



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Erjavec, Igor (2014) *Utjecaj serotoninemije na metabolizam koštane pregradnje [Effect of serotoninemia on bone remodeling metabolism].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2171>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Igor Erjavec**

**Utjecaj serotoninemije na  
metabolizam koštane pregradnje**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2014.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Igor Erjavec**

**Utjecaj serotoninemije na  
metabolizam koštane pregradnje**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2014.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Lovorka Grgurević

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Lovorki Grgurević na stručnom vodstvu i korisnim savjetima prilikom izrade i pisanja doktorske disertacije

Zahvaljujem prof. dr. sc. Slobodanu Vukičeviću na stručnim savjetima i sugestijama prilikom izrade disertacije.

Također zahvaljujem dr. sc. Lipi Čičin-Šain i svim članovima Laboratorija za neurokemiju i molekularnu neurobilologiju Instituta „Ruđer Bošković“ na suradnji i pomoći oko pokusa u sklopu disertacije.

Veliko hvala dr. sc. Tatjani Nikšić-Bordukalo na pomoći u pokusima prilikom izrade disertacije, kao i svim članovima Laboratorija za mineralizirana tkiva na pomoći i savjetima.

Mojoj obitelji, posebice roditeljima, Ani i Vladimiru, zahvaljujem što su uvijek bili uz mene.

Posebno hvala Gogi na velikom razumjevanju, nesebičnoj podršci, strpljenju i pomoći pri pisanju disertacije.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. KOŠTANO TKIVO.....	1
1.1.2. STRUKTURA KOSTI.....	1
1.1.3. IZVANSTANIČNI MATRIKS.....	2
1.1.4. MINERALNI DIO KOŠTANOG TKIVA .....	4
1.1.5. MORFOLOGIJA KOŠTANOG TKIVA .....	5
1.1.6. STRUKTURA I FUNKCIJA KOŠTANIH STANICA.....	6
1.1.7. KOŠTANA PREGRADNJA .....	8
1.1.8. HORMONALNA REGULACIJA KOŠTANOG SUSTAVA .....	10
1.1.9. BIOMEHANIKA KOSTI .....	13
1.2. SEROTONIN .....	14
1.2.1. BIOSINTEZA SEROTONINA.....	15
1.2.2. POHRANA SEROTONINA .....	16
1.2.3. TROMBOCITI.....	16
1.2.4. UNOS I POHRANA SEROTONINA U TROMBOCITE .....	17
1.2.5. SEROTONINSKI PRIJENOSNIK (5-HTT).....	18
1.2.6. OTPUŠTANJE SEROTONINA IZ TROMBOCITA.....	18
1.2.7. SEROTONINSKI RECEPTORI.....	19
1.3. UTJECAJ SEROTONINA NA KOŠTANO TKIVO .....	20
1.4. SVRHA RADA.....	21
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	22
3.1. OPĆI CILJ.....	22
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI.....	22
4. MATERIJALI I METODE.....	23
4.1. ŽIVOTINJE .....	23
4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA .....	24
4.3. MIKRO-KOMPJUTERIZIRANA TOMOGRAFIJA.....	24
4.3.1. SNIMANJE KOŠTANOG TKIVA.....	26
4.3.2. SNIMANJE MASNOG TKIVA .....	27
4.4. ANALIZA PODATAKA MIKRO CT SNIMANJA.....	28
4.4.1. PERIFERNI KOSTUR.....	28
4.4.2. AKSIJALNI KOSTUR.....	29
4.4.3. MASNO TKIVO .....	30
4.5. DENZITOMETRIJA.....	31

4.6. CIJELJENJE PRIJELOMA .....	32
4.7. DINAMIČKA HISTOMORFOMETRIJA .....	32
4.8. BIOMEHANIČKO TESTIRANJE KOSTI .....	33
4.9. HORMONALNI STATUS WZ-5HT ŠTAKORA .....	36
4.10. BIOKEMIJSKI PROFIL WZ-5HT ŠTAKORA .....	37
4.11. TEST OPTEREĆENJA GLUKOZOM I INZULINOM .....	37
4.11.1. TEST OPTEREĆENJA GLUKOZOM .....	38
4.11.2. TEST OPTEREĆENJA INZULINOM .....	38
4.12. STANIČNA KULTURA .....	38
4.12.1. PRIMARNA KULTURA OSTEOLASTA .....	38
4.12.2. TRETMAN OSTEOLASTA .....	39
4.12.3. PRIMARNA KULTURA OSTEOKLASTA .....	39
4.12.4. TRETMAN OSTEOKLASTA .....	39
4.13. IZOLACIJA UKUPNE RNA IZ STANICA .....	40
4.14. PREVOĐENJE RNA U KOMPLEMENTARNU DNA .....	40
4.15. ANALIZA IZRAŽAJA GENA .....	41
4.16. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	44
5. REZULTATI .....	45
5.1. FENOTIPSKA OBILJEŽJA .....	45
5.2. KOŠTANA MINERALNA GUSTOĆA .....	46
5.3. UTJECAJ SEROTONINA NA KORTIKALNU KOST .....	47
5.4. UTJECAJ SEROTONINA NA TRABEKULARNU KOST PERIFERNOG KOSTURA ..	49
5.5. UTJECAJ SEROTONINA NA TRABEKULARNU KOST AKSIJALNOG KOSTURA ...	53
5.6. BIOMEHANIČKA SVOJSTVA BEDRENE KOSTI WZ-5HT ŠTAKORA .....	57
5.6.1. TEST UVIJANJA U 3 TOČKE .....	57
5.6.2. TEST UDUBLJENJA .....	57
5.7. UTJECAJ SEROTONINA NA CIJELJENJE PRIJELOMA .....	58
5.8. KOŠTANA PREGRADNJA U WZ-5HT ŠTAKORA .....	60
5.9. HORMONALNI STATUS WZ-5HT ŠTAKORA .....	62
5.10. BIOKEMIJSKI PROFIL WZ-5HT ŠTAKORA .....	64
5.11. GLUKOZNI METABOLIZAM U WZ-5HT ŠTAKORA .....	67
5.12. MASNO TKIVO U WZ-5HT ŠTAKORA .....	70
5.13. IZRAŽAJ GENA U OSTEOLASTA WZ-5HT ŠTAKORA .....	71
5.13.1. UČINAK SEROTONINA I INZULINA NA MARKERE DIFERENCIJACIJE OSTEOLASTA .....	71
5.14. IZRAŽAJ GENA U OSTEOKLASTA WZ-5HT ŠTAKORA .....	72

5.14.1. UČINAK SEROTONINA I INZULINA NA MARKERE DIFERENCIJACIJE OSTEOKLASTA.....	73
6. RASPRAVA.....	74
6.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKU WZ-5HT ŠTAKORA.....	74
6.2. KOŠTANI FENOTIP.....	75
6.2.1. KOŠTANA MINERALNA GUSTOĆA.....	76
6.2.2. KORTIKALNA KOST.....	77
6.2.3. TRABEKULARNA KOST.....	79
6.3. BIOKEMIJSKI I HORMONALNI STATUS.....	82
6.3.1. HORMONI KOJI UTJEČU NA KOŠTANO TKIVO.....	82
6.3.2. GLUKOZNI METABOLIZAM WZ-5HT ŠTAKORA.....	83
6.4. DJELOVANJE 5-HT-a NA KOŠTANE STANICE.....	84
6.4.1. UTJECAJ NA OSTEOBLASTE.....	85
6.4.2. UTJECAJ NA OSTEOKLASTE.....	86
7. ZAKLJUČCI.....	89
8. SAŽETAK.....	90
9. SUMMARY.....	91
10. LITERATURA.....	92
11. ŽIVOTOPIS.....	101

## **POPIS KRATICA:**

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> – kalcitriol ili aktivni oblik vitamina D

5-HIAA – 5-hidroksiindol octena kiselina

5-HT – 5-hidroksitriptamin ili serotonin

5-HTP – 5-hidroksitriptofan

5-HTT – 5-HT prijenosnik ili serotoniniski prijenosnik

ALPH – alkalna fosfataza

ATP – adenzin trifosfat

BFR – stopa koštanog stvaranja

BMC – sadržaj koštanog minerala

BMD – koštana mineralna gustoća

BMU – osnovna multistanična jedinica koštanog tkiva

BSP – koštani sialoprotein

BV – koštani volumen

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

Co.Th. – debljina kortikalne kosti

Ct – prag ciklusa PCR reakcije

CT – kompjuterizirana tomografija

Ctsk – katepsin K

DBP – vitamin D vežući protein

DEPC – dietil pirokarbonat

DMP-1 – dentin matriks protein 1

DXA – apsorpciometrija rendgenskih zraka dvostruke energije

ECM – izvanstanični matriks

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

ELISA – imunoenzimska reakcija za određivanje količine specifičnih molekula

FBS – serum dobiven iz goveda



FV – volumen masnog tkiva

GAG – glikozamino glikani

GPCR – receptor povezan s G-proteinom

GTP – gvanozin trifosfat

GTT – test tolerancije glukoze

HDL – lipoprotein visoke gustoće

ITT – test tolerancije inzulina

IU – internacionalna jedinica

LRO – organeli srodni lizosomima

LRP-5 – protein 5 povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće

MAO – monoanino oksidaza

MAR – stopa odlaganja minerala u kost

M-CSF – čimbenik rasta koji stimulira stvaranje kolonija makrofaga

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

N.OB/BS – broj osteoblasta po koštanoj površini

N.Oc/BS – broj osteoklasta po koštanoj površini

OCN – osteokalcin

OCS – otvoreni sustav kanalića trombocita

OPG – osteoprotegerin

OPT – ortohtaladialdehid

PCR – lančana reakcija polimerazom

PRP – plazma bogata trombocitima

PSL – količina serotonina u trombocitima

PSU – unos serotonina u trombocite

PTH – paratiroidni hormon

RANK – aktivator receptora za nuklearni čimbenik  $\kappa$ B

RANKL – ligand aktivatora receptora za nuklearni čimbenik  $\kappa$ B

RTG – rendgen

SSRI – selektivni inhibitor povratnog unosa serotonina

SŽŠ – središnji živčani sustav

T2DM – dijabetes melitus tipa II

T<sub>m</sub> – temperatura mekšanja DNA molekule

T<sub>b.N.</sub> – broj koštanih trabekula

T<sub>b. Sp.</sub> – razdvojenost koštanih trabekula

T<sub>b.Th.</sub> – debljina koštanih trabekula

TPH – triptofan hidroksilaza

TRAP – kiselna fosfataza otporna na tartarat

VMAT – vezikularni prijenosnik monoamina

WZ-5HT štakor – Wistar-Zagreb 5-HT soj štakora

# 1. UVOD

## 1.1. KOŠTANO TKIVO

Kost je visoko specijalizirano vezivno tkivo karakteristično za sve više kralješnjake. Uz glavnu ulogu potpore organizma, kost ima ulogu u kretanju, zaštiti organa, skladištenju iona, proizvodnji krvnih stanica i naposljetku, ima ulogu u endokrinnoj regulaciji metabolizma. Koštano tkivo se sastoji od organskog materijala koje mu daje elastičnost i anorganskih soli koje mu daju čvrstoću. Kao najzastupljeniji organski materijal ističe se kolagen tipa I koji čini oko 90% organskog materijala u kosti, dok je najzastupljeniji anorganski spoj u kosti hidroksiapatit kojeg sačinjavaju kalcijevi i fosfatni ioni. Glavne stanice uključene u proces stvaranja kosti čine osteoblasti i osteoklasti (1). Kost se odlikuje izrazitom aktivnošću i dinamikom te je obilježena stalnim preoblikovanjem i velikim regeneracijskim potencijalom. Koštana pregradnja je proces kojim se stvara nova kost, zacijeljuju prijelomi i održava strukturna čvrstoća kostiju, a sastoji se od dva usko povezana i usklađena procesa, koštane izgradnje koju obavljaju osteoblasti i koštane razgradnje koju obavljaju osteoklasti. Koštana pregradnja se odvija tokom čitavog života čovjeka, a cjelokupni kostur odrasle osobe se pregradi u roku od 10 godina (2). Važna uloga koštane pregradnje je i u održavanju strukturne stabilnosti jer se na taj način uklanjaju mikro oštećenja koja bi mogli dovesti do prijeloma kosti. U ljudi se nakon četrdesete godine starosti prilikom koštane pregradnje pomalo smanjuje koštana izgradnja te starenjem dolazi do gubitka kosti. Kod poremećaja u pregradnji kosti, gdje koštana razgradnja uvelike nadmašuje koštanu izgradnju, dolazi do gubitka kosti i nastanka osteoporoze.

### 1.1.2. STRUKTURA KOSTI

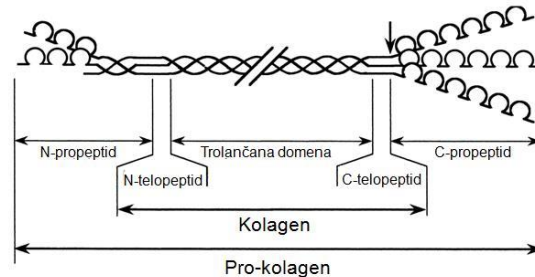
Sva koštana tkiva imaju organiziranu hijerarhijsku strukturu koja je posložena u 4 razine (3). Na najnižoj, nano razini, se nalazi mineralizirani izvanstanični matriks koji se najvećim dijelom sastoji od kolagenih vlakana i mineralnih kristala (Slika 1 i 2). Na mikro razini, koja se može promatrati pod svjetlosnim mikroskopom, razlikujemo morfološku strukturu kosti koja se dijeli na kompaktnu i spužvastu kost te koštane stanice (Slika 3). Na mezo razini se mogu promatrati odnosi i povezanost između kompaktne i spužvaste kosti. Na kraju se na makro razini može promatrati izgled

svake pojedine kosti, kao i povezanost u cjelokupni kostur organizma (4). Na makroskopskoj razini u ljudi razlikujemo 4 tipa kosti. Duge kosti karakterizira cjevasti trup, dijafiza, sačinjena od kompaktne kosti, dok se kroz sredinu trupa proteže medularna šupljina ispunjena krvotvornom koštanom moždinom. Pri krajevima dugih kostiju se nalaze metafize u kojima se nalazi spužvasta kost. Na metafize se nastavlja ploča rasta kosti, dok se na samim krajevima dugih kostiju nalaze epifize koje su ispunjene trabekularnom kosti koja je okružena tankim slojem kortikalne kosti. Kao tipičan primjer dugih kostiju, navodi se primjer bedrene kosti. Kratke kosti karakterizira kockasti izgled i tanak površinski sloj kompaktne kosti koji okružuje spužvastu kost. Tipičan primjer kratkih kostiju su tarzalne kosti stopala. Plosnate kosti su kosti u kojima 2 sloja kompaktne kosti okružuju sloj spužvaste kosti. Tipičan primjer plosnatih kostiju su kosti lubanje. Zadnja kategorija kosti su kosti nepravilnog oblika koje se ne mogu svrstati niti u jednu od ovih kategorija, a gdje su tipičan primjer kralješci.

### 1.1.3. IZVANSTANIČNI MATRIKS

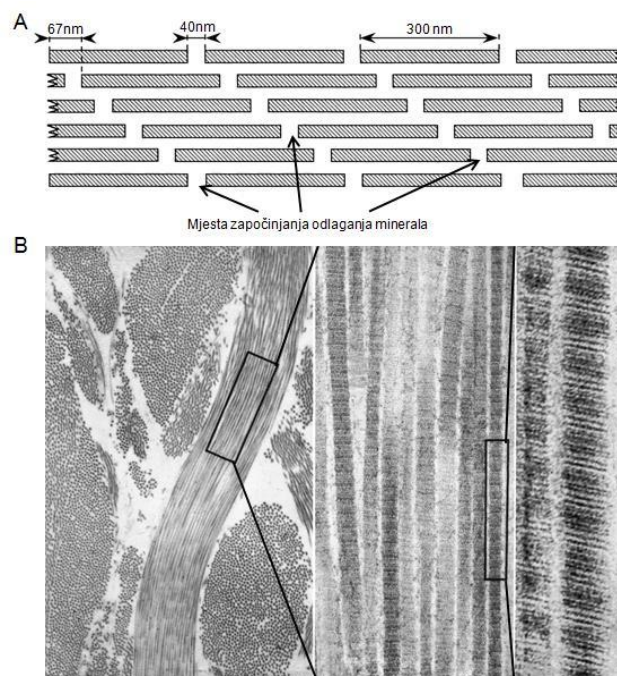
Izvanstanični matriks (*ECM*, od eng. *extracellular matrix*) predstavlja organsku komponentu koštanog tkiva koja daje elastičnost i osnovni uzorak mineralizacije koštanom tkivu, a čini od 20% do 40% koštane mase. Najveći udio, oko 95%, u izvanstaničnom matriksu imaju molekule kolagena, dok ostatak čine nekolageni glikoproteini, hijaluroni i proteoglikani (5). Kolageni su velika obitelj proteina koje kodira 38 gena dajući pritom 20 različitih tipova molekula kolagena (6). Osnovni motiv u kolagenim vlaknima je trostruka uzvojnica polipeptidnih lanaca u kojima se ponavlja slijed aminokiselina glicin-X-Y, gdje X i Y predstavljaju bilo koju drugu aminokiselinu. U gotovo 33 % slučajeva se na mjestu Y nalazi aminokiselina hidrokisprolin koja je ključna u stabilizaciji trostruke uzvojnice kolagenih vlakana. U koštanom tkivu su pronađeni kolagen tipa I, II i V, dok se od ostalih tipova kolagena, koji nemaju direktnu ulogu u stvaranju osnovnog uzorka za mineralizirani matriks, ističu se kolagen tip IX, XII i XIV koji omogućavaju povezanost kolagenih vlakana kosti s drugim komponentama izvanstaničnog matriksa i stanicama (7). Čak 90% izvanstaničnog matriksa kosti čini kolagen tipa I. Ovako velika količina kolagena tipa I u kostima, kao i prisustvo u drugim tkivima, čini ga najzastupljenijim proteinom u kralješnjaka (8). Kolagen tipa I je sintetiziran u pro-kolagenom obliku koji je topiv u

vodi. Pojedinačna molekula kolagena tipa I se sastoji od dva  $\alpha 1$  lanca i jednog  $\alpha 2$  lanca kolagena koji su zavijeni u trostruku uzvojnici. Oba  $\alpha 1$  lanca, kao i  $\alpha 2$  lanac, sadrže dugačku uzvojitu domenu te na krajevima molekule kratak N-terminalni i C-terminalni peptid, nazvanim N-telopeptid i C-telopeptid (Slika 1) (9).



Slika 1. Shematski prikaz molekule prokolagena. Preuzeto i prilagođeno prema potrebi iz (9).

Prilikom stvaranja koštanog izvanstaničnog matriksa, zrele molekule kolagena tipa 1 se spontano slažu u fibrile. Stvaranje fibrila se temelji na principu „jezgrovitog rasta“ gdje se od malog broja pojedinačnih molekula stvara jezgra molekule koja brzo raste stvarajući velike fibrile. U fibrilama su molekule kolagena paralelno poslagane i dugačke 300nm te se preklapaju na dužini od 67nm. Razmak između molekula kolagena iznosi 40 nm, a u tim razmacima započinje odlaganje minerala na površini kolagenih niti (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz slaganja molekula kolagena u fibrile (A). Preuzeto iz (9). Kolageno vlakno snimljeno elektronskim mikroskopom (B). Preuzeto s [http://medcell.med.yale.edu/histology/connective tissue lab/collagen fibers em](http://medcell.med.yale.edu/histology/connective_tissue_lab/collagen_fibers_em).

