

Histomorfometrijska analiza jetre i bubrega štakora *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) s promijenjenom homeostazom serotonina

Grunčić, Snježana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:564594>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Snježana Grunčić

**Histomorfometrijska analiza jetre i bubrega štakora *Rattus norvegicus*
(Berkenhout, 1769) s promijenjenom homeostazom serotoninina**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Romane Gračan.

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc Romani Gračan na ukazanoj podršci, korisnim savjetima i stručnoj pomoći oko izrade ovog diplomskog rada

Hvala tehničarki Zrinki Benčini na pomoći prilikom laboratorijske izrade ovog rada

Veliko hvala mojoj majci, pokojnom ocu, suprugu i tetki Anici, na pomoći i podršci koju su mi pružali kroz cijeli studij, bez vas ne bih uspjela!

Hvala svim mojim prijateljima, a posebno hvala Zrinki, Mateji, Antoniji, Marinu i Dubravku, što ste uvijek bili tu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA JETRE I BUBREGA ŠTAKORA *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) S PROMIJENJENOM HOMEOSTAZOM SEROTONINA

Snježana Grunčić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Serotonin je biološki aktivan indolamin prisutan u mozgu i perifernim tkivima sisavaca. U ovom radu laboratorijski štakori su tretirani prekursorom sinteze serotonina, 5-hidroksitriptofanom (5HTP) ili neselektivnim inhibitorom monoamin-oksidge, tranilciprominom (TCP), kako bi se uzrokovalo povišenje razine serotonina i promjena njegove homeostaze i zatim ispitaio utjecaj povišene razine serotonina na jetru i bubrege. Eksperimentalnom tretmanu su podvrgnute trudne ženke te mladunci iz okota koji su žrtvovani kako bi se analizirali njihovi organi. Analizirani su histološki preparati jetre (N =34) i bubrege (N =38) te su morfometrijski izmjerene ciljne strukture u tim organima, koje su uključivale mjerenja promjera jezgri stanica, centralnih vena i sinusoida hepatocita unutar jetre te mjerenje površine bubrežnih tjelešaca, glomerula i proksimalnih kanalića bubrege. Rezultati su pokazali značajne statističke razlike između kontrolne skupine i životinja s povišenom razinom serotonina, pri čemu su životinje tretirane s TCP-om pokazale veća odstupanja u građi jetre, dok je 5HTP imao veći utjecaj na bubrege.

(39 stranica, 16 slika, 8 tablica, 27 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: bubreg, jetra, serotonin, 5-hidroksitriptofan, tranilcipromin

Voditelj: doc. dr. sc. Romana Gračan

Ocjenitelji: : doc.dr.sc. Romana Gračan

doc.dr.sc. Sofia Ana Blažević

dr.sc. Damir Sirovina, v. pred.

Rad prihvaćen: 07.01.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

HYSTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF LIVER AND KIDNEY IN RATS *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) WITH ALTERED SEROTONIN HOMEOSTASIS

Snježana Grunčić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Serotonin (5HT) is a biologically active indolamine in brain and peripheral tissues of the mammals. In this experiment rats were treated with serotonin synthesis precursor, 5-hydroxytryptophan (5HTP) or with nonselective monoamine oxidase inhibitor, tranylcypromine (TCP) in order to increase the level of serotonin and alter its homeostasis, and to investigate the influence of increased serotonin on the liver and kidney. The experiment started with treatment of pregnant females, continued on offsprings, and finished with immolation of baby rats, and isolation of their organs for analysis. We have analysed tissue sections of liver (N =34) and kidneys (N =38), and morphometrically measured target structures in these organs, which included diameter of nucleus, cells, central veins and hepatic sinusoids and surfaces of the renal bodies, glomerules and proximal tubules in the kidney. Our results showed statistically significant differences between control group and rats with altered serotonin homeostasis. Large structural changes were recognised in the liver of animals treated with TCP, while rats treated with 5HTP displayed more severe structural changes in kidneys.

(39 pages, 16 figures, 8 tables, 27 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: kidney, liver, serotonin, 5-hydroxytryptophan, tranylcypromine

Supervisor: Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

Dr. Sofija Ana Blažević, Asst. Prof.

Dr. Damir Sirovina, Senior Lecturer

Thesis accepted: 07.01.2020.

POPIS KRATICA

ADH-antidiuretski hormon

AAAD-dekarboksilaze aromatskih aminokiselina

5-HIAA-hidroksiindolotenu kiselinu

5HT-5-hidroksitriptamin

5HTP-5-hidroksitriptofan

HE-hemalaun-eozin

MAO-monoamin-oksidaza

PAS- perјodna kiselina i Schiffov reagens

Trp- L-triptofan

TPH-triptofanhidroksilaza

TCP-tranilcipromin

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. LABORATORIJSKI ŠTAKOR	1
1.2. SEROTONIN.....	2
1.3. METABOLIZAM SEROTONINA I PERIFERNI SEROTONINSKI ODJELJAK ...	2
1.4. HISTOLOŠKA GRAĐA JETRE	4
1.5. HISTOLOŠKA GRAĐA BUBREGA	5
1.6. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	7
2. MATERIJALI I METODE	8
2.1. EKSPERIMENTALNA FAZA	8
2.2. HISTOLOŠKA BOJENJA	9
2.2.1. BOJENJE HEMALAUN EOZINOM (HE)	10
2.2.2. HISTOKEMIJSKO BOJENJE METODOM PAS	10
2.3. MIKROSKOPIRANJE I FOTOGRAFIRANJE.....	11
2.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	13
3. REZULTATI.....	15
3.1. HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA JETRE ŠTAKORA	15
3.2. HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA BUBREGA ŠTAKORA	24
4. RASPRAVA	33
5. ZAKLJUČAK	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

1.1. LABORATORIJSKI ŠTAKOR

Laboratorijski štakor, *Rattus Norvegicus* (Berkenhout 1769) je danas jedan od glavnih eksperimentalnih modela za neurobiološka, toksikološka i farmakološka istraživanja (Slika 1). Dostupan je veliki broj mutiranih i singeničnih sojeva koji se koriste u istraživanjima različitih bolesti poput raka, dijabetesa, hipertenzije i raznih imunoloških tretmana. Neke od prednosti korištenja štakora kao animalnog modela su te što štakori imaju veću patofiziološku sličnost s ljudima u modeliranju nekih bolesti, žive duže od miševa, dok njihova veličina olakšava izvođenje određenih kirurških postupaka. Prvi transgenični štakori načinjeni su 90-ih godina prošlog stoljeća dok je 2003. godine načinjen prvi knock-out štakor za *brca1* i *brca2* gene. Sekvencioniranje štakorskog genoma dovršeno je 2005. godine (Priručnik za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama 2014).

Za štakore je karakteristična brza reprodukcija i veliki broj potomaka, dok su u društvenim interakcijama štakori manje agresivni od miševa. Štakori su noćne životinje, a svojim ponašanjem pokazuju veliku sposobnost prilagodbe na različite uvjeta života. U laboratoriju je izražen njihov cirkadijani ritam i odgovara im 12 sati mraka i 12 sati svjetla. U kavezu im je bitno osigurati im skrovito mjesto jer imaju veliku potrebu za sigurnošću koja uvelike definira njihovo ponašanje.

Zbog velikog broja različitih istraživanja, definirana su pravila Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili u druge znanstvene svrhe (NN broj 55/13).



Slika 1. Vanjski izgled štakora *Rattus norvegicus* (preuzeto sa: www.criver.com)

1.2. SEROTONIN

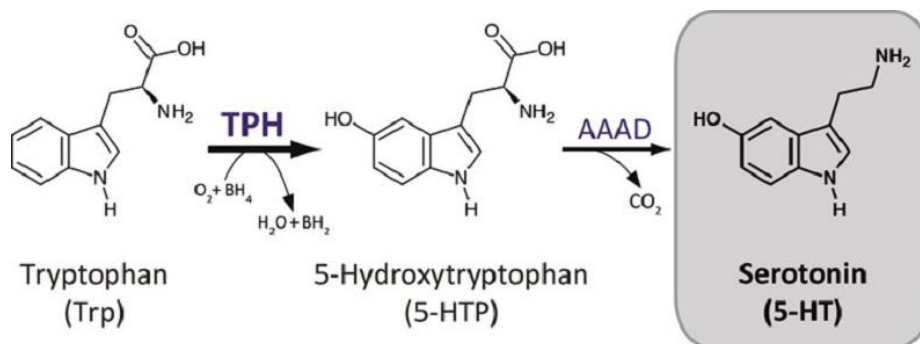
Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biološki aktivan indolamin prisutan u mozgu i u perifernim tkivima sisavaca. Pripada porodici monoaminskih neurotransmitera i neuromodulatora koji se sintetizira iz esencijalne aminokiseline triptofana. U sisavaca razlikujemo dva serotoniniska odjeljka: središnji, koji podrazumijeva središnji živčani sustav te periferni, kojeg čine ostali organski sustavi (Blažević 2013). Odjeljci su odvojeni krvno-moždanom barijerom koja nije propusna za serotonin, ali je propusna za njegove prekursore, triptofan i 5-hidroksitriptofan. U mozgu je serotonin uključen u regulaciju razvoja serotonergičnih neurona i ciljnih tkiva tijekom neurogeneze, a kasnije ima ulogu neurotransmitera koji posreduje u mnogim neurofiziološkim procesima (Lucki 1998). U perifernim tkivima serotonin sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima većine organskih sustava: gastrointestinalnog, kardiovaskularnog, dišnog i genitourinarnog.

1.3. METABOLIZAM SEROTONINA I PERIFERNI SEROTONINSKI ODJELJAK

U mozgu se serotonin sintetizira u serotonergičnim neuronima, smještenim u jezgrama rafe moždanog debla, dok je najvažnije mjesto sinteze u perifernom odjeljku, u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva. Uz serotonergične neurone i enterokromafine stanice, trombociti su stanice najbogatije serotoninom. Serotonin se u oba odjeljka metabolizira na isti način, ali postoji razlika u nekim enzimima koji sudjeluju u njegovom metabolizmu kao i funkcije koje serotonin izvršava u svakom od odjeljaka.

Sinteza serotoninina se odvija u dva koraka: u prvom će koraku hidroksilacijom L- triptofana (Trp), uz pomoć enzima triptofanhidroksilaze (TPH) nastati 5- hidroksitriptofan (5HTP), dok će u drugom koraku nastati serotonin (5HT), dekarboksilacijom 5HTP-a uz pomoć enzima dekarboksilaze aromatskih kiselina (AAAD).

Razgradnja serotoninina se odvija u presinaptičkim neuronima i endotelnim stanicama pluća i jetre. Razgrađuje se oksidativnom deaminacijom uz pomoć enzima monoamin-oksidge (MAO), u hidroksiindolactenu kiselinu (5HIAA) (Hranilović i sur. 2011).



Slika 2. Shematski prikaz reakcija sinteze serotonina (preuzeto sa: www.biovaria.org)

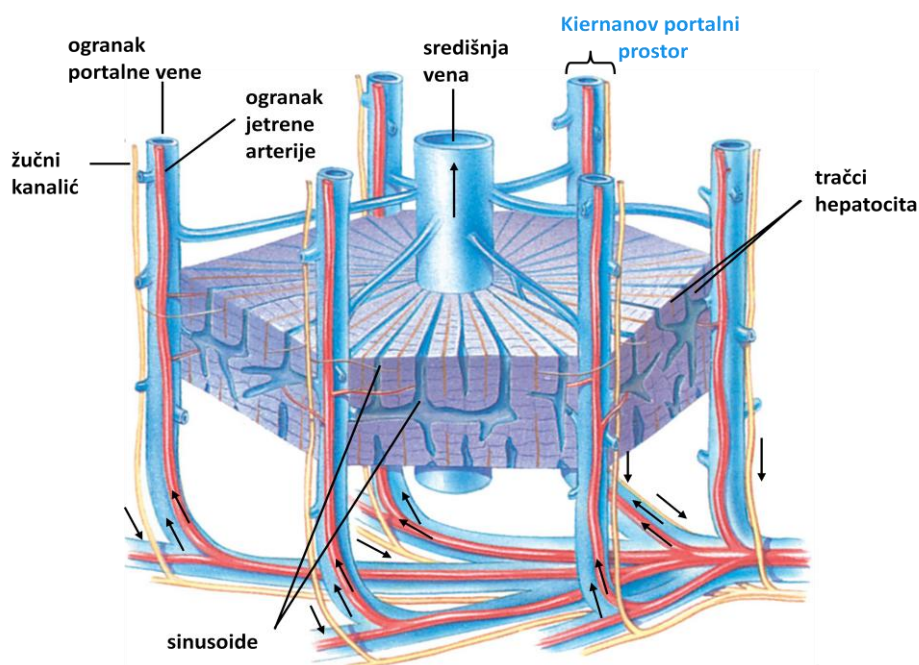
Oko 90% ukupnog serotonina se sintetizira u perifernim tkivima. Periferni 5HT se sintetizira u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva i pohranjuje se u sekretorne vezikule, iz kojih se otpušta u krvotok i dalje se aktivno unosi u trombocite (Racke i sur. 1995). Na membrani trombocita se nalazi proteinski 5HT prijenosnik, koji aktivno transportira 5HT u trombocite, gdje ima važnu ulogu u procesu zgrušavanja krvi. U epifizi se serotonin prevodi u melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) koji ima važnu ulogu u regulaciji cirkadijanog ritma. U gastrointestinalnom sustavu serotonin potiče crijevnu peristaltiku, sekreciju i osjećaj mučnine. U kardiovaskularnom sustavu sudjeluje u regulaciji srčanog ritma i krvnog tlaka. Na dišni sustav 5HT djeluje dvojako: izravno preko centra za regulaciju disanja u moždanom deblu, dok neizravno djeluje vazodilatacijom i vazokonstrikcijom krvnih žila. U muškom genitourinarnom sustavu serotonin regulira sekreciju testosterona, inhibiciju ejakulacije, kontrakciju epididimisa te inhibiciju mokrenja. Kod žena djeluje na razvoj mliječnih žlijezda, kontrakciju glatkih mišića maternice, sazrijevanje jajnih stanica i izlučivanje progesterona (Berger i sur. 2009).

