

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Mia Rora

**Utjecaj povišene i snižene razine perifernog
serotonina na trabekularnu koštanu masu
štakora**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za mineralizirana tkiva, Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom akademika Slobodana Vukičevića u sklopu Tehnologijskog projekta "Uloga TSH u modelu osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom koštanom masom", voditelj akademik Slobodan Vukičević i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014/2015.

POPIS KRATICA:

5HT	5 hidroksitriptamin
K_m	Michaelisova konstanta
TPH	triptofan hidroksilaza
MAO	monoaminooksidaza
5HIAA	5-hidroksi indol octena kiselina
SERT	serotoninski transporter
5HTT	5 hidroksitriptaminski transporter
LRP	protein 5 povezan s lipoproteinskim receptorom male gustoće
PRP	plazma bogata trombocitima
PSL	razina serotonina u trombocitima
OPT	ortoftaldialdehid
μCT	mikro kompjuterizirana tomografija
DXA	dvoenergetska apsorpciometrija x zraka
BV	koštani volumen
TV	tkivni volumen
BV/TV	odnos koštanog i tkivnog volumena
Tb.No.	broj trabekula
Tb.Sp.	trabekularno razdvajanje
Tb.Th.	debljina trabekula
BMD	koštana mineralna gustoća

SADRŽAJ

1. SAŽETAK.....	
2. SUMMARY	
3. UVOD	1
3.1 SEROTONIN.....	1
3.2. KOST.....	3
3.3. ULOGA SEROTONINA U REGULACIJI KOŠTANOG METABOLIZMA	5
4. HIPOTEZA	8
5. CILJEVI RADA.....	8
6. MATERIJALI I METODE	9
6.1 ODREĐIVANJE RAZINE SEROTONINA	9
6.2. ŽIVOTINJSKI MODEL I PROTOKOL	9
6.3. MIKRO-KOMPJUTERIZIRANA TOMOGRAFIJA	10
6.4. DENZITOMETRIJA	11
6.5 STATISTIKA	11
7. REZULTATI.....	12
7.1. RAZLIKE U MORFOMETRIJSKIM PARAMETRIMA ŽIVOTINJA SA PROMIJENJENOM RAZINOM SEROTONINA	12
7.1.1. Težina	12
7.1.2. Duljina i širina bedrene i goljenične kosti.....	13
7.2. MIKRO CT ANALIZA	14
7.2.1. Distalni dio bedrene kosti.....	14
7.2.2. Lumbalni dio kralješnice	16
7.3. ANALIZA KOŠTANE MINERALNE GUSTOĆE DENZITOMETRIJOM	19
8. RASPRAVA.....	20
9. ZAKLJUČAK	22
10. ZAHVALE.....	22
11. LITERATURA.....	23
12. ŽIVOTOPIS	26

1. SAŽETAK

Rora Mia

Utjecaj povišene i snižene razine perifernog serotonina na trabekularnu koštanu masu štakora

U nedavnim istraživanjima se pokazalo kako periferni serotonin djeluje inhibitorno na proces koštane formacije. U našem istraživanju smo koristili sublinije životinja dobivene selektivnim križanjem sa višom odnosno nižom razinom perifernog serotonina što predstavlja fiziološki model za razliku od modela s izbačenim genom u kojem su dobivene ekstremne vrijednosti. Kako bi pokazali utjecaj perifernog i centralnog serotonina analizirali smo distalni dio bedrene kosti i kralježnicu mikro CT-om te denzitometrijom. Potvrđene su statistički značajne razlike relevantnih koštanih parametara životinja sa sniženom razinom serotonina u odnosu na životinje sa povišenom razinom serotonina. Porastom vrijednosti serotonina dolazi do snižavanja trabekularnog koštanog volumena. Nadalje, životinje sa povišenom razinom serotonina imale su veću duljinu bedrene i goljenične kosti od životinja sa sniženom razinom serotonina. Dobiveni rezultati mogli bi poslužiti u daljnjim istraživanjima i razvoju nove anaboličke terapije kojoj bi mehanizam djelovanja bio inhibicija ključnih dijelova serotonininskog puta.

Ključne riječi: serotonin, kost, anabolička terapija

2. SUMMARY

Rora Mia

The Influence of Raised and Reduced Levels of Peripheral Serotonin on Trabecular Bone Mass in Rats

Recent studies have shown that peripheral serotonin has an inhibitory effect on the process of bone formation. In our research, we used sublines of animals that have developed, through selective cross-breeding higher and lower levels of peripheral serotonin, which represents a physiological model, as opposed to the model with the excluded gene in which extreme values were obtained. To show the effect of peripheral and central serotonin, we have analysed the distal femur and the spine using micro-CT and densitometry. We confirmed statistically significant differences in relevant bone parameters of animals with reduced levels of serotonin, compared to animals with raised levels. The increase in the serotonin value leads to lowering trabecular bone volume. Measuring length and width of femur and shin bone we have found that increasing serotonin values leads to increasing bone length and width compared to animals with reduced levels of serotonin. The acquired results could help further research and the development of a new anabolic therapy, whose mechanism of action would be the inhibition of key parts of serotonergic pathways.

Key words: serotonin, bone, anabolic therapy

3. UVOD

3.1 SEROTONIN

Serotonin ili 5–hidroksitriptamin (5-HT), biogeni je amin široko rasprostranjen u biljnome i životinjskome svijetu. U sisavaca serotonin se nalazi u enterokromafinim crijevnim stanicama, u trombocitima, te kao neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (Mohamed i sur., 2008). Serotonin u organizmu se sintetizira iz esencijalne aminokiseline L-triptofana pomoću enzima triptofan hidroksilaze (Slika 1). Najveći dio, oko 95% serotonina u organizmu sintetizira se u enterokromafinim stanicama tankog crijeva (tzv. Kultschitzkyjeve stanice), a ostatak se sintetizira u mozgu i perifernim organima.

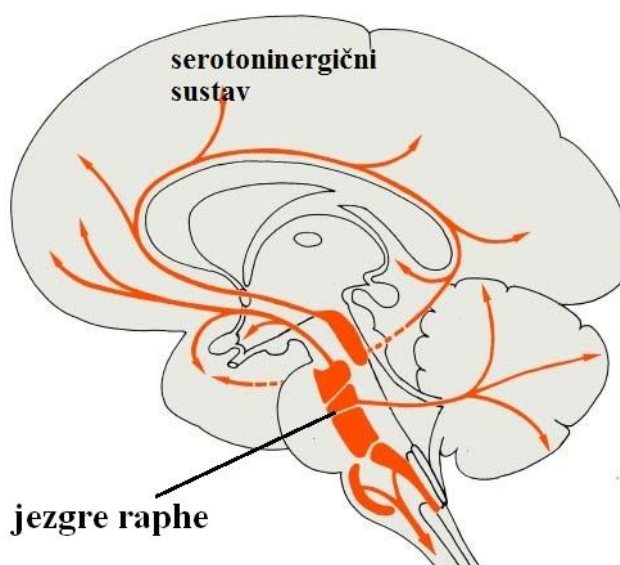


Slika 1. Sinteza serotonina. Hidroksilacijom C5 atoma triptofan hidroksilazom nastaje 5-hidroksitriptofan, koji se potom dekarboksilira dekarboksilazom aromatskih L-aminokiselina u serotonin.

Zbog ograničene distribucije i visoke konstante K_m triptofan hidroksilaza je limitirajući faktor u sintezi serotonina. Samo 5% od ukupnog metabolizma triptofana koristi se za sintezu serotonina. Ovako mali postotak može se objasniti gotovo specifičnom lokalizacijom triptofan hidroksilaze u mozgu i enterokromafinim stanicama. 95% metabolizma triptofana odvija se u jetri za sintezu kinureina (Mohamed i sur., 2008). Zbog dvostruke prirode serotonina otkrivene su 2 izoforme triptofan hidroksilaze (TPH). Izoforma TPH1 djeluje na periferiji organizma dok se TPH2 izoforma nalazi u središnjem živčanom sustavu u serotonergičnim neuronima (Walther i sur., 2003). Razgradnja serotonina odvija se pomoću enzima monoamino oksidaze (MAO) koja također ima 2 izoforme (Mohamed i sur., 2008). MAO-A izoforma djeluje u jetri i plućima gdje se razgrađuje veći dio serotonina, dok MAO-B

izoforma djeluje u mozgu. Konačan produkt razgradnje serotonina je 5-hidroksi indol octena kiselina (5-HIAA) (Ashcroft i sur., 1966).