Proteoglikani su skupina molekula izvanstaničnog matriksa koje karakterizira kovalentna veza dugačkih lanaca polisaharida (glikozamino-glikana, GAG), koji sadrže sulfatne skupine, i jezgre proteinske molekule. U ovu skupinu spadaju molekule agrekan, verzikan, dekorin i biglikan. Glikoproteini su skupina molekula izvanstaničnog matriksa na koje su postranslacijskim modifikacijama vezani oligosaharidi. Iako bi prema ovoj definiciji sve komponente izvanstaničnog matriksa pripadale ovoj skupinu, jer su u većoj ili manjoj mjeri promijenjene postranslacijskim modifikacijama i vezanjem oligosaharida, u skupinu glikoproteina ubrajaju se i molekule osteonektin, fibronektin, trombospondini, tetranektin, vitronektin, fibrilini, osteopontin, koštani sialoprotein (*BSP*, od eng. *bone sialoprotein*) i dentin matriks protein 1 (*DMP-1*) (10).

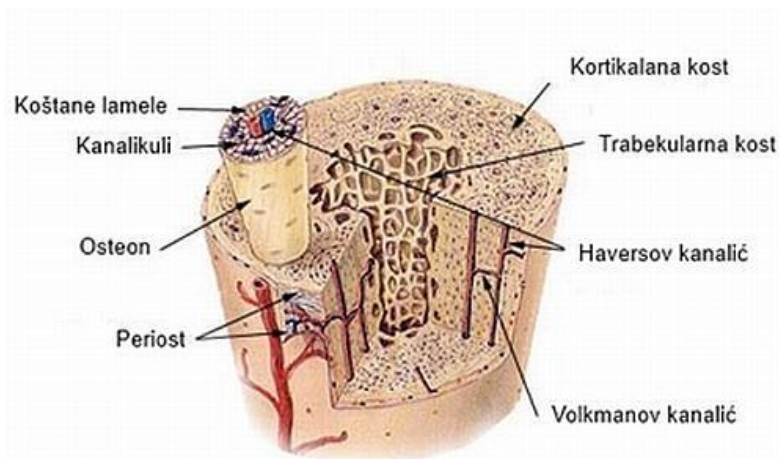
#### **1.1.4. MINERALNI DIO KOŠTANOG TKIVA**

Kako većinu organske komponente kosti čini kolagen, tako je i anorganski dio kosti sačinjen najvećim dijelom od kalcijevih soli koje čine 50 do 70% koštane mase. Ostatak koštane mase čine izvanstanični matriks, voda (do 10%) i masti (manje od 3%) (11). U odraslih ljudi 99% kalcija u tijelu je pohranjeno u kostima i zubima (1). Kalcij se u kostima najvećim dijelom nalazi u vezi s fosfatnim solima u obliku hidroksiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Osim hidroksiapatita, koštano tkivo također sadrži i karbonatne i citratne anione te katione kalija i magnezija. Kalcijev karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) je, uz hidroksiapatit, najzastupljeniji anorganski spoj u kostima gdje u ljudi čini do 10% ukupne mase minerala. Kako se kalcijev karbonat ne uklapa dobro u kristalnu rešetku hidroksiapatita, koštani mineral je strukturno nesavršeni analog prirodnog hidroksiapatita. Na kolagene fibrile se u procesu mineralizacije odlažu soli kalcija pomoću enzima alkalne fosfataze koji proizvode osteoblasti. Alkalna fosfataza hidrolizira pirofostate i organske estere fosfata te tako uklanja komponente koje inhibiraju rast kristala i potiče mineralizaciju kosti (12). Osteoblasti sintetiziraju vezikule izvanstaničnog matriksa sastavljene od nekolagenih proteina, kao osteokalcin, osteopontin i BSP te pružaju zaštićeni mikro-okoliš u kojem se nakupljaju ioni kalcija i fosfata te zbog povišenih koncentracija precipitiraju i tvore kristale hidroksiapatita koji se onda vežu na kolagene fibrile (11; 13). Odlaganje hidroksiapatita počinje u razmacima između kolagenih vlakana (14) (Slika 2).

Zbog potrebe za ionima kalcija i fosfata, u gotovo svim fiziološkim procesima u tijelu, od prijenosa živčanih impulsa do poticanja izražaja gena, koštano tkivo služi i kao spremište ovih iona. Ako se javi povećana potreba za ionima kalcija ili fosfata, oni se brzo mogu osloboditi koštanom resorpcijom pomoću osteoklasta, ali dugotrajni nedostatak ili poremećaj regulacije odlaganja minerala u kosti uzrokuje smanjenje koštanog volumena i pogoduje nastanku osteoporoze.

### **1.1.5. MORFOLOGIJA KOŠTANOG TKIVA**

Ovisno o mjestu proizvodnje i stupnju organiziranosti izvanstaničnog matriksa, morfološki razlikujemo nezrelu, vlaknastu, i zrelu, lamelarnu, kost. Vlaknasta kost se pojavljuje u embrionalnom razvoju kod stvaranja koštanog tkiva, a u odraslih nakon prijeloma prvo nastaje vlaknasta kost koja kasnije prelazi u lamelarnu. Vlaknastu kost karakterizira nepravilan raspored kolagenih fibrila te mala mehanička čvrstoća i stabilnost. Zrela, lamelarna, kost je normalni, zdravi, oblik kosti. Stvaranje kosti se događa procesom intramembranoznog ili endohondralnog okoštavanja. Intramembranozno okoštavanje se događa u embrionalnom razvoju direktnom transformacijom mezenhimalnih stanica u osteoblaste koji stvaraju kost. Ovakvo okoštavanje ograničeno je samo na kosti lubanje, određene kosti lica, dijelove donje čeljusti i ključne kosti. Ostale kosti u tijelu nastaju endohondralnim okoštavanjem. Ovakvim okoštavanjem mezenhimalne stanice se transformiraju prvo u hondrocite koji stvaraju hrskavično tkivo. Progresivna hipertrofija hondrocita te mineralizacija hrskavičnog matriksa djeluju kao osnova za produženje kostiju u subhondralnoj kosti. Nakon mineralizacije hrskavice, koja se naziva i primarno okoštalo tkivo, dolaze osteoblasti koji pretvaraju mineralizirani hrskavični matriks u kost ili sekundarno okoštalo tkivo. Osnovna građevna jedinica lamelarne kosti je osteon. U osteonu su fibrile kolagena koncentrično raspoređene oko krvne žile. Ovisno o načinu slaganja osteona, razlikujemo kompaktnu ili kortikalnu i spužvastu, odnosno trabekularnu kost. U kompaktnoj kosti su koštane lamele gusto pakirane te su osteoni u kompaktnoj kosti nazvani Haversovi osteoni kroz čije kanaliće prolaze krvne žile i živci, a transverzalno su povezani Volkmanovim kanalićima, dok su u spužvastoj kosti kolagena vlakna posložena u otvorenu mrežu trabekularnih ploča i štapova (Slika 3) (1).



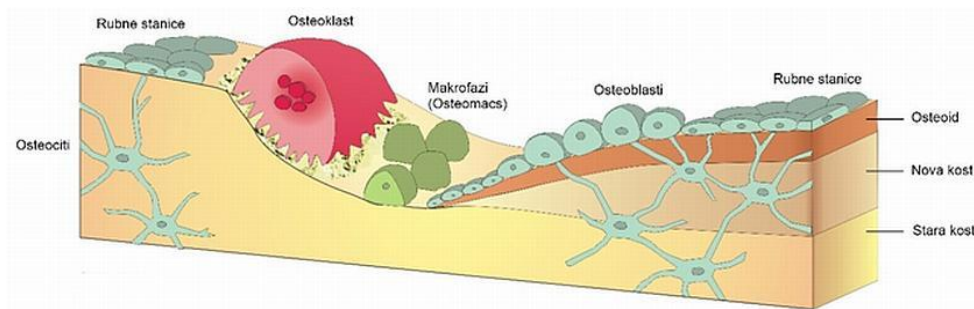
Slika 3. Morfološka struktura kosti u kojoj se razlikuje kortikalna i trabekularna kost. Preuzeto s [http://www.biologycorner.com/anatomy/skeletal/notes\\_ch7.html](http://www.biologycorner.com/anatomy/skeletal/notes_ch7.html).

Trabekularna kost čini samo oko 20% ukupne koštane mase, ali i preko 80% ukupne koštane površine u sisavaca. Iz tog razloga je trabekularna kost metabolički aktivnija od kortikalne kosti. Tako se godišnje pregradi oko 25% trabekularne i samo 3% kortikalne kosti (2). Kod kompaktne kortikalne kosti razlikujemo vanjsku, periostalnu, i unutarnju, endostealnu, površinu. U zdrave kosti na periostalnoj površini koštana izgradnja nadilazi koštanu razgradnju i kost starenjem raste u promjeru. Na endostealnoj površini kortikalne kosti je koštana razgradnja veća od koštane izgradnje te se medularni prostor u kojem je smještena koštana srž širi starenjem. Razlika između kortikalne i trabekularne kosti je arbitrarna te se uzima da se radi o kortikalnoj kosti ako je poroznost promatrane kosti manja od 25%, dok trabekularna kost ima poroznost veću od te vrijednosti (3). Razlika u morfologiji između 2 tipa kosti ima uporište u primarnoj funkciji. Kortikalna kost služi kao mehanička potpora, dok trabekularna, iako dodatno učvršćuje kortikalnu kost, ima primarnu funkciju u metabolizmu koštanog tkiva. Kod poremećaja metabolizma kosti, kao u slučaju osteoporoze, dolazi do narušavanja morfološke strukture kosti kao posljedice neravnoteže koštane pregradnje te olakšano dolazi do prijeloma kosti (15). Cjelokupni kostur sisavaca se može podijeliti na aksijalni kostur koji sadrži kosti glave i kralješnicu te periferni kostur kojeg čine kosti udova (16).

### 1.1.6. STRUKTURA I FUNKCIJA KOŠTANIH STANICA

U koštanom tkivu postoje 4 tipa stanica (Slika 4). Uz već spomenute osteoblaste i osteoklaste, nalazimo također i osteocite i rubne stanice (1).





Slika 4. Stanice koštanog tkiva. Na površini neaktivne kosti se nalaze rubne stanice koje diferenciraju u osteoblaste. Osteoklasti su odgovorni za razaranje koštanog tkiva, dok su osteociti smješteni unutar mineraliziranog matriksa. Slika preuzeta i prilagođena prema potrebama s <http://www.york.ac.uk/res/boneremodelling.html>.

#### 1.1.6.1. OSTEOLASTI

Osteoblasti su potpuno diferencirane stanice odgovorne za proizvodnju koštanog matriksa koji nastaju diferencijacijom iz osteoprogenitornih stanica. Prilikom diferencijacije, stanice osteoprogenitora mijenjaju oblik iz malih vretenastih u velike kuboidalne stanice. Osteoblasti, kao stanice koje proizvode velike količine proteina, imaju veliku jezgru i dobro razvijen Golgi-jev aparat i grubu endoplazmatsku mrežicu. Proizvode kolagene i nekolagene proteine izvanstaničnog matriksa koji sačinjavaju koštano tkivo. Osteoblasti također pokreću mineralizaciju izvanstaničnog matriksa stvaranjem mikro-okoliša za nakupljanje iona kalcija i fosfata te lučenjem enzima alkalne fosfataze koja potiče rast mineralnih kristala koji se vežu za izvanstanični matriks. Pronađene su razne podvrste osteoblasta te je pokazano da osteoblasti iz aksijalnog i perifernog kostura reagiraju različito na citokine te hormonalne i mehaničke signale (11). Prilikom odlaganja mineralnih kristala pojedini osteoblasti ostaju „zarobljeni“ u mineraliziranom matriksu i čine osteocite.

#### 1.1.6.2. OSTEOCITI

Osteociti su zreli osteoblasti koji se nalaze u lakunama unutar mineraliziranog matriksa i odgovorni su za njegovo održavanje. U koštanom tkivu osteociti su najbrojnije stanice koje su preko 10 puta brojnije od osteoblasta (17). Uz sposobnost sinteze izvanstaničnog matriksa, imaju i ograničeni kapacitet za resorpciju istog. Zbog stacionarnog položaja u mineraliziranom matriksu, osteociti su razvili kanalikularni sustav kroz koji su razgranati izduženi stanični ogranci, filopodi, kojima su preko pukotinastih spojišta (eng. *gap junction*) povezani sa susjednim osteocitima, ali i također s obližnjim krvnim žilama te njima vrše opskrbu hranjivim tvarima i razmjenu plinova. Istraživanja su pokazala da su osteociti središnje stanice u

biomehaničkoj regulaciji koštane mase i strukture (18; 19) jer otkrivaju mikropukotine i mehaničko opterećenje unutar kosti te daju signale za početak koštane pregradnje.

### **1.1.6.3. KOŠTANE RUBNE STANICE**

Koštane rubne stanice su plosnate, izdužene stanice koje prekrivaju koštane površine ispod kojih je neaktivna kost. Kako su to neaktivne stanice, imaju mali broj organela u citoplazmi. Sve uloge ovih stanica su još nepoznate, ali se smatra da komuniciraju s osteocitima (20), započinju koštanu resorpciju (21) i stvaranje kosti (22) te da iz njih diferenciraju osteoblasti (1).

### **1.1.6.4. OSTEOKLASTI**

Osteoklasti su velike, višejezgrene, stanice koje rastvaraju mineralizirani koštani matriks. Nastaju spajanjem više jednojezgrenih prekursora iz monocitno-makrofagne loze stanica krvi (23). Za diferencijaciju osteoklasta najvažnija su 2 citokina, čimbenik koji stimulira stvaranje kolonija makrofaga (*M-CSF*, od eng. *macrophage colony stimulating factor*) i ligand receptora aktivatora nuklearnog čimbenika  $\kappa\beta$  (*RANKL*, od eng. *receptor activator nuclear factor  $\kappa\beta$  ligand*) (24). Prilikom resorpcije kosti vežu se direktno na površinu kosti putem molekula integrina (11). Vezanjem na površinu kosti se osteoklasti aktiviraju te pritom postaju polarizirane stanice, gdje se Golgi-jev aparat, mitohondriji i brojni lizosomi, koji nastaju iz Golgi-jevog aparata, smještaju bliže, a stanične jezgre se udaljavaju na stranu stanice koja je dalje od površine kosti. U tako polariziranoj stanici, fibrile aktina se organiziraju tako da se stvara posebni odjeljak u stanici, a plazmatska membrana na dnu tog odjeljka, koja je vezana na koštanu površinu, postaje naborana (25). U tako stvoren odjeljak luče se kiseli  $H^+$  ioni i enzimi  $H^+$ -ATPaze koji dalje potiču egzocitozu enzima katepsina k, kisele fosfataze otporne na tartarat (*TRAP*, od eng. *tartarate resistant acid phosphatase*) i ostalih proteolitičkih enzima iz lizosoma. Kiseli mikrookoliš rastvara mineralni dio kosti, dok proteolitički enzimi razlažu izvanstanični matriks na mjestu vezanja osteoklasta (26).

### **1.1.7. KOŠTANA PREGRADNJA**

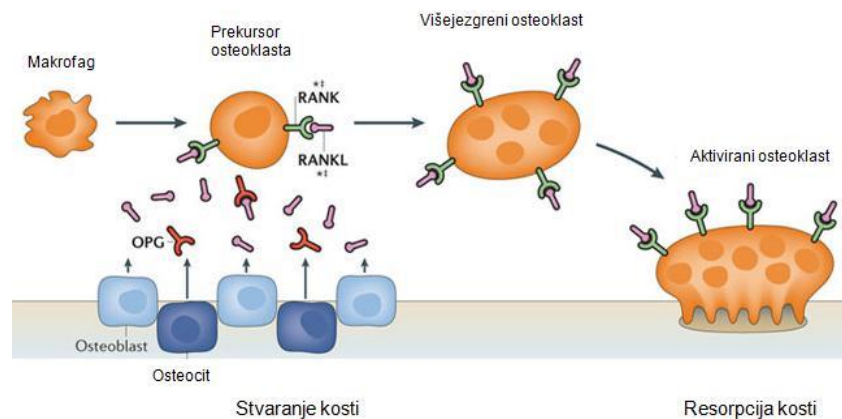
Proces koštane pregradnje se odvija tokom čitavog života sisavaca i sastoji se od procesa koštane razgradnje i izgradnje koji su usko povezani. U mlađoj dobi proces koštane izgradnje prednjači pred koštanom razgradnjom te na taj način kostur raste. Tokom starenja uspostavlja se ravnoteža između ova dva procesa, dok u starosti

koštana izgradnja slabi te dolazi do gubitka koštane mase. Koštana pregradnja je, osim za rast kostura, bitna za održavanje koštane mase i arhitekture u koštanom sustavu odraslih ljudi (27), kao i tijekom procesa cijeljenja kosti, a također je potrebna za održanje primjerene razine kalcija u krvi. Osnovno svojstvo koštane pregradnje je odvijanje na diskretnim, lokaliziranim mjestima kako se ne bi narušio strukturni integritet kosti. Koštana pregradnja je mnogo aktivnija u slučaju prijeloma i odvija se na puno većem području kako bi se u što kraćem vremenu obnovio strukturni integritet oštećene kosti. Tijekom koštane pregradnje kemijski i mehanički podražaji aktiviraju lokalne populacije koštanih stanica i koordiniraju njihovu aktivnost u uklanjanju i zamjeni pojedinih dijelova kosti. Takve organizirane skupine stanica, sastavljene ponajprije od osteoblasta i osteoklasta, nazivaju se osnovne višestanične jedinice (*BMU*, od eng. *basic multicellular units*) i aktivne su tijekom određenog ciklusa koštane pregradnje (28).

Aktivnosti koštanih stanica u procesu koštane pregradnje se mogu podijeliti u četiri glavna događaja: aktivacija, razgradnja, preokret i stvaranje. Ciklus pregradnje započinje aktivacijom neaktivnih koštanih površina. Tijekom faze aktivacije osteoklasti se prihvaćaju za površinu kosti te počinje proces razgradnje kosti. Aktivacija osteoklasta i resorpcija kosti u ljudi traje oko 42 dana (29). S vremenom se resorpcija smanjuje te dolazi do prijelazne faze preokreta, koja u ljudi traje oko 9 dana i u kojoj na koštanu površinu u lakunama resorbirane kosti počinju pristizati zreli, diferencirani, osteoblasti. Faza stvaranja započinje kad osteoblasti počnu proizvoditi izvanstanični matriks u području resorbirane kosti koji kasnije mineraliziraju. Ova faza u ljudi traje najduže, između 124 i 168 dana i završava, kao i ciklus koštane pregradnje, kad osteoblasti nadomjeste resorbiranu kost nestalu tijekom faze razgradnje. Događaji razgradnje i stvaranja kosti međusobno su povezani tako da nakon resorpcije slijedi izgradnja koštanog tkiva. Mnogi čimbenici rasta i citokini, prethodno proizvedeni u osteoblastima i ugrađeni u koštani matriks, tijekom razgradnje kosti djeluju kao autokrino-parakrini čimbenici koji upravljaju diobom, diferencijacijom i regrutacijom novih osteoblasta na mjesta pregradnje te na taj način reguliraju ciklus koštane pregradnje (30).

Aktivnost osteoklasta i osteoblasta u procesu koštane pregradnje je usko vezana RANK-RANKL-OPG sustavom (31; 32). Aktivator receptora za nuklearni čimbenik  $\kappa$ B (RANK), njegov ligand (RANKL) te osteoprotegerin (OPG) ključni su regulatori

koštane pregradnje. RANKL koji luče osteoblasti veže se s RANK-om koji je izražen na prekursorima osteoklasta te tako potiče njihovu diferencijaciju. Međudjelovanjem RANKL-a i RANK-a dolazi do aktivacije osteoklasta te se stimulira preživljenje aktiviranih osteoklasta. OPG luče osteoblasti, osteociti i stromalne stanice, a po svojoj je strukturi homolog RANK-u, koji djeluje kao inhibitor međudjelovanja RANKL-a i RANK-a te je jedan od regulatora koštane pregradnje (Slika 5).