Tijekom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja, krvno-moždana barijera nije u potpunosti razvijena pa je propusna za serotonin koji može slobodno prelaziti iz perifernog odjeljka u mozak i na taj način može utjecati na razvoj središnjeg serotoniniskog sustava. To razdoblje kod čovjeka traje do 2. godine života, dok je kod štakora to razdoblje do 20. postnatalnog dana (Whitaker-Azmitia 2001; 2005). S obzirom da serotonin sudjeluje u velikom broju fizioloških procesa, poremećaj u njegovoj homeostazi može dovesti do poremećaja u ponašanju ili do poremećaja u razvoju, poput autizma, Downovog sindroma, depresije, shizofrenije, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, alkoholizma i dr.

1.4. HISTOLOŠKA GRAĐA JETRE

Jetra je organ u kojemu se hranjive tvari, apsorbirane u probavnom sustavu, obrađuju i pohranjuju za uporabu u drugim dijelovima tijela. Većina njezine krvi potječe iz portalne vene, dok je manji dio krvi iz jetrene arterije. Jetra je pokrivena tankom vezivnom čahurom, Glissonovom čahurom, koja je zadebljana u području hilusa, gdje u jetru ulaze portalna vena, jetrena arterija a izlaze desni i lijevi jetreni kanal i limfne žile (Junquiera i Carneiro 2005).

Funkcionalna jedinica jetre je jetreni režnjić koji je građen od međusobno povezanih tračaka jetrenih stanica ili hepatocita. Na perifernim dijelovima, režnjići su odvojeni vezivnim tkivom u kojem se nalaze Kiernanovi portalni prostori sa portalnim trijadama. U jetri čovjeka nalazi se 3-6 portalnih prostora, kojeg čine: vena (ogranak portalne vene), arterija (ogranak jetrene arterije), žučni kanalić i limfne žile.



Slika 3. Građa jetrenog režnjića (preuzeto od: Sherwood 2012).

Centralna vena je središnji dio režnjića oko koje se nalaze hepatociti koji teku radijalno od periferije prema središtu režnjića, a između njih se nalaze jetrene sinusoide. Jetrene sinusoide su građene od endotelnih i stanica mononuklearnog fagocitnog sustava (Kupferovih stanica). Između endotelnih stanica i hepatocita se nalazi subendotelni ili Disseov prostor u koji strše mikrovili s površine hepatocita. U Disseovom prostoru su smještene zvjezdolike Itove stanice, koje primaju i pohranjuju masti i u mastima otopljene tvari poput vitamina A.

Na periferiji reznjica se krv iz interlobularne vene ulijeva u jetrene sinusoidne i teče prema središtu reznjica i ulijeva se u centralnu venu. Napuštajući reznjić, centralna vena se ulijeva u prijelaznu venu, koje se spajaju u više jetrenih vena a one se ulijevaju u donju šuplju venu.

Jetrene stanice koje izgrađuju jetrene reznjice nazivaju se hepatociti. To su stanice višekutnog oblika s okruglim jezgrama koje sadrže jednu ili dvije jezgrice. Njihova citoplazma sadrži veliki broj mitohondrija, hrapavu i glatku endoplazmatsku mrežicu i veliki broj Golgijevih kompleksa. Hrapava endoplazmatska mrežica tvori nakupine, tzv. bazofilna tjelešca, dok se u glatkoj endoplazmatskoj mrežici nalaze enzimi koji su potrebni za različite detoksikacijske procese. Stanične membrane susjednih hepatocita tvore stijenku žučnih kapilara u kojima žuč teče od centra prema periferiji reznjica. Žučne kapilare međusobno anastomiziraju i završavaju u žučnim kanalićima, iz kojih se ulijevaju u žučne kanale u Kiernanovim portalnim prostorima, tvoreći na kraju lijevi desni jetreni kanal, koji izlazi iz jetre. U citoplazmi hepatocita prisutni su i lizosomi, kapljice lipida i glikogen, koji se nakuplja u obliku zrnaca uz kanaliće glatke endoplazmatske mreže.

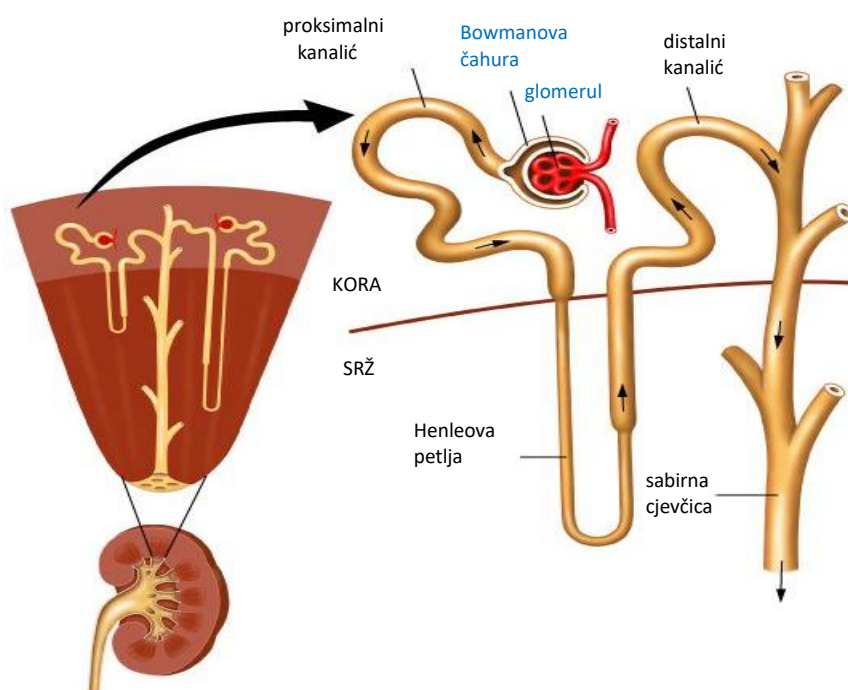
Glikogen se kao pričuvni oblik glukoze, razgrađuje u trenutku kada se razina glukoze u krvi spusti ispod normalne vrijednosti. Jetra proizvodi bjelancevine plazme i ispušta ih u optok krvi: albumin, protrombin, fibrinogen i lipoproteine.

1.5. HISTOLOŠKA GRAĐA BUBREGA

Na medijalnoj strani bubrega nalazi se hilus, gdje ulaze grane bubrežne arterije, živci i limfne žile, a izlaze mokraćovod i bubrežna vena. Na uzdužnom presjeku bubrega razlikujemo koru i unutarnje područje, srž bubrega. Srž bubrega se dijeli na vanjsku i unutrašnju zonu, a građena je od 10-18 sržnih piramida. U vanjskoj zoni srži nalazimo Henleove petlje kratkih nefrona i ravne sabirne kanaliće, dok u unutrašnjoj zoni nalazimo Henleove petlje dugih nefrona i ravne sabirne kanaliće koji tvore papile s papilarnim kanalićima. Papile se otvaraju u male bubrežne vrčeve koji se otvaraju u velike bubrežne vrčeve a oni se otvaraju u bubrežnu nakapnicu, i dalje u mokraćovod. Bubrežna kora se nalazi ispod čahure, zrnatog je izgleda, okružuje srž i dijeli se na dvije zone. U kortikalnoj zoni se nalaze bubrežna tjelešca i zavijeni dijelovi proksimalnih i distalnih kanalića i polukružni sabirni kanalići. U medularnim tračcima se nalazi uzlazni i silazni dio Henleove petlje i ravni sabirni kanalići (Kozarić 1997).

Osnovna funkcionalna jedinica bubrega je nefron, a čine ga: bubrežno tjelešce, proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja i distalni zavijeni kanalić. Bubrežno tjelešce se sastoji od klupka krvnih kapilara (glomerula) koji su okruženi Bowmanovom čahuricom, koja svojim

parijetalnim listom čini vanjsku granicu bubrežnog tjelešca, a viscelarnim listom okružuje kapilare glomerula. Prostor između dva lista čahure je interkapsularni prostor, u koji se filtrira glomerularni filtrat, koji je po kemijskom sastavu vrlo sličan plazmi, ali ne sadržava bjelančevine. Na bubrežnom tjelešcu razlikujemo žilni pol, mjesto na kojem ulaze i izlaze arteriole i na suprotnoj strani mokraćni pol, iz kojeg izlazi proksimalni zavijeni kanalić. On je građen od jednoslojnog kubičnog ili cilindričnog epitela, zvjezdastog je lumena sa četkastom prevlakom na unutarnjoj površini. Glavna zadaća proksimalnih kanalića je da aktivnim i pasivnim mehanizmima prijenosa apsorbiraju glukozu, aminokiseline i oko 85% vode i natrijevog klorida, i vrate ih nazad u krv. Uz to, proksimalni zavijeni kanalići eliminiraju iz plazme u filtrat kreatinin i neke druge otpadne produkte, tzv. tubularnom sekrecijom.



Slika 4. Građa nefrona (preuzeto od: Sherwood 2012).

Filtrat dalje prolazi Henleovom petljom, čiju stijenku čine pločaste epitelne stanice, a uloga petlje je koncentriranje mokraće. Henleova petlja se sastoji od debelog dijela silaznog kraka, po građi vrlo sličnom proksimalnom zavijenom kanaliću, zatim tankog dijela silaznog kraka, tankog dijela uzlaznog kraka i debelog dijela uzlaznog kraka, koji je po građi vrlo sličan distalnom zavijenom kanaliću (Junquiera i Carneiro 2005).

Tanki dio silaznog kraka petlje je odgovoran za reapsorpciju vode, dok je tanki dio uzlaznog kraka je nepropustan za vodu. U debelom se dijelu uzlaznog kraka nastavlja reapsorpcija natrija, klorida i kalija. Tako bitno promijenjeni filtrat debelim dijelom uzlaznog kraka

dospijeva do kore, gdje postaje zavijen i naziva se distalni zavijeni kanalić, iako je njegova histološka građa ostala ista. Na histološkim rezovima, stanice distalnih zavijenih kanalića imaju kubični oblik, manje su od proksimalnih, nemaju četkastu prevlaku, a lumen kanalića je širi od proksimalnih. Na mjestu gdje distalni zavijeni kanalić dodiruje dovodnu arteriolu (jukstaglomerularno područje) kubične stanice se mijenjaju u cilindrične, postaju više i gusto su zbijene. Taj promijenjeni dio distalnog kanalića je macula densa, koja je u kontaktu s promijenjenim glatkim mišićnim stanicama dovodne arteriole (tzv. jukstaglomerularne stanice) koje izlučuju hormon renin, čime sudjeluju u održavanju krvnog tlaka. U distalnim zavijenim kanalićima se uz prisutnost aldosterona, hormona kore nadbubrežne žlijezde, apsorbira natrij iz filtrata, a izlučuju se ioni kalija.

Mokraća dalje ide do sabirnih cijevi koje su pod utjecajem antidiuretskog hormona (ADH), vrlo propusne za vodu, te se na ovoj razini reapsorbira velika količina vode i nastaje hipertonična mokraća. Sabirne cijevi skupljaju mokraću nastalu u nefronu i odvođe je u bubrežnu nakapnicu i dalje u mokraćovod.

1.6. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom diplomskom radu istražili smo utjecaj perinatalno povišene razine serotonina na građu jetre i bubrega mladunaca laboratorijskih štakora. U tu svrhu su napravljeni histološki preparati jetre i bubrega štakora raspoređenih u 3 eksperimentalne grupe, koje su izložene akutnom perinatalnom tretmanu s 5-hidroksitriptofanom ili tranilciprominom ili fiziološkom otopinom kako bi se otkrile potencijalne histopatološke promjene u dosad slabo istraženom perifernom odjeljku serotoninske homeostaze. U tu svrhu, detaljno smo kvantificirali i morfološki analizirali ciljne strukture u organima jetre i bubrega, koje su uključivale mjerenja promjera jezgri stanica, centralnih vena i sinusoida hepatocita unutar jetre te mjerenje površine bubrežnih tjelešaca, glomerula i proksimalnih kanalića bubrega.

