Socijalno i emotivno ponašanje štakora nakon perinatalne primjene prekursora serotonina

Čolić, Lejla

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:745937

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Lejla Čolić

Socijalno i emotivno ponašanje štakora nakon perinatalne primjene prekursora serotonina

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

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

POPIS KRATICA

5HIAA	5- hidroksiindoloctena kiselina
5HT	5- hidroksitriptamin
5HTP	5- hidroksitriptofan
FO	fiziološka otopina
MAO	monoaminooksidaza
NAD +/ NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
PND	postnatalni dan
SBP	serotonin vezajući protein (eng. *serotonin- binding protein*)
SERT	serotoninski transporter (eng. *serotonin transporter*)
SŽS	središnji živčani sustav
TPH	triptofan hidroksilaza

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno- matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

SOCIJALNO I EMOTIVNO PONAŠANJE ŠTAKORA NAKON PERINATALNE PRIMJENE PREKURSORA SEROTONINA

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

SAŽETAK

Serotonin (5- hidroksitriptamin, 5HT) je biološki aktivan amin. Nalazi se u mozgu i na periferiji gdje vrši različite fiziološke uloge. 5HT također kontrolira razvoj mozga. Promjene u sustavu koji regulira metabolizam i funkciju 5HT mogle bi predstavljati jednu od mogućih bioloških podloga poremećaja ponašanja u koje spada i autizam. Smatra se da visoka razina 5HT u krvi, u doba fetalnog i ranog postanatalnog razvoja, može inhibirati rast i razvoj 5HT neurona i tako dovesti do anatomskih i funkcionalnih promjena u mozgu. Kako bi se ispitale posljedice visoke razine 5HT u krvi u doba perinatalnog razvoja na središnji odjeljak 5HT, štakori su bili tretirani prekursorom 5HT, 5- hidroksitriptofanom (5HTP, 25mg/kg), od 13. gestacijskog dana do 21. postnatalnog dana života. U ovom radu smo istražili posljedice perinatalnog tretmana prekursorom serotonina na kognitivno, socijalno i emotivno ponašanje štakora. Eksperimentalne štakore tretirane 5HPT-om i kontrolne štakore tretirane fiziološkom otopinom podvrgnuli smo bateriji testova ponašanja kojima smo redom ispitali: učenje i kognitivnu rigidnost, lokomotorno ponašanje, anksioznost i eksploratorno ponašanje, socijabilnost te reakciju i habituaciju na opetovani zvučni podražaj. Skupina tretirana 5HPT-om pokazala je povećanu lokomotronu aktivnost i anksioznost, te smanjenu socijabilnost i habituaciju na zvuk visoke frekvencije u odnosu na kontrolnu skupinu. Sposobnost učenja i kognitivna rigidnost nisu se razlikovale između skupina. Rezultati pokazuju da je perinatalni tretman prekursorom serotonina utjecao na ponašanja regulirana serotoninom, što ukazuje na promjene u središnjem odjeljku 5HT nastale tijekom razvoja mozga.

(36 stranica, 13 slika, 74 literaturna navoda, jezik izvornika: Hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: 5- hidroksitriptofan, serotonin, štakor, ponašanje, hiperserotoninemija
Voditelj: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.
Ocjenitelji: dr. sc. Antun Alegro, doc.
dr. sc. Davor Zanella, doc.
Rad prihvaćen: 07.04.2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

SOCIAL AND EMOTIONAL BEHAVIOUR IN RATS AFTER PERINATAL TREATMENT WITH SEROTONIN PRECURSOR

Lejla Čolić
Faculty of Science, University of Zagreb
Division of Biology, Department of Animal Physiology
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Serotonin (5- hydroxytryptamine, 5HT) is a biologically active amine present in both, brain and peripheral tissues where it serves different physiological functions. 5HT also regulates brain development. Disruption of 5HT metabolic pathway or impairments in its function could represent a base for different bahavioural disorders including autism. During prenatal and early postnatal development, high concentrations of serotonin in blood could inhibit 5HT neuronal growth and differentiation, and so cause anatomical and functional changes in brain. To examine consequences of high blood 5HT concentrations during perinatal development, rats were treated with 5HT precursor, 5HTP (5- hydroxytryptophan, 25mg/kg) from 13th gestational day till 21st postnatal day. In this study we explored consequences of the mentioned perinatal treatment on cognitive, social and emotional behaviour in rats. Experimental group (treated with 5HTP) and control group (treated with saline solution) of rats were submitted to the battery of tests. We examined learning and cognitive rigidity, locomotor activity, anxiety and exploratory behaviour, sociability, and reaction and habituation to repeated high-frequency sound. Experimental group displayed significantly higher level of locomotion and anxiety, and showed lower sociability and ability to habituate to the repeated high-frequency sound. Learning capacity and cognitive rigidity did not differ between the groups. These results show that the treatment with 5HTP has influenced 5HT-regulated bahaviours, and indicate changes in the central 5HT compartment that occurred during brain development.

(36 pages, 13 figures, 74 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in Central biological library.
Key words: 5- hydroxytryptophan, serotonin, rat, behaviour, hyperserotonemia
Supervisor: dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.
Reviewers: dr. Antun Alegro, Asst. Prof.., dr. Davor Zanella, Asst. Prof..
Thesis accepted: 07.04.2010.

SADRŽAJ

1. UVOD..... 1

1.1. SEROTONIN..... 2

1.1.1. Serotoninski receptori..... 2

1.1.2. Metabolizam serotonina..... 2

1.2. SEROTONINSKI ODJELJCI..... 4

1.2.1. Serotoninski sustav u mozgu..... 4

1.2.2. Periferni serotoninski sustav..... 7

1.2.3. Povezanost središnjeg i perifernog serotoninskog sustava..... 8

1.3. PROMJENE SEROTONINSKE HOMEOSTAZE..... 9

1.3.1. Serotonin i poremećaji ponašanja..... 9

1.3.2. Autizam..... 10

1.3.3. Hiperserotoninemija..... 11

2. CILJ ISTRAŽIVANJA..... 12

3. MATERIJALI I METODE..... 14

3.1. MATERIJALI..... 15

3.1.1. Životinje..... 15

3.1.2.Aparatura..... 15

3.2. TESTOVI PONAŠANJA..... 18

3.2.1. Učenje i kognitivna rigidnost..... 18

3.2.2. Lokomotorna aktivnost..... 19

3.2.3. Anksioznost i eksploracijsko ponašanje..... 19

3.2.4. Socijalni izbor..... 19

3.2.5. Reakcija na opetovani zvučni podražaj..... 20

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA..... 20

4. REZULTATI..... 22

4.1. UČENJE I KOGNITIVNA RIGIDNOST..... 23

4.2. LOKOMOTORNA AKTIVNOST..... 25

4.3. ANKSIOZNOST I EKSPLATORNO PONAŠANJE..... 26

4.4. SOCIJALNI IZBOR..... 27

4.5. REAKCIJA NA OPETOVANI ZVUČNI PODRAŽAJ..... 29

5. RASPRAVA..... 31

6. ZAKLJUČAK..... 35

7. LITERATURA..... 37

1. UVOD

1.1. SEROTONIN

Serotonin (prema IUPAC 5- hidroksitriptamin ili 3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol, skraćeno 5HT) je biogeni amin koji pripada skupini monoaminskih neurotransmitera i neuromodulatora. Godine 1948. M. Rapport i sur. su ga izolirali iz krvnog seruma i zbog njegovih vazokonstrikcijskih svojstava ga nazvali serotonin (Frazer i Hensler 1999). 5HT je izvanstanična signalna molekula koja vrši mnogobrojne funkcije u središnjem živčanom sustavu i drugim organskim sustavima (krvožilni, probavni, i dr.). U tijelu nalazimo dva serotoninska odjeljka- središnji kojem pripadaju serotoninski neuroni smješteni u jezgrama rafe (lat. *raphé nuclei*) u središnjem živčanom sustavu (SŽS) i periferni koji čine ostali organski sustavi. 90% ukupne količine serotonina se nalazi u perifernom odjeljku organizma gdje sudjeluje u mnogobrojnim fiziološkim procesima (Caspi i sur. 2008). U središnjem živčanom sustavu djeluje kao neurotransmiter te utječe na niz bihevioralnih funkcija, a pronađen je i kao intermedijarna molekula u sintezi melatonina u epifizi (Frazer i Hensler 1999). Nalazimo ga u ranom razvoju mozga što implicira njegovu ulogu u umnožavanju, migraciji i diferencijaciji neurona (Whitaker-Azmitia 2001, 2005). Kod životinja se pojavljuje vrlo rano u evoluciji (od početaka bilateralno simetričnih životinja), a pronalazimo ga i u nekih biljaka *(Juglans, Urtica dioca, Solanum lycopersicum*).

1.1.1. Serotoninski recptori

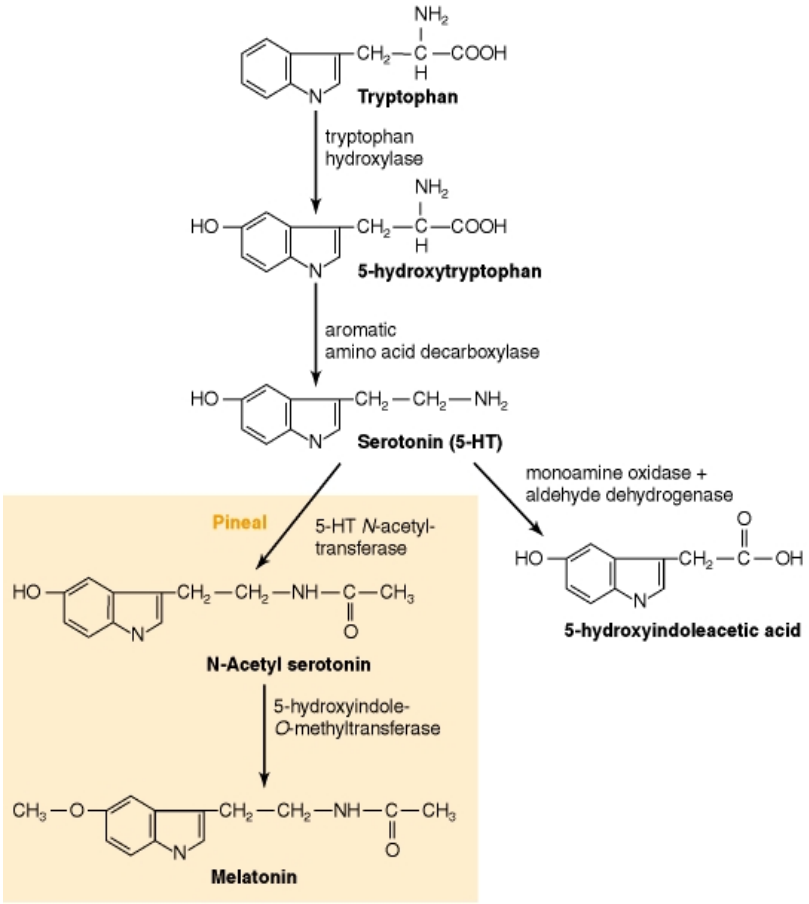
Serotonin se veže na 15 tipova 5HT receptora grupiranih u 6 obitelji (od $5HT_1$ do $5HT_7$) s obzirom na signalni mehanizam i primarnu strukturu receptora (Frazer i Hensler 1999, www.themedicalbiochemistrypage.org). Svi tipovi su prisutni u mozgu, a pojedini su prisutni uglavnom u drugim sustavima, na primjer $5HT_4$ se većinom nalazi u sluznici crijeva (Berger i sur. 2009). Uz izuzetak $5HT_3$ receptora svi pripadaju nadobitelji receptora vezanih uz G-proteine (metabotropni receptori) koji modificiraju aktivnost ionskih kanala, adenilat ciklaze ili fosfolipaze C. $5HT_3$ receptori su ionski kanali (Frazer i Hensler 1999, Kolb i Whishaw 2005, www. themedicalbiochemistrypage.org).

1.1.2. Metabolizam serotonina

Prvi korak hidroksilacija L-triptofana, je kataliziran enzimom triptofan hidroksilaza (TPH) koji je ujedno i ograničavajući faktor sinteze (Caspi i sur. 2008, www. themedicalbiochemistrypage.org). Enzim se nalazi u serotonergičnim neuronima u SŽS, u epifizi, enterokromafinskim stanicama sluznice tankog crijeva, te u neuronima mijenteričnog pleksusa (Côte i sur. 2003). Kod svih vertebrata pronađena su dva izoenzima TPH1 i TPH2 kodirana s dva različita gena. Ekspresija gena *Tph1* se odvija u epifizi i enterokromafinskim stanicama, a ekspresija gena *Tph2* u serotogeničnim sneuronima u SŽS i neuronima mijenteričnog pleksusa . Sličnost između TPH1 i TPH2 u slijedu aminokiselina iznosi 65% (Alenina i sur.