Slika 5. Povezanost osteoblasta i osteoklasta u koštanoj pregradnji preko OPG-RANKL sustava. Preuzeto iz (33) i modificirano prema potrebama.

## 1.1.8. HORMONALNA REGULACIJA KOŠTANOG SUSTAVA

Kost je, kao iznimno dinamično i aktivno tkivo, regulirano od strane mnogih citokina i hormona. Učinak svakog hormona pojedinačno se može opisati i mjeriti, ali u konačnici oni zajedno djeluju u regulaciji koštanog tkiva i osjetljive ravnoteže u procesu koštane pregradnje.

### 1.1.8.1. ESTROGEN

Estrogen ili estradiol je cirkulirajući spolni hormon kojeg nalazimo u ženki, ali djeluje i u mužjaka sisavaca preko specifičnih steroidnih receptora. Utjecaj spolnih hormona na razvoj i rast kosti te na koštanu pregradnju i razvoj osteoporoze je dobro istražen (34). Spolni hormoni doprinose spolnom dimorfizmu kako jedinki tako i kostura zbog kojeg postoji razlika između mužjaka i ženki u koštanoj masi. Također utječu na zatvaranje epifiza i održavanju koštane arhitekture i mase te homeostaze minerala u odraslih jedinki. U ženki kojima su uklonjeni jajnici, gubitak estrogena uzrokuje gubitak koštane mase. Ove promjene nastupaju zbog načina stvaranja i pregradnje kosti. Kod kortikalne kosti smanjenje ili gubitak estrogena u štakora uzrokuje pojačanu aktivaciju osteoklasta i resorpciju kortikalne kosti na endostealnoj površini

dugih kostiju, ali ne smanjuje aktivnost osteoblasta na periostalnoj površini istih kostiju te je moguć i radijalni rast kosti kod smanjene razine estrogena. Utjecaj estrogena na trabekularnu kost mnogo je značajniji jer se trabekularna kost u metafizalnom i epifizalnom dijelu dugih kostiju gubi značajno brže u životinja kojima su uklonjeni jajnici. U tih životinja je primjećeno povećanje koštane pregradnje čiji je rezultat smanjenje trabekularne koštane mase.

#### **1.1.8.2. PARATIROIDNI HORMON (PTH)**

Paratiroidni hormon se proizvodi i izlučuje iz paratiroidnih žlijezda u obliku polipeptida koji se sastoji od 84 aminokiseline. Glavna uloga PTH-a je održavanje homeostaze kalcija u organizmu, a kako su kalcij i fosfati usko vezani u koštanom tkivu, PTH regulira i razine fosfata u organizmu. Kako bi se održao uski fiziološki raspon kalcija i fosfata, PTH djeluje na 3 sustava u organizmu. Djeluje na kost, kao najveće skladište kalcijevih i fosfatnih iona, gdje u slučaju nedostatka kalcija potiče koštanu resorpciju i otpuštanje kalcija i fosfata u cirkulaciju. Zbog činjenice da osteoklasti, kao stanice koje razaraju kost, nemaju receptore za PTH, aktivacija osteoklasta kreće od djelovanja PTH na osteoblaste koji smanjuju lučenje OPG-a koji inhibira diferencijaciju osteoklasta, a povećavaju lučenje RANKL-a i tako potiču resorpciju kosti. Također djeluje na aktivnost bubrega u slučaju nedostatka kalcija, potičući povećanu resorpciju kalcija i fosfata iz urina. Na kraju djeluje i na gastro-intestinalni trakt gdje pojačava pretvorbu neaktivnog 25-hidroksi vitamina D<sub>3</sub> ( $25(OH)D_3$ ) u aktivni oblik 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub> ( $1,25(OH)_2D_3$ ) koji unosi kalcij iz probavnog sustava u krvotok. Lučenje PTH-a je regulirano povratnom spregom s ionima kalcija. Kada koncentracija kalcija u krvi padne, potiče se lučenje PTH-a do trenutka kada koncentracija kalcija dođe u normalnu vrijednost te se zaustavlja lučenje PTH-a. Djelovanje PTH na regulaciju koncentracije fosfatnih iona je neposredno jer se porastom fosfatnih iona u cirkulaciji smanjuju ioni kalcija i tako potiču lučenje PTH-a (35).

#### **1.1.8.3. AKTIVNI OBLIK VITAMINA D ( $1,25(OH)_2D_3$ )**

U skupinu steroida nazvanih vitamin D spada i oblik molekule nazvan kolekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) (36). Ljudsko tijelo ima mogućnost proizvodnje vitamina D u koži gdje se, pod utjecajem ultraljubičastog zračenja, spoj 7-dehidrokolesterol pretvara u vitamin D koji se u tijelu metabolizira u aktivni oblik vitamina D, 1, 25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub>. Pretvaranje u aktivni oblik započinje u jetri hidroksilacijom vitamina D u 25-hidroksi

vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) koji se dalje prenosi u proksimalne tubule bubrega gdje se u konačnici hidrosilira u 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). U krvotoku se 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> prenosi preko proteina nosača, vitamin D vežućeg proteina (*DBP*, od eng. *vitamin D binding protein*), u organe u kojima vrši svoju funkciju (37). Uloga 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u organizmu je regulacija iona kalcija i fosfata. U uskoj svezi s PTH-om, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> djeluje na kost, bubrege i gastrointestinalni trakt kako bi se održao fiziološki raspon ovih iona. U gastro-intestinalnom traktu potiče povećani unos kalcija u krvotok (38), a u bubrezima potiče pojačan izražaj receptora za PTH u distalnim tubulima (39) pojačavajući resorpciju kalcija i fosfata iz urina te tako kontrolira njihovu koncentraciju u krvi (40). Osim utjecaja na metabolizam kalcija i fosfata, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> djeluje i na pojačanu aktivaciju osteoklasta. S obzirom da osteoklasti nemaju receptore za 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, djelovanje na diferencijaciju osteoklasta se odvija preko osteoblasta i RANK-RANKL-OPG signalnog puta (32). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> smanjuje lučenje OPG-a u osteoblastima i tako potiče vezanje RANK-RANKL i diferencijaciju osteoklasta.

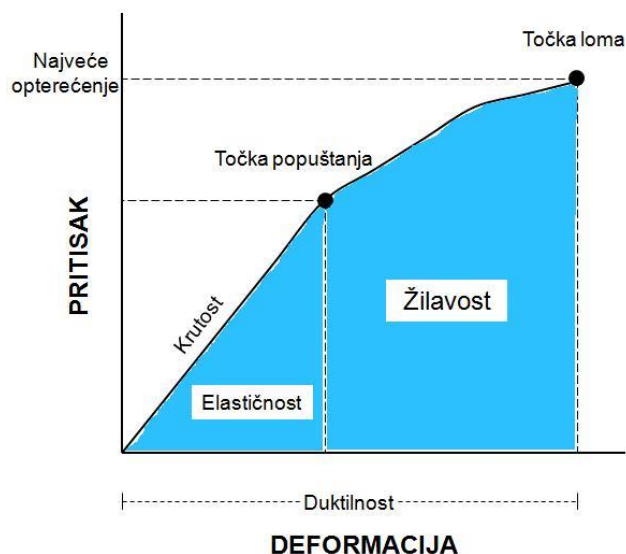
#### **1.1.8.4. INZULIN**

Inzulin je peptidni hormon koji se sastoji od 51 aminokiseline. U tijelu je glavni hormon koji regulira unos glukoze u stanice te utječe na metabolizam masti, a ima najjači utjecaj u tkivima koja su povezana s metabolizmom glukoze, kao što su jetra, koštani mišići i masno tkivo, ali je povezan i s hrskavičnim i koštanim tkivom. Ranija istraživanja pokazuju da se u slučajevima kada je poremećen metabolizam glukoze i inzulina gotovo trenutno zaustavlja rast kostiju (41). U *in vitro* kulturi mišje kalvarije povećanje razine inzulina je povećalo diferencijaciju osteoblastičnih stanica i koštano stvaranje, ali nije imalo utjecaj na diferencijaciju osteoklasta (42). Kod promijenjene homeostaze inzulina u tijelu opisana su 2 tipa dijabetesa. U dijabetesa tipa I dolazi do odumiranja β otočića, stanica u gušterači koje proizvode inzulin te se posljedično smanjuje lučenje inzulina. Kod ovakvog stanja vidljiv je negativan utjecaj na kost gdje dolazi do smanjenja koštane mase u obliku osteopenije i osteoporoze. U dijabetesa tipa II dolazi do povećanja broja β otočića i povećanog lučenja inzulina, što kroz duži period izaziva razvoj otpornosti stanica prema inzulinu i unosu glukoze u stanice. Kod proučavanja učinka dijabetesa tipa II na kost postoje oprečni rezultati. U nekim studijama je uočen anabolični učinak na kost (43), dok druga istraživanja pokazuju povećanje mineralne gustoće, ali sa smanjenim strukturnim parametrima (44).

### 1.1.9. BIOMEHANIKA KOSTI

Koštano tkivo daje potporu cijelom organizmu kralješnjaka i mora udovoljavati određenim mehaničkim svojstvima. Mora biti otporno na lomove, dovoljno čvrsto i kruto, ali ujedno i elastično. Koštano tkivo u viših kralješnjaka je zapravo kompromis između ovih svojstava. Kad bi kost bila čvršća morala bi biti deblja, a to znači teža i veća, duže vremena bi rasla, više materijala bi bilo potrebno za izgradnju kostiju, a mišićna masa potrebna za pokretanje takvih kostiju bi trebala biti također puno veća. U toku evolucije se koštano tkivo optimiziralo uvjetima života u ovisnosti o okolišnim čimbenicima (3). U vidu tih optimizacija koštano tkivo je prilagođeno da izdrži svakodnevne napore, ali i da podnese sile koje se javljaju prilikom izrazitih napora kao što su brzo trčanje, skakanje ili borba. Kao izrazito promjenjivo tkivo, kost ima sposobnost promjene strukture pod utjecajem vanjskih faktora. U 19. stoljeću postavljen je tzv. *Wolff-ov zakon* koji govori o odnosu mehaničkog opterećenja i strukture kosti (45). Kostur nije samo genetski programiran prema specifičnoj konfiguraciji, nego veliki utjecaj na morfološku strukturu ima i mehaničko opterećenje kroz životni vijek jedinke. U idealnom sustavu na kost djeluju tri osnovne sile uzrokujući pritisak (eng. *stress*): 1) sila istezanja (eng. *tension*), 2) sila sabijanja (eng. *compression*) i 3) poprečna sila (eng. *shear*). U živom organizmu na kost djeluju kombinacije ovih triju sila (3). Prilikom prijeloma sila koja djeluje na kost je veća od njegovih mehaničkih svojstava te dolazi do gubitka strukturnog integriteta kosti. U laboratoriju se u kontroliranim uvjetima može primijeniti i izmjeriti sila potrebna za lom kosti. Biomehanička svojstva kosti se prilikom testa uvijanja mogu vidjeti iz krivulje pritisak/deformacija (eng. *stress/strain curve*), gdje je pritisak prikazan na ordinati, a deformacija na apscisi u koordinatnom sustavu (Slika 6). Bez obzira na veličinu uzorka kosti, pritisak se može normalizirati na jedinicu područja, dok se deformacija može normalizirati na jedinicu dužine. Analizom krivulje pritisak/deformacija se mogu izračunati različita svojstva kosti. Linearni dio krivulje predstavlja elastičnost kosti. Opterećenje u granicama ove regije će rezultirati deformacijom kosti koja će se vratiti u svoj prvobitan oblik nakon prestanka djelovanja sile. Daljnjim opterećenjem na kost ulazi se u plastičnu regiju krivulje, u kojoj dolazi do trajnog opterećenja kosti, te se ono ne može više vratiti u prvobitan oblik nakon prestanka djelovanja sile. Točka loma predstavlja najveći pritisak sile koju kost može podnijeti, dok je duktilnost mjera sposobnost kosti da se plastično deformira prije nego što dođe do loma. Ukupna

energija pohranjena kod točke loma se naziva žilavost (eng. *toughness*), a može se izračunati iz površine ispod krivulje (Slika 6).



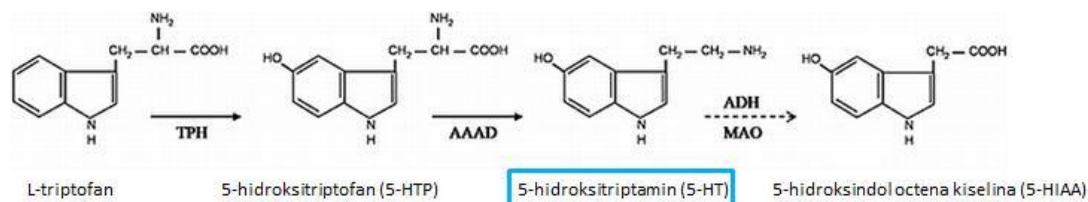
Slika 6. Krivulja pritisak/deformacija kod testa uvijanja prikazuje biomehaničke parametre kosti koji se mogu izraziti i izračunati.

S obzirom na morfološku razliku u kompaktnoj i spužvastoju kosti, koriste se različiti testovi za testiranje ta dva tipa kosti. Kod kompaktne kosti u dijafizi bedrene kosti koristi se test uvijanja, u kojem na kost djeluju poprečna sila i sila sabijanja, dok se za trabekularnu kost koristi test udubljenja gdje djeluje samo sila sabijanja.

## 1.2. SEROTONIN

Serotonin je biogeni monoamin široko rasprostranjen u biosferi planeta Zemlje. Otkriven je 1948. godine u sastavu goveđeg seruma kao spoj s vazokonstriktornim djelovanjem (46). Daljnjim istraživanjem otkriveno je da je koncentracija novog spoja znatno viša u serumu nego u plazmi te je zaključeno da se u procesu zgrušavanja krvi otpušta iz trombocita. Zbog pronalaska u serumu i načina djelovanja, spoj je dobio ime serotonin. Ime serotoninu prema IUPAC-ovom nazivlju je 5-hidroksitriptamin (5-HT) (Slika 7). U odraslom ljudskom organizmu 5-HT ne prolazi kroz krvno-moždanu barijeru te je 5-HT iz središnjeg živčanog sustava (SŽS) u potpunosti odijeljen od 5-HT-a iz perifernih tkiva (47).





Slika 7. Kemijska struktura i sinteza serotonina (5-HT). Preuzeto iz (48) i prilagođeno prema potrebama.

### 1.2.1. BIOSINTEZA SEROTONINA

U sisavaca biosinteza 5-HT-a počinje od esencijalne aminokiseline triptofan (Slika 7). Prvi korak u sintezi je hidroksiliranje aminokiseline L-triptofan u prisustvu enzima triptofan hidroksilaza (TPH). Uslijed podijeljenosti 5-HT sustava u organizmu na SŽS i periferiju, istraživanjima su pronađene dvije izoforme enzima TPH. Na periferiji organizma pronađena je izoforma nazvana TPH1, dok je u središnjem živčanom sustavu pronađena izoforma nazvana TPH2 (49). Proizvod hidroksilacije L-triptofana je 5-hidroksitriptofan (5-HTP) koji se brzo dekarboksilira enzimom triptofan dekarboksilaza pri čemu nastaje serotonin ili 5-hidroksitriptamin (5-HT).

5-HT se na periferiji sintetizira u enterokromafinim stanicama tankog crijeva, gdje se sintetizira preko 90% cjelokupne količine 5-HT-a u organizmu (50). Osim u tankom crijevu, sinteza 5-HT-a je pronađena i u  $\beta$ -stanica gušterače (51), osteoblastičnih (52) i osteoklastičnih stanica (53), stijenci arterija (54) i koži (55). U mozgu se sinteza odvija u tijelima serotonergičkih neurona, lokaliziranim u području nazvanom jezgre rafe (56; 57). Visoka selektivnost krvno-moždane barijere za 5-HT ne odnosi se na prekursore sinteze, L-triptofan i 5-HTP te oni nesmetano prolaze kroz barijeru, dok je 5-HT u potpunosti odijeljen između SŽS i periferije organizma (58).

Razgradnja 5-HT-a (Slika 7) počinje djelovanjem enzima monoaminooksidaza (MAO) (59). MAO je učestali enzim pronađen u svih kralješnjaka i beskralješnjaka. U miša su pronađene dvije izoforme MAO enzima nazvane MAO-A i MAO-B (60). Izoforme MAO enzima se razlikuju u afinitetu prema supstratu kojeg metaboliziraju i osjetljivosti prema inhibitorima (61). Osim što ima afinitet za 5-HT, MAO enzim sudjeluje u razgradnji noradrenalina, feniletilamina, dopamina, triptamina i tiramina (62). Primarna funkcija MAO enzima u metabolizmu monoamina i kateholamina uvjetuje njihovu distribuciju, kako u SŽS-u, tako i na periferiji organizma i odraz je fizioloških i funkcionalnih uloga obje izoforme. MAO je u organizmu široko zastupljen

te većina perifernih tkiva izražava MAO-A i MAO-B izoforme. Na periferiji se ipak glavina razgradnje 5-HT-a odvija u jetri i plućima (63) te bubrezima (62). Djelovanjem enzima MAO nastaje 5-hidroksiindol-acetaldehid koji se dalje prevodi enzimom aldehyd dehidrogenaza u 5-hidroksiindol octenu kiselinu (5-HIAA). Treba napomenuti da 5-HIAA ima mogućnost prolaska krvno-moždane barijere te se, kao završni produkt razgradnje 5-HT-a, izlučuje iz tijela bubrezima (64).

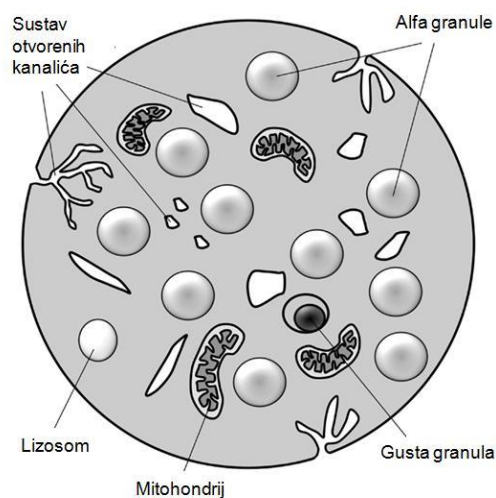
### **1.2.2. POHRANA SEROTONINA**

Zbog značajnog utjecaja na mnoge fiziološke procese u organizmu, količina dostupnog 5-HT-a u organizmu mora biti strogo regulirana i u fiziološkim granicama. 5-HT koji se proizvodi na periferiji organizma pohranjuje se najvećim dijelom u trombocitima te manjim dijelom na mjestu sinteze u enterokromafinim stanicama tankog crijeva, dok je u središnjem živčanom sustavu, zbog uloge neurotransmitera, pohranjen u živčanim završecima i serotonergičkim neuronima. Unos 5-HT-a u stanice se vrši pomoću 5-HT prijenosnika (*5-HTT*, od eng. *5-hydroxytyptamine transporter*) koji se nalazi na plazmatskoj membrani.