2. MATERIJALI I METODE

U ovom radu korišteni su laboratorijski štakori soja Wistar iz uzgoja, na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Studija je dobila odobrenje Etičkog povjerenstva Biološkog odsjeka PMF-a te je provedena u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006).

Štakori su bili smješteni u prostoriji kontrolirane temperature i vlažnosti, svjetlost je bila podešena na 12 sati mraka i 12 sati svjetla te su imali slobodan pristup hrani i vodi.

2.1. EKSPERIMENTALNA FAZA

Štakori su podijeljeni u tri skupine (Tablica 1) označene bojama:

- 1) štakori označeni crvenom su tretirani s 2 mg/kg TCP-a koji značajno povećava koncentraciju serotonina u oba odjeljka
- 2) štakori označeni plavom bojom su tretirani s fiziološkom otopinom koja ne mijenja koncentraciju serotonina
- 3) štakori označeni zelenom su tretirani s 25 mg/kg 5HTP-a koji značajno povećava koncentraciju serotonina samo u perifernom odjeljku

Tablica 1. Prikaz skupina tretirane određenom kemikalijom

Naziv skupine	Naziv kemikalije	Broj životinja
Crvena (C)	Tranilcipromin (TCP)	13 (6 mužjaka i 7 ženki)
Plava (P)	Fiziološka otopina	12 (6 mužjaka i 6 ženki)
Zelena (Z)	5-hidroksi-L-triptofan (5HTP)	13 (7 mužjaka i 6 ženki)

Životinje su tretirane subkutano u nabor kože na zatiljku. Volumen injektirane otopine prilagođen je težini štakora izvaganog neposredno prije tretmana. Koncentracija otopina prilagođena je rasponu očekivanih volumena odnosno rasponu mogućih tjelesnih težina. Na taj način je omogućeno da životinje svakodnevno dobivaju točno određenu dozu 5HTP-a ili TCP-a. Kontrolna ili plava skupina je na jednak način dobivala dnevnu dozu fiziološke otopine. Korišteni 5HTP i TCP (Sigma-Aldrich, Njemačka) su bili u krutom obliku (prašak) i kao takvi su se morali otopiti u fiziološkoj otopini. Otapanje omogućava izrazito kisela sredina pa je u postupak dodana koncentrirana klorovodična kiselina (HCl). Važno je naglasiti kako je potrebno u potpunosti otopiti 5HTP i TCP, u protivnom bi došlo do nejednolike raspodjele tretmana u tijelu štakora, a samim time i pogrešnog doziranja. Obzirom da se takva

kisela otopina ne smije unositi u tijelo, izvršena je titracija pomoću vodene otopine natrijeva hidroksida (NaOH) pa je pH vrijednost otopine podešena na 7. Time je izbjegnuto oštećenje tkiva životinje pri niskoj pH vrijednosti. Shodno tome, prije svakog injiciranja izmjerena je pH vrijednost otopine te je otopina zagrijana u vodenoj kupelji na tjelesnu temperaturu životinja.

Tretmanu su podvrgnute ženke tijekom gestacije te mladunčad iz okota. Tretman gravidnih ženki (majki) počeo je 12. gestacijskog dana i trajao je do 21. dana gestacije (okota). Prvi dan nakon okota mladuncima je počeo postnatalni tretman koji je trajao do 21. postnatalnog dana. Dakle, mladunci su imali prenatalni tretman (tretiranje majki dok su još bili u uterusu) i postnatalni tretman koji je trajao od 1. do 21. postnatalnog dana. Pauza je bila nulti dan - dan samog okota. Mladunci su žrtvovani 70. dan nakon okota kako bi se tkiva mogla uzorkovati i analizirati.

Izoliran je dio lijevog režnja jetre, te lijevi bubreg u uzdužnom presjeku, a tkiva su fiksirana u 10% neutralnom puferiranom formaldehidu tijekom 36-48 sati.

Postupku uklapanja tkiva u paraplast prethode dva pripremna postupka: dehidriranje i prosvjetljivanje. Iz fiksiranih i ispranih komadića tkiva najprije se uklanja voda, uzastopnim prenošenjem u sve koncentriranije mješavine etanola i vode, obično od 70 % do 99 % etanola (Junquiera i Carneiro 2005). Slijedi postupak prosvjetljivanja ksilolom, nakog kojeg tkivo postane prozirno. Zatim se tkivo stavlja se u termostat na temperaturu od 58° C do 60° C, prvo u otopljenu smjesu paraplasta i kloroforma i na kraju u čisti otopljeni paraplast. Pod utjecajem topline otapalo ispari i svi se prostori u tkivu ispune paraplastom. Tkivo se stavi u kalupe ispunjene tekućim paraplastom, te izvadi iz termostata na sobnu temperaturu da se stvrdne. Blokovi s tkivom režu se pomoću rotacijskog mikrotoma (model Shandon Finesse 325) na rezove debele 6-7 µm. Rezovi se zatim prenese na vodenu kupelj kako bi se izravnali i zatim se nanose na predmetno stakalce prethodno namazano adhezivnom smjesom glicerina i bjelanjka (Junquiera i Carneiro 2005).

2.2. HISTOLOŠKA BOJENJA

Rezovi koji sadržavaju komadić tkiva iz lijevog režnja jetre, te lijevi bubreg u uzdužnom presjeku bojali su se kombinacijom histoloških metoda: rutinsko bojenje hemalaun – eozin tehnikom (HE) i rutinskom histokemijskom metodom koja kombinira perjodnu kiselinu i Schiffov reagens (PAS).

2.2.1. BOJENJE HEMALAUN EOZINOM (HE)

Bojenje tkivnih rezova mješavinom bazične boje hematoksilina i kiselog eozina omogućuje jasno razlikovanje jezgara i citoplazmatskih struktura. Hematoksilin boji plavoljubičasto staničnu jezgru i ostale kisele komponente stanice (npr. organele s mnogo RNA), dok eozin boji ružičasto do crveno citoplazmu, eritrocite i vezivno tkivo.

Postupak:

Rezovi se najprije deparafiniraju u ksilolu (2 x 15 min), zatim se rehidririraju kroz seriju alkohola od veće prema manjoj koncentraciji (100%, 96%, 80% i 70%) po 5 minuta. Zatim se rezovi stavljaju u destiliranu vodu (2 x 5 min), nakon čega slijedi bojenje rezova u hemalaunu (po Mayeru) 10 minuta. Uslijedilo je ispiranje rezova u tekućoj vodi (2 x 5 min), bojenje u eozinu 5 minuta, i ispiranje rezova u destiliranoj vodi (2 x 5 min). Nakon toga je slijedilo rehidriranje tkiva kroz seriju alkohola od manje prema većoj koncentraciji, držanje u ksilolu (2-10 minuta) i uklapanje u kanadski balzam.

2.2.2. HISTOKEMIJSKO BOJENJE METODOM PAS

Kombinacija perjordne kiseline i Schiffovog reagensa (Periodic Acid Schiff – PAS) je osnovna histokemijska metoda za dokazivanje mukoznih supstanci. PAS reakcijom se mogu dokazati/prikazati glikogen, glikozaminoglikani, glikoproteini, glikolipidi, sekretorni proizvodi nekih stanica i dr. Postupak bojenja se odvija u dvije faze. U prvoj fazi perjordna kiselina oksidira α -aminoalkohole i/ili 1,2 glikolne grupe u aldehide. Ti aldehidi reagiraju u drugoj fazi sa Schiffovim reagensom (Kozarić 1997). Vezanjem Schiffovog reagensa na aldehidne grupe stvara se grimizno-crveno obojenje, koje se pojačava ispiranjem u tekućoj vodi.

Tablica 2. Priprema periodne kiseline i Schiffovog reagensa (PAS)

Priprema periodne kiseline	0,5 grama u 100 ml destilirane H ₂ O
Priprema Schiffovog reagensa	po redosljedu: • 192 ml destilirane H₂O • 8 ml koncentrirane HCl • 5 g natrijevog metilsulfita (Na₂S₂O₅) • 0,5 g bazičnog fuksina (pararosanilin)
Priprema SO ₂ (300 ml)	• 18 ml 10%-tne otopine natrijevog metilsulfita (Na₂S₂O₅) • 15 ml HCl (1N HCl) • 300 ml destilirane H₂O

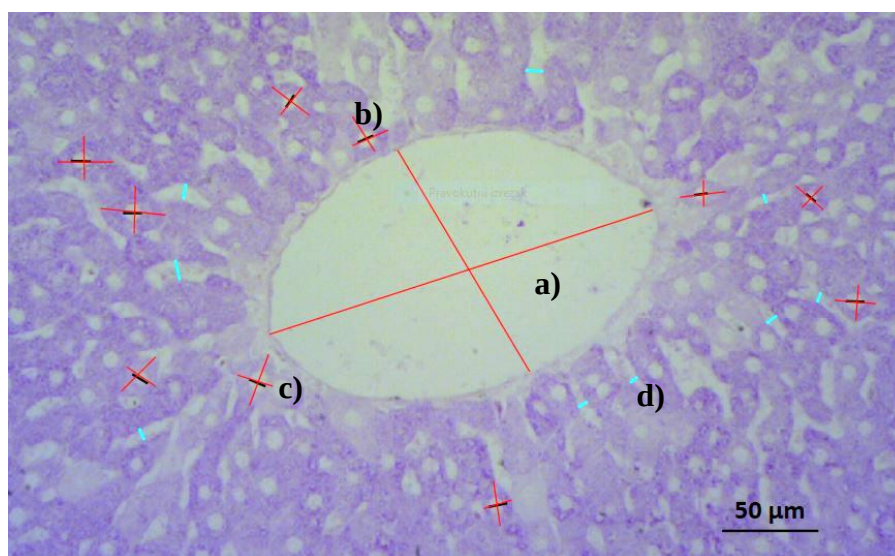
Nakon bojenja periodnom kiselinom i Schiffovim reagensom, slijedi postupak dehidriranja. Dehidriranje se provodi u rastućim koncentracijama alkohola (70%, 80%, 96% i 100%) te u ksilolu (2 x 5 min), nakon čega slijedi uklapanje u kanadski balzam. Nakon jednodnevnog sušenja, preparati su spremni za mikroskopiranje

2.3. MIKROSKOPIRANJE I FOTOGRAFIRANJE

Svi histološki preparati su prvo obojeni HE metodom kako bi se ustanovila osnovna strukturna građa tkiva i njegova primjerenost za specifično histokemijsko bojanje. Histološki preparati obojeni PAS reakcijom omogućili su isticanje bazalnih membrana u tkivima jetre i bubrega i time istaknuli stanice i morfološke strukture koje će se kvantificirati. Od svakog uzorka napravljeno je 4-5 prereza, pri čemu je odabran najbolji koji je dalje analiziran. Sva tkiva pregledana su svjetlosnim mikroskopom (Nikon Eclipse E600), pod povećanjem 200x. Mikroskopske slike histoloških preparata snimljene su digitalnom kamerom (AxioCamErc 5s) spojenom na mikroskop, a zatim su obrađene ZEN2 lite programom (Zeiss, Germany) koji je omogućio morfometrijsku obradu digitalnih slika preparata. Nakon što su preparati snimljeni digitalnom kamerom napravljeno je histomorfometrijsko mjerenje slika i statistička obrada podataka.

Pri pregledu tkiva jetre nasumično je odabrano 10 testnih polja koja su obuhvaćala jetrene režnjiće unutar kojih su se mjerili:

1. promjeri stanica hepatocita: 10 stanica po režnjiću, svaka stanica je mjerena 2x, po dužoj i široj osi, pri čemu su mjerene najveće stanice koje imaju vidljive najveće jezgre (kako bismo bili sigurni da je prerezom zahvaćen centralni dio stanice)
2. promjeri jezgre hepatocita (10 jezgri unutar režnjića, svaka jezgra je mjerena 1x, pri čemu su mjerene samo najveće jezgre)
3. promjeri sinusoida koje se nalaze najbliže centru jetrenih režnjića odnosno centralnoj veni
4. promjeri centralnih vena, dva mjerenja po veni, mjerena po dužoj i široj osi

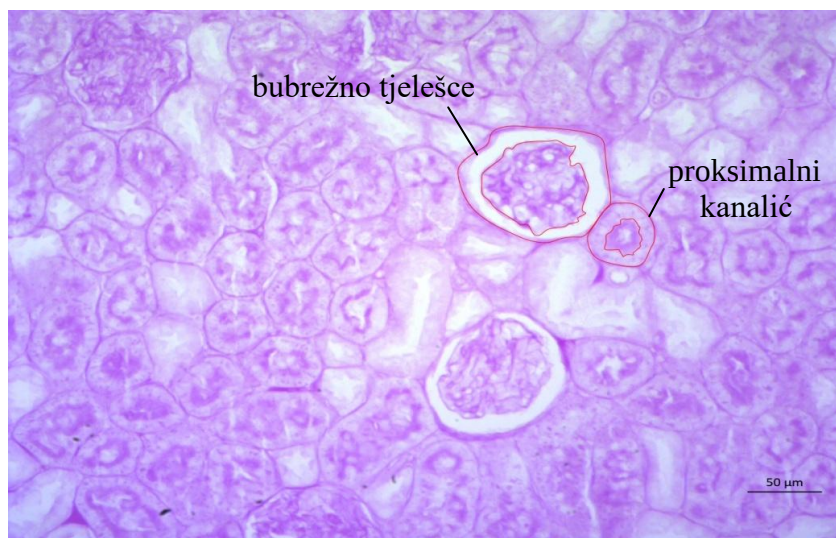


Slika 5. Histološki prikaz građe centralnog dijela jetrenog režnjića u kojem su izmjereni promjeri centralne vene (a), promjeri jezgri stanica (b) i samih stanica (c) te promjeri sinusoida (d) (PAS, 200x).

