

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Darija Šoltić

Utjecaj perinatalnog izlaganja povišenim
koncentracijama serotonina na histološku
građu somatosenzoričke kore odraslih štakora

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za neurofiziologiju i ponašanje životinja na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, te u Laboratoriju za imunohistokemiju i *in situ* hibridizaciju na Odsjeku za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović i prof. dr. sc. Nataše Jovanov- Milošević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Zahvalila bih prof dr. sc. Dubravki Hranilović i prof. dr. sc. Nataši Jovanov-Milošević na stručnosti i kompetentnosti pri izradi ovog diplomskog rada, na svim savjetima, strpljivosti i pruženom povjerenju u samostalnom radu, te poticanju učenja i kritičkog mišljenja. Također zahvalila bih dr. sc Ani Sofiji Blažević na pristupačnosti, poticanju samostalnog rada, podršci i pomoći kako u laboratorijskom radu, tako i u pisanju diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj perinatalnog izlaganja povišenim koncentracijama serotonina na histološku građu somatosenzoričke kore odraslih štakora

Darija Šoltić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Serotonin (5HT) je biološki aktivan amin prisutan u mozgu i perifernim tkivima sisavaca gdje izvršava različite funkcije, ovisno o odjeljku u kojem se nalazi. U mozgu regulira razvoj serotonergičnih neurona i ciljanih tkiva tijekom neurogeneze, dok u razvijenom mozgu preuzima ulogu neurotransmitera. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj perinatalno inducirane povišene razine serotonina, primjenom neposrednog prekursora sinteze serotonina, 5-hidroksitriptofana (5HTP, 25 mg/kg), ili inhibitora razgradnje serotonina, tranilcipromina (TCP, 2mg/kg) na razvoj bačvastog polja u somatosenzoričkoj kori mozga štakora. Mozgovi su prethodno izdvojeni neposredno po završetku tretmana (PND 21) ili u odrasloj dobi (PND 70). Tangencijalne rezove somatosenzoričke kore podvrgnula sam histološkoj metodi bojanja po Nisslu, te histokemijskoj metodi bojanja citokrom oksidazom (CO). Kvalitativna analiza bačvastog polja vršena je pregledavanjem rezova Nissla pod mikroskopom. Bačvasta polja na rezovima bojanim CO pronašli smo pod mikroskopom i fotografirali. Programom ImageJ ocrtili smo bačve unutar bačvastog polja, te izmjerili površinu koja je služila za kvantitativnu usporedbu eksperimentalnih skupina s kontrolnom, tretiranom fiziološkom otopinom. Povišene razine serotonina imale su značajan učinak na bačvasto polje mladunaca, pri čemu je tretman 5HTP-om rezultirao manjom površinom bačvastog polja i pojedinačnih bačvi, dok je je TCP narušio strukturu bačvi. Učinci tretmana 5HTP-om, vidljivi i u mozgu odraslih životinja, ukazuju na smanjeno grananje talamokortikalnih neurona tijekom prenatalnog dijela tretmana. Učinci TCP-a nisu zadržani u odraslih životinja, pa pretpostavljamo da je došlo do odgođenog sazrijevanja bačvastog polja uslijed kronične izloženosti povišenim koncentracijama serotonina u postnatalnom dijelu tretmana.

(41 stranica, 13 slika, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: bačvasto polje, bačve, tranilcipromin, 5-hidroksitriptofan

Prvi voditelj: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.

Drugi voditelj: dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević, izv. prof.

Neposredni voditelj: dr.sc. Ana Sofia Blažević

Ocjenjivači: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.; dr.sc. Gordana Lacković-Venturin, red. prof.; dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18.2.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

The effect of perinatal exposure to increased serotonin concentrations
on histological structure of somatosensory cortex of adult rats

Darija Šoltić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Serotonin (5HT) is biologically active amine present in the brain and peripheral tissues of mammals where it has various functions, depending on the compartment. In the brain, during neurogenesis, it regulates the development of serotonergic neurons and target tissues, while later it assumes the function of a neurotransmitter. The aim of this graduation thesis was to examine the effect of perinatally induced high serotonin levels on the development of barrel field in the rat somatosensory cortex, induced by treatment with the immediate serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan (5HTP, 25 mg/kg), and inhibitor of serotonin degradation, tranylcypromine (TCP, 2 mg/kg). Brains were collected on PND 21 or PND 70. Tangential sections of somatosensory cortex were used for histological processing with Nissl staining method, and histochemical method for cytochrome oxidase staining (CO). Qualitative analysis of barrel field were conducted by examination of Nissl sections under the microscope. We found barrel field on CO sections under the microscope and photographed them. In software ImageJ we draw barrels in barrel field, measured their area surface and conducted analysis of quantitative differences between treated and control group. High serotonin levels had significant effect on barrel field of the pups, with 5HTP treatment resulting in smaller barrel field and barrel area, and TCP treatment disrupting their structure. Treatment effects of 5HTP, still visible in adult rats, point to the decreased branching of thalamo-cortical axons during the prenatal phase of the treatment. Since the effects of TCP were not present in the brains of adult animals, we assume that the chronic exposure to high serotonin levels in the postnatal phase of the treatment only delayed maturation of the barrel field.

(41 pages, 13 figures, 33 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: barrel field, barrels, 5-hydroxytryptophan, tranylcypromine

First Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.

Second Supervisor: Dr. Nataša Jovanov-Milošević, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Ana Sofia Blažević

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.; Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.;
Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 18.2.2016.

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
1.1.	Serotonin	1
1.1.1.	Metabolizam serotonina	1
1.1.2.	Periferni i središnji serotoninski odjeljak	2
1.1.2.1.	Periferni serotoninski odjeljak.....	3
1.1.2.2.	Središnji serotoninski odjeljak.....	4
1.1.3.	Bačvasto polje.....	6
1.2.	Narušavanje serotoninske homeostaze	9
1.2.1.	Klinička istraživanja	9
1.2.2.	Istraživanja na animalnim modelima	11
1.2.2.1.	Modeli za bihevioralne poremećaje	11
1.2.2.2.	Modeli za razvoj somatosenzoričke kore	12
1.2.3.	Model perinatalno poremećenog metabolizma serotonina	13
2.	CILJ	14
3.	MATERIJALI I METODE	15
3.1.	Materijali	15
3.1.1.	Uzorci.....	15
3.1.2.	Kemikalije	15
3.1.3.	Pribor i pomagala	16
3.2.	Metode	17
3.2.1.	Izrada histoloških preparata.....	17
3.2.2.	Reakcija citokrom oksidaze	17
3.2.3.	Bojanje po Nisslu	18
3.2.4.	Analiza i slikanje preparata.....	18
3.2.5.	Obrada i analiza slika	19
3.2.6.	Statistička obrada rezultata.....	20
4.	REZULTATI.....	21
4.1.	Veličina i organizacija bačvastog polja	21
4.1.1.	Veličina bačvastog polja	21
4.1.2.	Organizacija bačvastog polja	22
4.2.	Struktura i veličina bačvi	25
4.2.1.	Definiranost bačvi.....	25

4.2.2.	Prosječna površina bačvi	28
5.	RASPRAVA.....	30
5.1.	Učinak 5-hidroksitriptofana (5HTP).....	31
5.2.	Učinak tranilcipromina (TCP).....	32
6.	ZAKLJUČAK.....	34
7.	LITERATURA.....	35
8.	ŽIVOTOPIS.....	40

POPIS KRATICA:

5HIAA	5-hidroksiindoloctena kiselina
5HT	5-hidroksitriptamin
5HTP	5-hidroksitriptofan
5HTT	serotoninski transporter
AADC	dekarboksilaza aromatskih aminokiselina
Adcy1 ili AC1	adenilil ciklaza 1
BBB	krvno-moždana barijera
CNS	središnji živčani sustav
CO	citokrom oksidaza
dH ₂ O	deionizirana voda
DS	downov sindrom
EC	enterokromafine stanice
FGF8	fibroblasni faktor rasta 8
GD	gestacijski dan
GI	gastrointestinalni sustav
HPA os	os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda
KW analiza	Kruskal-Wallis analiza
LGE	lateralna ganglijska uzvisina
MAO	monoamin oksidaza
MAOA	monoamin oksidaza A
MAOB	monoamin oksidaza B
MGE	medijalna ganglijska uzvisina
NMDAR	receptor N-metil-D-aspartat
PND	postnatalni dan
PFA	paraformaldehid

PKA	protein kinaza A
S1	primarna somatosenzorička kora
TCA	talamokortikalni aksoni
TPH	triptofan hidroksilaza
TPH1	triptofan hidroksilaza 1
TPH2	triptofan hidroksilaza 2
VMAT	vezikularni transporter monoamina
VMAT1	vezikularni transporter monoamina 1
VMAT2	vezikularni transporter monoamina 2
VPM jezgra talamusa	ventralno posteriorno medijalna jezgra talamusa

1. UVOD

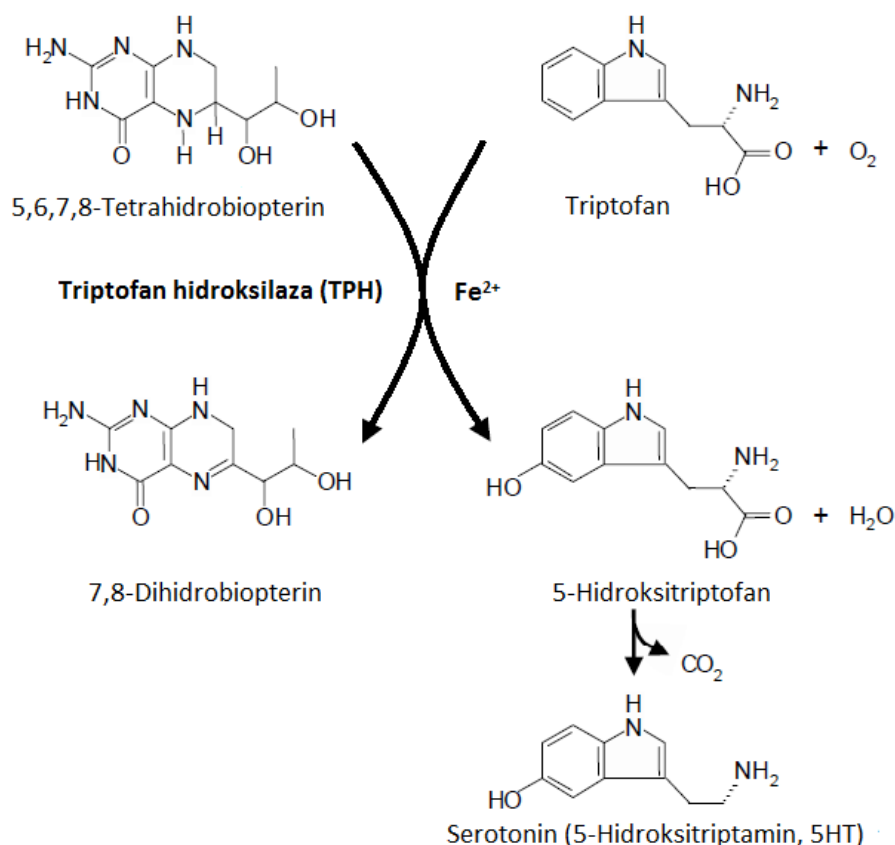
1.1. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biološki aktivan monoamin, a svrstava se u skupinu monoaminskih neurotransmitera zajedno s histaminom i katekolaminima u koje ubrajamo adrenalin, noradrenalin i dopamin. Izoliran je i okarakteriziran 1948. godine nakon dugotrajnih pokušaja da se definira periferni vazokonstriktor za koji se pretpostavljalo da je pohranjen u trombocitima (Mohammad-Zadeh i sur., 2008). Zastupljen je u svim organizmima koji imaju živčani sustav, pa je njegova uloga neurotransmitera izražena među beskralješnjacima i kralješnjacima (Murphy i sur., 1998). S obzirom da je u sisavaca prisutan na periferiji i u mozgu, nameće se kao važna molekula u regulaciji brojnih procesa. Na periferiji serotonin ima ulogu u regulaciji gastrointestinalnih i kardiovaskularnih funkcija, te aktivaciji trombocita. U mozgu regulira razvoj serotonergičnih neurona i ciljanih tkiva tijekom neurogeneze, dok kasnije u razvijenom mozgu preuzima ulogu neurotransmitera gdje je zadužen za regulaciju brojnih neuronskih procesa i plastičnost mozga (Blažević i sur., 2012; Blažević i sur., 2010). S obzirom na široki spektar uloga koje serotonin ima tijekom perinatalnog razvoja i u odrasloj dobi, pokazalo se da kontrolira brojna ponašanja koja su zajednička svim sisavcima. Tako je zadužen za regulaciju cirkadijanih ritmova, raspoloženja, spavanja, učenja, agresivnog ponašanja, kontrolira seksualno ponašanje, apetit, osjetljivost na bol i senzoričko-motoričku reaktivnost. Stoga ne čudi da se nameće i kao važan čimbenik u razvoju brojnih poremećaja poput depresije, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, autizma, anoreksije, shizofrenije te alkoholizma (Blažević i sur., 2012; Lucki, 1998).