2008, Côte i sur. 2003, Savelieva i sur. 2008). Produkt hidroksilacije je nestabilni 5- hidroksitriptofan (5HTP) koji se u drugom koraku dekarboksilira uz pomoć enzima dekarboksilaze aromatskih kiselina te nastaje 5HT (Caspi i sur. 2008, www. themedicalbiochemistrypage.org) (Slika 1.1.)

Monoamin oksidaza (MAO) pretvara 5- HT u 5- hidroksindolacetaldehid koji se dalje oksidira u 5- hidroksindolacetatnu kiselinu (5 HIAA), a taj proces katalizira aldehid dehidrogenaza ovisna o NAD^+. Intermedijarni produkt (aldehid) se može i reducirati pomoću NADH- ovisne aldehid reduktaze u alkohol 5- hidroksitriptofol. O omjeru NAD^+/ NADH ovisi hoće li se 5-hidroksindolacetaldehid oskidirati ili reducirati. U mozgu, 5 HIAA je primarni metabolit 5HT (Caspi i sur. 2008). Postoje dva izoenzima MAO A i MAO B, koji različito regiraju na inhibitore i imaju različit afinitet za supstrate. U serotonergičnim sinapsama MAO A razgrađuje 5HT, dok MAO B veže agoniste koji bi mogli ometati normalan metabolizam 5HT (Frazer i Hensler 1999). U perifernom odjeljku 5HT se metabolizira u jetri te se u obliku 5 HIAA izlučuje urinom (Caspi i sur. 2008) (Slika 1.2.).

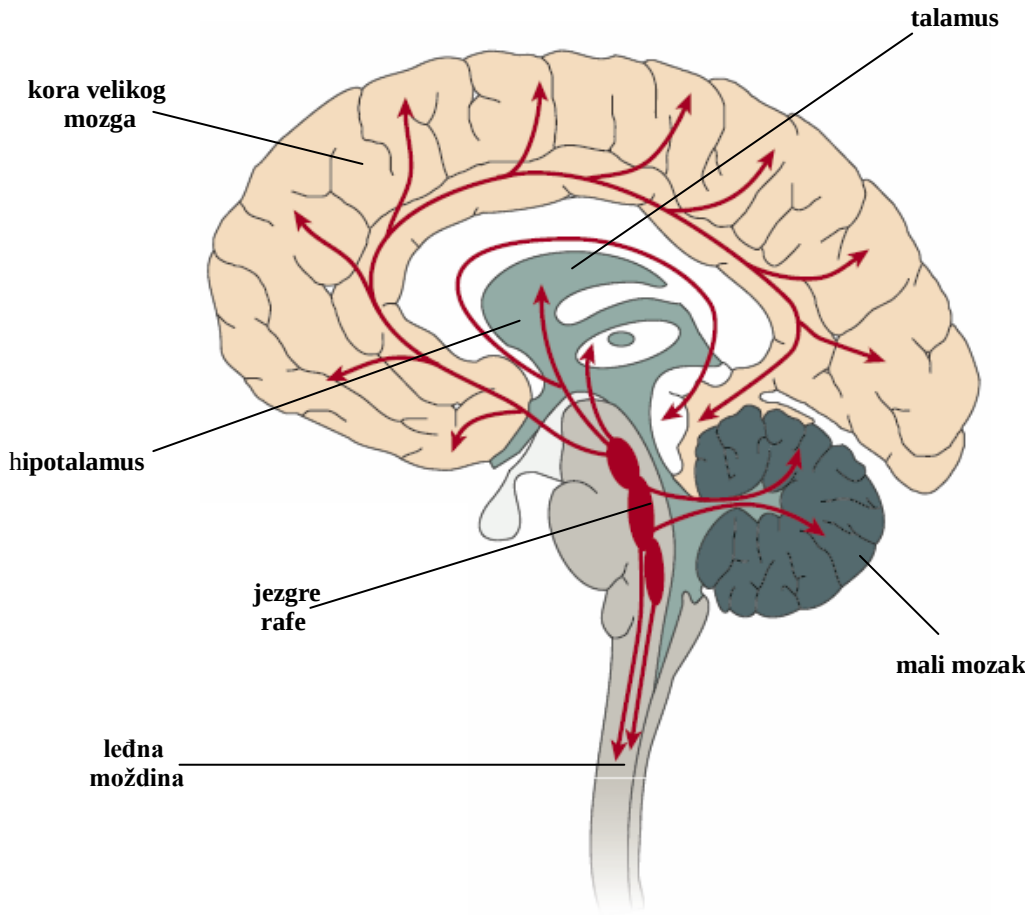


Slika 1.1. Metabolizam serotonina.

1.2. SEROTONINSKI ODJELJCI

1.2.1. Serotoninski sustav u mozgu

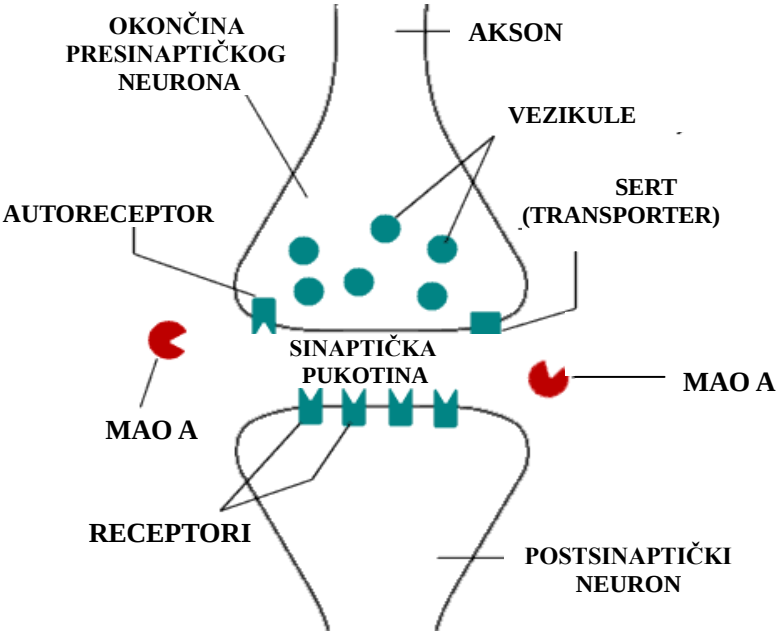
Tijela serotonergičnih neurona nalaze se uzduž dorzalne linije moždanog debla u području nazvanom jezgre rafe (lat. *raphé nuclei*), koje su podijeljene u devet skupina (B1- B9) (Slika 1.3). Aksoni tih stanica projiciraju u gotova sva područja mozga i moduliraju niz fizioloških procesa i ponašanja. Projekcije serotogeničnih neurona su topografski organizirane (Frazer i Hensler 1999). Mnogobrojne funkcije serotonina se mogu objasniti postojanjem preko 15 podtipova receptora koji modluliraju i podešavaju stanične odgovore na serotonin (Whitaker-Azmitia 2005, Whitaker-Azmitia i sur. 1996). Svi tipovi receptora su prisutni u svim strukturama mozga, a pojedine neurofiziološke procese i ponašanja regulira više tipova receptora. *Raphé nuclei* prima aferentna vlakna iz drugih dijelova moždanog debla (*substantia nigra*, ventralni tegmentum), hipotalamusa, talamusa, limbičkih struktura, a i između grupa sertonergičnih neurona dolazi do regulacije (Frazer i Hensler 1999).



Slika 1.3.

Slika 1.4. prikazuje serotonergičnu sinapsu. Serotonin, nakon sinteze u citoplazmi, mehanizmom

aktivnog transporta ulazi u vezikule na aksonskim završecima serotonergičnih neurona, a unutar njih se veže na SBP (eng. *serotonin- binding protein*). Ispuštanje serotonina u sinaptičku pukotinu se događa egzocitozom posredstvom kompleksa Ca^{2+}- kalmodulin. Serotonin se zatim veže na jedan od tipova receptora i aktivira postsinaptički neuron. Da bi sinapsa pravilno funkcionirala neurotransmiter mora imati ograničeno vremensko djelovanje unutar sinaptičke pukotine. Prekid djelovanja serotonina i povrat serotonina u presinaptički tj. serotonergičini neuron se odvija aktivnim transportom preko serotoninskog trasnsportera (SERT) (Holz i Fisher 1999, Kolb i Whishaw 2005, Melikian 2004). U presinaptičkom neuronu serotonin se katabolizira ili reciklira (tj. opet ulazi u vezikule). Broj transportera na pojedinom neuronu nije stalan nego se mijenja ovisno o aktivnosti sinapse, te tako pridonosi plastičnosti neurona (Melikian 2004).



Slika 1.4. Shematski prikaz serotonergične sinapse.

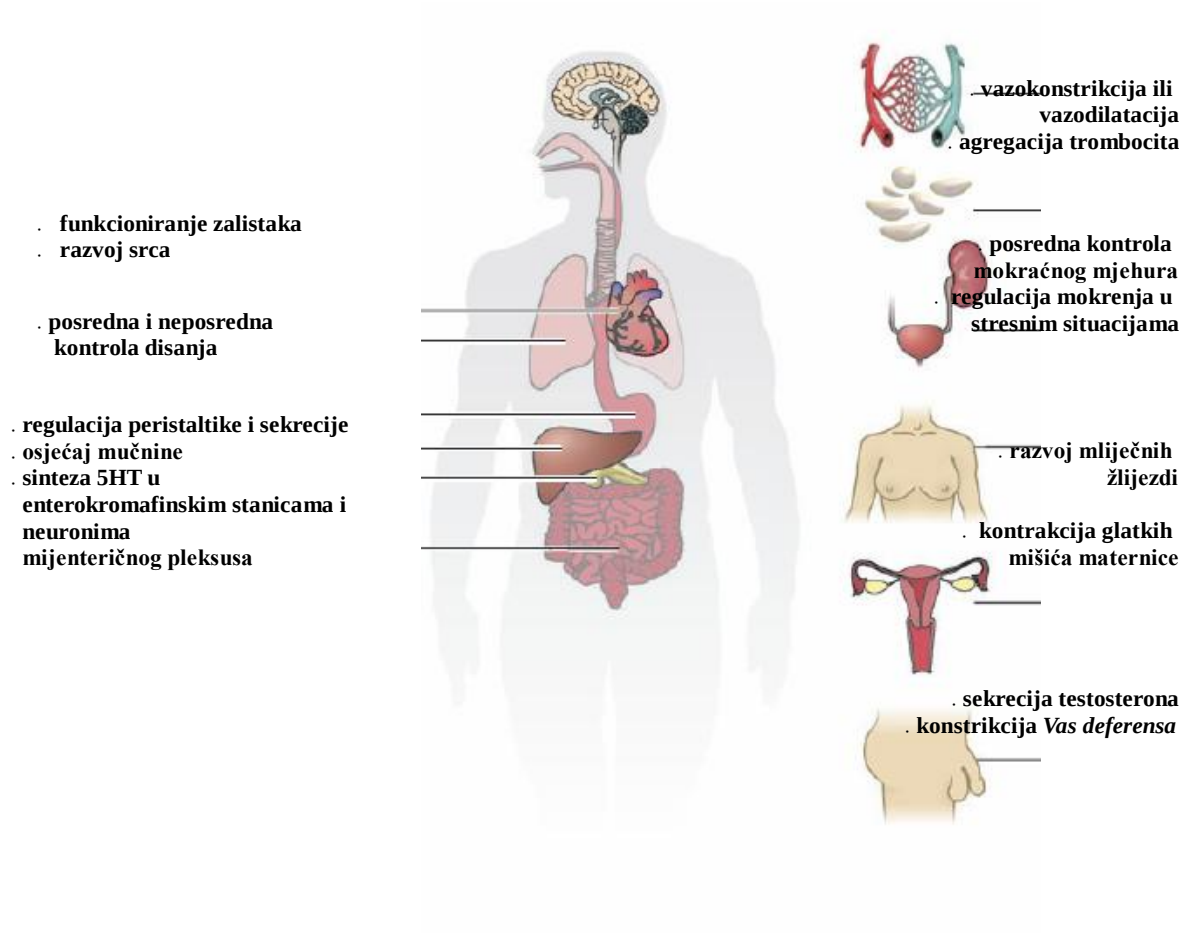
Neki od fizioloških procesa i ponašanja koje regulira serotonin su nociocepcija, neuroendokrino izlučivanje, raspoloženje, osjećaj nagrade, stanje budnosti, agresija, anksioznost i strah, procesi učenja, seksualno ponašanje, apetit, i dr. (Frazer i Hensler 1999).

