

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA ZAZIJAL

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA ZAZIJAL

**IZRAŽANJE SEROTONINSKIH RECEPTORJEV V
MOŽGANSKI SKORJI TER V PRIMARNIH KULTURAH
ASTROCITOV MOŽGANSKE SKORJE PODGAN**

**THE EXPRESSION OF SEROTONIN RECEPTOR
SUBTYPES IN RAT CEREBRAL CORTEX AND CORTICAL
ASTROCYTES IN PRIMARY CULTURES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Kržan, dr. med., in somentorstvom asist. Davida Osredkarja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Kržan in somentorju asist. Davidu Osredkarju za strokovno vodstvo, pomoč in nasvete pri delu ter temeljit pregled diplomske naloge.

Največja zahvala velja mojima staršema Mariji in Bernardu, ki sta me od malih nog vzpodbujala in mi omogočala, da sem dosegla enega večjih zelenih ciljev v mojem življenju.

Iskrena hvala tudi moji ljubezni Gregorju za vzpodbudo in podporo v času študija ter pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Mojce Kržan, dr. med., in somentorja asist. Davida Osredkarja, mag. farm.

Lidija Zazijal

Ljubljana, 2008

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Irena Mlinarič Raščan, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|--------|
| KAZALO VSEBINE | - 4 - |
| KAZALO SLIK | - 6 - |
| KAZALO PREGLEDNIC | - 7 - |
| POVZETEK | - 8 - |
| ABSTRACT | - 9 - |
| SEZNAM OKRAJŠAV | - 10 - |
| 1 UVOD..... | - 12 - |
| 1.1 ODKRITJE SEROTONINA..... | - 12 - |
| 1.2 VLOGA SEROTONINA V ORGANIZMU | - 12 - |
| 1.3 BIOSINTEZA, METABOLIZEM IN SINAPTIČNI PRENOS SEROTONINA..... | - 13 - |
| 1.4 SEROTONINSKI RECEPTORJI..... | - 17 - |
| 1.4.1 Družina receptorjev 5-HT ₁ | - 20 - |
| 1.4.2 Družina receptorjev 5-HT ₂ | - 22 - |
| 1.4.3 Receptorji 5-HT ₃ | - 24 - |
| 1.4.4 Receptorji 5-HT ₄ | - 26 - |
| 1.4.5 Receptorji 5-HT ₅ | - 26 - |
| 1.4.6 Receptorji 5-HT ₆ | - 27 - |
| 1.4.7 Receptorji 5-HT ₇ | - 27 - |
| 1.5 ASTROCITI | - 28 - |
| 2 NAMEN DELA..... | - 30 - |
| 3 MATERIALI IN METODEDE | - 31 - |
| 3.1 POSKUSNE ŽIVALI | - 31 - |
| 3.2 PRIMARNE KULTURE ASTROCITOV | - 31 - |
| 3.2.1 Gojenje astrocitov v prisotnosti serotonina | - 32 - |
| 3.4 IZOLACIJA RNA..... | - 32 - |
| 3.4 UV SPEKTROSKOPIJA | - 34 - |
| 3.4.1 Določanje koncentracije celokupne RNA in njene čistosti..... | - 34 - |
| 3.5 AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA (AGE)..... | - 35 - |
| 3.5.1 Priprava gela..... | - 36 - |

| | |
|--|--------|
| 3.5.2 Izvedba elektroforeze..... | - 37 - |
| 3.5.3 Detekcija RNA | - 37 - |
| 3.6 REVERZNA TRANSKRIPCija S POLIMERAZNO VERIŽNO REAKCIJO (RT-PCR)..... | - 38 - |
| 3.7 DETEKCIJA PRODUKTOV RT-PCR..... | - 44 - |
| 3.7.1 Priprava gela..... | - 44 - |
| 3.7.2 Izvedba elektroforeze..... | - 44 - |
| 3.7.3 Detekcija DNA..... | - 44 - |
| 4 REZULTATI | - 45 - |
| 4.1 KONTROLA PRODUKTOV RT-PCR Z AGE..... | - 45 - |
| 4.1.1 Izražanje 5-HT receptorjev v možganski skorji novorojene podgane | - 45 - |
| 4.1.2 Izražanje 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov druge pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane v odsotnosti 5-HT..... | - 46 - |
| 4.1.3 Izražanje 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov druge pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane v prisotnosti 5-HT..... | - 47 - |
| 5 RAZPRAVA | - 50 - |
| 5.1 PRIMERJAVA IZRAŽANJA 5-HT RECEPTORJEV V TKIVU IN KULTURI | - 51 - |
| 5.2 VPLIV ČASA NA IZRAŽANJE 5-HT RECEPTORJEV V KULTURI | - 52 - |
| 5.3 VPLIV SEROTONINA NA IZRAŽANJE 5-HT RECEPTORJEV V KULTURI..... | - 52 - |
| 5.4 KRITIČNA ANALIZA POSKUSOV | - 54 - |
| 6 SKLEP | - 56 - |
| 7 LITERATURA | - 57 - |

KAZALO SLIK

| | |
|---|--------|
| Slika 1: Serotonergične poti v možganih podgane. | - 13 - |
| Slika 2: Sinteza in metabolizem serotonina (3). | - 14 - |
| Slika 3: Sinaptični prenos serotonina (9). | - 16 - |
| Slika 4: Zgradba receptorja, ki je sklopljen z G proteinom (2). | - 18 - |
| Slika 5: Transdukcijske značilnosti 5-HT receptorjev sklopljenih z G proteinom (10). | - 19 - |
| Slika 6: Zgradba ionskega kanala (2). | - 19 - |
| Slika 7: Astrocit v kulturi barvan z GFAP (31). | - 29 - |
| Slika 8: Celokupna RNA izolirana iz možganske skorje (a) in primarnih kultur astrocitov druge (b) in prve pasaže (c) na agaroznem gelu barvanem z etidijevim bromidom. | - 38 - |
| Slika 9: Reverzna transkripcija (34). | - 39 - |
| Slika 10: Princip verižne reakcije s polimerazo (PCR). | - 39 - |
| Slika 12: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev (a) in negativne kontrole (b) v primarni kulturi astrocitov druge pasaže v odsotnosti 5-HT. | - 46 - |
| Slika 13: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev (a) in negativne kontrole (b) v primarni kulturi astrocitov druge pasaže v prisotnosti 5-HT. | - 47 - |
| Slika 14: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov prve pasaže v odsotnosti 5-HT. | - 48 - |
| Slika 15: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov prve pasaže v prisotnosti 5-HT. | - 49 - |
| Slika 16: Shematski prikaz procesov v celici, ki lahko vodijo do regulatornega zmanjšanja števila 5-HT receptorjev (39). | - 53 - |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|--------|
| PREGLEDNICA I: REAGENTI ZA IZOLACIJO CELOKUPNE RNA IN NJIHOVA SESTAVA | - 32 - |
| PREGLEDNICA II: REZULTATI MERJENJA ABSORBANCE IZOLIRANE CELOKUPNE RNA | - 35 - |
| PREGLEDNICA III: SESTAVINE ZA PRIPRAVO 1 % AGARozNEGA GELA IN NJIHOVA KOLIČINA | - 36 - |
| PREGLEDNICA IV: ZNAČILNOSTI ISTOSMERNIH (R) IN OBRATNOSMERNIH (F) OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV | - 40 - |
| PREGLEDNICA V: REAGENTI ZA PRIPRAVO REAKCIJSKE ZMESI 1 IN NJIHOVA SESTAVA | - 41 - |
| PREGLEDNICA VI: REAGENTI ZA PRIPRAVO REAKCIJSKE ZMESI 2 IN NJIHOVA SESTAVA | - 42 - |
| PREGLEDNICA VII: POGOJI PRI VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO | - 43 - |

POVZETEK

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je pomemben neurotransmitter in nevromodulator v osrednjem živčnem sistemu, deluje pa tudi na druga tkiva. Vpleten je v številne fiziološke in patofiziološke procese. Pri podgani posreduje svoje učinke prek stimulacije trinajstih podtipov serotoninskih receptorjev. Izražanje posameznih podtipov serotoninskih receptorjev v osrednjem živčevju je odvisno od možganske regije in starosti poskusne živali.

V raziskavi smo ugotavljali, kako se izraža informacijska RNA (mRNA) za serotoninske receptorje v možganski skorji novorojenih (tri dni starih) podgan obeh spolov seva Wistar in v primarnih kulturah astrocitov, vzgojenih iz možganske skorje novorojenih podgan. Izražanje serotoninskih receptorjev smo preverjali v primarnih kulturah astrocitov prve in druge pasaže, gojenih v običajnem mediju in v kulturi astrocitov, gojenih v mediju, ki je vseboval 500 nM serotonina. Z reverzno transkripcijo s polimerazno verižno reakcijo (RT-PCR) smo v možganski skorji dokazali mRNA za 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B} in 5-HT₇ receptorje. Ugotovili smo, da možganska skorja izraža več podtipov serotoninskih receptorjev kot primarna kultura astrocitov vzgojena iz iste regije možganov. Kultura astrocitov prve pasaže izraža mRNA za receptorje 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ in 5-HT₇, medtem ko kulture astrocitov druge pasaže izražajo mRNA le za 5-HT_{2B} in 5-HT₇ receptor. V kulturi, ki smo jo gojili v prisotnosti serotonina, pa smo odkrili mRNA za 5-HT_{2B}, 5-HT_{5B} in 5-HT₇ receptorje, ne glede na to ali smo uporabili astrocite prve ali druge pasaže. Ugotovili smo, da prisotnost serotonina vpliva na izražanje posameznih podtipov serotoninskih receptorjev v primarni kulturi astrocitov, saj zavre izražanje mRNA za 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A}, in 5-HT₆ receptorje ter ohranja izražanje 5-HT_{5B} receptorjev.

Ključne besede: serotonin, serotoninski receptorji; astrociti, mRNA, RT-PCR

ABSTRACT

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is an important neurotransmitter and neuromodulator in the central nervous system, but it also affects several peripheral tissues. It is involved in many physiological and pathophysiological processes. Many different effects of serotonin are the result of its activation of at least 13 different serotonin receptor subtypes, found so far in rat. The expression of serotonin receptors is an age- and brain region dependent process.

In the present research we investigated the expression of all known rat receptors in neonatal rat brain cortical tissue and in astrocytes cultures raised from rat brain cortex and cultured in the presence or absence of 500 nM serotonin from 3-days old Wistar rats of both sexes. Using reverse transcriptase polymerase chain reaction we found out that neonatal brain tissue expresses mRNA for more serotonin receptor subtypes than the astrocyte cultures grown from rat brain cortex for 14 days. In neonatal rat cortex we found a message for 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B} and 5-HT₇ receptor subtype, whereas in the first passage of astrocyte cultures mRNA for 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors were found. In astrocytes cultured for 21 days the mRNA for 2 out of 13 known serotonin receptor subtypes were found: 5-HT_{2B} and 5-HT₇. If cortical astrocytes were grown in the medium containing 500 nM serotonin they expressed mRNA for 5-HT_{2B}, 5-HT_{5B} and 5-HT₇ receptor, regardless the duration of culturing. We found out that serotonin is involved in expression of receptor subtypes, because it prevented the expression of mRNA for 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A}, and 5-HT₆ receptors and preserved the expression of 5-HT_{5B} receptor.

Keywords: serotonin, serotonin receptors, astrocytes, mRNA, RT-PCR

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|-------------------|---|
| AC | adenilat-ciklaza |
| ACTH | adenokortikotropni hormon |
| AGE | agarozna gelska elektroforeza |
| ATP | adenozin-5'-trifosfat |
| cAMP | ciklični adenozin-3',5'-monofosfat |
| cDNA | komplementarna DNA |
| CŽS | centralni živčni sistem |
| DEPC | dietilpirokarbonat |
| DOPA | dihidroksifenilalanin |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| dNTP | deoksinukleozid-5'-trifosfat |
| EDTA | etilendiaminotetraocetna kislina |
| EGTA | etilen glikol-bis (β -aminoetil eter) N, N, N', N'-tetraocetna kislina |
| GABA | γ -aminomaslena kislina |
| GDP | gvanozin-5'-difosfat |
| GFAP | glijalna fibrilarna kislina beljakovina |
| GTC | gvandintiocianat |
| GTP | gvanozin-5'-trifosfat |
| LSD | dietilamid lizergične kisline |
| MgCl ₂ | magnezijev klorid |
| MnCl ₂ | manganov klorid |
| mRNA | informacijska RNA |
| NAD | nikotinamidadenindinukleotid |
| NADH | reducirana oblika nikotinamidadenindinukleotida |
| PBS | fosfatni pufer s soljo |
| 5-HT | 5-hidroksitriptamin ali serotonin |
| 5-HTP | 5-hidroksitriptofan |
| 5-HIAA | 5-hidroksiindol očetna kislina |
| PLC | fosfolipaza C |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| RT-PCR | reverzna transkripcija s polimerazno verižno reakcijo |
| TBE | Tris-boratni pufer z EDTA |

| | |
|------|---|
| Tm | temperatura tališča |
| TPH | triptofan-hidroksilaza |
| Tris | 2-amino-2(hidroksimetil)-1,3-propandiol |

1 UVOD

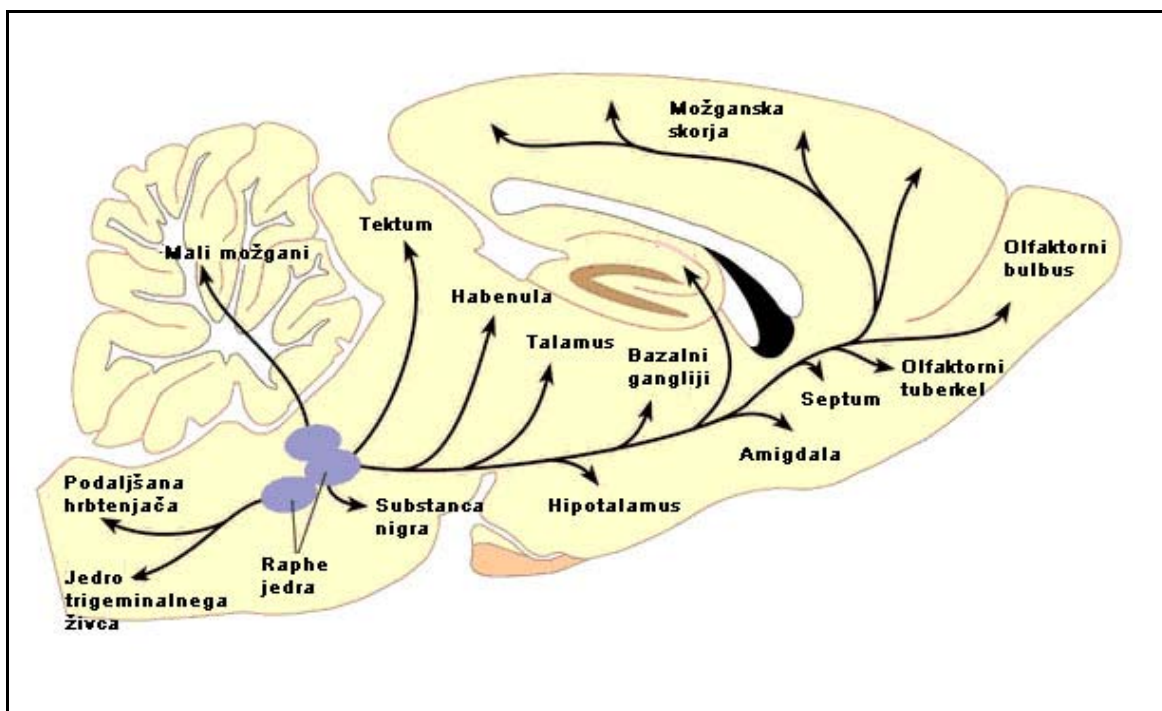
1.1 Odkritje serotonina

V zgodnjih 30-ih letih 20. stoletja je Vittorio Erspamer v enterokromafinih celicah gastrointestinalnega trakta odkril spojino, ki povzroča kontrakcijo gladkih mišic prebavil. Poimenoval jo je enteramin. Leta 1948 pa so Rapport, Green in Page iz seruma strjene krvi izolirali ter pravilno identificirali spojino, ki povzroča močno kontrakcijo gladkih mišic v steni žil in zvišuje krvni tlak. Substituirani indol so poimenovali 5-hidroksitriptamin (5-HT) oz. serotonin. Beseda serotonin pomeni snov, ki se nahaja v **serumu** in uravnava **tonus** žil. Leta 1952 sta Erspamer in Areso ugotovila, da sta 5-HT in enteramin ista spojina. Twarog in Page pa sta leta 1953 dokazala prisotnost 5-HT tudi v možganih (1).

1.2 Vloga serotonina v organizmu

5-HT je zelo pogosta signalna molekula v človeškem telesu, ki vpliva na vrsto fizioloških in patofizioloških procesov. Približno 90 % 5-HT v telesu se nahaja v enterokromafinih celicah črevesne stene, kjer ima pomembno vlogo v delovanju prebavnega sistema. Povzroča kontrakcije gladkih mišičnih celic v steni prebavnega trakta in tako uravnava motiliteto, pospešuje izločanje želodčnih sokov ter sodeluje pri odzivih, kot sta slabost in bruhanje. 5-HT je prisoten tudi v krvnem obtoku v trombocitih, ki ga ne sintetizirajo sami, temveč ga privzamejo iz plazme. Sproščanje 5-HT iz trombocitov povzroča njihovo agregacijo ter lokalno vazokonstrikcijo ali vazodilatacijo, odvisno od lokalnega fiziološkega stanja ožilja. 5-HT vpliva tudi na krčenje gladkih mišic bronhijev in maternice, deluje kot vnetni mediator in povečuje občutljivost nociceptorjev (2).