1.1.1. Metabolizam serotonina

Sinteza serotonina iz prekursora triptofana jednaka je na periferiji i u mozgu, te se odvija u dva koraka. Prvi je korak hidrosilacija L-triptofana u 5-hidroksitriptofan (5HTP) pod katalitičkim djelovanjem enzima triptofan hidrosilaze (TPH) koji je ujedno i ograničavajući korak u sintezi serotonina. TPH koristi Fe^{2+} kao kofaktor, te O_2 i tetrahydrobiopterin kao kosubstrate. Razlikujemo dvije izoforme TPH, TPH1 koji nalazimo na

periferiji i TPH2 u mozgu. Drugi korak je dekarboksilacija 5-hidroksitriptofana pod katalitičkim djelovanjem enzima dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (AADC, eng. *aromatic L-amino acid Decarboxylase*) (Slika 1) (Walther i Bader, 2003). Razgradnju serotonina do 5-hidroksiindoloctene kiseline (5HIAA, eng. *5-hydroxyindoleacetic acid*) u procesu oksidativne deaminacije katalizira enzim monoamin oksidaza (MAO). MAO također dolazi u dvije izoforme, MAOA i MAOB. MAOA katalizira razgradnju serotonina i noradrenalina, MAOB feniletilamina, dok su u razgradnji dopamina i tiramina podjednako zastupljene obje izoforme. (Blažević i Hranilović, 2013). Produkt razgradnje serotonina izlučuje se primarno urinom (Mohammad-Zadeh i sur., 2008).



Slika 1. Sinteza serotonina (prilagođeno prema Walther i Bader, 2003)

1.1.2. Periferni i središnji serotoninski odjeljak

Održavanje homeostaze serotonina na periferiji i u središnjem živčanom sustavu (CNS, eng. *Central Nervous System*) odvojeno je krvno-moždanom barijerom (BBB, eng.

blood-brain barrier) koja onemogućava transport serotonina između dva odjeljka. Sinteza 5HT-a ista je u oba odjeljka, no razlikuju se izoforme enzima koji sudjeluju u reakcijama metabolizma u pojedinim serotoninskim odjeljcima (Blažević i Hranilović, 2013). Tako primjerice TPH koji je ključan u prvom koraku sinteze 5HT-a dolazi u dvije izoforme, od kojih je TPH1 zastupljen na periferiji a TPH2 u CNS-u (Blažević i sur., 2015). Nadalje, proteini koji kontroliraju homeostazu 5HT u oba odjeljka kodirani su istim genom, imaju identičnu primarnu strukturu i slijede istu kinetiku (Blažević i sur., 2010). U oba odjeljka serotonin svoje djelovanje ostvaruje pomoću serotoninskih receptora. Pronađeno je 15 različitih receptora unutar skupine kralješnjaka, a dijelimo ih u 7 obitelji, 5HT₁₋₇, gdje najveću obitelj čine 5HT₁ receptori (5HT_{1A}, B, D_α, D_β, E i F) (Murphy i sur., 1998). Iako BBB uvjetuje odvojenu regulaciju serotoninske homeostaze u dva odjeljka, tijekom perinatalnog i početnog dijela postnatalnog razvoja, kada BBB još nije formirana, serotonin može prelaziti iz perifernog u središnji odjeljak. Stoga svaka promjena u metabolizmu serotonina može utjecati na razvoj serotonergičnih neurona u mozgu (Blažević i sur., 2012).

1.1.2.1. Periferni serotoninski odjeljak

U perifernim tkivima nalazimo 90-95% ukupnog serotonina, a većina je pohranjena u enterokromafinim stanicama (EC, eng. *enterochromaffin cells*) i trombocitima (Mohammad-Zadeh i sur., 2008). Veći dio sinteze 5HT-a odvija se u enterokromafinim stanicama mukoze crijeva, dok se manji dio odvija u mliječnim žlijezdama, kostima i gušterači gdje ostvaruje autokrino i parakrino djelovanje (Blažević i sur., 2015). Serotonin se nakon sinteze pohranjuje u sekrecijske granule koje su smještene uz bazolateralnu membranu EC-a (Racke i sur., 1996), a oslobađanje 5HT-a u portalnu cirkulaciju posredovano je receptorima. Više od 99% ukupne količine serotonina koji se nalazi u krvi pohranjen je u trombocitima, gdje se njegova koncentracija regulira odnosom između periferne sinteze i razgradnje, te odnosom između akumulacije u trombocite i otpuštanja u krvotok. Za ovu su regulaciju ključni određeni proteini: serotoninski transporter (5HTT), monoamin oksidaza B (MAOB) i serotoninski receptor 5HT_{2A}. Aktivni transport iz krvi u trombocite vrši 5HTT koji je smješten u membrani trombocita. Razgradnja se vrši najvećim dijelom u plućima i jetri, pod katalitičkim djelovanjem mitohondrijskog enzima MAOB do 5HIAA koja se izlučuje urinom. 5HT_{2A} je

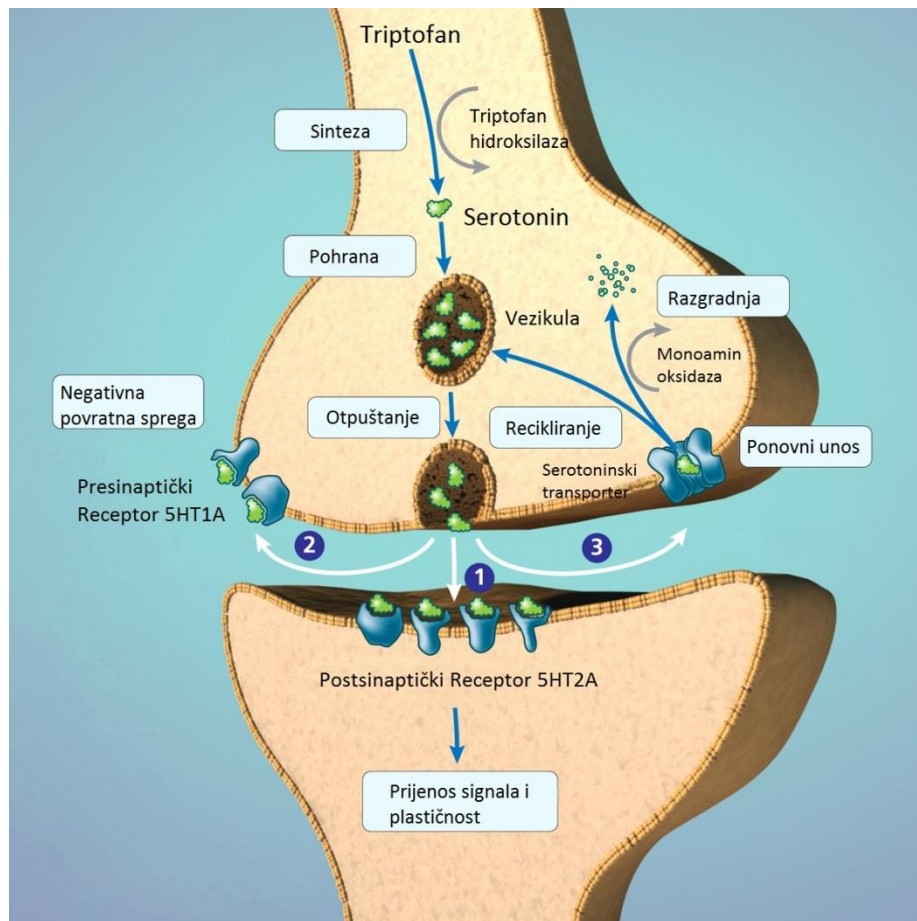
receptor vezan uz G-protein, koji ima ulogu u agregaciji trombocita, pri čemu se serotonin otpušta u cirkulaciju (Hranilović i sur., 2011; Hranilović i sur., 2009).

Serotonin na periferiji utječe na brojne organske sustave, počevši od kardiovaskularnog, gastrointestinalnog (GI), pulmonarnog, endokrinog do urogenitalnog sustava. Tako ima ulogu u regulaciji krvnog tlaka gdje vezanjem za određeni tip serotoninских receptora na stjenkama krvnih žila izaziva vazokonstrikciju ili vazodilataciju. Nadalje, poznata je njegova uloga u zgrušavanju krvi, gdje se otpušta iz aktiviranih trombocita u krvotok, te potiče agregaciju trombocita i vazokonstrikciju okolnih krvnih žila. Serotonin regulira razne aspekte srčane funkcije poput električne provodljivosti, zatvaranja zalistaka i remodeliranja ventrikula nakon srčanog udara. Utječe na kontrolu disanja djelovanjem na centre za disanje u moždanom deblu i pulmonarnu vaskulaturu. Djelovanje na endokrini sustav i metabolizam ostvaruje modulacijom osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA os, eng. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*), te centralnom kontrolom energetske ravnoteže (Berger i sur., 2009). Nadalje smatra se da ima ulogu u regulaciji mineralne gustoće kostiju i hematopoezi (Blažević i sur., 2015). Gastrointestinalni sustav, osim što je glavno mjesto sinteze perifernog serotoninа, pod velikim je utjecajem serotoninа. Kao neurotransmitter prenosi informaciju o okusu, kontrolira peristaltiku crijeva i izlučivanje iz žlijezda koje su vezane uz GI sustav. Nadalje u urogenitalnom i reproduktivnom sustavu ima ulogu u kontroli ejakulacije i mikturicije. Regulira kontrakcije maternice kojima se potiče prolazak spermija prema jajovodu. Serotonin se sintetizira u nerazvijenim mliječnim žlijezdama gdje autokrinim i parakrinim djelovanjem potiče njihov razvoj, dok u razvijenim mliječnim žlijezdama ima ulogu u oslobađanju mlijeka. Također smatra se da ima ulogu u poremećenoj vaskularnoj fiziologiji u trudnica, s obzirom da su koncentracije serotoninа u serumu trudnica povišene. Tako su koncentracije serotoninа u serumu žena koje su razvile preeklampsiju u trudnoći deseterostruko veće (Berger i sur., 2009).

1.1.2.2. Središnji serotoninски odjeljak

U mozgu sinteza serotoninа događa se u 5HT sintetizirajućim neuronima koji su smješteni u regiji moždanog debla, jezgrama rafe (eng. *raphe nuclei*), odakle neuroni pružaju svoje aksone u različite kortikalne i subkortikalne regije mozga (Hranilović i sur., 2011). Vezikularni transporter monoamina (VMAT, eng. *vesicular monoamine transporter*) je

zadužen za akumulaciju i pohranu serotonina u vezikule, pri čemu je VMAT2 zadužen za pohranu u CNS-u, a VMAT1 u trombocitima (Blažević i Hranilović, 2013). Depolarizacija presinaptičkog neurona uzrokuje otpuštanje serotonina u sinaptičku pukotinu. Serotonin se može vezati na postsinaptički receptor $5HT_{2A}$ kako bi se signal prenio dalje ili na presinaptički receptor $5HT_{1A}$, što djeluje kao mehanizam negativne povratne sprege kako bi se spriječilo daljnje otpuštanje serotonina u sinapsu. 5HTT u presinaptičkoj membrani uklanja višak serotonina iz sinaptičke pukotine, nakon čega se serotonin u presinaptičkom neuronu ponovno pohranjuje u vezikule (recikliranje) ili razgrađuje u citosolu neurona do 5HIAA (Slika 2) (Mohammad-Zadeh i sur., 2008; Blažević i Hranilović, 2013).

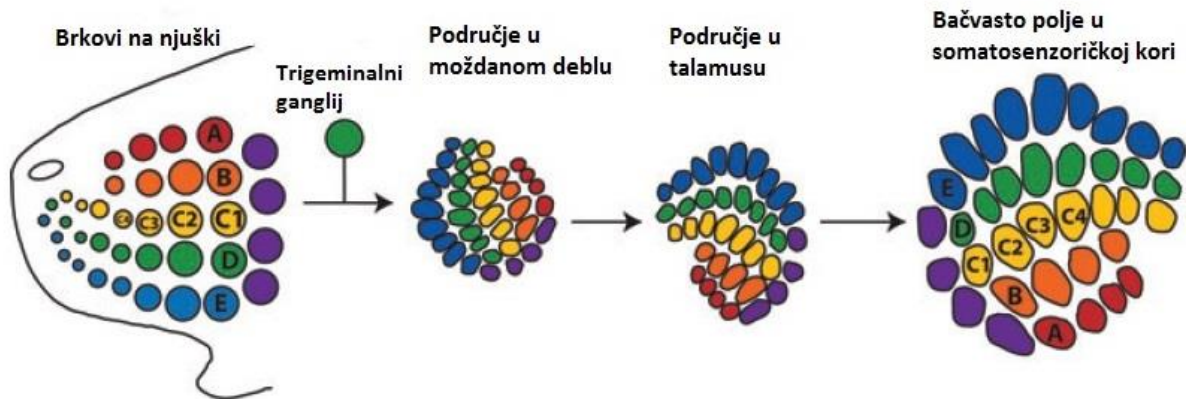


Slika 2. Metabolizam i sinaptička regulacija serotonina u središnjem živčanom sustavu (prilagođeno prema <http://blog.baucominstitute.com/wp-content/uploads/2015/02/serotonin-neurons-baucominstitute-stress-anxiety-depression-blog.jpg>)

Razvoj serotonergičnih neurona počinje rano, tako da se u ljudi do 15. tjedna gestacije može vidjeti tipična građa serotoninskih tijela neurona u jezgrama rafe. Koncentracija serotonina se neprestano povećava do druge godine, te nakon toga pada na razinu koja je normalna za odrasli mozak do pete godine života, što iznosi oko 50% najveće koncentracije koja je postignuta u ranom djetinjstvu. U glodavaca serotonin doseže najveće koncentracije do 21. postnatalnog dana (PND). Visoke koncentracije serotonina važne su jer u tom periodu služi kao razvojni signal te utječe na sazrijevanje ciljanih tkiva, uključujući grananje dendrita, sinaptogenezu, neurogenezu i organizaciju kortikalne ploče. S obzirom da dolazi do pretjeranog razvoja mozga, odnosno do razvoja prevelikog broja stanica i sinapsi koje u odraslom mozgu nisu potrebne, proces sazrijevanja bazira se na pročišćavanju učenjem koje je također kontrolirano serotoninom. U ovom se procesu uklanjaju sve suvišne stanice i sinapse koje se ne koriste, čime se objašnjava postepeni pad koncentracije serotonina nakon druge godine života. (Whitaker-Azmitia, 2005; Whitaker-Azmitia, 2001). U odraslom mozgu serotonin kao neurotransmiter regulira funkciju i plastičnost mozga (Hranilović i sur., 2011).