Serotonin se rano pojavljuje u prenatalnom razvoju mozga. Nakon formiranja, sertonergični neuroni

šalju aksonske izdanke prema ciljnim neuronima gdje 5HT služi kao signalana molekula za diferencijaciju i pravilno pozicioniranje neurona unutar kore mozga i hipokampusa, te stvaraju rane sinapse. 5HT također utječe na neurogenezu, sazrijevanje neurona, grananje dendrita i biosintezu drugih neuromodulatora (npr. tahikinina). Osim što utječu na razvoj ostalih struktura mozga, serotonergični neuroni autoreguliraju i svoj razvoj. Inhibicija rasta i razvoja se vrši negativnom povratnom spregom direktno preko receptora $5HT_{1B}$, a poticanje indirektno preko faktora rasta S- 100β kojeg izlučuju stanice astroglije stimulirane serotoninom. Kod ljudi se serotogenični neuroni pojavljuju u 5. tjednu nakon začeća, a do 15. tjedna se organiziraju u strukturu jezgre rafe. Količina serotonina raste u mozgu do 2.- 5. godine života, a u odrasloj dobi čini 50% najveće koncentracije u djetinjstvu. Sličan razvojni put možemo naći i u mozgu štakora: prvi serotogenični neuroni se pojavljuju 12. dana gestacije, a vrhunac razgranjenja se događa 21. dana nakon okota (Whitaker-Azmitia 2001, 2005, Whitaker-Azmitia et al. 1996).

1.2.2. Periferni serotoninski sustav

Serotonin sudjeluje u fiziološkim procesima gotovo svih organskih sustava- krvožilnog, plućnog, gastrointestinalnog i genitourinarnog (Slika 1.5). Preko vaskularnog sustava kontrolira krvni tlak, te ovisno o tipu receptora kojeg aktivira, potiče vazodilataciju ili vazokonstrikciju, te mitogenezu unutar endotela i sloja glatkih mišića (Berger i sur. 2009, Watts i sur. 2009). Također igra važnu ulogu u aktivaciji trombocita pri zgrušavanju krvi. Trombociti ne mogu sintetizirati serotonin nego 5HT sintetiziran u enterokromafinskim stanicama i otpušten u krvotok uzimaju i akumuliraju unutar granula. 5HT ne posreduje različite procese samo preko receptora nego se može i kovalentno vezati untar trombocita za GTP-aze i stimulirati agregaciju (Berger i sur. 2009, Watts i sur. 2009). 5HT također koordinira razvoj srca i djelovanje zalistaka u odraslih (Berger i sur. 2009, Côte i sur. 2003). Djelovanje serotonina u plućnom sustavu je dvojako: neposredno putem vazokonstrikcije/ vazodilatacije pojedinih žila i posredno preko kontrole središta za disanje smještenog unutar leđne moždine (Berger i sur. 2009). U gastrointestinalnom sustavu 5HT modulira pokretljivost tankog crijeva preko mijenteričnog živčanog spleta, sekreciju i osjećaj mučnine (Berger i sur. 2009, Côte i sur. 2003). U muškom genitourinarnom sustavu regulira sekreciju testosterona, krvni protok kroz testise, te potiče kontrakciju *vas deferensa*. Postoje naznake da sudjeluje i u sazrijevanju spermija (Jimenez-Trejo i sur. 2007).



Slika 1.5. Fiziološki procesi koje regulira serotonin (prema Berger i sur. 2009).

1.2.3. Povezanost središnjeg i perifernog serotoninskog sustava

Pri fiziološkom pH, 5HT je, zbog hidroksilne grupe i dušika koji služi kao akceptor protona, hidrofilna molekula i kao takva ne može proći krvno- moždanu barijeru. Posljedica toga je funkcionalna odijeljenost perifernog i serotoninskog sustava u mozgu (Laterra i sur. 1999, Whitaker-Azmitia 2001, 2005).

Krvno- moždana barijera je struktura koja odjeljuje SŽS od ostatka tijela i tako mu omogućava normalnu funkciju u uravnoteženom okolišu lišenog ionskih i hormonskih fluktuacija koje se događaju u ostatku tijela. Krvno- moždana barijera je građena od endotelnih stanica koje oblažu kapilare u mozgu i nastavaka ("nožica") astrocita. Endotelne stanice kapilara u mozgu tvore čvrsto spojište (eng. *tight juctions*) te time onemogućavaju prolaz tvari između pojedinih stanica, a astrociti predstavljaju mjesto izmjene tvari između krvi i izvanstanične tekućine mozga (Laterra i sur. 1999). Astrociti oblažu oko 80% endotelnih stanica moždanih kapilara. Krvno- moždana barijera ipak ne oblaže svu površinu mozga- hipofizu kojoj je potreban kontakt sa krvožilnim sustavom zbog pravilnog funkcioniranja endokrinog izlučivanja, epifizu kojoj je također potrebna regulacija hormonima, i donji dio moždanog debla unutar kojeg se nalazi centar

za povraćanje. Mehanizam izmjene tvari preko krvno- moždane barijere je jednostavna difuzija (kojom prelaze male nenabijene molekule topive u mastima, plinovi, itd.) i olakšana difuzija (kojom prolaze molekule poput glukoze, ketona, L- aminokiselina, vitamina, itd.) (Laterra i sur. 1999). Tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razvoja dva serotoninska odjeljka "komuniciraju" i utječu jedan na drugoga budući da krvno- moždana barijera nije do kraja razvijena. To razdoblje traje do 2 godine starosti kod ljudi tj. 20. dana kod štakora. (Whitaker-Azmitia 2001, 2005, Whitaker-Azmitia et al. 1996)

1.3. PROMJENE SEROTONINSKE HOMEOSTAZE

1.3.1. Serotonin i poremećaji ponašanja

Budući da serotonergični neuroni projiciraju u gotovo sva područja mozga, poremećaji homeostaze serotonina sudjeluju u razvoju mnogih bolesti i poremećaja ponašanja. Serotonin usklađuje aktivnosti kao što su cirkadijani ritam, agresija, anksioznost, kognitivne funkcije te modulira druge sustave neurotransmitera kao što su dopaminski i tahikininski (Whitaker-Azmitia i sur. 1996). Uzrok promjene djelovanja serotonina može biti poremećaj u bilo kojem dijelu sinapse- od smetnji u sintezi do pogreške u transportu ili razgradnji. Poopćeno, lučenje serotonina inhibira tj. umanjuje odgovor na okolišne stimulanse, dok smanjena koncentracija dovodi do pojačanih aktivnosti (Lucki 1998).

Utvrđeno je da serotonin ima ulogu i u cirkadijanom ritmu tj. kontroliranju ciklusa spavanja i tjelesne temperature (Lucki 1998, Thomas i sur. 2003). Promjene u kocentraciji 5HT ili u aktivnosti $5HT_1$, $5HT_{2C}$ ili $5HT_7$ receptora (Frank i sur. 2002, Morrow i sur. 2008, Thomas i sur. 2003) dovode do drugačijeg obrasca spavanja.

Serotonin je dio sustava hranjenja te kontrolira količinu i izbor hrane, te broj obroka (Jimerson i sur. 1990, Lucki 1998). Povećanje koncentracije 5HT u medijanim jezgrama hipotalamusa dovodi do osjećaja sitosti i prekida hranjenja, a smanjenje do pretjeranog konzumiranja hrane (Lucki 1998). Oboljeli od anoreksije i bulimije također imaju promijenjenu transmisiju serotonina u hipotalamusu (Jimerson i sur. 1990).

Reguliranje nekih primarnih nagona kao što su anksioznost, agresija i impulzivno ponašanje pripada serotoninskom živčanom krugu. Otpuštanje 5HT-a u amigdali, hipokampusu i prednjem dijelu korteksa posreduje odgovor na stresne situacije i uključuje obrambene mehanizme (npr. u situacijama napada predatora) (Barros Viana i sur. 2008). Isto tako se smatra da serotonin čini neurobiološku podlogu anksioznih reakcija kao i njihovih poremećaja (Barros Viana i sur. 2008).

Najčešća bolest promjene serotoninske homeostaze je zasigurno depresija (Jimerson i sur. 1990, Lucki 1998, Turner i sur. 2006). Većina simptoma te bolesti je posljedica deficita serotoninske transmisije iako

sam razvoj bolesti nije još do kraja razjašnjen (Crawley i sur. 2007, Jimerson i sur. 1990, Lucki 1998). Depresija se liječi inhibitorima SERT-a i MAO koji povećavaju razinu serotonina u sinaptičkoj pukotini tijekom transmisije, te tako ublažavaju simptome bolesti (Crawley i sur. 2007, Kolb i Whishaw 2005, Turner i sur. 2006).

U Downovom sindromu, neravnoteža u ekspresiji 21. kromosoma, između ostalog utječe i na razvoj serotonergičnih neurona. Morfološke promjene i abnormalne reakcije poput samoozljeđivanja i agresivnih istupa su simptomi izravno povezani s nepravilnim izlučivanjem serotonina (Whitaker-Azmitia 2001).

1.3.2. Autizam

Autizam je neurorazvojni sindrom koji obuhvaća spektar simptoma (Crawley 2004, 2007b, Crawley i sur. 2007).

Središnji simptomi bolesti su abnormalna socijalna komunikacija, poremećene komunikacijske vještine i repetitivno ponašanje (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, 2007b, Moy i Nadler 2008). Ostali neurobihevioralni simptomi uključuju nemogućnost prepoznavanja osjećaja, manjak mimike, smanjeno snalaženje u društvenim situacijama, smanjeno emocionalno vezivanje, pretjeranu osjetljivost na taktilne i akustične podražaje te stereotipne pokrete (npr. pljeskanje) (Crawley 2004, Crawley i sur. 2007, Moy i Nadler 2008). Učestalost autizma u općoj populaciji je 1 oboljeli na 250- 595 osoba. Bolest se najčešće dijagnosticira u dobi od oko 2 godine života, (Crawley i sur. 2007, Moy i Nadler 2008).

Uzroci autizma još nisu do kraja razjašnjeni, ali se zna da bolest ima genetičku podlogu (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, Crawley i sur. 2007). Studije nasljeđivanja su pokazale da koincidencija obolijevanja od autizma kod jednojajčanih blizanaca iznosi 60- 90% (Crawley 2007b, Moy i Nadler 2008, Murcia i sur. 2005), kod dvojajčanih blizanaca do 24%, a kod braće i sestara 1- 8% (DiCicco-Bloom i sur. 2007, Murcia i sur. 2005). Na gentetičku podlogu ukazuje i omjer između spolova jer četiri puta više muškaraca obolijeva od autizma (Crawley 2007b, Crawley i sur. 2007). Uz razvoj autizma povezuje se veći broj gena čime se podupire teorija multigenskog nasljeđivanja (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, 2007b, Crawley i sur. 2007, Moy i Nadler 2008, Murcia i sur. 2005). Nastale promjene ne moraju biti isključivo rezultat mutacija i oštećenja gena, već i izmijenjenih epigenetičkih procesa (Lord i sur. 2000, Moy i Nadler 2008). Interakcija gena i okolišnih faktora mogla bi pridonijeti tolikoj raznovrsnosti simptoma izraženih u autizmu. Kao neki od mogućih okolišnih uzroka spominju se prenatalno izlaganje nekim kemikalijama kao npr. talidomidu, valproičnoj kiselini, kokainu, alkoholu ili nekim virusnim infekcijama (DiCicco-Bloom i sur. 2007, Whitaker-Azmitia i sur. 1996).

Pretpostavlja se da u autizmu dolazi i do promjena u homeostazi neurotransmitera i hormona. Za sada su rađena istraživanja na poremećajima oksitocina, vazopresina i serotonina (Moy i Nadler 2008, Murcia i sur. 2005, 35,). Poremećaji u metabolizmu tih spojeva u kombinaciji s mutacijom u nekim drugim genima

vjerojatno dovode do oštećenja u razvoju i funkcioniranju mozga, koja su prisutna u autizmu (Moy i Nadler 2008).

Nepravilan razvoj mozga i funkcioniranje neurotransmitera je vidljivo i u patološkim promjenama u korteksu, malom mozgu, hipokampusu i amigdali (Crawley i sur. 2007, DiCicco-Bloom i sur. 2007, Lord i sur. 2000), a učestali su i abnormalni nalazi na staničnoj razini (npr. smanjen broj Purkinijevih stanica u malom mozgu) (DiCicco-Bloom i sur. 2007, Lord i sur. 2000). Naravno, navedene promjene dovode i do oslabljenih funkcija tih dijelova mozga i promijenjenih živčanih puteva (DiCicco-Bloom i sur. 2007).