Le 1-2 % 5-HT je prisotnega v možganih. Ker kot hidrofilna molekula ne prehaja krvno-možganske pregrade, se sintetizira v možganih v serotoninških nevronih. Telesa teh nevronov se večinoma nahajajo v raphe jedrih, ki so skupki teles živčnih celic v možganskem deblu, njihovi aksoni pa se razpredajo po večini predelov možganov (slika 1). Zato 5-HT vpliva na številne možganske funkcije in tako sodeluje pri uravnavanju apetita, motorične aktivnosti, razpoloženja, spolnosti, senzorične zaznave, kognicije, izločanja hormonov, telesne temperature, nocicepcije in spanja (3).



Slika 1: Serotonergične poti v možganih podgane. Telesa serotonergičnih živčnih celic se nahajajo v raphe jedrih, dendriti pa segajo v različne dele osrednjega živčevja (1).

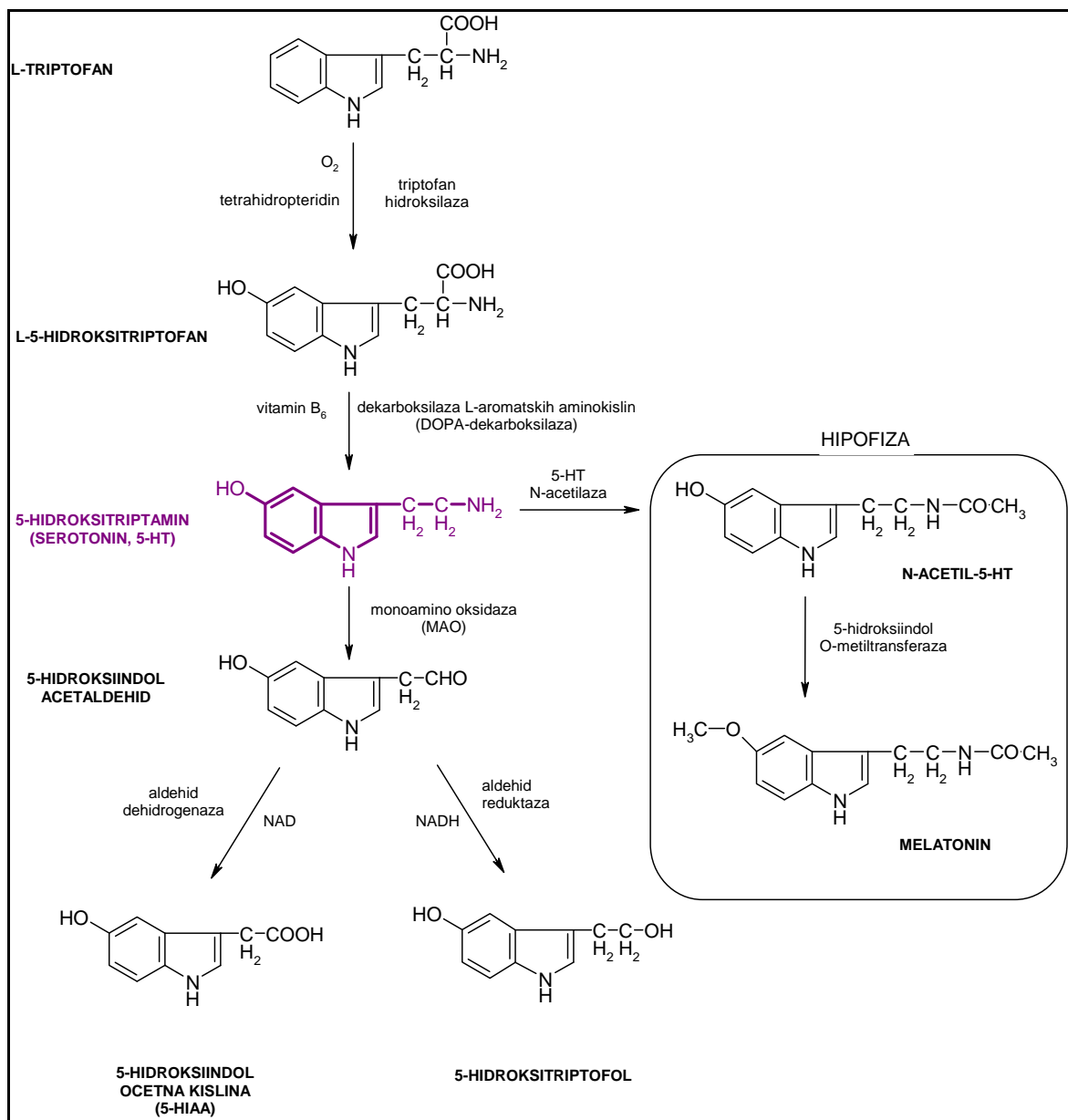
5-HT je tudi prekursor hormona melatonina, ki deluje antioksidativno, antikancerogeno, sodeluje v imunskem sistemu, vzdržuje cirkadiani ritem, vpliva na sezonski reprodukcijski cikel pri živalih in je povezan s spanjem (4, 5).

Motnje v delovanju serotoninskega sistema naj bi bile poglaviten razlog za migreno, karcinoidni sindrom ter najrazličnejše težave razpoloženja, kot so depresija, manija, shizofrenija, avtizem, agresija, obsesivno-kompulzivne motnje in anksioznost (2).

1.3 Biosinteza, metabolizem in sinaptični prenos serotonina

Biosinteza endogenega 5-HT poteka v enterokromafinih in živčnih celicah iz aminokislina L-triptofana. Njena količina v osrednjem živčevju je odvisna od vnosa s hrano in od prehoda skozi krvno-možgansko pregrado. Za prenos triptofana skozi to pregrado je potreben aktivni transport. Raven triptofana v možganih ni odvisna le od njegove koncentracije v plazmi, temveč tudi od koncentracije nevtralnih aminokislin v plazmi, s katerimi triptofan kompetitivno tekmuje za vezavo na prenašalnik (6).

Sinteza in metabolizem 5-HT prikazuje slika 2.



Slika 2: Sinteza in metabolizem serotonina (3).

Sinteza 5-HT poteka v dveh stopnjah. Prva je hidroksilacija triptofana do 5-hidroksitriptofana (5-HTP), ki jo katalizira triptofan-hidroksilaza (TPH). Encim za svojo aktivnost potrebuje kofaktorja tetrahydropteridin in molekularni kisik. TPH določa hitrost biosinteze 5-HT in pomembno vpliva na njegovo količino v sinaptični špranji (6, 7). Pred kratkim so odkrili, da encim TPH obstaja v dveh izooblikah, TPH1 in TPH2, ki imata skupnih 71 % aminokislin, gena pa sta locirana na dveh različnih kromosomih.

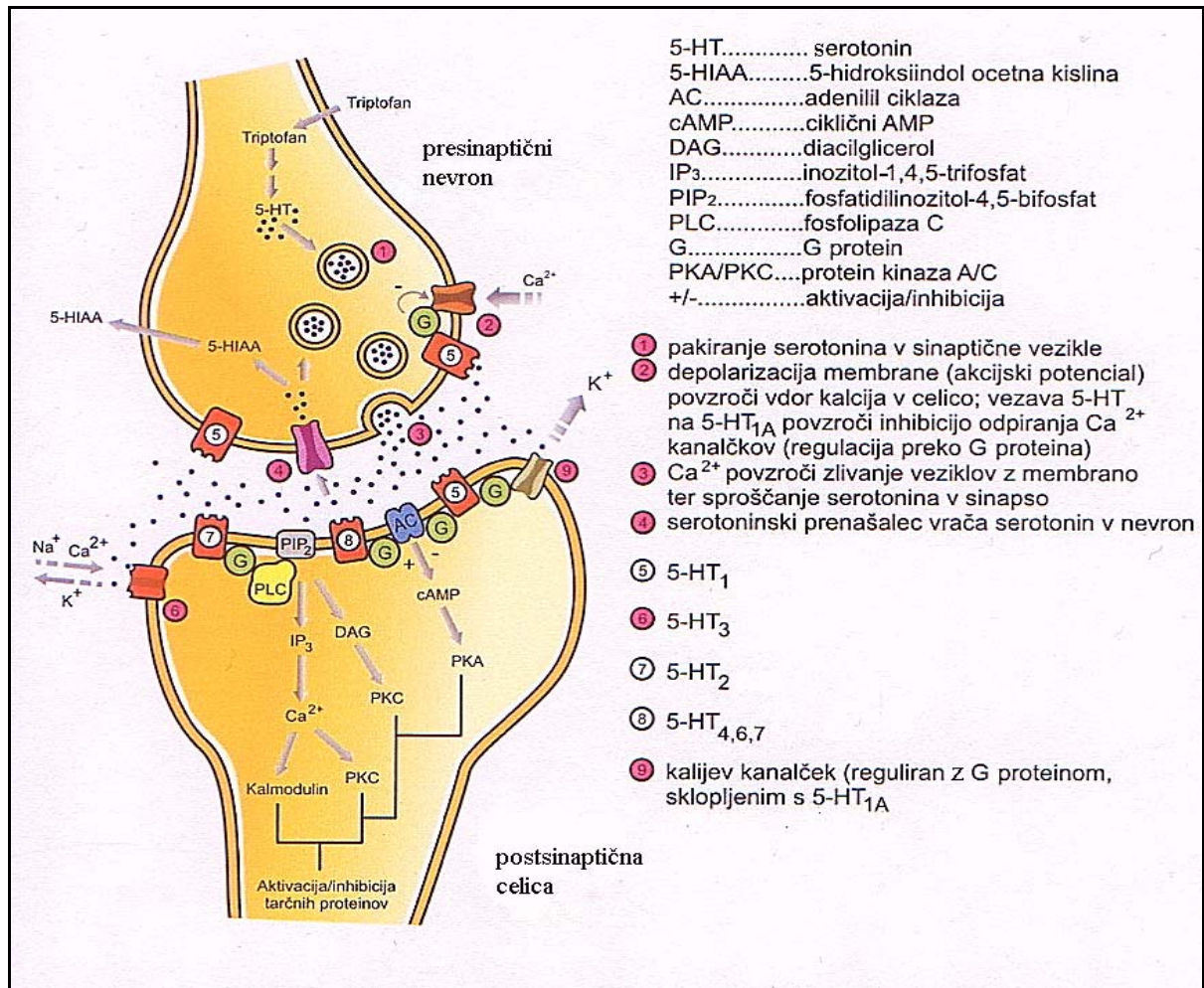
Encimski obliki sta prisotni v različnih predelih možganov v enaki količini, v možganskem deblu pa prevladuje TPH2 (8).

Druga stopnja v sintezi 5-HT je dekarboksilacija 5-HTP do 5-HT, ki jo katalizira dekarboksilaza L-aromatskih aminokislin ali DOPA-dekarboksilaza s pomočjo piridoksal fosfata (vitamin B₆). Encim je prisoten tako v nevronih, ki sintetizirajo 5-HT, kot tudi v tistih, kjer poteka sinteza kateholaminov in spreminja dihidroksifenilalanin v dopamin (3, 6).

Pri razgradnji 5-HT nastaja 5-hidroksiindol očetna kislina (5-HIAA). Razgradnja poteka s pomočjo encima monoamin-oksidge (MAO), ki pretvori 5-HT v 5-hidroksiindol acetaldehid, tega pa oksidira od NAD odvisna aldehyd-dehidrogenaza. Nastane 5-HIAA, ki se izloči v urin. Po alternativni poti acetaldehyd lahko reducira tudi od NADH odvisna aldehyd-reduktaza in nastane 5-hidroksitriptofol, ki se prav tako izloči z urinom v obliki glukoronida ali sulfata (3, 6).

V hipofizi pa poteka acetyliranje 5-HT z encimom 5-HT-N-acetylaza do N-acetyl-5-HT in nato metyliranje s hidroksiindol-O-metyltransferazo do melatonina (7).

Sintetizirani 5-HT se nato shranjuje v sinaptičnih veziklih (slika 3) in trombocitih kot kotransmitter skupaj s somatostatinom, substanco P ali vazoaktivnim intestinalnim polipeptidom (2). Za vstop v vezikle je potreben aktivni transport s pomočjo citoplazemskih prenašalnikov (vezikularni monoaminski transporter-VMAT). Energijo za aktivni transport zagotavlja aktivnost encima H⁺-ATPaze. Vezikli z znotrajceličnim transportom (mikrotubuli) potujejo do živčnega končiča. Ko akcijski potencial doseže živčni končič, sproži vstop Ca²⁺ skozi Ca-kanale, kar nato sproži zlivanje veziklov z membrano (eksocitoza) in s tem sproščanje 5-HT v sinaptično špranjo. Sproščeni 5-HT se nato veže na 5-HT receptorje v membrani postsinaptičnega nevrona oz. na drugi tarčni celici ali na avtoreceptorje v presinaptični membrani. To posledično izzove sproščanje različnih efektorjev in sekundarnih prenašalcev signala v postsinaptični celici (oz. v presinaptični v primeru vezave na avtoreceptor), ki modulirajo njen odziv, bodisi inhibitorno ali ekscitacijsko, odvisno od tipov receptorjev v membrani tarčne celice (6, 7, 9).



Slika 3: Sinaptični prenos serotonina (9).

Signal, ki ga sproži 5-HT, se nato prekine z:

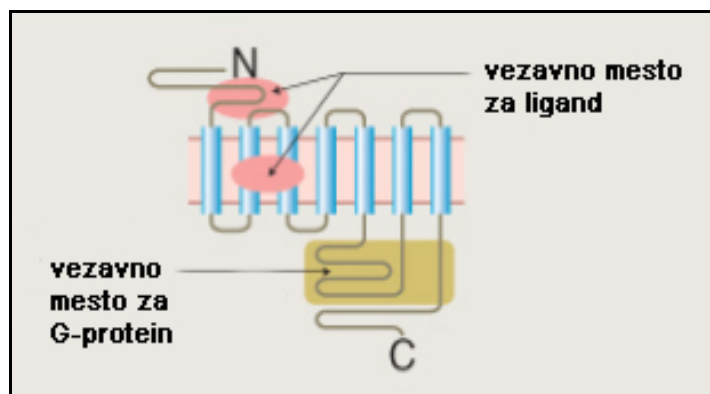
- razgradnjo prostega 5-HT;
- vezavo 5-HT na avtoreceptor, ki povratno zavre njegovo nadaljnje sproščanje;
- vezavo 5-HT na serotoninški prenašalec (SERT) in ponovnim privzemom v presinaptično celico, kjer se ponovno shrani v vezikle ali pa razgradi do 5-HIAA in izloči v zunajcelični prostor. SERT je transmembranski protein, zasidran v presinaptični membrani in ima funkcijo ponovnega privzema 5-HT iz sinapse v presinaptično celico, s tem ustavi serotoninški signal; in
- difuzijo v zunajcelični prostor (6, 7, 9).

1.4 Serotoninski receptorji

Receptorji so beljakovinske molekule na celični membrani, redkeje v citoplazmi ali v celičnem jedru, na katere se specifično vežejo telesu lastne snovi ter snovi vnesene v telo in posledično povzročijo biološki odgovor. Glede na strukturo, mehanizem prenosa in hitrost odgovora ločimo receptorje na: ionske kanale, receptorje sklopljene z G proteinom, receptorje s kinazno aktivnostjo in znotrajcelične oz. jedrne receptorje (2).

Obstoj več različnih 5-HT receptorjev sta potrdila že Gaddum in Picarelli leta 1975 na izoliranem ileumu budre. Predvidevala sta, da obstajata dve vrsti receptorjev za 5-HT, in sicer 5-HT-D (blokirani z dibenzilinom) in 5-HT-M (blokirani z morfinom), saj sta kontrakcijo ileuma, ki jo sicer povzroči 5-HT, preprečili spojini dibenzilin in morfin. Z razvojem radioligandov in metodo avtoradiografije so v zgodnjih 80-ih letih preteklega stoletja identificirali še dodatne receptorje, v začetku 90-ih let pa so zaradi razmaha molekularno bioloških metod sklonirali ter ugotovili zaporedje baz v genetskem zapisu in aminokislinsko zaporedje 5-HT receptorjev pri mnogih živalskih vrstah (1). Tako danes pri človeku poznamo petnajst, pri podgani pa trinajst podtipov 5-HT receptorjev, ki jih glede na vlogo, strukturo in mehanizem prenosa signala delimo v sedem razredov. Zaradi postranskripcijskega procesiranja mRNA, kot sta alternativno izrezovanje intronov in preurejanje mRNA, obstajajo različni podtipi 5-HT receptorjev še več oblikah, pravimo jim izooblike. 5-HT receptorje najdemo v osrednjem in perifernem živčevju, prebavnem in srčnožilnem sistemu (9).

Vsi receptorji, razen 5-HT₃, ki so ionski kanali, so sklopljeni z G proteinom. Receptorji sklopljeni z G proteinom so zasidrani v membrano s sedmimi hidrofobnimi α heliksi, ki jih povezujejo tri zunajcelične in tri znotrajcelične zanke, to so 7-transmembranski receptorji. N-terminalni konec se nahaja v zunajceličnem prostoru, C-terminalni konec pa je znotraj celice (slika 4). Ligand, v našem primeru 5-HT, se veže na zunajcelične zanke in v jedro receptorja, G protein pa na znotrajcelične zanke in C-terminalni del receptorja (10).