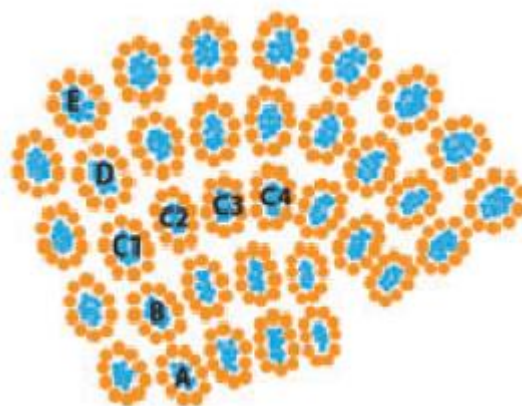
1.1.3. Bačvasto polje

Bačvasto polje (eng. *barrel field*) se zbog svoje jedinstvene anatomije posljednjih nekoliko desetljeća koristi kao modelni sustav za proučavanje razvoja kortikalne ploče, plastičnosti i senzoričko-motoričke integracije (Li i Crair, 2011). Bačvasto polje je struktura u IV sloju primarne somatosenzoričke kore (S1) glodavaca koja prima taktilnu informaciju iz brkova. Građeno je od pojedinačnih bačvi (eng. *barrels*) koje su topografski organizirane kao i brkovi, tako da svaka bačva prima informaciju od samo jednog specifičnog brčića (Slika 3). Taktilna informacija prenosi se trigeminalnim živcem do trigeminalne jezgre u moždanom deblu, koja je topografski organizirana u strukturu sličnu bačvastom polju (eng. *barrelles*). Neuroni dalje prenose informaciju u ventralnu-posteriorno-medijalnu (VPM, eng. *ventral posterior medial*) jezgru talamusa gdje su neuroni također topografski organizirani u strukturu koju nazivamo eng. *barreloids*, odakle se informacija prenosi do bačvastog polja u S1 (Petersen, 2007).



Slika 3. Shematski prikaz aferentnog puta od brkova do bačvastog polja i topografska organizacija pripadajućih struktura u moždanom deblu, talamusu i primarnoj somatosenzoričkoj kori (prilagođeno prema Li i Crair, 2011)

Bačvasto polje se formira u prvom postnatalnom tjednu sinaptičkim povezivanjem talamokortikalnih aksona (TCA, eng. *thalamocortical afferents*) i neurona IV sloja S1 (Li i Crair, 2011). Svaka je bačva građena od snopa aferentnih vlakana koji je okružen neuronima IV sloja S1, a bačve su međusobno odvojene prazninom (eng. *septa*) (Inan i Crair, 2007). Bačvasto polje organizirano je u 5 redova označenim slovima A-E, te u stupce, gdje redovi A i B imaju 4 stupca, red C 5 stupaca, a redovi D i E 7 stupaca. Prema tome svaka je bačva unutar bačvastog polja nomenklaturno definirana slovom i brojem (Slika 4) (Petersen, 2007).



Slika 4. Shematski prikaz građe pojedinačnih bačvi (Plavo su talamokortikalni aksoni (TCA), narančasto su neuroni IV sloja primarne somatosenzoričke kore (S1)) i organizacija bačvi unutar bačvastog polja (preuzeto iz Li i Crair, 2011)

Za pravilnu topografsku organizaciju bačvastog polja potrebna je kombinacija intrinzičnih i ekstrinzičnih informacija. Intrinzične informacije su zadužene za rani razvoj kortikalne ploče i usmjeravanje rasta TCA, dva procesa koji su u ranom razvoju neovisni jedan o drugom. Kada se TCA sinaptički povežu s ciljanim stanicama kortikalne ploče čime se omogućuje prijenos signala, na razvoj bačvastog polja utječu i vanjski faktori, odnosno aferentni signali (Li i Crair, 2011). Razvoj kortikalne ploče je primarno pod utjecajem fibroblasnog faktora rasta 8 (FGF8, eng. *fibroblast growth factor 8*) koji određuje smještaj i veličinu bačvastog polja (Petersen, 2007). Ekspresija transkripcijskih faktora na točno određenom mjestu i u točno određeno vrijeme u strukturama kroz koje prolaze TCA, ali i ekspresija biljega kortikalne ploče usmjerava TCA prema S1. Tako se primjerice Ngn2, Dlx 1 i Dlx 2 eksprimiraju u bazalnim ganglijima (Inan i Crair, 2007). Nadalje neke molekule služe kao kemoatraktanti, a druge kao kemorepelenti. Tako Netrin-1 koji se ekspirira u ventralnom dijelu prednjeg mozga služi kao atraktant, dok Slit koji se ekspirira u hipotalamusu služi kao repelent jer sprječava ulazak TCA u hipotalamus (Li i Crair, 2011). Nadalje, poznate su takozvane „koridor“ stanice u prednjem mozgu koje tangencijalno migriraju iz lateralne ganglijske uzvisine (LGE, eng. *lateral ganglionic eminence*) u medijalnu ganglijsku uzvisinu (MGE, eng. *medial ganglionic eminence*). Migracija neurona iz LGE u MGE koji eksprimiraju određene membranske molekule osigurava okoliš za olakšani prolazak TCA (Inan i Crair, 2007). Kad TCA dođu do kortikalne ploče najprije formiraju sinapse s neuronima sloja pod pločom (SP, eng. *subplate neurons*) koji se nalaze na granici bijele tvari i kortikalne ploče. Inicijalna komunikacija TCA i neurona SP nužna je za pravilno usmjeravanje TCA do IV sloja i pravilnu topografsku organizaciju bačvastog polja (Li i Crair, 2011). Također pokazalo se da je razvoj S1, prema tome i bačvastog polja ovisan o izvanstaničnim koncentracijama 5HT-a. Blokiranjem recikliranja serotonina iz sinaptičke pukotine ili njegove razgradnje, izazivaju se povišene izvanstanične koncentracije 5HT-a, što dovodi do poremećaja ekspresije transkripcijskih faktora, a time i do poremećaja u navođenju TCA prema kortikalnoj ploči (Miceli i sur., 2013). Aferentna aktivnost je također nužna za pravilan razvoj bačvastog polja. Struktura bačvastog polja je u potpunosti narušena kada se kod rođenja prereže infraorbitalna grana trigeminalnog živca. Nadalje, kada se ukloni jedan red brčića u prvom postnatalnom tjednu, pripadajući red u bačvastom polju nedostaje, a susjedni se redovi šire preuzimajući njegovo područje što je dobar pokazatelj plastičnosti polja (Inan i Crair, 2007).

1.2. Narušavanje serotoninske homeostaze

Serotonergični neuroni razvijaju se među prvima tijekom perinatalnog razvoja, a aksoni serotonergičnih neurona u razvoju otpuštaju serotonin i prije razvoja konvencionalnih sinapsi. Nadalje, mnogi neuroni pokazuju djelomični serotoninski fenotip jer mogu pohranjivati i otpuštati serotonin, ali ne i sintetizirati ga. Također, ekspresija mnogih receptora 5HT je vrlo dinamična već tijekom ranog embrionalnog razvoja (Gaspar i sur., 2003). Serotonin kao razvojni modulator utječe na proliferaciju, migraciju i diferencijaciju stanica, navođenje aksona, sinaptogenezu i funkcionalnost sinaptičke veze. S obzirom da tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razvoja BBB još nije razvijena, serotonin može nesmetano prelaziti iz perifernog u središnji odjeljak i utjecati na razvoj serotoninskog sustava. Kako bi se osigurala funkcionalnost serotonina tijekom razvoja, nužno je da je u različitim regijama mozga uvijek prisutna optimalna koncentracija 5HT-a. Serotoninska homeostaza postiže se kontrolom sinteze i razgradnje, a svako narušavanje periferne ili središnje homeostaze dovodi do promjena u koncentracijama 5HT-a i nepravilnog razvoja serotoninskog sustava (Hranilović i Blažević, 2012). Homeostazu može narušiti mutacija bilo koje komponente u metabolizmu serotonina ili sinaptičkoj aktivnosti (Gaspar i sur., 2003). Nadalje, dokazano je da koncentraciju serotonina tijekom razvoja mogu narušiti virusne infekcije, pothranjenost, promjenjena razina socijalnog kontakta (pozitivna ili negativna), hipoksija, stres, droga, alkohol, nikotin i neka terapijska sredstva (Whitaker-Azmitia, 2011). Narušavanje serotoninske sinaptičke aktivnosti narušava funkcionalnost neuronskih mreža što se dugotrajno očituje cijelim spektrom bolesti poput autizma, shizofrenije, Downovog sindroma, depresije, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, anoreksije i poremećaja pažnje (Lesch i Waider, 2012; Lucki, 1998).

1.2.1. Klinička istraživanja

Autizam je razvojni poremećaj koji utječe na različite funkcije mozga. Četiri je puta češći u dječaka nego u djevojčica, i najčešće se ne dijagnosticira prije druge godine života kada do izražaja dolazi nedostatak komunikacijskih vještina. Karakteriziraju ga ponavljajući pokreti tijela, stereotipno ponašanje, nedostatak socijalne interakcije, nerazvijena maštovitost, slaba emocionalna povezanost s drugim ljudima i preosjetljivost na taktilne i auditorne

podražaje (Whitaker-Azmitia, 2011). Fiziološki parametar koji je najuočljiviji je povišena razina serotonina u krvi, odnosno hiperserotoninemija. Hiperserotoninemiju karakterizira povišenje koncentracije 5HT-a za 50-70 %, a javlja se u 30% oboljelih od autizma (Whitaker-Azmitia, 2005). Prva teorija o mehanizmu razvoja hiperserotoninemije govori o poremećenoj serotoninskoj regulaciji na periferiji koja dovodi do povišenja koncentracija serotonina u krvi (Hranilović i Blažević, 2012). Uzimajući u obzir slobodan prolazak 5HT-a u mozak prije formiranja BBB, smatra se da povišene razine serotonina na periferiji tijekom razvoja dovode do inhibicije serotoninских neurona mehanizmom negativne povratne sprege (Whitaker-Azmitia, 2005), što na kraju dovodi do poremećaja u razvoju ciljanih tkiva koje kontrolira serotonin. U prilog tome ide činjenica da je sinteza serotonina u kori i talamusu autistične djece smanjena, kao i volumen hipokampusa. Također, uočena je hipersenzitivnost autoreceptora 5HT_{1D}. Nadalje, ljudi oboljeli od autizma reagiraju na terapiju lijekovima koji povećavaju razine serotonina u mozgu. Isto tako, uočena je povećana stopa autizma kod djece koja su perinatalno bila izložena tvarima poput kokaina i alkohola koje utječu na metabolizam serotonina (Whitaker-Azmitia, 2011). S druge strane, postoje teorije o narušavanju serotoninске homeostaze u oba odjeljka istovremeno, pri čemu povišene koncentracije 5HT-a u središnjem dijelu dovode do poremećaja u razvoju mozga, dok se na periferiji poremećaj homeostaze očituje hiperserotoninemijom (Janušonis, 2005).

Downov sindrom (DS) je poznat kao trisomija 21. kromosoma, a poznata je i molekularna podloga sindroma u kojoj se ističu serotonin i protein S100 β . Uočena je ranija maksimalna ekspresija receptora 5HT_{1A} tijekom perinatalnog razvoja mozga u ljudi koji boluju od DS-a, da bi do rođenja ekspresija receptora pala ispod normalne razine. Nadalje, u odraslih je uočena promijenjena serotoninска inervacija pojedinih regija mozga. Tako je u frontalnoj kori i vidnoj kori serotoninска inervacija pojačana, dok je u talamusu, malom mozgu, temporalnoj kori i kaudatnoj jezgri smanjena. Protein S100 β je kodiran genom koji se nalazi u obligatnoj regiji za DS na kromosomu 21 (Whitaker-Azmitia, 2011). Produciraju ga glija stanice, astrociti, a oslobađa se iz stanica stimulacijom receptora 5HT_{1A}. Tijekom razvoja djeluje kao faktor rasta serotonergičnih neurona, ima ulogu u sinaptogenezi, grananju dendrita, te prekomjernom razvoju neurona i njihovoj apoptozi, dok u razvijenom mozgu ima ulogu u stabilizaciji citoskeleta i sinaptičkoj plastičnosti (Shapiro i sur., 2004). Koncentracije S100 β su povećane u ljudi koji boluju od DS-a, a pokazalo se da je razina S100 β direktno povezana sa stupnjem mentalne retardacije (Whitaker-Azmitia, 2011).