Iz enterokromafinih stanica serotonin se otpušta u cirkulaciju te djeluje na periferiji organizma, dok je serotoninski sustav u centralnom živčanom sustavu odvojen krvno moždanom barijerom. Serotonin ne prolazi krvno moždanu barijeru te je na taj način dobro odijeljen od serotonina iz periferije, što je vrlo interesantno u proučavanju njegove uloge kao molekule koja djeluje neovisno u dva odvojena sustava (Mann i sur., 1992). U cirkulaciji se serotonin nalazi u plazmi u malim količinama jer ga trombociti unose u svoj lumen pomoću serotoninskog transportera (5HTT ili SERT) (Berger i sur., 2009). Za farmakologiju je posebno važno da je serotonin neurotransmiter u središnjim i perifernim neuronima. U središnjem živčanom sustavu postoji difuzni serotonergični sustav. Tijela neurona nalaze se u tzv. rafe-jezgrama iz kojih odlaze descendenti aksoni u kralježničnu moždinu i ascendentne projekcije u mozak (Slika 2).



Slika 2. Mjesto stvaranja serotonina u mozgu te njegove glavne projekcijske zone.

Farmakološki i fiziološki učinci serotonina u središnjem živčanom sustavu su mnogostruki i raznovrsni, a obuhvaćaju nadzor nad učenjem, pamćenjem, raspoloženjem i ponašanjem, nad kardiovaskularnom funkcijom, termoregulacijom, mišićnom kontrakcijom, endokrinom funkcijom i depresijom. U organizmu serotonin ima brojne katkad i suprotne učinke, to je posljedica što ovaj biogeni amin djeluje na mnoga tkiva i organe izravno, ali i posredno preko

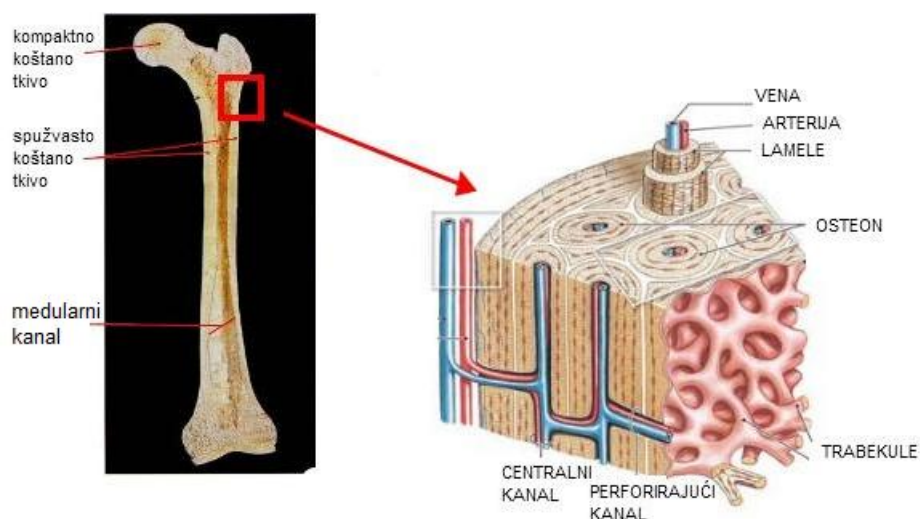
živčanog sustava. U pravilu serotonin izravno uzrokuje kontrakciju glatkih mišića krvnih žila preko 5-HT_{2a} receptora. Osim u skeletnim mišićima i srcu, gdje nastaje vazodilatacija, serotonin izaziva vazokonstrikciju (Katzung i sur., 2011). Serotoninom izazvana vazodilatacija, zahtijeva prisutnost vaskularnih endotelnih stanica (u oštećenom endotelu koronarne se krvne žile kontrahiraju). Aktivacija 5-HT₃ receptora na živčanim završecima vagusa u koronarnim krvnim žilama povezana je s kemoreceptorskim refleksom koji se sastoji od bradikardije zbog pojačanog tonusa vagusa i hipotenzije koja je posljedica smanjenja srčanog minutnog volumena bradikardijom. Nakon injekcije serotonina pokusnim životinjama, vide se tri promjene krvnog tlaka. Na početku su smanjeni frekvencija srca, minutni volumen i krvni tlak zbog kemoreceptorskog učinka. Nakon toga se zbog vazokonstrikcije krvni tlak povećava. U trećoj fazi se tlak ponovno smanjuje, što se pripisuje vazodilataciji krvnih žila koje opskrbljuju skeletne mišiće (Katzung i sur., 2011). U probavnom sustavu dolazi do stimulacije motiliteta gastrointestinalnoga trakta, u bronhima najčešće nastaje bronhokonstrikcija, posebice u astmatičnih bolesnika i bolesnika sa karcinoidom (Kovač i suradnici 2011). Zbog nedostatka substanične organizacije, kao i enzima triptofan hidroksilaze, trombociti ne mogu sintetizirati serotonin, ali posjeduju mehanizam za njegov aktivni unos („serotoninsku pumpu“). Smatra se da najveći dio serotonina u njima potječe iz enetrokromafinih stanica crijevne sluznice iz kojih serotonin dopijeva u trombocite pretežno iz cirkulacije. Trombociti imaju sposobnost otpuštanja serotonina bilo izdvojeno bilo vlastitim raspadom. Učinci serotonina posredovani su iznimno velikim brojem membranskih receptora (od 1 do 7). Šest podtipova pripada porodici receptora spregnutih s G-proteinima dok je jedan ionotropni receptor. Posljednji (5-HT₃) član je obitelji nikotinskih/GABA_A receptora u čijem se sastavu nalaze Na⁺, K⁺ ili Cl⁻ kanali (Katzung i sur., 2011).

3.2. KOST

Kost je visoko specijalizirano tkivo koje je karakteristično za sve kralježnjake. Uz glavnu ulogu potpore organizmu kost je štiti organima u tjelesnim šupljinama, hvatište mišićima, mjesto stvaranja krvnih stanica i biokemijski regulator koncentracije kalcija i drugih minerala u organizmu. Koštano tkivo izgrađeno je od koštanog matriksa i tri različite vrste stanica: osteocita, osteoblasta i osteoklasta. Koštani matriks sastoji se od organskog materijala koji mu

daje elastičnost i anorganskih soli koje mu daju čvrstoću. Kao najzastupljeniji organski materijal ističe se kolagen tipa I koji čini 95% organske tvari kosti. Od ostalih organskih tvari nalazi se i veliki broj proteoglikana, glikoproteina i koštanih morfogenetskih proteina. Najzastupljeniji anorganski spoj u kosti je hidroksiapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Diferencijacijom iz osteoprogenitornih stanica nastaju osteoblasti, stanice odgovorne za proizvodnju i mineralizaciju koštanog matriksa. Osteociti su zreli osteoblasti koji se nalaze unutar koštanog matriksa i zaduženi su za njegovo održavanje. Osteoklasti su velike, višejezgrene stanice, nastale spajanjem mononuklearnih stanica prekursora u višejezgrene cjeline (Urist, 1980). Osnovna im je zadaća razgradnja mineraliziranog koštanog tkiva lučenjem proteolitičkih enzima i vodikovih iona.

Morfološka struktura kosti dijeli se na kompaktnu-kortikalnu i na spužvasto-trabekularnu kost (Slika 3). U kortikalnoj kosti su vlakna kolagena gusto složena u koncentrične lamele dok su u spužvastoj kosti kolagena vlakna posložena u otvorenu mrežu trabekula. Trabekule čine kost lakšom i daju joj veću površinu te se stvaraju mjesta za krvne žile i koštanu moždinu. Razlika u morfologiji između ova dva tipa kosti ima osnovu u primarnoj funkciji. Kortikalna kost služi kao mehanička potpora, dok trabekularna ima primarnu funkciju u metabolizmu koštanog tkiva.