1.3.3. Hiperserotoninemija

Hiperserotoninemija ili povišena koncentracija 5- HT-a u krvi, jedan je od najučestalijih fizioloških simptoma autističnog poremećaja koji se javlja u 30- 50% oboljelih (Cook, Leventhal 1996, Hranilovic i sur. 2009, McNamara i sur. 2007). S druge strane, kod autističnih osoba uočena je smanjena mogućnost sinteze serotonina u mozgu (Chugani 1999). Dok kod odraslih organizama serotonin ne prelazi krvno-moždanu barijeru (Whitaker-Azmitia 2001, 2005), u mozgu koji se razvija (kod čovjeka do 2. godine, kod štakora do 20. PND) serotonin može slobodno cirkulirati između odjeljaka. Smatra se da bi povišena kocentracija 5- HT-a koji krvlju s periferije dospijeva u mozak mogla negativnom povratnom spregom inhibirati razvoj terminalnih krajeva serotonergičnih neurona (Anderson et al. 1990, Whitaker-Azmitia 2001), smanjiti sintezu serotonina (Hranilovic i sur. 2009) i tako dovesti do raznih poremećaja u funkcioniranju sustava reguliranih serotoninom, koji se mogu uočiti kod autističnih osoba. Kao mogući uzroci hiperserotoninemije spominju se povećana sinteza ili smanjena razgradnja 5HT u perifernom odjeljku, promijenjeno otpuštanje iz enterokromafinskih stanica, povećani unos u trombocite ili smanjeno otpuštanje iz trombocita (Anderson i sur.1990, Cook i Leventhal 1996, Hranilovic i sur. 2009).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovaj rad dio je sveobuhvatnije studije utjecaja povišene koncentracije perifernog serotonina na funkciju serotonina u središnjem odjeljku, na modelu štakora. U tu svrhu štakori su tretirani neposrednim prekursorom serotonina 5- hidroksitriptofanom (5HTP) u doba intenzivnog razvoja 5- HT neurona: od 13. embrionalnog do 21. postnatalnog dana.

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi postoje li promjene u emocionalnom, socijalnom i kognitivnom ponašanju odraslih štakora perinatalno tretiranih s 25 mg/ kg 5HTP-a, u odnosu na kontrolnu skupinu štakora tretiranu fiziološkom otopinom.

Razina lokomotorne aktivnosti i reakcija na opetovani zvučni podražaj testirane su u otvorenom polju (eng. *open field*), stupanj anksioznosti i eksploratorno ponašanje na ploči s rupama (eng. *hole board*), socijalna anksioznost ispitivana je pomoću testa socijalnog izbora (eng. *social choice*), a sposobnost učenja i kognitivna rigidnost u T- labirintu (eng. *T- maze*). Pretpostavili smo da bi značajna odstupanja u nekom od navedenih ponašanja mogla ukazivati na trajne poremećaje u serotonergičnoj transmisiji izazvane perinatalnim tretmanom 5HTP-om.

3. MATERIJALI I METODE

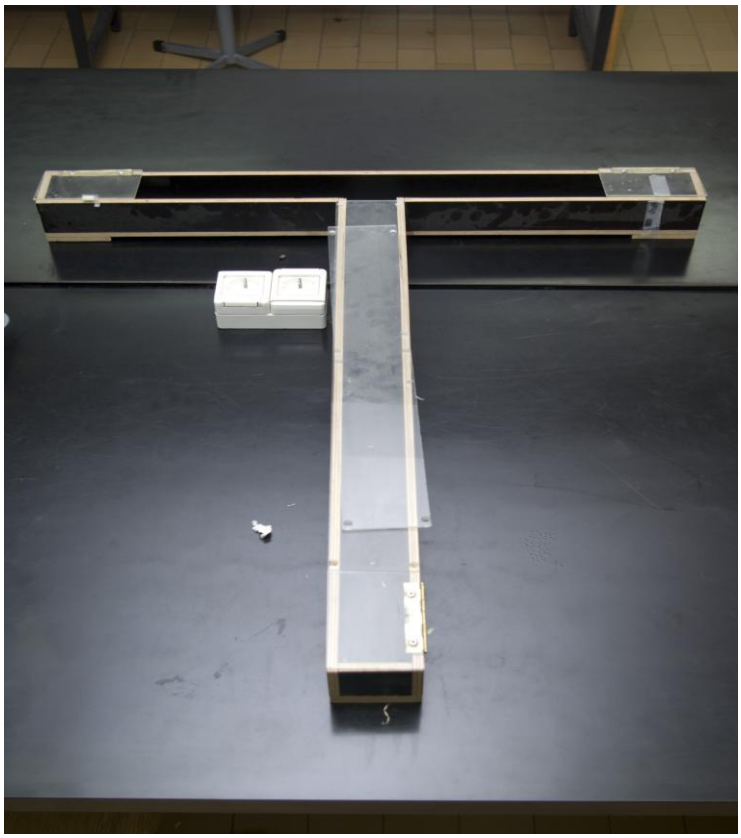
3.1. MATERIJALI

3.1.1. Životinje

U istraživanju je korišteno 28 štakora soja Wistar. 10 štakora (4 mužjaka i 6 ženki) je perinatalno tretirano s 25 mg/ kg 5HTP-a, a 18 štakora (9 mužjaka i 9 ženki) s fiziološkom otopinom, (jednakim volumenom, u istom periodu i na isti način). Perinatalni tretman opisan je u diplomskom radu Dolenec P. (2009). Štakori su bili smješteni u kavezima od 3- 5 jedinki, odvojeni po spolu, u prostoriji kontrolirane temperature (22± 2º C) i svjetlosnim ciklusima od 12h (svjetlo se palilo u 09.00h, a gasilo u 21h), uz slobodan pristup hrani i vodi (osim u razdoblju kognitivnog testiranja).

3.1.2. Aparatura

- T- labirint (Slika 3.1) je jednostavan labirint oblika slova T, napravljen od drva obojanog crnom bojom. Veličina središnjeg kraka je 85cm x 7,8cm x 6cm, a postranih 37cm x 7,8cm x 6cm. Na kraju oba kraka je bio označen dio (dugačak 10cm) u koji se stavljala hrana.

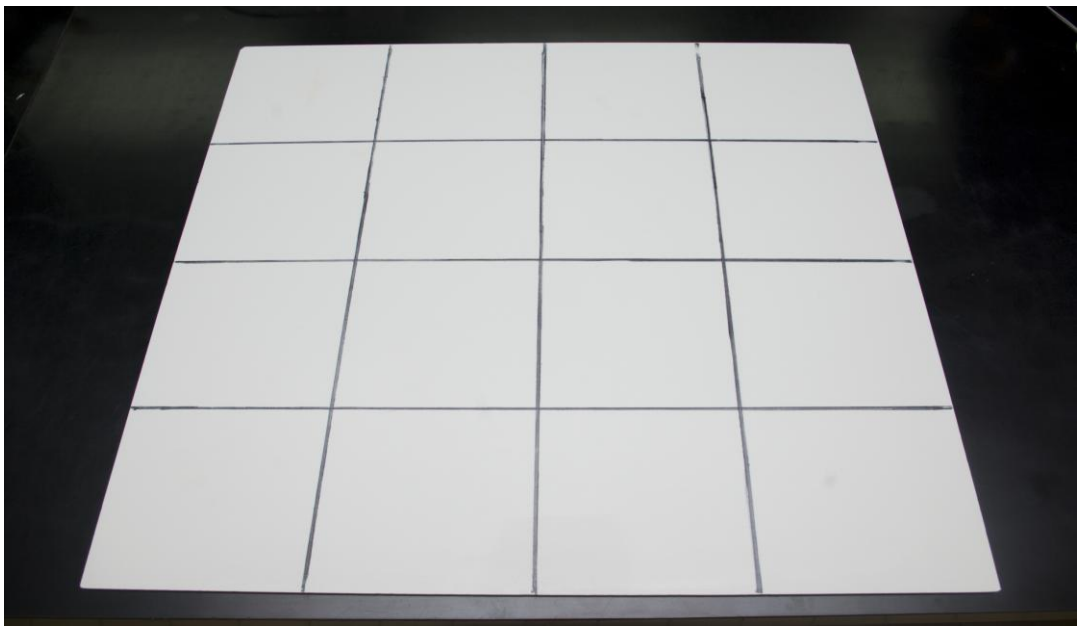


Slika 3.1. T- labirint

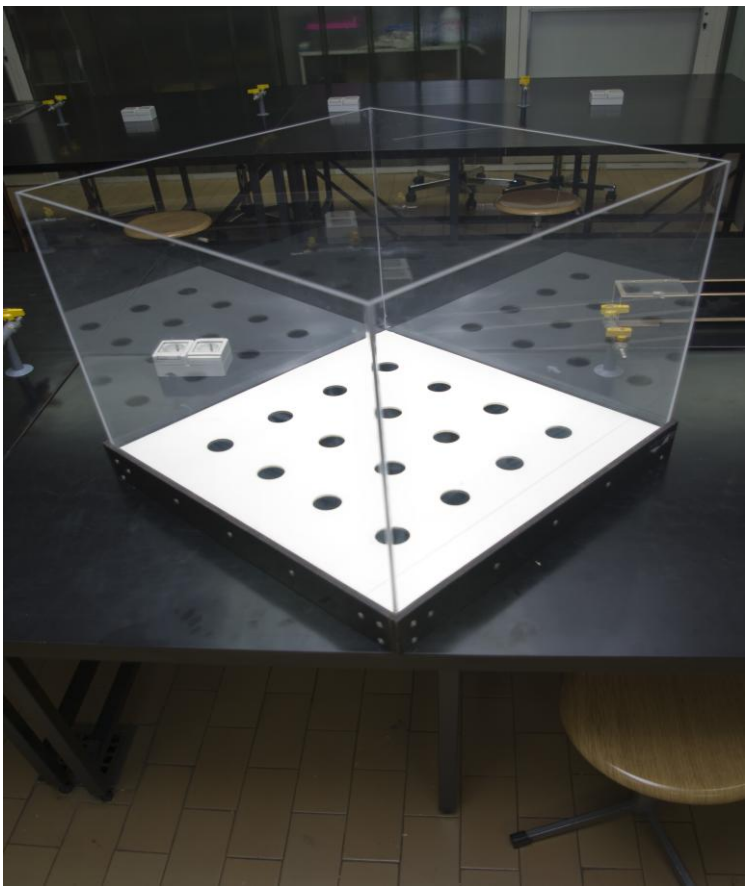
- Aparat otvoreno polje (Slika 3.2) je prozirna kutija od pleksiglasa veličine 56cm x 56cm x 44cm s

drvenom pločom na dnu na kojoj su označena 4x 4 polja veličine 13,8cm x 13,8cm.

- Ploča s rupama (Slika 3.3) je prozirna kutija, napravljena od pleksiglasa veličine 56cm x 56cm x 44cm. Na dnu se nalazi ploča sa 16 ravnomjerno postavljenih rupa (4x 4) promjera 3,8cm. Rupe su bile fiktivno podijeljene na rubne (12 rupa uz stijenke kutije) i centralne (4 rupe u središnjem dijelu aparature).

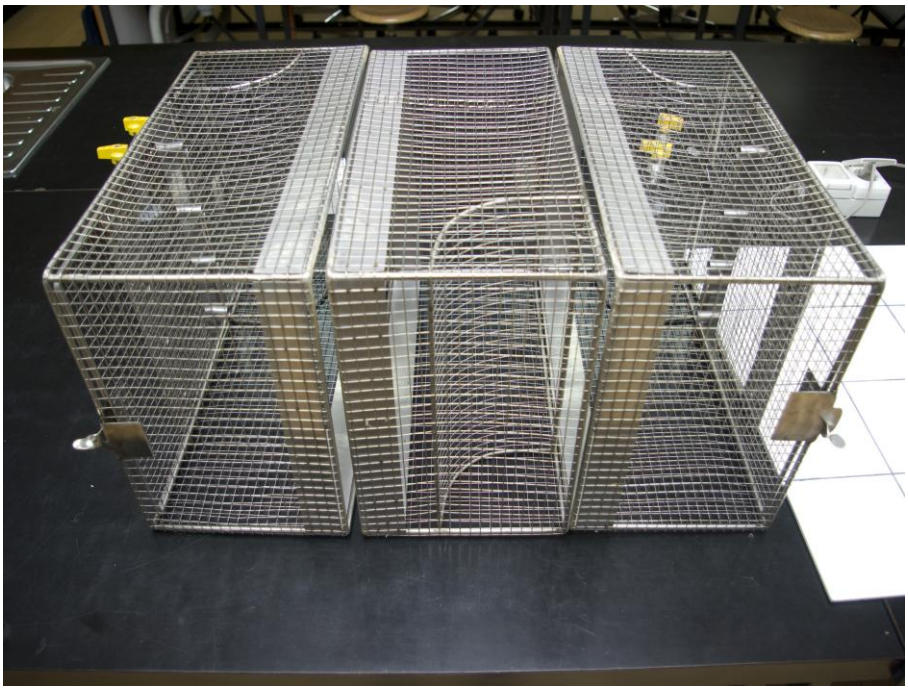


Slika 3.2. Aparat otvoreno polje



Slika 3.3. Aparat ploča s rupama

- Testni kavez za socijalni izbor (Slika 3.4) je sastavljen od tri međusobno spojena dijela.. Dva postrana dijela, dimenzija 41,5cm x 21,5cm x 30cm, sadrže žičani odjeljak u koji se može smjestiti živi ili neživi objekt namijenjen istraživanju. Žičana pregrada dopušta vizualno, auditorno, olfaktornuo i ograničeno taktilno istraživanje inicirano od strane testiranog štakora (Crawley 2004, 2007b). Središnji dio u koji se stavlja testirani štakor je također veličine 41,5cm x 21,5cm x 30cm.