Smanjena koncentracija ili funkcionalnost monoamina, serotonina i noradrenalina, smatra se uzrokom depresije. Antidepresivi povećavaju koncentraciju ili funkciju monoamina inhibicijom enzima MAOA koji vrši razgradnju, ili inhibicijom njegovog recikliranja u presinaptički neuron, odnosno djelovanjem na 5HTT (Green, 2008). Jedan od češće spominjanih uzroka serotoninske disfunkcionalnosti je polimorfizam promotora gena za 5HTT (5HTTLPR), gdje razlikujemo kratki (s, eng. *short*) i dugi alel (l, eng. *long*). Alel s, koji ima slabiju transkripcijsku učinkovitost od alela l, povezuje se s narušavanjem serotoninske homeostaze i razvojem depresije (Caspi i sur., 2003). Uz 5HTT i MAOA, i drugi se proteini poput TPH i serotoninskih receptora razmatraju kao podloga razvoja depresije, ali i drugih poremećaja. Tako se primjerice određeni polimorfizmi TPH mogu povezati sa suicidalnim ponašanjem, depresijom (Nakamura i sur., 2006), te alkoholizmom. Također uočena je moguća povezanost različitih serotoninskih receptora s depresijom, halucinacijama, anksioznošću i različitim ovisnostima (VanderWeele i sur., 2000).

1.2.2. Istraživanja na animalnim modelima

1.2.2.1. Modeli za bihevioralne poremećaje

Animalni model autizma, odnosno „hiperserotoninemični model autizma“ razvijen je izlaganjem štakora neselektivnom serotoninskom agonistu, 5-metoksitriptaminu, od gestacijskog dana (GD) 12 do PND 20. Tretirane životinje imaju manju koncentraciju serotonina u kori i hipokampusu. Nadalje, pokazuju promjene u senzoričkom odgovoru, pa je tako kod životinja između PND 5 i 9 izraženo drhtanje kad se rukuje njima. Također izražena je hipersenzitivnost na zvuk što se očituje smrzavanjem u otvorenom prostoru na auditorne podražaje. Tretirane su životinje pokazale manju anksioznost u testu odvojenosti od majki u odnosu na kontrolnu grupu, što je mjereno razinom glasanja kojim dozivaju majku. Sve se navedene morfološke i bihevioralne karakteristike mogu povezati s karakteristikama izraženim kod ljudi oboljelih od autizma (Whitaker-Azmitia, 2001). Izražena impulzivnost, agresivnost i stereotipno ponašanje izraženi su i kod životinja koje su perinatalno izložene inhibitorima enzima MAO (Whitaker-Azmitia, 2005). Animalni model DS-a pokazuje neke morfološke paralele s DS-om u ljudi. Izražen je pretjerani razvoj i rani gubitak neurona u hipokampusu, problemi s učenjem i pamćenjem, a smanjena je i osjetljivost receptora 5HT_{1A}

(Whitaker-Azmitia, 2001). Sva istraživanja upućuju na važnu ulogu povišenih razina 5HT-a u abnormalnom razvoju mozga (Miceli i sur., 2013).

1.2.2.2. Modeli za razvoj somatosenzoričke kore

Od identifikacije prve spontane homozigotne mutacije *brl* (eng. *barrelless*), koja inhibira ekspresiju adenilil ciklase 1 (*Adcy1* ili *AC1*, eng. *adenylil cyclase 1*) u miša, ispitan je utjecaj brojnih faktora u regulaciji razvoja somatosenzoričke kore (Li i Crair, 2011).

AC1 je membranski protein prisutan u presinaptičkom i postsinaptičkom neuronu, a ima ulogu u regulaciji molekularnih signala nužnih za pravilan razvoj bačvastog polja. Homozigoti za mutaciju *brl* nemaju pravilnu anatomsku organizaciju bačvi jer je poremećena prostorna segregacija TCA u strukturu bačvi što dovodi i do abnormalnog odgovora stanica kore na podražaj (Li i Crair, 2011; Inan i Crair, 2007). Nadalje, KO (eng. *knockout*) miševi za postsinaptički receptor NMDA (NMDAR, eng. *N-methyl-D-aspartate receptor*), koji regulira aktivnost *AC1*, pokazuju nedostatak agregacije stanica IV sloja kore u strukturu bačvi, dok je agregacija TCA normalna. Isti učinak na građu bačvi u miševa ima i *PKARIIβ* KO kod kojeg je regulatorna podjedinica *IIβ* protein kinaze A (*PKA*, eng. *protein kinase A*) nefunkcionalna. *PKA* je signalna molekula koju aktivira *AC1* u signalnom putu NMDAR-*AC1*-*PKA* (Li i Crair, 2011). U istraživanjima serotoninske regulacije razvoja bačvastog polja najviše se radilo na proteinima koji reguliraju serotoninsku sinaptičku aktivnost: *5HTT*, *VMAT2*, *5HT_{1B}*, *MAOA*. Bačvasto polje se ne razvija kod jednostrukih i dvostrukih *5HTT* i *MAOA* KO. Ako se uz mutacije *5HTT* i *MAOA* napravi i *5HT_{1B}* KO, razvoj bačvastog polja je normalan što upućuje na ulogu divljeg tipa receptora u stvaranju abnormalnog fenotipa u *5HTT* i *MAOA* KO miševima. S druge strane, pojedinačne mutacije gena *5HT_{1B}* i *VMAT2* nemaju utjecaja na razvoj bačvastog polja (Inan i Crair, 2007), dok farmakološka hiperaktivacija *5HT_{1B}* vodi k razvoju abnormalnog fenotipa bačvastog polja. Sva istraživanja dovode do zaključka da povišene koncentracije serotonina u sinaptičkoj pukotini, djelovanjem na receptor *5HT_{1B}* na TCA, uzrokuju abnormalni fenotip bačvastog polja (Li i Crair, 2011).

1.2.3. Model perinatalno poremećenog metabolizma serotonina

U Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu razvijen je model štakora s perinatalno poremećenim metabolizmom serotonina. Životinje su tretirane supkutano serotoninskim prekursorom 5-hidroksitriptofanom (5HTP) ili neselektivnim inhibitorom MAO tranilciprominom (TCP), u razdoblju od GD 12 do PND 21. Svrha ovog animalnog modela je ispitivanje učinka perinatalno induciranih visokih razina serotonina na perifernu i središnju homeostazu serotonina u odraslih životinja. Oba su tretmana kod mladunaca izazvala hiperserotoninemiju, dok je samo TCP doveo i do znatnijeg povećanja razine 5HT-a u mozgu. U odrasloj dobi, u štakora tretiranih TCP-om razina serotonina je drastično smanjena u regiji jezgara rafe (u kojoj su smještena tijela 5HT-neurona) i frontalnoj kori (u kojoj se nalaze aksonski završetci 5HT-neurona), dok je u štakora tretiranih 5HTP-om blago smanjenje razine serotonina uočeno samo u frontalnoj kori (Hranilović i sur., 2011). U navedenim regijama mozga, u obje eksperimentalne grupe uočen je značajni porast ekspresije gena za MAO A i B, a u grupi tretiranoj TCP-om i gena za 5HTT i VMAT (Blažević i Hranilović, 2013). U odraslih životinja iz obje tretirane skupine uočeno je smanjeno anksiozno ponašanje, proporcionalno smanjenju razine serotonina u mozgu (Blažević i sur., 2012). Pretpostavlja se da perinatalna izloženost povišenim koncentracijama 5HT dovodi do trajnih promjena u ekspresiji 5HT-regulirajućih gena koja pak stoji u podlozi opisanih neurokemijskih i bihevioralnih promjena (Blažević i Hranilović, 2013).

2. CILJ

Ovaj diplomski rad dio je šireg istraživanja utjecaja perinatalno poremećene razine serotonina na perifernu i središnju serotoninsku homeostazu. Cilj nam je bio ispitati uzrokuje li povišena koncentracija serotonina tijekom perinatalnog razvoja (dugo)trajne posljedice u građi bačvastog polja primarne somatosenzoričke kore štakora, te postoji li razlika u posljedicama koje izaziva primjena prekursora serotonina 5-hidroksitriptofana (5HTP), koji narušava homeostazu 5HT samo u perifernom odjeljku, od primjene inhibitora razgradnje serotonina tranilcipromina (TCP), koji narušava homeostazu 5HT u perifernom i središnjem odjeljku.

U tu su svrhu životinje prethodno tretirane 5HTP-om (25 mg/kg), TCP-om (2 mg/kg) ili fiziološkom otopinom od 12. gestacijskog do 21. postnatalnog dana, te im je nakon žrtvovanja 22. ili 70. dana, izdvojen i pohranjen mozak. U ovom radu načinili smo tangencijalne prereze kore, histokemijski ih obradili bojanjem po Nisslu i tretmanom citokrom oksidazom te kvalitativno i kvantitativno usporedili bačvasta polja između skupina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

U istraživanju smo koristili mozgove Wistar štakora starosti 22 i 70 dana. Prerezi mozga po dva mladunca iz svake skupine bojani su po Nisslu. Iz skupine odraslih štakora ukupno je izdvojeno 12 mozgova, od čega tri iz grupe tretirane fiziološkom otopinom, pet iz grupe tretirane TCP-om, te četiri iz grupe tretirane 5HTP-om. Iz svake je grupe jedan mozak korišten za histološku metodu bojanja po Nisslu, dok je ostatak uzoraka korišten za histokemijsko bojanje citokrom oksidazom (CO, eng. *cytochrome oxidase*).

3.1.2. Kemikalije

- Cresyl violet
- Deionizirana H₂O
- Etanol (75%, 96%)
- Ksilen
- Agaroza (Oxoid microbiology, Velika Britanija)
- Histomount (National Diagnostics, SAD)
- Natrijev hidrogen fosfat anhidrat, Na₂HPO₄ (Kemika, Republika Hrvatska)
- Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat, NaH₂PO₄ × H₂O (Kemika, Republika Hrvatska)
- 3,3-diaminobenzidin, DAB (Sigma-Aldrich, SAD)
- Citokrom C oksidaza (Sigma-Aldrich, SAD)
- Saharoza (Claro-Prom, Republika Hrvatska)

- Katalaza (Sigma-Aldrich, SAD)
- Fosfatni pufer (PBS)

3.1.3. Pribor i pomagala

- mikropipete (Eppendorf Research, Eppendorf, Njemačka)
- 15 mL Falcon epruvete (BD Biosciences, SAD)
- predmetna stakalca (Superfrost Plus, Menzel-Glaser, Njemačka)
- pokrovna stakalca (Menzel-Glaser, Njemačka)
- kadica za ispiranje
- kadica za inkubaciju
- filter papir
- skalpel
- pap pen (blokator tekućine)
- mikroskop (Nixon Alphaphot-2 YS2, Japan; Nikon Eclipse E600, Japan)
- vibratom 1500 (Vibromix 204 EV, Tehnica, Slovenija)
- fotoaparat (Zeiss AxioCam ERc 5s, Njemačka)
- vaga (Precisa 1212 MCS, Švicarska)
- hladnjak (+4 °C)
- zamrzivač (-20 °C)

3.2. Metode

3.2.1. Izrada histoloških preparata

Tkiva izvađena iz krioprezervacijske otopine (30%-tna otopina saharoze) isprali smo dva puta u PBS-u. Izolirali smo somatosenzoričku koru na način da smo skalpelom ogulili parijetalni režanj, a odvojeno tkivo izrezali na veličinu 5×10 mm te uklopili u 3%-tni agar. Tkivo smo u tom obliku rezali na vibratomu sve dok nismo izrezali cijelu koru, što je uočeno pojavom bijele tvari na rezovima. Po životinji smo dobili 25-39 tangencijalnih rezova debljine 60 μm . Rezove smo navlačili na Superfrost predmetna stakalca koja zbog posebnog površinskog sloja silicija omogućuju prianjanje rezove na površinu bez primjene dodatnih ljepila. Po stakalcu je bilo 6-12 rezova ovisno o veličini rezova.

3.2.2. Reakcija citokrom oksidaze

Rezovi su se na stakalcima sušili nekoliko minuta, nakon čega smo ih stavili u kadicu za inkubaciju čije je dno prekriveno filter papirom natopljenim destiliranom vodom, kako bi se osigurala vlaga u kadici za vrijeme inkubacije. Prije nakapavanja inkubacijske otopine, rezove smo zaokružili „pap penom“. „Pap pen“ je flomaster kojim se iscrtava hidrofobni oblik na stakalcu kako bi se spriječilo otjecanje inkubacijske tekućine sa stakalca. Inkubacijsku otopinu pripremili smo prema protokolu za citokrom oksidazu:

1. Priprema 0.2 M PBS-a, pH 7.6, 100 mL:
 - 87 mL 0.2 M Na_2HPO_4 (141.96)
 - 13 mL 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (137.99)
2. Priprema inkubacijske otopine od 10 mL (prema redoslijedu navedenom niže):
 - 750 mg saharoze otopi se u 7.5 mL dH_2O
 - 2.5 mL 0.2 M PBS-a
 - 5 mg DAB-a (2 tablete)
 - 10 mg citokrom C oksidaze
 - 20 μg katalaze (nekoliko kristala)

Pripremljenu otopinu nakapali smo na stakalca u područje zaokruženo „pap penom“, nakon čega smo preparate stavili na inkubaciju na 2 sata pri temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije rezove smo isprali u PBS-u 3x po 10 minuta i dH₂O na 20 sekundi. Preparate smo ostavili da se suše preko noći na zraku. Za izradu trajnih preparata uzorke smo najprije uronili u ksilen na 1-2 minute kako bi se rezovi posvijetlili, nakon čega smo primijenili sredstvo za pokrivanje Histomount i pokrili pokrovnim stakalcem.