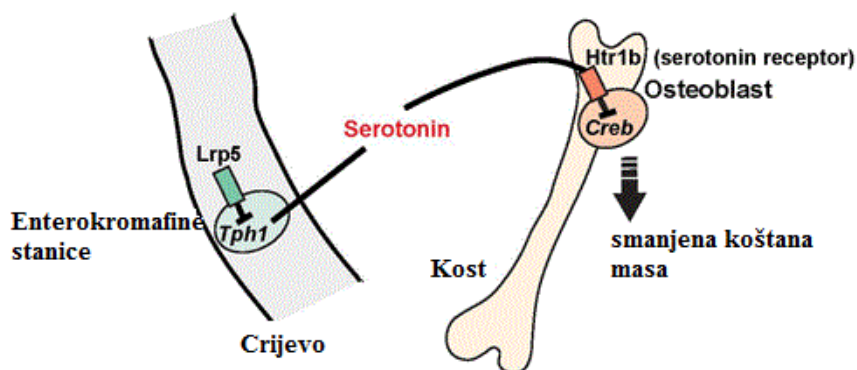


Slika 3. Osnovna građa koštanoga tkiva.

Koštano tkivo je u neprekidnom dinamičkom procesu razgradnje i ponovnog obnavljanja. Proces kojim se tijekom života dijelovi koštanog tkiva zamjenjuju novoizgrađenom kosti naziva se koštanom pregradnjom. Njezin je cilj izmjena starih i dotrajalih dijelova novom, kvalitetnom kosti, a nastaje kao odgovor na tjelesnu aktivnost. Koštana pregradnja također osigurava otpuštanje kalcija i ostalih minerala u cirkulaciju. Taj proces je nužan za održavanje optimalne koncentracije kalcija u krvi i odvijanje raznih procesa u tijelu. Pregradnja kosti se odvija u dvije faze. Prva je razgradnja (resorpcija), za koju su odgovorni osteoklasti koji djeluju na koštanoj površini. Druga faza je izgradnja kosti pod utjecajem osteoblasta koji udubine nastale razgradnjom kosti ispunjavaju organskim matriksom. U mrežu kolagenih vlakana odlažu se minerali te ciklus koštane pregradnje završava mineralizacijom kosti organskog matriksa. Ravnoteža u procesu koštane pregradnje postiže se kada se razgrađena kost u potpunosti nadomjesti novim koštanim tkivom. Tijekom života mijenja se dinamika koštane pregradnje. Vrh koštane mase postiže se oko tridesete godine života nakon čega postepeno prevladavaju procesi koštane razgradnje. Slabljenje strukture, odnosno kvalitete kosti, može dovesti do razvoja kronične degenerativne bolesti, osteoporoze, visoko zastupljene u zapadnjačkoj populaciji koja je praćena velikim rizikom za razvoj prijeloma, koji potom može dovesti do vrlo ozbiljnih zdravstvenih komplikacija (WHO, 2004).

3.3. ULOGA SEROTONINA U REGULACIJI KOŠTANOG METABOLIZMA

Uloga serotonina u regulaciji metabolizma koštanog tkiva otkrivena je tek nedavno (Warden i sur., 2005). Transporter serotonina (5HTT) kao i serotoninski receptori nađeni su na svim stanicama koštanog tkiva. Iako se funkcija navedenih receptora treba još potvrditi kao i mehanizmi djelovanja serotonina na kost, vjeruje se da djeluje neposredno preko Lrp-5 (low density lipoprotein receptor 5) receptora koji je jedan od koreceptora u Wnt signalnom putu (Yadav i sur. 2008) (Slika 4).

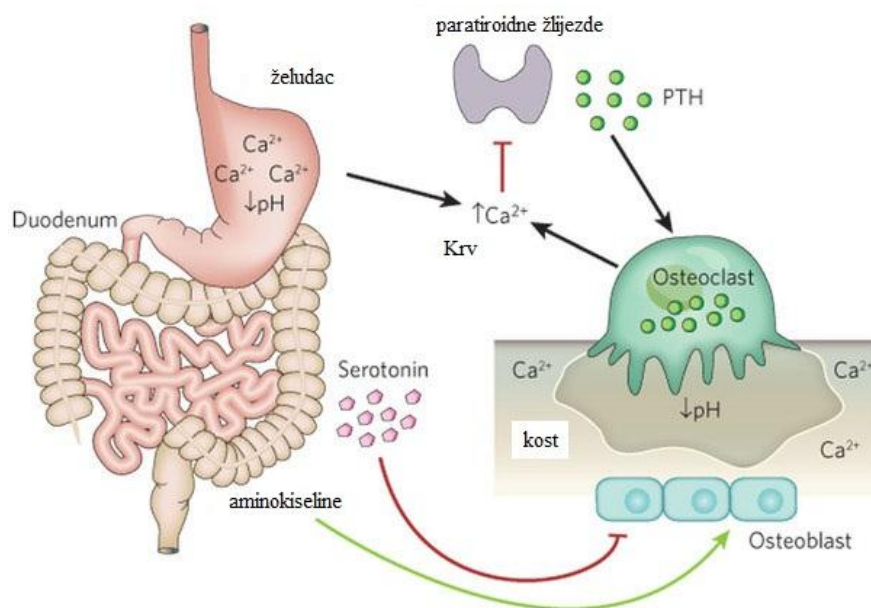


Slika 4. Mehanizam djelovanja serotonina na kost.

U ljudi gubitak funkcije LRP-5 receptora zbog mutacije uzrokuje osteoporozu pseudoglioma (Gong i sur., 2001). Osteoporoza pseudoglioma je rijetka autosomalno recesivna bolest koja se očituje juvenilnom osteoporozom i kongenitalnom sljepoćom (Martinović i sur., 2004). Za razliku od osteoporoze pseudogliome gdje gubitak funkcije LRP-5 dovodi do prevladavanja kataboličkih nad anaboličkim procesima koštanog metabolizma, sindrom visoke koštane mase, uzrokovan hiperfunkcijom LRP-5 signalnog puta, pokazuje prevladavanje anaboličkih procesa (Boyden i sur., 2002). Genskom analizom miševa sa izbačenim genom za Lrp-5 utvrđeno je da ekspresija gena za triptofan hidroksilazu, koja je ograničavajući faktor u sintezi serotonina, značajno povišena u odnosu na miševe divljeg tipa (Kato i sur., 2002), koji su imali manju koštanu masu te smanjenu funkciju i proliferaciju osteoblasta.

Navedeno može imati značajnu ulogu u prevenciji menopauzom inducirane osteoporoze kod miševa, djelovanjem na smanjenje produkcije serotonina na periferiji.

Istraživanja pokazuju da serotonin iz crijeva može direktno kontrolirati koštani metabolizam. Otpuštanjem u krv dolazi do kosti gdje je gubitak kosti upravo proporcionalan sa koncentracijom serotonina (Karsenty i sur., 2008).



Slika 5. Utjecaj crijevnog serotonina na koštani metabolizam djelovanjem na funkciju osteoblasta.

Najnovija istraživanja pokazuju da serotonin ima utjecaj na proliferaciju osteoklasta, za razliku od prvotnih rezultata u kojim se pokazalo da serotonin djeluje na osteoblaste (Chabbi i sur., 2012). Također je napravljeno istraživanje u kojem se pokazuje da serotonin ne djeluje na kost preko Lrp-5 te da je upitan njegov direktan učinak na kost (Cui i sur., 2011). Sve navedeno ukazuje na još nedovoljno istraženu ulogu serotonina u koštanom metabolizmu te da je uspostavljanje adekvatnih životinjskih modela, neophodno za tumačenje, analizu te u konačnici formulaciju buduće terapije u bolestima koštanog metabolizma.

4. HIPOTEZA

U životinjskom modelu s promijenjenom razinom serotonina u krvi postojat će utjecaj na pregradnju trabekularne kosti. Životinje s povišenom razinom serotonina imat će slabiju koštanu pregradnju te će kosti biti slabije kvalitete u usporedbi sa životinjama sa sniženom razinom serotonina u krvi.

5. CILJEVI RADA

- Testirati utjecaj razine serotonina u krvi na kvalitetu kosti.
- Odrediti i kvantificirati razliku u koštanim trabekularnim parametrima između životinja sa višom i nižom razinom serotonina.
- Odrediti i kvantificirati razliku u dužini kosti između životinja sa višom i nižom razinom serotonina.
- Odrediti i kvantificirati razliku u širini kosti između životinja sa višom i nižom razinom serotonina.

