazuju značajnu razliku u koncentraciji serotonina u moždanoj kori (uz tendenciju viših vrijednosti kod životinja iz 5HT-visoke sublinije). Tretman fluoksetinom doveo je do tendencije pada razine serotonina kod životinja iz 5HT-niske sublinije (20 % u odnosu na netretirane životinje,  $p = 0,0695$ , Fisherov LSD test), dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nije bilo promjena. Ovaj pad razine 5HT u skladu je s očekivanim učinkom lijeka. Akutni porast izvanstaničnog 5HT dovodi, nakon višekratnih injekcija, do kompenzatornih promjena koje rezultiraju padom izvanstaničnog 5HT, a kumulativni učinak inhibicije sinteze uzrokuje pad ukupnog (unutarstaničnog i izvanstaničnog) 5HT (Andrews i sur., 2015.). Literaturni podaci pokazuju da doza od 5 mg/kg aplicirana dvaput dnevno tijekom 14 dana dovodi do pada razine 5HT u moždanoj kori štakora od oko 50 %, a sniženje 5HT od 20-ak % vidljivo je još tjedan dana nakon prestanka tretmana (Caccia i sur., 1993.). Pad razine 5HT kod 5HT-niskih životinja u skladu je s tim rezultatima, a možemo pretpostaviti da bi veća doza fluoksetina i/ili produženi tretman dovela do pada i kod 5HT-visoke sublinije.

Kako životinje iz 5HT-niske sublinije bazalno pokazuju tendenciju veće brzine unosa 5HT u sinaptosome moždane kore (i jezgre rafa), moguće je da razlike u gustoći prijenosnika, iako male, uzrokuju da se fluoksetin vezuje većim kapacitetom na 5HTT kod životinja iz 5HT-niske sublinije, što posljedično dovodi do jačeg kompenzacijskog odgovora i većeg smanjenja koncentracije 5HT kod životinja iz 5HT-niske sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije.

Drugo objašnjenje različitog odgovora sublinija može biti da su životinje iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije zbog disregulacije 5HT homeostaze različito osjetljive na antidepresive. Konkretno, moguće je da su 5HT-niske životinje osjetljivije na male doze fluoksetina, dok 5HT-visoke životinje trebaju ili veću dozu ili duže vrijeme tretmana za isti učinak. Doza

fluoksetina koja je korištena u ovom pokusu je relativno mala, a odabrana je upravo sa svrhom da se, ukoliko postoje, razlike među sublinijama mogu uočiti nakon nekoliko tjedna tretmana. Popa i sur. (2010.) pokazali su da kronični tretman fluoksetinom kod BALB7/cJ soja miševa koji pokazuju anksiozan fenotip, te osjetljivost na kronični tretman fluoksetinom u bihevioralnim testovima, dovodi do reverzibilnog porasta izvanstanične koncentracije serotonina u hipokampusu i jezgrama rafe tijekom tretmana (28 dana). Ovaj porast izvanstaničnog 5HT ukazuje na pad unutarstaničnog 5HT kod ispitanih životinja u tim regijama mozga, koji se može očekivati i kod 5HT-sublinija. Durand i sur. (1999.) su za svoje pokuse odabrali dva soja štakora koji se razlikuju po svom emotivnom profilu, WKY (eng. *Wistar-Kyoto*) i SHR (eng. *Spontaneously Hypertensive Rats*), od kojih WKY štakori pokazuju pojačanu anksioznost u usporedbi s SHR sojem štakora (kao i životinje iz 5HT-visoke sublinije u usporedbi sa 5HT-niskom sublinijom). Rezultati ovih pokusa pokazuju da kronični tretman fluoksetinom u dozi od 10 mg/kg tt dovodi do pada koncentracije serotonina u hipokampusu kod oba soja, dok pri dozi od 5 mg/kg tt nema značajnih promjena ni kod jednog soja. Kod manje doze, međutim, WKY štakori pokazuju tendenciju porasta unutarstanične razine 5HT (kao i kod 5HT-visoke sublinije pri isto tako maloj dozi), a SHR štakori pokazuju tendenciju pada hipokampalne koncentracije 5HT (analogno padu razine 5HT kod 5HT-niske sublinije). Iako ove promjene nisu bile statistički značajne uočava se paralelizam sa našim sublinijama. Moguće je da bi pad razine 5HT bio vidljiv i kod 5HT-visoke sublinije da je korištena doza bila viša, no, kao što je rečeno, manja doza fluoksetina odabrana je upravo sa svrhom da se razlike među sublinijama, ako postoje, mogu opaziti. Kod većih doza fluoksetina vjerojatno je da su kod obje sublinije zauzeti svi 5HT prijenosnici.

Sumarno možemo reći da fluoksetin akutno nije doveo do mjerljivih promjena u brzini unosa 5HT u sinaptosome ni kod jedne 5HT-sublinije, dok je njegova kronična primjena dovela do pada koncentracije serotonina u moždanoj kori samo kod životinja iz 5HT-niske sublinije.

#### **5.4. Ekspresija mRNA za serotoninski prijenosnik i serotoninski receptor tipa 1A u moždanoj kori, hipokampusu i regiji jezgara rafe**

Učinci serotonina regulirani su, između ostalog, aktivnošću serotoninskog prijenosnika te različitih podtipova serotoninskih receptora. Aktivnosti ovih proteina općenito ovise o postranslacijskim modifikacijama poput fosforilacije te o razini ekspresije njihovih gena. U ovoj disertaciji proučavali smo ekspresiju gena za serotoninski prijenosnik i receptor 5HT1A. Oba ova proteina imaju važnu ulogu u emotivno-kognitivnim procesima te su uključena u mehanizme djelovanja antidepresivnih lijekova kao što su inhibitori povratnog unosa serotonina.

Dosadašnja istraživanja genske ekspresije u mozgu WZ-5HT štakora nisu pokazala značajne razlike između sublinija u ekspresiji gena za 5HTT u fiziološkim uvjetima u regiji jezgara rafe (Bordukalo-Nikšić i sur., 2004.), kao niti u ekspresiji gena za 5HT1A receptor u moždanoj kori, hipokampusu i jezgrama rafe (Bordukalo-Nikšić, 2008.; Bordukalo-Nikšić i sur., 2008.; Bordukalo-Nikšić i sur., 2010.). Rezultati dobiveni u ovoj disertaciji potvrđuju izostanak konstitucijskih razlika između sublinija u ekspresiji mRNA za 5HTT u jezgrama rafe te mRNA za receptora 5HT1A u sve tri ispitivane moždane regije ( $p < 0.05$ , Fisherov LSD test). S druge strane, ovdje smo po prvi put pokazali da je kortikalna ekspresija mRNA za 5HTT veća (70 %,  $p=0,0135$ , Fisherov LSD test) kod životinja iz 5HT-niske sublinije u odnosu na životinje iz 5HT-visoke sublinije (Slika 4.16.). Sublinije WZ-5HT štakora razvijene su selekcijom prema ekstremnim, ali još uvijek fiziološkim, vrijednostima 5HT parametara, te se u bazalnim uvjetima ne očekuju velike promjene ekspresije mRNA za 5HTT ili 5HT1A receptor u mozgu ovih životinja. Studije na 5HTT-KO životinjama, kod kojih je homeostaza 5HT znatno jače zahvaćena, pokazuju kompenzacijske promjene u ekspresiji gena za receptor 5HT1A koje su ovisne o regiji mozga. Tako su, npr., Li i sur. (2000.) pokazali da je u jezgrama rafa 5HTT-KO miševa došlo do smanjenja ekspresije mRNA za 5HT1A receptor za 40 %, dok u regijama kao što su hipotalamus i hipokampus nije bilo promjena. S druge strane, Fabre i sur. (2000.) pokazali su da je u hipokampusu 5HTT-KO životinja došlo do pojačane ekspresije mRNA za 5HT1A receptor (23 %), dok je u jezgrama rafe došlo do smanjenja ekspresije (45 %).

Kako su dosadašnja bihevioralna i farmakološka istraživanja ukazala na različitu serotonergičnu transmisiju kod životinja iz WZ-5HT sublinija, zanimalo nas je kako se te razlike odražavaju na ekspresiju gena za 5HTT i receptor 5HT1A nakon farmakološke inhibicije serotoninskog prijenosnika. Rezultati ukazuju na postojanje razlika u regulaciji

ekspresije navedenih gena kod sublinija WZ-5HT štakora nakon tretmana fluoksetinom (6 mg/kg tt, 27 dana, 48-satni period ispiranja lijeka), kao i na postojanje regionalnih razlika. Kod životinja iz 5HT-niske sublinije tretman fluoksetinom doveo je do značajno smanjene ekspresije mRNA za 5HTT ( $p=0,0023$ , Fisherov LSD test) i receptor 5HT1A ( $p=0,0160$ , Fisherov LSD test) u moždanoj kori, dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinije tretman fluoksetinom nije uzrokovao statistički značajne razlike u kortikalnoj ekspresiji ovih gena. Hipokampalna ekspresija gena za 5HTT nije se statistički značajno promijenila nakon tretmana fluoksetinom, dok je u regiji jezgara rafe tretman fluoksetinom značajno povećao ekspresiju mRNA za 5HTT, ali interakcija tretmana i sublinije nije bila statistički značajna. Ekspresija mRNA za receptor 5HT1A u hipokampusu značajno je porasla nakon tretmana fluoksetinom, ali, iako je kod 5HT-visoke sublinije uočena tendencija porasta nakon tretmana fluoksetinom ( $p=0,0523$ , Fisherov LSD test), interakcija tretmana i sublinije nije bila statistički značajna. S druge strane, u jezgrama rafe, tretman fluoksetinom nije imao značajan učinak na ekspresiju mRNA za receptor 5HT1A (Slika 4.16. i 4.17.).

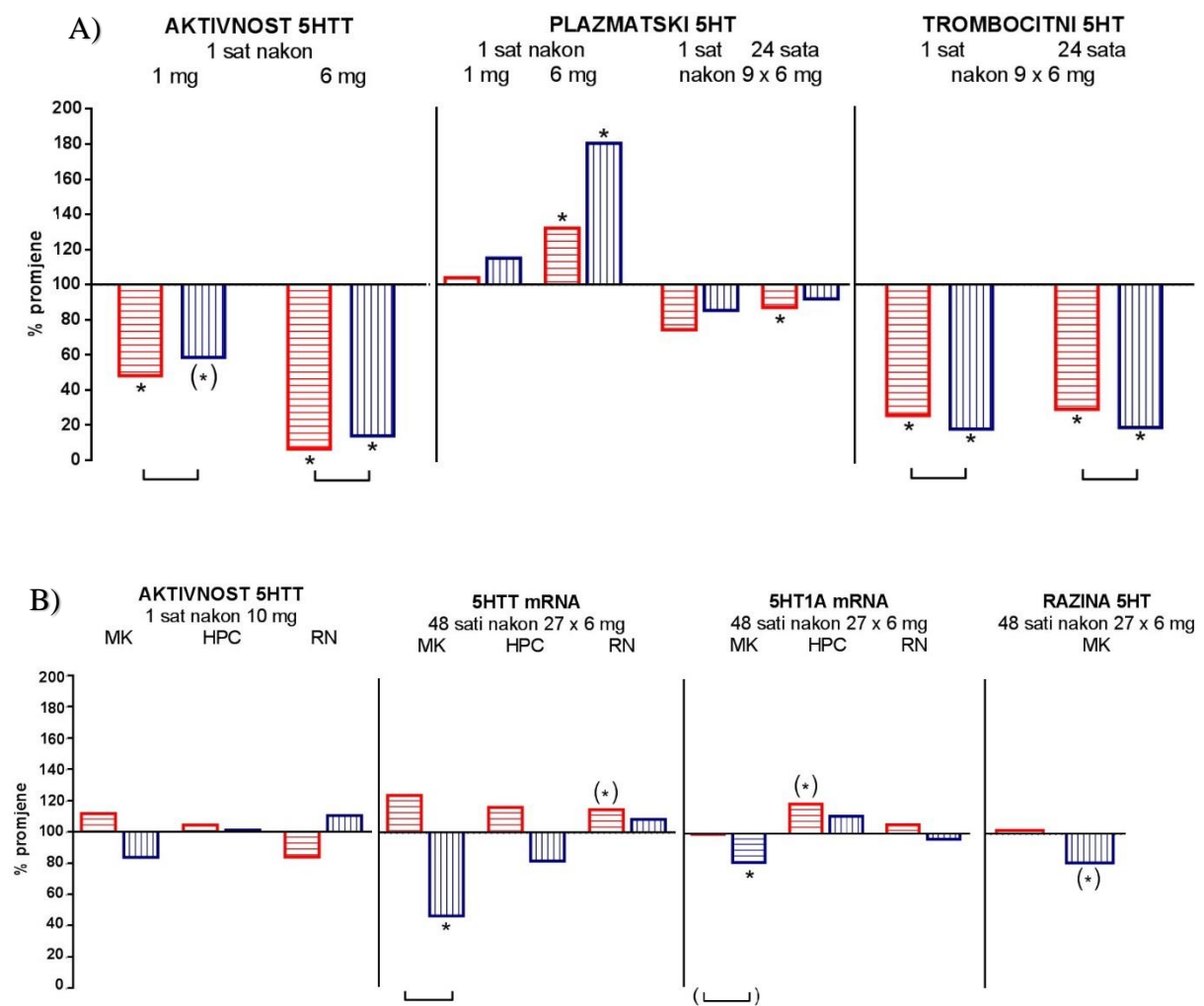
Regionalne razlike u ekspresiji mRNA navedenih gena nakon primjene fluoksetina opažene su i u drugim istraživanjima, iako rezultati nisu jednoznačni. Tako su, npr. Le Poul i sur. (2000.) pokazali da nakon kroničnog tretmana fluoksetinom dolazi do smanjenja razine mRNA za 5HT1A receptor u regiji jezgara rafa (38 %), do povećanja razine mRNA u hipokampusu (24 %), dok u moždanoj kori nije bilo promjena. Isti autori su pokazali da kronični tretman fluoksetinom nije utjecao na razinu mRNA za 5HTT u regiji jezgara rafe, dok druge studije govore o značajnom padu ekspresije kod životinja tretiranih tokom 7 dana, dok se nakon 21. dana tretmana vrijednosti ekspresije mRNA vraćaju na kontrolne vrijednosti (Neumaier i sur., 1996.). Carlini i sur. (2012.) pokazali su da nakon kroničnog tretmana fluoksetinom ne dolazi do promjena u ekspresiji gena za 5HTT u hipokampusu i regiji jezgara rafa (Johnson i sur., 2009.). Isti autori su pokazali da kronični tretman fluoksetinom ne dovodi do promjene u ekspresiji gena za 5HT1A receptor i TPH (Johnson i sur., 2009.). Regionalne razlike u promjeni ekspresije gena nađene su i za neke druge elemente 5HT sustava kao npr. 5HT2C receptor kod kojeg kronični tretman fluoksetinom dovodi do pada ekspresije u korteksu i porasta u hipokampusu (Barbon i sur., 2011.).