3.2.3. Bojanje po Nisslu

Za metodu bojanja po Nisslu rezove smo nakon navlačenja na predmetna stakalca Superfrost ostavili da se suše 24 sata na zraku. Nakon sušenja, stakalca smo stavili u kadicu ispunjenu bojom *Cresyl violet* na 10 minuta. *Cresyl violet* je bazična histološka boja koja se koristi za prikazivanje citoarhitekture mozga. Dolazi do bojanja tijela neurona, odnosno RNA ribosoma hrapavog endoplazmatskog retikuluma koja poprima tamno plavu do ljubičastu boju. Nakon bojanja preparate smo posvijetlili (ispiranje suviška boje) kako bi se dobila najbolja razlučivost tkiva. Najprije smo ispirali 2x u dH₂O, nakon čega je uslijedilo ispiranje u 75%-tnom etanolu, te 2x u 96%-tnom etanolu. Vrijeme svakog ispiranja variralo je od 1-5 minuta što je ovisilo o intenzitetu obojenja. Na kraju smo uronili rezove u ksilen 2x po 1-2 minute, te trajno pokrili preparate Histomountom i pokrovnim stakalcem.

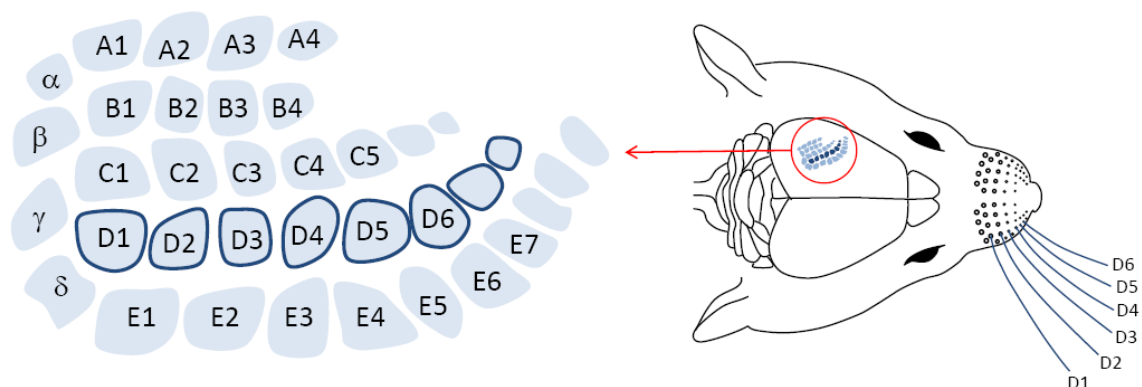
3.2.4. Analiza i slikanje preparata

Preparate CO smo sustavno pregledavali svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 4x dok nismo identificirali područje bačvastog polja. Najbolje preparate smo slikali fotoaparatom priključenim na mikroskop pod povećanjem 2x. Prije slikanja, vidno polje smo prilagođavali u programu Zeiss Zen 2 podešavanjem kontrasta i svjetline, te na mikroskopu kontrolom razine svjetlosti. Odredili smo skalu koja je kod povećanja 2x iznosila 500 µm. Slike smo dalje koristili za kvantitativnu analizu. Preparate smo kvalitativno analizirali pregledavanjem pod svjetlosnim mikroskopom. Parametri koje smo koristili u analizi su: definiranost ruba bačve i organizacija bačve. Rub bačve je jasno definiran kada se u prazninama ne nalazi, ili se nalazi malen broj obojenih stanica, dok je većina stanica u bačvi organizirana u nakupine tako da čine veliki kontrast prema praznini. Organizacija bačvi je

definirana prostornim razmještajem struktura u bačvi. Metodom bojanja po Nisslu mogu se razlučiti ljubičasto obojene kortikalne stanice zbijene u prsten uz rub bačve, dok se u središtu bačve nalaze svijetliji (plavo obojani) talamokortikalni aksoni.

3.2.5. Obrada i analiza slika

Za kvantitativnu analizu, slike smo dalje obrađivali programima IrfanView i Image J. U programu IrfanView dodatno smo podešavali kontrast, zasićenost i gamma korekciju kako bi se što bolje vizualiziralo bačvastog polja za daljnju obradu. Vrijednosti kontrasta kretale su se u rasponu od -30 do +30, zasićenosti u rasponu od -255 do -150, dok su se vrijednosti gamma korekcije kretale u rasponu od 0.90 do 1.50. Svaka je slika zahtijevala individualan pristup i obradu tako da je bilo i odstupanja od navedenih raspona. Nakon obrade, slike smo analizirali u programu Image J. Najprije smo izmjerili duljinu prethodno postavljene skale od 500 μm , čime smo dobili mjerljivu udaljenost u pikselima koja iznosi 0.466 piksela/ μm . Navedenu smo skalu primijenili na svaku sliku koju smo analizirali. Isertavali smo svaku pojedinačnu bačvu unutar bačvastog polja i mjerili njenu površinu. Bačve smo označavali na način da smo zaokružili tamno područje gdje je došlo do reakcije s CO, što ujedno označava područje bogato mitohondrijima, odnosno područje jake moždane aktivnosti u S1. Po svakoj životinji analizirali smo od 4 do 7 rezova, a broj analiziranih rezova ovisio je o tome koliko je područje bačvastog polja zahvaćeno, odnosno o tome koliko pojedinačnih bačvi možemo razlikovati na svakom rezu. Nastojali smo dobiti maksimalan broj bačvi u polju unutar svake grupe kako bi usporedba grupa bila što vjernija (Slika 5). S obzirom da smo analizirali nekoliko rezova svake životinje, dobili smo nekoliko podataka o površini za svaku bačvu iste životinje, pa smo za daljnju statističku obradu podataka koristili srednju vrijednost površine svake bačve.



Slika 5. Shematski prikaz organizacije bačvi unutar bačvastog polja

(preuzeto iz <http://img.medicalxpress.com/newman/gfx/news/hires/2013/optogeneticr.png>)

3.2.6. Statistička obrada rezultata

Pri statističkoj obradi podataka koristili smo program GraphPadPrism 5. Pravilno distribuirane parametre usporedili smo jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s naknadnim Dunnettovim testom. Nepravilno distribuirane parametre analizirali smo neparametrijskom Kruskal-Wallis (KW) analizom s naknadnim Dunnovim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (M, engl. *mean*) \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM, engl. *standard error of mean*). Razina značajnosti je postavljena na 0.05.

4. REZULTATI

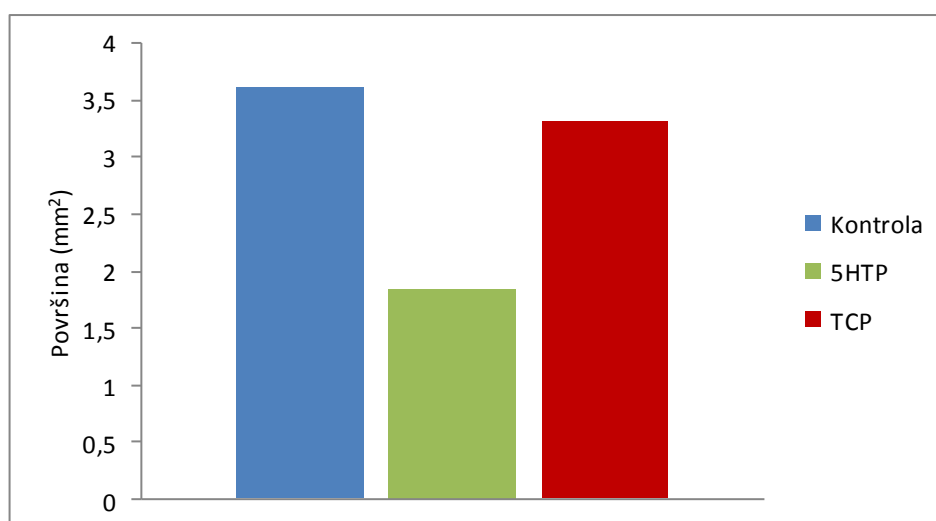
4.1. Veličina i organizacija bačvastog polja

Tangencijalni rezovi somatosenzoričke kore štakora, bojani po Nisslu i tretirani citokrom oksidazom, korišteni su za usporedbu veličine i organizacije bačvastog polja, te usporedbu veličine i strukture bačvi između skupina.

4.1.1. Veličina bačvastog polja

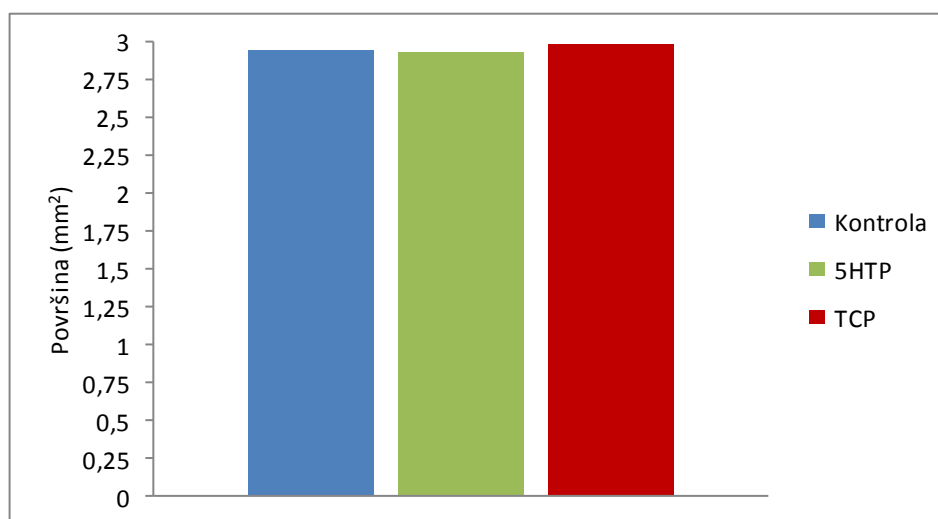
Veličinu bačvastog polja odredili smo kao ukupnu površinu svih bačvi i septa. Iz obojanih prereza somatosenzoričke kore mladih i odraslih štakora odabrali smo po jedan analogni rez iz svake tretirane skupine, koji prikazuje istu razinu bačvastog polja.

S obzirom da na svim rezovima koje smo uspoređivali nije prikazano cijelo bačvasto polje, u mladunaca je u izračun površine uključeno prvih 5 stupaca redova A-E, dok su stupci 6 i 7 isključeni iz izračuna. Površina bačvastog polja bila je oko dva puta manja u skupini tretiranoj 5HTP-om ($1,84 \text{ mm}^2$), u odnosu na kontrolnu skupinu ($3,62 \text{ mm}^2$) i skupinu tretiranu TCP-om ($3,32 \text{ mm}^2$) (Slika 6).



Slika 6. Ukupna površina bačvastog polja mladunca tretiranog fiziološkom otopinom (Kontrola), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP).

U odraslih štakora su u izračun površine uključena prva 4 stupca redova A-E, dok su stupci 5, 6 i 7 isključeni iz izračuna. U odrasloj dobi, površina polja skupine tretirane 5HTP-om ($2,93 \text{ mm}^2$) više se nije se razlikovala od površine polja kontrolne skupine ($2,95 \text{ mm}^2$) i skupine tretirane TCP-om ($2,99 \text{ mm}^2$) (Slika 7).



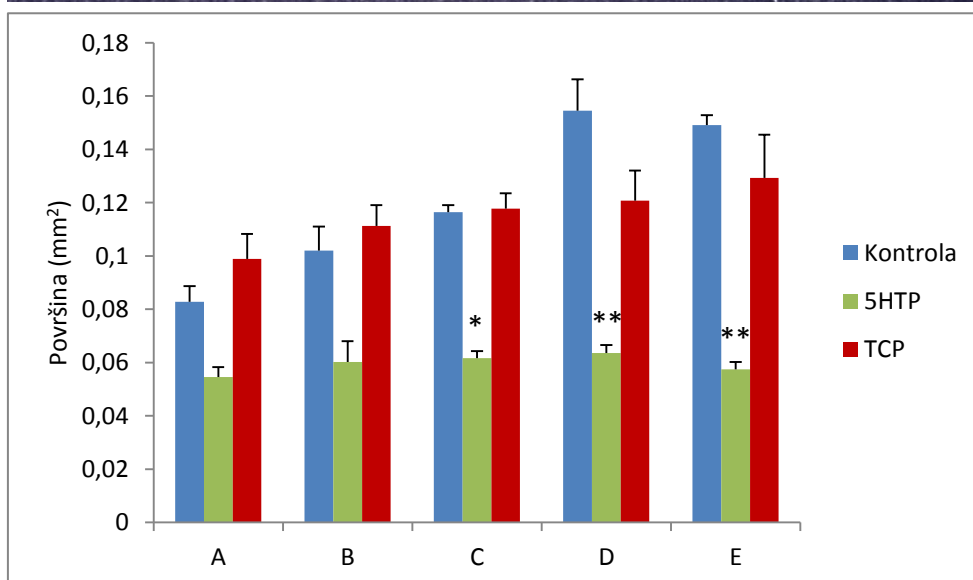
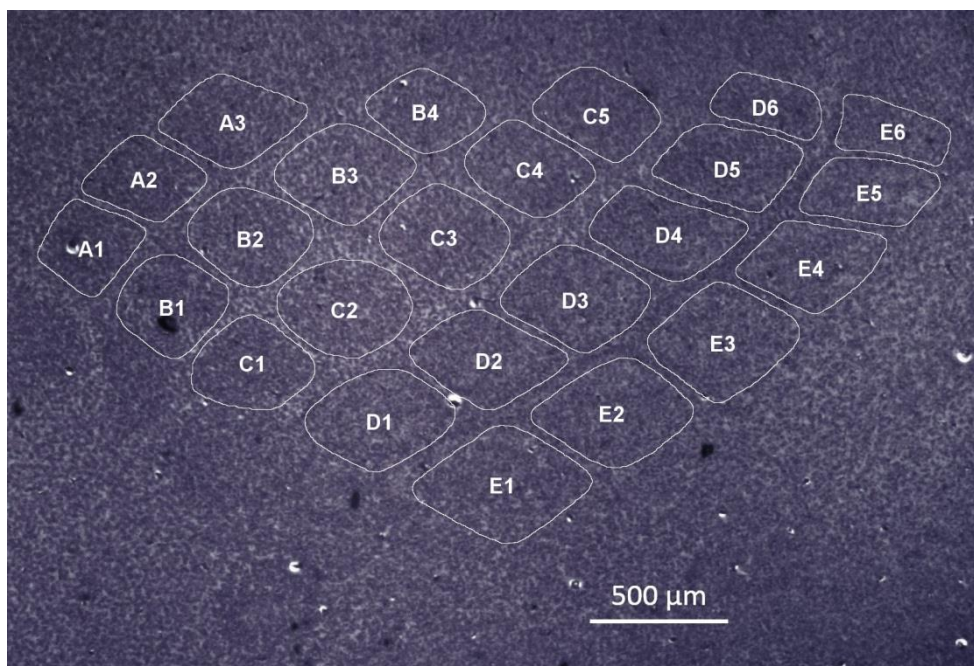
Slika 7. Ukupna površina bačvastog polja odraslog štakora tretiranog fiziološkom otopinom (Kontrola), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP).