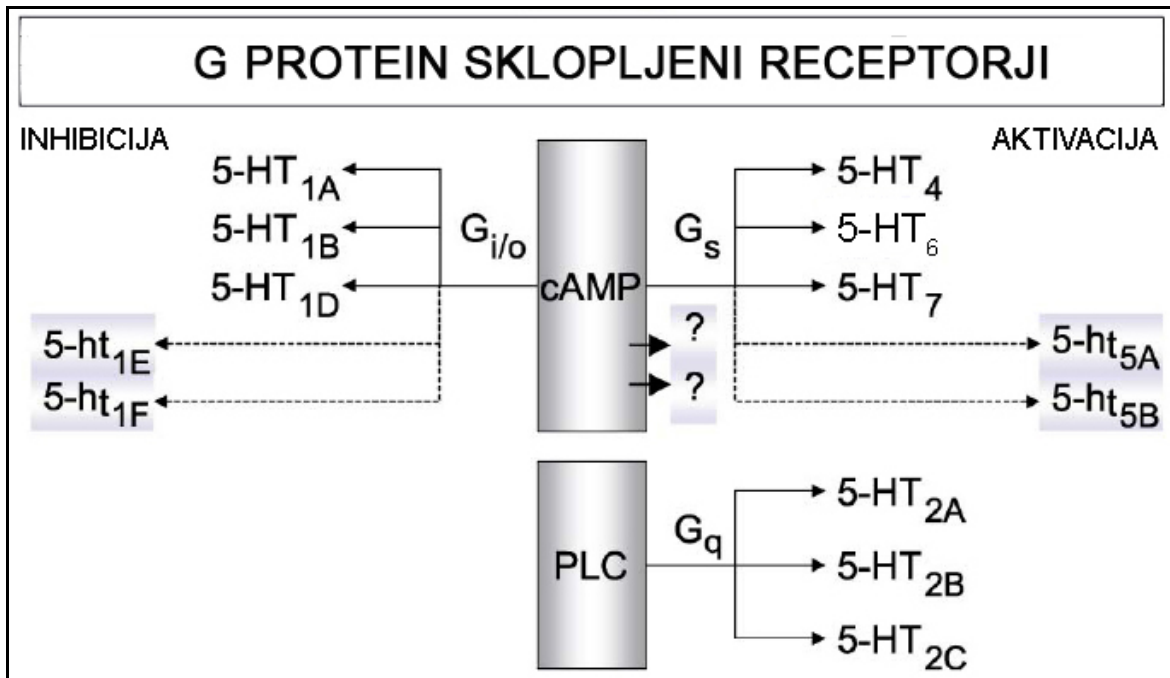
Slika 4: Zgradba receptorja, ki je sklopljen z G proteinom (2).

G proteini so sestavljeni iz treh podenot, α , β in γ , ki se ob vezavi 5-HT na receptor aktivirajo. Podenota α ima GTP-azno aktivnost in izmenja vezani GDP za GTP, zaradi česar trimerni protein razpade na kompleks $\beta\gamma$ in podenoto α . Slednja nato ločeno aktivirata oz. inhibirata različne sisteme sekundarne signalizacije, kot so:

- aktivacija ali inhibicija adenilat-ciklaze (AC), ki pretvarja ATP v cAMP-sekundarni prenašalec signala, ki nato aktivira protein-kinaze, te pa povzročijo fosforilacijo oz. aktivacijo tarčnih proteinov;
- aktivacija fosfolipaze C (PLC), ki hidrolizira fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP_2) do diacilglicerola (DAG) in inozitol-1,4,5-trifosfata (IP_3); DAG aktivira protein-kinazo C, ki povzroči fosforilacijo različnih znotrajceličnih proteinov; IP_3 pa se veže na receptor na endoplazmatskem retikulumu, ki je Ca-kanal, in na ta način nadzoruje sproščanje Ca^{2+} iz intracelularnih zalog;
- neposredna aktivacija oz. odprtje K-kanalov, kar povzroči izstop K^+ iz celice ter tako hiperpolarizacijo celične membrane;
- zaprtje Ca-kanalov (2).

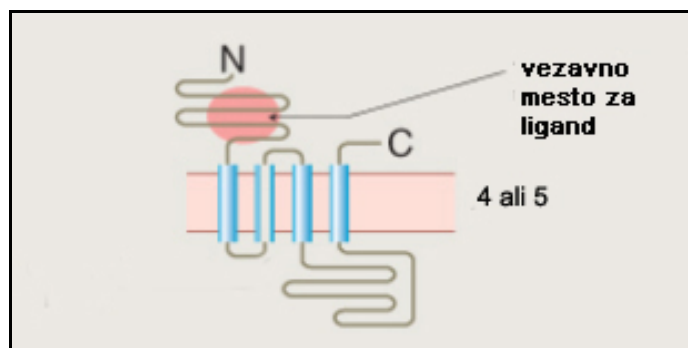
Farmakološko pomembni so štiri razredi G proteinov, ki se razlikujejo glede na podenoto α , to so G_s , G_i , G_o in G_q . 5-HT receptorji so sklopljeni z različnimi razredi G proteinov, zato imajo različne transdukcijske lastnosti (slika 5). Receptorji, ki spadajo v družino 5-HT₁, inhibirajo delovanje AC preko $G_{i/o}$ razreda G proteinov. Receptorji 5-HT₄, 5-HT₆ in 5-HT₇ aktivirajo AC in povečajo količino cAMP.

Tudi receptorji 5-HT_{5A} in 5-HT_{5B} naj bi delovali podobno, vendar se pri njih točen mehanizem transdukcije še preučuje. Receptorji družine 5-HT₂ pa ne vplivajo na AC, temveč aktivirajo PLC (10).



Slika 5: Transdukcijske značilnosti 5-HT receptorjev sklopljenih z G proteinom (10).

Receptorji tipa 5-HT₃ so ionski kanali, ki se odprejo ob vezavi liganda (5-HT) ter dobro prepuščajo Na⁺ in K⁺, slabše pa Ca²⁺ ione. Sodelujejo pri hitrem sinaptičnem prenosu. Vezavno mesto za ligand je na zunajcelični domeni (slika 6). Vzdraženje teh receptorjev ne vključuje sekundarnih prenašalcev (10).



Slika 6: Zgradba ionskega kanala (2).

1.4.1 Družina receptorjev 5-HT1

V to družino uvrščamo 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} in 5-HT_{1F} receptorje. Receptorji so homologni v 40-63 % aminokislinskega zaporedja. So različno farmakološko specifični in se nahajajo v različnih možganskih regijah (11).

a) Receptorji 5-HT_{1A}

Gostota receptorjev 5-HT_{1A} je povečana v raphe jedrih, kjer se nahajajo presinaptično. Delujejo kot avtoreceptorji in z negativno povratno zvezo inhibirajo sproščanje 5-HT. Ti receptorji se nahajajo tudi postsinaptično na membranah živčnih celic v možganski skorji in limbičnem področju (hipokampus, septum, amigdala). V obeh primerih delujejo inhibitorno na prenos signala prek aktivacije K-kanalov in s tem hiperpolarizacije membrane. Inhibirajo pa napetostno odvisne Ca-kanale (11).

V centralnem živčnem sistemu (CŽS) uravnavajo hranjenje, spolnost in telesno temperaturo. Aktivacija 5-HT_{1A} receptorjev povzroči izločanje adrenokortikotropnega hormona (ACTH), posledica njihove aktivacije na periferiji pa je znižanje arterijskega tlaka, upočasnitev srčne frekvence, povečan lokomotorni odziv in pospešitev fagocitoze (1, 12).

Imajo pomembno vlogo v patogenezi anksioznosti in depresije, zato se delni agonisti receptorjev 5-HT_{1A}, kot sta buspiron in gepiron, uporabljajo za zdravljenje omenjenih dveh stanj. Učinkovine z agonističnim učinkom na te receptorje so zanimive tudi za zdravljenje shizofrenije in agresije. Polni agonist receptorjev 5-HT_{1A} je 8-hidroksi-(2-N,N-dipropilamino)-tetralin (8-OH-DPAT), ki se uporablja eksperimentalno v farmakoloških študijah (7).

b) Receptorji 5-HT_{1B}

Receptorje 5-HT_{1B} najdemo v bazalnih ganglijah, zato naj bi bili vpleteni v bolezni, ki jih prizadenejo, kot je Parkinsonova bolezen. Delujejo kot presinaptični avtoreceptorji na končnih delih aksonov, kjer inhibirajo sproščanje 5-HT. Postsinaptično pa modulirajo sproščanje drugih nevrottransmitterjev, in sicer acetilholina v hipokampusu in dopamina v možganski skorji (1).

Receptorji 5-HT_{1B} naj bi imeli pomembno vlogo pri različnih nevroloških in psihiatričnih motnjah. Nekatere *post mortem* raziskave so pokazale spremenjeno vezavo na 5-HT_{1B} receptorje pri samomorilcih (13). Miši brez gena za 5-HT_{1B} so bile bolj impulzivne in agresivne, bolj nagnjene k uživanju alkohola in so hitreje postale odvisne od kokaina kot normalne kontrole. To nakazuje na možno vlogo tega receptorja v psihopatoloških stanjih, kot so samomor, agresija in odvisnost (14). Ta podtip receptorjev naj bi imel vlogo tudi pri vnosu hrane (15).

Postsinaptične receptorje 5-HT_{1B} so našli tudi na možganskih arterijah. Agonisti teh receptorjev, triptani, z vezavo nanje povzročijo vazokonstrikcijo možganskih arterij. Ta zdravila se uporabljajo pri zdravljenju akutnih migrenskih glavobolov (16).

c) Receptorji 5-HT_{1D}

Receptorje 5-HT_{1D} so našli v bazalnih ganglijih, hipokampusu in možganski skorji. mRNA za receptor 5-HT_{1D} pa se v nizkih količinah izraža v bazalnih ganglijih, dorzalnih raphe jedrih in locusu ceruleusu (10).

Protimigrenska zdravila prek delovanja na receptorje 5-HT_{1D} blažijo sterilno nevrogeno vnetje in bolečino. Vezavi na te receptorje pripisujejo še večji pomen pri zdravljenju migrene kot vezavi na 5-HT_{1B} receptorje, zato v ta namen preizkušajo selektivne agoniste receptorjev 5-HT_{1D}. Zelo znana agonista 5-HT_{1D} receptorjev, ki se uporabljata pri akutnih migrenskih glavobolih, sta sumatriptan in zolmitriptan (16, 17).

č) Receptorji 5-ht_{1E}

Receptorje 5-ht_{1E} in še nekatere druge podtipe 5-HT receptorjev označujemo z malimi črkami zato, ker doslej še niso odkrili ustreznih endogenih receptorjev s fiziološko vlogo. Njihov obstoj so potrdili le s kloniranjem ustrezne mRNA v različnih predelih CZŠ. mRNA za ta receptor so našli v možganski skorji pri ljudeh in nekaterih glodalcih. Po aminokislinskem zaporedju je ta receptor najbolj homologen receptorju 5-HT_{1D} (1, 11).

d) Receptorji 5-ht_{1F}

Ta receptor so klonirali in mu določil aminokislinsko zaporedje leta 1993. Po aminokislinskem zaporedju je najbolj homologen s 5-ht_{1E} receptorjem.

mRNA za ta receptor so našli v možganski skorji, hipokampusu, uterusu, trigeminalnem gangliju, dorzalnih raphe jedrih in striatumu (11). Ker so mRNA za ta receptor našli tudi v trigeminalnem gangliju, agonisti teh receptorjev predstavljajo potencialna zdravila za zdravljenje migrene (18).

1.4.2 Družina receptorjev 5-HT₂

V to družino spadajo 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} in 5-HT_{2C} receptorji. Receptorji so homologni v 46-50 % aminokislinskega zaporedja. Pomembni so tako na periferiji kot v CŽS, kjer predstavljajo tarče halucinogenov in posredujejo njihove učinke (10).

a) Receptorji 5-HT_{2A}

Postsinaptične receptorje 5-HT_{2A} (5-HT-D receptorji po Gaddumu in Picarelliju) najdemo v možganski skorji, klavstrumu, predelih limbičnega sistema in bazalnih ganglijih. V možganski skorji se ti receptorji nahajajo na gabaergičnih in glutamatergičnih nevronih (1).

Aktivacija receptorjev v CŽS povzroči porast telesne temperature (hipertermija) in izločanje hormonov, kot so ACTH, kortikosteron, oksitocin, renin in prolaktin (19). Na periferiji 5-HT prek teh receptorjev sproži kontrakcijo gladkih mišic in agregacijo trombocitov ter poveča prepustnost kapilar. Poleg termoregulacije, kontrakcije gladkih mišic in kardiovaskularnih učinkov naj bi imeli vlogo tudi pri učenju, uravnavanju apetita in spanja (7).

Na te receptorje se z relativno visoko afiniteto vežejo tipični in atipični antipsihotiki ter antidepressivi. Kronična terapija z antagonisti 5-HT_{2A} receptorjev ima za posledico paradokсно znižanje števila teh receptorjev, kar bi lahko uporabili pri zdravljenju depresije. Nekateri 5-HT_{2A} antagonisti, kot je risperidon, delujejo kot antipsihotiki. Veliko antagonistov, ki se veže na 5-HT_{2A} receptorje, se veže tudi na dopaminske D₂ receptorje. Antagonisti, ki se vežejo z večjo afiniteto na 5-HT_{2A} receptorje, naj bi bili bolj učinkoviti pri zdravljenju negativnih znakov shizofrenije, medtem ko so D₂ antagonisti učinkovitejši pri zdravljenju pozitivnih znakov shizofrenije. Nekateri predklinične študije kažejo tudi na anksiolitično delovanje 5-HT_{2A} antagonistov, kot je ritanserin (7). Receptorji 5-HT_{2A} so tudi tarče halucinogenov.

Neselektivni agonist receptorjev 5-HT_{2A} je LSD (dietilamid lizergične kisline). Številne študije kažejo, da naj bi bila vezava na ta podtip receptorjev odgovorna za halucinogene učinke (20).

b) Receptorji 5-HT_{2B}

Na periferiji so našli mRNA za ta receptor v želodcu, črevesju, ledvicah, srcu in pljučih. V možganih pa v možganski skorji, malih možganih, amigdali, substanci nigri, talamusu in hipotalamusu. Receptorji 5-HT_{2B} se nahajajo tudi v krvnih žilah. Antagoniste teh receptorjev bi zato zaradi vazodilatatornih učinkov lahko uporabljali pri zdravljenju migrene. Sicer naj bi imeli ti receptorji vlogo še pri anksioznosti in vnosu hrane (10).

c) Receptorji 5-HT_{2C}

Glede na vezavne lastnosti je 5-HT_{2C} podoben receptorjema 5-HT_{1A} in 5-HT_{1B}, zato so ga sprva uvrščali v družino receptorjev 5-HT₁ in ga poimenovali 5-HT_{1C}. V aminokislinskem zaporedju pa kaže visoko homologijo z receptorjem 5-HT_{2A}, s katerim imata tudi zelo podoben farmakološki vezavni profil. Od tukaj poimenovanje 5-HT_{2C} (21).

Gostota receptorjev 5-HT_{2C} je največja v horoidnem pletežu, sledijo hipotalamus, hipokampus, amigdala, substancia nigra in možganska skorja. Najmanj receptorjev je v malih možganih (22).

Receptor naj bi imel pomembno vlogo pri anksioznosti, boleznih odvisnosti, samomorilnosti, opravljanju kognitivnih funkcij, erekciji in vnosu hrane. Poleg tega bi receptorji 5-HT_{2C} lahko uravnavali sestavo in volumen cerebrospinalne tekočine (1). Med pomembne naloge pa spada tudi uravnavanje delovanja dopaminskega sistema (23) ter posredovanje učinkov mnogih zdravil in psihoaktivnih snovi (21).

Kot regulator hranjenja in energijskega ravnotežja predstavlja 5-HT_{2C} receptor tarčo razvoja zdravil, ki uravnavajo vnos hrane oz. občutek lakote. Selektivni agonisti receptorjev 5-HT_{2C} so obetavne učinkovine za zdravljenje debelosti (24). Agonistično nanje naj bi deloval tudi zaviralec apetita fenfluramin, ki so ga umaknili s tržišča zaradi ugotovljene povezave z boleznijo srčnih zaklopk (1).

Neselektivni antagonisti receptorjev 5-HT_{2C}, kot so ritanserin, mianserin in mesulergin, in selektivni antagonisti, kot je deramciklam, bi se lahko uporabljali kot antidepresivi in anksiolitiki. Z visoko afiniteto se na te receptorje vežeta LSD in klozapin, kar nakazuje možno vlogo teh receptorjev pri razvoju halucinacij (20).

1.4.3 Receptorji 5-HT₃

Receptorji 5-HT₃ (5-HT-M receptorji po Gaddumu in Picarelliju) se razlikujejo od ostalih receptorjev, saj niso sklopljeni z G proteini, ampak so ionski kanali. Receptor 5-HT₃ je pentamer, sestavljen iz petih podenot. Leta 1993 so klonirali eno izmed podenot receptorja, in sicer 5-HT_{3A} podenoto, ki je zelo podobna alfa podenoti nikotinskega receptorja za acetilholin. Kasneje so klonirali še 5-HT_{3B} podenoto. Nekateri viri poročajo tudi o odkritju tretje podenote 5-HT_{3C}. Ugotovili so, da heteromerna kombinacija obeh podenot zagotavlja lastnosti 5-HT₃ receptorja, kakršen se pojavlja v tkivih. Homomerni receptor sestavljen iz ene od obeh podenot namreč ne kaže tipičnih lastnosti nativnega 5-HT₃ receptorja v tkivih. Točna sestava podenot nativnega 5-HT₃ receptorja še ni znana, domnevajo pa, da naj bi se 5-HT₃ receptorji razlikovali po sestavi podenot glede na tkivo. 5-HT₃ receptorji naj bi zato imeli tudi različne farmakološke značilnosti (1).