Prikazani rezultati upućuju na regionalne razlike u regulatornim mehanizmima 5HTT i receptora 5HT1A kod 5HT-sublinija koje su uočljive nakon farmakološkog izazova serotoninskog sustava kroničnom primjenom fluoksetina. Uočene promjene u ekspresiji mRNA za navedene gene sugeriraju različitu kontrolu transkripcije tih gena u različitim regijama mozga. Polimorfizmi 5HTT gena, odnosno transkripcijska učinkovitost 5HTT gena, povezuju



se s terapijskim odgovorom na antidepresive (Porcelli i sur., 2012.). Kako životinje iz 5HT-sublinija pokazuju drugačiji biokemijski i bihevioralni odgovor na tretman fluoksetinom, moguće je da je proces selektivnog uzgoja utjecao na transkripcijski mehanizam 5HTT gena, što sugerira moguće postojanje varijacija u njegovim regulatornim regijama.

Sumarni prikaz vrijednosti perifernih i centralnih 5HT parametara kod 5HT sublinija nakon primjene fluoksetina, izraženih u postotku promjene prema odgovarajućim kontrolnim (netretiranim) životinjama prikazan je na slici 5.1.



**Slika 5.1.** Relativna promjena 5HT parametara A) na periferiji i B) u mozgu životinja iz 5HT-sublinija nakon primjene fluoksetina izražena kao % u odnosu na kontrolne (netretirane) životinje iz odgovarajuće skupine. — označava prisutnost značajne interakcije između tretmana i sublinije; (—) označava prisutnost tendencije interakcije između tretmana i sublinije (dvosmjerna analiza varijance); \* označava vrijednosti koje se značajno razlikuju prema kontrolnim vrijednostima ( $p = 0,05$  ili manje); (\*) označava razliku koja je blizu granice statističke značajnosti ( $p = 0,051 - 0,085$ ) (Fisherov LSD post hoc test). Vrijednosti pojedinih parametara prikazane su u poglavlju Rezultati i u Tablici u Prilogu. 5HT-visoki=crveno, 5HT-niski=plavo, 5HT=serotonin, 5HTT = serotoninski prijenosnik, MK = moždana kora, HPC = hipokampus, RN = jezgre rafa.

## **5.5. Učinak inhibicije 5HT prijenosnika na ponašanje životinja iz WZ-5HT sublinija**

Područja mozga koja su uključena u regulaciju emocionalnih ponašanja bogato su inervirana serotonergičnim neuronima. Poznavanje regulacije serotoninskog sustava nužno je za razumijevanje etiopatogeneze mnogih poremećaja ponašanja, uključujući anksioznost. Nastanak anksioznosti povezuje se s poremećenom serotonergičnom neurotransmisijom koja je primarno regulirana aktivnošću 5HTT. Sve je više dokaza o povezanosti polimorfnih varijanti gena za 5HTT i nastanka anksioznih poremećaja, a slični rezultati dobiveni su u kliničkim studijama (Lesch i Mössner, 1998.; Jennings i sur., 2008.; Olivier i sur., 2013.) i na animalnim modelima (Jennings i sur., 2006.; Olivier i sur., 2013.).

Najčešće korišteni testovi koji se primjenjuju za analizu ponašanja nalik na anksioznost uključuju izlaganje životinje nepoznatoj, potencijalno opasnoj okolini. Baziraju se na izazivanju sukoba oprečnih prirodnih nagona životinje - nagonom za istraživanje nepoznate okoline i straha od potencijalno opasne okoline (neofobija). Kako bismo osigurali vjerodostojan zaključak, u ovoj disertaciji proveli smo tri različita testa koja mjere iste tipove ponašanja - istraživačko i lokomotorno ponašanje, te ponašanje nalik na anksioznost. Ti testovi su bili test otvorenog prostora, test ploče s rupama, te uzdignuti križni labirint.

Podaci o lokomotornoj aktivnosti u testovima koji mjere anksioznost životinja od važnosti su kako bi se uočile moguće razlike u općoj aktivnosti životinja, odnosno kako se ne bi dogodilo da se smanjena ili povećana lokomotorna aktivnost životinje pogrešno interpretira kao anksiogeni ili anksiolitički učinak. Ranije smo pokazali da životinje iz 5HT-niske sublinije u nekim aspektima pokazuju povećanu lokomotornu aktivnost u usporedbi sa životinjama iz 5HT-visoke sublinije (Bordukalo-Nikšić i sur., 2010.), a u ovoj disertaciji to smo i potvrdili, te pri interpretaciji rezultata farmakoloških pokusa treba uzeti u obzir i mogućnost razlika u lokomociji između 5HT-sublinija. Također, povećana istraživačka aktivnost kod 5HT-niskih u odnosu na 5HT-visoke životinje pokazana je ranije u OFT i EPM testu a povećano ponašanje nalik na anksioznost u tim testovima prisutno je kod 5HT-visoke u odnosu na 5HT-nisku subliniju (Quevedo i sur., 2002.; Hranilović i sur., 2005.; Bordukalo-Nikšić i sur., 2010.; Mokrović, 2011.). Nalazi dobiveni u ovom istraživanju potvrđuju navedene rezultate istraživanja na prijašnjim generacijama WZ-5HT životinja, što ide u prilog uspostave stabilnog ponašanja kroz više generacija WZ-5HT štakora. Također, analogni rezultati dobiveni u različitim testovima ponašanja potvrđuju zaključak da životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju povećanu anksioznost. Prema literaturnim podacima povećano ponašanje nalik na

anksioznost povezano je s povećanom serotonergičnom neurotransmisijom (Lesch i Mössner, 1998.; Lesch i sur., 2003.). Tako transgenični miševi s prekomjernom ekspresijom 5HTT (smanjenom 5HT transmisijom) pokazuju smanjenu anksioznost u nekoliko različitih testova (Jennings i sur., 2006.), dok životinje s inaktiviranim genom za 5HTT pokazuju promijenjeni odgovor na stres, te ponašanje nalik na anksioznost i depresiju (Holmes i sur., 2003.a; Homberg i sur., 2007.; Olivier i sur., 2013.). Uz to, 5HTT-KO životinje pokazuju smanjenu lokomotornu aktivnost kada se testiraju u istim testovima koji su se provodili u ovoj disertaciji, ali i smanjenu istraživačku aktivnost u testu uzdignutog križnog labirinta (Kalueff i sur., 2007.a; Kalueff i sur., 2007.b). Jedno od mogućih objašnjenja pojačanog anksioznog ponašanja kod životinja iz 5HT-visoke sublinije i 5HTT-KO životinja, dakle dva sasvim različita genetička modela, proizlazi iz činjenice da životinje iz 5HT-visoke sublinije, kao i 5HTT-KO životinje, imaju povećanu izvanstaničnu koncentraciju serotonina u odnosu na 5HT-niske, odnosno 5HTT +/+ životinje.

Kronični tretman fluoksetinom dovodi do promjena u ponašanju životinja, a te su promjene ili jače izražene ili statistički značajne samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Tako u testu otvorenog prostora (Tablica 4.10. i Slika 4.18.) kod životinja iz 5HT-visoke sublinije dolazi do povećane lokomotorne (duljina prijeđenog puta:  $p = 0,0224$ ; brzina kretanja:  $p = 0,0211$ , Fisherov LSD test) i istraživačke (mjereno kao vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge,  $p = 0,0039$ , Fisherov LSD test) aktivnosti, te do smanjenog anksioznog ponašanja (mjereno kao vrijeme timarenja u rubnoj zoni,  $p = 0,0072$ , Fisherov LSD test) u odnosu na kontrolne životinje. Kod životinja iz 5HT-niske sublinije kronični tretman fluoksetinom nije imao učinka na promatrane parametre ponašanja. U testu ploča s rupama (Tablica 4.11. i Slika 4.19.) tretman fluoksetinom nije doveo do značajnih promjena u anksioznosti ni kod jedne od sublinija WZ-5HT štakora, ali je došlo do povećane istraživačke aktivnosti kod 5HT-visoke sublinije mjereno kao vrijeme do uzdizanja na stražnje noge ( $p = 0,0354$ , Fisherov LSD test). Kod životinja iz 5HT-niske sublinije višekratni tretman fluoksetinom doveo je do značajnog pada istraživačke aktivnosti mjerene kao vrijeme do guranja glave u rupu u rubnoj zoni ( $p = 0,0418$ , Fisherov LSD test), kao i vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge ( $p = 0,0251$ , Fisherov LSD test). U uzdignutom križnom labirintu (Tablica 4.12. i Slika 4.20.) kronični tretman fluoksetinom nije doveo do promjena u mjerenim parametrima kod životinja iz 5HT-niske sublinije, dok je kod životinja iz 5HT-visoke sublinije doveo do povećane istraživačke aktivnosti mjerene kao vrijeme provedeno u naginjanju preko ruba otvorenih krakova ( $p = 0,0456$  Fisherov LSD test). Uz to, životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju tendenciju smanjenog stupnja anksioznosti mjenog kao % vremena provedenog u otvorenim krakovima

( $p = 0,0503$ , Fisherov LSD test), kao i % ulazaka u otvorene krakove ( $p = 0,0803$ , Fisherov LSD test).

Kronični tretman fluoksetinom imao je sličan učinak na BALB/cByJ miševе, soj miša koji bazalno pokazuje visok stupanj anksioznosti kao i životinje iz 5HT-visoke sublinije. Kada se ti miševi testiraju u testu otvorenog prostora, pokazuju povećanu istraživačku aktivnost i smanjeno ponašanje nalik na anksioznost, dok kronični tretman fluoksetinom nije utjecao na njihovu lokomotornu aktivnost (Popa i sur., 2010.). S druge strane, kronični tretman fluoksetinom u OFT nije doveo do promjena u anksioznom ponašanju kod nekoliko sojeva miševa selektiranih prema različitom stupnju anksioznosti, BALB7/c i DBA/2 (sojevi s pojačanom anksioznošću), te C57 i 129Sv (sojevi s smanjenim ponašanjem nalik na anksioznost). Kronični tretman fluoksetinom nije utjecao na lokomotornu aktivnost kod BALB7/c miševa, kod C57 i 129Sv doveo je do redukcije u lokomotornoj aktivnosti, dok je kod DBA/2 pokazan trend prema povećanoj lokomotornoj aktivnosti u usporedbi s kontrolnim životinjama (Dulawa i sur., 2004.). Durand i sur. (1999.) pokazali su da kronični tretman fluoksetinom nije imao značajan učinak na lokomotornu aktivnost i ponašanje nalik na anksioznost kod SHR štakora u usporedbi s WKY štakorima u uzdignutom križnom labirintu. WKY štakori pokazuju u bazalnim uvjetima povećanu anksioznost i smanjenu lokomotornu aktivnost u usporedbi s SHR štakorima, te je kod njih kronični tretman fluoksetinom imao anksiojeni učinak, odnosno povećao anksioznost u nekim, ali ne svim, mjerenim parametrima u EPM. Iz tih podataka vidljivo je da genetička pozadina životinja, kao i korišteni test, dovodi do različitog odgovora na tretman antidepressivima, te je prilikom interpretacije rezultata nužno obratiti pažnju na te parametre. Također, uvijek je poželjno provesti više različitih testova koji mjere isto ponašanje što je u ovom radu napravljeno te je potvrđena konzistentnost dobivenih rezultata.

Zaključno možemo reći da je kronični tretman životinja fluoksetinom doveo do očekivanih promjena u ponašanju samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, kod kojih je opaženo smanjeno ponašanje nalik na anksioznost, kao i povećana lokomotorna i istraživačka aktivnost. Naši rezultati su u skladu s pretpostavkom Sachs-a i sur (2013.) da kongenitalni manjak 5HT smanjuje učinkovitost fluoksetina. Njihovi pokusi pokazali su da kronični tretman fluoksetinom kod životinja (TPH2-KI) koje bazalno imaju nisku koncentraciju izvanstaničnog 5HT u mozgu, izaziva značajno manji porast izvanstaničnog 5HT koji limitira nizvodne stanične i molekularne odgovore (Sachs i sur., 2013.). Također su pokazali da tretman sa prekursorom serotonina, dakle farmakološko povećanje sinteze 5HT, kod životinja sa deficitom

5HT u mozgu dovodi do nekih antidepresivnih učinaka (Sachs i sur., 2013.). Analogne neurokemijske razlike na izazov SSRI pokazane su i kod naših životinja (ranije obrazloženo, Romero i sur., 1998.). Rezultati prikazanih bihevioralnih pokusa govore da jedinke sa konstitucijski povećanom serotonergičnom transmisijom pokazuju bolji odgovor na farmakološku inhibiciju 5HTT.