6. MATERIJALI I METODE

6.1 ODREĐIVANJE RAZINE SEROTONINA

Plazma bogata trombocitima (PRP-platelet rich plasma) dobivena je centrifugiranjem uzorka krvi na 1200 x g, 2 min. Dio plazme u kojoj su se odijelili trombociti prenio se u novu tubu gdje se miješanjem dobila homogena suspenzija trombocita. Iz te homogene smjese odijelio se mali dio za brojanje trombocita u uzorku. Razina serotonina u trombocitima (PSL-platelet serotonin level) dobivena je centrifugiranjem plazme bogate trombocitima (PRP) na 8500 x g, 10 min. Trombociti su homogenizirani u deioniziranoj vodi pomoću ultrasonikacije (30s, 20kHz, 8µm). Proteini iz otopine su precipitirani sa ZnSO₄ (10%, 1 mL) i NaOH (1 N, 0.5 mL) nakon čega je uslijedilo ponovno centrifugiranje na 1200 x g, 15min. Supernatant je prenesen u staklenu epruvetu u koju je kasnije dodan L-cistein (1%, 100 µl) i OPT (orthophthaldi-aldehyde) (0.01%, 2 mL) nakon čega je reakcijska smjesa bila zagrijana do 100°C i tako držana 10min. Nakon hlađenja fluorescencija uzorka je očitana na 485nm sa ekscitacijom na 345nm (Perkin-Elmer LS50). Rezultati su izraženi kao masa serotonina (5HT) u ng po jediničnom broju trombocita (Jernej i sur., 2011).

6.2. ŽIVOTINJSKI MODEL I PROTOKOL

Istraživanje se provodilo u suradnji sa Institutom "Ruđer Bošković" koji je donirao životinje sa promijenjenom razinom serotonina u krvi. Sublinije štakora soja Wistar sa visokim i niskim razinama serotonina stvorene su tako da su mužjaci i ženke sa najvišim i najnižim vrijednostima trombocitnog serotonina izabrani iz populacije i pareni međusobno kako bi stvorili sublinije sa visokim i niskim serotoninom. U potomcima se određivanje serotonina u trombocitima odvijalo 4 tjedna nakon okota. Srednje vrijednosti serotonina za subliniju s nižim vrijednostima serotonina s iznosima oko 70%, dok za subliniju sa višim vrijednostima s iznosima oko 150% u odnosu na početnu populaciju se smatralo značajnim za uvrštavanje u studiju (Cicin-Sain i sur., 2011). Životinje su smještene u kavezima pod kontroliranim uvjetima sa pravilnom izmjenom svjetla i tame (12h/12h), 24°C i 60±10% relativne vlažnosti. Životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi. Svi pokusi su provedeni u skladu sa i prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili u druge znanstvene svrhe Zakona o zaštiti životinja Republike Hrvatske.

U istraživanje su bile uključene ženke sublinije štakora soja Wistar koje smo razdvojili u dvije grupe prema razini serotonina u plazmi: povišena razina i snižena razina. Određivanje razine serotonina napravljeno je u laboratorijima instituta "Ruđer Bošković", Zavod za molekularnu biologiju, Laboratorij za neurokemiju i neurobiologiju. Životinje su vagane kako bi se usporedila masa između sublinija. Nakon žrtvovanja životinja duljina i širina kosti bila je izmjerena pomičnom mjerkom i dalje su kosti bile fikisrane 24 sata u 4% formalinu i pohranjene u 70% etanolu.

6.3. MIKRO-KOMPJUTERIZIRANA TOMOGRAFIJA

Tomografsko snimanje se temelji na usmjeravanju rendgenskih zraka prema predmetu iz više orijentacija (kutova) i mjerenju smanjenja intenziteta emitiranih zraka. Kompjuterizirana tomografija (CT) je neinvazivna radiografska metoda koja koristi kompjuter za rekonstrukciju slike od ravnine poprečnog presjeka (eng. slice) kroz predmet. CT umjesto dvodimenzionalnih elemenata, piksela (slikovni elementi) sadrži voksele (volumni elementi) koji opisuju trodimenzionalnost dobivene slike (Guldborg i sur., 2004). CT je prvi put razvijena ranih 1970-tih godina (Ambrose i sur., 1973). CT uređaji dobivaju prefiks s obzirom na razinu razlučivosti.

U istraživanju se koristio μ CT uređaj 1076 tvrtke SkyScan (Kontich, Belgija) (Slika 6). Uređaj ima mogućnost snimanja *in vivo* i *ex vivo* uzoraka. Snimanje uzoraka kosti iz ovog pokusa radilo se na $18\mu\text{m}$ sa aluminijskim filtrom debljine 0,5mm te rotacijskim pomakom od $0,6^\circ$ u području od 190° . Utjecaj na kosti promatrana je na 2 mjesta, distalna bedrena kost i lumbalni dio kralježnice. Analizom dobivenih slika odredili smo vrijednosti za trabekularnu kost.



Slika 6. μ CT uređaj 1076 tvrtke SkyScan

6.4. DENZITOMETRIJA

Denzitometrija je napravljena pomoću Hologic QDR 4000 (Waltham, USA) uređaja koristeći metodu dvoenergetske apsorpcionometrije X zraka (DXA) na *ex vivo* štakorskim bedrenim kostima. Pripadajućim programom analizirali smo distalni dio bedrene kosti i lumbalni dio kralješnice te su dobivene vrijednosti za koštano područje (BV, bone volume), koštani mineralni sadržaj (BMC, bone mineral content) koji su korišteni za izračunavanje koštane mineralne gustoće (BMD, bone mineral density).

6.5 STATISTIKA

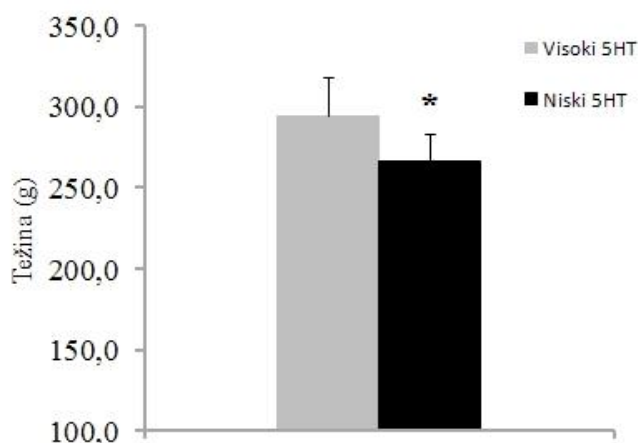
Dobiveni podaci za koštane parametre prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija za svaku promatranu grupu. Podaci su analizirani primjenom Student t-testa za usporedbu 2 promatrane grupe. Rezultati su smatrani statistički značajni ako je $p \leq 0,05$.

7. REZULTATI

7.1. RAZLIKE U MORFOMETRIJSKIM PARAMETRIMA ŽIVOTINJA SA PROMIJENJENOM RAZINOM SEROTONINA

7.1.1. Težina

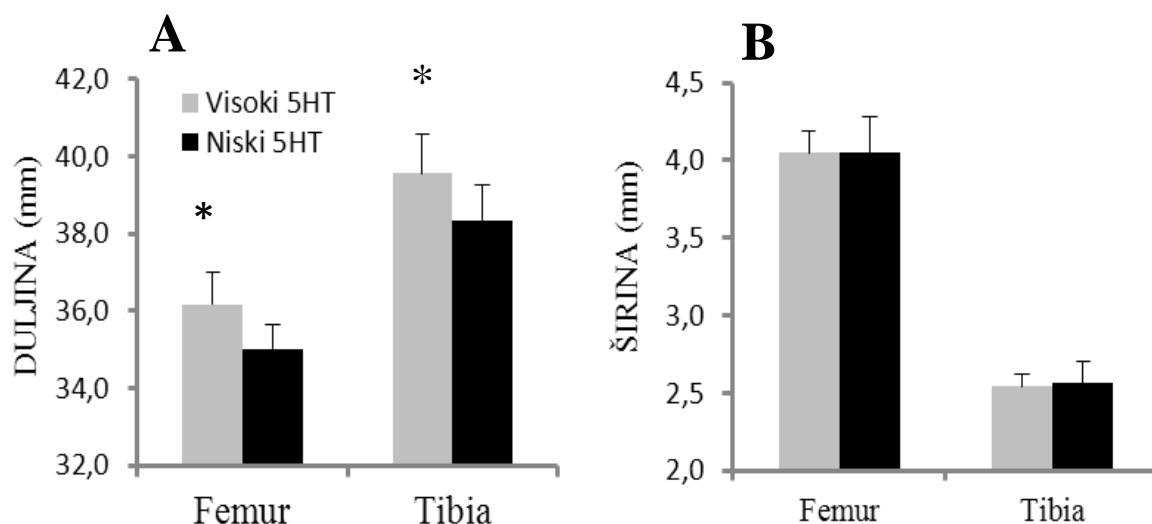
Mjerenjem težine životinja sa promijenjenom razinom serotonina u krvi pokazano je da životinje sa sniženom razinom serotonina imaju manju težinu u odnosu na životinje s povišenom razinom serotonina, što govori u prilog sistemskog učinka serotonina na cijeli organizam (Slika 7).