Kako bi se histomorfometrijski analiziralo tkivo bubrega, slikano je 10 nasumično odabranih testnih polja iz kore bubrega na kojima se vide bubrežna tjelešca, proksimalni i distalni kanalići. Kvantitativne histološke analize su obuhvatile:

1. mjerenje površine bubrežnih tjelešaca, ograničenih vanjskim listom Bowmanove čahure

2. mjerenje površine glomerula
3. izračun površine interkapsulnog prostora unutar bubrežnog tjelešca
4. mjerenje površine 5 poprečno presječenih proksimalnih kanalića (od bazalne membrane do apikalne strane uključujući četkastu prevlaku)



Slika 6. Histološki prikaz građe bubrežnog tjelešca i proksimalnog kanalića (PAS, 200x).

2.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Tip raspodjele dobivenih podataka iz morfometrijskih mjerenja testiran je Kolmogorov-Smirnov testom. Kada je raspodjela podataka slijedila normalnu distribuciju (Kolmogorov – Smirnov test $p > 0,05$) u daljnjim statističkim analizama korišteni su parametrijski testovi, dok su u slučajevima kada raspodjela podataka nije bila normalna korišteni neparametrijski testovi. Sve vrijednosti izmjerenih površina i promjera prikazane su kao prosječna vrijednost, standardna devijacija (SD) te minimumi i maksimumi vrijednosti.

Korištenjem analize varijance (ANOVA) analizirane su razlike u morfometrijskim mjerama jezgri hepatocita između skupina štakora pod različitim tretmanom (između skupina crvena, plava i zelena). U slučajevima kad su rezultati bili statistički značajni ($p < 0,05$), dodatno je korišten post-hoc Tukey HSD test.

Neparametrijski Kruskal-Wallis test korišten je za analizu razlika u promjeru sinusoida, centralnih vena i promjera stanica između skupina štakora pod različitim tretmanom (između skupina crvena, plava i zelena). U slučajevima kad su rezultati bili statistički značajni ($p < 0,05$), dodatno je korišten Mann-Whitney U test. Isti neparametrijski statistički testovi

primijenjeni su za morfometrijske analize površina bubrežnih tjelešaca i glomerula, te površina proksimalnih kanalića i lumena kanalića smještenih u kori bubrega.

Studentov t-test ili Mann-Whitney U test su korišteni za analiziranje razlika između spolova, za sve mjerene parametre, za svaku pojedinu grupu (crvena, plava i zelena).

Sve statističke analize rađene su u programu SPSS 17.0 za Windows (SPSS Inc., SAD).

3. REZULTATI

Histomorfometrijskom analizom jetre ukupno je obuhvaćeno 34 životinja koje su bile podijeljene u tri eksperimentalne grupe:

1. u crvenoj skupini bilo je 13 životinja (6 mužjaka i 7 ženki) tretiranih s TCP-om
2. u plavoj (kontrolnoj) skupini bilo je 9 životinja (3 mužjaka i 6 ženki) tretiranih fiziološkom otopinom
3. u zelenoj skupini bilo je 12 životinja (6 mužjaka i 6 ženki) tretiranih s 5HTP-om

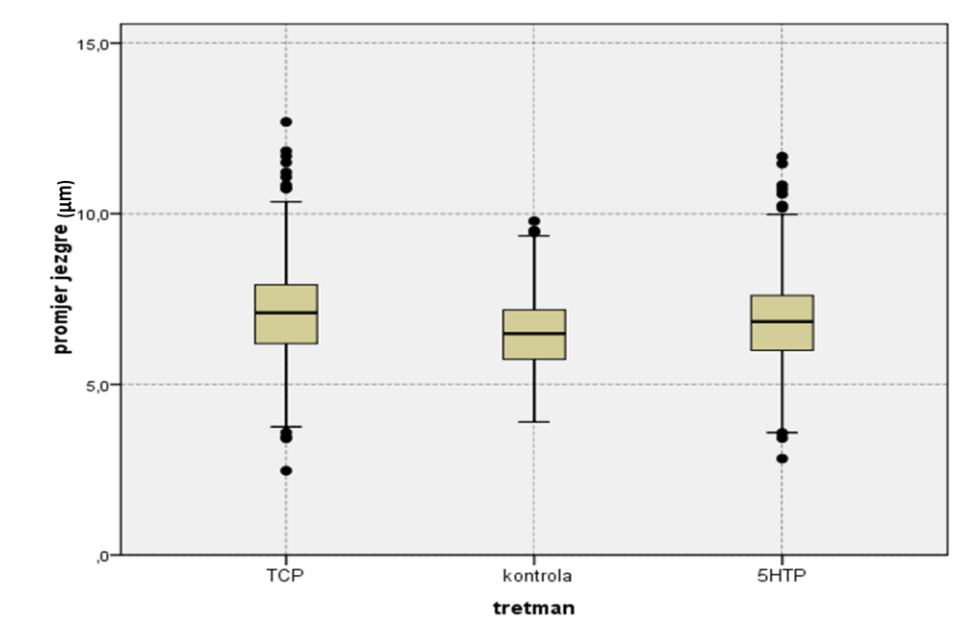
Histomorfometrijskom analizom bubrega ukupno obuhvaćeno 38 životinja koje su bile podijeljene u tri eksperimentalne grupe:

1. u crvenoj skupini bilo je 13 životinja (6 mužjaka i 7 ženki) tretiranih s TCP-om
2. u plavoj (kontrolnoj) skupini bilo je 12 životinja (6 mužjaka i 6 ženki) tretiranih fiziološkom otopinom
3. u zelenoj skupini bilo je 13 životinja (7 mužjaka i 6 ženki) tretiranih s 5HTP-om

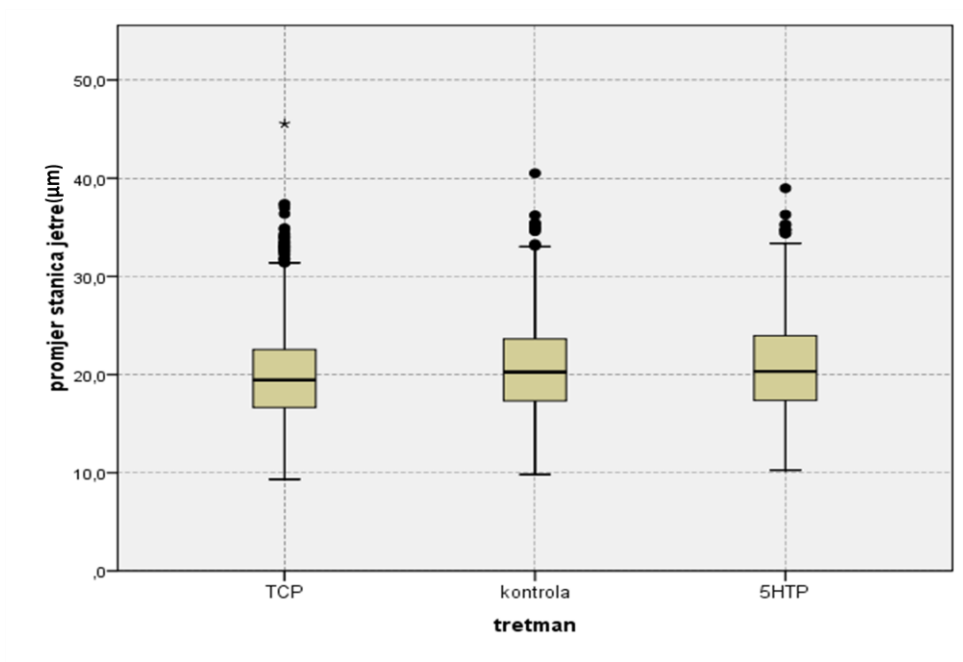
3.1. HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA JETRE ŠTAKORA

Osnovni morfometrijski pokazatelji strukture jetre očituju se u građi jetrenih režnjića, odnosno veličini stanica i jezgara jetrenih stanica, proširenih sinusoidnih kapilara koje se pružaju između tračaka stanica i centralne vene u središtu režnjića.

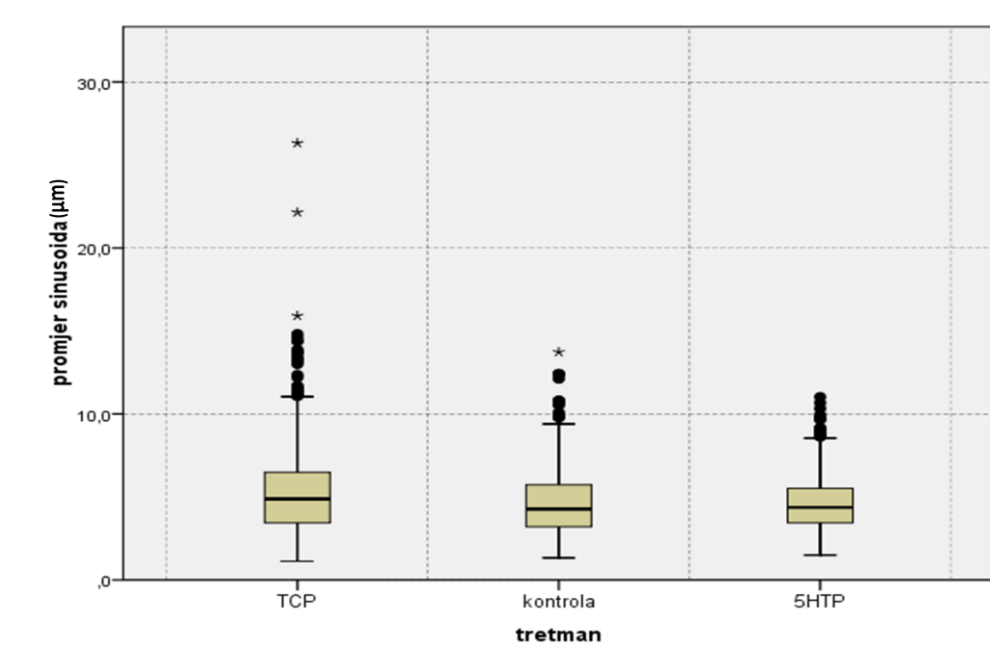
Izmjereni parametri i usporedba njihovih vrijednosti između tretiranih grupa prikazani su pomoću kutijastih dijagrama (*eng.* box and whisker plot), u kojem središnja crta označava medijan, dok sam pravokutnik označava vrijednosti gornjeg i donjeg kvartila. Rezultati su prikazani posebice za promjere jezgara (Slika 7) i jetrenih stanica (Slika 8) te za promjere sinusoida (Slika 9) i centralnih vena (Slika 10). Sumarni rezultati ovih mjerenja, s prikazom srednje vrijednosti, standardne devijacije te rasponima vrijednosti (minimum-maksimum) prikazani su u Tablicama 3 i 4.



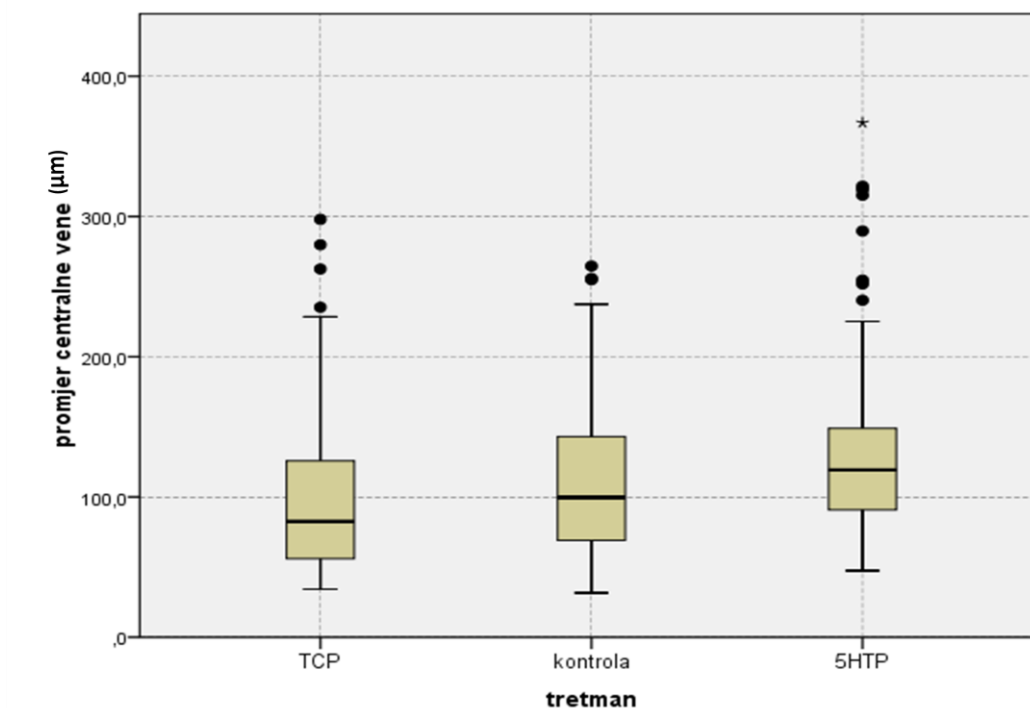
Slika 7. Promjeri jezgri jetrenih stanica prikazani za svaku eksperimentalnu grupu laboratorijskih štakora pomoću kutijastih dijagrama.