### **1.2.3. TROMBOCITI**

Trombociti su stanični fragmenti nastali odvajanjem dijelova citoplazme od stanica megakariocita. Diskoidalnog su oblika, 2-3  $\mu\text{m}$  u promjeru te im prosječni volumen iznosi 6-7  $\mu\text{m}^3$ . Primarna funkcija trombocita je skladišna te su u njima pohranjeni ioni kalcija, ATP, 5-HT, mnogi koagulacijski faktori kao i faktori rasta. Osnovna karakteristika im je odsustvo jezgre što povećava prostor za skladištenje iona i molekula. Zbog skladištenja raznih bioaktivnih molekula, trombociti sudjeluju u procesima hemostaze, upalnim procesima, imunološkom odgovoru organizma i cijeljenju rana. Trombociti su obavijeni plazmatskom membranom koja na pojedinim mjestima ulazi u unutrašnjost stanice čineći otvoreni sustav kanalića (*OCS*, od eng. *open canalicular system*). U citoplazmi trombocita se nalaze 3 vrste granula (Slika 8). Alfa ( $\alpha$ ) granule su najčešće granule i čine oko 10% ukupnog volumena trombocita. Prosječan broj unutar trombocita iznosi između 50 i 80 granula. Unutar alfa granula su pohranjeni koagulacijski i antikoagulacijski čimbenici, angiogeni i anti-angiogeni čimbenici rasta, proteolitički enzimi i inhibitori proteolitičkih enzima te proinflamatorni i anti-inflamatorni medijatori. Naizgled sadrže molekule suprotnog djelovanja unutar istih granula, ali je detaljnim istraživanjima pronađeno više tipova alfa granula te se

pretpostavlja da određeni podtipovi alfa granula ne sadrže molekule koje imaju antagonističko djelovanje (65). Gusta granula su podtip organela povezanih s lizosomima (*LRO*, od eng. *lysosome related organelles*). Prosječan broj unutar trombocita iznosi između 3 i 6 granula, dok pH lumena iznosi 5,4. Najveći dio sadržaja gusta granula čine ADP (635 mM), ATP (436 mM), kalcij (2,2 M), magnezij, polifosfati te biogeni amini, 5-HT i histamin. Uz ove dvije vrste granula, trombociti sadrže i lizosome u kojima su pohranjeni litički enzimi (65). Osim granula, citoplazma trombocita sadrži i mikrotubule, koji održavaju oblik trombocita, mitohondrije, ribosome, Golgi-jev aparat te zrnca glikogena (66).



Slika 8. Shematski prikaz strukture trombocita. Preuzeto iz (65).

#### 1.2.4. UNOS I POHRANA SEROTONINA U TROMBOCITE

Trombociti unose 5-HT iz okoline u citoplazmu aktivnim transportom i pasivnom difuzijom. Omjer ovih dvaju procesa ovisi o temperaturi i koncentraciji 5-HT-a. U organizmu u fiziološkim uvjetima prevladava aktivni unos 5-HT-a koji se odvija preko 5-HT prijenosnika. Ako se koncentracija 5-HT-a povisi, omjer između ova dva procesa se pomiče prema pasivnom unosu. Aktivni unos 5-HT-a u trombocite se odvija u dva koraka. Prvi korak je unos 5-HT-a u citoplazmu trombocita pomoću 5-HTT-a i naziva se PSU (od eng. *platelet serotonin uptake*) koji se odvija preko natrij/kalijeve pumpe uz utrošak energije u obliku ATP-a jer se 5HT unosi protivno koncentracijskom gradijentu. Reakcija unosa je u skladu s Michaelis-Mentenovom jednačbom za brzinu reakcije između enzima i supstrata (67). Nakon unosa u citoplazmu, proces unosa 5-HT-a u gusta granule odvija se ponovo uz utrošak energije u obliku ATP-a. Unos i pohrana 5-HT-a se vrši pomoću vezikularnog

monoaminskog prijenosnika 2 (*VMAT2*, od eng. *vesicular monoamine transporter 2*) te je potaknut elektrokemijskim gradijentom protona duž membrane granula (68). Količina serotonina u trombocitima (PSL, od eng. *platelet serotonin level*) ovisi o aktivnosti serotoninskog prijenosnika, a izražava se po jediničnom broju trombocita ili po jediničnoj masi trombocitnog proteina (69).

### **1.2.5. SEROTONINSKI PRIJENOSNIK (5-HTT)**

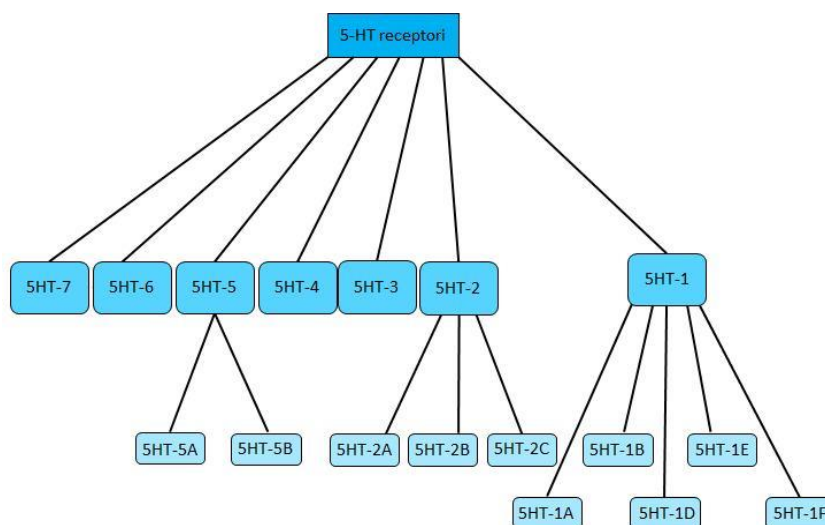
5-HT prijenosnik se u središnjem živčanom sustavu nalazi na presinaptičkim membranama živčanih završetaka, dok je na periferiji organizma pronađen na površini stanica mnogih organa kao i na površini trombocita. Otkrićem slijeda nukleotida u genu za 5-HTT (70) i kasnijim istraživanjima, pretpostavljeno je da funkcionalni kompleks prijenosnika postoji u oligomernom obliku (71). Zbog nemogućnosti izolacije solubiliziranog oblika, struktura 5-HTT-a je zaključena prema 3D modeliranju bliskih membranskih prijenosnika poput laktozne permeaze (72) i glicerol-3-fosfat prijenosnika (73). 5-HTT spada u skupinu prijenosnika natrij/kalij pumpe ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) te sadrži 12 transmembranskih regija. Predviđeni mehanizam djelovanja 5-HTT-a uključuje simultano vezanje  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i 5-HT. Kada se popuni vezno mjesto, događa se konformacijska promjena u 5-HTT-u te se, uz utrošak energije u obliku ATP-a, sadržaj vezan s izvanstanične strane prenosi u citoplazmu stanice. Prilikom otpuštanja  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i 5-HT u citoplazmi, na 5-HTT se vežu ioni kalija ( $\text{K}^+$ ) koji potpomažu konformacijsku promjenu i povratak 5-HTT-a u početni strukturni oblik.

### **1.2.6. OTPUŠTANJE SEROTONINA IZ TROMBOCITA**

5-HT se otpušta aktivacijom trombocita procesom egzocitoze. Aktivacijom trombociti mijenjaju oblik te se u citoplazmi stvara središnja granulomera gdje se okupljaju granule (74). Prilikom aktivacije trombocita se povećava koncentracija iona kalcija u citoplazmi te se na taj način aktivira enzim protein kinaza c (PKC) koji je važan u procesu egzocitoze (75). U aktiviranih trombocita može doći do spajanja više granula u veće procesom fuzije granula (76). Sadržaj gusta granula se izlučuje egzocitozom preko otvorenog sustava kanalića koji se proteže kroz lumen trombocita (77) ili direktnim spajanjem s plazmatskom membranom (74).

## 1.2.7. SEROTONINSKI RECEPTORI

Mnogostruke uloge 5-HT-a u organizmu upućuju na njegovu vrlo složenu regulaciju djelovanja. Utjecaj na brojne procese omogućen je velikim brojem 5-HT receptora. Do danas je pronađeno 18 gena koji su odgovorni za proizvodnju 14 različitih proteina grupiranih u 7 skupina 5-HT receptora nazvanih 5HT-1 do 5HT-7 (Slika 9) (78). Svi receptori, osim 5HT-3 receptora, spadaju u super-obitelj receptora povezanih s G-proteinima (*GPCR*, od eng. *G-protein coupled receptors*). Osnovni motiv ove super-obitelji proteina je 7 transmembranskih domena (79). GPCR su integralni membranski proteini koji sadrže izvanstaničnu N-terminalnu regiju koju prati 7 transmembranskih  $\alpha$ -uzvojnica koje su povezane s 3 izvanstanične i 3 unutarstanične petlje te završavaju C-terminalnom unutarstaničnom regijom. Vežanjem liganda na receptor događa se konformacijska promjena koja omogućuje vezanje GTP-a na G-protein i daljnju aktivaciju signalne kaskade, ovisno o ligandu koji je aktivirao receptor (80). 5HT-3 receptor je ionski kanal koji sadrži cisteinsku petlju i koji se evolucijski razvio neovisno od ostalih 5-HT receptorima (81). 5HT-1 skupina receptora sadrži 5 članova, nazvanih 5HT-1A, -1B, -1D, -1E i -1F, a karakterizira ih povezanost s  $G\alpha_i/G\alpha_o$  proteinima i inhibicija enzima adenilat ciklaze. 5HT-2 skupina receptora sadrži 3 člana nazvanih 5HT-2A, -2B i -2C i karakterizira ih povezanost s  $G\alpha_q$  proteinima i aktivacijom enzima fosfolipaza C. 5HT-5 skupina receptora sadrži 2 člana, 5HT-5A i -5B čiji mehanizam djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen dok su receptori 5HT-4, -6 i -7 jedini članovi svoje skupine, a karakterizira ih povezanost s  $G_s$  proteinima i aktivacija enzima adenilat ciklaze (82).



Slika 9. Podjela 5-HT receptora prema skupinama.

### 1.3. UTJECAJ SEROTONINA NA KOŠTANO TKIVO

Koštano tkivo se prvi puta pojavljuje u razredu riba (*Osteichthyes*) prije 420 milijuna godina. S obzirom na visoku zastupljenost 5-HT-a u tijelu viših kralješnjaka i dugačak period koegzistiranja koštanog tkiva i 5-HT-a tokom evolucije, sigurno je razvijen mehanizam regulacije koštanog tkiva pomoću 5-HT-a.

Utjecaj 5-HT-a na kost je prvi put uočen u pacijenata sa dijagnosticiranom depresijom (83). U ovih pacijenata je primjećena poremećena homeostaza 5-HT sustava kao i smanjena kvaliteta kosti. Kasnije je u studijama povezana terapija antidepresivima koji inhibiraju povratni unos serotonina (*SSRI*, od eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*) sa smanjenom koštanom mineralnom gustoćom i povećanim rizikom od prijeloma (84). Kako bi se istražio mehanizam i utjecaj 5HT-a na koštano tkivo, napravljena su istraživanja na osteoblastičnim i osteoklastičnim stanicama. Istraživanjima na osteoblastičnim stanicama su pronađeni receptori 5HT-2A i 5HT-2B (85). 5HT-2B receptor je bio izražen u velikoj mjeri u osteoblasta miša i pileta, dok je u mozgu njegov izražaj bio u puno manjoj količini. Daljnjim istraživanjima su na osteoblastičnim stanicama pronađeni i drugi receptori kao i 5-HT prijenosnik (5-HTT) (86). 5HT-2B receptor u miša djeluje na koštanu masu potičući proliferaciju osteoblastičnih stanica (87). Porijeklo osteoklasta iz monocitno/makrofagne loze stanica ukazuje na velike sličnosti u regulacijskim mehanizmima stanica iz te zametne loze. Utjecaj 5-HT-a na funkciju makrofaga je već otprije poznat (88) što je dovelo do otkrića 5-HTT-a, kao i 5-HT receptora, na osteoklastičnim stanicama (89). Pritom je otkrivena izraženost 5HT-1B i 5HT-4 receptora tokom diferencijacije osteoklasta, dok isti receptori nisu imali utjecaj na funkciju zrelih osteoklasta. Uz utjecaj 5-HT receptora na proces diferencijacije osteoklasta, veliki utjecaj ima i 5-HTT. U istom istraživanju pronađeno je da promjena aktivnosti 5-HTT-a može do određene mjere zaobići RANK-RANKL-OPG sustav u diferencijaciji osteoklasta i tako potaknuti ograničenu koštanu resorpciju. Kasnijim istraživanjima je pronađeno da nedostatak 5-HT-a smanjuje osteoklastogenezu u miša (53). Uz izražaj 5-HTT-a i 5-HT receptora, pronađen je i funkcionalan sustav za proizvodnju 5-HT-a u osteoblastičnim prekursorima preko Tph1 enzima te posljedična autokrino/parakrina regulacija aktivacije osteoklasta. U istom istraživanju pronađeni su i receptori 5HT-1B, 5HT-2A i 5HT-2B, ali ne i 5HT-1A i 5HT-4. Nakon tretmana osteoklasta RANKL-om u *in vitro* uvjetima pojačao se izražaj 5HT-1B receptora što govori o ulozi 5-HT-a

u diferenciranih osteoklasta. Važna uloga 5-HTT-a u regulaciji koštanih stanica potvrđena je daljnjim istraživanjima (90). Uz direktan učinak preko 5-HTT-a i 5-HT receptora pronađeno je da periferni 5-HT proizveden u enterokromafinim stanicama tankog crijeva ima anaboličan učinak na kost (91). Protein koji ima ključnu ulogu u Wnt signalnom putu aktivacije osteoblasta, Lrp-5 (eng. *low density lipoprotein receptor related protein 5*), povezan je s izražajem Tph1 enzima u enterokromafinim stanicama tankog crijeva. Predloženi mehanizam djelovanja Lrp-5 je da potiče stvaranje kosti inhibicijom proizvodnje 5-HT-a u tankom crijevu. Na taj način u organizmu smanjuje količinu 5-HT-a, koji ima negativan učinak na proliferaciju osteoblasta te zapravo potiče stvaranje kosti. U sličnom životinjskom modelu nije ponovljen učinak Lrp-5 na stvaranje 5-HT-a, ali nije dobiven niti utjecaj 5-HT-a iz tankog crijeva na koštanu masu (92) te je regulacija 5-HT-a preko Lrp-5 ostala još uvijek nerazjašnjena. Osim učinka na periferiji organizma, istraživanja su pokazala da 5-HT i u središnjem živčanom sustavu ima utjecaj na stvaranje periferne kosti (93). U istraživanjima djelovanja SŽS na kost predložen je mehanizam koji uključuje 5-HT i leptin (94). Djelovanjem preko leptina smanjuje se simpatički tonus te se povećava proliferacija osteoblasta i tako potiče stvaranje kosti. Prilikom mehaničkog opterećenja, kao kod povećane fizičke aktivnosti, dolazi do dodatne stimulacije osteocita koji aktiviraju koštanu pregradnju i jačanje kosti. U životinja kojima je inhibirana aktivnost 5-HTT-a primjećena je promijenjena pokretljivost te smanjena koštana masa, ali i u kostima koje nisu pod mehaničkim opterećenjem, kao kosti lubanje, u odnosu na kontrolne životinje (90).

Zbog širokog spektra djelovanja 5-HT-a na stanice i organe u tijelu kralješnjaka, teško je izdvojiti samo jedan mehanizam djelovanja 5-HT-a i proučavati ga odvojeno od ostalih sustava te dosadašnja istraživanja nisu u potpunosti uspjela otkriti sve aspekte djelovanja 5-HT-a na kost.

## 1.4. SVRHA RADA

Djelovanje serotonina u kralješnjaka je iznimno složeno zbog velikog broja receptora i 5-HT prijenosnika. Ovo istraživanje pruža uvid u serotoninsku regulaciju koštanog sustava te zbog jedinstvenog fiziološkog modela omogućuje proučavanje međudjelovanja glukoznog i serotoninskog metabolizma s koštanim tkivom.

## **2. HIPOTEZA**

Promijenjena količina serotonina u krvi utjecat će na stvaranje i pregradnju trabekularne i kortikalne kosti u štakorskom modelu. Životinje s višom koncentracijom serotonina u krvi imat će višu koštanu pregradnju u usporedbi sa životinjama s nižom koncentracijom serotonina što će imati za rezultat slabije koštane parametre zbog povećane resorpcije kosti.

## **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **3.1. OPĆI CILJ**

Istražiti utjecaj količine serotonina u krvi na kvalitetu kosti u štakorskom modelu s promijenjenom serotoninskom homeostazom.

### **3.2. SPECIFIČNI CILJEVI**

- Odrediti utjecaj serotonina na razliku u koštanim parametrima u životinja s višom i nižom količinom serotonina u odnosu na dob i spol.
- Odrediti i kvantificirati utjecaj serotonina na pregradnju kosti između životinja s višom i nižom količinom serotonina.
- Istražiti potencijalni mehanizam djelovanja serotonina na koštano tkivo u životinjskom modelu.
- Analizom genske ekspresije istražiti mehanizam djelovanja serotonina na koštane stanice u staničnoj kulturi.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. ŽIVOTINJE

U istraživanju utjecaja serotonina na koštani metabolizam korišten je životinjski model nazvan Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT), razvijen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta "Ruđer Bošković". Karakteristika WZ-5HT štakora je fiziološki promijenjena homeostaza serotonina u krvi što ga čini izvrsnim modelom za proučavanje utjecaja serotonina na kost. Kontrolnoj populaciji štakora soja Wistar je određena razina serotonina u trombocitima i plazmi te je izmjerena aktivnost serotoninskog prijenosnika (5-HTT) na membrani trombocita. Na temelju izmjerenih vrijednosti razvijen je WZ-5HT štakorski model ciljanim međusobnim križanjem životinja s višim odnosno nižim vrijednostima aktivnosti 5-HTT-a kao i vrijednostima koncentracije serotonina u trombocitima. Takvim selektivnim križanjem nakon 5 generacija (F5) stvorene su dvije stabilne sublinije nazvane 5HT-niska, s vrijednostima serotonina od oko 70%, i 5HT-visoka sublinija, s vrijednostima serotonina od oko 150% početne populacije (69). U svakoj novoj generaciji životinjama starim 4 tjedna je određena aktivnost 5-HTT-a kao i vrijednosti trombocitnog serotonina te su životinje raspoređene u dvije sublinije. Kako bi se proučio utjecaj serotonina u ovisnosti o spolu, u istraživanju su korištene životinje oba spola F11 do F17 generacije, dok su za utjecaj dobi životinja odabrane životinje starosti 2, 4 i 12 mjeseci. Životinje ovih životnih dobi su izabrane za istraživanje jer predstavljaju mlade, spolno zrele i ostarjele jedinke na kojima se može dobro proučiti utjecaj promijenjene homeostaze 5-HT-a na kost u različitim stadijima života. Životinje su držane u kavezima pod kontroliranim uvjetima s pravilnom izmjenom svjetla i tame (12h/12h), 24°C i 60±10% relativne vlažnosti. Imale su slobodan pristup hrani i vodi, osim prilikom mjerenja glukoze i inzulina kada im je preko noći uskraćen pristup hrani. Prilikom žrtvovanja životinje su eutanazirane injiciranjem ketamina (1 ml/kg) intraperitonealno i embutramida (1 ml/kg) intrapulmonarno. Nakon žrtvovanja životinja prikupljeni su uzorci krvi, bedrene kosti i lumbalnog dijela kralješnice. Masa životinja izmjerena je laboratorijskom vagom (Scaltec, Njemačka). Dužina bedrene kosti izmjerena je pomičnim mjerilom.

Svi pokusi su provedeni u skladu sa i prema Pravilniku o zaštiti životinja (NN 55/13) koji se koristi u pokusima ili u druge znanstvene svrhe Zakona o zaštiti životinja Republike Hrvatske (NN 135/06 i 37/13).