4.1.2. Organizacija bačvastog polja

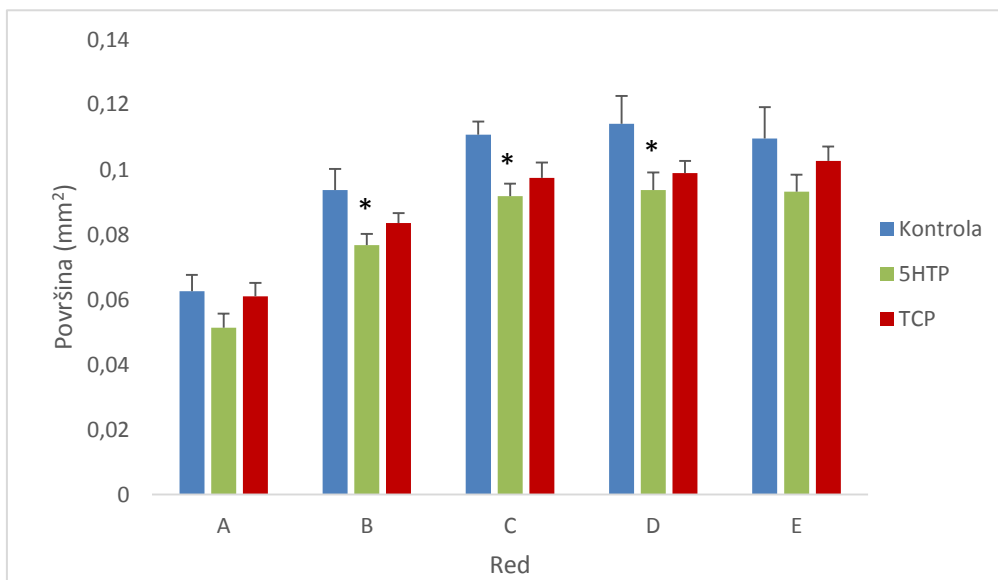
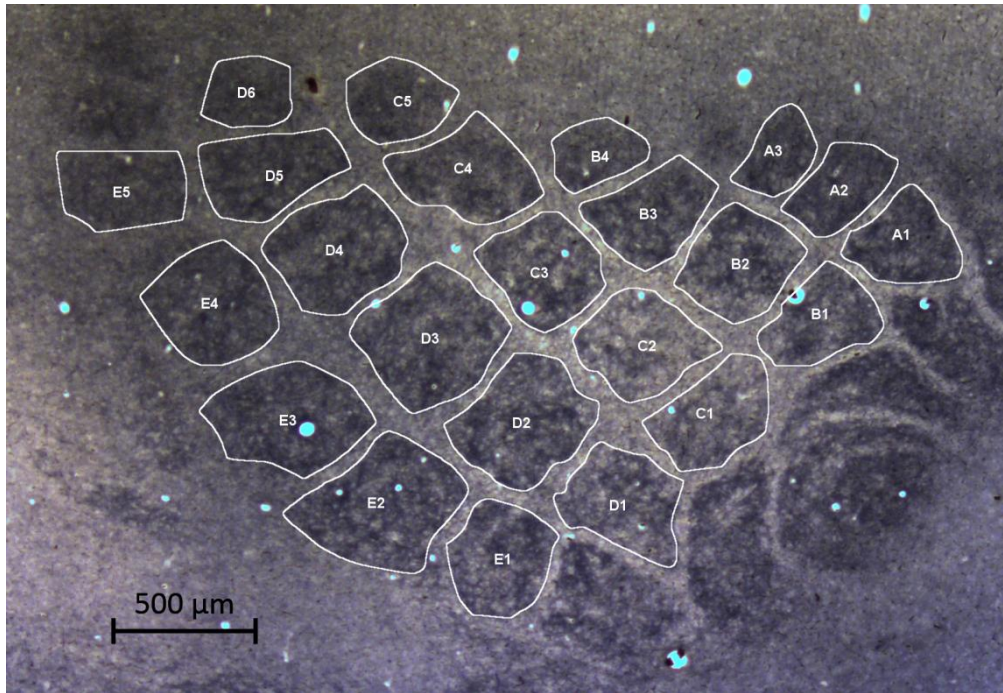
Organizaciju bačvastog polja provjerili smo usporedbom prosječnih površina bačvi u pojedinim redovima bačvastog polja.

U mladunaca je razlika u organizaciji bačvastog polja između eksperimentalnih i kontrolne skupine bila uočljiva (Slika 8). Prosječna površina bačvi postepeno se povećavala od reda A-E u kontrolnoj skupini ($KW=17.6$, $P<0.01$), pri čemu su bačve u redovima D i E značajno veće od bačvi u redu A. Povećanje površine bačvi po redovima izostaje u skupinama tretiranim 5HTP-om ($KW=3.16$, $P=0.532$) ili TCP-om ($KW=4.02$, $P=0.403$).

Na slici 8. je također uočljivo da je prosječna površina bačvi u redovima C, D i E mladunaca iz skupine tretirane 5HTP-om značajno manja od površine bačvi u odgovarajućim redovima mladunaca iz kontrolne skupine.



Slika 8. Prosječna površina bačvi u pojedinom redu A-E bačvastog polja mladunca tretiranog fiziološkom otopinom (Kontrola), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) (* $P < 0,05$, ** $< 0,01$; vs. odgovarajući red u kontrolnoj skupini, Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallisovog testa).



Slika 9. Prosječna površina bačvi u pojedinom redu A-E bačvastog polja odraslog štakora tretiranog fiziološkom otopinom (Kontrola), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) (* $P < 0.05$; vs. odgovarajući red u kontrolnoj skupini, Dunnettov test).

Organizacija bačvastih polja odraslih štakora iz sve tri tretirane skupine bila je podjednaka (Slika 9). U kontrolnoj skupini, prosječna površina bačvi postepeno se povećavala od reda A do reda E ($P < 0.0001$), pri čemu su bačve u redovima C, D i E bile značajno veće od bačvi u redu A. Prosječna površina bačvi postepeno se povećavala i u skupini tretiranoj 5HTP-om ($P < 0.01$), pri čemu su bačve u redovima C, D i E bile značajno veće od bačvi u redu A, i bačve u redu D znatno veće od bačvi u redu B. Povećanje prosječne površine kroz redove vidljivo je i u skupini tretiranoj TCP-om ($P < 0.0001$), gdje su bačve u redovima B, C, D i E značajno veće od bačvi u redu A, a bačve u redu E značajno veće od bačvi u redu B.

Međutim, prosječna površina bačvi u pojedinim stupcima (B, C i D) životinja iz skupine tretirane 5HTP-om i dalje je značajno manja od prosječne površine bačvi u odgovarajućim stupcima kontrolnih životinja (Slika 9).

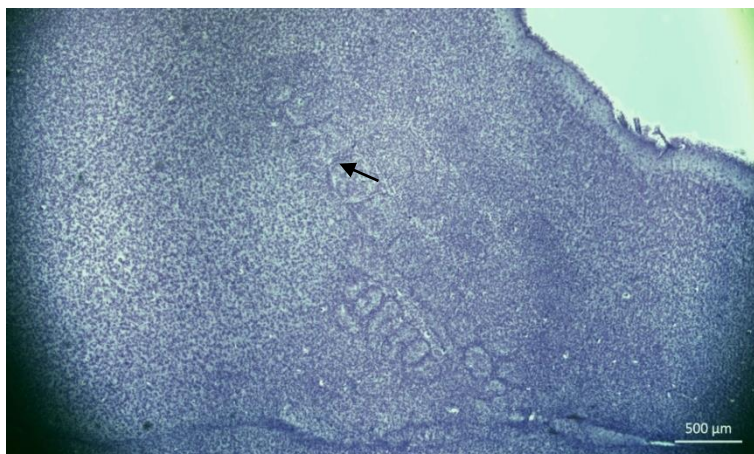
4.2. Struktura i veličina bačvi

4.2.1. Definiranost bačvi

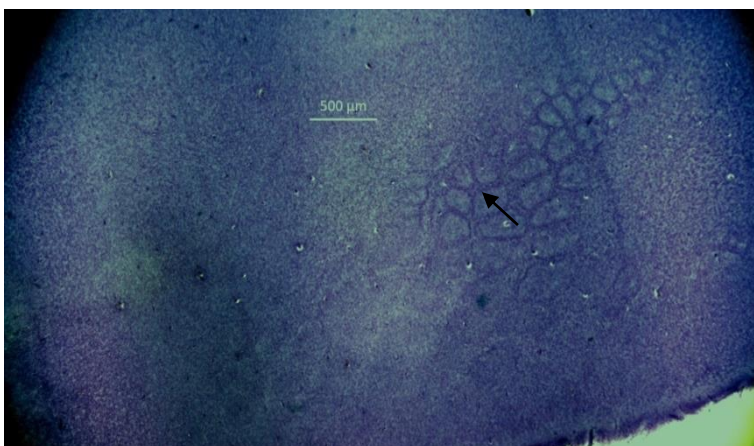
Kvalitativna usporedba bačvastog polja u mladunaca tretiranih fiziološkom otopinom, 5HTP-om i TCP-om ukazala je na razlike u definiranosti ruba bačvi (Slika 10). Skupina tretirana fiziološkom otopinom imala je bačve s jasno definiranim rubom (Slika 10 A), kao i skupina tretirana 5HTP-om (Slika 10 B). U skupini tretiranoj TCP-om bačve su bile difuzne sa slabo definiranim rubom. (Slika 10 C).

Rubovi bačvi u odraslih životinja iz sve tri skupine bili su jasno definirani (Slika 11).

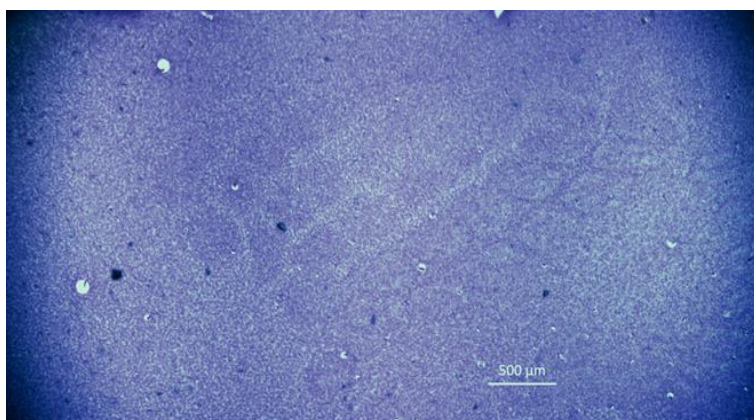
A)



B)

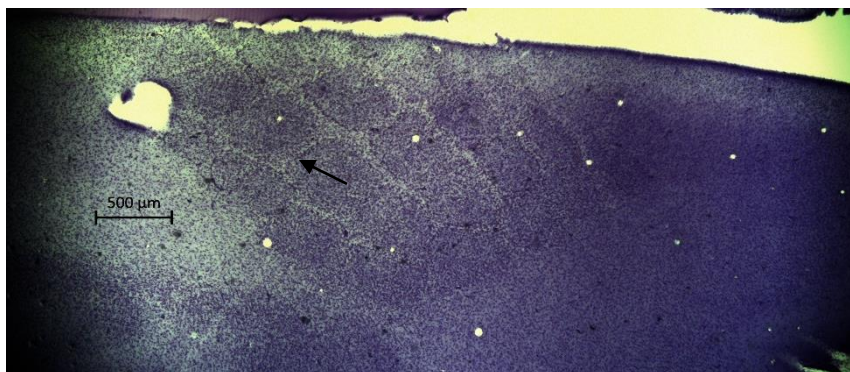


C)

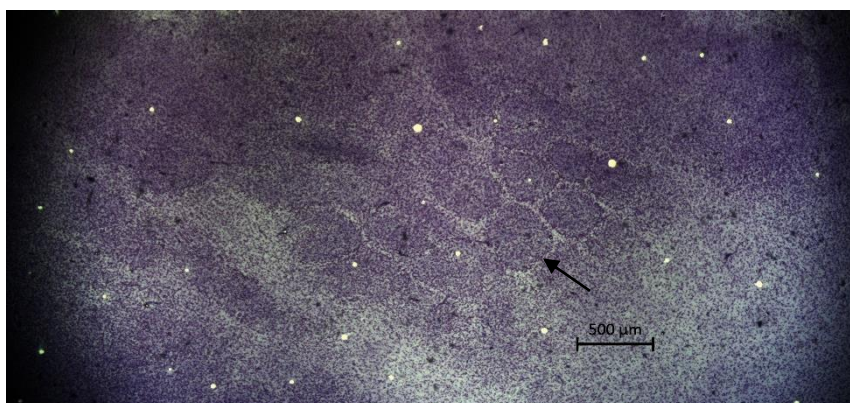


Slika 10. Tipičan prerez mozga mladog štakora tretiranog A) Fiziološkom otopinom B) 5-hidroksitriptofanom (5HTP) C) Tranilciprominom (TCP) (Metoda bojanja po Nisslu, strelice označavaju jasno definiran rub bačvi).