Receptorje 5-HT₃ najdemo v CZS, perifernem živčevju, srčnožilnem in prebavnem sistemu (10). Serotonin preko aktivacije receptorjev 5-HT₃ uravnava motiliteto in izločanje prebavnih sokov v prebavilih. Gostota teh receptorjev je velika v perifernih ganglijih in nevronih, kot tudi v substanci gelatinosi v hrbtenjači. Prisotnost receptorjev v hrbtenjači in podaljšani hrbtenjači nakazuje na njihovo vlogo v nocicepciji, saj ti receptorji tam pospešijo izločanje substance P (1).

Receptorje 5-HT₃ so našli tudi v možganski skorji in limbičnem področju, zato predvidevajo, da naj bi antagonisti teh receptorjev imeli anksiolitično in antidepresivno delovanje ter vpliv na kognicijo (1, 25). Večina nevronov v možganski skorji in hipokampusu, ki izraža mRNA za 5-HT₃ receptor, je gabaergičnih. Receptorji 5-HT₃ uravnava tudi sproščanje dopamina, zato naj bi bili antagonisti teh receptorjev tudi potencialni antipsihotiki. Antagonisti naj bi tudi zmanjšali odtegnitveni sindrom pri zasvojenosti z alkoholom, nikotinom, kokainom in amfetamini (1, 26).

Pomembni antagonisti 5-HT₃ receptorjev so antiemetiki, med katere spadajo ondansetron, granisetron, tropisetron. Te učinkovine blažijo slabost in bruhanje pri bolnikih na kemoterapiji raka (3, 7).

1.4.4 Receptorji 5-HT₄

Raziskovanje teh receptorjev je sprva oteževalo pomanjkanje visokoafinitetnih radioligandov. Šele sinteza in razvoj specifičnih radioligandov sta omogočila karakterizacijo in študije 5-HT₄ receptorjev. Gostota teh receptorjev je visoka v striatumu, substanci nigri, olfaktornem tuberkulu in hipokampusu. Nahajajo se postsinaptično na serotonergičnih nevronih in uravnavajo sproščanje različnih živčnih prenašalcev, in sicer acetilholina, dopamina in GABA ter posredno 5-HT. Pri podganah in opicah so ugotovili vpliv receptorjev na kognitivne sposobnosti, pri človeku naj bi bil ta podtip vpleten v funkcije spomina in učenja. Na periferiji so našli mRNA za ta receptor v gladkih mišicah žil. Receptorji se nahajajo tudi na živčnih (mienterični plexus), gladko-mišičnih ter sekretornih celicah prebavnega trakta, kjer uravnavajo sekrecijo in peristaltiko (11).

Zdravilne učinkovine, ki aktivirajo te receptorje, predstavljajo nove možnosti v zdravljenju neurodegenerativnih bolezni, aritmij in urinske inkontinence (1, 27). Agoniste 5-HT₄ receptorjev, kot so cisaprid, prukaloprid in tegaserod, uporabljajo pri zdravljenju sindroma iritabilnega črevesa s poudarjeno zaprtostjo (28).

Zaradi posttranskripcijskega procesiranja mRNA obstaja več izooblik 5-HT₄ receptorjev, ki se specifično izražajo v različnih tkivih. Pri človeku se zato 5-HT_{4a}, 5-HT_{4b} in 5-HT_{4c} izooblike izražajo v možganih, atriju in črevesu, medtem ko se 5-HT_{4d} izooblika pojavlja samo v črevesu. Različne izooblike pa naj bi se razlikovale tudi v farmakološkem delovanju (11).

1.4.5 Receptorji 5-ht₅

Za te receptorje še vedno ni dokazov o endogeni prisotnosti. Klonirali so dva podtipa teh receptorjev, 5-ht_{5A} in 5-ht_{5B}, ki sta homologna v 77 % aminokislinskega zaporedja, medtem ko je podobnost z ostalimi 5-HT receptorji manjša.

mRNA za 5-ht_{5A} receptor so odkrili s pomočjo *in situ* hibridizacije v možganski skorji, hipokampusu, malih možganih, amigdali, septumu, nekaterih talamičnih jedrih in olfaktornem bulbusu pri miših in podganah. Informacijsko RNA za 5-ht_{5B} receptor pa so s pomočjo iste metode našli v hipokampusu, habenuli in dorzalnih raphe jedrih tako pri podganah kot pri ljudeh (11).

Imunohistokemične študije z uporabo protiteles proti 5-ht_{5A} receptorju so pokazale, da se receptor izraža predvsem v astrocitih. Kadar se 5-ht_{5A} receptor izraža v rekombinantnih celičnih sistemih, je sklopljen z G proteinom in preko njega inhibira AC, sklopljenost 5-ht_{5B} receptorja še ni znana, kot tudi ni poznana fiziološka vloga teh receptorjev (1, 10).

Glede na razporeditev teh receptorjev predvidevajo, da naj bi bili vpleteni v anksioznost, depresijo, prehranjevanje, učenje, spomin, prilagajanje, gibanje in razvoj možganov (7).

1.4.6 Receptorji 5-HT₆

Receptorji 5-HT₆ naj bi se nahajali izključno v CŽS, njihovo mRNA so našli v striatumu, olfaktornem tuberclu, hipokampusu in možganski skorji. Vloga teh receptorjev v tkivu še ni povsem znana. Farmakologija, porazdelitev in genska struktura receptorjev je tako pri podgani kot pri človeku enaka (11).

Visoka afiniteta atipičnih antipsihotikov, kot so klozapin, olanzapin, kvetiapin, in antidepresivov, kot so amitriptilin, klomipramin, mianserin, ritanserin, do teh receptorjev nakazuje njihovo vlogo v razvoju psihiatričnih bolezni (1). Ena izmed nalog teh receptorjev naj bi bila kontrola sproščanja acetilholina. Selektivne antagoniste 5-HT₆ receptorjev bi zato lahko uporabljali pri zdravljenju anksioznosti in motenj spomina. Nekatere študije kažejo na pomembno vlogo teh receptorjev pri nevromodulaciji in motoriki (29).

1.4.7 Receptorji 5-HT₇

Identificirali in klonirali so dve obliki 5-HT₇ receptorjev, in sicer 5-HT_{7a} in 5-HT_{7b}, ki sta najverjetneje posledica alternativnega izrezovanja intronov in preurejanja mRNA.

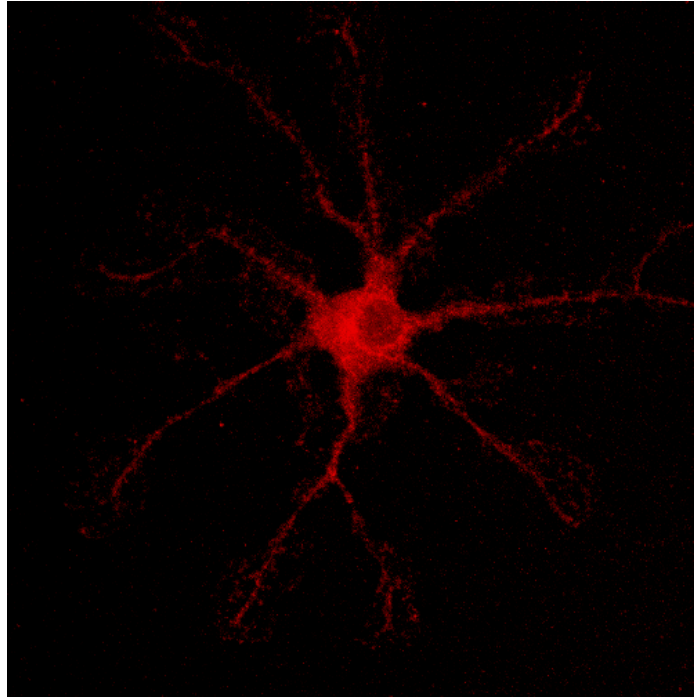
Nekateri viri zagovarjajo celo obstoj 4 izooblik tega receptorja, ki pa se naj ne bi razlikovale glede na tkivno porazdelitev, farmakološke in transdukcijske lastnosti (1).

Ti receptorji se izražajo v glavnem v CŽS (7). S pomočjo neselektivnih radioligandov so ob prisotnosti učinkovin, ki zasedejo 5-HT_{1A} in 5-HT_{1B} receptorska vezavna mesta, odkrili 5-HT₇ receptorje v podganjih možganih. Porazdelitev teh receptorjev pa so potrdili z uporabo neselektivnih radioligandov v možganih transgenih miši, ki niso vsebovali 5-HT_{1A} in 5-HT_{1B} receptorjev. Nizko gostoto receptorjev so ugotovili v možganski skorji, septumu, talamusu, hipotalamusu, amigdali in hipokampusu. Vpleteni naj bi bili v uravnavanje cirkadianega ritma in v nekatere psihiatrične bolezni (1, 11).

Visoko afiniteto do teh receptorjev imajo atipični antipsihotiki, kot sta klopazin in risperidon, in nekateri antidepresivi (1, 30). Ti receptorji so prisotni tudi na periferiji v gladkih mišicah žil, kjer povzročajo vazodilatacijo. Učinkovine z delovanjem na 5-HT₇ receptorje naj bi bile zato učinkovite tudi pri zdravljenju koronarne srčne bolezni (7).

1.5 Astrociti

Astrociti so tako kot nevroni ektodermalnega izvora, vendar niso vzdražni. So edine celice, ki imajo glialno fibrilarno kislino beljakovino (GFAP), del citoskeletnega sistema, ki služi kot nenadomestljiv označevalec teh celic v razmerah *in vivo* ter *in vitro* (slika 7). Astrociti tvorijo številne presledkovne stike, ki omogočajo medcelično komunikacijo tako z astrociti kot z nevroni predvsem z uporabo kalcijevih tokov. Imajo edinstveno lastnost, da lahko v skladu s spremembami v neposrednem okolju spreminjajo svojo obliko in funkcijo, zato imajo popolnoma različne vloge v različnih življenjskih obdobjih. Posebej se razlikujeta njihova oblika in funkcija v obdobju med razvojem, v odraslem obdobju in v času po poškodbi CŽS. Astrociti izražajo receptorje za večino prenašalcev v CŽS, med njimi tudi za 5-HT. Njihova prisotnost je bila potrjena z vezavnimi študijami z uporabo radioligandov in imunocitokemično (31).



Slika 7: Astrocit v kulturi barvan z GFAP (31).

Iz kratkega pregleda vidimo, da obstaja veliko podtipov 5-HT receptorjev, ki so razporejeni po različnih predelih CŽS, na različnih vrstah celic in so vpleteni v vrsto fizioloških ter patoloških dogajanj. Raziskave na tem področju lahko privedejo do pomembnih ugotovitev, ki bi prinesle nove odgovore, izboljšale obstoječe načine zdravljenja ali celo pripomogle k razvoju povsem novih zdravil.

2 NAMEN DELA

5-HT posreduje učinke pri podgani prek stimulacije trinajstih različnih podtipov 5-HT receptorjev. Izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev je odvisno od možganske regije in starosti poskusne živali.

V raziskavi bomo preverili, kako se izraža mRNA za 5-HT receptorje v možganski skorji novorojenih podgan in v primarnih kulturah astrocitov, vzgojenih iz možganske skorje novorojenih podgan. Izražanje v kulturah bomo preučevali v prisotnosti in odsotnosti 5-HT. Potrdili ali ovrgli bomo naslednje hipoteze:

1. primarna kultura astrocitov izraža manj različnih podtipov 5-HT receptorjev kot tkivo, iz katerega kultura izvira;
2. gojenje astrocitov v prisotnosti 5-HT vpliva na izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev; in
3. čas gojenja astrocitov v kulturi ne vpliva na izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Poskusne živali

Za izvajanje poskusov na živalih smo imeli dovoljenje Veterinarske uprave Slovenije št. 323-02-232/2005/2. Uporabili smo novorojene podgane (starosti 3 dni) obeh spolov vrste *Rattus norvegicus* seva Wistar. Podgane je dekapitiral tehnik, ki ima dovoljenje za izvajanje evtanazije poskusnih živali. Iz lobanje je previdno odstranil možgane.

Iz možganske skorje smo ali neposredno izolirali RNA ali pa vzgojili primarne kulture astrocitov. Na izbiro živalske vrste je vplivala zlasti lahka dostopnost, možnost primerjave s številnimi že objavljenimi študijami in možnost prenosa ugotovitev v humano medicino. Poskus na živali smo izbrali zato, ker ne obstaja ustrezen neživalski model za preučevanje prisotnosti receptorskih mRNA v skorji možganov, s čimer bi dobili odgovore na zastavljena vprašanja.

3.2 Primarne kulture astrocitov

Celične kulture astrocitov smo pripravili iz možganske skorje po protokolu, ki zagotavlja pridobitev čiste kulture astrocitov (32). Po odstranitvi mening smo mehansko razdrobili možgansko tkivo s pomočjo pipet in injekcijskih igel različnih svetlin ter pripravili suspenzijo v Leibowitzovem mediju L-15. Po centrifugiranju smo usedlino prenesli v gojilne posode, ki so vsebovale medij za gojenje astrocitov z naslednjo sestavo: DMEM (po Dulbeccu modificiran Eaglov medij) z visoko koncentracijo glukoze, 10 % fetalni goveji serum, 1 mM piruvat, 2 mM glutamin in 25 µg/mL gentamicin. Astroците smo vzgajali v inkubatorju pri 37 °C, v prisotnosti 95 % zraka in 5 % CO₂.

Konfluentne celice smo stresali preko noči pri 225 vrtljajev/min in zjutraj zamenjali medij. S tem postopkom, ki smo ga trikrat zapored ponovili, smo odstranili kontaminirajoče celice, predvsem mikroglijo. Celice smo tripsinizirali in presadili ter jih 24 ur gojili v prisotnosti 10 µM citozin arabinozida, citostatika, ki onemogoči rast fibroblastom, ker se začnejo najhitreje deliti.

Za izolacijo RNA smo uporabili konfluentne celice prve in druge pasaže. Celice prve pasaže so rasle v kulturi do 14 dni, celice druge pasaže pa približno 21 dni.

3.2.1 Gojenje astrocitov v prisotnosti serotonina

Za ugotavljanje vpliva 5-HT na izražanje 5-HT receptorjev, smo mediju za gojenje v zadnji pasaži dodali še 5-HT (končna koncentracija 500 nM). Medij smo menjavali vsak dan, dokler ni kultura postala konfluentna. Le-to smo uporabili za izolacijo RNA.

3.4 Izolacija RNA

Za izolacijo celokupne RNA iz možganske skorje in celičnih kultur astrocitov smo uporabili protokol in komplet reagentov SV Total RNA Isolation System (Promega, ZDA) (preglednica I). Ta metoda omogoča izolacijo celokupne RNA iz krvi, celičnih kultur, živalskih in rastlinskih tkiv, kvasovk in bakterij. Bistveni so štirje koraki: razgradnja tkiva oz. celic, inaktivacija endogenih RNaz, obarjanje proteinov ter odstranitev kontaminirajočih proteinov in DNA.

Preglednica I: Reagenti za izolacijo celokupne RNA in njihova sestava

| Reagent | Sestava |
|--|---|
| RNA pufer za liziranje | 4 M GTC 0,01 M Tris (pH 7,5) 0,97 % β -merkaptoetanol |
| RNA pufer za redčenje | |
| DNaza I | |
| 0,09 M $MnCl_2$ | |
| Rumeni pufer (Yellow Core Buffer) | 0,0225 M Tris (pH 7,5) 1,125 M NaCl 0,0025 % rumeno barvilo |
| Raztopina za ustavitev delovanja DNaze | 2 M GTC 4 mM Tris-HCl (pH 7,5) 57 % etanol |
| RNA raztopina za izpiranje | 60 mM kalijev acetat 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 pri 25°C) 60 % etanol |

Preostali potrebni material za izolacijo RNA po omenjeni metodi smo priskrbeli v laboratoriju:

- homogenizator ULTRA-TURRAX T45 (Janke & Kunkel KG, Nemčija);
- toplotni inkubator Thermomixer Comfort (Eppendorf, Nemčija);
- centrifuga 5810 R (Eppendorf, Nemčija);
- voda obdelana z DEPC (dietilpirokarbonat karboksietilira histidin v aktivnem mestu RNaze in jo s tem ireverzibilno inaktivira);
- 95 % etanol.

Za izolacijo iz tkiva smo v epruveto odpipetirali 175 μ L pufru za liziranje in epruveto stehali. Nato smo v epruveto dodali tkivo in jo ponovno stehali. Masa tkiva naj bi namreč ustrezala razmerju 60 mg / 175 μ L pufru za liziranje. Tkivo smo nato homogenizirali s homogenizatorjem.

Pri izolaciji RNA iz celične kulture smo oprijete celice najprej dvakrat sprali z 10 mL 1x PBS (fosfatni pufer s soljo), nato smo dodali 4 mL 1x PBS, jih postrgali in centrifugirali pri 300 g. Bistvo raztopino (supernatant) smo zavrgli, usedlini celic (sedimentu) pa dodali 175 μ L pufru za liziranje. Celice smo pod mikroskopom tudi prešteli. Priporočljivo število celic za dobro izolacijo RNA naj bi bilo med 1.5×10^3 in 5×10^6 .