## **4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA**

Sva mjerenja koncentracije 5-HT-a i selektivni odabri životinja provodio se u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta "Ruđer Bošković". Prilikom vađenja krvi životinjama je iz repne vene izvađen 1 ml krvi u epruvete s ACD (kisela citratna dekstroza, od eng. *acid citrate dextrose*) u omjeru 1:3. Plazma bogata trombocitima (*PRP*, od eng. *platelet-rich plasma*) dobivena je centrifugiranjem uzorka antikoagulirane krvi 30 sekundi pri 1200 x g. Dio plazme u kojoj su odijeljeni trombociti prenesen je u novu epruvetu gdje je miješanjem dobivena homogena suspenzija trombocita. Koncentracija 5-HT-a u trombocitima je određena u trombocitnom talogu koji je dobiven centrifugiranjem PRP 10 minuta pri 8500 x g. Trombocitni talog je homogeniziran u deioniziranoj vodi pomoću ultrasonikacije (30s, 20kHz, 8µm). Proteini iz otopine su precipitirani dodavanjem ZnSO<sub>4</sub> (10%, 1 ml) i NaOH (1 N, 0,5 ml) nakon čega su uzorci ponovno centrifugirani 15 minuta pri 1200 x g. Supernatant je prenesen u staklenu epruvetu u koju je kasnije dodan L-cistein (1%, 100 µl) i OPT (od eng. *orthophthaldialdehyde*) (0.01%, 2 ml) nakon čega je reakcijska smjesa zagrijana do 100°C i tako inkubirana 10 minuta. Nakon hlađenja fluorescencija uzorka je očitana na uređaju Varian Cary Eclipse (Agilent, SAD) pri ekscitaciji na 345 nm i emisiji na 485 nm. Dobiveni rezultati su izraženi kao masa 5-HT-a u ng po jediničnoj masi trombocitnih proteina (95). Koncentracija ukupnih proteina u soniciranom talogu trombocita određena je metodom prema Bradfordu (96).

## **4.3. MIKRO-KOMPJUTERIZIRANA TOMOGRAFIJA**

U ovom istraživanju utjecaja serotonina na kost kao glavna metoda karakterizacije koštanog tkiva, korištena je mikro-kompjuterizirana tomografija (mikro CT). Riječ tomografija je dobivena od grčkih riječi *tomē* (rezati) ili *tomos* (dio) i *graphein* (pisati). Tomografsko snimanje se temelji na usmjeravanju zračenja iz određenog izvora

prema predmetu iz više orijentacija (kutova) te mjerenju smanjenja intenziteta emitiranih zraka na odgovarajućem detektoru. Kompjuteriziranu tomografiju (CT) je razvio Sir Godfrey Hounsfield ranih 1970-ih godina (97). Kompjuterizirana tomografija je nedestruktivna metoda koja koristi rendgenske zrake za vizualizaciju predmeta pomoću CCD (eng. *charged coupled device*) kamere ispred koje se nalazi fosforni sloj koji pretvara ionizirajuće zračenje u svjetlosni signal kojeg bilježi kamera. Dobivene slike se koriste za kompjutersku rekonstrukciju ravnine poprečnog presjeka (eng. *slice*) kroz uzorak. U usporedbi s konvencionalnim radiološkim metodama, koje su ograničene na dvodimenzionalne prikaze snimljenih uzoraka, CT omogućuje vizualizaciju trodimenzionalnih prikaza i kvantifikaciju unutarnje strukture bez narušavanja integriteta promatranog uzorka. Rezultat rekonstrukcije je kvantitativna mapa linearnih atenuacijskih koeficijenata rendgenskih zraka u svakoj točki ravnine. Atenuacija ili utišavanje rendgenskih zraka primarno je funkcija energije rendgenskih zraka te gustoće i kompozicije materijala koji se snima (98). U kompjuteriziranoj tomografiji su umjesto dvodimenzionalnih slikovnih elemenata, piksela, uvedeni vokseli, odnosno volumni elementi koji opisuju trodimenzionalnost slike dobivene rekonstrukcijom pomoću x-, y- i z-osi svakog pojedinog vokselu (99). Upotreba CT uređaja u eksperimentalne svrhe je omogućila razvoj uređaja s jačim izvorima zračenja, kao što je mikrofokusni izvor rendgenskog zračenja ili, u novije vrijeme, zračenje iz sinkrotronskih postrojenja i duža vremena ekspozicije, a samim time i povećanje razlučivosti uređaja. Feldkamp i suradnici (100) su konstruirali mikro CT uređaj koji je koristio stožasti snop (eng. *cone beam*) rendgenskih zraka s rezolucijom od 50  $\mu\text{m}$ . Ovakav izvor zračenja je za rekonstrukciju slika zahtijevao poseban algoritam za izračun distribucije atenuiranosti rendgenskih zraka nazvan prema autoru Feldkampov algoritam. Upotrebom takvog algoritma značajno je smanjen odnos signala prema šumu što povećava kvalitetu dobivene slike. Detektori u mikro CT uređajima omogućuju izotropnu rezoluciju koja je jednaka u sve tri ravnine. CT, kao tehnologija, u usporedbi s drugim vizualizacijskim tehnikama, ima određene nedostatke kao što je povećana doza zračenja prilikom snimanja te nešto lošiji prikaz mekih tkiva. Osim ovih nedostataka, prilikom snimanja se mogu javiti određeni artefakti kao posljedica različite energije rendgenskih zraka i izvora zračenja, različitih materijala unutar istog uzorka, pomicanja uzorka ili problema kod rekonstrukcije podataka. Jedan od najčešćih problema je stvaranje kružnih artefakata (eng. *ring artefacts*) koji nastaju zbog nesavršenosti detektora CT uređaja. Kružni

artefakti mogu se ispraviti kalibracijom uređaja prije snimanja, snimanjem tzv. *flat fields* snimaka. Kod CT uređaja koji koriste polikromatske izvore rendgenskog zračenja javlja se efekt otvrdnjavanja rendgenskih zraka (eng. *beam hardening*). Ovaj efekt nastaje zbog velike razlike u energiji rendgenskih zraka koje nastaju u polikromatskom izvoru zračenja. Utišavanje zraka niske energije se odvija lako, dok zrake visoke energije lakše prolaze kroz uzorak te se dobiva slika lošije kvalitete zbog neujednačenosti u atenuacijskim koeficijentima rendgenskih zraka. Kod snimanja tkiva poput kosti uz otvrdnjenje zraka, javlja se i efekt Compton-ovog raspršenja gdje koštano tkivo raspršuje rendgenske zrake više od okolnog mekog tkiva što dodatno utječe na kvalitetu dobivenih slika. Artefakti nastali zbog ovih efekata mogu se smanjiti upotrebom metalnih filtra koji ujednačavaju energiju rendgenskih zraka iz izvora zračenja i upotrebom programskih algoritama prilikom rekonstrukcije podataka.

#### **4.3.1. SNIMANJE KOŠTANOG TKIVA**

Utjecaj promijenjene homeostaze serotonina na kost analiziran je pomoću mikro CT uređaja 1076 (SkyScan, Belgija). Uređaj karakterizira mogućnost snimanja *in vivo* malih laboratorijskih životinja (miš, štakor) kao i *ex vivo* uzoraka do maksimalne dužine od 200 mm i širine od 68 mm. Uređaj posjeduje stacionarno postolje za uzorke te izvor i detektor rendgenskog zračenja koji se okreću oko snimanog uzorka. Od mogućnosti, ističu se još 3 izotropne razlučivosti uređaja od 35, 18 i 9  $\mu\text{m}$  uz mogućnost snimanja objekta svakih  $0,1^\circ$  i u krugu od  $360^\circ$ . Za ujednačavanje energije i smanjenje učinka otvrdnjavanja rendgenskih zraka uređaj ima na raspolaganju 2 aluminijska filtra debljine 0,5 i 1 mm te titanijski filtar debljine 0,025 mm. Za dodatno smanjenje šuma na slici uređaj ima mogućnost uprosječenja slike (eng. *frame averaging*) gdje se snima određeni broj slika iz identičnog kuta te se slike računalno preklapaju dajući jedinstvenu sliku.

Prilikom snimanja uzorci distalnog dijela bedrene kosti i lumbalnog dijela kralješnice bili su učvršćeni u nosačima na platformi mikro CT uređaja te su snimljeni koristeći rezoluciju od 18  $\mu\text{m}$ , što je odgovaralo naponu od 50 kV i jakosti struje od 200  $\mu\text{A}$ . Otvrdnjavanje rendgenskih zraka smanjeno je upotrebom aluminijskog filtra debljine 0,5 mm. Rotacijski pomak izvora zračenja prilikom snimanja je iznosio  $0,5^\circ$  u području od  $198^\circ$  za svaki uzorak. Za smanjenje šuma uprosječenje slike postavljeno je na vrijednost 2.

Rekonstrukcija dobivenih podataka izvršena je pomoću NRecon (SkyScan, Belgija) programa koji se izvodio simultano na 4 računala. NRecon program koristi modificirani Feldkamp-ov algoritam za rekonstrukciju podataka koji se sastoji od procesa filtrirane nazadne projekcije (eng. *filtered backprojection*) i saziva (eng. *convolution*) podataka (100).

#### **4.3.2. SNIMANJE MASNOG TKIVA**

Meka tkiva u tijelu kralješnjaka se sastoje najvećim dijelom od atoma vodika, ugljika, kisika i dušika. Odnos ugljika i kisika, kao 2 najučestalija elementa u izgradnji tkiva razlikuje se za svako tkivo. Tako, primjerice, njihov postotak u kostima iznosi 27% i 41%. U mekim tkivima postotak ovih atoma iznosi 12% i 73% za mišićno, dok je u masnom tkivu odnos 57% i 30% (101). Velika razlika u odnosu ugljika i kisika između masnog i mišićnog tkiva je odgovorna za razliku u apsorpciji rendgenskih zraka manje energije (do 30keV) te mogućnost razlikovanja između tkiva nakon snimanja i rekonstrukcije na mikro CT uređaju (102).

Za analizu masnog tkiva odabrana je visceralna regija štakora gdje je nakupljanje masnog tkiva najveće. Prije snimanja životinje su eutanazirane već opisanom metodom i odmah stavljene u uređaj kako ne bi došlo do pojave mrtvačke ukočenosti i artefakata prilikom snimanja. Životinje su snimljene pomoću SkyScan 1076 mikro CT uređaja koristeći rezoluciju od 35  $\mu\text{m}$ , što je odgovaralo naponu od 70 kV i jakosti struje od 140  $\mu\text{A}$ . Kako bi se smanjila energija i otvrdnjavanje rendgenskih zraka te pojačao kontrast između masnog i mišićnog tkiva, korišten je aluminijski filtar debljine 1 mm. Rotacijski pomak izvora zračenja prilikom snimanja je iznosio  $0,7^\circ$  u području od  $360^\circ$  za svaki uzorak. Za smanjenje šuma uprosječenje slike postavljeno je na vrijednost 2. Rekonstrukcija dobivenih podataka izvršena je pomoću NRecon programa koji se izvodio simultano na 4 računala te je primijenjeno programsko zaglađivanje slike (eng. *smoothing kernel*) u radijusu od 4, korekcija kružnih artefakata (eng. *ring artefact reduction*) u vrijednosti od 4, korekcija otvrdnjavanja zraka (eng. *beam hardening correction*) u vrijednosti od 30% i maskiranje defektnih piksela (eng. *defect pixel mask*) u vrijednosti od 5%.

## 4.4. ANALIZA PODATAKA MIKRO CT SNIMANJA

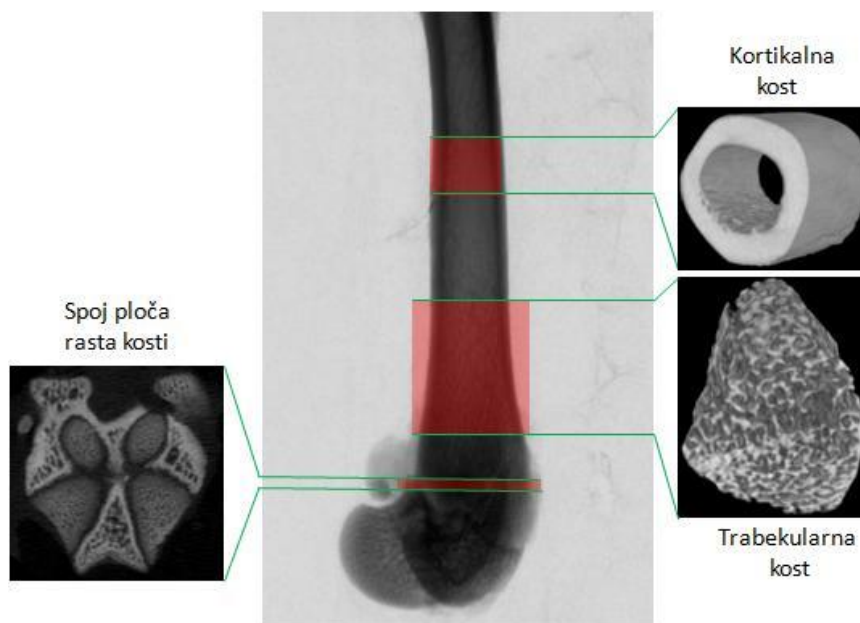
### 4.4.1. PERIFERNI KOSTUR

Utjecaj promijenjene homeostaze 5-HT-a na periferni kostur proučavan je u distalnom dijelu bedrene kosti gdje su analizirane kortikalna i trabekularna kost.

Za analizu kortikalne kosti napravljen je odmak od ploče rasta u iznosu od 400 presjeka za životinje stare 2 mjeseca što je preračunato iznosilo 7,2 mm, odnosno 500 presjeka za životinje stare 4 i 12 mjeseci što je preračunato iznosilo 9 mm. Na taj način su izbjegnute trabekularne strukture koje bi mogle negativno utjecati na izračun parametara kortikalne kosti. Područje analize kortikalne kosti je iznosilo 100 presjeka za sve životinje što je preračunato iznosilo 1,8 mm (Slika 10). Kortikalna kost u definiranom području je ručno označena i spremljena kao zasebni skup podataka u vidu područja od interesa (eng. *region of interest*). Prilikom analize kortikalne kosti u CTAn programu (Skyscan, Belgija) definiran je niz računalnih operacija koji se sastojao od binarizacije podataka postavljanjem praga histogramске ljestvice (*General thresholding*) u vrijednostima od 40 do 255, uklanjanja zaostalih bijelih točkica manjih od 3 vokseli (*Despeckle*), ograničavanja vanjskog ruba područja od interesa na periostalno područje kosti (*ROI shrink wrap*) i analize koštanih parametara u 3 dimenzije (*3D bone analysis*). Dobiveni podaci sadržavali su vrijednosti za volumen cjelokupnog tkiva koji se sastoji od kortikalne kosti i medularnog kanala (TV, od eng. *tissue volume*), koštani volumen (BV, od eng. *bone volume*), postotak koštanog tkiva u odnosu na volumen tkiva (BV/TV, od eng. *bone volume/tissue volume*) i prosječna debljina kortikalne kosti (Co.Th, od eng. *cortical thickness*). Zbog ograničavanja vanjskog ruba područja od interesa na periostalni rub kortikalne kosti, bilo je moguće izračunati vrijednost volumena medularnog kanala, odnosno endostealni volumen (EV, od eng. *endosteal volume*), oduzimanjem dobivenih vrijednosti koštanog od tkivnog volumena.

Kod trabekularne kosti analizirano je samo sekundarno okoštalo tkivo što je postignuto specifičnim odmakom od ploče rasta kosti čime je izbjegnuto primarno okoštalo hrskavično tkivo. Za životinje 2 mjeseca starosti, zbog kraćih kostiju, odmak je iznosio 150 presjeka što preračunato iznosi 2,7 mm, dok je za životinje stare 4 i 12 mjeseci iznosio 200 presjeka što preračunato iznosi 3,6 mm. Područje analize

trabekularne kosti je iznosilo 200 presjeka što preračunato iznosi 3,6 mm, za sve životinje (Slika 10). Trabekularna kost u definiranom području je ručno označena i spremljena kao odvojeni skup podataka iz područja od interesa. Prilikom analize trabekularne kosti u CTAn programu definiran je niz računalnih operacija koji se sastojao od binarizacije podataka postavljanjem praga histogramске ljestvice (*Adaptive thresholding*) u vrijednostima od 45 do 255, uklanjanja zaostalih bijelih točaka manjih od 3 vokseli i analize koštanih parametara u 3 dimenzije. Dobiveni podaci sadržavali su vrijednosti za postotak koštanog tkiva u odnosu na volumen tkiva, debljinu trabekula (*Tb.Th.*, od *trabecular thickness*), broj trabekula (*Tb.N.*, od eng. *trabecular number*) i razmak između trabekula (*Tb.Sp.*, od eng. *trabecular separation*).



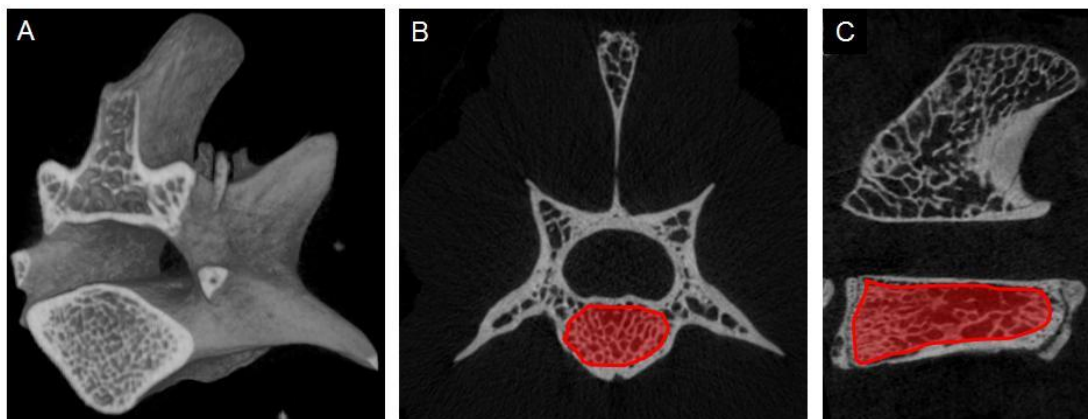
Slika 10. Prikaz analiziranog područja kortikalne i trabekularne kosti prilikom mikro CT analize bedrene kosti WZ-5HT štakora. Specifičan odmak od spoja 4 ploče rasta je napravljen prilikom odabira područja analize kortikalne i trabekularne kosti.

#### 4.4.2. AKSIJALNI KOSTUR

Utjecaj promijenjene homeostaze 5-HT-a na aksijalni kostur proučavan je u lumbalnom dijelu kralješnice gdje je analizirana trabekularna kost tijela kralješka.

Za analizu kralješnice odabran je 3. kralješak lumbalnog dijela kralješnice (L3) (Slika 11A). U kralješku je analizirana samo trabekularna kost kroz cijelo tijelo kralješka (slika 11B i 11C). Trabekularna kost u definiranom području je ručno označena i

spremljena kao odvojeni skup podataka iz područja od interesa. Prilikom analize kortikalne kosti u CTAn programu definiran je niz računalnih operacija koji se sastojao od binarizacije podataka postavljanjem praga histogramске ljestvice (*Adaptive thresholding*) u vrijednostima od 50 do 255, uklanjanja zaostalih bijelih točaka manjih od 3 vokseli (*Despeckle*) i analize koštanih parametara u 3 dimenzije (*3D bone analysis*). Dobiveni podaci sadržavali su vrijednosti za postotak koštanog tkiva u odnosu na volumen tkiva (*BV/TV*), debljinu trabekula (*Tb.Th*), broj trabekula (*Tb.N.*) i razmak između trabekula (*Tb.Sp.*).