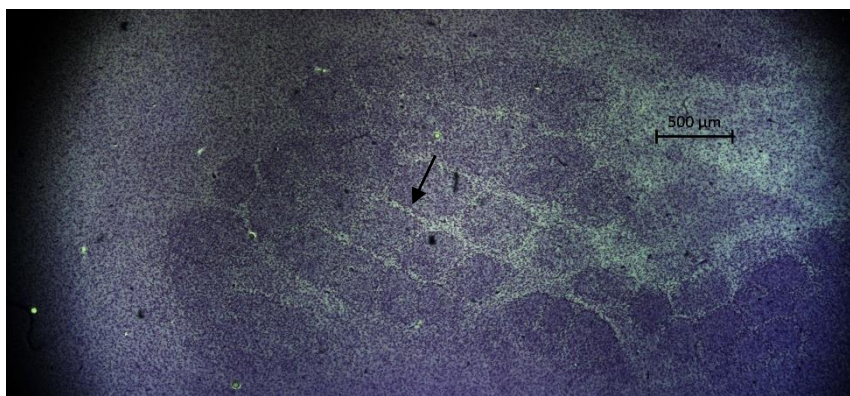
A)



B)



C)

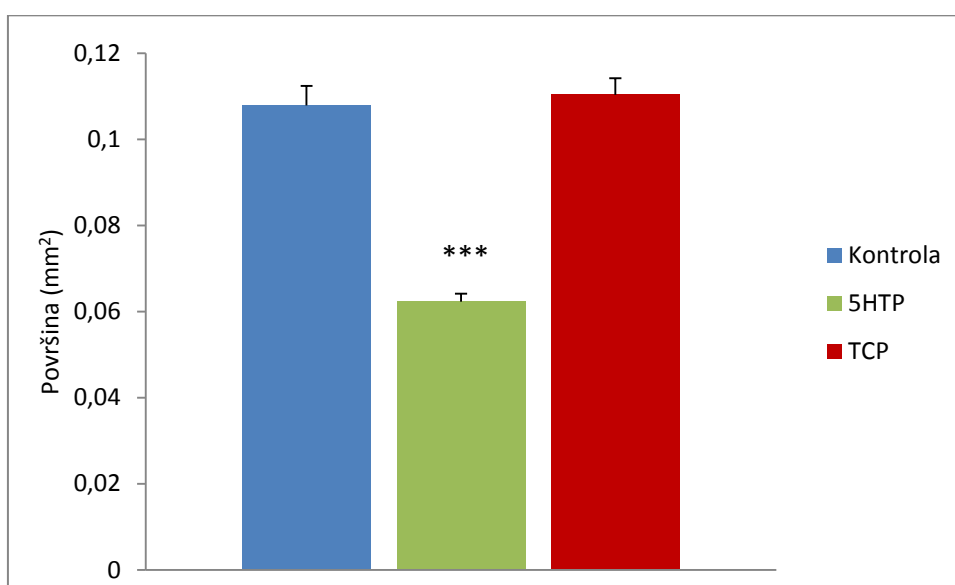


Slika 11. Tipičan prevez mozga odraslog štakora tretiranog A) Fiziološkom otopinom B) 5-hidroksitriptofanom (5HTP) C) Tranilciprominom (TCP) (Metoda bojanja po Nisslu, strelice označavaju jasno definiran rub bačvi).

4.2.2. Prosječna površina bačvi

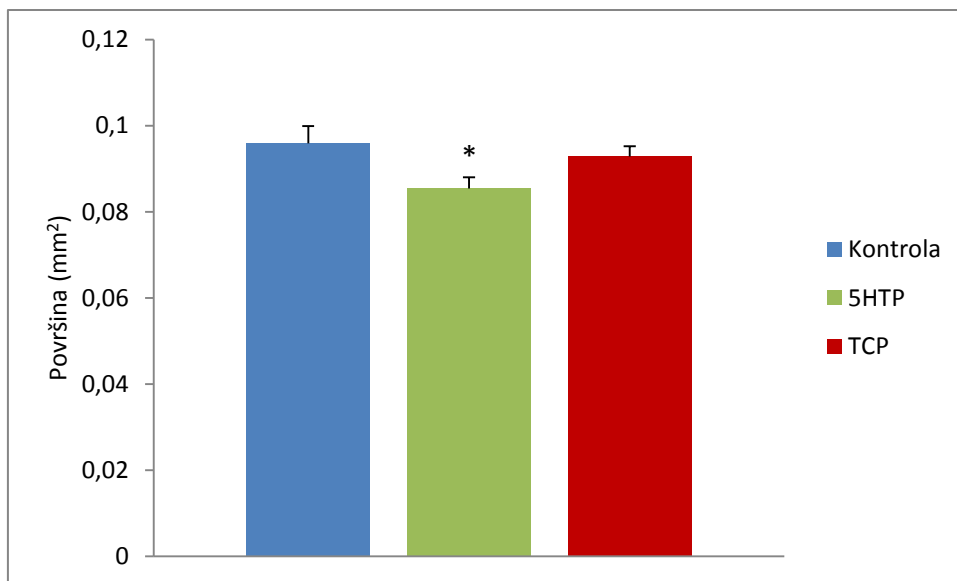
Na kraju smo usporedili prosječnu površinu bačve u bačvastim poljima životinja iz dviju eksperimentalnih i kontrolne skupine.

U mladunaca je utjecaj tretmana na površinu bačvi bio značajan ($KW=62.954$, $P<0.0001$), pri čemu je površina bačvi u skupini tretiranoj 5HTP-om bila značajno manja ($62.3 \pm 1.84 \times 10^{-3} \text{mm}^2$) u usporedbi s površinom bačvi u kontrolnoj skupini ($107.8 \pm 4.51 \times 10^{-3} \text{mm}^2$) i skupini tretiranoj TCP-om ($110.3 \pm 3.90 \times 10^{-3} \text{mm}^2$) (Slika 12).



Slika 12. Prosječna površina bačvi u bačvastom polju mladunca tretiranog fiziološkom otopinom (Kontrola), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) (***) $P<0.001$ Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallisovog testa).

U odraslih životinja je utjecaj tretmana na površinu bačvi bio indikativan ($KW=5.486$, $P=0.0644$), pri čemu je površina bačvi u skupini tretiranoj 5HTP-om i dalje bila značajno manja ($85.4 \pm 2.62 \times 10^{-3} \text{mm}^2$) u usporedbi s površinom bačvi u kontrolnoj skupini ($95.9 \pm 4.01 \times 10^{-3} \text{mm}^2$) i skupini tretiranoj TCP-om ($92.9 \pm 2.36 \times 10^{-3} \text{mm}^2$) (Slika 13).



Slika 13. Prosječna površina bačvi u bačvastom polju odraslog štakora tretiranog fiziološkom otopinom (Kontrola), 5-hidroksitriptofanom (5HTP) i tranilciprominom (TCP). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) (* $P < 0.05$ Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallisovog testa.).

5. RASPRAVA

Bačvasto polje je jedinstvena struktura koja se zbog svoje topografske organizacije, koja je nužna za pravilnu interpretaciju senzoričke informacije, koristi kao modelni sustav u proučavanju razvoja kortikalne ploče velikog mozga (Miceli i sur., 2013). S obzirom da je za pravilno formiranje bačvastog polja nužna kombinacija genetičkog programa i pravilne aktivnosti talamokortikalnih akosona, manipulacija bilo kojeg dijela može dovesti do promjena u razvoju somatosenzoričke kore. Razvoj bačvastog polja ovisan je i o regulaciji izvanstanične koncentracije serotonina. Povišene izvanstanične koncentracije serotonina, uzrokovane genskim inaktivacijama ili farmakološkim tretmanom, uzrokuju nepravilnu organizaciju bačvastog polja (Li i Crair, 2011; Inan i Crair, 2007). Tako je u miševa s inaktiviranim genom za MAOA struktura bačvi narušena. Bačve su difuzne sa slabo definiranim rubom, što je izraženo u mladuncima i odraslim životinjama (Cases i sur., 1996). Istovremena inaktivacija gena za MAOA i 5HTT trajno narušava organizaciju bačvastog polja u miševa. Nadalje, ispitan je učinak receptora 5HT_{1B} u uvjetima normalne razine serotonina (5HT_{1B} KO) i povišene razine serotonina (5HTT/ HT_{1B} dvostruki KO, MAOA KO/ 5HT_{1B} +/-, MAOA/ 5HT_{1B} dvostruki KO, MAOA/5HTT/ 5HT_{1B} trostruki KO). 5-HT_{1B} KO samostalno nema učinak na organizaciju bačvi. U MAOA KO miševima s jednim funkcionalnim genom za 5HT_{1B} rub bačvi je izraženiji u odnosu na kontrolu (MAOA KO). U MAOA/ 5HT_{1B} dvostrukom KO-u, 5HTT/ HT_{1B} dvostrukom KO-u i MAOA/5HTT/ 5HT_{1B} trostrukom KO-u bačvasto polje je pokazivalo normalnu organizaciju u mladim i odraslim životinjama. Receptor 5-HT_{1B} samostalno nema ulogu u formiranju bačvastog polja, no u uvjetima povišene razine serotonina inhibira aktivnost TCA, čime se narušava normalna organizacija bačvastog polja (Salichon i sur., 2001). Nadalje, promjene u organizaciji bačvastog polja u 5HTT KO miševima, mladuncima i odraslim životinjama, iste su kao u Casesovom MAOA KO-u i Salichonievom MAOA/5HTT DKO-u, iako su nešto slabije izražene. Miševi s jednim funkcionalnim genom za 5HTT daju intermedijarni fenotip u organizaciji bačvastog polja između divljeg tipa miša i 5HTT KO-a, a praznine između bačvi su povećane (Persico i sur., 2001). Miševi tretirani klorgilinom, selektivnim inhibitorom MAOA, od embrionalnog dana 15 do PND 7, te od PND 0 do PND 7, pokazuju slične karakteristike u organizaciji bačvastog polja. Izostaje karakteristična organizacija bačvi, rubovi bačvi su difuzni i neograničeni. Promjene u bačvastom polju su trajne, te se uočavaju i u odraslim životinjama koje su tretirane klorgilinom od PND 0 do PND 7 (Vitalis i sur., 1998).

5.1. Učinak 5-hidroksitriptofana (5HTP)

5-hidroksitriptofan je neposredni prekursor serotonina. Odabran je u dizajnu eksperimenta iz nekoliko razloga. Prvo, 5HTP nalazimo isključivo u serotoninskom biosintetskom putu, što znači da se kvantitativno sav 5HTP pretvara u 5HT, što nije slučaj s triptofanom. Nadalje, korištenjem 5HTP-a preskače se limitirajući korak u sintezi serotonina kojeg katalizira TPH. Također, 5HTP lako prelazi BBB i placentu, čime se osigurava utjecaj povišenih razina 5HT-a na razvoj CNS-a (Birdsall, 1998.). Tretman 5HTP-om značajno je podigao koncentraciju 5HT-a na periferji (hiperserotoninemija), no ne i u mozgu mladunaca. U odrasloj dobi homeostaza serotonina na periferiji je ponovno uspostavljena, dok je u frontalnoj kori uočeno blago smanjenje koncentracije serotonina, bez promjena u njegovom metabolizmu (Hranilović i sur., 2011). Tretman 5HTP-om utječe na veličinu bačvi u mladunaca, dok su organizacija i definiranost ruba bačvi očuvani. Veličina bačvi ne raste od reda A-E, te su one znatno manje u odnosu na bačve u kontrolnoj grupi. Nadalje, prosječna veličina bačvi u skupini tretiranoj 5HTP-om, ali i površina cijelog bačvastog polja, znatno je manja u odnosu na kontrolnu skupinu. Sličan fenotip pokazuju štakori s 5HTT KO-om (Miceli i sur, 2013). Nešto manje, no ipak značajne razlike u veličini bačvi u odnosu na kontrolnu skupinu uočavaju se i u odraslih životinja. Iako veličina bačvi proporcionalno raste od reda A-E, prosječna veličina bačvi u pojedinim redovima, kao i prosječna veličina bačvi u cijelom bačvastom polju još je uvijek značajno manja u odnosu na kontrolnu skupinu.