Serotonin ima značajnu ulogu i u formiranju kognitivnih funkcija, uključujući učenje i pamćenje. Morrisov vodeni labirint jedan je od najčešće korištenih testova kojim se kod životinja testira prostorna memorija, dok se za testiranje nedeklarativne asocijativne memorije često koristi test pasivnog izbjegavanja. Upravo smo ova dva testa odabrali kako bi istražili postoje li razlike između sublinija WZ-5HT štakora u strahom motiviranom učenju i pamćenju, te prostornom učenju i pamćenju nakon farmakološke aktivacije serotoninskog sustava.

Dosadašnja istraživanja na WZ-5HT štakorima pokazala su da životinje iz 5HT-niske sublinije lošije uče položaj platforme u odnosu na životinje 5HT-visoke sublinije (Mokrović, 2011.), što je u skladu s pretpostavkom da 5HT-visoke životinje imaju povećanu serotonergičnu transmisiju. Razlike u pamćenju prostornih odnosa između sublinija WZ-5HT štakora nisu pokazane (Mokrović, 2011.), što je potvrđeno i u ovome radu (Tablica 8.3.). Potrebno je napomenuti da je ovdje naš primarni cilj bio usporediti parametre učenja i pamćenja kod 5HT-sublinija nakon tretmana životinja fluoksetinom, tako da su u istom pokusu paralelno testirane kontrolne i tretirane životinje iz pojedine 5HT sublinije, te je potreban oprez pri usporedbi sublinija bazalno. Testiranjem životinja u Morrisovom vodenom labirintu pokazano je da tretman fluoksetinom nije imao učinka na prostorno pamćenje niti kod jedne 5HT-sublinije (Tablica 4.14. i Slika 4.24.)

Test pasivnog izbjegavanja na životinjama iz 5HT-sublinija prvi je put proveden u ovome radu i pokazao je da životinje iz 5HT-niske sublinije bazalno imaju značajno kraću latenciju do ulaska u crni odjeljak (Tablica 8.3.). Kako je to pokazano i prilikom habituacije i prilikom testiranja pamćenja (Tablica 8.3.) možemo pretpostaviti da je takav nalaz posljedica različite motoričke aktivnosti životinja. Tretman fluoksetinom značajno je povećao vrijeme latencije do ulaska u crni odjeljak tijekom treninga kod obje sublinije što također može biti posljedica djelovanja na lokomociju životinja. U testu, koji se odvijao 24 sata nakon treninga, životinje tretirane fluoksetinom u odnosu na netretirane životinje imale su značajno kraću latenciju do ulaska u crni odjeljak što možemo interpretirati kao smanjeno prizivanja sjećanja na neugodni poticaj (Slika 4.22.). Između 5HT-sublinija nije bilo značajnih razlika u promatranim

parametrima (Tablica 8.3.). Kao i u prethodnom testu, i u testu pasivnog izbjegavanja glavni cilj je bio usporediti učinak fluoksetina na 5HT-sublinije, tako da su uspoređeni rezultati dobiveni u neovisnim pokusima u kojima su zasebno testirane životinje iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se učinak fluoksetina na kognitivne funkcije životinja razlikuje ovisno o korištenom testu. Pokazali smo da tretman fluoksetinom utječe na sposobnost prizivanja neugodnih sjećanja, dakle na pamćenje neugodnih doživljaja, no nema nikakvog učinka na prostorno pamćenje. Ni u jednom slučaju nije bilo razlika između 5HT-sublinija. U oba testa fluoksetin je injiciran kratko vrijeme prije samog učenja odnosno treninga, te je moguće da bi njegovi učinci bili drugačiji da su životinje bile tretirane tijekom dužeg vremena. U literaturi je opisana velika varijabilnost rezultata ovisno o vrsti AD, duljini tretmana, i vremenu injiciranja (Monleón i sur., 2008.). Uz to kod testiranja pamćenja u Morrisovom vodenom labirintu postoji čitav niz različitih protokola učenja te je teško usporediti rezultate različitih laboratorija.

5HTT, kao i veliki broj različitih serotoninskih receptora, prisutni su u regijama mozga povezanim sa kognitivnim funkcijama, a pokazano je da njihova genetička i/ili farmakološka stimulacija i/ili blokada može utjecati na nastanak i uspostavu kognitivnih funkcija (Karabeg i sur., 2013.). Istraživanja učinka akutne i/ili kronične primjene SSRI na kognitivne funkcije kod životinja dale su kontradiktorne rezultate. Tako je pokazano je da farmakološka inhibicija 5HTT može dovesti do poboljšane memorije, do njenog pogoršanja ili da nema utjecaja na memoriju. Pretpostavljeno je da tolika varijabilnost nalaza može biti povezana sa korištenim sojem životinja, genetičkom pozadinom animalnog modela, korištenim testom itd. (Yau i sur., 2002.; Arenas i sur., 2006.; pregled u Monleón i sur., 2008.; Sass i Wörtwein, 2012.; Ampuero i sur. 2013.). 5HTT-KO životinje pokazuju pojačani strah u testovima kondicioniranja straha, odnosno promjene u nedeklarativnoj memoriji (Homborg, 2012.), dok im je prostorno učenje koje je primarno vezano uz hipokampus lošije u odnosu na divlji tip životinja (Karabeg i sur., 2013.).

Istraživanja učinka fluoksetina na konsolidaciju memorije nisu dala jednoznačne rezultate, a varijabilnost rezultata vezana je primarno uz razlike u tretmanu životinja. U testu pasivnog izbjegavanja kronični tretman lijekom prije treninga dovodi do lošijeg prizivanja sjećanja na neugodni stimulans (Monleón i sur., 2002.), dok tretman nakon treninga, bez obzira da li je jednokratni ili višekratni, nema učinka na pamćenje (Monleón i sur., 2001.; Monleón i sur., 2002.; Arenas i sur., 2006.). U Morrisovom vodenom labirintu kronični tretman štakora

fluoksetinom ne dovodi do razlika u učenju položaja skrivene platforme, ali postoje razlike u testu pamćenja gdje je pokazano da fluoksetin ili nema učinka na pamćenje (prizivanje položaja platforme) (Yau i sur., 2002.; Ampuero i sur., 2013.) ili umanjuje pamćenje (Sass i Wörtwein, 2012.). Poznato je da različiti neurotransmitterski sustavi, poput glutamatnih, kolinergičkih i noradrenergičkih, također sudjeluju u formiranju i konsolidaciji memorije, a antikolinergička djelovanja nekih od antidepresiva povezuju se s lošijim odgovorom životinja u testovima memorije. Kako fluoksetin pokazuje samo slabi afinitet prema muskarinskim receptorima za acetilkolin učinak tretmana fluoksetinom na memoriju u testu pasivnog izbjegavanja ne može se objasniti njegovim antikolinergičkim djelovanjem, već su vjerojatno u podlozi neki drugi mehanizmi. U obzir treba uzeti i mogućnost učinka fluoksetina na lokomotornu aktivnost životinja, kao što je gore spomenuto.

Smanjenje ponašanja nalik na anksioznost, kao i porast istraživačke i lokomotorne aktivnosti, kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nakon kroničnog tretmana fluoksetinom prate promjene u ekspresiji gena za 5HTT i receptor 5HT1A. Kao što je ranije rečeno kronična primjena fluoksetina dovela je do porasta razine mRNA za 5HTT u jezgrama rafe i mRNA za receptor 5HT1A u hipokampusu, koji je kod 5HT-visokih životinja bio blizu granice statističke značajnosti ( $p=0,071$  kod jezgara rafe;  $p= 0,052$  kod hipokampusa). Uz to u moždanoj kori došlo je do pada ekspresije oba ova gena kod životinja iz 5HT-niske sublinije, dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nije bilo promjena.

Rezultati ovih istraživanja jasno pokazuju da selektivni odabir životinja prema aktivnosti trombocitnog 5HTT koji je doveo do trajnih promjena u centralnoj i perifernoj homeostazi serotonina za posljedicu ima i različit odgovor životinja na tretman fluoksetinom. Nalaz da je biokemijski odgovor na farmakološki izazvano pojačanje serotonergične transmisije jači kod životinja iz 5HT-niske sublinije, a bihevioralni odgovor kod životinja iz 5HT-visoke sublinije je intrigantan, no za objašnjenje mehanizama koji bi mogli biti u podlozi nužni su daljnji pokusi. Tako bi npr. za bolje razumijevanje navedenih odnosa mogli pomoći rezultati pokusa u kojima bi se koristio drugačiji pristup farmakološkoj manipulaciji 5HT homeostaze (npr. pojačanje sinteze ili inhibicija razgradnje serotonina, primjena 5HT1A agonista i sl.), ili pokusi usporedbe 5HT-sublinija uz korištenje većih doza fluoksetina odnosno drugih, čak i neselektivnih, inhibitora unosa 5HT. Također bi bilo korisno detaljnije raščlaniti razlike u učinku na centralne i periferne parametre kao i učinke jednokratnog i kroničnog tretmana.

## 5.6. Tjelesna težina životinja tijekom kronične primjene fluoksetina

Ekperimentalne i kliničke studije pokazuju da primjena antidepresivnih lijekova dovodi do promjene tjelesne težine, no podaci nisu jednoznačni (Halford i sur., 2005.; Maswood i sur., 2008.; Homberg i sur., 2011.b; Klenotich i sur., 2012.; Suplicy i sur., 2014.). Tjelesna težina životinja iz 5HT-sublinija bazalno se razlikuje s time da je veća (10-ak %) kod životinja iz 5HT-visoke sublinije. Kako bi se izbjegla mogućnost da početna tjelesna težina životinja utječe na rezultat tijekom kroničnog tretmana fluoksetinom u pokusima smo koristili grupe životinje kod kojih je početna težina bila podjednaka u obje 5HT-sublinije (Tablica 4.15.). Rezultati pokazuju da životinje tretirane fluoksetinom imaju sporiji prirast tjelesne težine tijekom 27 dana tretmana (Tablica 4.15.), ali se razlika u prirastu između tretiranih i netretiranih životinja nije razlikovala između 5HT-sublinija (Slika 4.24.).

Nasuprot tome u literaturi je pokazano je da i WKY štakori (štakori s povećanom anksioznošću, dakle hipotetski s pojačanom serotonergičnom transmisijom) i SHR štakori kronično tretirani fluoksetinom (s farmakološki pojačanom serotonergičnom transmisijom) pokazuju smanjeni prirast tjelesne težine u odnosu na kontrolu (Durand i sur., 1999.). D'Souza i sur. (2002.) su pokazali da fluoksetin u dozi od 5 mg/kg tt ne dovodi do promjena u prirastu tjelesne težine, dok 10 mg/kg dovodi do značajnog smanjenja tjelesne težine kod tretiranih životinja u odnosu na netretirane. Moguće je zaključiti, na osnovu ovih rezultata, da bi kod tretmana većim dozama lijeka između 5HT-sublinija postojala razlika u prirastu težine tijekom tretmana. Smanjen prirast tjelesne težine tijekom tretmana fluoksetinom može biti posljedica njegovog djelovanja na 5HT mehanizam u crijevu ili zbog njegovog djelovanja, iako s malim afinitetom, na druge neurotransitorske receptore, poput dopaminskih, histaminskih, alfa- i beta-adrenergičkih ili muskarinski (D'Souza i sur., 2002.). Drugo objašnjenje fluoksetinom inducirano smanjenja prirasta tjelesne težine moglo bi biti povezano sa njegovim indirektnim agonističkim djelovanjem na 5HT<sub>2C</sub> receptore u središnjem živčanom sustavu, čija aktivacija rezultira anoreksičnim učinkom (D'Souza i sur., 2002.).



*Zaključci*



Serotoninski (5HT) prijenosnik (5HTT) igra ključnu ulogu u regulaciji serotoninske transmisije i uključen je u etiopatogenezu niza neuropsihijatrijskih bolesti. Osim toga, on predstavlja ciljno mjesto djelovanja antidepresiva iz skupine selektivnih inhibitora povratnog unosa serotonina (SSRI). Iako često korišteni, ovi lijekovi ostvaruju terapijski učinak samo kod jednog dijela bolesnika, a razlozi za to nisu poznati. Promotorski polimorfizam gena za 5HTT (5HTTLPR) povezuje se s kliničkim odgovorom pojedinca na SSRI, pri čemu nosioci kraće varijante imaju manju transkripcijsku učinkovitost 5HTT gena, smanjenu aktivnost 5HTT i pokazuju slabiji terapijski odgovor.

Ovim radom željeli smo dati doprinos boljem razumijevanju neurobiološke osnove različitog odgovora pojedinca na farmakoterapiju lijekovima iz skupine SSRI. Istraživanja smo proveli na originalnom animalnom modelu (Wistar-Zagreb 5HT štakor) koji se sastoji od dviju sublinija s konstitucijski različitom homeostazom serotonina dobivenim usmjerenom genetičkom selekcijom životinja prema aktivnosti perifernog 5HTT. Cilj rada bio je istražiti razlikuju li se životinje iz ovih sublinija u odgovoru na tretman SSRI-om. U tu svrhu, usporedili smo odabrane biokemijske i bihevioralne parametre kod životinja iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u bazalnim uvjetima i nakon farmakološkog izazova jednokratnom ili kroničnom primjenom fluoksetina, najčešće korištenog SSRI-a u kliničkoj praksi.