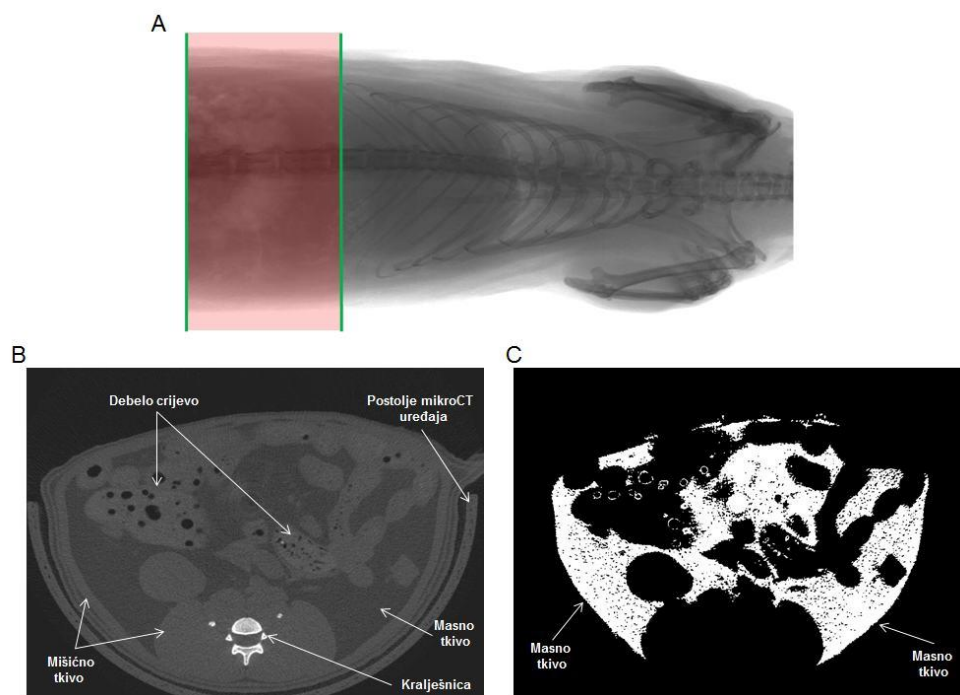


Slika 11. 3D model L3 kralješka (A). Trabekularna kost u tijelu kralješka u transaksijalnom (B) i sagitalnom (C) presjeku prilikom mikro CT analize WZ-5HT štakora označena je crveno.

#### 4.4.3. MASNO TKIVO

Kako bi prilikom mjerenja masnog tkiva u WZ-5HT životinja bila analizirana identično područje, odabrana je visceralna regija koja je odgovarala lumbalnom dijelu kralješnice između 3. i 5. (*L3-L5*) kralješka (Slika 12A). Na rekonstruiranim slikama vidljiva je razlika između koštanog, mišićnog i masnog tkiva (Slika 12B). Prilikom analize masnog tkiva u CTAn programu definiran je niz računalnih operacija koji se sastojao od binarizacije podataka postavljanjem praga histogramске ljestvice (*General thresholding*) u vrijednostima od 11 do 18 kojom je izdvojeno masno od mišićnog tkiva. Uklonjene su zaostale bijele točke manje od 35 piksela (*Despeckle*) i analiziran je volumena tkiva u 3 dimenzije (*3D tissue analysis*) (Slika 12C). Dobiveni podaci sadržavali su vrijednosti za tkivni volumen (*TV*), volumen masnog tkiva (*FV*, eng. *fat tissue volume*) i postotak masnog tkiva u odnosu na volumen tkiva (*FV/TV*, eng. *fat volume/tissue volume*).





Slika 12. Visceralni dio štakora koji je snimljen za analizu masnog tkiva između L3 i L5 kralješka je označen crvenom bojom (A). Transaksijalni presjek kroz tijelo štakora nakon rekonstrukcije mikro CT snimaka gdje se može dobro vidjeti razlika između koštanog, mišićnog i masnog tkiva (B). Masno tkivo prikazano nakon filtriranja i binarizacije slika dobivenih mikro CT snimanjem (C).

## 4.5. DENZITOMETRIJA

Apsorpciometrija rendgenskih zraka dvostruke energije (*DXA*, od eng. *dual-energy x-ray absorptiometry*) je metoda za mjerenje koštane mineralne gustoće (*BMD*, od eng. *bone mineral density*). Temelji se na usmjerenosti rendgenskih zraka iz dva izvora različite energije na tijelo pacijenta ili uzorak kosti. Na temelju fantomskog predmeta, koji ima strogo definiranu gustoću, se utvrđuje referentni interval za određivanje koštanog mineralnog sadržaja (*BMC*, od eng. *bone mineral content*) i koštane mineralne gustoće (*BMD*, od eng. *bone mineral density*) u promatranom uzorku.

Denzitometrijsko snimanje izvršeno je pomoću Hologic QDR 4000 (Hologic, SAD) uređaja na *ex vivo* bedrenim kostima kao i lumbalnom dijelu kralješnice, gdje je analiziran L3 kralješak, iz obje sublinije WZ-5HT štakora. Kostu su snimane u modu visoke rezolucije (eng. *Regional high resolution scanning mode*). Normalizacija snimanja provedena je kalibrirajući DXA uređaj fantomskom kralješnicom dobivenom od proizvođača. Pripadajućim programom analizirane su kosti te su dobivene vrijednosti za koštanu mineralnu gustoću.

## 4.6. CIJELJENJE PRIJELOMA

U modelu prijeloma bedrene kosti istražen je utjecaj promijenjene homeostaze serotonina na cijeljenje kosti. U pokusu su korištene ženke soja WZ-5HT štakora iz obje sublinije starosti 8 mjeseci.

Životinje su uspavane intraperitonealnim injiciranjem kombinacije ketamina (0,8 mg/kg) i dijazepam (0,6 mg/kg). Dlaka na stražnjoj desnoj nozi je ošišana i koža sterilizirana 7,5% otopinom joda. Skalpelom je učinjen longitudinalni rez na koži ukupne duljine 2 cm. Radi lakšeg oporavka životinje, mišići su samo preparirani te je učinjen pristup bedrenoj kosti. Prijelom je izvršen električnom oscilatornom pilom (Aesculap, Njemačka) i oštricom širine 5 mm. Učvršćivanje fragmenata bedrene kosti napravljeno je uvođenjem čeličnog intramedularnog klina (Krichner-ov pin) promjera 2 mm kroz distalni dio bedrene kosti kako bi se očuvala pokretljivost uda u koljenu. Nakon stabilizacije fragmenata rez na koži sašiven je korištenjem Polysorb 2.0 (Ethicon, SAD) konca te je sašiveno mjesto dodatno tretirano Bivacin (Lek, Slovenija) sprejem kako bi se smanjila mogućnost infekcije. Za smanjenje bolova životinje su sljedeća 2 dana dobivale karprofen (2 mg/kg, Caliprofen, Genera, Hrvatska) supkutano jednom dnevno.

Rendgenske snimke životinja snimljene su 4 i 8 tjedana nakon prijeloma pomoću 1076 mikro CT uređaja kako bi se procijenio tijek cijeljenja prijeloma. Nakon 8 tjedana životinje su žrtvovane te su prikupljene bedrene kosti za daljnju analizu pomoću DXA i mikro CT uređaja te biomehaničkog testiranja. Intramedularni klinovi su izvađeni iz svih kostiju kako ne bi utjecali na rezultat prilikom snimanja na mikro CT uređaju.

Analiza cijeljenja prijeloma kosti provedene je pomoću CTAn programa. Područje od interesa definirano je sa 200 presjeka, što je preračunato iznosilo 3,6 mm, oko mjesta prijeloma. U definiranom području izmjereni su parametri koštanog volumena (BV) i površine (BS, od eng. *bone surface*) novostvorenog koštanog kalusa.

## 4.7. DINAMIČKA HISTOMORFOMETRIJA

Osnova dinamičke histomorfometrije temelji se na principu vezanja kemijskih spojeva koji imaju svojstvo fluorescencije za ione kalcija te posljedične ugradnje u kost

pomoću osteoblasta. U istraživanju je korištena metoda dvostrukog označavanja koštane pregradnje kalceinom (103). Kalcein otopljen u sterilnoj vodi u konačnoj koncentraciji od 10 mg/ml životinjama je injiciran intraperitonealno u količini od 10 mg/kg 7 i 3 dana prije žrtvovanja. Nakon žrtvovanja kosti su fiksirane u 10% puferiranoj otopini formaldehida u trajanju od 48 sati. Nakon fiksacije uzorci su uklopljeni u materijal metil-metakrilat kako bi se mogli rezati na mikrotomu bez potrebe za dekalciniranjem kosti. Uzorci su rezani na mikrotomu (Leica, Njemačka) te je debljina rezova iznosila 5  $\mu$ m. Prerezi životinja starih 2 mjeseca su bojani Masson trichrome tehnikom dok su prerezi životinja starih 12 mjeseci bojani Goldner tehnikom (104) i pokrivena HistoMount (Invitrogen, SAD) otopinom. Slike preparata su zabilježene pomoću fluorescentnog mikroskopa (Olympus, Japan) dok je mjerenje parametara napravljeno pomoću OsteoMeasure XP (Osteometrics, SAD) programa. Dobiveni parametri obuhvaćali su tkivne parametre debljine trabekula (*Tb.Th.*), broja trabekula (*Tb.N.*), razmaka između trabekula (*Tb.Sp.*), broj osteoblasta (*N.OB/BS*, eng. *number of osteoblasts/bone surface*) i broj osteoklasta (*N.Oc/BS*, eng. *number of osteoclasts/bone surface*). Odabrane 2 vremenske točke primjene kalceina u životinja omogućile su praćenje vremenski i prostorno odijeljene aktivnosti osteoblasta u stvaranju nove kosti, koja je bila vidljiva u obliku 2 odvojene fluorescentne fronte stvaranja kosti. Iz tog svojstva izmjereni su parametri stope stvaranja kosti (*BFR*, od eng. *bone formation rate*) i stope odlaganja minerala u kost (*MAR*, od eng. *mineral apposition rate*).

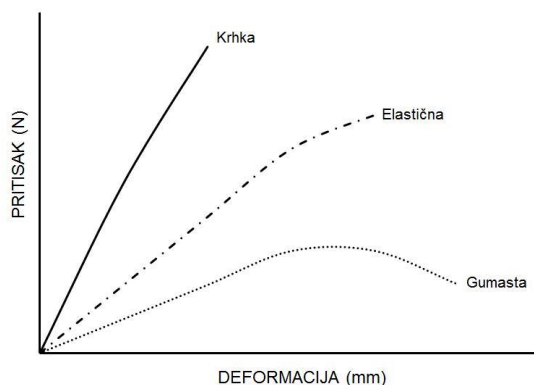
#### **4.8. BIOMEHANIČKO TESTIRANJE KOSTI**

Biomehanička svojstva bedrene kosti WZ-5HT životinja testirana su *ex vivo* pomoću uređaja Texture Analyzer TA.HD Plus (Texture Technologies, SAD). Testovi su uključivali test uvijanja u 3 točke (eng. *three point bending test*) za analizu kortikalne kosti i test udubljenja (eng. *indentation test*) za analizu trabekularne kosti. Test uvijanja u 3 točke proveden je tako što je bedrena kost stavljena na 2 paralelna nosača međusobno udaljena 15 mm. Nakon toga je pokrenut test s definiranim parametrima (Tablica 1) prema kojima se sonda spuštala i vršila pritisak na sredinu trupa bedrene kosti dok je uređaj mjerio silu u vremenu potrebnu za prijelom kosti. Kod kostiju iz pokusa s cijeljenjem prijeloma, sonda je spuštana na mjesto prijeloma, kako bi se analizirala čvrstoća zacijeljene kosti. Prema dobivenim dijagramima

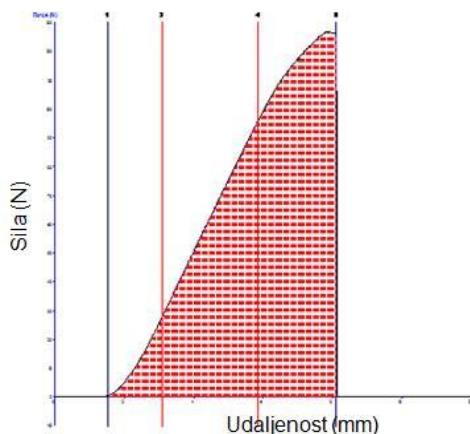
naprezanja kosti se može zaključiti je li kost krhka, u slučaju previše minerala, elastična, u slučaju previše kolagena, ili gumasta, u slučaju premalo minerala (Slika 13). Prilikom mjerenja uređaj je iscrtavao graf mjerenja sile po dužini prijeđenog puta sonde (Slika 14) iz kojeg su izračunati parametri za najveće opterećenje (N), krutost (N/mm) kao nagib krivulje i žilavost kosti kao energiju oslobođenu prilikom prijeloma (mJ).

Tablica 1. Parametri korišteni u testu uvijanja u 3 točke kortikalne kosti.

Test uvijanja u 3 točke	
Testni mod	Kompresija
Brzina prije početka testa	1 mm/sekunda
Testna brzina spuštanja sonde	0,1 mm/sekunda
Testna udaljenost	1,5 mm
Sila koja pokreće test	5 G



Slika 13. Dijagram naprezanja kostiju različitih svojstava. Iz krivulja pritisak/deformacija se mogu razlikovati krhke, elastične i gumaste kosti.

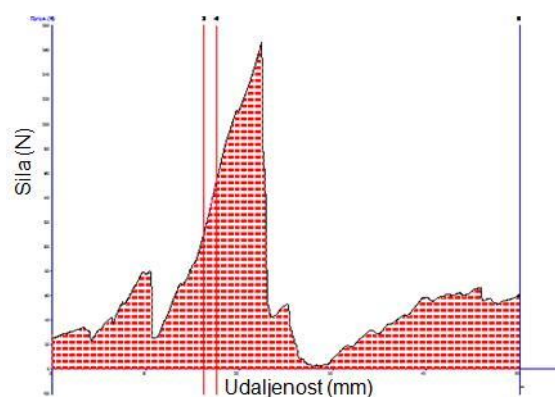


Slika 14. Krivulja pritisak/deformacija dobivena za test uvijanja u 3 točke kortikalne kosti napravljen na Texture Analyzer HD.Plus uređaju.

Kako bi se u testu udubljenja analiziralo jednako područje u svim kostima, nakon testa uvijanja u 3 točke uzet je distalni fragment bedrene kosti i izmjereno je 10 mm proksimalno od kondila te je fragment na ovom mjestu ispiljen kako bi se dobila ravna površina. Fragment je zatim postavljen u držač kako bi okrugla sonda promjera 2 mm mogla ući u medularni kanal kosti. Nakon toga je pokrenut test s definiranim parametrima (Tablica 2) prema kojima je sonda prodirala u medularni kanal, a uređaj je mjerio silu po dužini prijeđenog puta sonde potrebnu za lom trabekularne kosti (Slika 15). Iz dobivenih grafova su izračunati parametri za najveće opterećenje (N), krutost (N/mm) kao nagib krivulje i žilavost trabekularne kosti kao energiju oslobođenu prilikom prijeloma (mJ). Ukupna kompresivna čvrstoća ( $\sigma$ ) je mjera otpornosti trabekularne kosti na smanjenje volumena. Izračunata je kao omjer sile primijenjene okomito na poprečni presjek trabekularne kosti, prema formuli  $\sigma = F/r^2\pi$ , gdje je  $F$  najveća sila primijenjena na trabekularnu kost, a  $r$  je polumjer sonde (1mm).

Tablica 2. Parametri korišteni u testu udubljenja trabekularne kosti.

Test udubljenja	
Testni mod	Kompresija
Brzina prije početka testa	1 mm/sekunda
Testna brzina spuštanja sonde	0,1 mm/sekunda
Testna udaljenost	5 mm
Sila koja pokreće test	5 G



Slika 15. Krivulja pritisak/deformacija dobivena za test udubljenja trabekularne kosti napravljen na Texture Analyzer HD.Plus uređaju.

## 4.9. HORMONALNI STATUS WZ-5HT ŠTAKORA

Prilikom određivanja količine hormona u krvi WZ-5HT životinja fokus je stavljen na hormone koji utječu na metabolizam kosti i metabolizam glukoze. Hormoni su mjereni u plazmi WZ-5HT štakora pomoću komercijalno dostupnih ELISA kompleta.

Uzorci štakorske krvi prikupljeni su vađenjem iz retro-orbitalnog pleksusa oka pomoću staklenih kapilara. Prilikom vađenja životinje su blago anestetizirane intraperitonealnim injiciranjem ketamina (0,5 ml/kg) i izvađeno 1 ml krvi. Kako bi se prikupila plazma, uzorci krvi su vađeni u Vacutainer® epruvete (BD, SAD) volumena 2,8 ml presvučene EDTA antikoagulansom, dok su uzorci seruma izvađeni u Vacutainer® epruvete (BD, SAD) za odvajanje seruma. Unutar 30 minuta od vađenja krv je centrifugirana 15 minuta pri 1000 x g i 4°C. Uzorci plazme ili seruma su odvojeni u manje volumene od 200 µl i pohranjeni na -80°C do daljnjeg korištenja.

ELISA metoda se temelji na prepoznavanju određene molekule specifičnim protutijelima i provodi u pločicama s 96 bazenčića. Dno bazenčića je prekriveno protutijelima koja će specifično vezati određeni protein. Uzorci, standardi i kontrole nanose se na pločicu te se nakon perioda inkubacije ispiru pri čemu se uklanjaju slabo vezani proteini. Kako bi se otkrila prisutnost vezanih proteina, u svaki se bazenčić dodaju sekundarna protutijela konjugirana s enzimom, najčešće peroksidazom ili alkalnom fosfatazom. Nakon određenog inkubacijskog razdoblja, otopina sa sekundarnim protutijelima se ispiru te se konačno dodaje supstrat za enzim. Tijekom inkubacije u mraku, nastaje reakcija između enzima i supstrata, odnosno enzimi metaboliziraju supstrat te se pojavljuje obojenje u bazenčiću proporcionalno koncentraciji mjenog proteina u plazmi. U trenutku dovoljnog obojenja se reakcija prekida te se očitava optička gustoća pri određenoj valnoj dužini. Na osnovi vrijednosti optičkih gustoća standarda izračunava se standardna krivulja iz koje se zatim računaju koncentracije uzoraka.

Tablica 3. ELISA kompleti korišteni u određivanju hormonalnog statusa životinja.

ELISA komplet	Uzorak	Kataloški broj	Proizvođač
Estrogen	Plazma	MBS703614	MyBioSources, SAD
PTH	Plazma	60-2500	Immutopics, SAD
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	Serum	MBS704153	MyBioSources, SAD
Inzulin	Plazma	MBS702460	MyBioSources, SAD

Sva mjerenja ELISA kompletima (Tablica 3) napravljena su prema uputama proizvođača. Vrijednosti apsorbancija uzoraka prilikom korištenja ELISA kompleta izmjerena su koristeći BioTek EL808 (BioTek, SAD) čitač mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 450 nm. Izmjerene vrijednosti apsorbancije za sve komplete određene su u dvostrukim uzorcima (duplikatima) te je za daljnje računanje korištena srednja vrijednost. Kako bi se izračunala vrijednost koncentracije hormona u uzorcima korištena je krivulja standarda i nelinearna regresija sa 4 parametra.

#### **4.10. BIOKEMIJSKI PROFIL WZ-5HT ŠTAKORA**

Biokemijski parametri krvi WZ-5HT životinja izmjereni su na Roche Cobas 6000 (Roche, Njemačka) kliničkom kemijskom analizatoru. Svi reagensi, standardi i kontrole korišteni u mjerenju su dobavljeni od tvrtke Roche i napravljeni su za rad navedenim uređajem. Kalcij je izmjeren o-kresolftalein spektrofotometrijskom metodom (105). Količina fosfata u serumu izmjerena je spektrofotometrijski korištenjem molibden metode. Kolesterol u plazmi izmjeren je spektrofotometrijski pomoću metode s kolesterol oksidazom. Za mjerenje triglicerida korištena je enzimatska reakcija, dok je HDL direktno izmjeren spektrofotometrijski. Prilikom mjerenja hemoglobina A1c kao markera dijabetesa, korištena je turbidimetrijska metoda.