Slika 3.4. Kavez za test socijalni izbor

3.2. TESTOVI PONAŠANJA

Obje skupine štakora su bile podvrgnute bateriji testova istim redoslijedom: učenje i kognitivna rigidnost, lokomotorna aktivnost, anksioznost i ekploratorno ponašanje, socijalni izbor i reakcija na opetovano izlaganje zvučnom podražaju.

Svi testovi su se izvodili u periodu između 12h i 18h u sobi sa stalnom temperaturom i umjerenim osvjetljenjem. Ponašanja su bilježila dva neovisna promatrača te su na kraju izračunate srednje vrijednosti njihovih rezultata. Nakon svakog testiranog štakora aparatura je oprana antiseptikom i vodom.

3.2.1. Učenje i kognitivna rigidnost

Učenje i kognitivna rigidnost ispitivani su u T- labirintu. Test je podijeljen u dva dijela: učenje, u kojem štakor nauči u kojem se kraku nalazi nagrada (kondenzirano mlijeko) i obrat pri kojem životinja treba naučiti da se nagrada nalazi u suprotnom kraku (Crawley 2004, 2007b). 24 h prije testiranja štakore smo lišili hrane, tako da budu motivirani za učenje (Schwarting i Borta 2005). Tijekom čitavog testiranja štakori su imali pristup hrani jedan sat dnevno. Prvi pokušaj smo nazvali "nulti", njime smo odredili prirodni odabir štakora jedne strane te smo u sljedećim pokušajima nagradu (kondenzirano mlijeko) stavili na suprotnu stranu. Test se izvodio jedan put dnevno, a sastojao se od 10 pokušaja u trajanju od 60 sec. Štakori su usvojili prostornu poziciju hrane u trenutku kada su imali 8 točnih od 10 pokušaja (Crawley 2004, 2007b). Točan odabir se računao kada bi štakor prešao sa dvije prednje šape u krajnji dio kraka i kušao

hranu. Neuspjeli pokušaj se bilježio kada bi štakor otišao na suprotni krak, a postojala je i kategorija izostanka kada štakor ne bi došao niti do jednog kraja labirinta. Nakon naučenog položaja, mijenjala se pozicija hrane te je slijedila inverzija učenja. Novi položaj se smatrao usvojenim u trenutku kada je ostvareno 8/10 uspješnih pokušaja. Bilježio se broj pokušaja potrebnih da se usvoji početna pozicija hrane te broj pokušaja za inverznu poziciju hrane. Između pokušaja istog štakora T- labirint se brisao vlažnim maramicama.

3.2.2. Lokomotorna aktivnost

Lokomotorna aktivnost se istraživala u otvorenom polju, a obuhvaćala je horizontalnu aktivnost (mjerenu kao broj prelazaka između označenih polja) i vertikalnu aktivnost (mjerenu kao broj propinjanja). Svaki štakor je stavljen u donji desni kut i njegovo ponašanje se bilježilo tijekom 5 minuta. Prelazak u novo polje bilježio se kada bi štakor s obje prednje šape prešao istu crtu, a propinjanje kada prednje šape ne dodiruju podnu ploču, a tijelo je uspravno. Broj prelazaka i propinjanja se određivao ručnim hemocitometrima.

3.2.3. Anksioznost i eksploratorno ponašanje

Anksioznost i eksploratorna aktivnost su određivane na ploči s rupama u koje su štakori gurali njuške. Ukupan broj istraženih rupa odražavao je eksploratornu aktivnost, a omjer broja posjećenih unutarnjih i vanjskih rupa razinu anksioznosti. "Ubod" se bilježio kada je štakor uronio glavu u rupu iznad razine očiju. Svaki štakor je postavljen na sredinu ploče s rupama te se tijekom 5 min. bilježilo vrijeme do prvog uboda, broj uboda te položaj istraženih rupa.

3.2.4. Socijalni izbor

Test socijalni izbor podijeljen je u tri dijela: 1. period habituacije, 2. period izbora između istraživanja neživog predmeta i štakora i 3. period izbora između već istražene i nove jedinke štakora.

Prvih 5 min štakor se stavi u kavez na habituaciju, a bilježe se latencija do prvog prelaska u drugi kavez, broj prelazaka i broj propinjanja. Prelazak se bilježi kad štakor s obje prednje noge prijeđe u susjedni odjeljak kaveza za testiranje. Navedeni parametri pokazuju lokomotornu aktivnost i razinu anksioznosti ispitivane životinje. Nakon perioda habituacije u postrane odjeljke se istovremeno stavi štakor s kojim testirani štakor nije ranije imao kontakta i predmet (crvena bočica). Tijekom 10 min se mjeri latencija do prvog kontakta s predmetom ili štakorom te vrijeme provedeno istažujući predmet ili štakora. U zadnjem dijelu testa se predmet zamijenio s drugim nepoznatim štakorom te su se izmjerile iste aktivnosti kao i u drugom dijelu pokusa (Crawley 2004, Crawley i sur. 2007). Štakori koji su korišteni kao objekti istraživanja su bili istog spola kao i testni štakori te su prije pokusa na 10 min bili navikavani na

boravak u žičanom odjeljku kako ne bi pokazivali remetili tijek pokusa (Crawley i sur. 2007). Parametri su se mjerili ručnim hemocitometrima i zapornim satovima.

3.2.5. Reakcija na opetovani zvučni podražaj

Reakcija na opetovani zvučni podražaj je ispitivana u aparatu otvoreno polje. Njime smo ispitali odgovor životinja na opetovani glasni zvuk visoke frekvencije, kao i postojanje habituacije na opetovanu zvučnu stimulaciju.

Zvuk smo proizveli puhanjem u pištaljku za pse koja ima raspon 18- 22 kHz, u trajanju od 3s, što odgovara frekvenciji i trajanju prirodnog alarmnog glasanja štakora (ono traje 300- 2000 ms) (Wöhr i sur. 2005).

Pokus se sastojao od dva dijela. U prvom dijelu smo stavili životinju u otvoreno polje na 5 minutnu habituaciju, tijekom koje su se čuli samo bijeli šumovi (Kahne i sur. 2002). Bilježili su se prelasci , propinjanja i latencija do prvog prelaska kako bi se ustvrdila normalna pokretljivost i razina anksioznosti životinje. Tijekom drugog dijela pokusa smo zvučno stimulirali životinju 10 puta tijekom 5 min u pravilnim razmacima i bilježili intenzitet reakcije bijega mjeren kao broj prelazaka u susjedno polje. Broj prelazaka smo bilježili i u razdobljima između zvučnih stimulacija Broj prelazaka i propinjanja se mjerio ručnim hemocitometrima, a vrijeme latencije zapornim satom.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Podatke smo analizirali u programu GraphPad InStat 3.01. Za određivanje pravilnosti distribucije upotrijebili smo Kolmogorov– Smirnov test (s korekcijom pomoću Lilliefor- ovog testa). Parametre koji su imali pravilnu distribuciju smo usporedili Studentovim t- testom, a one koji nisu neparametrijskim Mann-Whitney U testom. U testu učenje i kognitivna rigidnost smo upotrijebili Friedmanov test uz Dunnovu post- hoc analizu, a u testu reakcija na opetovani zvučni podražaj skupinu tretiranu fiziološkom otopinom smo obradili pomoću Wilcoxon signed rank testa.

U tabličnom prikazu koristila se srednja vrijednost ± standardna devijacija (M ± SD), a u grafičkom srednja vrijednost ± standardna pogreška (M ± SEM). Značajnost rezultata je prihvaćena kod $p< 0,05$. U rezultatima nekih pokusa smo isključili jedinke čiji su rezultati odstupali od prosječne vrijednosti više od dvije standardne devijacije.

4. REZULTATI

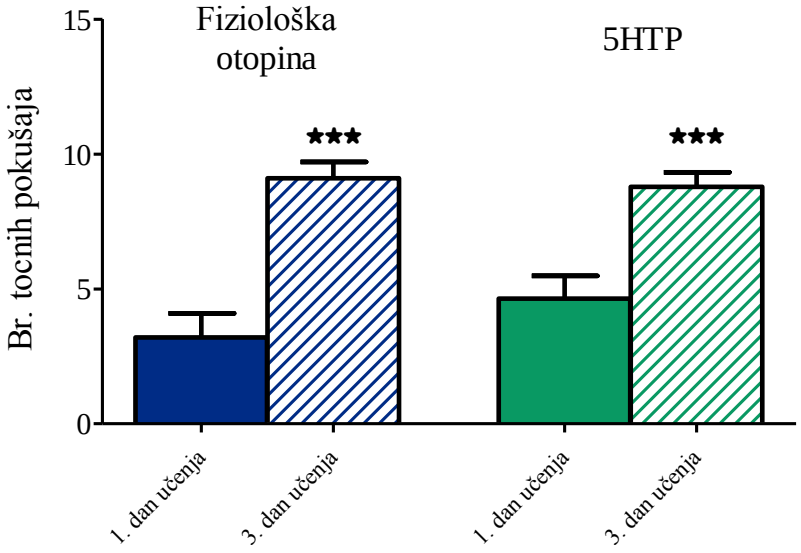
4.1. UČENJE I KOGNITIVNA RIGIDNOST

Učenje i kognitivna rigidnost ispitivani su u T- labirintu (Tablica 4.1.). Prvi dio testa odnosio se na vrijeme potrebno da štakori nauče u kojem kraku T- labirinta se nalazi nagrada. Broj točnih pokušaja u obje skupine se značajno povećavao s vremenom što je vidljivo u značajnom porastu točnih pokušaja trećem u odnosu na prvi dan (skupina tretirana fiziološkom otopinom Fr= 19.00, p< 0,001, df= 10; skupina tretirana 5HTP-om- Fr= 17.76, p< 0,001, df= 14) (Slika 4.1.a). U drugom dijelu testa štakori su trebali naučiti da se nagrada nalazi u suprotnom kraku (Slika 4.1.b). I ovdje se s vremenom povećavao broj točnih pokušaja, a značajno je porastao 3. u odnosu na 1. dan (skupina tretirana fiziološkom otopinom Fr= 18.57, p< 0,001, df= 10; skupina tretirana 5HTP-om Fr= 26.00, p< 0,001, df= 14). između skupina nije bilo značajnih razlika niti pri inicijalnom učenju niti pri obratu naučenog.