Iz dobivenih rezultata mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. U bazalnim uvjetima, životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju, pored značajno veće aktivnosti trombocitnog 5HTT i veće koncentracije serotonina u trombocitima, i veću razinu slobodnog serotonina u krvnoj plazmi. Međutim, u moždanoj kori životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju diskretno sniženu aktivnost 5HTT-a praćenu značajno nižom ekspresijom mRNA za 5HTT, te tendencijom prema višoj tkivnoj razini serotonina u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije. Ti rezultati govore da promjene u kinetici 5HT prijenosnika u perifernom i centralnom odjeljku kod 5HT-sublinija nisu istovjetne i upućuju na **strožu kontrolu 5HT homeostaze u centralnom odjeljku. Odsutnost paralelizma između perifernog i centralnog odjeljka zahtjeva oprez pri korištenju perifernih 5HT parametara kao pokazatelja središnjih zbivanja.**

2. Farmakološka aktivacija serotoninskog sustava primjenom fluoksetina rezultirala je biokemijskim, molekularnim i funkcionalnim promjenama, od kojih su se neke značajno razlikovale između 5HT-sublinija.

Gledano u cjelini, jednokratna primjena fluoksetina dovela je do jače inhibicije trombocitnog 5HTT kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, dok je posljedični porast razine plazmatskog serotonina bio veći kod životinja iz 5HT-niske sublinije. Kronična primjena fluoksetina dovela je do diskretnog pada plazmatskog serotonina koji je bio jače izražen kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, dok je pad trombocitnog serotonina bio izrazitiji kod životinja iz 5HT-niske sublinije.

U centralnom 5HT odjeljku, kronična primjena fluoksetina dovela je do porasta razine mRNA za 5HTT u jezgrama rafe i mRNA za receptor 5HT1A u hipokampusu, pri čemu se učinak nije razlikovao među sublinijama. Nasuprot tome, u moždanoj kori došlo je do pada ekspresije oba ova gena kod životinja iz 5HT-niske sublinije, dok kod životinja iz 5HT-visoke sublinije nije bilo promjena. Kod životinja iz 5HT-niske sublinije uočena je i tendencija pada razine 5HT u moždanoj kori. Ti rezultati govore u prilog jačeg **molekularnog odgovora na farmakološku inhibiciju 5HTT kod životinja s konstitucijski smanjenom serotonergičnom transmisijom.**

S druge strane, bihevioralni odgovor na fluoksetin bio je vidljiv samo kod životinja iz 5HT-visoke sublinije koje su nakon njegove kronične primjene pokazale smanjeno ponašanje nalik na anksioznost i povećano istraživačko i lokomotorno ponašanje. Ti rezultati upućuju da je **emotivni odgovor na farmakološku inhibiciju 5HTT bolji kod životinja s pojačanom serotonergičnom transmisijom.** Učinak fluoksetina na kognitivne funkcije nije se razlikovao među 5HT sublinijama.

Zaključno, sublinije WZ-5HT štakora pokazuju niz biokemijskih, molekularno-bioloških i bihevioralnih razlika u odgovoru na tretman fluoksetinom, što upućuje na značajnu ulogu konstitucijskih razlika u aktivnosti 5HT sustava u kliničkom odgovoru na terapiju SSRI-om. WZ-5HT štakor mogao bi stoga biti koristan model u istraživanju centralnih mehanizama uključenih u djelovanje SSRI-a kao i vrednovanju perifernih serotoninskih parametara za predviđanje i praćenje terapijskog odgovora.

*Citirana literatura*



Albert PR (2012) Transcriptional regulation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor: implications for mental illness. *Phil Trans R Soc B* 367: 2402–15.

Albert PR, Benkelfat C, Descarries L (2012) The neurobiology of depression-revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. *Phil Trans R Soc B* 367: 2378–81.

Alvarez JC, Gluck N, Fallet A, Grégoire A, Chevalier JF, Advenier C, Spreux-Varoquaux O (1999b) Plasma serotonin level after 1 day of fluoxetine treatment: A biological predictor for antidepressant response?. *Psychopharmacology* 143: 97–101.

Alvarez JC, Sanceaume M, Advenier C, Spreux-Varoquaux O (1999a) Differential changes in brain and platelet 5-HT concentrations after steady-state achievement and repeated administration of antidepressant drugs in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 10: 31–6.

Ampuero E, Stehberg J, Gonzalez D, Besser N, Ferrero M, Diaz-Veliz G, Wyneken U, Rubio FJ (2013) Repetitive fluoxetine treatment affects long-term memories but not learning. *Behav Brain Res* 247: 92–100.

Andrews PW, Bharwani A, Lee KR, Fox M, Thomson JA Jr (2015) Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neurosci Biobehav Rev* 51: 164–88. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.01.018. Epub 2015 Jan 24.

Araragi N, Lesch KP (2013) Serotonin (5-HT) in the regulation of depression-related emotionality: insight from 5-HT transporter and tryptophan hydroxylase-2 knockout mouse models. *Curr Drug Targets* 14: 549–70.

Arenas MC, Vinader-Caerols C, Monleón S, Martos AJ, Everss E, Ferrer-Añó A, Parra A (2006) Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent?. *Behav Brain Res* 166: 150–8.

Artigas F (2013) Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 137: 119–31.

Azmitia, E. C. 2001. Serotonin. eLS.

Bach H, Arango V, Huang YY, Leong S, Mann JJ, Underwood MD (2011) Neuronal tryptophan hydroxylase expression in BALB/cJ and C57Bl/6J mice. *J Neurochem* 118: 1067–74.

Bagdy G, Juhasz G, Gonda X (2012) A new clinical evidence-based gene-environment interaction model of depression. *Neuropsychopharmacol Hung* 14: 213–20.

Baldinger P, Kranz GS, Haeusler D, Savli M, Spies M, Philippe C, Hahn A, Höflich A, Wadsak W, Mitterhauser M, Lanzenberger R, Kasper S (2014) Regional differences in SERT occupancy after acute and prolonged SSRI intake investigated by brain PET. *Neuroimage* 88: 252–62.

Barbon A, Orlandi C, La Via L, Caracciolo L, Tardito D, Musazzi L, Mallei A, Gennarelli M, Racagni G, Popoli M, Barlati S (2011) Antidepressant treatments change 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression in rat prefrontal/frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychobiology* 63: 160–8.

Barco A, Bailey CH, Kandel ER (2006) Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 97: 1520–33.

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

Belzung C, Griebel G (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res* 125: 141–9

Bengel D, Murphy DM, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mönsner R, Westphal H, Lesch KP (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (‘Ecstasy’) in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* 53: 649–55.

Bianchi M, Moser C, Lazzarini C, Vecchiato E, Crespi F (2002) Forced swimming test and fluoxetine treatment: In vivo evidence that peripheral 5-HT in rat platelet-rich plasma mirrors cerebral extracellular 5-HT levels, whilst 5-HT in isolated platelets mirrors neuronal 5-HT changes. *Exp Brain Res* 143: 191–7.

Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ (1998) Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol Psychiatry* 44: 169–78.

Blažević S, Erjavec I, Brižić M, Vukičević S, Hranilović D (2015) Molecular background and physiological consequences of altered peripheral serotonin homeostasis in adult rats perinatally treated with tranylcypromine. *J Physiol Pharmacol* 66: 529–37.

Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, Blakely RD, Deneris ES, Levitt P (2011) A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 47: 347–50.

Bordukalo-Nikšić T, Čičin-Šain L, Jernej B (2004) Expression of brain and platelet serotonin transporters in sublines of rats with constitutionally altered serotonin homeostasis. *Neurosci Lett* 369: 44–9.

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

Bordukalo-Nikšić T, Mokrović G, Štefulj J, Zivin M, Jernej B, Čičin-Šain L (2010) 5HT-1A receptors and anxiety-like behaviours: studies in rats with constitutionally upregulated/downregulated serotonin transporter. *Behav Brain Res* 213: 238–45.

Bordukalo-Nikšić T (2008) Serotoninski receptori: genska varijabilnost, ekspresija i funkcija u uvjetima promijenjene homeostaze serotonina. Doktorska disertacija, Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.



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

Bortolato M, Chen K, Shih JC (2008) Monoamine oxidase inactivation: From pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 527–33.

Bouet V, Klomp A, Freret T, Wylezinska-Arridge M, Lopez-Tremoleda J, Dauphin F, Boulouard M, Booij J, Gsell W, Reneman L (2012) Age-dependent effects of chronic fluoxetine treatment on the serotonergic system one week following treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 221: 329–39.

Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascöet M (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 21: 567–74.

Brigman JL, Mathur P, Harvey-White J, Izquierdo A, Saksida LM, Bussey TJ, Fox S, Deneris E, Murphy DL, Holmes A (2010) Pharmacological or genetic inactivation of the serotonin transporter improves reversal learning in mice. *Cereb Cortex* 20: 1955–63.

Buhot MC, Wolff M, Benhassine N, Costet P, Hen R, Segu L (2003) Spatial learning in the 5-HT1B receptor knockout mouse: selective facilitation/impairment depending on the cognitive demand. *Learn Mem* 10: 466–77.

Caccia S, Anelli M, Codegoni AM, Fracasso C, Garattini S (1993) The effects of single and repeated anorectic doses of 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors on indole levels in rat brain. *Br J Pharmacol* 110: 355–9.

Caccia S, Cappi M, Fracasso C, Garattini S (1990) Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 100: 509–14.

Cahill L, McGaugh JL (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21: 294–99.

Camacho A, Dimsdale JE (2000) Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosom Med* 62: 326–36.

Carey PD, Warwick J, Niehaus DJH, van der Linden G, van Heerden BB, Harvey BH, Seedat S, Stein DJ (2004) Single photon emission computed tomography (SPECT) of anxiety disorders before and after treatment with citalopram. *BMC Psychiatry* 4: 30.

Carlini VP, Poretti MB, Rask-Andersen M, Chavan RA, Ponzio MF, Sawant RS, de Barioglio SR, Schiöth HB, de Cuneo MF (2012) Differential effects of fluoxetine and venlafaxine on memory recognition: possible mechanisms of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38: 159–67.

Carrillo-Mora P, Giordano M, Santamaría A (2009) Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 203: 151–64.

Carter MD, Shah CR, Muller CL, Crawley JN, Carneiro AM, Veenstra-VanderWeele J (2011) Absence of preference for social novelty and increased grooming in integrin  $\beta 3$  knockout mice: initial studies and future directions. *Autism Res* 4: 57–67.

Casarrubea M, Sorbera F, Magnusson M, Crescimanno G (2010) Temporal patterns analysis of rat behavior in hole-board. *Behav Brain Res* 208: 124–31.

Catafau AM, Perez V, Plaza P, Pascual JC, Bullich S, Suarez M, Penengo MM, Corripio I, Puigdemont D, Danus M, Perich J, Alvarez E (2006) Serotonin transporter occupancy induced by paroxetine in patients with major depression disorder: A  $^{123}\text{I}$ -ADAM SPECT study. *Psychopharmacology (Berl)* 189: 145–53.

Cavallaro S (2008) Genomic analysis of serotonin receptors in learning and memory. *Behav Brain Res* 195: 2–6.

Cavanagh J, Patterson J, Pimlott S, Dewar D, Eersels J, Dempsey MF, Wyper D (2006) Serotonin transporter residual availability during long-term antidepressant therapy does not differentiate responder and nonresponder unipolar patients. *Biol Psychiatry* 59: 301–8.

Celada P, Dolera M, Alvarez E, Artigas F (1992) Effects of acute and chronic treatment with fluvoxamine on extracellular and platelet serotonin in the blood of major depressive patients. Relationship to clinical improvement. *J Affect Disord* 25:243–250.

Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD (2001) Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* 21: 6348–61.

Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1: 581–5.

Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 107–24.

Čičin-Šain L, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B (2004) Wistar-Zagreb 5HT rat: A new animal model of alcoholism. U: (Thaller V, ur.) 2<sup>nd</sup> Croatian Conference on Alcoholism and other Addictions and 6<sup>th</sup> Alpe-Adria Conference on Alcoholism, 92–3.

Čičin-Šain L, Fröbe A, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B (2005) Serotonin transporter kinetics in rats selected for extreme values of platelet serotonin level. *Life Sci* 77:452–61.

Čičin-Šain L, Fröbe A, Jernej B (1998) Physiological characteristics of serotonin transporters on rat platelets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 120: 723–29.

Čičin-Šain L, Jernej B (2010) Wistar-Zagreb 5HT rats: a rodent model with constitutional upregulation/downregulation of serotonin transporter. U: Kalueff A, LaPorte J (ur.) *Experimental Models of Serotonin Transporter Research*. Cambridge University Press 214–44.