#### **4.11. TEST OPTEREĆENJA GLUKOZOM I INZULINOM**

Testovima opterećenja glukozom (*GTT*, od eng. *glucose tolerance test*) i inzulinom (*ITT*, od eng. *insulin tolerance test*) istražena je regulacija unosa i metabolizma glukoze u životinja s promijenjenom homeostazom 5-HT-a. Prije izvođenja testova životinjama je uklonjena hrana, za *GTT* preko noći, dok je prilikom izvođenja *ITT*-a hrana uklonjena 6 sati prije izvođenja. Uskraćivanje hrane životinjama je provedeno kao bi se ustalile vrijednosti te kako konzumacija hrane ne bi utjecala na izmjerene vrijednosti glukoze i inzulina. Kao direktan pokazatelj u oba testa mjerena je koncentracija glukoze u krvi WZ-5HT štakora. Na vrhu repa životinje napravljena je sitna ozljeda sterilnim skalpelom i glukoza je mjerena iz kapi krvi ručnim monitorom i trakicama za mjerenje glukoze (Abbot, SAD).

### **4.11.1. TEST OPTEREĆENJA GLUKOZOM**

Test opterećenja glukozom je standardan test učinkovitosti inzulina u smanjenju povišenih razina glukoze u krvi. U WZ-5HT štakora je intraperitonealno injicirana glukoza jednokratnom dozom od 1g/kg u volumenu od 1 ml fiziološke otopine. Razina glukoze u krvi je mjerena u vremenskim točkama prije injiciranja, 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injiciranja. Prije injiciranja životinjama je izvađeno 500 µl krvi iz retro-orbitalnog pleksusa oka u Microtainer® epruvete s EDTA (BD, SAD) kao antikoagulantom zbog uzimanja plazme za mjerenje razine inzulina.

### **4.11.2. TEST OPTEREĆENJA INZULINOM**

Test opterećenja inzulinom imao je za cilj pokazati učinkovitost povećane koncentracije inzulina u cirkulaciji na unos glukoze iz krvi u stanice. U životinja WZ-5HT štakora je intraperitonealno jednokratno injicirana 1 IU/kg inzulina (Humalog, Eli Lilly, Švicarska) u volumenu od 1 ml fiziološke otopine. Razina glukoze u krvi je mjerena u vremenskim točkama prije injiciranja, 30, 60 i 180 minuta nakon injiciranja.

## **4.12. STANIČNA KULTURA**

### **4.12.1. PRIMARNA KULTURA OSTEOLASTA**

Koštana srž je prikupljena propuhivanjem bedrene i goljenične kosti od po 2 štakora iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije starosti 3 mjeseca  $\alpha$ -modificiranim esencijalnim medijem ( $\alpha$ -MEM, Lonza, Belgija) kroz sterilnu iglu. Nakon centrifugiranja 5 minuta pri 300 x g suspenzija stanica je profiltrirana kroz stanično sito. Stanice su izbrojane pomoću tripan plavo metode i nasađene u pločice s 24 bazenčića (Falcon, SAD) u konačnoj gustoći od  $1 \times 10^6$  stanica/ml/bazenčiću. Stanice su nasađene u  $\alpha$ -MEM mediju u koji je dodan 1% penicilin i streptomycin (Gibco, SAD) i 10% dijalizirani fetalni goveđi serum (FBS; Invitrogen, SAD). Upotreba dijaliziranog seruma je ključna zbog uklanjanja 5-HT koji postoji u običnom serumu, kako bi dobiveni rezultati bili utjecaj samo dodanog 5-HT u staničnu kulturu. Četvrti dan od postavljanja primarne kulture promijenjeno je pola volumena medija u bazenčićima. Sedmi dan od postavljanja kulture medij je promijenjen u potpunosti u svakom bazenčiću te je dodan 10mM  $\beta$ -glicerofosfat (Sigma, SAD) i 50 µg/ml askorbinske kiseline (Sigma, SAD) kako bi se diferencirale osteoblastične stanice. Nakon toga je svaki treći dan



mijenjano pola volumena medija do 21. dana nakon uspostavljanja kada je kultura terminirana radi daljnje analize genskog izražaja.

#### **4.12.2. TRETMAN OSTEOLASTA**

Stanice izolirane iz koštane srži nasađene su u  $\alpha$ -MEM mediju u koji je dodan 1% penicilin i streptomycin (Gibco, SAD), 10% dijalizirani fetalni goveđi serum (FBS; Invitrogen, SAD) te 5-HT (Sigma, SAD) u konačnoj koncentraciji od 100nM, dok u kontrolnu kulturu nije dodavan 5-HT. Četvrti dan od postavljanja primarne kulture promijenjeno je pola volumena medija u bazenčićima. Sedmi dan od postavljanja kulture medij je promijenjen u potpunosti u svakom bazenčiću te je dodan 10mM  $\beta$ -glicerofosfat (Sigma, SAD) i 50  $\mu$ g/ml askorbinske kiseline (Sigma, SAD) kako bi se potaknula diferencijacija osteoblasta. Nakon toga je svaki treći dan mijenjano pola volumena medija do diferencijacije u zrele osteoblaste u kulturu 17 dana nakon uspostavljanja kada je dodan inzulin (Humalog®, Eli Lilly, Švicarska) u konačnoj koncentraciji od 1 $\mu$ M. Tako tretirana kultura terminirana je 21 dan nakon uspostavljanja radi daljnje analize genskog izražaja.

#### **4.12.3. PRIMARNA KULTURA OSTEOKLASTA**

Koštana srž je prikupljena propuhivanjem prikupljene bedrene i goljenične kosti od po 2 štakora iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije starosti 3 mjeseca  $\alpha$ -modificiranim esencijalnim medijem kroz sterilnu iglu. Nakon centrifugiranja 5 minuta pri 300 x g suspenzija stanica je profiltrirana kroz stanično sito. Stanice su izbrojane pomoću tripan plavo metode i nasađene u pločice sa 48 bazenčića (Falcon, SAD) u konačnoj gustoći od 7,5 $\times$ 10<sup>5</sup> stanica/0,5ml/bazenčiću. Stanice su nasađene u  $\alpha$ -MEM mediju u koji je dodan 1% penicilin i streptomycin (Gibco, SAD), 10% dijalizirani fetalni goveđi serum (FBS; Invitrogen, SAD), 20 ng/ml RANKL (R&D, SAD) i M-CSF (R&D, SAD) za potpunu diferencijaciju osteoklastičnih stanica do šestog dana nakon uspostavljanja kad je kultura terminirana radi daljnje analize genskog izražaja.

#### **4.12.4. TRETMAN OSTEOKLASTA**

Za tretman osteoklastičnih stanica koštana srž je izolirana iz neselektiranih WZ-5HT štakora starosti 3 mjeseca. Nakon izolacije iz koštane srži stanice su nasađene u  $\alpha$ -MEM mediju u koji je dodan 1% penicilin i streptomycin (Gibco, SAD) i 10% dijalizirani fetalni goveđi serum (FBS; Invitrogen, SAD), 20 ng/ml RANKL (R&D, SAD) i M-CSF (R&D, SAD) te 5-HT (Sigma, SAD) u konačnoj koncentraciji od 100nM ili/i inzulin

(Humalog®, Eli Lilly, Švicarska) u konačnoj koncentraciji od 1  $\mu$ M. Šestog dana nakon uspostavljanja je kultura terminirana radi daljnje analize utjecaja terapije na genski izražaj osteoklastičnih markera.

#### **4.13. IZOLACIJA UKUPNE RNA IZ STANICA**

Za analizu genskog izražaja stanica izolirana je ukupna RNA iz uzoraka pomoću Trizol otopine (Invitrogen, SAD). Na stanice u kulturi je dodano 1 ml Trizol otopine te su stanice odvojene s podloge pomoću strugača i prebačene u sterilne mikroepruvete od 1,5 ml (Eppendorf, Njemačka). Uzorci u mikroepruvetama su smrznuti na 24 sata na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ . Prilikom izolacije RNA na 1 ml korištene otopine Trizol dodano je 200  $\mu$ l kloroforma (Kemika, Hrvatska) te je uzorak centrifugiran 10 minuta pri 12 000 x g i  $4^{\circ}\text{C}$ . Izdvojena vodena faza prebačena je u nove mikroepruvete gdje je RNA izdvojena iz otopine dodavanjem 500  $\mu$ l izopropanola (Kemika, Hrvatska) te je oborena na dno mikroepruvete centrifugiranjem 10 minuta pri 12 000 x g i  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant je odbačen, a talog RNA je pročišćen dodavanjem 1 ml 75% etanola nakon čega je uslijedilo miješanje uzorka i centrifugiranje 5 minuta pri 10 000 x g i  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant je ponovo odbačen, dok je talog osušen u vremenskom periodu od 15 minuta pri  $37^{\circ}\text{C}$  kako bi se uklonili tragovi etanola. Talog je otopljen u odgovarajućem volumenu sterilne vode tretirane dietil pirokarbonatom (DEPC, Sigma, SAD) te inkubacijom u termomikseru (Eppendorf, Njemačka) pri  $50^{\circ}\text{C}$  do potpunog otapanja. Nakon otapanja pripremljena su razrjeđenja uzoraka u omjeru 1:100 za mjerenje koncentracije i čistoće izolirane RNA. Mjerenjem apsorbancije uzoraka pri 260 nm uređajem Biophotometer (Eppendorf, Njemačka) izmjerena je koncentracija RNA, dok je vrijednost čistoće dobivena omjerom apsorbancija izmjerenih pri 260 nm i 280 nm ( $A_{260/280}$ ).

#### **4.14. PREVOĐENJE RNA U KOMPLEMENTARNU DNA**

Za uklanjanje ostataka DNA u izoliranim uzorcima RNA korišten je enzim DNaza I (Invitrogen, SAD). U 25  $\mu$ l uzorka RNA dodano je 0,5  $\mu$ l enzima DNaza I te su uzorci inkubirani 60 minuta na temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$ .

Komplementarna DNA (eng. *cDNA*) dobivena je prepisivanjem 1 µg ukupne RNA korištenjem kompleta za reverznu transkripciju (Applied Biosystems, SAD) s oligo-dT početnicama čime je osigurano prepisivanje samo glasničke RNA (*mRNA*, od eng. *messenger RNA*). Sastav reakcijske smjese prilikom reverzne transkripcije napravljen je prema uputama proizvođača (Tablica 4). U reakcijsku smjesu je dodan izračunati volumen RNA za svaki uzorak u kojem je bio 1 µg ukupne RNA i dopunjena je reakcijska smjesa sterilnom H<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 10 µl. Reakcija prepisivanja napravljena je u GeneAmp Thermal Cyclor 2400 (Perkin-Elmer, SAD) uređaju. Početni korak reakcije je inkubacija uzorka RNA 10 minuta pri 25°C tijekom kojeg je došlo do sparivanja oligo-dT početnica s kalupom RNA. Uslijedio je korak produženja lanaca cDNA pri 37°C tokom 120 minuta. Zadnji korak je bio odvajanje enzima reverzne transkriptaze od kalupa RNA u uvjetima visoke temperature gdje je uzorak inkubiran pri 85°C tokom 5 minuta. Nakon prepisivanja, cDNA je razrijeđena u omjeru 1:2 koristeći sterilni 1x TE pufer, za inhibiciju DNaza enzima koji bi mogli degradirati uzorak, te je pohranjena na -20°C do analize izražaja gena.

Tablica 4. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju uzorka ukupne RNA.

Komponenta kompleta	Volumen (µl)
100× RT pufer	2,0
25× dNTP (100 mM)	0,8
50µM oligo dT primer	1,0
MultiScribe reverzna transkriptaza, 50 U/ µl	1,0
DEPC - H <sub>2</sub> O	x
RNA (1µg)	x
Ukupni volumen reakcijske smjese	10,0

#### 4.15. ANALIZA IZRAŽAJA GENA

Izražaj gena analiziran je metodom lančane reakcije polimeraze (*PCR*, od eng. *polymerase chain reaction*) u stvarnom vremenu korištenjem kompleta LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche, Švicarska) i uređaja Light Cyclor 1.5 (Roche, Švicarska). Metoda se temelji na umetanju boje SYBR Green I u dvolančanu strukturu molekule DNA. Boja apsorbira plavo svjetlo pri valnim duljinama od 497 nm dok emitira zeleno svjetlo pri valnim duljinama od 520 nm, što je svojstvo koje koristi

LightCycler uređaj za mjerenje fluorescencije. Prilikom eksponencijalnog umnažanja DNA molekule eksponencijalno raste i umetanje SYBR boje. Nakon prelaska vrijednosti praga (*Ct*, od eng. *cycle threshold*) uređaj bilježi točnu vrijednost ciklusa za kasniju analizu. Sastav reakcijske smjese za PCR u stvarnom vremenu prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Reakcijska smjesa LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green kompleta za analizu genskog izražaja u uzorku cDNA.

Komponenta kompleta	Volumen (μL)
DEPC - H <sub>2</sub> O	5,1
SYBR mix	2
25μM 5'-3' početnica	0,2
25μM 3'-5' početnica	0,2
cDNA	2,5
Ukupni volumen reakcijske smjese	10,0

Nakon denaturacije cDNA na 95°C tijekom 10 minuta, uslijedilo je 40 ciklusa umnažanja DNA po sljedećem obrascu: denaturacija lanca DNA pri 95°C tijekom 10 sekundi, vezanje početnice na odsječke DNA pri 60°C tijekom 5 sekundi i sinteza komplementarnog lanca pri 72°C tijekom 10 sekundi. Nakon umnažanja slijedila je analiza temperature mekšanja DNA (*T<sub>m</sub>*, od eng. *melting temperature*) koja je mjerilo specifičnosti početnica i produkta nastalog u PCR reakciji. Pri analizi se temperatura u uređaju podiže od 70°C do 95°C u koracima od 0,5°C u 10 sekundi. Prilikom svakog povećanja temperature uređaj mjeri fluorescenciju. Ako su početnice za analizu gena specifične, svi uzorci će imati jednaku temperaturu mekšanja. Geni od interesa kao i nukleotidni slijed početnica koji su analizirani prikazani su u Tablici 6, dok je kao „*housekeeping*“ gen korišten β-aktin. Svi uzorci nanoseni su u kao dvostruki uzorci (duplikati), a za daljnju analizu uzeta je srednja vrijednost dobivenih vrijednosti.

Tablica 6. Nukleotidni slijed početnica korištenih u analizi izražaja gena.

Gen	Ime gena	Smjer 5'-3'	Smjer 5'-3'
<i>5-Htt</i>	5-HT prijenosnik	TCTGAAAAGCCCCACTGGACT	TAGGACCGTGTCTTCATCAGGC
<i>Tph1</i>	Triptofan hidrosilaza 1	AGCATAACCAGCGCCATGAA	GGCATCATTGACGACATCGAG
<i>5Ht-1B</i>	5-HT receptor 1B	TGGCGTCAAGCCAAAGCGGA	AACTGGGCTCGGGTCAAGCG
<i>5Ht-2A</i>	5-HT receptor 2A	TTCACCACAGCCGCTTCAA	ATCCTGTAGTCCAAAGACTGGGATT
<i>5Ht-2B</i>	5-HT receptor 2B	GGCTGATTTGCTGGTTGGATTG	GGGCCATGTAGCCTCAAACATG
<i>Ocn</i>	Osteokalcin	AAGCCCAGCGACTCTGAGTCT	CCGGAGTCTATTCACCACCTTACT
<i>Alph</i>	Alkalna fosfataza	TGAATCGGAACAACCTGACTGA	TTCCACTAGCAAGAAGAAGCCTTT
<i>Trap</i>	Kisela fosfataza otporna na tartarat	ACGCCAATGACAAGAGGTTTC	AGGTGATCATGGTTTCCAGC
<i>Ctsk</i>	Katepsin K	AGACGCTTACCCGTATGTGG	CACTGCTCTCTTCAGGGCTT
<i>β-aktin</i>	Beta aktin	GCGCAAGTACTCTGTGTGGA	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC

Za analizu relativnog izražaja gena korištena je komparativna  $\Delta\Delta$ CT metoda (106). Metoda se temelji na principu mjerenja vrijednosti praga ciklusa (Ct). U svakom uzorku izmjerene su vrijednosti za „housekeeping“ gen (HKG), gen koji ima stalan izražaj bez obzira na uvjete okoline, kao i za gen od interesa (GOI). Vrijednosti Ct za „housekeeping“ gen korištene su za normalizaciju izražaja gena od interesa tako da je od Ct vrijednosti za GOI oduzeta Ct vrijednost HKG. Normalizirane vrijednosti genskog izražaja su za stanice izolirane iz 5HT-niske sublinije postavljene kao kontrolne vrijednosti, dok su vrijednosti genskog izražaja za stanice iz 5HT-visoke sublinije izračunate u odnosu na 5HT-nisku subliniju. Kako bi se dobile relativne vrijednosti promjene genskog izražaja, od normalizirane Ct vrijednosti GOI oduzeta je normalizirana Ct vrijednost GOI iz 5HT-niske sublinije te su te vrijednosti eksponencijalno uvećane za negativnu vrijednost prema formuli:

$$\text{Promjena izražaja gena} = 2^{-\Delta\Delta\text{normalizirana CT vrijednost}}$$

## **4.16. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

Dobiveni podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za svaki promatrani parametar. Sve statističke analize učinjene su s programom Statistica 10 (StatSoft, USA). Normalna razdioba vrijednosti potvrđena je Kolmogorov-Smirnov testom za sve dobivene podatke. Podaci o koncentraciji 5-HT-a u trombocitima, koštanoj mineralnoj gustoći, mikro CT, histomorfometrijskim i biomehaničkim parametrima, kao i biokemijskim i hormonalnim profiliranjem životinja te analizom izražaja gena u osteoblastičnih i osteoklastičnih stanica analizirani su primjenom Student t-testa. Razina značajnosti  $\alpha$  postavljena je na 0,05 i svi korišteni testovi bili su dvosmjerni.

## 5. REZULTATI

### 5.1. FENOTIPSKA OBILJEŽJA

Zbog jasno izraženog spolnog dimorfizma, nisu direktno uspoređivane životinje muškog spola sa životinjama ženskog spola. U ovom istraživanju promatrane su generacije F11 do F17 WZ-5HT štakora oba spola i starosti 2, 4 i 12 mjeseci. Broj promatranih jedinki u 2 mjeseca starih životinja iznosio je 6 po subliniji za oba spola. U 4 mjeseca starih životinja broj ženki iznosio je 10, dok je kod mužjaka promatrano 8 životinja po subliniji. U 12 mjeseci starih životinja broj promatranih jedinki iznosio je 6 po subliniji za oba spola.

Osnovni parametar prema kojem su razdvojene sublinije WZ-5HT štakora je količina 5-HT-a u trombocitima. Kod životinja oba spola količina 5-HT-a u trombocitima 5HT-visoke sublinije bila je značajno viša (Student t-test,  $p < 0,05$ ) u odnosu na 5HT-nisku subliniju. Mjerenjem mase životinja ustanovljena je razlika između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije od najranije dobi jer su kod životinja oba spola primijećene značajne razlike u tjelesnoj masi (Student t-test,  $p < 0,05$ ). Značajnu razliku u masi pratila je i razlika u dužini bedrene kosti čije je mjerenje pokazalo da životinje oba spola iz 5HT-visoke sublinije imaju značajno (Student t-test,  $p < 0,05$ ) duže bedrene kosti u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Tablica 7 i 8).

Tablica 7. Fenotipska obilježja mužjaka WZ-5HT štakora. Tjelesna masa, dužina bedrene kosti i koncentracija 5HT u trombocitima u sve tri promatrane životne dobi.