Slika 7. Težina (g) životinja sa sniženom i povišenom razinom serotonina; * statistički značajno različit rezultat u odnosu na grupu sa višim vrijednostima serotonina, $p < 0.05$.

7.1.2. Duljina i širina bedrene i goljenične kosti

Mjerenjem pomičnom mjerkom dobiveni su sljedeći podaci: životinje sa povišenom razinom serotonina imaju veću duljinu bedrene i goljenične kosti od životinja sa sniženom razinom serotonina (Slika 8.A). Razina serotonina u krvi ne utječe na širinu kosti (Slika 8.B).



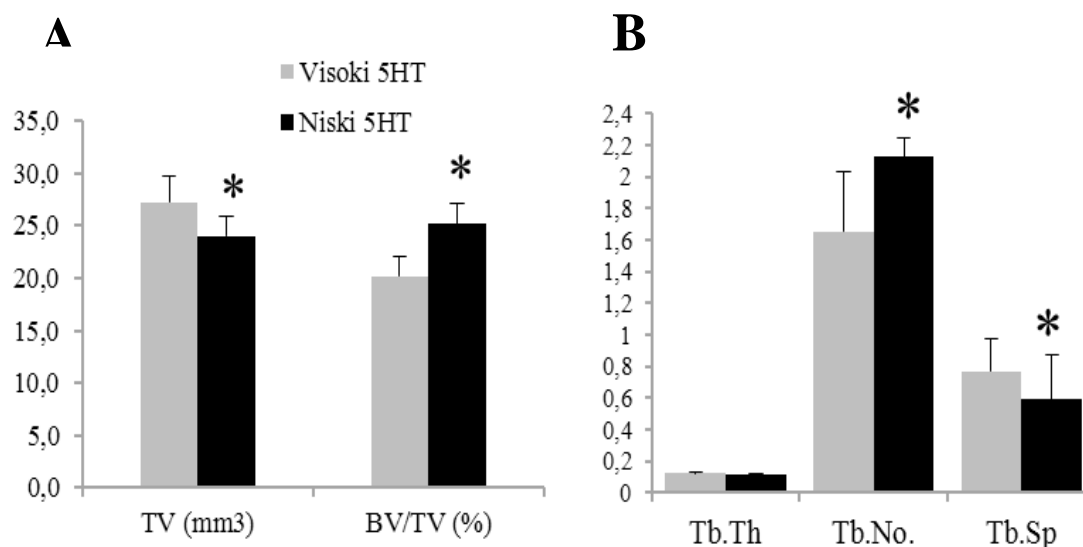
Slika 8. Duljina i širina bedrene i goljenične kosti. (A) duljina (mm) kod životinja sa povišenim i sniženim vrijednostima serotoninom. ; (B) širina (mm) kod životinja sa povišenim i sniženim vrijednostima serotoninom.; * značajno različito u odnosu na grupu sa višim vrijednostima serotonina, $p < 0.05$

7.2. MIKRO CT ANALIZA

7.2.1. Distalni dio bedrene kosti

Analizom podataka dobivenih mikroCT uređajem izmjereni su slijedeći koštani parametri: TV- tkivni volumen, BV/TV–odnos trabekularnog koštanog i tkivnog volumena i trabekularni parametri koji uključuju Tb.Th.-debljinu trabekula, Tb.Sp.-trabekularno razdvajanje i Tb.No.-broj trabekula. Pokazano je da životinje sa sniženom razinom serotonina imaju niže vrijednosti TV, ali više vrijednosti odnosa trabekularnog koštanog i tkivnog volumena (BV/TV) u odnosu na životinje sa povišenim vrijednostima serotonina (Slika 9.A).

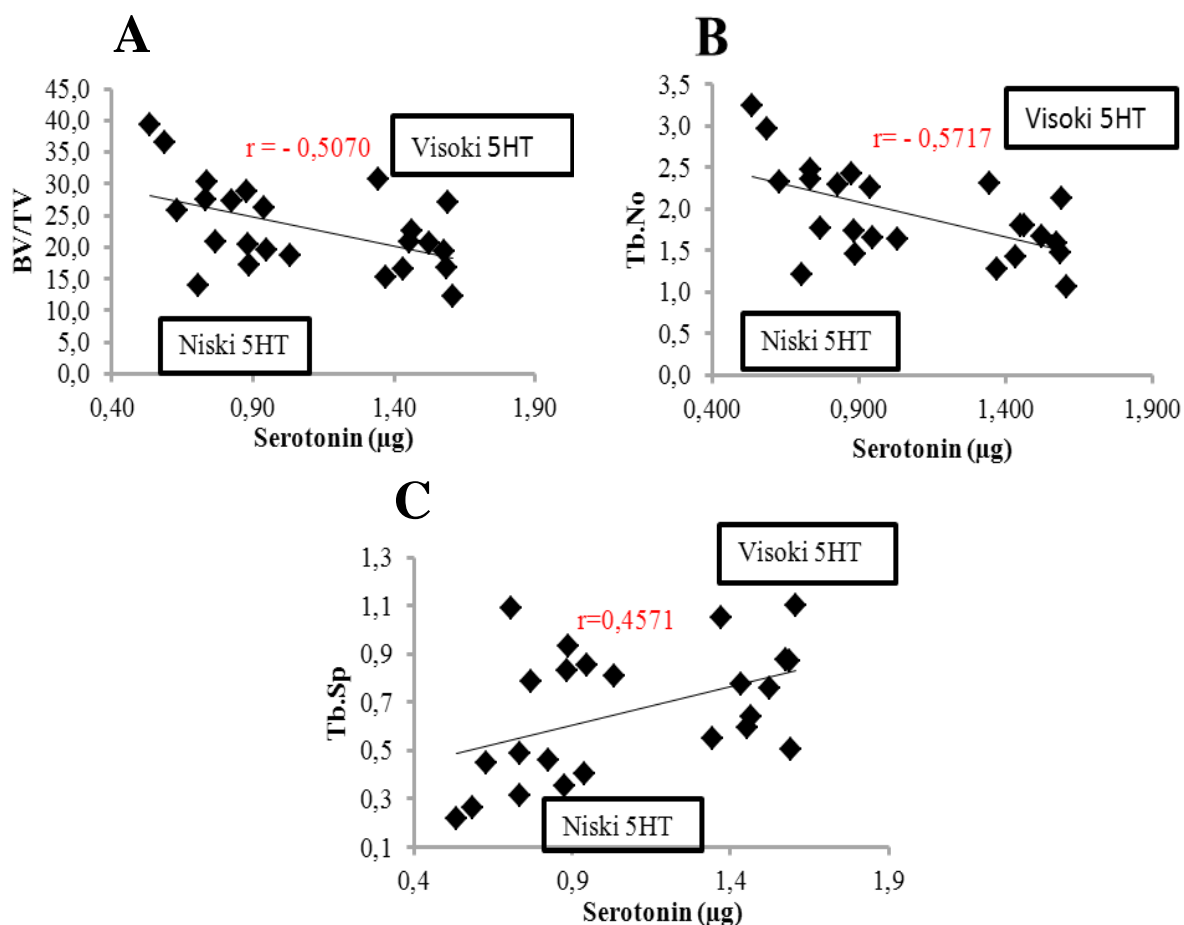
Životinje sa povišenom razinom serotonina imaju slabije trabekularne parametre od životinja sa nižom razinom serotonina, što se vidi iz većih vrijednosti debljine trabekula te smanjenja njihovog ukupnog broja (Slika 9.B).



Slika 9. MikroCT analiza distalnog dijela bedrene kosti; (A) TV-tkivni volumen; BV/TV-odnos trabekularnog koštanog i tkivnog volumena; (B) Tb.Th-debljina trabekula; Tb.No.-broj trabekula; Tb.Sp- trabekularno razdvajanje; * statistički značajno različit rezultat u odnosu na grupu sa višim vrijednostima serotonina, $p < 0.05$.