- Čičin-Šain L, Orešković D, Perović S, Jernej B, Iskrić S (1990) Determination of serotonin in peripheral rat tissues by ion-exchange chromatography-fluorometry. Validation by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Biogenic Amines* 7: 641–50.
- Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z (2010) Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106: 226–33.
- Dawson LA, Nguyen HQ (2000) Acute fluoxetine-induced changes in extracellular 5-HT: the mechanism of action of (±) pindolol. *Neuropharmacology* 39:1044–52.
- de Castro Gomes V, Hassan W, Maissonette S, Johnson LR, Ramos A, Landeira-Fernandez J (2013) Behavioral evaluation of eight rat lines selected for high and low anxiety-related responses. *Behav Brain Res* 257: 39–48.
- De Groote L, Olivier B, Westenberg HGM (2002) The effects of selective serotonin reuptake inhibitors on extracellular 5-HT levels in the hippocampus of 5-HT<sub>1B</sub> receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 439: 93–100.
- D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 36: 60–90.
- Di Cara B, Dusticier N, Forni C, Lievens JC, Daszuta A (2001) Serotonin depletion produces long lasting increase in striatal glutamatergic transmission. *J Neurochem* 78: 240–8.
- Drago A, Alboni S, Nicoletta B, De Ronchi D, Serretti A (2010) HTR1B as a risk profile maker in psychiatric disorders: A review through motivation and memory. *Eur J Clin Pharmacol* 66: 5–27.
- Drapier D, Bentuè-Ferrer D, Laviolle B, Millet B, Allain H, Bourin M, Reymann JM (2007) Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 176: 202–9.
- D'Souza DN, Zhang Y, Garcia F, Battaglia G, Van De Kar LD (2002) Destruction of serotonergic nerve terminals prevents fluoxetine-induced desensitization of hypothalamic 5-HT(1A) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 164: 392–400.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29: 1321–30.
- Durand M, Berton O, Aguerre S, Edno L, Combourieu I, Mormède P, Chaouloff F (1999) Effects of repeated fluoxetine on anxiety-related behaviours, central serotonergic systems, and the corticotropic axis in SHR and WKY rats. *Neuropharmacology* 38: 893–907.
- Eacott MJ, Easton A (2010) Episodic memory in animals: Remembering which occasion. *Neuropsychologia* 48: 2273–80.
- Eichenbaum H, Schoenbaum G, Young B, Bunsey A (1996) Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13500–7.

Enginar N, Hatipoğlu I, Firtina M (2008) Evaluation of the acute effects of amitriptyline and fluoxetine on anxiety using grooming analysis algorithm in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 89: 450–5.

Fabre V, Beaufour C, Evrard A, Rioux A, Hanoun N, Lesch KP, Murphy DL, Lanfumey L, Hamon M, Martres MP (2000) Altered expression and functions of serotonin 5-HT 1A and 5-HT 1B receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *Eur J Neurosci* 12: 2299–310.

File SE (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 125: 151–7.

File SE, Ouagazzal AM, Gonzalez LE, Overstreet DH (1999) Chronic fluoxetine in tests of anxiety in rat lines selectively bred for differential 5-HT(1A) receptor function. *Pharmacol Biochem Behav* 62: 695–701.

File SE, Wardill AG (1975) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44: 53–9.

Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP (1999) An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett* 458: 171–4.

Fone KCF (2008) An update on the role of the 5-hydroxytryptamine 6 receptor in cognitive function. *Neuropharmacology* 55: 1015–22.

Fox MA, Andrews AM, Wendland JR, Lesch KP, Holmes A, Murphy DL (2007) A pharmacological analysis of mice with a targeted disruption of the serotonin transporter. *Psychopharmacology* 195: 147–66.

Fox MA, Panessiti MG, Moya PR, Tolliver TJ, Chen K, Shih JC, Murphy DL (2013) Mutations in monoamine oxidase (MAO) genes in mice lead to hypersensitivity to serotonin-enhancing drugs: implications for drug side effects in humans. *Pharmacogenomics J* 13: 997–1003.

Gardier AM, David DJ, Jégo G, Przybylski C, Jacquot C, Durier S, Gruwez B, Douvier E, Beauverie P, Poisson N, Hen R, Bourin M (2003) Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT<sub>1B</sub> receptor knockout mice. *J Neurochem* 86: 13–24.

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

Giorgi O, Piras G, Lecca D, Hansson S, Driscoll P, Corda MG (2003) Differential neurochemical properties of central serotonergic transmission in Roman high- and low-avoidance rats. *J Neurochem* 86: 422–31.

Gorman JM (2006) Gender differences in depression and response to psychotropic medication. *Gen Med* 3: 93–109.

Griebel G, Cohen C, Perrault G, Sanger DJ (1999) Behavioral effects of acute and chronic fluoxetine in Wistar-Kyoto rats. *Physiol Behav* 67: 315–20.

Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ (1997) Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 817–27.

Gutknecht L, Araragi N, Merker S, Waider J, Sommerlandt FMJ, Mlinar B, Baccini G, Mayer U, Proft F, Hamon M, Schmitt AG, Corradetti R, Lanfumey L, Lesch KP (2012) Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and Raphe neuron serotonergic specification. *PLoS One* 7(8):e43157. doi:10.1371/journal.pone.0043157.

Gutknecht L, Popp S, Waider J, Sommerlandt FMJ, Göppner C, Post A, Reif A, van den Hove D, Strelakova T, Schmitt A, Colaço MBN, Sommer C, Palme R, Lesch KP (2015) Interaction of brain 5-HT synthesis deficiency, chronic stress and sex differentially impact emotional behavior in Tph2 knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2015 DOI 10.1007/s00213-015-3879-0.

Guzzetti S, Calcagno E, Canetta A, Sacchetti G, Fracasso C, Caccia S, Cervo L, Invernizzi RW (2008) Strain differences in paroxetine-induced reduction of immobility time in the forced swimming test in mice: Role of serotonin. *Eur J Pharmacol* 594: 117–24.

Haddley K, Vasiliou AS, Ali FR, Paredes UM, Bubb VJ, Quinn JP (2008) Molecular genetics of monoamine transporters: Relevance to brain disorders. *Neurochem Res* 33: 652–67.

Halford JC, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE (2005) Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets* 6: 201–13.

Hannon J, Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195: 198–213.

Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15049–54.

Henke K (2010) A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat Rev Neurosci* 11: 523–32.

Hensler JG (2006) Serotonin. U: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (ur.) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Burlington: Elsevier Academic Press 227–48.

Herold N, Uebelhack K, Franke L, Amthauer H, Luedemann L, Bruhn H, Felix R, Uebelhack R, Plotkin M (2006) Imaging of serotonin transporters and its blockade by citalopram in patients with major depression using a novel SPECT ligand [<sup>123</sup>I]-ADAM. *J Neural Transm* 113: 659–70.

Hervás I, Artigas F (1998) Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur J Pharmacol* 358: 9–18.

Holmes A (2008) Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1293–1314.

Holmes A, Li Q, Murphy DL, Gold E, Crawley JN (2003a) Abnormal anxiety-related behaviour in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes Brain Behav* 2: 365–80.

Holmes A, Murphy DL, Crawley JN (2003b) Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: Parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry* 54: 953–9.

Holmes A, Yang RJ, Murphy DL, Crawley JN (2002) Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology* 27: 914–23.

Homberg JR (2012) Serotonergic Modulation of Conditioned Fear. *Scientifica (Cairo)* doi: 10.6064/2012/821549.

Homberg JR, Lesch KP (2011) Looking on the bright side of serotonin transporter gene variation. *Biol Psychiatry* 69: 513–9.

Homberg JR, Olivier JDA, Blom T, Arentsen T, van Brunshot C, Schipper P, Korte-Bouws G, van Luijtelaaar G, Reneman L (2011b) Fluoxetine exerts age-dependent effects on behavior and amygdala neuroplasticity in the rat. *PloS One* DOI:10.1371/journal.pone.0016646.

Homberg JR, Olivier JDA, Smits BMG, Mul JD, Mudde J, Verheul M, Nieuwenhuizen OFM, Cools AR, Ronken E, Cremers T, Schoffelmeer ANM, Ellenbroek BA, Cuppen E (2007) Characterization of the serotonin transporter knockout rat: A selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience* 146: 1662–76.

Homberg JR, Schubert D, Gaspar P (2010) New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. *Trends Pharmacol Sci* 31: 60–5.

Horstmann S, Binder EB (2009) Pharmacogenomics of antidepressant drugs. *Pharmacol Ther* 124: 57–73.

Hranilović D, Čičin-Šain L, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B, (2005) Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: Differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 165: 271–7.

Hranilović D, Herak-Kramberger CM, Cicin-Sain L, Sabolić I, Jernej B (2001) Serotonin transporter in rat platelets. Level of protein expression underlies inherited differences in uptake kinetics. *Life Sci* 69: 59–65.

Hrdina PD (1987) Regulation of high- and low-affinity [3H]imipramine recognition sites in rat brain by chronic treatment with antidepressants. *Eur J Pharmacol* 138: 159–68.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D (2006) Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 78: 815–26.

Ito K, Yoshida K, Sato K, Takahashi H, Kamata M, Higuchi H, Shimizu T, Itoh K, Inoue K, Tezuka T, Suzuki T, Ohkubo T, Sugawara K, Otani K (2002) A variable number of tandem repeats in the serotonin transporter gene does not affect the antidepressant response to fluvoxamine. *Psychiatry Res* 111: 235–39.

Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165–229.

Jennings KA, Loder MK, Sheward WJ, Pei Q, Deacon RMJ, Benson MA, Olverman HJ, Hastie ND, Harmar AJ, Shen S, Sharp T (2006) Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci* 26: 8955–64.

Jennings KA, Sheward WJ, Harmar AJ, Sharp T (2008) Evidence that genetic variation in 5-HT transporter expression is linked to changes in 5-HT<sub>2A</sub> receptor function. *Neuropharmacology* 54: 776–83.

Jernej B, Čičin-Šain L (1990) Platelet serotonin level in rats is under genetic control. *Psychiatry Res* 32: 167–74.

Jernej B, Čičin-Šain L, Iskrić S (1988) A simple and reliable method for monitoring platelet serotonin levels in rats. *Life Sci* 43:1663–70.

Jernej B, Čičin-Šain L, Kveder S (1989) Physiological characteristics of platelet serotonin in rats. *Life Sci* 45: 485–92.

Jernej B, Hranilović D, Čičin-Šain L (1999) Serotonin transporter on rat platelets: levels of mRNA underlie inherited differences in uptake kinetics. *Neurochem Int* 33: 519–23.

Jiao J, Nitzke AM, Doukas DG, Seiglie MP, Dulawa SC (2011) Antidepressant response to chronic citalopram treatment in eight inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 213: 509–20.

Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE (2011) Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147: 509–24.

Johnson DA, Ingram CD, Grant EJ, Craighead M, Gartside SE (2009) Glucocorticoid receptor antagonism augments fluoxetine-induced downregulation of the 5-HT transporter. *Neuropsychopharmacology* 34: 399–409.

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

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

Kalueff AV, Jensen CL, Murphy DL (2007b) Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain Res* 1169: 87–97.

Kalueff AV, Tuohimaa P (2005) The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods* 143: 169–77.

Karabeg MM, Grauthoff S, Kollert SY, Weidner M, Heiming RS, Jansen F, Popp S, Kaiser S, Lesch KP, Sachser N, Schmitt AG, Lewejohann L (2013) 5-HTT deficiency affects neuroplasticity and increases stress sensitivity resulting in altered spatial learning performance in the Morris Water Maze but not in the Barnes Maze. *PLoS One* 8(10):e78238 DOI: 10.1371/journal.pone.0078238.

Keck ME, Sartori SB, Welt T, Müller MB, Ohl F, Holsboer F, Landgraf R, Singewald N (2005) Differences in serotonergic neurotransmission between rats displaying high or low anxiety/depression-like behaviour: Effects of chronic paroxetine treatment. *J Neurochem* 92: 1170–9.

Kent JM, Coplan JD, Gorman JM (1998) Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biol Psychiatry* 44: 812–24.

Kent JM, Mathew SJ, Gorman JM (2002) Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biol Psychiatry* 52: 1008–30.

Kim DK, Lim SW, Lee S, Sohn SE, Kim S, Hahn CG, Carroll BJ (2000) Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response. *Neuroreport* 11: 215–19.

Kim DK, Tolliver TJ, Huang SJ, Martin BJ, Andrews AM, Wichems C, Holmes A, Lesch KP, Murphy DL (2005) Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. *Neuropharmacology* 49: 798–810.

Klein AB, Ultved L, Adamsen D, Santini MA, Tobeña A, Fernandez-Teruel A, Flores P, Moreno M, Cardona D, Knudsen GM, Aznar S, Mikkelsen JD (2014) 5-HT<sub>2A</sub> and mGlu<sub>2</sub> receptor binding levels are related to differences in impulsive behavior in the Roman Low- (RLA) and High- (RHA) avoidance rat strains. *Neuroscience* 263: 36–45.

Klenotich SJ, Seiglie MP, McMurray MS, Roitman JD, Le Grange D, Dugad P, Dulawa SC (2012) Olanzapine, but not fluoxetine, treatment increases survival in activity-based anorexia in mice. *Neuropsychopharmacology* 37: 1620–31.

Kliethermes CL, Crabbe JC (2006) Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 57–65.



Kreiss DS, Lucki I (1995) Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 866–76.

Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, Strømgaard K, Gether U (2011) SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev* 63: 585–640.

Kroeze WK, Roth BL (1998) The molecular biology of serotonin receptors: Therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry* 44: 1128–42.

Kroeze Y, Zhou H, Homberg JR (2012) The genetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 136: 375–400.

Kugaya A, Sanacora G, Staley JK, Malison RT, Bozkurt A, Khan S, Anand A, van Dyck CH, Baldwin RM, Seibyl JP, Charney D, Innis RB (2004) Brain serotonin transporter availability predicts treatment response to selective serotonin reuptake inhibitors. *Biol Psychiatry* 56: 497–502.

Kusserow H, Davies B, Hftrnagl H, Voigt I, Stroh T, Bert B, Deng DR, Fink H, Veh RW, Theuring F (2004) Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 129: 104–16.

Lanzenberger R, Kranz GS, Haeusler D, Akimova E, Savli M, Hahn A, Mitterhauser M, Spindelegger C, Philippe C, Fink M, Wadsak W, Karanikas G, Kasper S (2012) Prediction of SSRI treatment response in major depression based on serotonin transporter interplay between median raphe nucleus and projection areas. *Neuroimage* 63: 874–81.