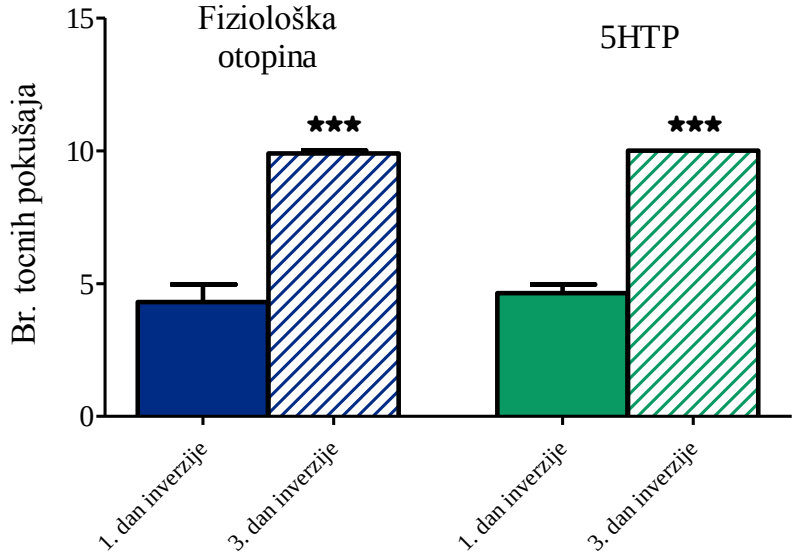
Tablica 4.1. Parametri učenja i kognitivne rigidnosti (M ± SD)

	Tretman	
	Fiziološka otopina (N= 10)	5HTP (N= 14)
Točan broj pokušaja prvog dana učenja	3,2 ± 2,82	4,64 ± 3,15
Točan broj pokušaja drugog dana učenja	7,0 ± 2,63	7,14 ± 3,78
Točan broj pokušaja trećeg dana učenja	9,1 ± 1,91	8,79 ± 2,0
Točan broj pokušaja četvrtog dana učenja	9,9 ± 0,2	10,0 ± 0,0
Točan broj pokušaja prvog dana inverzije	4,3 ± 2,11	4,64 ± 1,22
Točan broj pokušaja drugog dana inverzije	8,8 ± 1,6	9,07 ± 0,92
Točan broj pokušaja trećeg dana inverzije	9,9 ± 0,3	10,0 ± 0,0

A



B



Slika 4.1. A) Dinamika učenja položaja nagrade u T-labirintu štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 10) i 5HTP-om (N= 14). Rezultati su prikazani kao M ± SEM. *** p< 0,001, Dunnova post-hoc analiza; B) Dinamika učenja inverznog položaja nagrade u T-labirintu štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 10) i 5HTP-om (N= 14). Rezultati su prikazani kao M ± SEM. *** p< 0,001, Dunnova post-hoc analiza

4.2. LOKOMOTORNA AKTIVNOST

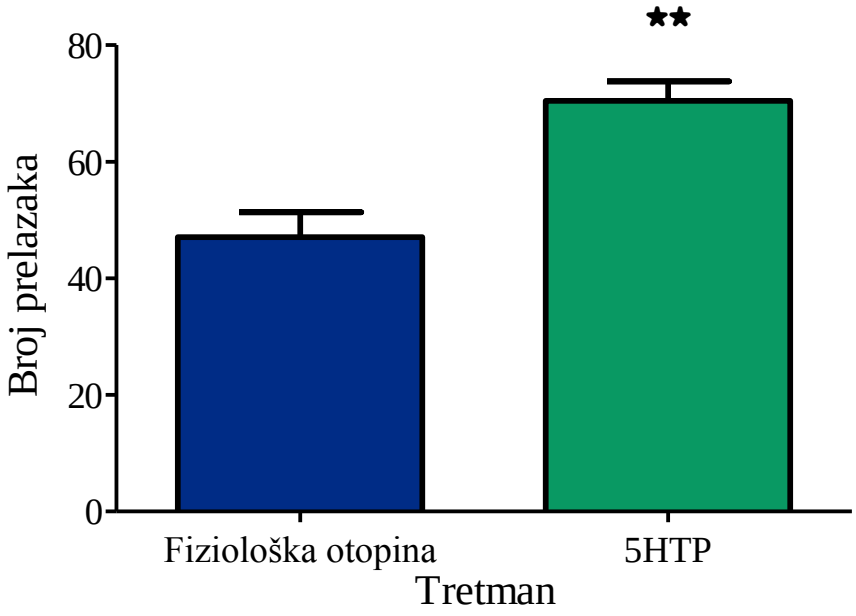
Lokomotorna aktivnost štakora mjerena je u otvorenom polju tijekom 5 min, pri čemu se bilježila horizontalna i vertikalna aktivnost (Tablica 4.2.).

Uočena je značajna razlika u horizontalnoj aktivnosti između skupina (t= 3,64; df= 24; p= 0,0013) (Slika 4.2.) dok se vertikalna aktivnost nije značajno razlikovala između skupina.

Tablica 4.2. Parametri lokomotorne aktivnosti štakora

	Tretman	
	Fiziološka otopina (N= 16)	5HTP (N= 9)
Broj prelazaka	47,06 ± 17,71	70,44 ± 10,04 **
Broj propinjanja	23,00 ± 10,03	25,33 ± 11,25

M ± SD, ** p< 0.01, Studentov t- test



Slika 4.2. Horizontalna lokomotorna aktivnost štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 16) i 5HTP-om (N= 9), mjerena kao broj prelazaka u susjedno polje. Rezultati su prikazani kao M ± SEM. ** p< 0,01, Studentov t- test

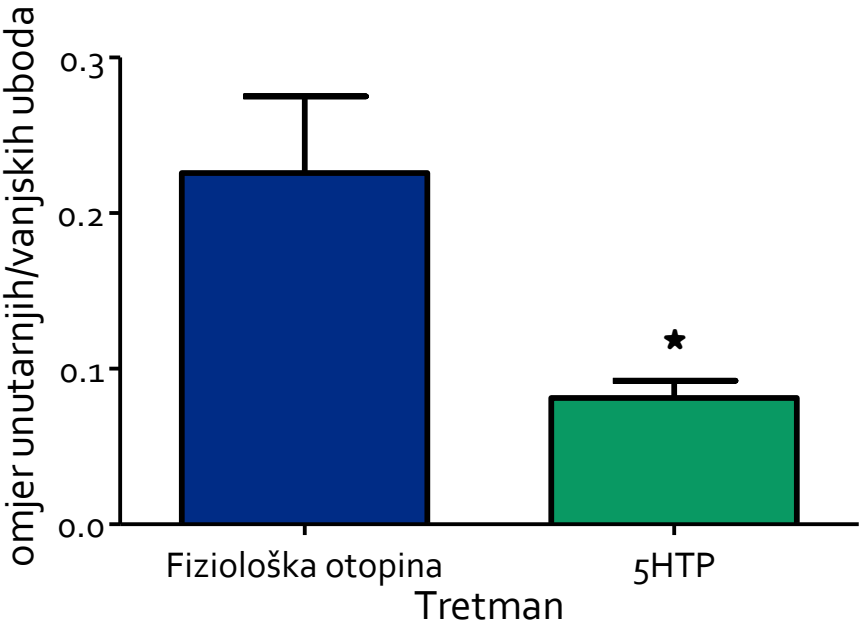
4.3. ANKSIOZNOST I EKSPLORATORNO PONAŠANJE

Anksioznost i eksploratorna aktivnost mjerene su tijekom 5 minuta na ploči s rupama (Tablica 4.3.). Štakori tretirani 5- HPT-om posjetili su značajno veći broj rupa nego štakori tretirani fiziološkom otopinom (t= 2,38, df= 23, p= 0,026), no to je vjerojatno posljedica povećane lokomotorne aktivnosti koju smo uočili u prethodnom testu, pa ne možemo zaključiti imaju li promijenjeno eksploratorno ponašanje. Međutim, omjer broja unutarnjih i vanjskih rupa koje su štakori istražili ukazuje na značajan porast anksioznosti kod štakora tretiranih 5HTP-om (U= 27,5, p= 0,0127) (Slika 4.3.).

Tablica 4.3. Parametri anksioznosti i eksploratornog ponašanja

	Grupa	
	Fiziološka otopina (N= 16)	5HTP (N= 9)
Ukupni broj uboda	12,16 ± 5,58	16,89 ± 2,80 *
Broj vanjski uboda	10,94 ± 5,37	16,44 ± 2,30 **
Broj unutarnjih uboda	1,19 ± 1,38	0,44 ± 0,73
Omjer unutarnjih i vanjskih uboda	0,23 ± 0,20	0,08 ± 0,03 #
Latencija do prvog uboda	22,88 ± 17,37	17,22 ± 10,17

M ± SD; * p<0,05, ** p< 0,01, Studentov t- test; # p< 0,05, Mann- Whitney test.



Slika 4.3. Stupanj anksioznosti štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 16) i 5HTP-om (N= 9), izmjeren kao omjer ubadanja njuške u untarnje i vanjske rupe. Rezultati su pokazani kao M ± SEM. * p< 0,05, Mann- Whitney test

4.4. SOCIJALNI IZBOR

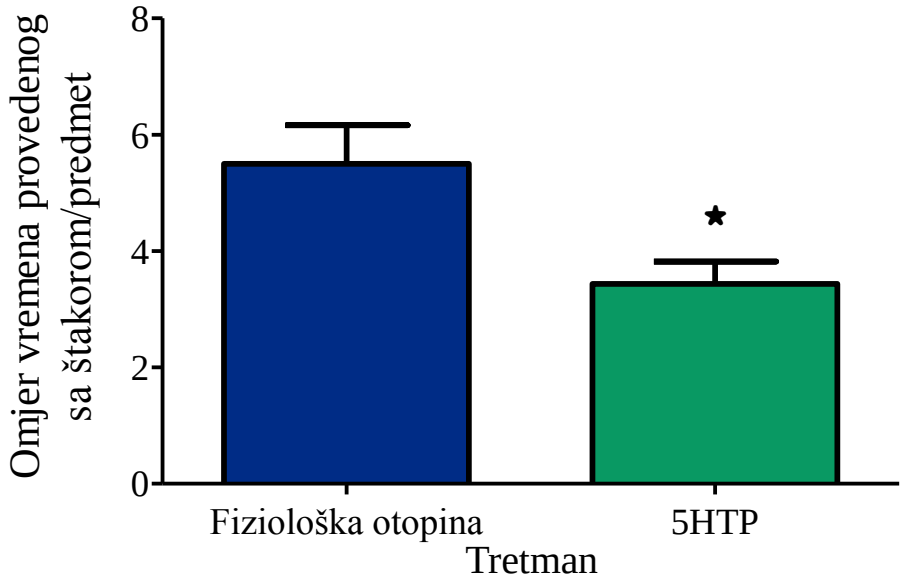
Socijalno ponašanje štakora mjereno je testom socijalnog izbora (Tablica 4.4).

U prvom dijelu pokusa- habituaciji nije pronađena niti jedna razlika u razini aktivnosti štakora iz ispitivanih skupina. U drugom dijelu pokusa- izboru između istraživanja nepoznatog štakora ili predmeta, životinje se nisu razlikovale u ukupnom vremenu provedenom u istraživanju objekata kao ni u istraživanju preferiranog objekta (u obje skupine štakor). Ipak, relativno vrijeme istraživanja štakora u odnosu na predmet je bilo značajno manje kod štakora tretiranih 5HTP-om (t= 2,14, df= 24, p= 0,0425) (Slika 4.4.). U trećem dijelu eksperimenta- izboru između neistraženog i istraženog štakora, skupine se nisu značajno razlikovale niti u jednom mjerenom parametru.

Tablica 4.4. Parametri socijalnog ponašanja štakora

	Tretman	
	Fiziološka otopina (N= 17)	5HTP (N= 10)
Prelasci tijekom habituacije	18,00 ± 7,08	22,67 ± 6,63
Propinjanja tijekom habituacije	26,24 ± 11,26	29,78 ± 8,71
Vrijeme provedeno sa Š	106,00 ± 30,14	110,56 ± 26,05
Vrijeme provedeno s P	23,29 ± 10,65	34,44 ± 10,14
Vrijeme provedeno sa Š i P	129,29 ± 25,18	145,00 ± 28,86
Omjer vremena provedenog sa Š i P	5,50 ± 2,74	3,43 ± 1,15 *
Vrijeme provedeno sa Š1	28,94 ± 13,71	39,67 ± 17,94
Vrijeme provedeno sa Š2	48,59 ± 24,43	49,56 ± 14,13
Vrijeme provedeno sa Š1 i Š2	77,53 ± 31,48	89,22 ± 27,65
Omjer vremena provedenog sa Š1 i Š2	1,98 ± 1,26	1,47 ± 0,63

M ± SD; * p<0,05, Studentov t- test



Slika 4.4. Socijalna anksioznost štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 17) i 5HTP-om (N= 10), mjerena kao omjer vremena provedenog u istraživanju živog i neživog objekta. Rezultati su prikazani kao M ± SEM. * p< 0,05, Studentov t- test

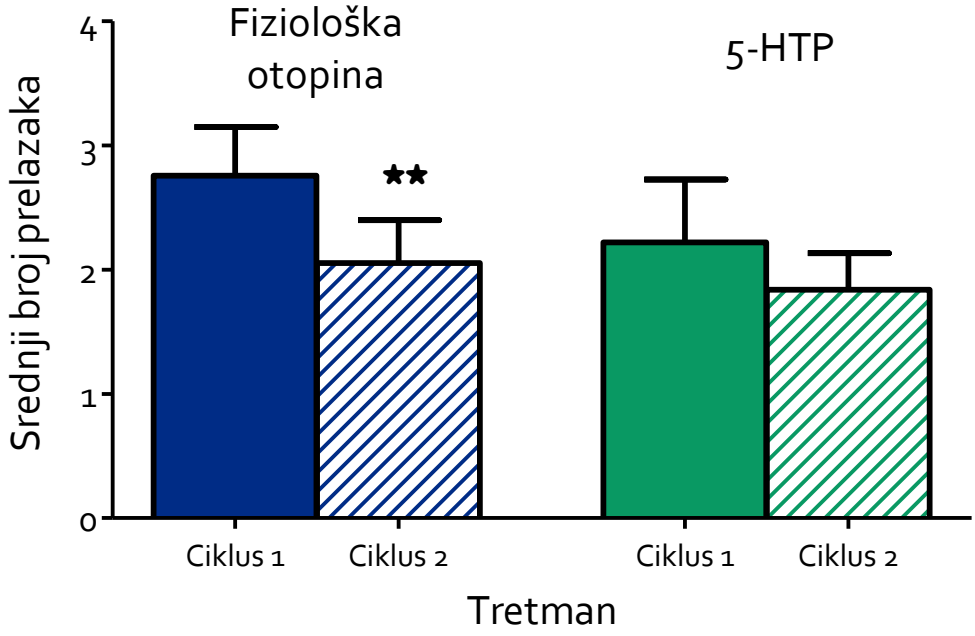
4.5. REAKCIJA NA OPETOVANI ZVUČNI PODRAŽAJ

Tijekom zvučnog podražaja, obje skupine štakora reagirale su bijegom. Broj prelazaka u susjedno polje označavao je intenzitet reakcije (Tablica 4.5.). Prosječni intenzitet reakcije tijekom cijelog eksperimenta nije se značajno razlikovao između skupina (U= 48,5; p= 0,22). No, kada se ukupni broj zvučnih podražaja podijelio u dvije skupine (prvih 5 i drugih 5), skupina teretirana fiziološkom otopinom imala je značajno manji broj prelazaka u drugom ciklusu (W= 75; p= 0,0097), što ukazuje na habituaciju na zvučni podražaj, dok je takva reakcija izostala kod skupine tretirane 5HTP-om (t= 0,849; df= 9; p= 0,418) (Slika 4.5.).