U promatranih životinja postoji dobra korelacija koštanih parametara na distalnom dijelu bedrene kosti sa izmjerenim vrijednostima serotonina. Promatrani koštani parametri su BV/TV (odnos trabekularnog koštanog i tkivnog volumena), Tb.No (trabekularni broj) i

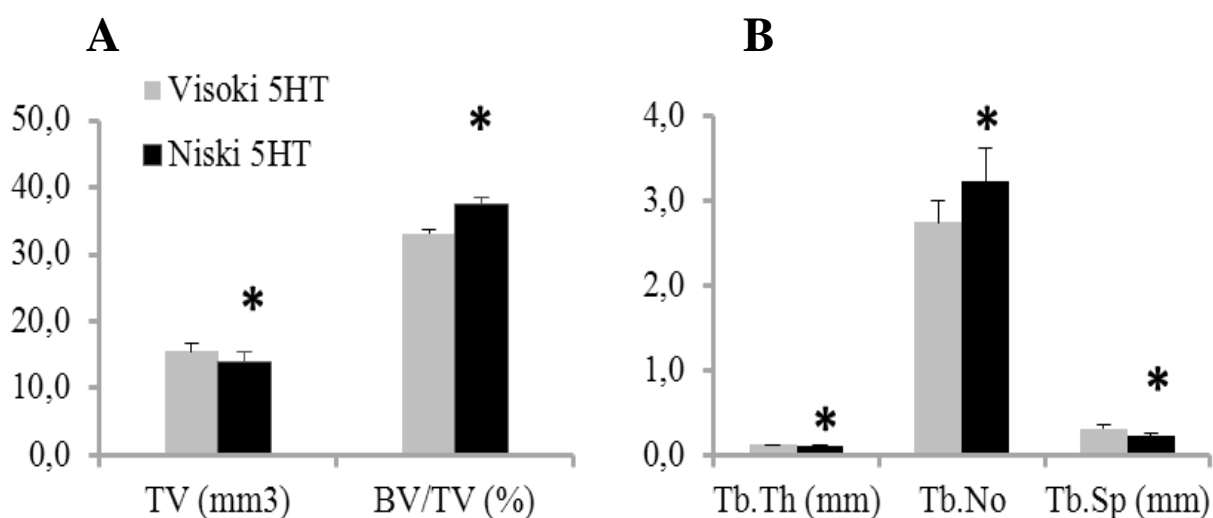
Tb.Sp (trabekularno razdvajanje). Porastom razine serotonina dolazi do pada odnosa trabekularnog koštanog i tkivnog volumena i broja trabekula te porasta trabekularnog razdvajanja. Vrijednosti korelacijskog koeficijenta upućuju na veliku korelaciju između vrijednosti serotonina i odnosa trabekularnog koštanog i tkivnog volumena (BV/TV) i broja trabekula (Tb.No) (Slika 10.A i 10.B). Mjerenjem promjena trabekularnog razdvajanja ovisno o promjenama serotonina dobivena je korelacija koja ukazuje na srednje jaku povezanost varijabli (Slika 10.C).



Slika 10. MikroCT analiza lumbalnog dijela kralješnice (L3); BV/TV (odnos trabekularnogkoštanog i tkivnog volumena) (A); Tb.No (broj trabekula) (B); Tb.Sp. (razdvojenost trabekula) (C).

7.2.2. Lumbalni dio kralješnice

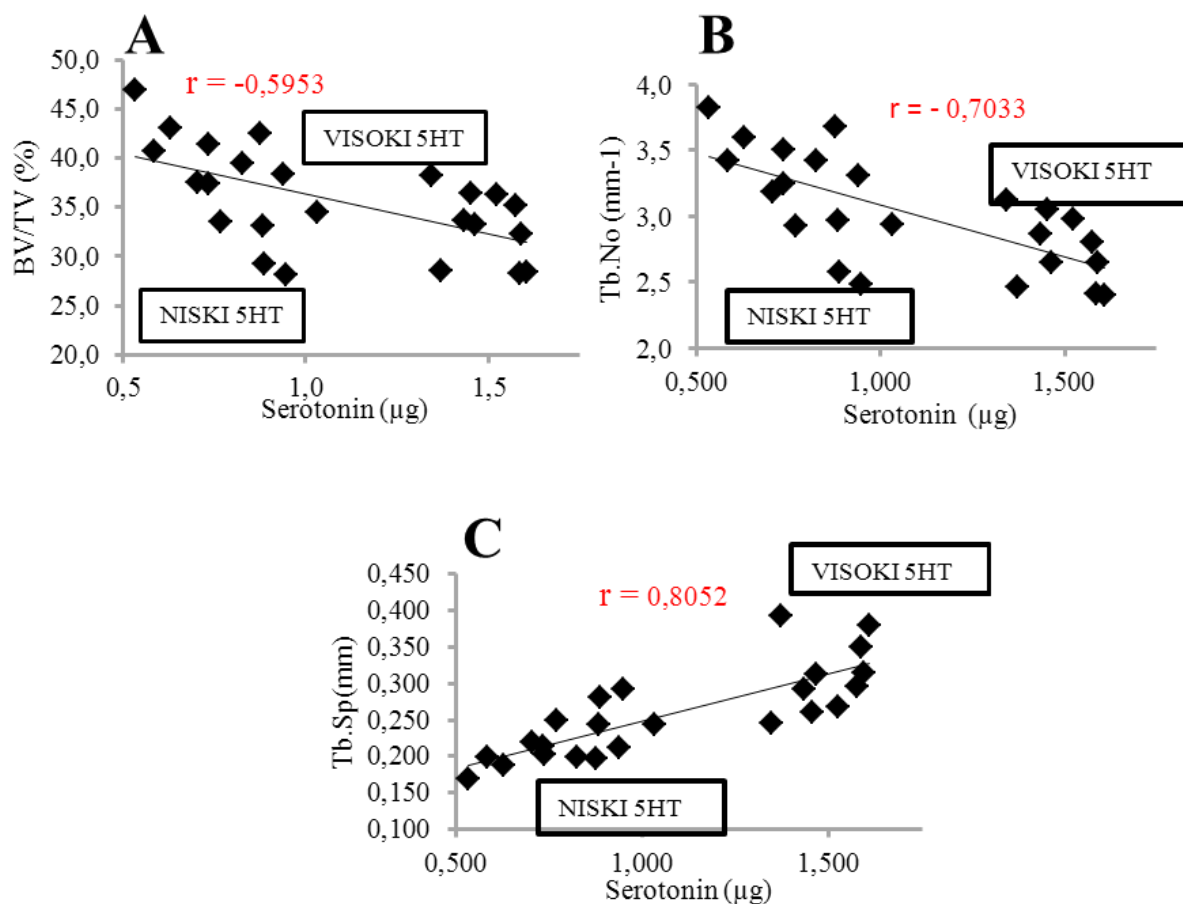
Životinje sa sniženom količinom serotonina imaju veći BV/TV (odnos trabekularnog koštanog i tkivnog volumena), veći Tb.No (trabekularni broj) dok su im TV (tkivni volumen), Tb.Th. (trabekularna debljina) i Tb.Sp. (trabekularna razdvojenost) manji od životinja sa povišenim serotoninom što ukazuje na bolju kvalitetu kosti na mjestu lumbalnog dijela kralješnice (Slika 11).