Larionov A, Krause A, Miller W (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 6: 62.

Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, Chauveau J, Hamon M, Lanfumey L (2000) Differential adaptation of brain 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* 39: 110–22.

Lesch KP, Araragi N, Waider J, van den Hove D, Gutknecht L (2012) Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. *Phil Trans R Soc B* 367: 2426–43.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527–31.

Lesch KP, Gutknecht L (2005) Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1062–73.

Lesch KP, Meyer J, Glatz K, Flügge G, Hinney A, Hebebrand J, Klauck SM, Poustka A, Poustka F, Bengel D, Mössner R, Riederer P, Heils A (1997) The 5-HT transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in evolutionary perspective: alternative biallelic variation in rhesus monkeys. *J Neural Transm* 104: 1259–66.

Lesch KP, Mössner R (1998) Genetically driven variation in serotonin uptake: Is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders?. *Biol Psychiatry* 44: 179–92.

Lesch KP, Waider J (2012) Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 76: 175–91.

Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P (1993) Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* 60: 2319–22.

Lesch KP, Zeng Y, Reif A, Gutknecht L (2003) Anxiety-related traits in mice with modified genes of the serotonergic pathway. *Eur J Pharmacol* 480: 185–204.

Li Q, Wichems C, Heils A, Lesch KP, Murphy DL (2000) Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT<sub>1A</sub>) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. *J Neurosci* 20: 7888–95.

Li Q, Wichems C, Heils A, Van De Kar LD, Lesch KP, Murphy DL (1999) Reduction of 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>1A</sub>-mediated temperature and neuroendocrine responses and 5-HT<sub>1A</sub> binding sites in 5-HT transporter knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 999–1007.

Liu J, Garza JC, Bronner J, Kim CS, Zhang W, Lu XY (2010) Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: A comparison with fluoxetine. *Psychopharmacology (Berl)* 207: 535–45.

Liu Q, Yang Q, Sun W, Vogel P, Heydorn W, Yu XQ, Hu Z, Yu W, Jonas B, Pineda R, Calderon-Gay V, Germann M, O'Neill E, Brommage R, Cullinan E, Platt K, Wilson A, Powell D, Sands A, Zambrowicz B, Shi ZC (2008) Discovery and characterization of novel tryptophan hydroxylase inhibitors that selectively inhibit serotonin synthesis in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 47–55.

Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44: 151–62.

Lüttgen M, Elvander E, Madjid N, Ögren SO (2005) Analysis of the role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in spatial and aversive learning in the rat. *Neuropharmacology* 48: 830–52.

Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84: 87–136.

Malagié I, David DJ, Jolliet P, Hen R, Bourin M, Gardier AM (2002) Improved efficacy of fluoxetine in increasing hippocampal 5-hydroxytryptamine outflow in 5-HT<sub>1B</sub> receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 443: 99–104.

Manias B, Taylor DA (1983) Inhibition of in vitro amine uptake into rat brain synaptosomes after in vivo administration of antidepressants. *Eur J Pharmacol* 95: 305–9.

Mannoury la Cour C, Boni C, Hanoun N, Lesch KP, Hamon M, Lanfumey L (2001) Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT(1A) receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity. *J Neurosci* 21: 2178–85.

Marcusson JO, Ross SB (1990) Binding of some antidepressants to the 5-hydroxytryptamine transporter in brain and platelets. *Psychopharmacology (Berl)* 102: 145–55.

Maswood N, Sarkar J, Uphouse L (2008) Modest effects of repeated fluoxetine on estrous cyclicity and sexual behavior in Sprague Dawley female rats. *Brain Res* 1245: 52–60.

Mathews TA, Fedele DE, Coppelli FM, Avila AM, Murphy DL, Andrews AM (2004) Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *J Neurosci Methods* 140: 169–81.

Mayorga AJ, Dalvi A, Page ME, Zimov-Levinson S, Hen R, Lucki I (2001) Antidepressant-like behavioral effects in 5-Hydroxytryptamine1A and 5-Hydroxytryptamine1B receptor mutant mice. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1101–7.

Meneses A, Perez-Garcia G, Ponce-Lopez T, Tellez R, Castillo C (2011) Serotonin transporter and memory. *Neuropharmacology* 61: 355–63.

Mercado CP, Kilic F (2010) Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol Interv* 10: 231–41.

Michalikova S, van Rensburg R, Chazot PL, Ennaceur A (2010) Anxiety responses in Balb/c, c57 and CD-1 mice exposed to a novel open space test. *Behav Brain Res* 207: 402–17.

Miller JM, Oquendo MA, Ogden RD, Mann JJ, Parsey RV (2008) Serotonin transporter binding as a possible predictor of one-year remission in major depressive disorder. *J Psychiatr Res* 42: 1137–44.

Mokrović G (2011) Serotonergična modulacija odgovora na alkohol: istraživanja na štakoru Wistar-Zagreb 5HT. Doktorska disertacija, Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

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

Monleón S, Casino A, Vinader-Caerols C, Arenas MC (2001) Acute effects of fluoxetine on inhibitory avoidance consolidation in male and female OF1 mice. *Neurosci Res Commun* 28: 123–30.

Monleón S, Urquiza A, Arenas MC, Vinader-Caerols C, Parra A (2002) Chronic administration of fluoxetine impairs inhibitory avoidance in male but not female mice. *Behav Brain Res* 136: 483–8.

Monleón S, Vinader-Caerols C, Arenas MC, Parra A (2008) Antidepressant drugs and memory: insights from animal studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 235–48.

Moya PR, Fox MA, Jensen CL, Laporte JL, French HT, Wendland JR, Murphy DL (2011) Altered 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist-induced responses and 5-HT<sub>2C</sub> receptor RNA editing in the amygdala of serotonin transporter knockout mice. *BMC Pharmacology* 11:3 doi:10.1186/1471-2210-11-3.

Murphy DL, Fox MA, Timpano KR, Moya PR, Ren-Patterson R, Andrews AM, Holmes A, Lesch KP, Wendland JR (2008) How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* 55: 932–60.

Myhrer T (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev* 41: 268–87.

Narwal S, Rishika Saini D, Kumari K, Narwal S, Singh G, Singh Negi R, Sarin RV (2012) Behavior and pharmacological animal models for the evaluation of learning and memory condition. *Indo Global J Pharm Sci* 2: 121–29.

Neumaier JF, Root DC, Hamblin MW (1996) Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT<sub>1B</sub> mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 15: 515–22.

Neumann ID, Wegener G, Homberg JR, Cohen H, Slattery DA, Zohar J, Olivier JDA, Mathé AA (2011) Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition?. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 1357–75.

Norcross M, Poonam M, Enoch AJ, Karlsson RM, Brigman JL, Cameron HA, Harvey-White J, Holmes A (2008) Effects of adolescent fluoxetine treatment on fear-, anxiety- or stress-related behaviors in C57BL/6J or BALB/cJ mice. *Psychopharmacology (Berl)* 200: 413–24.

Nutt DJ, Forshall S, Bell C, Rich A, Sandford J, Nash J, Argyropoulos S (1999) Mechanisms of action of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of psychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 81–6.

Ögren SO, Eriksson TM, Elvander-Tottie E, D'Addario C, Ekström JC, Svenningsson P, Meister B, Kehr J, Stiedl O (2008) The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in learning and memory. *Behav Brain Res* 195: 54–77.

O'Leary OF, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I (2007) Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 192: 357–71.

O'Leary TP, Gunn RK, Brown RE (2013) What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behav Genet* 43: 34-50.

Olivier JDA, Blom T, Arentsen T, Homberg JR (2011a) The age-dependent effects of selective serotonin reuptake inhibitors in humans and rodents: A review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 1400–08.

Olivier JDA, Jans LAW, Blokland A, Broers NJ, Homberg JR, Ellenbroek BA, Cools AR (2009) Serotonin transporter deficiency in rats contributes to impaired object memory. *Genes Brain Behav* 8: 829–34.

Olivier JDA, Vallès A, van Heesch F, Afrasiab-Middelmann A, Roelofs JJPM, Jonkers M, Peeters EJ, Korte-Bouws GAH, Dederen JP, Kiliaan AJ, Martens GJ, Schubert D, Homberg JR (2011b) Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. *Psychopharmacology (Berl)* 217: 419–32.

Olivier JDA, van der Hart MGC, van Swelm RPL, Dederen PJ, Homberg JR, Creemers T, Deen PMT, Cuppen E, Cools AR, Ellenbroek BA (2008) A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: An animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience* 152: 573–84.

Olivier JDA, Vinkers CH, Olivier B (2013) The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. *Front Pharmacol* 4: 1–17.

Ortiz J, Artigas F (1992) Effects of monoamine uptake inhibitors on extracellular and platelet 5-hydroxytryptamine in rat blood: different effects of clomipramine and fluoxetine. *Br J Pharmacol* 105: 941–46.

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth A (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10734–39.

Perez XA, Andrews AM (2005) Chronoamperometry to determine differential reductions in uptake in brain synaptosomes from serotonin transporter knockout mice. *Anal Chem* 77: 818–26.

Perez XA, Bianco LE, Andrews AM (2006) Filtration disrupts synaptosomes during radiochemical analysis of serotonin uptake: comparison with chronoamperometry in SERT knockout mice. *J Neurosci Methods* 154: 245–55.

Perez-Garcia G, Meneses A (2008) Memory formation, amnesia, improved memory and reversed amnesia: 5-HT role. *Behav Brain Res* 195: 17–29.

Popa D, Cerdan J, Repérant C, Guiard BP, Guilloux JP, David DJ, Gardier AM (2010) A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *Eur J Pharmacol* 628: 83–90.

Porcelli S, Fabbri C, Serretti A (2012) Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy. *Eur Neuropsychopharmacol* 22: 239–58.

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

Qu Y, Aluisio L, Lord B, Boggs J, Hoey K, Mazur C, Lovenberg T (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 92: 469–73.

Quevedo G, Moscoso O, Prado-Moreno A, Čičin-Šain L, Jernej B, Delgado-Garcia J (2002) Behavioral and molecular studies in rats over-expressing and under-expressing serotonin transporter. U: COST 10: Brain Damage Repair, 11th Committee Meeting, p 15. Dublin: Abstract book.

Ramamoorthy S, Shippenberg TS, Jayanthi LD (2011) Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation. *Pharmacol Ther* 129: 220–38.

Rausch JL (2005) Initial conditions of psychotropic drug response: Studies of serotonin transporter long promoter region (5-HTTLPR), serotonin transporter efficiency, cytokine and kinase gene expression relevant to depression and antidepressant outcome. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1046–51.

Rausch JL, Johnson ME, Fei YJ, Li JQ, Shendarkar N, Mac Hobby H, Ganapathy V, Leibach FH (2002) Initial conditions of serotonin transporter kinetics and genotype: Influence on SSRI treatment trial outcome. *Biol Psychiatry* 51: 723–32.

Ravinder S, Pillai AG, Chattarji S (2011) Cellular correlates of enhanced anxiety caused by acute treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine in rats. *Front Behav Neurosci* 5: 1–10.

Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafail RA, Khaku A, Mondello S, Gold MS, Kobeissy FH (2013) An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience* 240: 204–18.

Ressler KJ, Mayberg HS (2007) Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci* 10: 1116–24.

Roberts AJ, Hedlund PB (2012) The 5-HT<sub>7</sub> receptor in learning and memory. Importance of the hippocampus. *Hippocampus* 22: 762–71.

Romero L, Artigas F (1997) Preferential potentiation of the effects of serotonin uptake inhibitors by 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists in the dorsal raphe pathway: role of somatodendritic autoreceptors. *J Neurochem* 68: 2593–2603.

Romero L, Jernej B, Bel N, Čičin-Šain L, Cortés R, Artigas F (1998) Basal and stimulated extracellular serotonin concentration in the brain of rats with altered serotonin uptake. *Synapse* 28: 313–21.

Sachs BD, Jacobsen JP, Thomas TL, Siesser WB, Roberts WL, Caron MG (2013) The effects of congenital brain serotonin deficiency on responses to chronic fluoxetine. *Transl Psychiatry* 3, e291. DOI: 10.1038/tp.2013.65.

Sarkisyan G, Roberts AJ, Hedlund PB (2010) The 5-HT<sub>7</sub> receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. *Behav Brain Res* 209: 99–108.

Sass A, Wörtwein G (2012) The effect of subchronic fluoxetine treatment on learning and memory in adolescent rats. *Behav Brain Res* 228: 169–75.

Savelieva KV, Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q, Cullinan E, Lanthorn TH (2008) Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One* 3: e3301. doi:10.1371/journal.pone.0003301.

Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009) 5-HT<sub>1A</sub> receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88: 17–31.

Sawyer EK, Howell LL (2011) Pharmacokinetics of fluoxetine in rhesus macaques following multiple routes of administration. *Pharmacology* 88: 44–49.

Scullion K, Boychuk JA, Yamakawa GR, Rodych JTG, Nakanishi ST, Seto A, Smith VM, McCarthy RW, Whelan PJ, Antle MC, Pittman QJ, Teskey GC (2013) Serotonin 1A receptors alter expression of movement representations. *J Neurosci* 33: 4988–99.

Serretti A, Lilli R, Smeraldi E (2002) Pharmacogenetics in affective disorders. *Eur J Pharmacol* 438: 117–28.

Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H (2010) Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 87: 521–36.

Shrestha SS, Nelson EE, Liow JS, Gladding R, Lyoo CH, Noble PL, Morse C, Henter ID, Kruger J, Zhang B, Suomi SJ, Svenningsson P, Pike VW, Winslow JT, Leibenluft E, Pine DS, Innis RB (2014) Fluoxetine administered to juvenile monkeys: effects on the serotonin transporter and behavior. *Am J Psychiatry* 171: 323–31.