Tablica 4.5. Parametri reakcije na opetovani zvučni podražaj (M ± SD)

Tretman		Cijeli pokus	1. ciklus	2. ciklus
Fiziološka otopina (N= 13)	Prelasci tijekom zvučnog signala	2,41 ± 1,33	2,76 ± 1,47	2,05 ± 1,30
	Prelasci između zvučnih signala	1,10 ± 1,49	1,27 ± 1,55	0,93 ± 1,85
	Latencija do reakcije	1,57 ± 0,43	1,55 ± 0,47	1,59 ± 0,48
5HTP	Prelasci tijekom zvučnog signala	2,03 ± 1,10	2,22 ± 1,60	1,84 ± 0,92

(N= 10)	Prelasci između zvučnih signala	1,41 ± 1,30	1,76 ± 2,08	1,06 ± 1,06
	Latencija do reakcije	1,57 ± 0,50	1,60 ± 0,60	1,53 ± 0,45



Slika 4.5. Reakcija bijegom na opetovani podražaj zvukom visoke frekvencije štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 13) i 5HTP-om (N= 10), mjerene kao broj prijeđenih polja. Rezultati su prikazani kao M ± SEM. ** p< 0,01, Wilcoxon singed rank test

5. RASPRAVA

Perinatalnim tretmanom prekursorom serotonina, 5- hidroksitriptofanom, smo htjeli izazvati povišenje koncentracije serotonina u perifernom odjeljku tijekom razdoblja intenzivnog razvoja serotonergičnih neurona (od 12. gestacijskog do 21. postnatalnog dana). Tijekom tog razdoblja krvno- moždana barijera još uvijek nije do kraja formirana, pa serotoninski odjeljci nisu u potpunosti razdvojeni, te je moguć prelazak serotonina iz jednog odjeljka u drugi. Povišenje periferne koncentracije serotonina u tom bi slučaju trebalo utjecati i na koncentraciju 5HT- a u središnjem odjeljku, a posredno zatim i na razvoj serotonergičnih neurona. Triptofan, početnu molekulu sinteze serotonina nismo koristili jer sudjeluje u različitim metaboličkim procesima pa je nemoguće pretpostaviti koliko će ga se prevesti u serotonin, dok se 5HTP nalazi samo u putu sinteze 5HT-a (Birdsall 1998). Također, nismo injicirali sam serotonin budući da on ne prelazi posteljicu (dio tretmana se vršio tijekom prenatalnog razdoblja), dok je njegov izravni prekursor prelazi (Birdsall 1998).

Cilj istraživanja je bio vidjeti je li inducirana hiperserotonemija ostavila posljedice u kognitivnom, emocionalnom i socijalnom ponašanju odraslih jedinki što bi ukazivalo na promjene u središnjem odjeljku 5HT. Naime odabrali smo aspekte ponašanja koji su regulirani serotoninom ili koji predstavljaju endofenotipove autizma. Endofenotip je mjerljivi simptom nekog poremećaja koji se može proučavati na animalnom modelu te predstavlja odlično oruđe za istraživanje biološke podloge različitih poremećaja ponašanja (Gould i Gottesman 2006).

Testom učenje i kognitivna rigidnost smo ispitivali opće kognitivne sposobnosti štakora kao i moguće stereotipno ponašanje tj. nemogućnost obrata naučenog (Crawley i sur. 2007, Tanimura i sur. 2008). Iako do sada nije pronađena izravna veza između poremećaja serotoninskog sustava i promjena u kognitivnim funkcijama, Crawley (2004, 2007**)** navodi kognitivnu rigidnost kao jedan od glavnih simptoma autizma. Cilj testa je bio utvrditi koliko brzo štakor nauči početni položaj nagrade, te hoće li i koliko brzo usvojiti promijenjeno mjesto nagrade. Niti u jednom od ta dva aspekta nismo pronašli značajne razlike između skupina. Takvi rezultati nisu iznenađujući jer serotonin primarno ne sudjeluje u procesima učenja (Spowart-Manning i Staay 2004).

Testom lokomotorne aktivnosti se ispituje opća aktivnost štakora, kao i nepravilnosti poput hiperaktivnosti ili slabe pokretljivosti (Barros Viana i sur. 2008, Crawley 2007a, Pandaranandakaa i sur. 2009). Budući da većina testova uključuje kretanje štakora kroz neki prostor testirali smo njihovu opću pokretljivost i aktivnost. To smo učinili kako bismo mogli utvrditi jesu li dobiveni rezultati u drugim testovima posljedica izmijenjenog ponašanja ili izmijenjene pokretljivosti štakora. Dobiveni rezultati

pokazuju da skupina tretirana 5HTP- om ima povećano horizontalno kretanje, pa to treba uzeti u obzir pri interpretaciji ostalih rezultata. Povećano kretanje je najčešće posljedica promjena u dopaminskom sustavu. Budući da serotonergični neuroni reguliraju mnoge strukture mozga, mogu utjecati i na dopaminergičke neurone srednjeg mozga, a tako posredno i na lokomotornu aktivnost.

Usmjereno istraživačko ponašanje te razinu anksioznosti štakora u nepoznatom okolišu smo testirali na ploči s rupama (Brown i Nemes 2008, Moy i sur. 2008). Grupa tretirana 5HTP- om je istražila veći broj rupa od kontrolne skupine, što je najvjerojatnije posljedica povećane horizontalne aktivnosti koju smo zabilježili u otvorenom polju. Stoga ne možemo zaključiti da je eksploratorna aktivnost u eksperimentalnoj skupini povećana, već samo da nije smanjena u odnosu na kontrolu. Omjer posjećenosti unutarnjih i vanjskih rupa nam je ukazao da štakori tretirani 5HTP-om pokazuju veću razinu anksioznosti. Unutarnje rupe štakorima predstavljuju otvoreni, nezaštićeni prostor, pa boravak u njemu inducira stres (Brown i Nemes 2008). Anksiozniji štakori izbjegavaju otvorene prostore (tzv. tigmotaksija), te sukladno tome i manje posjećuju unutarnje rupe. Crawley **(**2004, 2007) svrstava anksioznost među popratne endofenotipove autizma. Osim toga, poznato je da povišena razina 5HT može djelovati anksiogeno (Barros Viana i sur. 2008).

Pokus socijalni izbor testira odabir socijalne interakcije nad istraživanjem neživog objekta te preferenciju za nove jedinke nad već poznatima (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, 2007b). Štakori tretirani 5HTP-om su općenito proveli nešto više vremena u istraživanju, vjerojatno zbog povećanog kretanja. No, to se povećano istraživanje odnosilo na objekt, a ne na štakora, što je i dovelo do značajno manjeg omjera provedenog vremena sa štakorom naspram predmeta, nego kod kontrolnih štakora. To ukazuje na smanjeni interes za socijalnim kontaktom. U drugom dijelu pokusa se istraživala želja za novim socijalnim kontaktom nasuprot onim s već poznatim štakorom (Crawley 2004, 2007b). U tom dijelu nismo uočili statističke značajne razlike iako je omjer vremena provedenog s novim štakorom i vremena provedenog s već istraženim štakorom opet bio manji u eksperimentalnoj nego u kontrolnoj skupini. Serotonin je jedan od modulatora socijalnog ponašanja pa nam rezultati ukazuju na to da je došlo do poremećaja u 5HT sustavu. Promijenjeno socijalno ponašanje je također jedan od glavnih endofenotipova autizma (Crawley 2004, 2007b). Autistične osobe, naime, pokazuju smanjeni interes za ostavarivanjem i održavanjem socijalnih kontakata.

Testiranjem reakcija na opetovani zvučni podražaj smo pokušali utvrditi promjene u osjetilnoj percepciji štakora. Štakori imaju dobro razvijen sluh i koriste ultrazvuk kao sredstvo komunikacije. Unutar

tog raspona, određena frekvencija i trajanje (ovisno o dobi štakora) prenose različite poruke (Brudzynski 2001, Ricceri i sur. 2007**,** Wöhr i sur. 2005). Za zvučni podražaj smo izabrali frekvenciju između 18- 32 kHz jer njome štakori upozoravaju druge štakore na prisutnost opasnosti ili neugodnih podražaja. Ta frekvencija inducira urođena obrambena ponašanja, kao što su smrzavanje (engl. *freezing*) ili bježanje (Brudzynski 2001, Nicolas i sur. 2007, Wöhr i sur. 2005). Nismo uočili razlike između skupina u intenzitetu reakcije na zvučni podražaj, što nam ukazuje na jednaku sposobnost percepcije zvuka. Međutim, postoje razlike u habituaciji na zvučni podražaj. Nakon nekoliko zvučnih podražaja, kontrolna skupina pokazuje određeni stupanj navikavanja na podražaj, što vjerojatno odgovara percepciji da on ne predstavlja stvarnu opasnost. Suprotno tome, skupina tretirana 5HTP-om nije pokazala habituaciju na podražaje, što znači ili da je sama osjetilna percepcija izmijenjena ili da štakori zbog povećane anksioznosti zvučni podražaj i nakon višestrukog ponavljanja doživljavaju kao stvarnu opasnost. U oba slučaja poremećaji 5HT-a mogu igrati ulogu. Promjene u serotoninskom sustavu, osim na razinu anksioznosti, utječu i na procesiranje zvuka u odrasloj dobi (Kahne i sur. 2002), a hiperosjetljivost na zvučne podražaje je jedan od popratnih endofenotipova autizma (Crawley 2004, 2007).

Povećana razina anksioznosti, smanjena želja za socijalnim kontaktom i odsutnost habituacije na opetovani zvučni podražaj pokazuju da je primjena 5HPT-a u prenatalnom i ranom postnatalnom razdoblju ostavila posljedice na emotivno i socijalno ponašanje odraslih štakora, što ukazuje na anatomske i neurokemijske promjene u središnjem serotoninskom odjeljku.

6. ZAKLJUČAK

1. 10 štakora perinatalno tretiranih s 25 mg/ kg 5HTP-a i 18 štakora perinatalno tretiranih fiziološkom otopinom podvrgnuto je u odrasloj dobi bateriji testova koji ispituju kognitivno, emotivno i socijalno ponašanje.

2. Testirane kognitivne sposobnosti štakora tretiranih 5HTP-om su bile jednake onima u štakora kontrolne skupine, što znači da inducirane promjene nisu ostavile posljedice u učenju ili kognitivnoj rigidnosti.

3. Skupina štakora tretiranih 5HTP-om je, u odnosu na skupinu kontrolnih štakora, pokazala promjene u aspektima ponašanja koji su regulirani serotoninom, izravno- povećanu anksioznost, smanjenu socijabilnost i smanjenu habituaciju na opetovani zvučni podražaj, ili neizravno– povećanu lokomotornu aktivnost.

4. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da je farmakološki izazvana hiperserotonemija u perinatalnom razdoblju utjecala na razvoj serotoninskog sustava u mozgu, te je izazvala trajne promjene u emotivnom i socijalnom ponašanju štakora.

7. LITERATURA

Aleninaa N., Kikica D., Todirasa M., Mosienkoa V., Qadria F., Plehma R., Boye P., Vilianovitcha L., Sohrb R., Tennera K., Hortnaglb H., Badera M. (2008): Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. PNAS 106: 10332–10337.