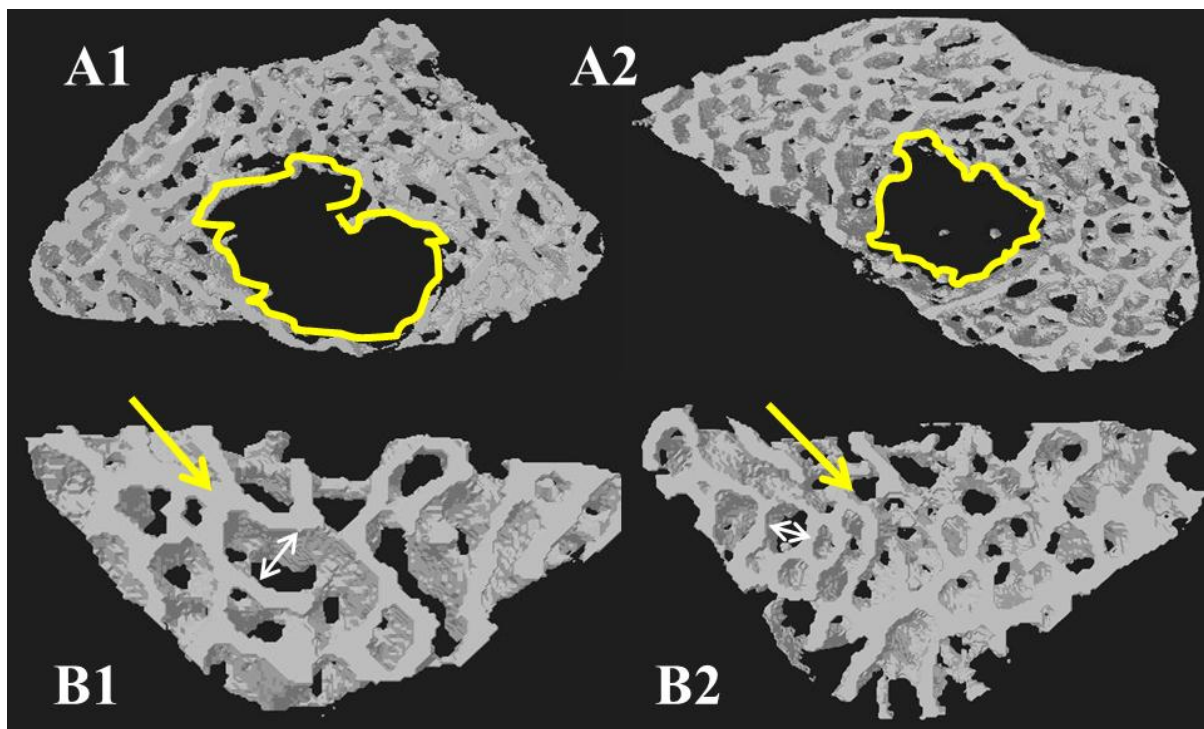
Slika 11. MikroCT analiza lumbalnog dijela kralješnice; (A) TV- tkivni volumen; BV/TV- odnos trabekularnog koštanog i tkivnog volumena; (B) Tb.Th- debljina trabekula; Tb.No- broj trabekula; Tb.Sp- trabekularno razdvajanje; * statistički značajno različit rezultat u odnosu na grupu sa višim vrijednostima serotonina, $p < 0.05$.

U promatranih životinja postoji dobra korelacija koštanih parametara na mjestu lumbalnog dijela kralješnice sa izmjerenim vrijednostima serotonina. Promatrani koštani parametri su BV/TV (odnos trabekularnog koštanog i tkivnog volumena), Tb.No (trabekularni broj) i Tb.Sp (trabekularno razdvajanje). Porastom razine serotonina dolazi do smanjenja odnosa trabekularnog koštanog i tkivnog volumena i broja trabekula te porasta trabekularnog razdvajanja. Vrijednosti korelacijskog koeficijenta upućuju na visoku negativnu korelaciju između vrijednosti serotonina i odnosa trabekularnog koštanog i tkivnog volumena (BV/TV) i broja trabekula (Tb.No). (Slika 12.A i 12.B). Mjerenjem promjena trabekularnog razdvajanja

ovisno o promjenama vrijednosti serotonina dobivena je visoka pozitivna korelacija koja ukazuje na veliku povezanost varijabli (Slika 12.C).



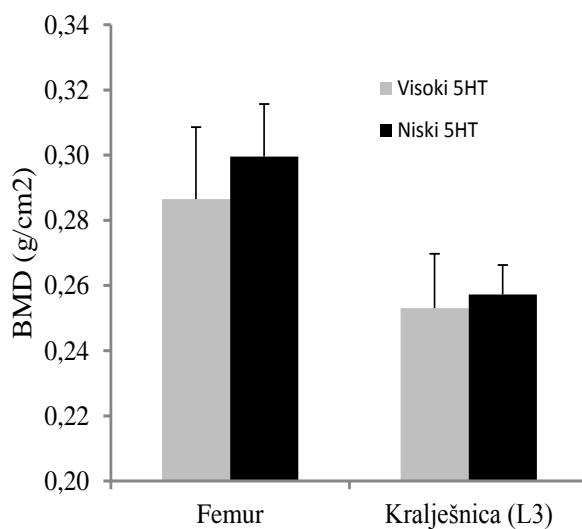
Slika 12. MikroCT analiza lumbalnog dijela kralješnice (L3); (A) BV/TV (odnos trabekularnog koštanog i tkivnog volumena); (B) Tb.No (broj trabekula); (C) Tb.Sp. (razdvojenost trabekula).



Slika 13. Mikro CT 3D prikaz modela (A) bedrene kosti i (B) kralježnice; (A1, B1) životinje sa povišenim serotoninom; (A2, B2) životinje sa sniženim serotoninom; žute strelice- debljina trabekula, bijele strelice- razdvojenost trabekula.

7.3. ANALIZA KOŠTANE MINERALNE GUSTOĆE DENZITOMETRIJOM

Nakon snimanja kostiju DXA Hologic QDR 4000 uređajem pripadajućim softver programom analizirane su bedrena kost te L3 kralježak lumbalnog dijela kralješnice. Životinje sa povišenom razinom serotonina pokazuju niže vrijednosti koštane mineralne gustoće (BMD) na distalnom djelu bedrene kosti i na lumbalnom dijelu kralješnice iako razlika nije statistička značajna (Slika 14).



Slika 14. Analiza koštane mineralne gustoće denzitometrijom kod životinja sa sniženim odnosno povišenim vrijednostima serotonina

8. RASPRAVA

Svaki organ, odnosno tkivo u ljudskom organizmu odlikuje se svojim specifičnim karakteristikama koji ga definiraju. Koštano tkivo predstavlja izrazito dinamičan organ koji se odlikuje jedinstvenom karakteristikom, a to je da se tijekom cijeloga života neprekidno razgrađuje odnosno izgrađuje u procesu koji se zove koštana pregradnja. Cijeli proces je izrazito dobro koordiniran usklađenom aktivnošću koštanih stanica osteoblasta i osteoklasta koji zahtijeva potpunu kontrolu i regulaciju aktivnosti putem mnogobrojnih faktora uključenih u koštani metabolizam. Među njima nalazimo veliki broj citokina i faktora rasta, hormona (PTH, estrogen, leptin), koštanih morfogogenetskih proteina (BMP 2-7, BMP 1) koji pospješuju izgradnju kosti i tako održavaju homeostazu unutar koštane pregradnje (Grgurević i suradnici, 2011).

Veliki je broj stanja kod kojih se razvija potreba za uporabom koštanih anaboličkih faktora. Jedno od zastupljenijih kroničnih degenerativnih bolesti koje nužno zahtijevaju potrebu za novim anabolicima je i osteoporoza. Ona je obilježena gubitkom koštane mase te poremećenom ravnotežom između procesa koštane razgradnje i izgradnje (Lix 2012). Terapija osteoporoze uključuje isključivo antiresorptivne lijekove, bisfosfonate, kalcitonin te estrogen te selektivne modulatore estrogenskih receptora kod žena. Navedeni lijekovi imaju mnogobrojna ograničenja. PTH predstavlja jedini anabolički lijek na tržištu. Pored njega imamo i aktivatore Wnt signalnoga puta koji djeluju preko inhibicije endogenih molekula sklerostina i dickkopfl. Svaki od navedenih lijekova djeluje preko različitih molekularnih mehanizama koji dovode do povećanja koštane mase, ali također imaju i svoje prednosti i ograničenja kao efektivnih anabolika u liječenju osteoporoze (Baron 2012).

Uloga serotonina u regulaciji koštanoga metabolizma nije do kraja razjašnjena te se pokušava istražiti njegova točna uloga odnosno mehanizam djelovanja. Ono što je poznato je da se serotonin nalazi i u centralnom živčanom sustavu i na periferiji, te ne prolazi krvno-moždanu barijeru. Nedostatak serotonina u mozgu ne utječe na serotonin na periferiji i obrnuto. U nedavnim istraživanjima pokazali su kako periferni serotonin djeluje inhibitorno na proces koštane formacije (Teitelbaum and Ross 2003; Yadav i sur., 2008). Prilikom istraživanja uloge serotonina u koštanom metabolizmu potrebno je razviti adekvatne modele koji će jasno pokazati kako nedostatak određenog enzima ili faktora povezanih uz metabolizam serotonina pravilno koreliraju i sa njegovom funkcijom na periferiji. Upravo zbog toga razvijen je veliki

broj animalnih modela povezanih uz metabolizam i funkciju serotonina kao što su miševi sa izbačenim genom za Tph1, Tph2, Lrp5 te miševa sa izbačenim genom za leptin (ob/ob) ili za njegov receptor (db/db) (Inose i sur., 2011).