Siesser WB, Zhang X, Jacobsen JPR, Sotnikova TD, Gainetdinov PR, Caron MG (2010) Tryptophan hydroxylase 2 genotype determines brain serotonin synthesis but not tissue content in C57Bl/6 and BALB/c congenic mice. *Neurosci Lett* 481: 6–11.

Silva RBC, Brandão ML (2000) Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: An ethological analysis. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 209–16.

Sousa N, Almeida OF, Wotjak CT (2006) A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav* 5: 5–24.

Søeby K, Larsen SA, Olsen L, Rasmussen HB, Werge T (2005) Serotonin transporter: evolution and impact of polymorphic transcriptional regulation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 136B: 53–57.

Squire LR, Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13515–22.

Stahl SM (1998) Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord* 51: 215–35.

Steimer W, Müller B, Leucht S, Kissling W (2001) Pharmacogenetics: a new diagnostic tool in the management of antidepressive drug therapy. *Clinica Chim Acta* 308: 33–41.

Steiner JA, Carneiro AMD, Blakely RD (2008) Going with the flow: Trafficking-dependent and -independent regulation of serotonin transport. *Traffic* 9: 1393–402.

Suplicy H, Boguszewski CL, dos Santos CM, do Desterro de Figueiredo M, Cunha DR, Radominski R (2014) A comparative study of five centrally acting drugs on the pharmacological treatment of obesity. *Int J Obes (Lond)* 38(8): 1097–103.

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

Terry Jr. Av, Buccafusco JJ, Wilson C (2008) Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: Selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets. *Behav Brain Res* 195: 30–38.

Toth M (2003) 5-HT<sub>1A</sub> receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. *Eur J Pharmacol* 463: 177–84.

Tyrer SP, Marshall EF, Griffiths HW (1990) The relationship between response to fluoxetine, plasma drug levels, imipramine binding to platelet membranes and whole-blood 5-HT. *Prog Neuropsychopharmacol* 14:797–805.

Ushijima K, Sakaguchi H, Sato Y, To H, Koyanagi S, Higuchi S, Ohdo S (2005) Chronopharmacological study of antidepressants in forced swimming test of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 764–70.

Varga G, Szekely A, Sasvari-Szekely M (2011) Candidate gene studies of dopaminergic and serotonergic polymorphisms. *Neuropsychopharmacol Hung* 13:93–101.

Wagner A, Montero D, Martensson B, Siwers B, Asberg M (1990) Effects of fluoxetine treatment of platelet [<sup>3</sup>H] imipramine binding, 5-HT uptake and 5-HT content in major depressive disorder. *J Affect Disord* 20:101–13.

Wang Z, Bradesi S, Charles JR, Pang RD, Maarek JMI, Mayer EA, Holschneider DP (2011) Functional brain activation during retrieval of visceral pain-conditioned passive avoidance in the rat. *Pain* 152: 2746–56.

Whitaker-Azmitia PM (2001) Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* 56: 479–85.

Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995) Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 57: 411–41.

Wong DT, Bymaster FP, Mayle DA, Reid LR, Krushinski JH, Robertson DW (1993) LY248686, a new inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake. *Neuropsychopharmacology* 8: 23–33.



Yau JLW, Hibberd C, Noble J, Seckl JR (2002) The effect of chronic fluoxetine treatment on brain corticosteroid receptor mRNA expression and spatial memory in young and aged rats. *Mol Brain Res* 106: 117–23.

Yochum CL, Medvecky CM, Cheh MA, Bhattacharya P, Wagner GC (2010) Differential development of central dopaminergic and serotonergic systems in BALB/c and C57BL/6J mice. *Brain Res* 1349: 97–104.

Young SN, Leyton M (2002) The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 857–65.

Zahniser NR, Doolen S (2001) Chronic and acute regulation of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters: Drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol Ther* 92: 21–55.

Zhang S, Amstein T, Shen J, Brush FR, Gershenfeld HK (2005) Molecular correlates of emotional learning using genetically selected rat lines. *Genes Brain Behav* 4: 99–109.

Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R (1999) Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>1B</sub> receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 52–60.

Ziu E, Mercado CP, Li Y, Singh P, Ahmed BA, Freyaldenhoven S, Lensing S, Ware J, Kilic F (2012) Down-regulation of the serotonin transporter in hyperreactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin. *J Mol Cell Cardiol* 52: 1112–21.



*Prilog*



**Popis kratica**

5HIAA	<i>5-hydroxyindoleacetic acid</i> , 5-hidroksiindol-octena kiselina
5HT	<i>5-hydroxytryptamine</i> , 5-hidroksitriptamin, serotonin
5HTP	<i>5-hydroxytryptophan</i> , 5-hidroksitriptofan
5HTT	<i>5-hydroxytryptamine transporter</i> , serotoniniski prijenosnik
5HTTLPR	<i>serotonin transporter linked polymorphic region</i> , funkcionalni polimorfizam u promotorskoj regiji gena za 5HTT
8-OH-DPAT	<i>8-hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetralin</i> , 8-hidroksi-2-(di-N-propilamino) tertralin
AD	antidepresivni lijekovi, antidepresivi
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , analiza varijance
AUC	<i>area under curve</i> , površina ispod krivulje
bp	<i>base pair</i> , parovi baza
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
DEPC	<i>diethylpyrocarbonate</i> , dietil-pirokarbonat
dNTP	<i>deoxyribonucleoside triphosphate</i> , deoksiribonukleozid-trifosfat
EDTA	<i>ethylene-diaminetetraacetic acid</i> , etilen-diamino tetraoctena kiselina
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , komplet za imunoenzimatski test
EPM	<i>elevated plus maze</i> , uzdignuti križni labirint
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> , γ-amino-maslačna kiselina
GAPDH	<i>glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase</i> , gliceraldehid-fosfat-dehidrogenaza
GPC	<i>G protein coupled</i> , G protein spregnuti receptori
HPC	<i>hippocampus</i> , hipokampus
i.p.	intraperitonealno
KO	<i>knock-out</i> , životinje sa utišanim ciljnim genom
LDB	<i>light/dark box</i> , test svjetlo-tamne komore

---

LTP	<i>long-term potentiation</i> , dugoročna potencijacija
M	<i>mean</i> , srednja vrijednost
MAO	<i>monoamine oxidase</i> , monoamin-oksidaza
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , mitogenom-aktivirane proteinske kinaze
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , glasnička ribonukleinska kiselina
N	<i>number</i> , broj
NKB	Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i> , N-metil-D-aspartat
OFT	<i>open field test</i> , test otvorenog prostora
OPT	O-ftaldialdehid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimerazom
PFP	<i>platelet-free-plasma</i> , plazma bez trombocita
PRP	<i>platelet-rich plasma</i> , plazma bogata trombocitima
PSL	<i>platelet serotonin level</i> , razina trombocitnog serotonina
PSU	<i>platelet serotonin uptake</i> , brzina unosa serotonina u trombocite
RT-PCR	<i>real time reverse transcription-polymerase chain reaction</i> , lančana reakcije polimerazom u stvarnom vremenu
SD	<i>standard deviation</i> , standardna devijacija
SEM	<i>standard error of the mean</i> , standardna pogreška srednje vrijednosti
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfizam jednog nukleotida
SSRI	<i>selective serotonin reuptake inhibitor</i> , selektivni inhibitori povratnog unosa serotonina
TPH	<i>tryptophan hydroxylase</i> , triptofan-hidroksilaza
Trc	trombocit
tt	tjelesna težina
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i> , varijabilni broj ponavljajućih ulomaka
WZ-5HT štakor	Wistar-Zagreb 5HT štakor

Tablica 8.1. Učinak tretmana fluoksetinom na pojedine 5HT parametre u krvi kod sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora.

mjereni		2 x 2 ANOVA			Fisherov LSD test			
parametar		sublinija x tretman	sublinija	tretman	V : N	V : Vf	N : Nf	Vf : Nf
trc 5HT	1h nakon 1 x 1mg/kg	$F(1, 20) = 0.658; p = 0.427$	<b><math>F(1, 20) = 167; p &lt; 0.0001</math></b>	$F(1, 20) = 1.30; p = 0.268$	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	ns	ns	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>
	1h nakon 9 x 6mg/kg	<b><math>F(1, 21) = 21.4; p = 0.0001</math></b>	<b><math>F(1, 21) = 130; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>F(1, 21) = 778; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>
	24h nakon 9 x 6mg/kg	<b><math>F(1, 23) = 45.9; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>F(1, 23) = 256; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>F(1, 23) = 867; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>
trc 5HT prijenosnik	1h nakon 1 x 1mg/kg	<b><math>F(1, 20) = 9.72; p = 0.0054</math></b>	<b><math>F(1, 20) = 57.9; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>F(1, 20) = 33.0; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	$p = 0.0778$	<b><math>p = 0.0047</math></b>
	1h nakon 1 x 6mg/kg	<b><math>F(1, 16) = 13.2; p = 0.0023</math></b>	<b><math>F(1, 16) = 14.5; p = 0.0016</math></b>	<b><math>F(1, 16) = 126; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p = 0.0001</math></b>	ns
plazma 5HT	1h nakon 1 x 1mg/kg	$F(1, 20) = 0.4675; p = 0.502$	<b><math>F(1, 20) = 7.76; p = 0.0114</math></b>	$F(1, 20) = 1.77; p = 0.198$	<b><math>p = 0.0235</math></b>	ns	ns	ns
	1h nakon 1 x 6mg/kg	$F(1, 18) = 1.73; p = 0.205$	$F(1, 18) = 0.963; p = 0.339$	<b><math>F(1, 18) = 62.3; p &lt; 0.0001</math></b>	ns	<b><math>p = 0.0002</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	ns
	1h nakon 9 x 6mg/kg	$F(1, 31) = 0.0463; p = 0.831$	<b><math>F(1, 31) = 5.87; p = 0.0214</math></b>	$F(1, 31) = 2.49; p = 0.125$	ns	ns	ns	$p = 0.0676$
	24h nakon 9 x 6mg/kg	$F(1, 30) = 1.56; p = 0.222$	$F(1, 30) = 1.52; p = 0.228$	<b><math>F(1, 30) = 13.6; p = 0.0009</math></b>	$p = 0.0899$	<b><math>p = 0.0011</math></b>	ns	ns

Vrijednosti pojedinih parametara, kao i broj korištenih životinja po pokusu, prikazani su u poglavlju Rezultati. Rezultati usporedbe pojedinih skupina prikazani ovdje provedeni su pomoću dvosmjerne analize varijance (eng. *two-way* ANOVA), popraćene *post hoc* testom (Fisher LSD test). trc 5HT: razina trombocitnog serotonina, trc 5HT prijenosnik: brzina unosa serotonina u trombocite, plazma 5HT: razina plazmatskog serotonina.

Tablica 8.2. Učinak tretmana fluoksetinom na pojedine 5HT parametre u mozgu kod sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora.

mjereni		2 x 2 ANOVA			Fisherov LSD test			
parametar		sublinija x tretman	sublinija	tretman	V : N	V : Vf	N : Nf	Vf : Nf
razina 5HT u MK	24h nakon 27 x 6mg/kg	$F(1, 28) = 2.25; p = 0.145$	<b><math>F(1, 28) = 5.90; p = 0.0218</math></b>	$F(1, 28) = 1.36; p = 0.253$	ns	ns	$p = 0.0695$	<b><math>p = 0.0096</math></b>
mRNA	5HTT u MK	<b><math>F(1, 27) = 9.40; p = 0.0049</math></b>	$F(1, 27) = 0.368; p = 0.549$	$F(1, 27) = 3.17; p = 0.0864$	<b><math>p = 0.0135</math></b>	ns	<b><math>p = 0.0023</math></b>	$p = 0.0987$
	5HTT u HPC	$F(1, 27) = 0.919; p = 0.346$	$F(1, 27) = 2.27; p = 0.144$	$F(1, 27) = 2.999e-005; p = 0.9$	ns	ns	ns	$p = 0.0873$
	5HTT u RN	$F(1, 26) = 0.227; p = 0.638$	$F(1, 26) = 2.16; p = 0.154$	<b><math>F(1, 26) = 4.76; p = 0.0383</math></b>	ns	$p = 0.0714$	ns	ns
	5HT1A u MK	$F(1, 26) = 3.17; p = 0.0868$	$F(1, 26) = 0.449; p = 0.509$	$F(1, 26) = 3.47; p = 0.0737$	ns	ns	<b><math>p = 0.0160</math></b>	ns
	5HT1A u HPC	$F(1, 28) = 0.286; p = 0.597$	$F(1, 28) = 0.243; p = 0.626$	<b><math>F(1, 28) = 5.44; p = 0.0271</math></b>	ns	$p = 0.0523$	ns	ns
	5HT1A u RN	$F(1, 28) = 0.833; p = 0.369$	$F(1, 28) = 0.698; p = 0.410$	$F(1, 28) = 0.0346; p = 0.854$	ns	ns	ns	ns

Vrijednosti pojedinih parametara, kao i broj korištenih životinja po pokusu, prikazani su u poglavlju Rezultati. Rezultati usporedbe pojedinih skupina prikazani ovdje provedeni su pomoću dvosmjerne analize varijance (eng. *two-way* ANOVA), popraćene *post hoc* testom (Fisher LSD test). mRNA: ekspresija mRNA, 5HTT: serotoninski prijenosnik, 5HT1A: serotoninski receptor tipa 1A, MK: moždana kora, HPC: hipokampus, RN: regija jezgara rafe.