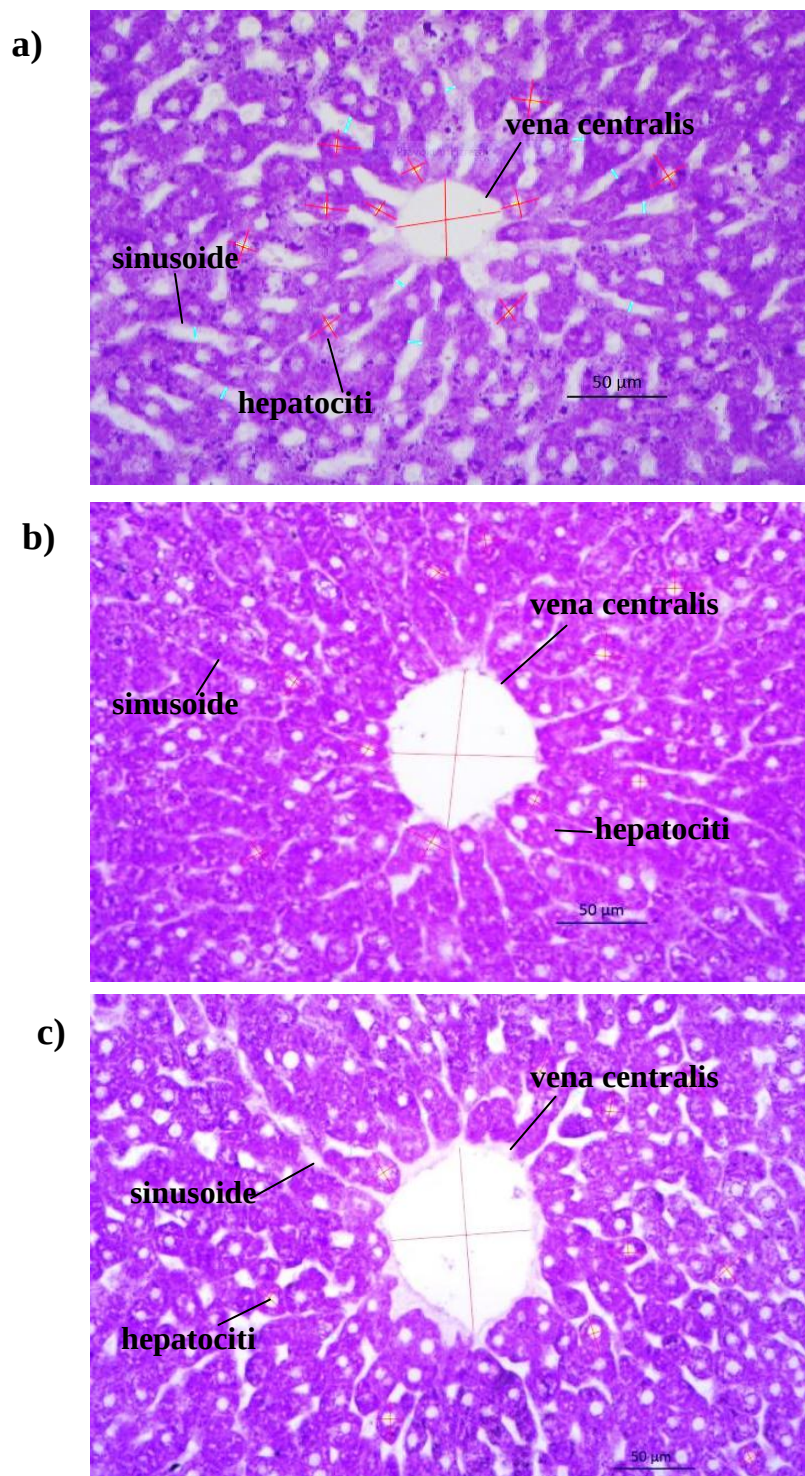
Slika 8. Promjeri jetrenih stanica prikazani za svaku eksperimentalnu grupu laboratorijskih štakora pomoću kutijastih dijagrama.



Slika 9. Promjeri sinusoida u jetrenim režnjićima jetre prikazani za svaku eksperimentalnu grupu laboratorijskih štakora, pomoću kutijastih dijagrama.



Slika 10. Promjeri centralne vene u jetrenim režnjićima prikazani za svaku eksperimentalnu grupu laboratorijskih štakora, pomoću kutijastih dijagrama



Slika 11. Histološki prikazi građe jetrenih režnjića u tri analizirane skupine životinja: a) skupina laboratorijskih štakora tretirani TCP-om, b) kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom i c) skupina štakora tretirana 5HTP-om (PAS 200x).

Tablica 3. Vrijednosti morfometrijskih mjerenja jetrenih stanica svih skupina laboratorijskih štakora u eksperimentu: Štakori tretirani TCP-om, kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom i skupina tretirana 5HTP-om (N-broj životinja, sr.vr.-srednja vrijednost, st.dev.-standardna devijacija, min.-maks.-raspon od minimuma do maksimuma).

Skupina		Promjer jezgri hepatocita/ μm				Promjer stanica hepatocita/ μm			
	spol (N)	sr.vr.	st.dev	min.	maks.	sr.vr.	st.dev.	min.	maks.
TCP	mužjaci (N=6)	7.31618	1.31277	3.41672	12.68944	21.03479	2.98290	12.58167	32.02962
	ženke (N=7)	6.92367	1.28446	2.47058	10.83967	18.81366	2.56700	12.85105	39.12227
KONTROLA	mužjaci (N=3)	6.61445	1.17665	3.93405	9.50077	21.05676	2.93227	11.43815	31.08230
	ženke (N=6)	6.41817	0.98737	3.89979	9.78336	20.40375	2.35715	13.71646	29.18473
5HTP	mužjaci (N=6)	7.03488	1.13632	3.84054	10.83445	21.27757	2.73331	14.02624	31.44809
	ženke (N=6)	6.65532	1.12876	3.57577	11.66905	20.24714	2.69269	13.57999	31.84103

Tablica 4. Vrijednosti morfometrijskih mjerenja centralnih vena i sinusoida u jetrenim režnjićima, svih skupina laboratorijskih štakora u eksperimentu: Štakori tretirani TCP-om, kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom i skupina tretirana 5HTP-om (N-broj životinja, sr.vr.-srednja vrijednost, st.dev.-standardna devijacija, min.-maks.-raspon od minimuma do maksimuma).

Skupina		Promjer sinusoida/ μm				Promjer centralnih vena/ μm			
	spol (N)	sr.vr.	st.dev	min.	maks.	sr.vr.	st.dev.	min.	maks.
TCP	mužjaci (N=6)	5.17823	2.85465	1.12849	26.32278	108.60758	62.86889	42.12468	297.95080
	ženke (N=7)	5.21852	1.93979	1.33794	13.24349	92.47882	46.76197	34.25904	235.28145
KONTROLA	mužjaci (N=3)	4.73897	2.23307	1.33247	13.73072	99.46687	52.14047	33.82739	255.79983
	ženke (N=6)	4.51561	1.67200	1.50901	10.80576	119.21605	53.95331	31.59091	264.61275
5HTP	mužjaci (N=6)	4.90773	1.66703	1.72012	11.02687	123.24836	50.55874	47.49888	315.10786
	ženke (N=6)	4.25340	1.39536	1.49978	9.79046	138.94458	66.81948	55.31421	366.77504

Mjerenje promjera jezgri hepatocita koji su se mjerili u centralnom dijelu jetrenih režnjića, oko centralne vene, pokazalo je da postoje razlike između tretiranih životinja, već na prikazu pomoću kutijastih dijagrama (Slika 7). Pri tome je vidljivo da su medijani promjera jezgra u kontrolnoj skupini manji u odnosu na dvije tretirane skupine. Rezultati statističkog testa (ANOVA, $F=71,77$, $p<0,001$) pokazali su statistički značajnu razliku koja je dodatno istražena *post hoc* Tukey HSD testom koji je utvrdio postojanje razlika između skupine tretirane TCP-om i kontrolne skupine ($p<0,001$), zatim skupine tretirane TCP-om i 5HTP-om ($p<0,001$), te kontrolne i skupine tretirane 5HTP-om ($p<0,001$). Srednja vrijednost promjera jezgara u kontrolnoj skupini iznosila je $6.61445\text{ }\mu\text{m}$ i st. dev. $1.17665\text{ }\mu\text{m}$ za muške životinje, sr.vr. $6.41817\pm 0.98737\text{ }\mu\text{m}$ za ženske životinje, dok su srednje vrijednosti jezgara životinja iz skupine tretirane TCP-om iznosile $5.17823\pm 2.85465\text{ }\mu\text{m}$ za muške životinje, a sr.vr. $6.92367\pm 1.28446\text{ }\mu\text{m}$ za ženske životinje i skupine tretirane 5HTP-om, sr.vr. $7.03488\pm 1.13632\text{ }\mu\text{m}$ za muške životinje, sr.vr. $6.65532\pm 1.12876\text{ }\mu\text{m}$ za ženske životinje (Tablica 3).

Histomorfometrijska mjerenja promjera jetrenih stanica (koja su obuhvaćala dvije mjere po najdužoj i najkraćoj osi za svaku stanicu) prikazana pomoću kutijastih dijagrama (Slika 8) pokazuju da su u skupini tretiranoj s TCP-om promjeri stanica nešto manji u odnosu na kontrolnu i skupinu tretiranu s 5HTP-om. Rezultati neparametrijskog Kruskal-Wallis testa pokazali su postojanje statistički značajne razlike između analiziranih skupina životinja (Chi-Square= $64,81$, $p<0,001$), pa se pristupilo daljnjoj analizi pomoću Mann-Whitney U testa koji je pokazao statistički značajnu razliku između skupine tretirane TCP-om i kontrolne skupine ($U=2093175$, $p<0,001$), i razliku između skupine tretirane s TCP-om i skupine koja je tretirana 5HTP-om ($U=2737827$, $p<0,001$), dok značajne razlike nije bilo između kontrolne i skupine tretirane 5HTP-om ($U=2123314$, $p=0,346$). Dakle, veličine stanica nisu pratile trend koji su pokazivale veličine jezgara jer su najveće jezgre zabilježene u skupini tretiranoj s TCP-om, dok su najveći promjeri stanica zabilježeni u skupini tretiranoj s 5HTP-om (sr.vr.: $21.27757\text{ }\mu\text{m}$ za muške i $20.24714\text{ }\mu\text{m}$ za ženske životinje), zatim u kontrolnoj skupini (sr.vr.: $21.05676\text{ }\mu\text{m}$ za muške i $20.40375\text{ }\mu\text{m}$ za ženske životinje), a skupina tretirana 5HTP-om je imala najmanje promjere, sa zabilježenom srednjom vrijednosti od $21.03479\text{ }\mu\text{m}$ za muške i $18.81366\text{ }\mu\text{m}$ za ženske životinje.

Nadalje, analiziranje promjena sinusoida koje su se mjerile u području oko centralne vene, pomoću neparametrijskog Kruskal-Wallis testa dobivena je statistički značajna razlika (Chi-Square= $44,70$, $p<0,001$) koja je dodatno istražena pomoću Mann-Whitney U testa koji je pokazao postojanje statistički značajne razlike u promjeru sinusoida između skupine tretirane

s TCP-om i kontrolne skupine ($U=501072$, $p<0,001$), te između skupina tretiranih TCP-om i 5HTP-om ($U=673798$, $p<0,001$), dok između kontrolne i skupine tretirane 5HTP-om razlika nije bila statistički značajna ($U=520747$, $p=0,280$).

Centralne vene, koje se nalaze u središnjem dijelu režnjića također su pokazale postojanje određenih promjena u veličini promjera, između analiziranih grupa životinja pri čemu su životinje u skupini tretiranoj s TCP-om pokazale suženje centralne vene, a u skupini tretiranoj s 5HTP-om proširenje centralne vene u odnosu na kontrolnu skupinu. Ta promjena je statistički potvrđena, prvo pomoću Kruskal-Wallis testa ($\text{Chi-Square}=25,63$, $p<0,001$), a zatim i usporednim Mann-Whitney U testom između pojedinih skupina koji je pokazao značajne razlike između skupine tretirane s TCP-om i kontrolne skupine ($U=4840$, $p<0,05$), skupine tretirane s TCP-om i skupine tretirane s 5HTP-om ($U=4889$, $p<0,001$), te kontrolne i skupine tretirane s 5HTP-om ($U=4371$, $p<0,05$).