Lizat smo nato tako pri tkivu kot pri celični kulturi prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko, dodali 350 μ L pufru za redčenje in premešali z obračanjem (3-4x). β -merkaptotanol je preprečil delovanje RNaz, z visoko koncentracijo GTC v razredčenem celičnem ekstraktu pa smo dosegli selektivno obarvanje celičnih proteinov, medtem ko so nukleinske kisline ostale v raztopini. Zmes smo 3 min inkubirali pri 70°C in nato 10 min centrifugirali. To in vsa naslednja centrifugiranja smo izvajali pri 23°C in 13000 g. Bistri lizat smo odpipetirali v čisto mikrocentrifugirko, dodali 500 μ L 95 % etanola in premešali s pipetiranjem. Na ta način smo nukleinske kisline oborili. Raztopino smo prenesli v centrifugalni koncentrador z membrano iz kremenovega peska, ki smo ga vstavili v zbiralno epruvetko, ter centrifugirali 1 min. Na ta način so se nukleinske kisline vezale na membrano. Koncentrat smo zavrgli, na membrano pa odpipetirali 600 μ L raztopine za izpiranje ter ponovno centrifugirali 1 min.

Koncentrat smo odlili. Nato smo na membrano nanesli zmes z DNazo, sestavljeno iz 40 μL rumenega pufra, 5 μL MnCl_2 in 5 μL DNaze I, ter pustili delovati 15 minut na sobni temperaturi. S tem smo razgradili kontaminirajočo DNA. Zmes z DNazo smo pripravili tik pred uporabo. Delovanje DNaze smo prekinili z dodatkom 200 μL raztopine za ustavitev delovanja DNaze in ponovno centrifugirali 1 min. Nato smo dodali 600 μL raztopine za izpiranje, centrifugirali 1 min, ponovno dodali 250 μL raztopine za izpiranje in centrifugirali 2 min. Centrifugalni koncentrator smo nato prenesli v novo sterilno mikrocentrifugirko, na membrano dodali 100 μL vode obdelane z DEPC in ponovno centrifugirali 1 min. Na ta način smo sprostili celokupno RNA z membrane v mikrocentrifugirko. Dobljeni vzorec smo shranili pri -70°C .

3.4 UV spektroskopija

Organske baze v nukleinskih kislinah, ki absorbirajo UV-svetlobo zaradi aromatskih obročev, imajo absorpcijski maksimum pri 260 nm. Z merjenjem absorbance pri tej valovni dolžini lahko neposredno določimo koncentracijo RNA v primeru, da vzorec ne vsebuje molekul, ki tudi absorbirajo pri tej valovni dolžini (proteini, fenoli) in bi lahko zmotile meritev. Čistost vzorca preverimo z vzporednim merjenjem absorbance pri 260 nm in 280 nm. Pri čisti RNA znaša razmerje med absorbcama približno 2,0 (33).

3.4.1 Določanje koncentracije celokupne RNA in njene čistosti

Po končani izolaciji celokupne RNA iz tkiva in kultur astrocitov smo z UV-spektrofotometrom MBA 2000 (Perkin Elmer, ZDA) dobljenim vzorcem izmerili absorbanco pri 260 nm. Pred tem smo vzorce 100x redčili (5 μl v 495 μl vode obdelane z DEPC). Spektrofotometer je podal tudi masno koncentracijo celokupne RNA v vzorcu ter razmerje absorbcanc pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm (preglednica II).

Preglednica II: Rezultati merjenja absorbanca izolirane celokupne RNA

| | Tkivo | Kultura astrocitov brez 5-HT (1.pasaža) | Kultura astrocitov s 5-HT (1.pasaža) | Kultura astrocitov brez 5-HT (2.pasaža) | Kultura astrocitov s 5-HT (2.pasaža) |
|------------------------------------|-------|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| A ₂₆₀ | 0,070 | 0,030 | 0,028 | 0,033 | 0,041 |
| RNA (µg/mL) | 2,80 | 1,20 | 1,12 | 1,32 | 1,64 |
| A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | 2,00 | 2,00 | 2,07 | 1,96 | 2,03 |

Poznavanje koncentracije RNA je pomembno pri reverzni transkripciji s polimerazno verižno reakcijo (RT-PCR), saj mora masna koncentracija celokupne RNA ustrezati 83 ng/mL. Koncentracijo, ki jo je podal spektrofotometer, smo množili s faktorjem 100 zaradi redčenja, da smo dobili koncentracijo celokupne RNA v osnovnem vzorcu, ki smo ga uporabili v nadaljnjih postopkih.

Pomemben podatek je tudi razmerje absorbanca pri 260 in 280 nm, saj nam veliko pove o čistosti izolirane RNA. To razmerje lahko zaradi razlik v izhodnem materialu in postopku izolacije celokupne RNA variira med vrednostima 1,7 in 2,1. Celokupna RNA, ki smo jo izolirali iz tkiva in celičnih kultur, je bila brez nečistoč (proteinov), saj je bilo razmerje A₂₆₀/A₂₈₀ vedno v predpisanem intervalu.

3.5 Agarozna gelska elektroforeza (AGE)

Elektroforeza je ločevalna tehnika, ki temelji na potovanju nabitih delcev pod vplivom električnega polja. Pozitivno nabiti delci potujejo proti katodi, negativno nabiti pa proti anodi. V primeru nukleinskih kislin, ki so zaradi prisotnosti fosfatov negativno nabite, molekule potujejo proti pozitivno nabiti elektrodi - anodi. Hitrost potovanja je odvisna od njihovega celokupnega naboja, oblike in velikosti, pa tudi od moči električnega polja, velikosti por oz. zamreženja gela in viskoznosti elektrolita. Ker je razmerje med nabojem in dolžino molekule pri vseh nukleinskih kislinah enako, bi v raztopini pod vplivom električnega polja vse molekule potovale enako hitro. Z uporabo gelov pa lahko delce ločujemo na podlagi njihove velikosti, saj manjši delci skozi pore gela potujejo hitreje, večji pa počasneje (33).

Za ločevanje makromolekul, kot so nukleinske kisline, se uporablja predvsem AGE, saj so dimenzije por v manj zamreženi agarozni večje kot v poliakrilamidih in tako bolj primerne za prehajanje velikih molekul DNA in RNA. Metodo izvajamo horizontalno, gel je popolnoma potopljen v pufer. Vzorcju pred nanosom dodamo glicerol in indikatorska barvila, kar nam olajša nanos in omogoča spremljanje položaja nukleinskih kislin v gelu. Če poleg vzorca na gel nanese tudi standarde znanih dolžin, lahko po končani ločitvi določimo velikost posameznih nukleinskih kislin (33).

3.5.1 Priprava gela

Gel z ustrešno koncentracijo agaroze pripravimo glede na velikost nukleinskih kislin, ki jih ločujemo. Različne koncentracije gelov omogočajo optimalno ločljivost fragmentov v posameznih velikostnih razredih. Večje kot so molekule, nižjo koncentracijo agaroze uporabimo (33).

Za analizo izolirane celokupne RNA smo uporabili 1 % agarozni gel, ki smo ga naredili iz sestavin navedenih v preglednici III.

Preglednica III: Sestavine za pripravo 1 % agaroznega gela in njihova količina

| Sestavina | Količina |
|---|----------|
| Agarozna Agarose LE Analytical Grade (Promega, ZDA) | 1,0 g |
| 10x TBE pufer (Sigma, ZDA) | 10 mL |
| Bidestilirana voda | 90 mL |
| 25 mM (10 mg/mL) etidijev bromid (Bio-Rad, ZDA) | 5 µL |

V erlenmajerico smo zatehtali ustrešno količino agaroze ter dolili elektroforezni pufer, ki smo ga pripravili tako, da smo 10 mL 10x TBE pufera razredčili z vodo do 100 mL in dobili 1x TBE pufer. Agarozo smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici pri srednji energiji valovanja. Raztopino smo med segrevanjem večkrat premešali. Ko se je agarozna popolnoma raztopila, smo raztopino nekoliko ohladili (na približno 60°C) in ponovno stehali ter nadomestili izparelo vodo, da se je ohranila želena koncentracija agaroze. Nato smo dodali ustrezen volumen etidijevega bromida, premešali in raztopino vlili v že pripravljen nosilec z glavničkoma.

Etidijev bromid omogoča kasnejšo detekcijo nukleinskih kislin s pomočjo UV svetlobe, saj se vgradi med bazne pare nukleinskih kislin in fluorescira, emitira svetlobo z valovno dolžino 590 nm (33).

Ko je agarozna polimerizirala, smo odstranili glavniček, ki je v gelu izoblikoval žepke za nanos vzorcev, in gel prenesli v elektroforezno kadičko, napolnjeno z elektroforeznim pufrom (1x TBE puffer).

3.5.2 Izvedba elektroforeze

Za izvedbo elektroforeze smo potrebovali:

- elektroforezno kadičko SUB-CELL GT (Bio-Rad, ZDA);
- vir energije PowerPack Junior (Bio-Rad, ZDA);
- barvilo za elektroforezo Blue Orange Loading Dye 6x (Promega, ZDA);
- molekularni označevalec 100 bp DNA Ladder (Promega, ZDA).

V žepke smo nanесли po 12 μ L zmesi vzorca, barvila in vodo po potrebi. Zmes smo pripravili iz:

- volumna vzorca, ki je vseboval 1 μ g izolirane celokupne RNA;
- 2 μ L barvila;
- vode obdelane z DEPC.

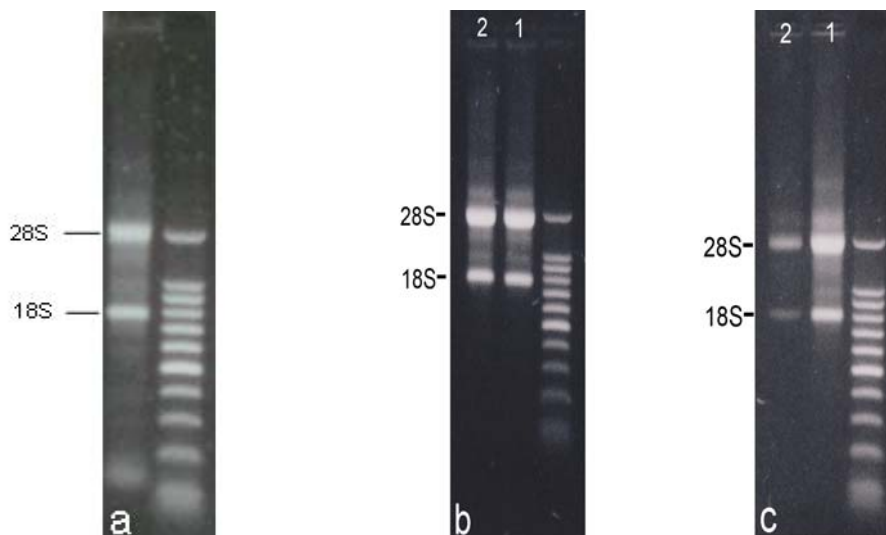
Elektroforeza je potekala pri 100 V 1 h in 30 min.

3.5.3 Detekcija RNA

Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV presvetljevalnikom 2000 (Bio-Rad, ZDA) in gel fotografirali s fotoaparatom Gelcom (Polaroid, VB).

Kvalitetno izolirana celokupna RNA je ključnega pomena za uspešno nadaljnje delo. Izolacija celokupne RNA iz tkiva in primarnih kultur astrocitov gojenih v prisotnosti in odsotnosti 5-HT je bila uspešna. To nam potrjuje fotografija agaroznega gela barvanega z etidijevim bromidom (slika 8), na kateri ni videti genomske DNA.

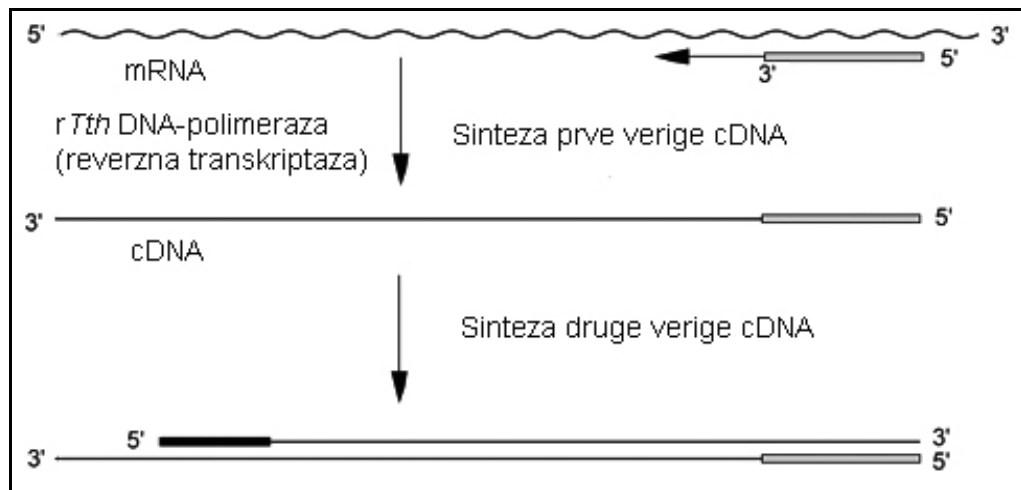
Njena lisa bi se v primeru kontaminacije pojavila v žepku ali nad žepkom v gelu. Pri dobri izolaciji naj bi bila 28S podenota rRNA približno dvakrat intenzivnejša kot 18S podenota, med njima pa naj ne bi bilo izrazitega pasu, ki kaže na razgradnjo RNA.



Slika 8: Celokupna RNA izolirana iz možganske skorje (a) in primarnih kultur astrocitov druge (b) in prve pasaže (c) na agaroznem gelu barvanem z etidijevim bromidom. Astroцитi so bili vzgojeni iz iste regije možganov v odsotnosti (1) in prisotnosti (2) 5-HT. Na sliki sta označeni 28S in 18S podenoti ribosomske RNA (rRNA).

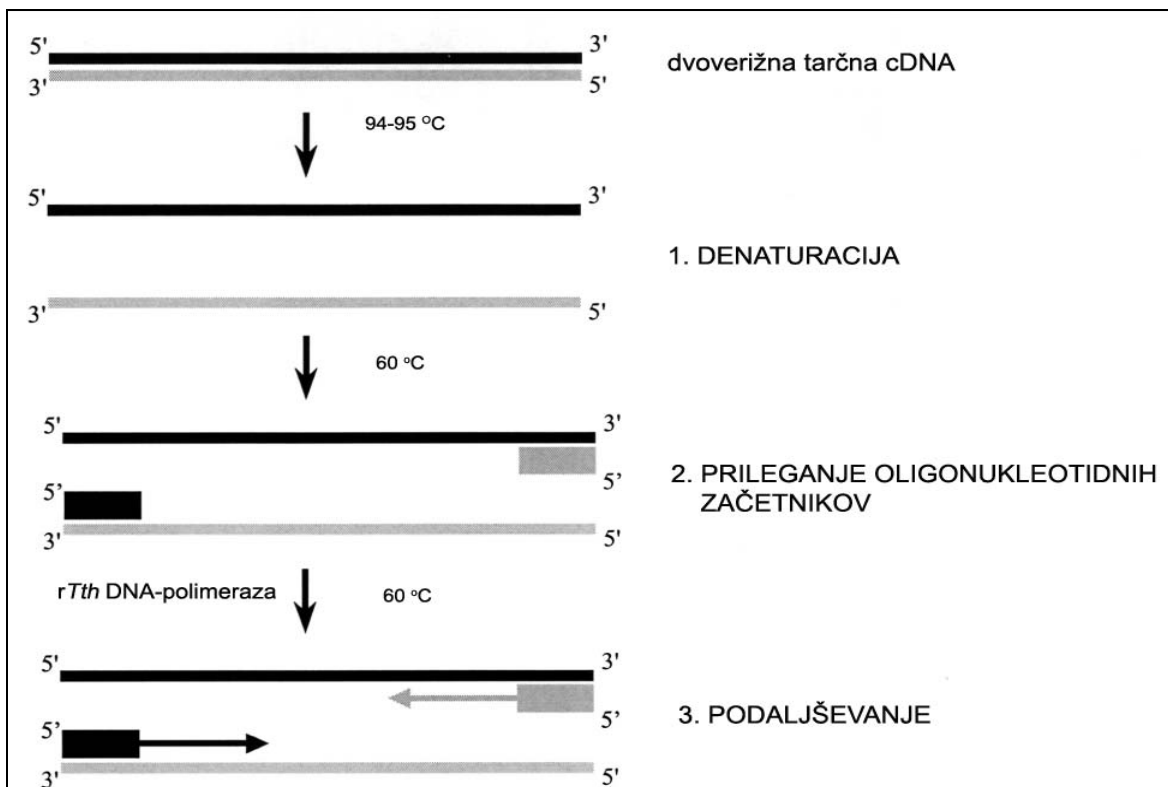
3.6 Reverzna transkripcija s polimerazno verižno reakcijo (RT-PCR)

RT-PCR je občutljiva metoda za detekcijo izražanja genov na nivoju RNA. Sestavljena je iz dveh korakov. Prvega predstavlja reverzna transkripcija (slika 9), kjer se enoverižna RNA s pomočjo encima reverzne transkriptaze prepíše v komplementarno DNA, ki jo nato v drugem koraku pomnožujemo (34).



Slika 9: Reverzna transkripcija (34).

Reakcija pomnoževanja poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja začetnih oligonukleotidov in sinteze komplementarne verige (slika 10).