Tablica 8.3. Učinak tretmana fluoksetinom na pojedine parametre ponašanja kod sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora.

test	mjereni parametar	2 x 2 ANOVA			Fisherov LSD test			
		sublinija x tretman	sublinija	tretman	V : N	V : Vf	N : Nf	Vf : Nf
OFT	duljina prijednog puta	F (1, 48) = 3.29; p = 0.0757	F (1, 48) = 0.311; p = 0.579	F (1, 48) = 2.07; p = 0.157	ns	<b>p = 0.0224</b>	ns	ns
	brzina kretanja	F (1, 48) = 3.31; p = 0.0750	F (1, 48) = 0.309; p = 0.581	F (1, 48) = 2.16; p = 0.149	ns	<b>p = 0.0211</b>	.	ns
	vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge	<b>F (1, 47) = 7.86; p = 0.0073</b>	<b>F (1, 47) = 5.75; p = 0.0205</b>	F (1, 47) = 2.17; p = 0.1473	<b>p = 0.0029</b>	<b>p = 0.0039</b>	ns	ns
	vrijeme do uzdizanja na stražnje noge	F (1, 46) = 0.108; p = 0.744	F (1, 46) = 0.00066; p = 0.979	F (1, 46) = 2.36; p = 0.131	ns	ns	ns	ns
	vrijeme provedeno u centralnoj zoni	F (1, 47) = 0.283; p = 0.597	<b>F (1, 47) = 5.45; p = 0.0239</b>	F (1, 47) = 3.84; p = 0.0559	p = 0.0858	p = 0.0757	ns	ns
	broj ulazaka u centralnu zonu	F (1, 48) = 0.705; p = 0.405	F (1, 48) = 2.14; p = 0.149	F (1, 48) = 0.495; p = 0.485	ns	ns	ns	<b>p = 0.0495</b>
	vrijeme provedeno u timarenju u rubnoj zoni	F (1, 48) = 1.62; p = 0.209	F (1, 48) = 1.39; p = 0.245	<b>F (1, 48) = 6.76; p = 0.0124</b>	ns	<b>p = 0.0072</b>	ns	<b>p = 0.0370</b>
	vrijeme do timarenja u rubnoj zoni	F (1, 48) = 0.351; p = 0.556	<b>F (1, 48) = 4.81; p = 0.0332</b>	F (1, 48) = 0.607; p = 0.439	p = 0.0961	ns	ns	ns
HB	duljina prijednog puta	F (1, 48) = 0.475; p = 0.494	<b>F (1, 48) = 7.45; p = 0.0089</b>	F (1, 48) = 1.70; p = 0.198	<b>p = 0.0427</b>	ns	ns	p = 0.0806
	brzina kretanja	F (1, 48) = 0.473; p = 0.495	<b>F (1, 48) = 7.58; p = 0.0083</b>	F (1, 48) = 1.87; p = 0.178	<b>p = 0.0414</b>	ns	ns	p = 0.0769
	vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge	F (1, 46) = 2.12; p = 0.152	<b>F (1, 46) = 11.8; p = 0.0013</b>	F (1, 46) = 3.60; p = 0.0639	<b>p = 0.0043</b>	ns	<b>p = 0.0251</b>	p = 0.0965
	vrijeme do uzdizanja na stražnje noge	F (1, 45) = 0.246; p = 0.622	F (1, 45) = 0.0216; p = 0.884	<b>F (1, 45) = 6.53; p = 0.0140</b>	ns	<b>p = 0.0354</b>	ns	ns
	vrijeme provedeno u guranju glave u rupe u rubnoj zoni	F (1, 46) = 0.193; p = 0.662	<b>F (1, 46) = 5.31; p = 0.0257</b>	F (1, 46) = 0.552; p = 0.461	ns	ns	ns	<b>p = 0.0192</b>
	vrijeme do guranja glave u rupe u rubnoj zoni	F (1, 46) = 2.31; p = 0.136	F (1, 46) = 1.06; p = 0.309	F (1, 46) = 2.43; p = 0.124	ns	ns	<b>p = 0.0418</b>	ns
	vrijeme provedeno u guranju glave u rupe u centralnoj zoni	F (1, 46) = 1.32; p = 0.256	F (1, 46) = 0.144; p = 0.706	F (1, 46) = 0.661; p = 0.4204	ns	ns	ns	ns
	vrijeme do guranja glave u rupe u centralnoj zoni	F (1, 48) = 0.999; p = 0.323	F (1, 48) = 2.73; p = 0.105	F (1, 48) = 1.78; p = 0.188	ns	ns	ns	ns



test	mjereni parametar	2 x 2 ANOVA			Fisherov LSD test			
		sublinija x tretman	sublinija	tretman	V : N	V : Vf	N : Nf	Vf : Nf
EPM	duljina prijednog puta	$F(1, 46) = 2.59; p = 0.115$	<b><math>F(1, 46) = 9.05; p = 0.0042</math></b>	$F(1, 46) = 0.0178; p = 0.894$	<b><math>p = 0.0074</math></b>	ns	ns	ns
	brzina kretanja	$F(1, 46) = 2.31; p = 0.135$	<b><math>F(1, 46) = 8.73; p = 0.0049</math></b>	$F(1, 46) = 0.0267; p = 0.871$	<b><math>p = 0.0093</math></b>	ns	ns	ns
	vrijeme provedeno u uzdizanju na stražnje noge u zatvorenim krakovima	$F(1, 47) = 0.429; p = 0.515$	<b><math>F(1, 47) = 30.9; p &lt; 0.0001</math></b>	$F(1, 47) = 0.0056; p = 0.941$	<b><math>p = 0.0005</math></b>	ns	ns	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>
	vrijeme provedeno u naginjanju preko ruba u otvorenim krakovima	$F(1, 48) = 0.162; p = 0.689$	$F(1, 48) = 0.792; p = 0.378$	<b><math>F(1, 48) = 5.89; p = 0.0190</math></b>	ns	<b><math>p = 0.0456</math></b>	ns	ns
	% vremena u otvorenim krakovima	$F(1, 47) = 2.33; p = 0.134$	$F(1, 47) = 0.126; p = 0.724$	$F(1, 47) = 1.69; p = 0.199$	ns	$p = 0.0503$	ns	ns
	% ulazaka u otvorene krakove	$F(1, 48) = 3.69; p = 0.0605$	$F(1, 48) = 0.0411; p = 0.840$	$F(1, 48) = 0.293; p = 0.591$	ns	$p = 0.0803$	ns	$p = 0.0690$
PAT	latencija do prelaska u crni dio tijekom habituacije	$F(1, 43) = 0.435; p = 0.513$	<b><math>F(1, 43) = 18.26; p = 0.0001</math></b>	$F(1, 43) = 0.331; p = 0.568$	<b><math>p = 0.0013</math></b>	ns	ns	<b><math>p = 0.0132</math></b>
	latencija do prelaska u crni dio tijekom treninga	$F(1, 43) = 0.0272; p = 0.869$	$F(1, 43) = 2.99; p = 0.0907$	<b><math>F(1, 43) = 57.9; p &lt; 0.0001</math></b>	ns	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p &lt; 0.0001</math></b>	ns
	latencija do prelaska u crni dio tijekom testa	$F(1, 42) = 0.0237; p = 0.879$	<b><math>F(1, 42) = 16.8; p = 0.002</math></b>	<b><math>F(1, 42) = 20.0; p &lt; 0.0001</math></b>	<b><math>p = 0.0079</math></b>	<b><math>p = 0.0039</math></b>	<b><math>p = 0.0021</math></b>	<b><math>p = 0.0044</math></b>
MWM	površina ispod krivulje učenja	$F(1, 43) = 2.05; p = 0.159$	$F(1, 43) = 0.0124; p = 0.912$	$F(1, 43) = 0.0023; p = 0.962$	ns	ns	ns	ns

Vrijednosti pojedinih parametara, kao i broj korištenih životinja po pokusu, prikazani su u poglavlju Rezultati. Rezultati usporedbe pojedinih skupina prikazani ovdje provedeni su pomoću dvosmjerne analize varijance (eng. *two-way* ANOVA), popraćene *post hoc* testom (Fisher LSD test). OFT: test otvorenog prostora, HB: ploča s rupama, EPM: uzdignuti kružni labirint, PAT: test pasivnog izbjegavanja, MWM: Morrisov vodeni labirint.



*Životopis*



Maja Kesić rođena je 1983. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i opću gimnaziju. 2002. godine upisuje studij Biologije, smjer profesor biologije i kemije, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te 2006. godine razliku predmeta za smjer molekularna biologija na istom fakultetu. Diplomirala je 2009. godine s diplomskim radom pod nazivom "Cjelovitost DNA u stanicama lista i korijena boba kao pokazatelj genotoksičnosti talijeva(I) acetata" izrađenim pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Pavlica. Godine 2010. upisuje poslijediplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te se zapošljava kao znanstvena novakinja u grupi prof. dr. sc. Branimira Jerneja, u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković. Godine 2015. prelazi na radno mjesto stručnog suradnika u istom laboratoriju.

Sudjelovala je na više nacionalnih i međunarodnih znanstvenih projekta: "Identifikacija genetskih puteva uključenih u serotonergičku modulaciju tjelesne težine" (TANITA Healthy Weight Community Trust, Japan; 2012.-2013.); "Prijenos serotonina preko placente: istraživanja na primarnim endotelnim stanicama humane placentarne barijere" (MZOŠ, RH i OeAD, Austrija; 2012.-2013.); "Epigenetika serotoninske signalizacije: istraživanja metilacije gena za serotoninski prijenosnik, monoamin oksidazu B i serotoninski receptor 2A" (MZOŠ, RH i DAAD, Njemačka; 2013.-2014.); "Serotonergična neurotransmisija: geni, proteini i ponašanje" (MZOŠ RH, 2007.-2014.); "Serotonergična modulacija pretilosti: međuovisnost regulatornih molekula i puteva" (HrZZ, 2015.-).

U dva je navrata bila na znanstvenim boravcima u inozemstvu, na Medicinskom sveučilištu u Grazu, Austrija (16.09.-05.10.2012. i 16.03.-16.06.2013.). Dobitnica je dviju stipendija za sudjelovanje na kongresima (Hrvatsko društvo za neuroznanost, 2011. i Austrian Pharmacological Society 2012.). U sklopu znanstveno-stručnog usavršavanja, pohađala je više tečajeva i radionica: Metodološki tečajevi u biologiji i medicini: DNA i RNA (2010.); Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama Kategorija LabAnim3 (2012.); Dopunska izobrazba o primjeni mjere zaštite od ionizirajućeg zračenja (2012.); Pozitronska emisijska tomografija na IRB-u: vrhunski alat u istraživanju animalnih modela (2014.).

Sudjeluje u održavanju seminara i vježbi na kolegiju Biološka psihologija I, te vježbi na kolegiju Osnove stanične biologije i genetike, preddiplomski studij psihologije, Hrvatsko katoličko sveučilište u Zagrebu. Aktivno je sudjelovala na četiri međunarodna i 6 domaćih znanstvenih skupova. Koautor je dva znanstvena članka u časopisu citiranom u bazi podataka *Current Contents* i 13 kongresnih priopćenja.

Članica je Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog genetičkog društva, Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, te Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama.

**Objavljeni radovi:**

Erjavec I, Bordukalo-Nikšić T, Brkljačić J, Grčević D, Mokrović G, Kesić M, Rogić D, Zavadski W, Paralkar VM, Grgurević L, Trkulja V, Čičin-Šain L, Vukičević S (2016) Constitutively Elevated Blood Serotonin Is Associated with Bone Loss and Type 2 Diabetes in Rats. PLoS One 11(2):e0150102. doi: 10.1371/journal.pone.0150102. eCollection 2016.

Kesić M, Tvrdeić A, Kolarić Darko, Stojković R, Čičin-Šain L (2015) Serotonergic modulation of pain and analgesic responses: a study in rats with constitutionally altered serotonin transporters. Eur J Pain 19(4): 508-515

**Odabrana kongresna priopćenja:**

Kesić M, Štefulj J, Čičin-Šain L (2015) Expression of adipokines and their receptors in brain and adipose tissue of rats with genetically altered serotonergic homeostasis. Book of Abstracts of 5th Croatian Congress of Neuroscience, Split, Hrvatska. 48

Kesić M, Mokrović G, Čičin-Šain L (2014) Behavioral response in Wistar-Zagreb 5HT model of rats with constitutionally altered serotonin transporter. Knjiga sažetaka, Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima, Zagreb, Hrvatska. 58-59

Kesić M, Tvrdeić A, Čičin-Šain L (2013) Pain sensitivity and analgesis response in Wistar-Zagreb 5HT rats with constitutionally altered serotonin transporter. Period Biol 115: 71

Kesić M, Čičin-Šain L, Desoye G, Wadsack C, Panzenboeck U, Štefulj J (2013) Biochemical and pharmacological characterisation of the serotonin transporter (SERT) in primary trophoblasts of the human placentas. Book of Abstracts of 4th Croatian Congress of Neuroscience, Zagreb, Hrvatska. 39

Kesić M, Štefulj J, Mokrović G, Čičin-Šain L (2012) The effect of chronic fluoxetine on anxiety-like behavior and expression of 5HT-related proteins in rats with constitutionally altered 5HT homeostasis. BMC Pharmacology and Toxicology 13:A30

Kesić M, Bordukalo-Nikšić T, Mokrović G, Čičin-Šain L (2011) Effect of acute injection of fluoxetine in rats with constitutional upregulation/downregulation of platelet serotonin transporter. Book of Abstracts of SiNAPSA Neuroscience Conference '11, Ljubljana, Slovenija. Osredkar D, Koritnik B, Pelko M (ur.), 87