Dodatno su analizirane razlike među spolovima, za svaku pojedinu grupu u tretmanu i za svaki analizirani parametar, a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 5. Dok su promjeri vene centralis bili bez razlika između spolova za sve istraživane grupe, pri testiranju promjera sinusoida vidljivo je da razlike između spolova nisu uočene za kontrolnu skupinu, dok su se statistički značajne razlike pojavile u skupini koja je tretirana TCP-om i skupini tretiranoj s 5HTP-om. Razlike među spolovima postojale su i za promjere stanica hepatocita i promjere jezgri hepatocita, ali za sve istraživane skupine životinja (Tablica 5).

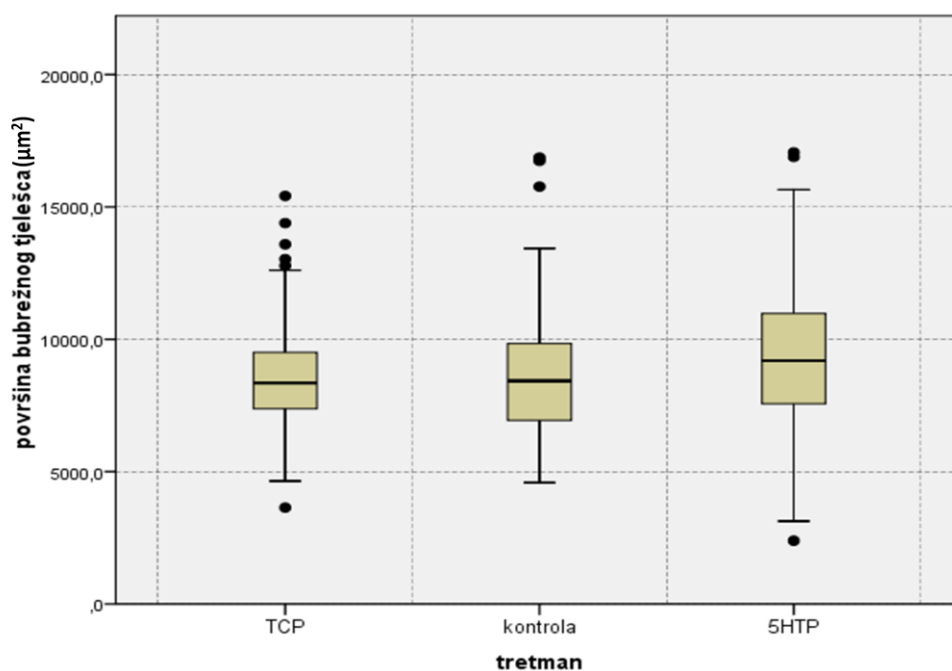
Tablica 5. Usporedba analiziranih parametara između spolova, provedena za svaku pojedinu skupinu laboratorijskih štakora u eksperimentu: Štakori tretirani TCP-om, kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom i skupina tretirana 5HTP-om.

Skupina	TCP	KONTROLA	5HTP
Analizirani parametar	Rezultati statističkog testa	Rezultati statističkog testa	Rezultati statističkog testa
promjer jezgri	Studentov T-test, N=599 jezgri mužjaka, N=700 jezgri ženki, P<0,001	Studentov T-test, N=300 jezgri mužjaka, N=600 jezgri ženki, P=0,013	Studentov T-test, N=610 jezgri mužjaka, N=599 jezgri ženki, P<0,001
promjer hepatocita	Mann-Whitney U test, N=1200 promjera stanica mužjaka, N=1400 promjera stanica ženki, p<0,001	Mann-Whitney U test, N=600 promjera stanica mužjaka, N=1200 promjera stanica ženki, p=0,006	Mann-Whitney U test, N=1200 promjera stanica mužjaka, N=1200 promjera stanica ženki, p<0,001
promjer sinusoida	Mann-Whitney U test, N=600 sinusoida mužjaka, N=700 sinusoida ženki, p=0,004	Mann-Whitney U test, N=300 sinusoida mužjaka, N=600 sinusoida ženki, p=0,810	Mann-Whitney U test, N=590 sinusoida mužjaka, N=600 sinusoida ženki, p<0,001
promjer centralne vene	Mann-Whitney U test, N=60 centralnih vena mužjaka, N=70 centralnih vena ženki, p=0,285	Mann-Whitney U test, N=30 centralnih vena mužjaka, N=60 centralnih vena ženki, p=0,059	Mann-Whitney U test, N=60 centralnih vena mužjaka, N=60 centralnih vena ženki, p=0,291

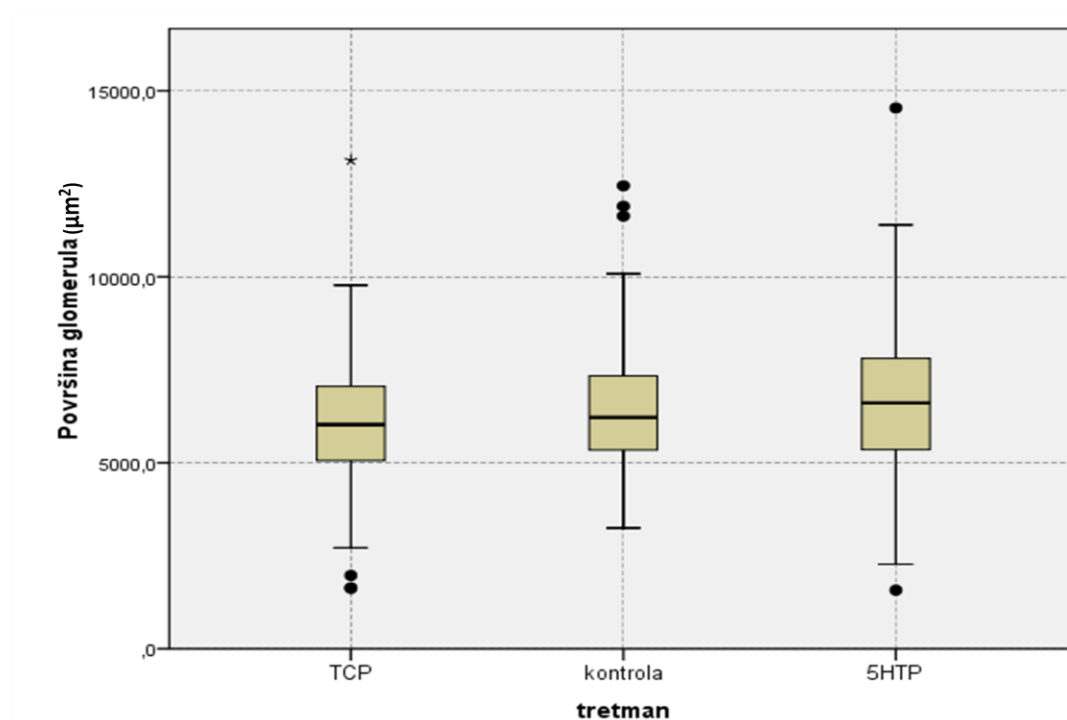
3.2. HISTOMORFOMETRIJSKA ANALIZA BUBREGA ŠTAKORA

Kako bi se analizirao utjecaj tretmana i poremećene homeostaze serotonina na histološku građu bubrega, analizirani su promjeri bubrežnih tjelešaca i posebice glomerula kao dijelova bubrežnih tjelešaca u kori bubrega, te promjeri proksimalnih kanalića koji se direktno nadovezuju na bubrežna tjelešca.

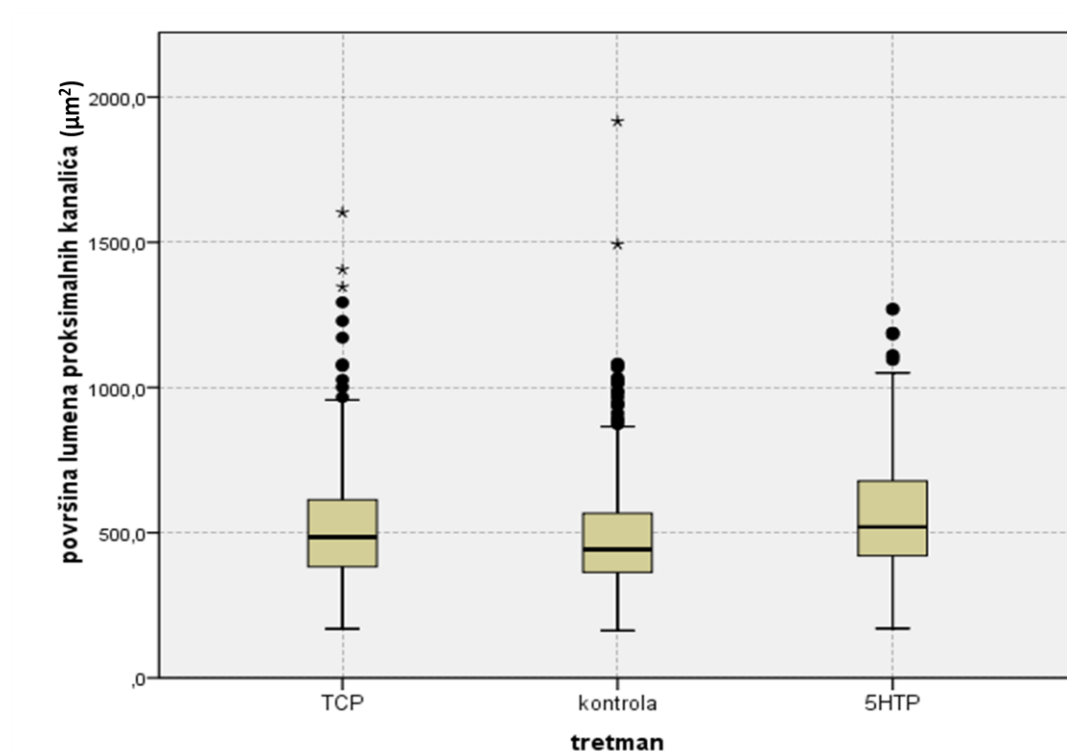
Izmjereni parametri i usporedba njihovih vrijednosti između tretiranih grupa prikazani su pomoću kutijastih dijagrama na Slikama 12 i 13. Rezultati su prikazani posebice za izmjerene površine bubrežnih tjelešaca, površine glomerula unutar bubrežnog tjelešca te za površine proksimalnih kanalića. Sumarni rezultati ovih mjerenja, s prikazom srednje vrijednosti, standardne devijacije te rasponima vrijednosti (minimum-maksimum) prikazani su u Tablicama 6 i 7.



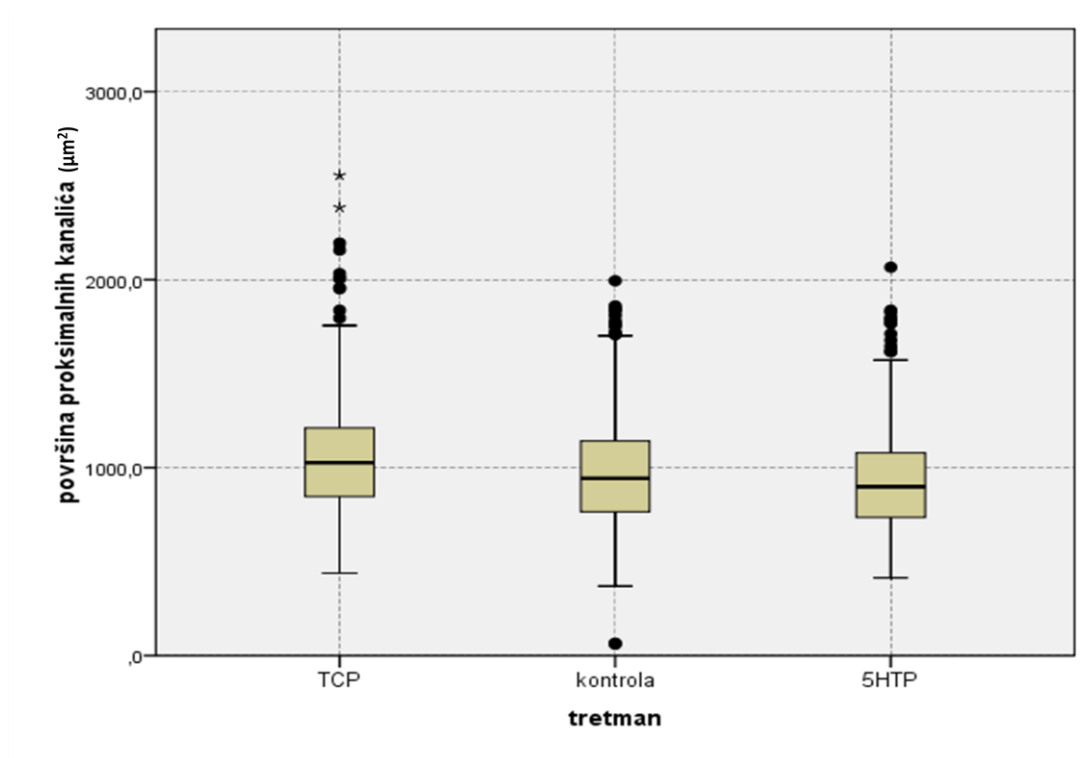
Slika 12. Površine bubrežnih tjelešaca u kori bubrega prikazane za svaku eksperimentalnu grupu laboratorijskih štakora, pomoću kutijastih dijagrama.