Slika 10: Princip verižne reakcije s polimerazo (PCR). Stopnje denaturacije, prileganja in podaljševanja sestavljajo en cikel (34).

Za RT-PCR metodo smo z računalniškim programom Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, ZDA) izbrali sestavo oligonukleotidnih začetnikov, sintetizirali pa so jih pri Applied Biosystems, ZDA. Njihova zaporedja in dolžine ustreznih DNA produktov prikazuje preglednica IV.

Preglednica IV: Značilnosti istosmernih (R) in obratnosmernih (F) oligonukleotidnih začetnikov

| Začetna oligonukleotida | Zaporedje (5'→3') | T _m | Velikost produkta v baznih parih (bp) |
|-------------------------|-------------------------|----------------|---------------------------------------|
| 5-HT _{1A} -R | CTCCTTGGCGGTTACTGAT | 55 | 376 |
| 5-HT _{1A} -F | GTAGATGGTGTAGCCGTGGT | 55 | |
| 5-HT _{1B} -R | TGATGCGGTGGACTATTCTG | 57 | 186 |
| 5-HT _{1B} -F | ACCGTGGAGTAGACCGTGTAGA | 59 | |
| 5-HT _{1D} -R | GCATCTCTGTGTCATCGCTCT | 58 | 197 |
| 5-HT _{1D} -F | ATGTGTTACCAGGCAGTCA | 56 | |
| 5-HT _{1F} -R | AGCAATCACAGACGCAGT | 64 | 593 |
| 5-HT _{1F} -F | GCCATTCAGTTCCTCCTT | 64 | |
| 5-HT _{2A} -R | GGCATCGTGTCTTCCTGTT | 57 | 335 |
| 5-HT _{2A} -F | TCAGCATCTTCCTGTGAGTTCT | 57 | |
| 5-HT _{2B} -R | CTCCGAAGTTCAACCATTCAGTC | 61 | 157 |
| 5-HT _{2B} -F | TTGCTTGGCCTCCTCCTCCTC | 61 | |
| 5-HT _{2C} -R | TCCTTCGTGGCATTCTTC | 54 | 429 |
| 5-HT _{2C} -F | ACACACATAGCCAATCCACA | 54 | |
| 5-HT ₃ -R | ATGGCTCTGCTGGTGATAA | 53 | 191 |
| 5-HT ₃ -F | TCAGTCTTGTTGGCTTGG | 52 | |
| 5-HT ₄ -R | GGAACAACATCGGCATAGT | 53 | 429 |
| 5-HT ₄ -F | TGATATAGCCAAGCCAGAGG | 56 | |
| 5-HT _{5A} -R | ATGGCTATCTCGGATGTGCTA | 58 | 344 |
| 5-HT _{5A} -F | CGACTGACCTGGCATTCTTC | 58 | |
| 5-HT _{5B} -R | GACTCCTTGACATAGCCTCTC | 53 | 170 |
| 5-HT _{5B} -F | TACTGAGCCATCTTGACGAC | 53 | |

| | | | |
|----------------------|----------------------|----|-----|
| 5-HT ₆ -R | ATCCTCAACCTCTGCCTCAT | 51 | 316 |
| 5-HT ₆ -F | CTTCCTGCTATGCTTGGTG | 58 | |
| 5-HT ₇ -R | AATCATTGGCTGAGACTGC | 53 | 278 |
| 5-HT ₇ -F | CACTCTTGTGGATGTGGACT | 52 | |
| ciklofilin-R | TGGACCAAACACAAATGGTT | 56 | 161 |
| ciklofilin-F | TGATCTTCTTGCTGGTCTT | 50 | |

Za reverzno transkripcijo s polimerazno verižno reakcijo smo uporabili protokol in komplet reagentov *rTth* DNA Polymerase with Buffer Pack (Applied Biosystems, ZDA).

Reverzno transkripcijo smo izvedli tako, da smo najprej pripravili reakcijsko zmes 1, preračunano za vseh trinajst novih vzorčkov, v katerih smo določali mRNA za posamezni 5-HT receptor (preglednica V).

Preglednica V: Reagenti za pripravo reakcijske zmesi 1 in njihova sestava

| Reagenti | V [μ L] | Sestava |
|---|--------------|--|
| Voda obdelana z DEPC | 6,4 | |
| 10x <i>rTth</i> pufer za reverzno transkripcijo | 2 | 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 900 mM KCl |
| 10 mM MnCl ₂ | 2 | |
| 10 mM raztopina dNTP-jev | 1,6 | dATP, dCTP dGTP, dTTP |
| <i>rTth</i> DNA polimeraza 2,5 U/ μ L | 2 | |

Pufer za reverzno transkripcijo zagotavlja ustrezen pH in ionsko moč za reverzno transkripcijo. Raztopina MnCl₂ je potrebna za optimalno reverzno transkriptazno aktivnost *Thermus thermophilus* (*rTth*) DNA-polimeraze. dNTP-ji predstavljajo gradnike za nove verige DNA. *rTth* DNA-polimeraza pa je ultračista, rekombinantna DNA-polimeraza, ki v prisotnosti Mn²⁺ ionov deluje kot reverzna transkriptaza, v prisotnosti Mg²⁺ ionov pa ima DNA-polimerazno aktivnost.

V trinajst 200 μL epruvet (v vsaki smo določali mRNA za en podtip receptorja) smo odpipetirali:

- 14 μL reakcijske zmesi 1;
- 3 μL raztopine specifičnega istosmernega oligonukleotidnega začetnika (5-HT_{XY}-R), $c = 5 \mu\text{M}$;
- 3 μL vzorca izolirane celokupne RNA, $c = 83 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Vzorec izolirane celokupne RNA smo najprej razredčili z vodo tako, da je koncentracija RNA v njem znašala 83 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Skupni volumen reakcijske mešanice je znašal 20 μL . Vzorce smo premešali na vibracijskem mešalu in izvedli reverzno transkripcijo. Ta je potekala 15 minut pri 70°C v aparatu Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, ZDA).

Po reverzni transkripciji smo za vse vzorce pripravili reakcijsko zmes 2 (preglednica VI).

Preglednica VI: Reagenti za pripravo reakcijske zmesi 2 in njihova sestava

| Reagent | V [μL] | Sestava |
|-------------------------|---------------------|--|
| Voda obdelana z DEPC | 63 | |
| 10x pufer za keliranje | 8 | 50 % (v/v) glicerol 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 1 M KCl 0,5 % (w/v) Tween 20 [®] 7,5 mM EGTA |
| 25 mM MgCl ₂ | 6 | |

Pufer za keliranje veže Mn²⁺ ione in zagotovi ustrezen pH in ionsko moč za PCR pomnoževanje. Raztopina MgCl₂ pa je potrebna za optimalno polimerazno aktivnost *rTh* DNA-polimeraze.

V vsako epruveto smo nato odpipetirali še:

- 77 μL reakcijske zmesi 2;
- 3 μL raztopine obratnosmernega oligonukleotidnega začetnika (5-HT_{XY}-F), $c = 5 \mu\text{M}$.

Končni volumen reakcijske mešanice je znašal 100 μ L. Vzorce smo ponovno premešali na vibracijskem mešalu in v istem aparatu kot prej izvedli reakcijo pomnoževanja.

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili gen za ciklofilin, kot negativne kontrole pa vzorce, pri katerih smo izpustili korak reverzne transkripcije. PCR je potekala pod točno določenimi pogoji (preglednica VII).

Preglednica VII: Pogoji pri verižni reakciji s polimerazo

| Stopnja | Temperatura | Čas | Število ciklov |
|--|-------------|----------|----------------|
| Začetna denaturacija | 95°C | 1 min | |
| Denaturacija | 95°C | 10 s | 35 |
| Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige | 60°C | 15 s | 35 |
| Končno podaljševanje verige | 60°C | 7 min | |
| Končna inkubacija | 4°C | ∞ | |

Z začetno denaturacijo pri 95°C (pred prvim ciklom) smo aktivirali DNA polimerazo, z nadaljnjo denaturacijo pa povzročili razpad dvoverižne DNA na enoverižne molekule. Nato smo temperaturo znižali na 60°C, pri čemer je prišlo do prileganja začetnih oligonukleotidov na posamezni verigi DNA. Temperatura prileganja je odvisna od talitvene temperature (T_m) začetnih oligonukleotidov. Pri 60°C je prišlo tudi do podaljševanja verige, saj je ta temperatura optimalna za delovanje *rTth* DNA-polimeraze. Encim se je vezal na začetni oligonukleotid in v smeri 5' proti 3' izgradil komplementarno verigo DNA. S končnim podaljševanjem verige pa smo dosegli popolno izgradnjo pomnoževanega dvoverižnega odseka DNA.

3.7 Detekcija produktov RT-PCR

3.7.1 Priprava gela

Produkte RT-PCR smo dokazali z agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo pripravili po enakem postopku kot pod točko 3.5.1, le da smo sedaj naredili 2 % gel in zato na začetku v erlenmajerico natehtali 2,0 g agaroze. Namesto 5 μL smo tukaj dodali 2 μL etidijevega bromida, ostale sestavine pa v enaki količini kot prej.

3.7.2 Izvedba elektroforeze

V žepke smo nanесли po 12 μL zmesi sestavljene iz:

- 10 μL raztopine posameznega produkta PCR;
- 2 μL barvila.

Na vsako stran gela pa še znani standard velikosti, sestavljen iz:

- 6 μL označevalca velikosti;
- 2 μL barvila.

Pred nanosom na gel smo pripravljene vzorce za posamezen 5-HT receptor premešali na vibracijskem mešalu. Ločevanje na gelu je potekalo pri napetosti 100 V 1 h in 20 min.

3.7.3 Detekcija DNA

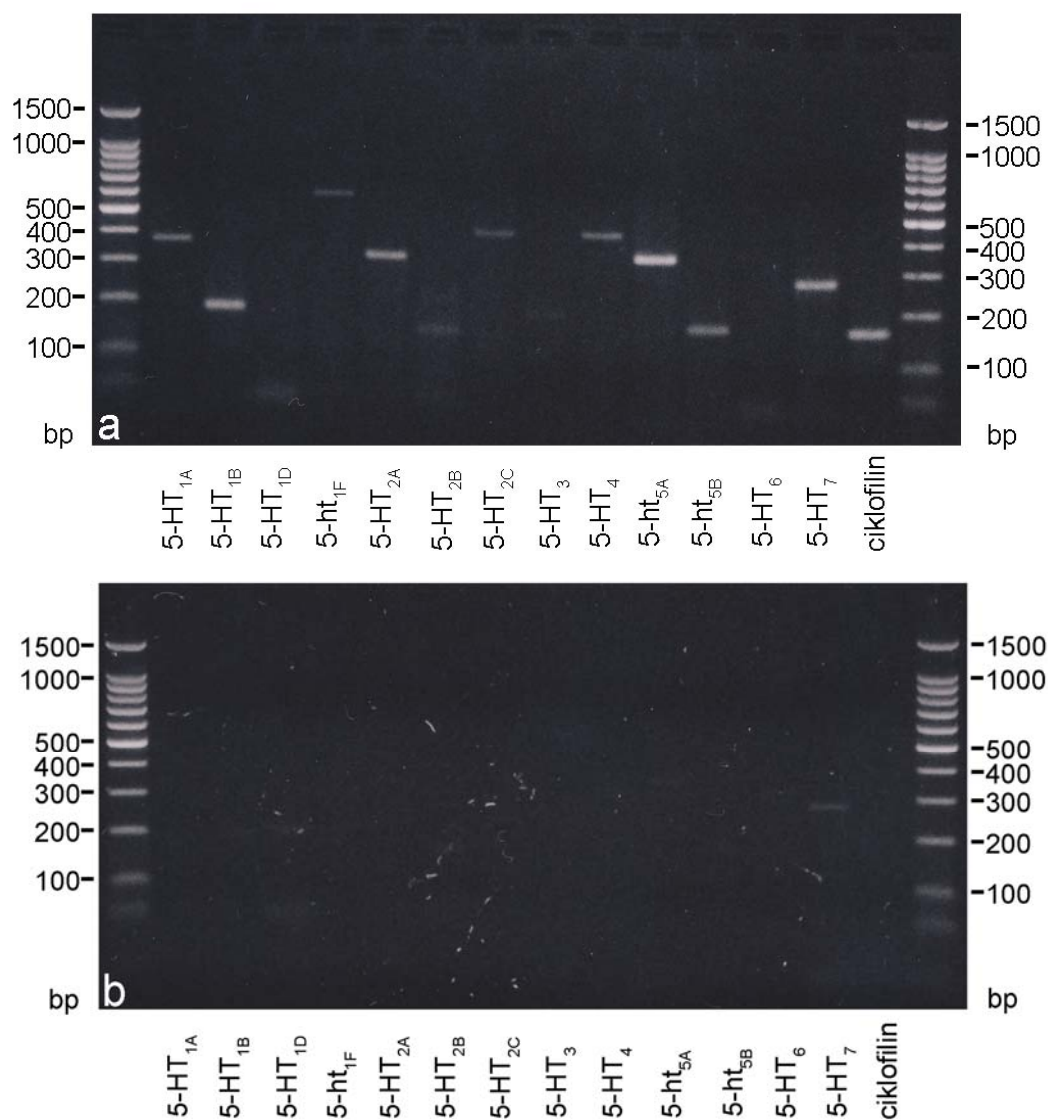
Gel smo nato presvetlili z UV presvetljevalnikom, ki smo ga uporabili že pri detekciji izolirane celokupne RNA. Kot pozitiven rezultat smo opredelili vzorce, pri katerih smo z metodo PCR dobili produkte, ki so po velikosti ustrezali pričakovanim produktom navedenim v preglednici IV. Tako pri tkivu kot pri kulturah astrocitov smo z AGE testirali tudi negativne kontrole.

4 REZULTATI

4.1 Kontrola produktov RT-PCR z AGE

4.1.1 Izražanje 5-HT receptorjev v možganski skorji novorojene podgane

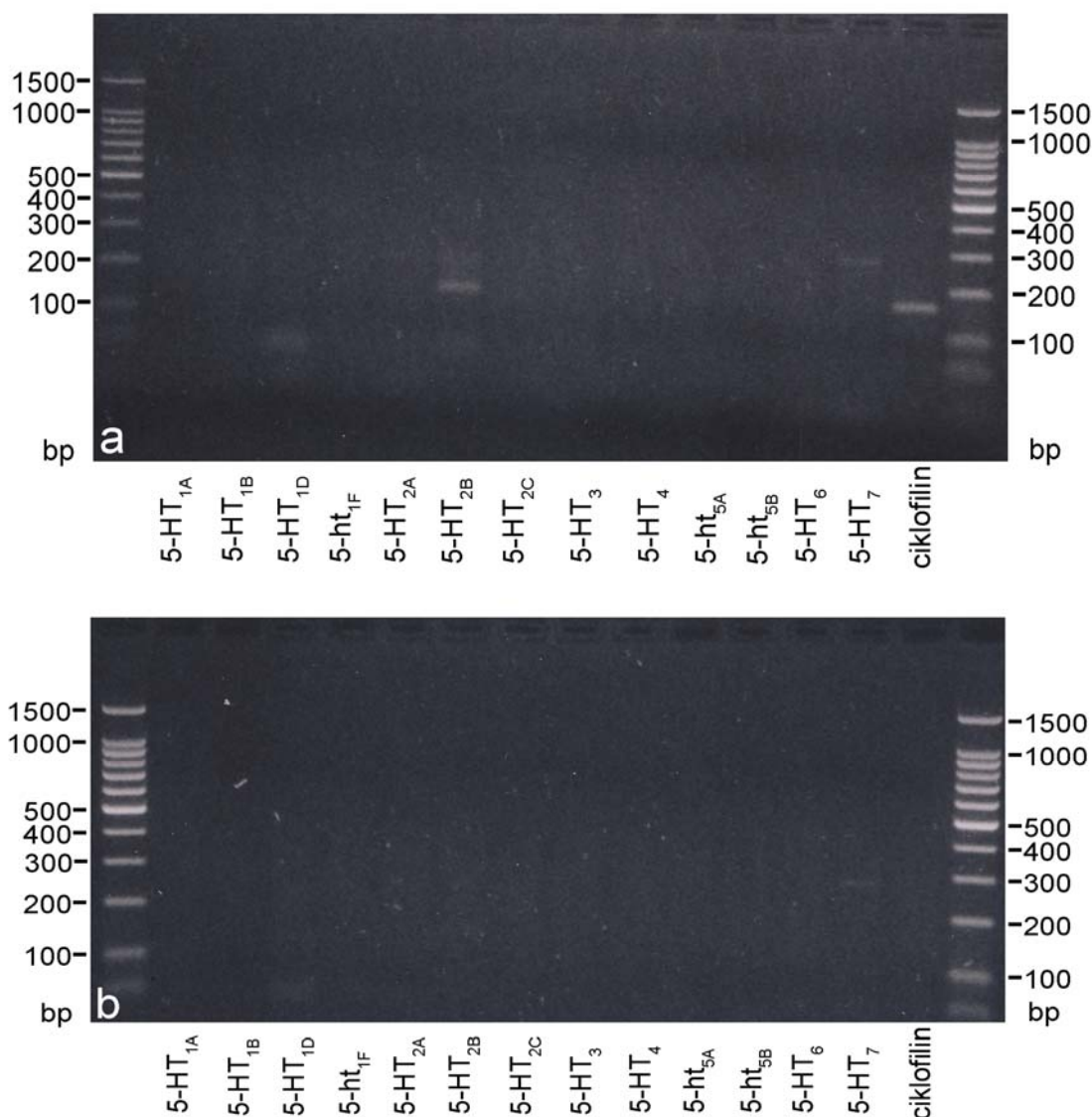
Slika 11a prikazuje vzorec izražanja posameznih podtipov 5-HT receptorjev v možganski skorji novorojene podgane. Ta izraža mRNA za 11 od 13 podtipov 5-HT receptorjev, in sicer za 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B} in 5-HT₇ receptorje. Pri negativnih kontrolah na sliki 12b je vidna lisa le pri 5-HT₇ receptorju.