Serotonin tijekom normalnog razvoja inhibira razvoj serotonergičnih neurona u uvjetima kada se postigne njegova maksimalna koncentracija. Maksimalna koncentracija u štakora postiže se oko PND 21, što ujedno odgovara razdoblju kada završava inervacija i grananje serotonergičnih neurona (Whitaker-Azmitia, 2005). Pretpostavljamo da je povišena razina serotonina u krvi, izazvana tretmanom, uzrokovala porast izvanstanične razine serotonina u mozgu i inhibirala grananje serotonergičnih neurona tijekom prenatalnog dijela tretmana. Rezultat toga je smanjena površina bačvi koja se, unatoč djelomičnoj kompenzaciji, zadržala i u odrasloj dobi. S obzirom da metabolizam serotonina ovim tretmanom nije narušen, pojačana aktivnost MAOA mogla je djelomično kompenzirati učinak povišenih razina serotonina, pa su sinaptička aktivnost TCA i organizacija bačvi ostali očuvani.

5.2. Učinak tranilcipromina (TCP)

Tranilcipromin je ireverzibilni inhibitor enzima MAOA i MAOB koji inhibira razgradnju egzogenih amina i monoaminskih neurotransmitera među kojima je i serotonin. Iako dvije izoforme enzima MAO u normalnim fiziološkim uvjetima imaju drugačiji afinitet za supstrate, mogu vezati iste supstrate, te u uvjetima nefunkcionalnosti jednog izoenzima, drugi izoenzim preuzima njegovu funkciju. S obzirom da inhibicija obje izoforme ima značajniji učinak na metabolizam 5HT od inhibicije samo MAOA, TCP je odabran u ovom istraživačkom dizajnu, u prethodno navedenoj koncentraciji, kako bi se osigurala efikasna inhibicija razgradnje većine serotonina (Blažević i sur., 2012). Tretman TCP-om uzrokuje značajno povišenje razine 5HT-a u perifernom i središnjem serotoninском odjeljku u mladunaca. Njegov učinak na homeostazu 5HT vidljiv je i u odrasloj dobi kao hiperserotoninemija na periferiji, te značajno smanjenje razine serotonina i promjena njegovog metabolizma u CNS-u (moždanom deblu i kori) (Hranilović i sur., 2011). Tretman TCP-om utjecao je na organizaciju bačvastog polja i definiranost bačvi u mladunaca. Bačve su bile difuzne sa slabo definiranim rubovima, a izostaje i tipično povećanje veličine bačvi kroz redove. Tretman TCP-om ima sličan učinak na organizaciju bačvastog polja u mladunaca kao MAOA KO (Cases i sur., 1996) i tretman klogilinom, selektivnim inhibitorom MAOA (Vitalis i sur., 1998). Za razliku od mladunaca, u odraslih štakora bačvasto polje ima normalnu organizaciju, a bačve jasno definirani rub.

Pretpostavljamo da je smanjenje aktivnosti MAOA u neuronima jezgara rafe i završetcima TCA, tijekom postnatalnog dijela tretmana, rezultiralo povišenom razinom serotonina u talamokortikalnim sinapsama, što je narušilo pravilnu organizaciju neurona sloja IV koji tvore rubove bačvi. Pravilna organizacija bačvastog polja u odraslih životinja ukazuje na to da proces formiranja bačvi nije trajno narušen, nego samo prolongiran, tj. da je došlo do kompenzacije po završetku tretmana. Slično kašnjenje u sazrijevanju pri tretmanu TCP-om uočeno je i u testovima ponašanja. Naime, proveden je test ultrazvučnog dozivanja nakon odvajanja od majke kako bi se ispitala razina anksioznosti tretiranih životinja. Za razliku od kontrolnih životinja, koje sazrijevanjem smanjuju učestalost dozivanja i povećavaju frekvenciju na kojoj se ono odvija, životinje tretirane TCP-om zadržavaju visoku učestalost dozivanja i nižu frekvenciju, što upućuje na zaključak da povišene razine serotonina negativno djeluju na sazrijevanje mladunaca. Isti bi učinak povišena razina serotonina mogla imati i na razvoj bačvastog polja. Naime, bačvasto polje se formira u prvom postnatalnom

tjednu, a kako su povišene razine serotonina u istraživanju održavane do PND21, pretpostavljamo da se kočio normalan razvoj bačvastog polja, što je vidljivo iz njegove organizacije u mladunaca. Po završetku tretmana smanjena je izvanstanična razina 5HT-a čime se omogućio daljnji razvoj bačvastog polja, što je rezultiralo normalnim fenotipom u odraslih životinja. U prilog tome govore i nedavna istraživanja u kojima je senzoričkom deprivacijom u odraslim životinjama reorganizirano receptivno polje TCA, što upućuje na platičnost TCA i nakon PND 21 (Oberlaender i sur., 2012).

6. ZAKLJUČAK

1. Perinatalna izloženost povišenim koncentracijama serotonina utjecala je na razvoj bačvastog polja somatosenzoričke kore mozga štakora.
2. Prosječna površina bačvi, kao i površina bačvastog polja, bila je značajno manja u mladunaca tretiranih 5HTP-om nego u kontrolnih mladunaca. Pretpostavljamo da je povišena razina serotonina inhibirala grananje talamokortikalnih aksona tijekom prenatalnog dijela tretmana. Iako manje izražena, značajna razlika u veličini bačvi zadržala se i u odrasloj dobi.
3. U mladunaca tretiranih TCP-om, veličina bačvi i bačvastog polja nije bila promijenjena u odnosu na kontrolne mladunce, no bačve su bile slabije definirane s nejasnim rubovima. Pretpostavljamo da je povišena razina serotonina narušila organizaciju neurona sloja IV somatosenzoričke kore tijekom postnatalnog dijela tretmana. Kako u odraslih štakora nije primijećena razlika u definiranosti bačvi u odnosu na kontrolne životinje, možemo pretpostaviti da je tretman TCP-om samo usporio formiranje bačvastog polja te da je proces dovršen nakon prestanka tretmana.
4. Rezultati upućuju na zaključak da se, u štakora, poremećaji nastali zbog narušavanja procesa tijekom postnatalnog razvoja mozga lakše kompenziraju od poremećaja nastalih zbog narušavanja procesa tijekom prenatalnog razvoja.

7. LITERATURA

Berger M., Gray J. G., Roth B. L. (2009): The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine* **60**, 355-366

Blažević S., Čolić L., Čulig L., Hranilovic L. (2012): Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. *Behavioural Brain Research* **230**, 175-181

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 tranlycypromine. *Journal of Physiology and Pharmacology* **66**, 529-537

Blažević S., Hranilović D. (2013): Expression of 5HT-related genes after perinatal treatment with 5HT agonists. *Translational Neuroscience* **4**, 165-171

Blažević S., Jurčić Ž., Hranilović D. (2010): Perinatal treatment of rats with MAO inhibitor tranlycypromine. *Translational Neuroscience* **1**, 149-54

Birdsall T. C. (1998): 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Alternative Medicine Review* **3**, 271-280

Cases O., Vitalis T., Seif I., De Maeyer E., Sotelo, Gaspar P. (1996): Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* **16**, 297-307

Caspi A., Sugden K., Moffitt T. E., Taylor A., Craig I. W., Harrington H., McClay J., Mill J., Martin J., Braithwaite A., Poulton R. (2003): Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* **301**, 386-389

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

Green A. R. (2008): Gaddum and LSD: the birth and growth of experimental and clinical neuropharmacology research on 5-HT in the UK. *British Journal of Pharmacology* **154**, 1583–1599

Hranilović D., Blažević, S. (2012): Hyperserotonemia in Autism: 5HT-regulating proteins. U: Patel V. B., Preedy V. R., Martin C. R. (ur.). *The comprehensive guide to Autism*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, str. 150-161

Hranilović D., Blažević S., Ivica N., Čičin-Šain L., Orešković D. (2011): The effects of the perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranlycypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochemistry International* **59**, 202-207

Hranilović D., Bujas-Petković Z., Tomičić M., Bordukalo-Nikšić T., Blažević S., Čičin-Šain L. (2009): Hyperserotonemia in Autism: activity of 5HT-associated platelet proteins. *Journal of neural transmission* **116**, 493-501

Inan M., Crair M. C. (2007): Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *The Neuroscientist* **13**, 49-61

Janušonis S. (2005): Serotonergic paradoxes of Autism replicated in a simple mathematical model. *Medical Hypotheses* **64**, 742-750

Lesch K. P., Waider J. (2012): Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* **76**, 175-191

Li H., Crair M. C. (2011): How do barrels form in somatosensory cortex? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1225**, 119-129

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

Miceli S., Negwer M., Van Eijs F., Kalkhoven C., Van Lierop I., Homberg J, Schubert D. (2013): High serotonin levels during brain development alter the structural input output connectivity of neural networks in the rat somatosensory layer IV. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **7**, 1-15

Mohammad-Zadeh L. F., Moses L., Gwaltney-Brant S. M. (2008): Serotonin: a review. *Jornual of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **31**, 187-199

Murphy D. L., Andrews A. M., Wichems C. H., Li Q., Tohda M., Greenberg B. (1998): Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interections with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *Journal of Clinical Psychiatry* **59**, 4-12

Nakamura K., Sugawara Y., Sawabe K., Ohashi A., Tsurui H., Xiu Y., Ohtsuji M., Lin Q. S., Nishimura H., Hasegawa H., Hirose S. (2006): Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *The Journal of Neuroscience* **26**, 530-534

Oberlaender M., Ramirez A., Bruno R. M. (2012): Sensory experience restructures thalamocortical axons during adulthood. *Neuron* **74**, 648-655

Persico A. M., Mengual E., Moessner R., Hall S. F., Revay R. S., Sora I., Arellano J., DeFelipe J., Gimenez-Amaya J. M., Conciatori M., Marino R., Baldi A., Cabib S., Pascucci T., Uhl G. R., Murphy D. L., Lesch K. P., Keller F. (2001): Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *The Journal of Neuroscience* **21**, 6862-6873

Petersen C. C. H. (2007): The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* **56**, 339-355

Racke K., Reimann A., Schworer H., Kilbinger H. (1996): Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural Brain Research* **73**, 83-87

Salichon N., Gaspar P., Upton A. L., Picaud S., Hanoun N., Hamon M., De Maeyer E., Murphy D. L., Mossner R., Lesch K. P., Hen R., Seif I. (2001): Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase A and 5-HT transporter knock-out mice. *The Journal of Neuroscience* **21**, 884-896

Shapiro L. A., Marks A., Whitaker-Azmitia P. M. (2004): Increased clusterin expression in old but not young adult S100B transgenic mice: evidence of neuropathological aging in a model of Down syndrome. *Brain Research* **1010**, 17-21

Veenstra-VanderWeele J., Anderson G. M., Cook Jr. E. H. (2000): Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *European Journal of Pharmacology* **410**, 165–181

Vitalis T., Cases O., Callebert J., Launay J. M., Price D. J., Seif I., Gaspar P. (1998): Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive developmental period. *The Journal of Comparative Neurology* **393**, 169-184

Walther D. J., Bader B. (2003): A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1673-1680

Whitaker-Azmitia P. M. (2005): Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in Autism? *International Journal of Developmental Neuroscience* **23**, 75-83

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

<http://blog.baucominstitute.com/wp-content/uploads/2015/02/serotonin-neurons-baucominstitute-stress-anxiety-depression-blog.jpg>

<http://img.medicalxpress.com/newman/gfx/news/hires/2013/optogeneticr.png>

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Darija Šoltić
Datum i mjesto rođenja: 28. prosinca 1991., Čakovec
Adresa prebivališta: Josipa Bajkovca 55, Savska Ves, 40000 Čakovec
Telefon: +385 91 891 9507
E-mail: darija.soltic@gmail.com

Završeno obrazovanje:

rujan 2010.- rujan 2013. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Preddiplomski studij biologije (sveučilišna prvostupnica biologije)
rujan 2006.- lipanj 2010. Gimnazija Josipa Slavenskog, Čakovec

Projekti:

2015. Istraživačko- edukacijski projekt „Papuk 2015“ Udruge studenata biologije- BIUS
2014. Istraživačko- edukacijski projekt „Grabovača 2014“ Udruge studenata biologije- BIUS
Noć biologije, Zavod za animalnu fiziologiju
2013. Istraživačko- edukacijski projekt „Apsyrtides 2013“ Udruge studenata biologije- BIUS
Noć biologije, Zavod za animalnu fiziologiju
2012. Sveučilište za djecu, Botanički zavod
Noć biologije, Botanički zavod

Nagrade i priznanja:

2015. Posebna rektorova nagrada za sudjelovanje na Istraživačko- edukacijskom projektu „Grabovača 2014“ Udruge studenata biologije- BIUS
2014. Posebna rektorova nagrada za sudjelovanje na manifestaciji Noć biologije 2013.

Članstva:

veljača 2013- članica Botaničke sekcije Udruge studenata biologije- BIUS

Volonterski rad:

Rujan 2014.- siječanj 2016. Botanički odjel Hrvatskog prirodoslovnog muzeja, Zagreb;
projekt digitalizacije botaničke zbirke

Znanja i vještine:

Rad na računalu korištenje alata MS Office, Mendeley

Strani jezici Engleski jezik: odlično znanje

Njemački jezik: osnovno znanje