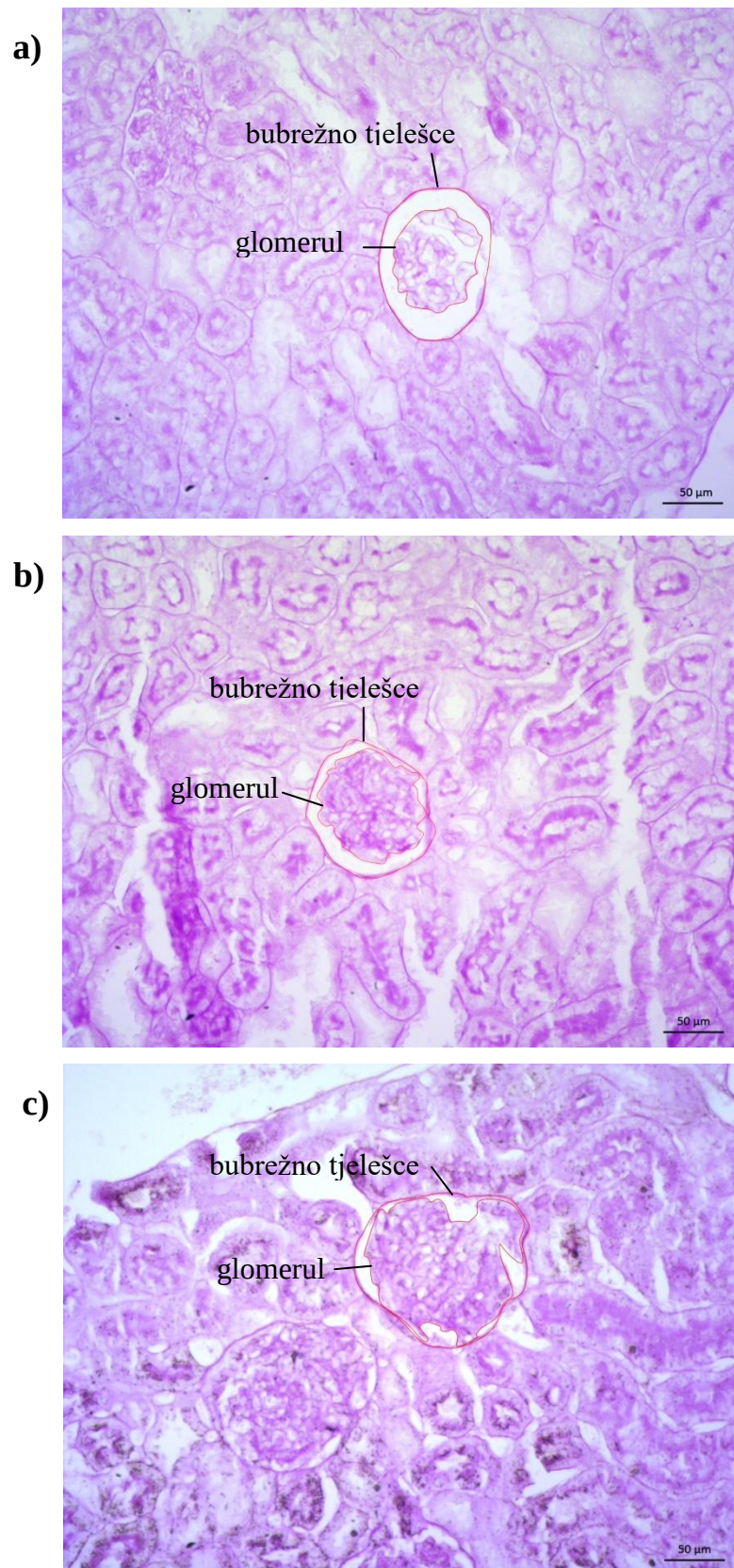
Slika 13. Površine glomerula unutar bubrežnih tjelešaca u kori bubrega prikazane za svaku eksperimentalnu grupu laboratorijskih štakora, pomoću kutijastih dijagrama.



Slika 14. Površine proksimalnih kanalića u kori bubrega prikazane za svaku eksperimentalnu grupu (crvena, plava i zelena) pomoću kutijastih dijagrama.



Slika 15. Lumeni proksimalnih kanalića u kori bubrega prikazani za svaku eksperimentalnu grupu laboratorijskih štakora, pomoću kutijastih dijagrama.



Slika 16. Histološki prikazi građe kore bubrega u tri analizirane skupine životinja: a) štakori tretirani TCP-om, b) kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom i c) skupina tretirana 5HTP-om (PAS, x200).

Tablica 6. Vrijednosti morfometrijskih mjerenja površina bubrežnih tjelešaca i površina glomerula u kori bubrega, svih skupina laboratorijskih štakora u eksperimentu: Štakori tretirani TCP-om, kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom i skupina tretirana 5HTP-om (N-broj životinja, sr.vr.-srednja vrijednost, st.dev.-standardna devijacija, min.-maks.-raspon od minimuma do maksimuma)

Skupina		Površina bubrežnih tjelešaca/ μm^2				Površina glomerula/ μm^2			
	spol (N)	sr.vr.	st.dev	min.	maks.	sr.vr.	st.dev.	min.	maks.
TCP	mužjaci (N=6)	8846.768	2093.128	3641.422	15415.594	6538.253	1849.203	1628.370	13133.630
	ženke (N=7)	8484.196	2064.729	4644.270	14391.062	5578.017	1423.253	1971.816	8515.883
KONTROLA	mužjaci (N=6)	8973.195	2337.955	4808.637	16865.851	6762.532	1656.113	3653.038	11896.139
	ženke (N=6)	8429.386	2179.132	4587.352	16739.624	6220.110	1771.716	3246.285	12446.544
5HP	mužjaci (N=7)	10011.050	2747.006	5807.419	17059.838	7401.121	2195.542	2927.619	14538.392
	ženke (N=6)	8823.833	2136.889	2391.541	12868.786	6030.075	1771.829	1576.098	9580.490

Tablica 7. Vrijednosti morfometrijskih mjerenja proksimalnih kanalića u kori bubrega, svih skupina laboratorijskih štakora u eksperimentu: Štakori tretirani TCP-om, kontroln skupina tretirana fiziološkom otopinom i skupina tretirana 5HTP-om (N-broj životinja, sr.vr.-srednja vrijednost, st.dev.-standardna devijacija, min.-maks.-raspon od minimuma do maksimuma)

Skupina		Površina proksimalnih kanalića/ μm^2				Površina lumena proksimalnih kanalića/ μm^2			
	spol (N)	sr.vr.	st.dev	min.	maks.	sr.vr.	st.dev.	min.	maks.
TCP	mušjaci (N=6)	1133.644	248.212	686.893	2383.603	582.047	176.763	220.898	1406.310
	ženke (N=7)	951.536	297.303	419.144	2554.552	447.815	163.357	169.206	1602.621
KONTROLA	mušjaci (N=6)	1095.153	270.357	60.597	1994.080	524.782	175.180	214.122	1916.446
	ženke (N=6)	849.670	271.390	369.582	1701.938	441.207	178.114	162.818	1492.656
5HTP	mušjaci (N=7)	1004.766	253.963	483.806	2065.906	607.681	195.060	266.006	1271.952
	ženke (N=6)	834.042	242.506	414.110	1794.285	507.071	159.119	170.174	1181.734

Tablica 8. Usporedba histomorfometrijskih parametara bubrega između spolova, provedena za svaku pojedinu skupinu laboratorijskih štakora u eksperimentu: Štakori tretirani TCP-om, kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom i skupina tretirana 5HTP-om.

Skupina	TCP	KONTROLA	5HTP
Analizirani parametar	Rezultati statističkog testa	Rezultati statističkog testa	Rezultati statističkog testa
bubrežna tjelešca	Mann-Whitney U test, N=60 bubrežnih tjelešaca mužjaka, N=70 bubrežnih tjelešaca ženki, P=0,289	Mann-Whitney U test, N=60 bubrežnih tjelešaca mužjaka, N=60 bubrežnih tjelešaca ženki, P=0,164	Mann-Whitney U test, N=70 bubrežnih tjelešaca mužjaka, N=60 bubrežnih tjelešaca ženki, P=0,038
glomeruli	Studentov T-test, N=60 glomerula mužjaka, N=70 glomerula, p=0,001	Studentov T-test, N=60 glomerula mužjaka, N=60 glomerula ženki, p=0,086	Studentov T-test, N=70 glomerula mužjaka, N=60 glomerula ženki, p<0,001
stanice proksimalnih kanalića	Mann-Whitney U test, N=300 proksimalnih kanalića mužjaka, N=340 proksimalnih kanalića ženki, p<0,001	Mann-Whitney U test, N=300 proksimalnih kanalića mužjaka, N=300 proksimalnih kanalića ženki, p<0,001	Mann-Whitney U test, N=350 proksimalnih kanalića mužjaka, N=300 proksimalnih kanalića ženki, p<0,001
lumen proksimalnih kanalića	Mann-Whitney U test, N=300 lumena kanalića mužjaka, N=340 lumena kanalića ženki, p<0,001	Mann-Whitney U test, N=300 lumena kanalića mužjaka, N=300 lumena kanalića ženki, p<0,001	Mann-Whitney U test, N=350 lumena kanalića mužjaka, N=300 lumena kanalića ženki, p<0,001

Uvidom u kutijaste dijagrame vidljivo je postojanje razlika u površini bubrežnih tjelešaca između tretiranih grupa, pri čemu skupina tretirana 5HTP-om pokazuje više vrijednosti medijana u odnosu na druge dvije skupine. Ovaj rezultat potvrđen je i statističkim neparametrijskim Kruskal-Wallis testom (Chi-Square=9,4, P=0,009), te dodatnim Mann-Whitney U testovima koji su pokazali statistički značajne razlike između skupina koje su tretirane 5HTP-om i skupine tretirane TCP-om (U=6840, p=0,008), te skupine tretirane 5HTP-om i kontrolne skupine (U=6290, p=0,008), dok razlike između kontrolne i skupine tretirane TCP-om nisu bile statistički značajne (U=7767, p=0,954).

Slični rezultati dobiveni su i za izmjerene površine glomerula, odnosno klupka kapilara smještena unutar bubrežnih tjelešaca, pa su medijani površina glomerula najveći za skupinu tretiranu 5HTP-om-om (Slika 13). U Tablici 6. prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije za površine glomerula, koje su najviše za skupinu tretiranu 5HTP-om (sr.vr.: 7401.121 μm^2 za muške i 6030.075 μm^2 za ženske životinje), a zatim slijedi kontrolna skupina (sr.vr.: 6762.532 μm^2 za muške i 6220.110 μm^2 za ženske životinje) i skupina tretirana TCP-om (sr.vr.: 6538.253 μm^2 za muške i 5578.017 μm^2 za ženske životinje).

Statističkom analizom pomoću ANOVA testa, dobivena je značajna razlika između grupa (p=0,005), te *post hoc* Tukey HSD testom koji je pokazao značajnu razliku između skupine tretirane s 5HTP-om i skupine tretirane s TCP-om (p=0,004) dok razlike između skupina koje su tretirane s TCP-om i kontrolne skupine (p=0,115) te kontrolne i skupine tretirane s 5HTP-om (p=0,468) nisu bile statistički značajne.

Morfometrijska mjerenja proksimalnih kanalića pokazala su da skupina tretirana s 5HTP-om najviše odudara od vrijednosti kontrolne skupine, pri tome su srednje vrijednosti površine kanalića za skupinu tretiranu s 5HTP-om iznosile 1004.766 μm^2 za muške životinje, sr.vr. 834.042 μm^2 za ženske životinje, a za kontrolnu skupinu sr.vr. 1095.153 μm^2 za muške životinje, sr.vr. 849.670 μm^2 za ženske životinje (Tablica 7). Rezultati statističkih analiza pokazali su postojanje značajne statističke razlike između skupina u površini kanalića i površini lumena kanalića (Kruskal-Wallis, oba p<0,001). Rezultati Mann-Whitney U testa pokazali su značajnu razliku između skupina tretiranih s TCP-om i 5HTP-om u površini stanica kanalića (U= 156630, p<0,001) i lumena kanalića (U= 176154, p<0,001), između skupine tretirane s TCP-om i kontrolne skupine u površini stanica kanalića (U= 164306, p<0,001) i lumena kanalića (U= 169639, p<0,001), te između kontrolne i skupine tretirane s 5HTP-om u površini stanica kanalića (U= 177126, p=0,005) i lumena kanalića (U= 142897, p<0,001).

Statističko testiranje postojanja razlika među spolovima, za svaku pojedinu grupu u tretmanu i za svaki analizirani parametar u kori bubrega, prikazano je u Tablici 8. Dok površine glomerula i bubrežnih tjelešaca nisu pokazivale razlike u spolovima unutar kontrolne skupine, statistički značajne razlike među spolovima su se pojavile u obje tretirane skupine s poremećenom homeostazom serotonina (TCP i 5HTP). Razlike među spolovima u građi proksimalnih kanalića su utvrđene za sve skupine.