Anderson G. M., Horne W.C., Chatterjee D., Cohen D. J. (1990): The hyperserotonemia of autism. Ann N Y Acad Sci. 600: 331–342.

Belzung C., Griebel G. (2001): Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. Behavioural Brain Research 125: 141–149.

Belzung C., Leman S., Vourc'h P., Andres C. (2005): Rodent models for autism: A critical review. Drug discovery today: disease models 2: 93–101.

Berger M., Gray J. A., Roth B. L. (2009): The Expanded Biology of Serotonin. Annu. Rev. Med. 60: 355–366.

Birdsall T. C. (1998): 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. Altern Med Rev 3: 271–280.

Bolivar V. J., Walters S. R., Phoenix J. L. (2007): Assessing autism-like behavior in mice: Variations in social interactions among inbred strains. Behavioural Brain Research 176: 21–26.

Brown G. R., Nemes C. (2008): The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: Is head-dipping a valid measure of neophilia?. Behav Processes. 78: 442–448.

Brudzynski S. M. (2001): Phramacological an behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 25: 611–617.

Brunelli S. A. (2005): Selective breeding for an infant phenotype: rat pup ultrasonic vocalization (USV). Behavior Genetics 35: 53–65.

Brunelli S. A., Hofer M. A. (2007): Selective breeding for infant rat separation-induced ultrasonic vocalizations: Developmental precursors of passive and active coping styles. Behavioural Brain Research 182: 193–207.

Brust P., Friedrich A., Krizbai I. A., Bergmann R., Roux F., Ganapathy V., Johannsen B. (2000): Functional expression of the serotonin transporter in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. J. Neurochem. 74: 1241–1248.

Caspi R., Foerster H., Fulcher C. A., Kaipa P., Krummenacker M., Latendresse M., Paley S., Rhee S. Y., Shearer A. G., Tissier C., Walk T. C., Zhang P., Karp P. D. (2008): The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases.

Nucleic Acids Research 36: 623– 631.

Caston J., Yon E., Mellier D., Godfrey H. P., Delhaye-Bouchaud N., Mariani J. (1998): An animal model of autism: behavioural studies in the GS guinea-pig. European Journal of Neuroscience 10: 2677–2684.

Chugani D. C., Muzik O., Behen M., Rothermel R., Janisse J. J., Lee J., Chugani H. T. (1999): Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. Ann Neurol 45: 287–295.

Clarke K. A., Parker A. J., Stirk G. C. (1984): Locomotion in the rat after 5.hydroxy-L-tryptophan. European Journal of Pharmacology 98: 255–260.

Cook E. H., Leventhal B. L. (1996): The serotonin system in autism. Current opinions in pediatrics 8: 348–354.

Côte F., Thevenot E., Fligny C., Fromes Y., Darmon M., Ripoche MA., Bayard E., Hanoun N., Saurini F., Lechat P., Dandolo L., Hamon M., Mallet J., Vodjdani G. (2003): Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 13525–13530.

Crawley J. N. (2004): Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic- like behaviors. MRDD Research Reviews 10: 248–58.

Crawley J. N. (2007a): Motor functions; Learning and memory; Social behavior; Emotional behaviors: animal models of psychiatric diseases. U: What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey, str. 62–85; 110–163; 206–225; 226–265.

Crawley J. N. (2007b): Mouse Behavioral Assays Relevant to the Symptoms of Autism. Brain Pathol 17: 448–459.

Crawley J. N., Chen T., Puri A., Washburn R., Sullivan T. L., Hill J. M., Young N. B., Nadler J. J., Moy S. S., Young L. J., Caldwell H. K., Young W. S. (2007): Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: Comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. Neuropeptides 41: 145–163.

de Barros Viana M., Zangrossi H., Massaro Onusic G. (2008): 5-HT1A receptors of the lateral septum regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 89: 360–366.

DiCicco-Bloom E., Lord C., Zwaigenbaum L., Courchesne E., Dager S.R., Schmitz C., Schultz R. T., Crawley J. N., Young L. J. (2006): The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder.

J. Neurosci. 26: 6897–6906.

Dolenec P. (2009): Fiziološke posljedice perinatalne primjene prekursora serotonina u štakora. Diplomski rad, Biološki odsjek, Prirodoslovno- matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Frank M. G., Stryker M. P., Tecott L. H. (2002): Sleep and sleep homeostasis in mice lacking the 5-HT2c receptor. Neuropsychopharmacology 27: 869–873.

Frazer A., Hensler J. G. (1999): Serotonin U: Siegel G. J. (ur.) Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Lippincott–Raven Publishers, 227 East Washington Square, Philadelphia, str. 227–248.

Gerlai R. (1998): A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice: A strain comparison and lesion study. Behavioural Brain Research 95: 91–101.

Gould T. D., Gottesman I. I. (2006): Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. Genes, brain and behavior 5: 113–119.

Hashimoto S., Inoue T., Koyanama T. (1999): Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. European Journal of Pharmacology 378: 23–30.

Holz R. W., Fisher S. K. (1999): Synaptic transmission and cellular signaling: an overview. U: Siegel G. J. (ur.) Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia, str. 167–184.

Hranilovic D., Bujas-Petkovic Z., Tomicic M., Bordukalo-Niksic T., Blazevic S., C icin-Sain L. (2009): Hyperserotonemia in autism: activity of 5HT-associated platelet proteins. J Neural Transm 116: 493–501.

Hranilovic D., Cicin-Sain L.,Bordukalo-Niksic T., Jernej B. (2005): Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: Differences in anxiety-related behavior. Behavioural Brain Research 165: 271–277.

Hunt P. R., Aggleton J. P. (1998): An examination of the spatial working memory deficit following neurotoxic medial dorsal thalamic lesions in rats. Behavioural Brain Research 97: 129–141.

Jimenez-Trejo F., Tapia- Rodriguez M., Queiroz D. B. C., Padilla P., Avellar M. C. W., Rivas Manzano P., Manjarrez- Gutierrez G., Gutierrez- OspinaG. (2007): Serotonin Concentration, Synthesis, Cell Origin, and Targets in the Rat Caput Epididymis During Sexual Maturation and Variations Associated With Adult Mating Status: Morphological and Biochemical Studies. J Androl 28: 136–149.

Jimerson D. C., Lesem M. D., Kaye W. H., Hegg A. P., Brewerton T.D. (1990): Eating disorders and depression: is there a serotonin connection?. Biol Psychiatry. 28: 443–454.

Kahne D., Tudoric A., Borella A., Shapiro L., Johnstone F., Huang W., Whitaker-Azmitia P. M. (2002): Behavioral and magnetic resonance spectroscopic studies in the rat hyperserotonemic model of autism. Physiology & Behavior 75: 403–410.

Kennett G. A., Bright F., Trail B., Baxter G. S., Blackburn T. P. (1996): Effects of the 5-HT2B receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. British Journal of Pharmacology 117: 1443–1448.

Kolb B., Whishaw I. Q. (2001): How the neurons communicate and adapt?; How do we learn and remeber?. U: An Introduction to Brain and Behavior. Worth Publishers, New York, str. 148– 185; 482– 519.

Laterra J., Keep R., Betz L. A.,Goldstein G. W. (1999): Blood—brain—cerebrospinal fluid barriers. U: Siegel G. J. (ur.) Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia, str. 559- 575.

Levin E. D., Christopher N. C., Brrigs S. J. (1997): Chronic nicotinic agonist and antagonist effects on T-maze alternation. Physiology & Behavior 61: 863–866.

Lord C., Cook E. H., Leventhal B. L., Amaral D. G. (2000): Autism spectrum disorders. Neuron 28: 355– 363.

Lucki I. (1998): The spectrum of behaviors influenced by serotonin. Biol Psychiatry. 44: 151–162.

McNamara I. M., Borella A. W., Bialowas L. A., Whitaker-Azmitia P. M. (2007): Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: Social, behavioral and peptide changes. Brain research 1189: 203–214.

Melikian H. E. (2004): Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. Pharmacology & Therapeutics 104: 17–27.

Morrow J. D., Vikraman S., Imeri L., Opp M. R. (2008) Effects of serotonergic activation by 5-hydroxytryptophan on sleep and body temperature of C57BL/6J and interleukin-6-deficient mice are dose and time related. SLEEP 31: 21–33.

Moy S. S., Nadler J. J., Poe M. D., Nonnemana R. J., Young N. B., Koller B. H., Crawley J. N., Duncana G. E., Bodfisha J. W. (2008): Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: Relevance to autism. Behavioural Brain Research 188: 178–194.

Moy S. S., Nadler J.J. (2008): Advances in behavioral genetics: mouse models of autism. Molecular Psychiatry 13: 4–26.

Murcia C. L., Guldenb F., Herrupa K. (2005): A question of balance: a proposal for new mouse models of autism. Int. J. Devl Neuroscience 23: 265–275.

Murphy D. L. (1990): Peripheral indices of central serotonin function in humans. Ann N Y Acad Sci. 600: 282–295.

Nicolas L. B., Klein S., Prinssen E. P. (2007): Defensive-like behaviors induced by ultrasound: further pharmacological characterization in Lister hooded rats. Psychopharmacology 194: 243–252.

Panagiotaropoulos T., Diamantopoulou A., Stamatakis A., Dimitropoulou M., Stylianopoulou F. (2009): Learning of a T-maze by rat pups when contact with the mother is either permitted or denied. Neurobiology of Learning and Memory 91: 2–12.

Pandaranandakaa J., Poonyachoti S., Kalandakanond-Thongsongb S. (2009): Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety asmeasured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system**.** Behavioural Brain Research 198 :142–148.

Parks C. L., Robinson P. S., Sibille E., Shenk T., Toth M. (1998): Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 10734–10739.

Ricceri L., Moles A., Crawley J. N. (2007): Behavioral phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders: Relevant social behavior patterns across the life span. Behavioural Brain Research 176: 40–52.

Savelieva K. V., Zhao S., Pogorelov V. M., Rajan I., Yang Q., Cullinan E., Lanthorn T. H. (2008): Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. PLoS ONE 3: e3301.

Schneider T., Przewłocki R. (2005): Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. Neuropsychopharmacology 30: 80–89.

Schwarting R. K. W., Borta A. (2005): Analysis of behavioral asymmetries in the elevated plus-maze and in the T-maze. Journal of Neuroscience Methods 141: 251–260.

Shair H. N. (2007): Acquisition and expression of a socially mediated separation response. Behavioural Brain Research 182: 180–192.

Simonson M., Stephan J. K., Hanson H. M., Chow B. F. (1971): Open Field Studies in Offspring of Underfed Mother Rats. J. Nutr. 101: 331–336.

Spowart-Manning L., Staay F.J. van der (2004): The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. Behavioural Brain Research 151: 37– 46.

Sunanda, Shankaranarayana B. S., Raju T. R. (2000): Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats. Current science 79: 1581–1584.

Tanimura Y., Yang M. C., Lewis M. H. (2008): Procedural learning and cognitive flexibility in a mouse model of restricted, repetitive behaviour. Behavioural Brain Research 189: 250– 256.

Thomas D. R., Melotto S., Massagrande M., Gribble A. D., Jeffrey P., Stevens A. J., Deeks N. J., Eddershaw P. J., Fenwick S. H., Riley G., Stean T., Scott C. M., Hill M. J., Middlemiss D. N., Hagan J. J., Price G. W., Forbes I. T. (2003): SB-656104-A, a novel selective 5-HT7 receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. British Journal of Pharmacology 139: 705–714.

Turner E. H., Loftis J. M., Blackwell A. D.(2006): Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. Pharmacol Ther. 109: 325–338.

Tvrdeic A., Kocevski D. (2008): Does behavioral response to novelty influence paw withdrawal latencies in repeated Hargreaves test? Period biol 110: 95–100.

Wakayama K., Ohtsuki S., Takanaga H., Hosoya K., Terasak T. (2002): Localization of norepinephrine and serotonin transporter in mouse brain capillary endothelial cells. Neurosci Res 44: 173–180.

Watts S. W., Priestley J. R. C., Thompson J. M. (2009): Serotonylation of Vascular Proteins Important to Contraction. PLoS ONE 4: e5682.

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?. Int. J. Devl Neuroscience 23: 75–83.

Whitaker-Azmitia P. M., DruseM., Walker P., Lauder J. M. (1996): Serotonin as a developmental signal. Behavioural Brain Research 73: 19–29.

Wöhr M., Borta A., Schwarting R. K. W. (2005): Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose– response study in the rat. Neurobiology of Learning and Memory 84: 228–240.

www.themedicalbiochemistrypage.org/nerves.html#receptors (pristupljeno 25.02.2010.)

www.z.about.com/d/bipolar/1/0/b/3/synapse1.gif (pristupljeno 15.03.2010.)