Slika 11: RT-PCR produkti za posamezne podtipove 5-HT receptorjev (a) in negativne kontrole (b) v možganski skorji novorojenih podgan.

4.1.2 Izražanje 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov druge pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane v odsotnosti 5-HT

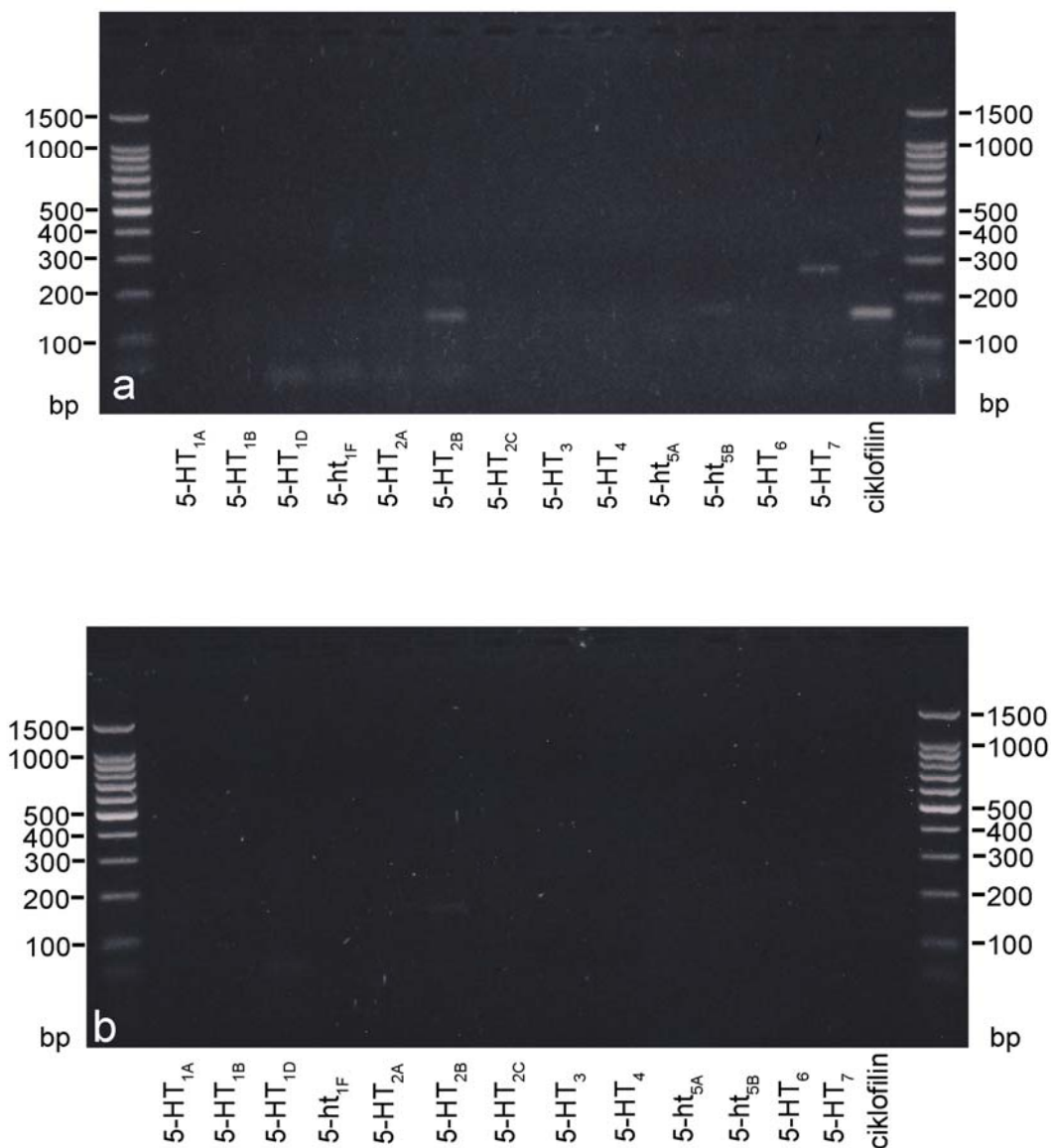
Slika 12a prikazuje izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov druge pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane. Kultura astrocitov izraža mRNA le za 2 od 13 podtipov 5-HT receptorjev, in sicer za 5-HT_{2B} in 5-HT₇ receptor. Pri negativnih kontrolah na sliki 12b je nekoliko vidna lisa le pri 5-HT₇ receptorju.



Slika 12: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev (a) in negativne kontrole (b) v primarni kulturi astrocitov druge pasaže v odsotnosti 5-HT.

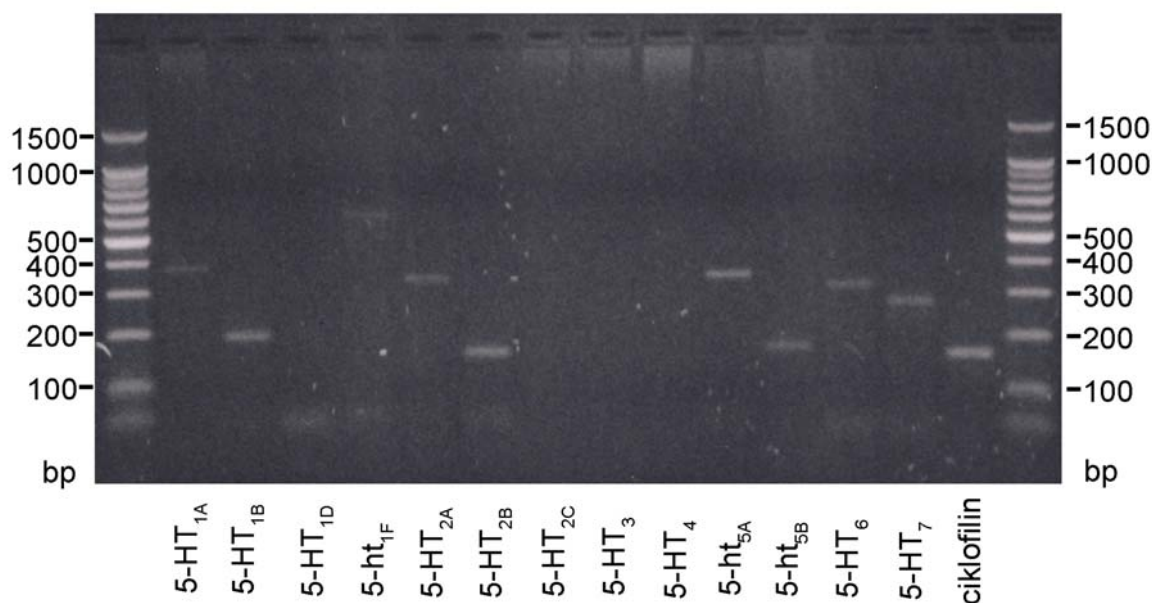
4.1.3 Izražanje 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov druge pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane v prisotnosti 5-HT

Slika 13a prikazuje izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov druge pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane v prisotnosti 5-HT. Kultura astrocitov izraža mRNA za 3 od 13 podtipov 5-HT receptorjev, in sicer za 5-HT_{2B}, 5-HT_{5B} in 5-HT₇ receptorje. Pri negativnih kontrolah na sliki 13b ni vidnih lis.



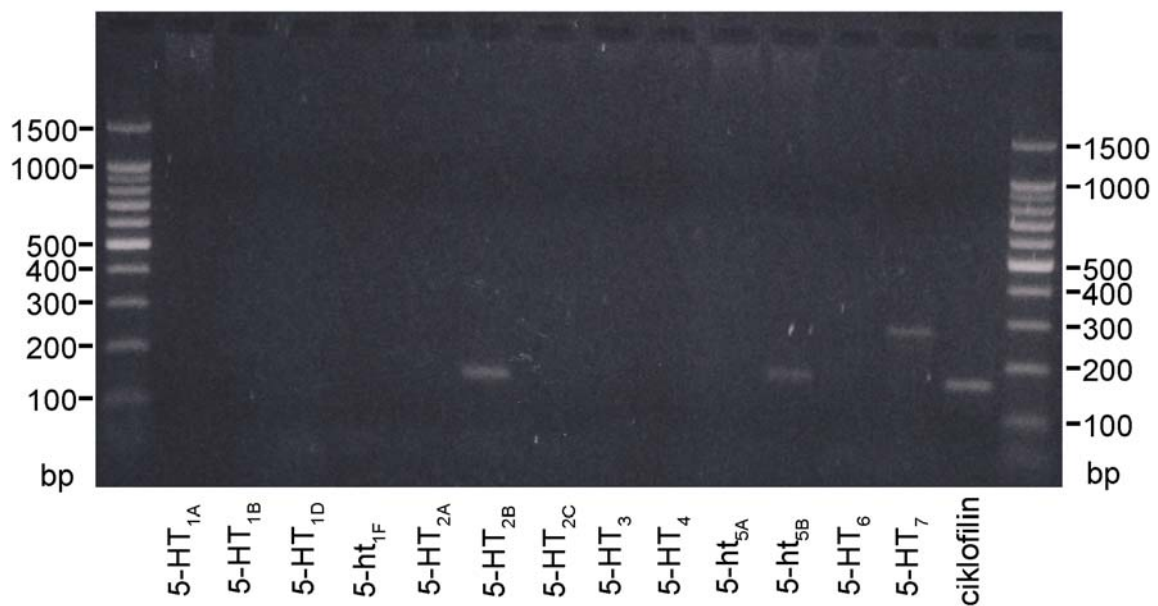
Slika 13: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev (a) in negativne kontrole (b) v primarni kulturi astrocitov druge pasaže v prisotnosti 5-HT.

Slika 14 prikazuje izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov prve pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane. Astroцитi so bili gojeni v običajnem mediju, brez prisotnosti 5-HT. Astroцитi so rastle v kulturi približno 14 dni. Kultura astrocitov izraža mRNA naslednjih podtipov 5-HT receptorjev: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ in 5-HT₇, torej bistveno večje število podtipov kot kultura druge pasaže, ki smo jo gojili 21 dni.



Slika 14: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov prve pasaže v odsotnosti 5-HT.

Slika 15 prikazuje izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov prve pasaže vzgojenih iz možganske skorje novorojene podgane. Astrociti so bili gojeni v prisotnosti 500 nM 5-HT. Kultura astrocitov izraža mRNA le za 5-HT_{2B}, 5-HT_{5B} in 5-HT₇ receptorje.



Slika 15: RT-PCR produkti za posamezne podtipe 5-HT receptorjev v primarni kulturi astrocitov prve pasaže v prisotnosti 5-HT.

Tudi pri kulturah astrocitov prve pasaže smo izvedli negativne kontrole, le-te so bile brez posebnosti, zato jih nismo navedli.

5 RAZPRAVA

Več raziskovalnih skupin se je že ukvarjalo z ugotavljanjem izražanja podtipov 5-HT receptorjev v osrednjem živčevju pri različnih živalskih vrstah (11), vendar se rezultati teh študij pogosto ne skladajo. Pomanjkljivost vseh do sedaj objavljenih študij s področja izražanja 5-HT receptorjev pri podganah je v tem, da niso proučevali vseh podtipov 5-HT receptorjev naenkrat, da so uporabljali različne metode, da so uporabili različne seve podgan (npr. podgane seva Sprague Dawley, podgane seva Wistar) ter da so proučevali izražanje podtipov 5-HT receptorjev pri različno starih podganah. Spol podgan je bil včasih naveden, včasih pa ne.

Zaradi zgornjih pomanjkljivosti smo se v naši raziskavi odločili za bolj sistematičen pristop. Odločili smo se, da bomo proučili izražanje vseh do januarja 2008 znanih podtipov 5-HT receptorjev pri podgani. Ker je bila sekvenca za 5-HT_{3A} receptor pri podgani znana šele marca 2008 (35), tega v naši raziskavi nismo preverjali. Pri raziskavi smo uporabili novorojene (3 dni stare) podgane seva Wistar obeh spolov. Osredotočili smo se le na področje možganske skorje, iz katere smo vzgajali tudi primarni kulturi astrocitov v prisotnosti in odsotnosti 5-HT. Tako smo primerjali izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev v tkivu in v kulturi astrocitov. Poleg tega pa smo ugotavljali tudi vpliv 5-HT na izražanje 5-HT receptorjev v sami kulturi astrocitov.

Izražanje 5-HT receptorjev smo želeli proučevati v razvojni fazi. Razvojna faza za osrednje živčevje pri podganah traja do 8. dneva po rojstvu. V razvojni fazi se astrociti bistveno hitreje delijo ter sintetizirajo tudi večje količine nevrotrofičnih dejavnikov, npr. živčnega rastnega faktorja. Živčne celice v razvojni fazi pa se bistveno hitreje regenerirajo, če pride do možganske poškodbe (31). 5-HT med razvojem možganov ne deluje le kot prenašalec v osrednjem živčevju, ampak ima tudi vlogo nevrotrofičnega dejavnika, ki jo posredujejo receptorji 5-HT_{1A} (36). V tem obdobju življenja bi se moralo izražati največ podtipov 5-HT receptorjev.

Drugi razlog za uporabo tri dni starih podgan je bolj praktičen. Pri starosti treh dni lahko s prostim očesom ločimo posamezne strukture v možganih podgane in ni potrebna disekcija z uporabo mikroskopa. Tako lahko enostavno ločimo možgansko skorjo od preostalih možganskih struktur, npr. od hipokampusa, striatuma ...

5.1 Primerjava izražanja 5-HT receptorjev v tkivu in kulturi

Ugotovili smo, da tkivo (možganska skorja novorojenih podgan) izraža več različnih podtipov 5-HT receptorjev kot primarna kultura astrocitov, vzgojenih iz istega tkiva. Možganska skorja izraža mRNA za 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B} in 5-HT₇ receptorje. To smo tudi pričakovali, saj tkivo možganske skorje sestavlja več vrst različnih celic. Poleg živčnih celic so v tkivu možganske skorje tri dni starih podgan prisotni tudi astrociti in ostale celice glije (oligodendrociti in mikroglia), endotelijske celice ter progenitorske celice itd., ki jih v kulturi astrocitov prve in druge pasaže ni. Celice v tkivu sestavljajo t.i. funkcionalno enoto. Medsebojno so povezane tako strukturno kot funkcionalno. Astrociti sproščajo različne humoralne in trofične dejavnike, ki so nujni za razvoj in diferenciacijo celic, pa tudi za vzdrževanje sinaptične plastičnosti nevronov (31).

Imunohistokemično barvanje celic je pokazalo, da kulturo astrocitov sestavljajo v 95 % - 99 % astrociti tipa 1, preostale celice pa so ali progenitorske celice ali mikroglia (37). Zaradi prisotnosti ene same vrste celic ter zaradi omejenega prostora, kjer se delijo in rastejo, celice gojene v kulturi po določenem času najverjetneje preidejo v »fazo mirovanja«, v kateri je izražanje mnogih proteinov zmanjšano ali celo zaustavljeno. Prav tako v čisti kulturi astrocitov ni nevrotransmiterjev, ki bi lahko vplivali na izražanje določenih receptorjev. Kultura astrocitov torej ne odraža stanja v razmerah *in vivo*, kar se odraža tudi s prisotnostjo mRNA za 5-HT receptorje.

Če astrocite v kulturi gojimo 21 dni in jih vmes dvakrat presadimo, ti izražajo mRNA le za HT_{2B} in 5-HT₇ receptor. Če pa astrocite gojimo le 14 dni, izražajo mRNA za 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ in 5-HT₇ receptorje, kar je delno skladno z rezultati, ki jih je dobil Hirst s sodelavci (38).

Hirst je v svoji raziskavi ugotovil, da kultura astrocitov iz možganske skorje novorojenih podgan seva Sprague Dawley izraža mRNA za vse podtipe 5-HT receptorjev, razen za 5-HT₄ in 5-HT_{5A}, izražanja 5-HT₃ receptorja pa ni preskušal (38).

Po pričakovanih astrociti gojeni v kulturi 14 dni izražajo večino podtipov 5-HT receptorjev, ki jih najdemo tudi v možganskem tkivu. Astrociti ne izražajo mRNA za 5-HT_{2C}, 5-HT₃ in 5-HT₄ receptorje. Predvidevamo, da se mRNA za te podtipe 5-HT receptorjev nahaja v živčnih celicah možganske skorje. Presentljivo pa astrociti gojeni v kulturi izražajo mRNA za podtip serotoinskega receptorja 5-HT₆. Izražanje tega podtipa je lahko posledica dozorevanja astrocitov v kulturah, kajti izražanje mRNA za ta receptorski podtip so našli le v astrocitih pripravljenih iz možganske skorje odraslih podgan, ne pa tudi novorojenih podgan (37), ali pa je to odraz vpliva rasti v razmerah »in vitro«.