4. RASPRAVA

U ovom radu su laboratorijski štakori perinatalno tretirani prekursorom sinteze serotonina, 5-hidroksitriptofanom (5HTP) ili neselektivnim inhibitorom monoamin-oksidge (MAO), tranilciprominom (TCP), kako bi se uzrokovalo povišenje razine serotonina i promjena njegove homeostaze. Tretman 5HTP-om doveo je do povišenja koncentracije serotonina samo u perifernom odjeljku, dok se tretmanom TCP-om povećala koncentracija serotonina u oba odjeljka. Tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razdoblja krvno-moždana barijera još uvijek nije u potpunosti formirana, što omogućuje prelazak serotonina iz jednog odjeljka u drugi. Promjena metabolizma serotonina u bilo kojem od odjeljaka može dovesti do narušavanja serotoninске homeostaze, što kasnije može dovesti do različitih razvojnih poremećaja.

Razlika između sve tri tretirane skupine štakora vidljive su u morfometrijskim parametrima i jetre i bubrega. Morfometrijsko mjerenje jezgri u hepatocitima pokazalo je da su promjeri jezgri u kontrolnoj skupini, manji u odnosu na dvije tretirane skupine. Nadalje, uočene su promjene na promjerima stanica hepatocita, koje su bile najmanje u skupini tretiranoj s TCP-om, dok između skupine tretirane s 5HTP-om i kontrolne skupine nije uočena značajna razlika u promjeru stanica. Promjene u veličini stanica često su povezane s proliferacijskim aktivnostima tkiva, jer se diobama stanica povećava njihov broj ali je udio citoplazme u novim stanicama kćerima nešto manji u odnosu na zrele stanice. Studija koja se bavila utjecajem razine serotonina na regeneraciju jetre pokazala je da povišene koncentracije serotonina povećavaju proliferaciju jetre i sintezu DNA (Papadimas i sur. 2012). S obzirom da je skupina tretirana s TCP-om imala najmanje promjere stanica u odnosu na kontrolnu skupinu, moguće je da tretman štakora s TCP-om koji uzrokuje povišenje serotonina u oba odjeljka, utječe na proliferaciju hepatocita u jetri. No, s obzirom da osim proliferacije, serotonin može uzrokovati i steatozu (masna jetra) te povećava mogućnost nastanka tumora, potrebno je detaljno razjasniti njegove molekularne mehanizme (Niture i sur. 2018), kako bi se mogli razlikovati njegovi pozitivni i negativni učinci.

Nadalje, pri testiranju promjera sinusoida pojavile su se statistički značajne razlike ponovno za skupinu tretiranu s TCP-om, u odnosu na kontrolnu i skupinu tretiranu s 5HTP-om. Ovaj rezultat nije iznenađujući jer je poznato da serotonin smanjuje poroznost endotelних stanica sinusoida djelovanjem na kalcijeve kanale koji uzrokuju suženje pora samih sinusoida (Braet i sur. 2002), a samim time i nakupljanje tekućine te proširenje samih sinusoida. Mjerenjem

centralnih vena, životinja u skupini tretiranoj s TCP-om, pokazale su suženje centralne vene, dok je u skupini tretiranoj s 5HTP-om došlo do proširenja centralne vene u odnosu na kontrolnu grupu.

Uočene su i određene kvantitativne morfometrijske promjene koje su bile vezane uz spol tretiranih životinja. Razlike među spolovima primijećene su za promjere stanica i jezgri hepatocita u svim tretiranim skupinama, pa je moguće da te razlike nisu posljedica samog eksperimenta. Nadalje, pri testiranju sinusoida pojavile su se statistički značajne razlike između skupine tretirane 5HTP-om skupine tretirane TCP-om, dok u kontrolnoj skupini tih razlika nije bilo. Stoga bi trebalo detaljnije utvrditi da li povišene koncentracije serotonina imaju različit utjecaj na mužjake i ženke, s obzirom da su razlike između spolova zabilježene samo u životinja s povišenom razinom serotonina.

Dobiveni rezultati su u skladu s objavljenim znanstvenim istraživanjima koja su usmjerena na promjenu građe jetre s promijenjenom homeostazom serotonina. Serotonin djeluje kao neurotransmitter i neuroendokrini hormon, a u jetri regulira proliferaciju i funkciju hepatocita, Kupfferovih i Ittovih stanica i epitelnih stanica žučnih kanalića (Ruddell i sur. 2008). Dosadašnja istraživanja pokazuju da promijenjene razine serotonina u središnjem živčanom sustavu direktno utječu na funkcije jetre i na niz akutnih i kroničnih bolesti jetre (Holt i sur. 2002; Lozeva i sur. 2004). Stoga je moguće da tretman TCP-om koji mijenja razine serotonina u oba odjeljka, izaziva veće promjene u jetri, u odnosu a životinje tretirane s 5HTP-om.

Tijekom primjene 5HTP-a može doći i do drugih fizioloških posljedica, jer je utvrđeno da djeluje na porođajnu masu i stopu preživljenja mladunaca, što se povezuje s indirektnim povišenjem razine 5HT u mozgu mladunaca, koje ima negativan utjecaj na razvoj fetalnog mozga (Blažević 2013).

Studije koje su pratile promjene građe jetre pod utjecajem tranilcipromina (TCP), utvrdile su da inhibitor sinteze serotonina može dovesti do akutnog oštećenja jetre (Bethesda i sur. 2012). Perinatalni tretman štakora TCP-om uzrokovao je i smanjeni broj okoćenih mladunaca po majci kao i nisku stopu preživljenja. Veliki broj mladunaca je okoćeno mrtvo ili je uginulo ubrzo nakon okota.

Morfometrijskim mjerenjem bubrega, uočeno je odstupanje u rezultatima skupine tretirane 5HTP-om. Za sve mjerene parametre: površinu bubrežnog tjelešca, glomerula i proksimalnih kanalića, ova je skupina pokazala više vrijednosti medijana u odnosu na kontrolnu i skupinu tretiranu s TCP-om.

Dok su razlike među spolovima u građi proksimalnih kanalića utvrđene za sve skupine, što indicira da te razlike nisu povezane s tretmanom u eksperimentu, zanimljivo je da se razlike među spolovima pojavljuju pri mjerenju površina glomerula i bubrežnih tjelešaca samo za skupinu tretiranu s 5HTP-om i TCP-om, ali ne i za kontrolnu skupinu. Stoga se slično kao i u jetri, na strukturama na kojima se odvija filtracija (sinusoide u jetri, glomerul u bubrežnom tjelešcu) pojavljuje značajna razlika između muškog i ženskog spola pri povišenim koncentracijama serotonina.

Dobiveni rezultati su i kod bubrega u skladu sa znanstvenim studijama koje su pratile promjene u građi bubrega s narušenom homeostazom serotonina. Studija koja je pratila utjecaj neposrednog prekursora serotonina na hipertenziju u trudnoći, potvrdila je da je perinatalnom primjenom 5HTP-a došlo do promjene u funkciji bubrega. Uz to, kod dijela mladunaca štakora je primjećena je i nekroza bubrega (Salas i sur. 2007). U drugim studijama utvrđena je povezanost glomerularne hiperfiltracije i povećanog interkapsularnog prostora Bowmanove čahure s povećanim hidrostatskim tlakom kroz glomerularne kapilare. Povećani hidrostatski tlak u interkapsularnom prostoru uzrokuje oštećenja epitelnih stanica parijetalnog lista Bowmanove čahure i dovodi do hipertrofije bubrežnog tjelešca. Povećani lumeni proksimalnih kanalića isto su tako uzrokovani povećanim hidrostatskim tlakom, što može dovesti do prorastanja vezivnog tkiva i smanjene funkcije bubrega (Tobar i sur. 2013).

Rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju da postoje razlike u mehanizmima djelovanja TCP-a i 5HTP-a, budući da TCP pokazuje veći utjecaj na jetru dok je 5HTP imao značajniji utjecaj na bubrege.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s dosadašnjim spoznajama, koje pokazuju da uzimanje pripravaka kao što su antidepresivi ili droge koje povišuju razine serotonina tijekom trudnoće, mogu kasnije uzrokovati poremećaje u razvoju potomstva (Blažević 2013). Iz tog razloga je nužno provesti daljnja istraživanja o utjecajima 5HTP-a i TCP-a, kako na životinjskim modelima, tako i na humanoj populaciji kako bi se preispitala sigurnost primjene ovih spojeva u trudnica i dojilja.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati histomorfometrijske analize jetre i bubrega eksperimentalnih štakora i kontrolne skupine pokazali su da:

- Perinatalna i postnatalna primjena neposrednog prekursora sinteze serotonina (5HTP) ili inhibitora njegove razgradnje (TCP) izaziva poremećaj homeostaze serotonina u perifernom odjeljku i djeluje na ključne strukturne dijelove jetre i bubrega
- Morfometrijski parametri jetre i bubrega pokazuju statistički značajnu razliku između skupine koja je tretirana TCP-om, skupine koja je tretirana 5HTP-om i kontrolne skupine koja je tretirana fiziološkom otopinom što znači da oba tretmana induciraju značajne strukturne promjene u istraživanim organima
- Rezultati pokazuju da postoje razlike i u mehanizmima djelovanja TCP-a i 5HTP-a, budući da TCP pokazuje veći utjecaj na jetru dok je 5HTP imao značajniji utjecaj na bubreg
- Hiperserotoninemija koja je izazvana u tretiranim životinja i njen utjecaj na jetru i bubrege zabilježene u ovom istraživanju pokazuje da su potrebna daljnja istraživanja promjena koje se odvijaju u perifernom odjeljku, da bi se identificirale sve fiziološke promjene koje nastaju prilikom uzimanja 5HTP-a ili TCP-a kod žena tijekom trudnoće i dojenja

6. LITERATURA

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

Blažević S. (2013): Utjecaj perinatalne primjene prekursora sinteze ili inhibitora razgradnje serotonina na serotoninsku homeostazu u odraslih štakora, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Braet F., Wisse E. (2002): Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review, *Comparative Hepatology*, 1:1.

Eroschenko V.P. (2012): *Atlas of Histology with Functional Correlations*, LWW, North American Edition.

Papadimas G.K., Tzirogiannis K.N., Mykoniatis M.G., Grypioti A.D., Manta G.A., Panoutsopoulos, G.I. (2012): The emerging role of serotonin in liver regeneration, *Swiss medical weekly*, **142**: 13548.

Holt D.E., Washabau R.J., Djali S., Dayrell-Hart B., Drobatz K.J., Heyes M.P., Robinson M.B. (2002): Cerebrospinal fluid glutamine tryptophan and tryptophan metabolite concentrations in dogs with portosystemic shunts, *American Journal of Veterinary Research*, **63**: 1167-1171.

Hranilovic D., Blazevic S., Ivic N., Cicin-Sain L., Oreskovic D. (2011): The effects of the perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranylcypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats, *Neurochemistry International*, **59**: 202-207.

Jacob H.J., Brown D.M., Bunker R.K., Daly M.J., Dzau V.J., Goodman A., Koike G., Kren V., Kurtz T., Lernmark A. i sur. (1995): A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*, *Nature genetics* **9**, 63-69.

Junquiera L.C., i Carneiro J. (2005): *Osnove histologije*, Školska knjiga, Zagreb.

Kozarić Z. (1997): Veterinarska histologija, Naklada Karolina, Zagreb.

Lozeva V., Montgomery J.A., Tuomisto L., Rocheleau B., Pannunzio M., Huet P.M., Butterworth R.F. (2004): Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis, *Journal of Hepatology*, **40**: 742-748.

Lucki I. (1998): The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin, *Society of Biological Psychiatry*, **44**: 151-162.

Niture S., Gyamfi MA., Kedir H., Arthur E., Ransom H., Deep G., Kumar D. (2018): Serotonin induced hepatic steatosis is associated with modulation of autophagy and notch signaling pathway, *Cell Communication Signaling*, 16:78.

Program za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka (2014): LabAnim, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Racke K., Reimann A., Schwörer H., Kilbinger H. (1995): Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural Brain Research*, **73**: 83-87.

Ruddell RG., Mann DA., Ramm GA. (2008): The function of serotonin within the liver, *J Hepatol*, **48** (4):666-75.

Salas P.S., Giacaman A., Romero W., Downey P., Aranda E., Mezzano D., Vio. P.C. (2007): Pregnant rats treated with a serotonin precursor have reduced fetal weight and lower plasma volume and kallikrein levels, *Hypertension*, **50**: 773-779.

Sherwood L. (2012): *Human Physiology: From Cells to Systems*, Cengage Learning, Melbourne.

Tobar A., Ori Y., Benchetrit S., Milo G., Herman-Edelstein M. i sur. (2013): Proximal tubular hypertrophy and enlarged glomerular and proximal tubular urinary space in obese subjects with proteinuria, *PLoS ONE*, 8 (9).

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

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.

Izvori s interneta:

Pravilnik, NN broj 55/13. Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe
Zakon, NN 135/2006. Zakon o zaštiti životinja

<http://www.biovaria.org/>

<http://www.ccac.ca/>

<http://www.criver.com/>

<http://www.oregonstate.edu/>