Posebnost našeg istraživanja je u tome što smo koristili jedinstveni životinjski serotoninski model gdje su selektivnim križanjem dobivene sublinije životinja sa višom odnosno nižom razinom perifernog serotonina (Cicin-Sain i sur., 2005). Kako bi pokazali razlike u djelovanju serotonina na aksijalni i periferni skelet učinak je analiziran na bedrenoj kosti i na kralježnici. Nakon analize mikroCT-om potvrđene su statistički značajne razlike odnosa trabekularnog koštanog i tkivnog volumena (BV/TV) kao i tkivnog volumena (TV) životinja sa niskom količinom serotonina u krvi u odnosu na životinje sa povišenom količinom. Iz vrijednosti tkivnog volumena (TV) bi mogli zaključiti da serotonin ima sistemski učinak na rast i razvoj cjelokupnog organizma jer su životinje s nižim vrijednostima serotonina bile manje i lakše sa kraćim kostima. Promjene u vrijednostima trabekularnih parametara bile su potvrda polazne hipoteze. Životinje sa sniženom razinom serotonina imale su povećan broj koštanih trabekula te snižene vrijednosti parametara koje određuju debljinu i razdvojenost trabekula. Analizom utjecaja serotonina na duljinu i širinu kosti, pokazane su razlike između životinja sa niskim serotoninom u odnosu na životinje sa visokim serotoninom što nije potvrđeno u studijama vezanih uz LRP5 funkciju i koštani metabolizam (Yadav i sur.,2010). Densitometrijska analiza samo je dala potvrdu rezultata dobivenih mikroCT-om, a to je da životinje sa povišenom razinom serotonina imaju manju koštanu mineralnu gustoću u odnosu na životinje sa povišenom razinom serotonina.

Navedenim istraživanjem je uspostavljen siguran i reproducibilan životinjski serotoninski model koji je jasno potvrdio veliku ulogu serotonina u koštanom metabolizmu analizom relevantnih koštanih parametara. Njegova primjena može poslužiti u daljnjim istraživanjima mnogobrojnih potencijalno novih lijekova- anabolika na koštanu formaciju djelujući na ključne dijelove serotoninskoga puta.

9. ZAKLJUČAK

Navedeno istraživanje potvrdilo je izraziti utjecaj serotonin na koštani metabolizam u dobro uspostavljenom životinjskom serotoninском modelu. Porastom vrijednosti serotoninа dolazi do snižavanja trabekularnog koštanog volumena. Time nam se otvaraju nove ideje za daljnja testiranja supstanci koje djeluju na sniženje vrijednosti serotoninа u krvi te prevenciju razvoja osteoporoze.

10. ZAHVALE

Posebnu zahvalnost dugujem prof.dr.sc. Lovorki Grgurević i dipl.ing. Igoru Erjavecu, jer bez njihove potpore i podrške ne bi bilo ovog mogа rada.

Zahvaljujem i Đurđici Car koja je pomagala pri izvođenju pokusa na životinjama .

Posebno zahvaljujem akademiku Slobodanu Vukičeviću što mi omogućio izradu navedenog rada mojim sudjelovanjem u istraživačkom radu Laboratorija za mineralizirana tkiva.

11. LITERATURA

- Ambrose J and Hounsfield G (1973) Computerized transverse axial tomography. *Br J Radiol*: 46(542):148-9.
- Ashcroft GW, Crawford TB, Eccleston D, Sharman DF, MacDougall EJ, Stanton JB, Binns JK (1966) 5-hydroxyindole compounds in the cerebrospinal fluid of patients with psychiatric or neurological diseases. *Lancet*: 2(7472):1049-52.
- Baron C (2012) Using the Gradient of Human Cortical Bone Properties to Determine Age-Related Bone Changes Via Ultrasonic Guided Waves. *Ultrasound Med. Biol*; u tisku.
- Berger M, Gray AJ, Roth LB (2009) The Expanded Biology of Serotonin. *Annu. Rev. Med*: 60:355-366.
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 16: 346(20):1513-21
- Chabbi-Achengli Y et al. (2012) Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 109(7):2567-72
- Cicin-Sain L, Froebe A, Bordukalo-Niksic T, Jernej B (2005) Serotonin transporter kinetics in rats selected for extreme values of platelet serotonin level. *Life Sci*: 77:452–61
- Cui et al (2011) Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nature Medicine*: 17(6):684-91
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML (2001) Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-

- related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*: 107(4):513-23.
- Grgurevic L, Macek B, Mercep M, Jelic M, Smoljanovic T, Erjavec I, Dumic-Cule I, Prgomet S, Durdevic D, Vnuk D, Lipar M, Stejskal M, Kufner V, Brkljacic J, Maticic D, Vukicevic S. (2011) Bone morphogenetic protein (BMP)1-3 enhances bone repair. *Biochem Biophys Res Commun*; 408(1):25-31
- Guldberg RE, Lin AS, Coleman R, Robertson G, Duvall C (2004) Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. *Birth Defects Res C Embryo Today*: 72(3):250-9
- Inose H, Zhou B, Yadav VK, Guo E, Karsenty G, Ducy P (2011) Efficacy of serotonin inhibition in mouse models of bone loss. *JBMR*; 26(9):1997-2001.
- Jernej B, Banović M, Cicin-Sain L, Hranilović D, Balića M, Oresković D, Folnegović-Smalc V (2000) Physiological characteristics of platelet/circulatory serotonin: study on a large human population. *Psychiatry Res* 2000;94:153–62.
- Karsenty G, Lee NK (2008) Reciprocal Regulation of bone and energy metabolism. *Epub*: 19(5):161-6.
- Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L (2002) Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Bio* 115: 157(2):303-14.
- Katzung GB, Masters BS, Trevor AJ, *Temeljna i klinička farmakologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2011.
- Kovac Z i suradnici, *Patofiziologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2011.
- Lix LM, Azimae M, Acan Osman B (2012) Osteoporosis-related fracture case definitions for population-based administrative data. *BMC Public Health*; 12(1):301.
- Mann JJ, McBride PA, Brown RP, Linnoila M, Leon AC, DeMeo M, Mieczkowski T, Myers JE, Stanley M (1992) Relationship between central and peripheral serotonin indexes in depressed and suicidal psychiatric inpatients *Arch Gen Psychiatry*: 49(6):442-6.

- Martinovic S, Simic P, Borovecki F, Vukicevic S : Biology of bone morphogenetic proteins. In :Bone morphogenetic proteins: From laboratory to clinical practice, edited by Vukicevic S, Sampath K (eds) pp 45-72. Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, 2004.
- Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM (2008) Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther*: 31:187–99.
- Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*; 4(8):638-49.
- Urist MR, *Fundamental and clinical bone physiology*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1980.
- Walther DJ, Bader M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 1: 66(9):1673-80.
- Warden SJ, Bliziotis MM, Wrenn KM, Eshleman AJ, Turner CH (2005) Neural regulation of bone and the skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine). *Mol Cell Endocrinol*: 242:1–9.
- Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G (2008) Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*: 135(5):825-37.
- Yadav VK, Balaji S, Suresh PS, Liu XS, Lu X, Li Z, Guo XE, Mann JJ, Balapur AK, Gershon MD, Medhamurthy R, Vidal M, Karsenty G, Ducy P (2010) Inhibition of gut-derived serotonin synthesis: a potential bone anabolic treatment. *Nat Med*; 16(3):308-312.

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Šibeniku 17. listopada 1990. Pohađala sam Gimnaziju Antuna Vrančića u Šibeniku koju sam završila 2009. Godine 2009. upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno sam studentica 6. godine Medicinskog fakulteta i prosjek ocjena mi je 4,57. U projektu "Uloga TSH u modelu osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom koštanom masom" sudjelujem od kraja akademske godine 2009/2010. Nagrađena sam Rektorovom nagradom za najbolji rad pod naslovom "Utjecaj snižene i povišene vrijednosti serotonina na trabekularnu koštanu masu", 2012. godine. Od 2012. godine sudjelujem i u znanstvenom projektu "Dinamika optičkog kanala i orbitalne šupljine otkrivena microCT", iz kojeg je proizašla publikacija 2014. godine. Godine 2012. završila sam tečaj "Kardiopulmonalna reanimacija uz korištenje automatskog vanjskog defibrilatora - KPR/AVD" te 2015. godine tečaj "UZV radionica" . Demonstrator sam za predmet Anatomija, te sudjelujem u radu Laboratorija za mineralizirana tkiva, Medicinskog fakulteta u Zagrebu.