5.2 Vpliv časa na izražanje 5-HT receptorjev v kulturi

V kulturi astrocitov druge pasaže, ki smo jih gojili 21 dni v odsotnosti 5-HT, smo uspeli dokazati mRNA le za dva 5-HT receptorja, medtem ko smo jih v kulturi prve pasaže dokazali 9. Ugotovili smo, da čas gojenja astrocitov v kulturi pomembno vpliva na izražanje 5-HT receptorjev. Zaključimo lahko, da je optimalni čas gojenja astrocitov v kulturi za študij 5-HT receptorjev do 14 dni.

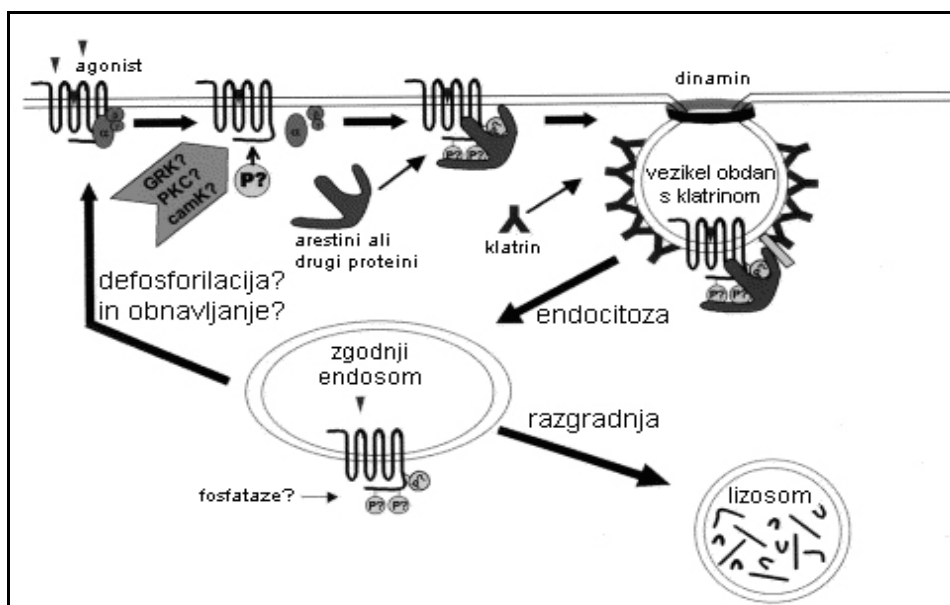
5.3 Vpliv serotonina na izražanje 5-HT receptorjev v kulturi

Ker do sedaj še nismo naleteli na študijo, ki bi proučevala vpliv serotonina na izražanje 5-HT receptorjev v kulturi, smo polovico celic v kulturah zadnjih 7 dni gojili v prisotnosti 500 nM serotonina, kar je malo manj od fiziološko ugotovljene koncentracije 5-HT v možganih, ki znaša 2-3 $\mu\text{mol/L}$.

Ugotovili smo, da 5-HT pomembno vpliva na izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev. V kulturi astrocitov, ki smo jo gojili v prisotnosti 5-HT, smo ne glede na predhodni čas gojenja našli mRNA le za 5-HT_{2B}, 5-HT_{5B} in 5-HT₇ receptor. Ugotavljamo, da prisotnost 5-HT zavre izražanje mRNA za 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A}, in 5-HT₆ receptorje.

Iz tega lahko sklepamo, da 5-HT zavre izražanje nekaterih podtipov 5-HT receptorjev ter ohranja izražanje podtipa 5-HT_{5B}. S tem smo potrdili hipotezo, da gojenje astrocitov ob prisotnosti 5-HT vpliva na izražanje 5-HT receptorjev.

Izražanje 5-HT receptorjev se lahko zmanjša zaradi različnih vzrokov. Ko so proučevali vpliv agonistov na izražanje 5-HT_{2A} receptorjev na nivoju proteinov, so ugotovili, da se pri daljši izpostavljenosti receptorja agonistu zmanjša občutljivost receptorja za učinek agonista oz. pride do desenzitizacije receptorja. Daljša ali ponavljajoča aktivacija receptorja z agonistom lahko privede tudi do regulatornega zmanjšanja števila receptorjev oz. angleško »down regulation« (2), ki je posledica najprej interanalizacije receptorjev. Stalna interakcija receptorja z agonistom ima za posledico konformacijsko spremembo receptorja. Če draženje z agonistom vztraja, pride do t.i. internalizacije receptorja. Proces internalizacije receptorjev še ni popolnoma pojasnjen. Predvideva se, da naj bi različne kinaze receptor fosforilirale, s pomočjo posebnih proteinov arestinov, dinamina in klatrinov pa naj bi se tvoril vezikel, ki se zlije z endosomi, kjer se receptor s fosfatazami defosforilira in vrne nazaj v plazemsko membrano, ali pa se v lizosomu razgradi (slika 16). Lizosomska razgradnja receptorjev pa naj ne bi bila edini možni vzrok za zmanjšanje števila receptorjev. Domneva se, da naj bi pomembno vlogo igrale tudi spremembe v stabilnosti mRNA, regulacija transkripcije ali translacije genov in proteoliza, ki nastane neposredno na celični površini (39).



Slika 16: Shematski prikaz procesov v celici, ki lahko vodijo do regulatornega zmanjšanja števila 5-HT receptorjev (39).

5.4 Kritična analiza poskusov

Pri nekaterih 5-HT receptorjih se je pojavila lisa na agaroznem gelu tudi pri negativnih kontrolah. Te smo izvedli zato, da smo se prepričali, ali je vzorec čist, brez primesi DNA. Pri negativnih kontrolah namreč nismo izvajali reverzne transkripcije, torej se mRNA ni prepisala v cDNA, ta pa se posledično ni mogla pomnoževati. Na agaroznem gelu negativnih kontrol se zato lisa za posamezen receptor naj ne bi pojavila. V primeru, da je do pojava lise prišlo, kot se je to zgodilo npr. pri 5-HT₇ receptorju, lahko sklepamo na prisotnost genomske DNA v vzorcu. Možno bi bilo, da bi med RT-PCR reakcijo pomnožili segment z intronom. Introni so nekodirajoči odseki DNA znotraj določenega gena, ki ločujejo eksone. Introni se skupaj z eksoni prepisejo v primarni prepis RNA (imenovan tudi pre-mRNA ali heterogena jedrna mRNA), vendar se kasneje izrežejo, še preden mRNA zapusti jedro. Zrela mRNA, ki je na voljo za prevajanje na ribosomih, vsebuje le še eksonske predele, torej odseke, ki kodirajo aminokislinsko sestavo beljakovine. V primeru pomnožitve segmenta z intronom, bi dobili RT-PCR produkt, ki je po velikosti bp večji od pričakovanega. Ker velikost produkta v bp ustreza predpisani, je malo verjetno, da bi šlo za pomnoževanje DNA, pa tudi slika RNA na agaroznem gelu kaže na čistost vzorca. Lahko bi z DNA bila onečiščena ena od raztopin obeh oligonukleotidnih začetnikov za ta receptor. Onečiščenje ostalih reagentov je manj verjetno, saj smo jih uporabljali pri vseh 5-HT receptorjih in bi se zato morale v tem primeru lise pojaviti tudi pri drugih receptorjih. Ker dela nismo opravljali v komori z laminarnim pretokom zraka, obstaja možnost kontaminacije vzorčka med delom. Kontaminacija vzorca z materialom, ki smo ga uporabljali pri delu, kot so nastavki za pipete, mikrocentrifugirke, epruvete itd., je malo verjetna, saj smo ga predhodno avtoklavirali. Lahko pa, da je bil vzorec čist in je lisa posledica delovanja encima, ki smo ga uporabili pri RT-PCR. Obstaja namreč možnost, da encim DNA-polimeraza med PCR reakcijo, torej med pomnoževanjem, deluje sočasno tudi kot reverzna transkriptaza, zato se med PCR nekaj mRNA kljub temu prepise v cDNA, ki se nadalje pomnoži (40). Temu bi se lahko izognili tako, da bi vzorce za posamezen 5-HT receptor po reverzni transkripciji inkubirali z RNazo pri 37°C 30 min. To bi preprečilo morebiten nastanek cDNA iz mRNA med PCR reakcijo.

Pri vrednotenju rezultatov je pomembno, da se zavedamo tudi omejitev RT-PCR metode. Povsem mogoče je, da mRNA za katerega od receptorjev nismo zaznali zaradi njene zelo nizke koncentracije, ki je pod limbo detekcije našega aparata. Ta problem bi rešili z uporabo kvantitativne PCR metode. Ta metoda je občutljivejša, omogoča pa tudi merjenje koncentracije nukleinskih kislin v preiskovanem vzorcu.

Z metodo PCR smo sicer precej enostavno določili prisotnost informacijske RNA za posamezne receptorje, vendar pa se rezultati teh poskusov velikokrat ne ujemajo z rezultati študij, ki dokazujejo receptorje v membrani. Informacijska RNA je namreč prisotna v aksoplazmi živčne celice, receptorji pa, v kolikor ne gre za somatodendritične, so navadno zasidrani v membrano lahko precej oddaljenega terminalnega dela živčne celice, celo v drugi regiji možganov. Tako ostaja ena od možnosti kombinacija uporabe metode PCR in imunohistokemije. S prvo bi dognali, kje (in kdaj) se gen za posamezen receptor izraža, pri drugi pa bi specifična protitelesa proti 5-HT receptorjem natančno pokazala prisotnost in lokacijo receptorskih beljakovin. Korak naprej bi bila dvojna ali trojna imunohistokemija, pri čemer bi poleg protiteles proti receptorju uporabili še eno ali dve vrsti protiteles proti beljakovinom, značilnih za določeno vrsto celic. Pri astrocitih je to GFAP, pri nevronih pa nevronska specifična enolaza. Tako bi povsem natančno opredelili lokacijo receptorjev na posameznih vrstah celic. Za takšen izbor metod se je smotno odločiti zato, ker je imunohistokemija zelo specifična, molekularno biološke metode pa pridejo v poštev zaradi nezmožnosti izvedbe farmakoloških študij. Selektivnih ligandov za večino podtipov serotoninskih receptorjev, predvsem antagonistov, ki bi omogočili izvedbo vezavnih študij in ugotavljanje farmakoloških lastnosti receptorjev, namreč še ne poznamo.

6 SKLEP

V raziskavi smo ugotavljali, kakšen je vzorec izražanja posameznih podtipov 5-HT receptorjev v možganski skorji ter v primarnih kulturah astrocitov vzgojenih iz iste regije možganov pri novorojenih (3 dni starih) podganah seva Wistar obeh spolov. Astroците smo gojili 14 dni (1. pasaža) in 21 dni (2. pasaža) v običajnem mediju in v mediju ki je vseboval 500 nM serotonina.

Potrdili smo dve in ovrgli eno izmed zastavljenih hipotez.

1. Ugotovili smo, da primarna kultura astrocitov izraža manj različnih podtipov 5-HT receptorjev kot tkivo, iz katerega kultura izvira.
2. Izjemo predstavlja izražanje mRNA za 5-HT₆ receptor, ki ga najdemo v prvi pasaži astrocitne kulture, v tkivu možganske skorje pa ne. Izražanje je lahko posledica dozorevanja astrocitov v kulturi ali odsev rasti v razmerah »*in vitro*«.
3. Ugotovili smo tudi, da prisotnost 5-HT različno vpliva na izražanje 5-HT receptorjev v kulturah astrocitov. Če gojimo v prisotnosti 5-HT astrocite prve pasaže, se izražanje mRNA za nekatere podtipove 5-HT receptojev zmanjša. Če pa v prisotnosti 5-HT gojimo astrocite druge pasaže, le-ti poleg mRNA za 5-HT_{2B} in 5-HT₇ izražajo še mRNA za 5-HT_{5B}.
4. Čas gojenja astrocitov v kulturi vpliva na izražanje posameznih podtipov 5-HT receptorjev. Optimalen čas gojenja astrocitov za izražanje mRNA serotoninskih receptojev je 14 dni.
5. Za boljše vrednotenje rezultatov bi bilo smiselno namesto konvencionalne PCR metode izvesti kvantitativno PCR. Dobro pa bi bilo uporabiti tudi katere od drugih že uveljavljenih metod za dokazovanje receptorjev, kot je npr. imunohistokemija. Na ta način bi dobili relevantnejše in pomenljivejše rezultate.

7 LITERATURA

1. Siegel GJ, Agranoff BW, Fisher SK, Albers RW, Uhler MD: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 7th Ed, Elsevier Academic, Burlington, 2006: 227-47.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Pharmacology, 5th Ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 126-33, 184-92, 480-2.
3. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10 th Ed., McGraw-Hill, New York, 2001: 269-88.
4. Španinger K, Fink M: Cirkadiani ritem in kronomedicina. Farm vest 2007; 58: 3-7.
5. Zupančič D, Jezernik K: Melatonin in njegovi celično-molekularni učinki. Med razgl 2007; 46: 67-74.
6. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH: The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 7th Ed, Oxford University Press, New York, 1996: 352-91.
7. Williams DA, Lemke TL: Foye's principles of medicinal chemistry, 5th Ed, Williams & Wilkins, Baltimore, 2002: 315-33.
8. Zill P: Single nukleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. Biol Psych 2004; 56: 581-6.
9. Aghajanian GK, Sanders-Bush E: Serotonin. Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress 2002: 15-28.
10. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR: Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol Biochem Behav 2002; 71: 533-54.
11. Barnes NM, Sharp T: A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology 1999; 38: 1083-152.
12. Freire-Garabal M, Nunez MJ, Balboa J, Lopez-Delgado P, Garcia-Caballero T, Fernandez-Roel MD, Brenlla J, Rey-Mendez M: Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors. Br J Pharmacol 2003, 139: 457-63.
13. Huang YY: Relationship of psychopathology to the human serotonin 1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. Neuropsychopharmacology 1999; 21: 238-46.
14. Gingrich JA, Hen R: Dissecting the role of serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. Psychopharmacology 2001; 155: 1-10.

15. Halford JC, Harrold JA, Boyland EJ, Lawton CL, Blundell JE: Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 2007; 67: 27-55.
16. Jones BJ, Blackburn TP: The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 555-68.
17. Villalón CM, Centurín D, Valdivia LF, Vries P, Saxena PR: Migraine: Pathophysiology, Pharmacology, Treatment and Future Trends. *Curr Vasc Pharmacol* 2003; 1: 71-84.
18. Pauwels PJ, John GW: Present and future of 5-HT agonists as antimigraine drugs. *Clin Neuropharmacol* 1999; 22: 123-36.
19. Van de Kar LD, Javed A, Zhang Y, Serres F, Rapp DK, Gray TS: 5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J Neurosci* 2001; 21: 3572-9.
20. Egan CT, Herrick-Davis K, Miller K, Glennon RA, Teitler M: Agonist activity of LSD and lisuride at cloned 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Psychopharmacology* 1998; 136: 409-14.
21. Giorgetti M, Teccot LH: Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur J Pharmacol* 2004; 488:1-9.
22. Pandey GN, Dwivedi Y, Ren X, Rizavi HS, Faludi G, Sarosi A, Palkovits M: Regional distribution and relative abundance of serotonin(2c) receptors in human brain: effect of suicide. *Neurochem Res* 2006; 31: 167-76.
23. Bubar MJ, Cunningham KA: Distribution of serotonin 5-HT(2C) receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2007;146: 286-97.
24. Bickerdike MJ: 5-HT_{2C} receptor agonists as potential drugs for the treatment of obesity. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 885-97.
25. Ramamoorthy R, Radhakrishnan M, Borah M: Antidepressant-like effects of serotonin type-3 antagonist, ondansetron: an investigation in behaviour-based rodent models. *Behav Pharmacol* 2008; 19: 29-40.
26. Ago Y, Nakamura S, Baba A, Matsuda T: Neuropsychotoxicity of abused drugs: effects of serotonin receptor ligands on methamphetamine-and cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *J Pharmacol Sci* 2008; 106: 15-21.

27. Darblade B, Behr-Roussel D, Gorny D, Lebret T, Benoit G, Hieble JP, Brooks D, Alexandre L, Giuliano F: Piboserod (SB 207266), a selective 5-HT₄ receptor antagonist, reduces serotonin potentiation of neurally-mediated contractile responses of human detrusor muscle. *World J Urol* 2005; 23: 147-51.
28. Moskwa A, Boznanska P: Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Wiad Lek* 2007; 60: 371-6.
29. Branchek TA, Blackburn TP: 5-HT₆ receptors as emerging targets for drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 319-34.
30. Mnie-Filali O, Lambas-Senas L, Zimmer L, Haddjeri N: 5-HT₇ receptor antagonists as a new class of antidepressants. *Drug News Perspect* 2007; 20: 613-8.
31. Kržan M: Funkcija astrocitov. *Zdr vest* 2001; 70:553-9.
32. Schwartz JP, Wilson DJ: Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum. *Glia* 1992; 5:75-80.
33. Kuhelj R: Biokemija v praksi: načela in tehnike, 3.izdaja, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2003: 79-100.
34. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm vest* 2004; 55:215-20.
35. Podatkovna baza: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
36. Whitaker-azmitia PM, Azmitia EC: Astroglial 5-HT_{1A} receptors and S-100 beta in development and plasticity. *Perspect Dev Neurobiol* 1994; 2: 233-8.
37. Krzan M, Wu VW, Schwartz JP: Serotonin regulation of nerve growth factor synthesis in neonatal and adult astrocytes: comparison to the beta-adrenergic agonist isoproterenol. *J Neurosci Res* 2001; 64: 261-7.
38. Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP: Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT₁ receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 61: 90-9.
39. Gray YA, Roth BL: Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 2001;56: 441-51.
40. Martel F, Grundemann D, Schomig E: A simple method for elimination of false positive results in RT-PCR. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 248-50.