Dob	Sublinija	Masa (g)	Dužina bedrene kosti (mm)	5HT u trombocitima (ng/mg proteina)
2 mjeseca (N=6)	5HT-visoka	246,9 ± 7,1*	33,4 ± 0,37*	2,11 ± 0,22*
	5HT-niska	228,3 ± 16,6	32,48 ± 0,71	0,97 ± 0,16
4 mjeseca (N=8)	5HT-visoka	378,6 ± 33,7*	37,92 ± 0,74*	1,59 ± 0,2*
	5HT-niska	352,6 ± 22,3	36,46 ± 0,81	0,84 ± 0,14
12 mjeseci (N=6)	5HT-visoka	551,7 ± 39,7*	40,87 ± 0,68*	1,43 ± 0,14*
	5HT-niska	508,3 ± 22,1	39,08 ± 0,91	0,71 ± 0,14

\*  $p < 0,05$ ; vs. 5HT-niska sublinija

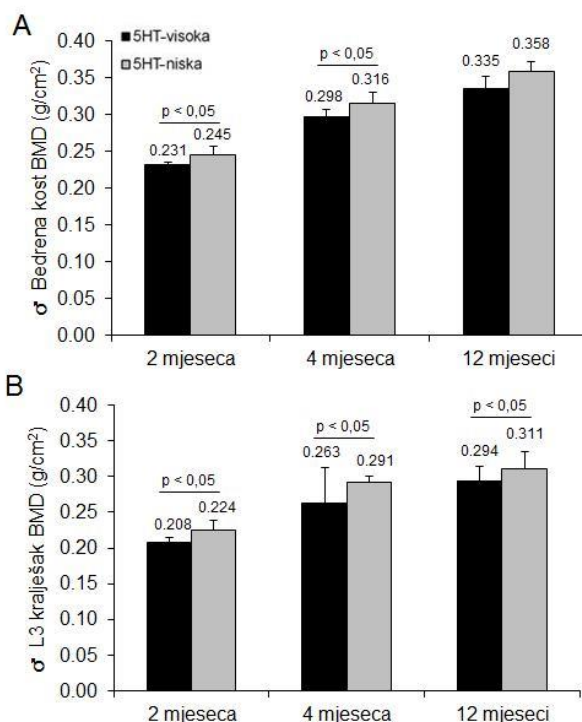
Tablica 8. Fenotipska obilježja ženki WZ-5HT štakora. Tjelesna masa, dužina bedrene kosti i količina 5HT u trombocitima u sve tri promatrane životne dobi.

Dob	Sublinija	Masa (g)	Dužina bedrene kosti (mm)	5HT u trombocitima (ng/mg proteina)
2 mjeseca (N=6)	5HT-visoka	213,3 ± 15,1*	33,23 ± 1,18*	1,95 ± 0,19*
	5HT-niska	197,5 ± 7,6	31,38 ± 0,71	0,86 ± 0,06
4 mjeseca (N=10)	5HT-visoka	237,9 ± 9,2*	33,45 ± 0,41*	1,58 ± 0,18*
	5HT-niska	218,2 ± 12,1	32,21 ± 0,98	0,84 ± 0,13
12 mjeseci (N=6)	5HT-visoka	293,8 ± 23,97*	36,17 ± 0,85*	1,50 ± 0,10*
	5HT-niska	265,9 ± 17,2	35,01 ± 0,62	0,79 ± 0,15

\* p<0,05; vs. 5HT-niska sublinija

## 5.2. KOŠTANA MINERALNA GUSTOĆA

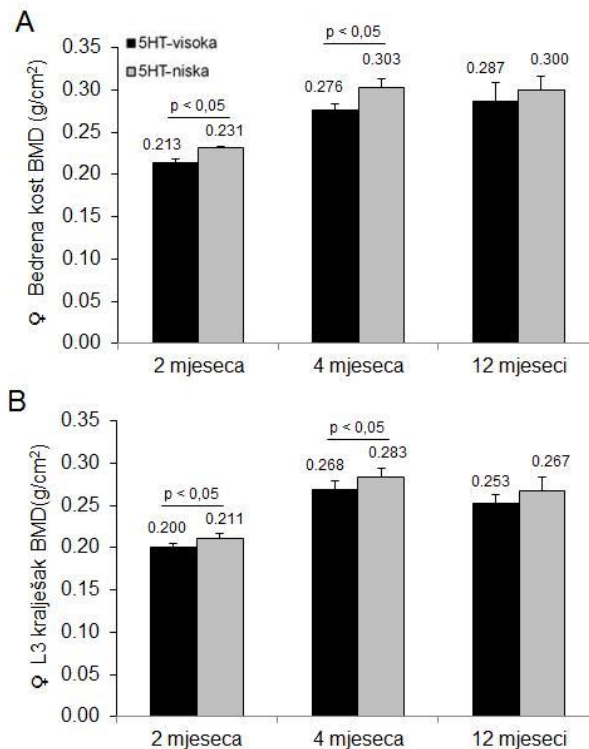
U mužjaka WZ-5HT štakora 2 i 4 mjeseca stare životinje s povišenom količinom 5HT-a su imale značajno smanjenu (Student t-test, p<0,05) koštanu mineralnu gustoću bedrene kosti (Slika 16A) i trećeg lumbalnog kralješka (Slika 16B). Kod 12 mjeseci starih mužjaka mineralna gustoća kosti je bila snižena u 5HT-visokih životinja, ali razlika nije bila statistički značajna na mjestu bedrene kosti u odnosu na 5HT-niske životinje (Slika 16A i 16B).



Slika 16. Koštanu mineralnu gustoću bedrene kosti (A) i 3. lumbalnog kralješka (B) u mužjaka WZ-5HT štakora.



Mjerenjem koštane mineralne gustoće bedrene kosti (Slika 17A) i trećeg lumbalnog kralješka (Slika 17B) u ženki WZ-5HT štakora dobivena je značajna razlika (Student t-test,  $p < 0,05$ ) između sublinija u 2 i 4 mjeseca starih životinja gdje su životinje s povišenom razinom 5HT-a imale smanjenu gustoću. Kod 12 mjeseci starih ženki mineralna gustoća bedrene kosti i trećeg lumbalnog kralješka je bila snižena u 5HT-visoke sublinije, ali razlika nije bila statistički značajna u odnosu na 5HT-niske životinje (Slika 17A i 17B).



Slika 17. Koštana mineralna gustoća bedrene kosti i 3. lumbalnog kralješka u ženskih WZ-5HT štakora.

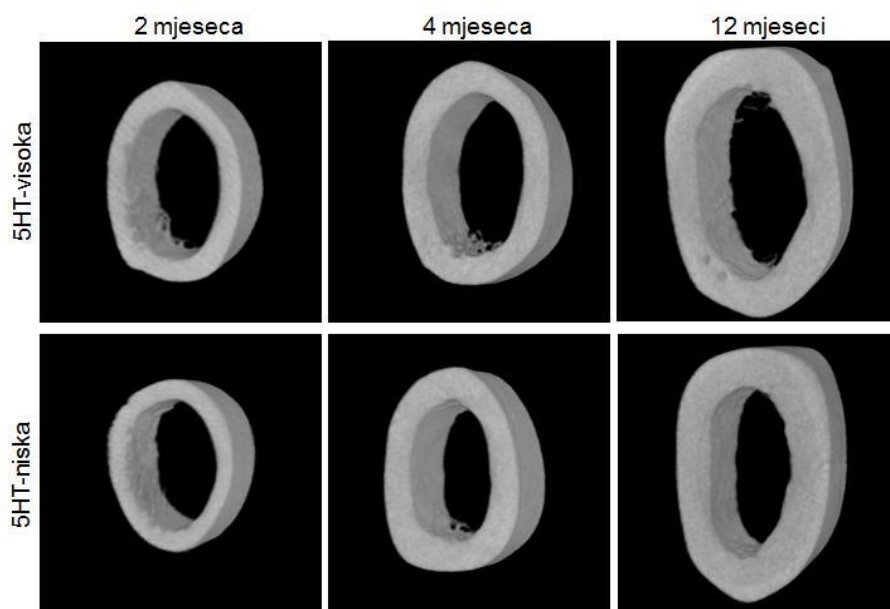
### 5.3. UTJECAJ SEROTONINA NA KORTIKALNU KOST

Analizom ukupnog tkivnog volumena kortikalne kosti dobivena je značajna razlika (Student t-test,  $p < 0,05$ ) između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije za mužjake u svim dobnim skupinama (Tablica 9 i Slika 18). Između koštanog volumena, kao i debljine kortikalne kosti, nije utvrđena značajna razlika između sublinija u promatranim životnim dobima. Ipak ukupna razlika u tkivom volumenu se odrazila na volumen medularnog kanala te je utvrđena značajna razlika u endostealnom volumenu kod mužjaka starih 2, 4 i 12 mjeseci.

Tablica 9. Vrijednosti parametara kortikalne kosti izmjerenih u muških WZ-5HT štakora na lokaciji distalne bedrene kosti.

Dob	Sublinija	TV (mm <sup>3</sup> )	BV (mm <sup>3</sup> )	EV (mm <sup>3</sup> )	Co.Th (mm)
2 mjeseca	5HT-visoka	17,17 ± 0,97*	8,66 ± 0,67	8,51 ± 0,99*	0,400 ± 0,033
	5HT-niska	15,59 ± 0,63	9,28 ± 0,78	6,31 ± 0,66	0,418 ± 0,017
4 mjeseca	5HT-visoka	19,99 ± 1,18*	11,22 ± 0,71	8,77 ± 0,58*	0,631 ± 0,020
	5HT-niska	17,02 ± 1,27	10,32 ± 0,58	6,70 ± 0,95	0,640 ± 0,020
12 mjeseci	5HT-visoka	23,42 ± 0,99*	14,22 ± 0,93	9,20 ± 0,53*	0,793 ± 0,048
	5HT-niska	22,19 ± 0,44	14,04 ± 0,63	8,15 ± 0,53	0,809 ± 0,044

\* p<0,05; vs. 5HT-niska sublinija



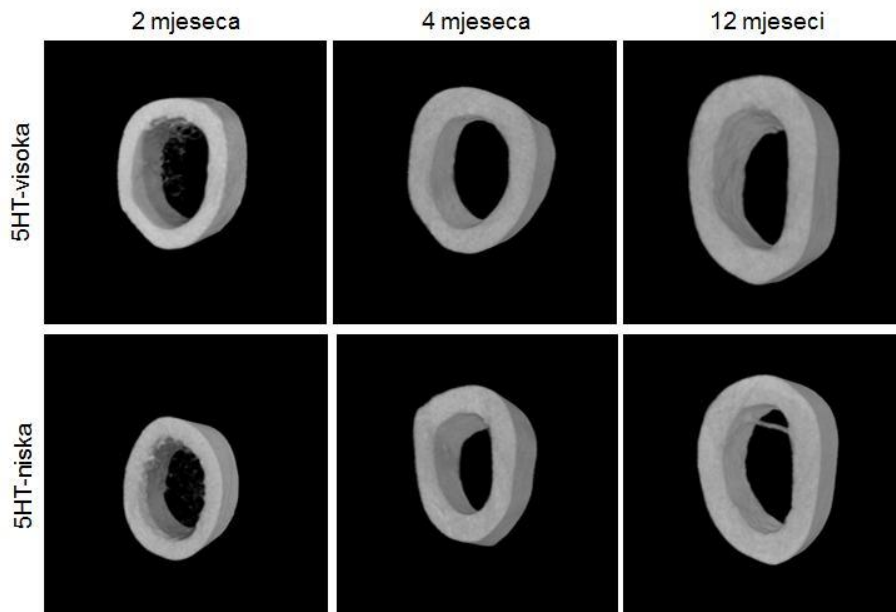
Slika 18. Prikaz kortikalne kosti analizirana mikro CT-om u mužjaka WZ-5HT štakora.

Kod ženki WZ-5HT štakora analizom ukupnog tkivnog volumena kortikalne kosti dobivena je značajna razlika (Student t-test, p<0,05) između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u svim dobnim skupinama (Tablica 10 i Slika 19). Analizom samog koštanog volumena, kao i debljine kortikalne kosti, nije utvrđena značajna razlika između sublinija u promatranim životnim dobima. Kao i kod mužjaka WZ-5HT štakora, ukupna razlika u tkivom volumenu se odrazila na volumen medularnog kanala te je utvrđena značajna razlika u endostealnom volumenu kod ženki starih 2, 4 i 12 mjeseci.

Tablica 10. Vrijednosti parametara kortikalne kosti izmjerenih u ženskih WZ-5HT štakora na mjestu bedrene kosti.

Dob	Sublinija	TV (mm <sup>3</sup> )	BV (mm <sup>3</sup> )	EV (mm <sup>3</sup> )	Co.Th (mm)
2 mjeseca	5HT-visoka	14,09 ± 1,21*	7,83 ± 0,50	6,26 ± 0,90*	0,544 ± 0,024
	5HT-niska	12,44 ± 0,95	7,68 ± 0,39	4,76 ± 0,58	0,556 ± 0,006
4 mjeseca	5HT-visoka	14,62 ± 1,04*	8,68 ± 0,48	5,94 ± 0,74*	0,613 ± 0,026
	5HT-niska	12,74 ± 0,96	8,44 ± 0,28	4,31 ± 0,83	0,627 ± 0,031
12 mjeseci	5HT-visoka	15,52 ± 1,21*	9,73 ± 0,95	5,80 ± 0,70*	0,646 ± 0,048
	5HT-niska	14,77 ± 1,07	9,78 ± 0,61	4,99 ± 0,61	0,664 ± 0,029

\* p<0,05; vs. 5HT-niska sublinija



Slika 19. Prikaz kortikalne kosti analizirane mikro CT-om u ženki WZ-5HT štakora.

#### 5.4. UTJECAJ SEROTONINA NA TRABEKULARNU KOST PERIFERNOG KOSTURA

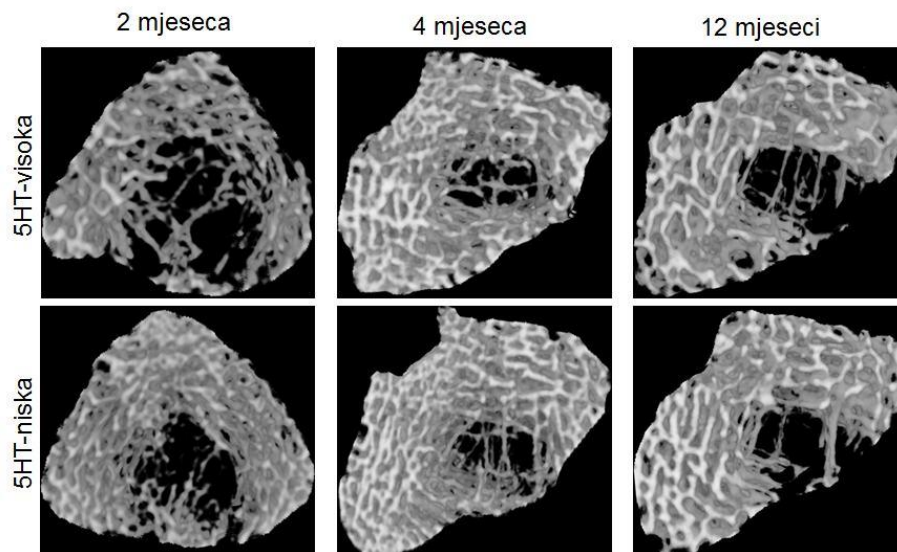
Analizom trabekularne kosti u području distalnog dijela bedrene kosti u svim dobnim skupinama mužjaka (Tablica 11) utvrđena je značajna razlika (Student t-test, p<0,05) između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u postotku trabekularnog koštanog volumena. Uz smanjeni postotak trabekularnog koštanog tkiva štakori iz 5HT-visoke sublinije imali su i veći razmak između trabekula te manji broj trabekula u području distalnog dijela bedrene kosti. Prilikom analize nije utvrđena razlika u debljini

trabekula između sublinija u mužjaka. Izmjerene razlike u trabekularnoj kosti između sublinija uočljive su u presjecima bedrene kosti (Slika 20) kao i na prikazima trabekularne kosti izdvojene prilikom mikro CT analize (Slika 21).

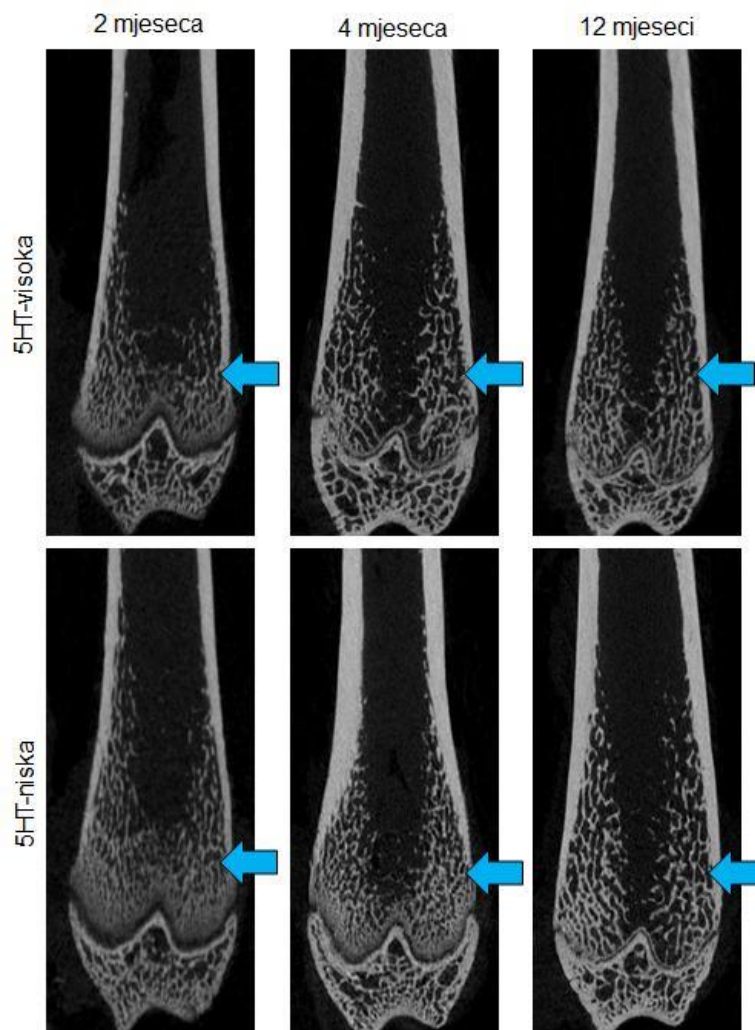
Tablica 11. Vrijednosti parametara trabekularne kosti izmjerenih u muških WZ-5HT štakora na mjestu distalne bedrene kosti.

Dob	Sublinija	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (mm <sup>-1</sup> )
2 mjeseca	5HT-visoka	14,47 ± 3,80*	0,101 ± 0,010	0,597 ± 0,114*	1,007 ± 0,212*
	5H-niska	19,68 ± 3,14	0,105 ± 0,005	0,425 ± 0,106	1,868 ± 0,234
4 mjeseca	5HT-visoka	23,16 ± 3,60*	0,115 ± 0,005	0,462 ± 0,066*	2,003 ± 0,259*
	5HT-niska	27,04 ± 3,66	0,113 ± 0,004	0,393 ± 0,077	2,383 ± 0,257
12 mjeseci	5HT-visoka	17,20 ± 3,79*	0,103 ± 0,003	0,713 ± 0,144*	1,671 ± 0,251*
	5HT-niska	21,67 ± 2,88	0,111 ± 0,004	0,575 ± 0,090	1,955 ± 0,310

\* p<0,05; vs. 5HT-niska sublinija



Slika 20. 3D prikaz izdvojenog područja trabekularne kosti distalnog dijela bedrene kosti za mikro CT analizu kod muških WZ-5HT štakora.



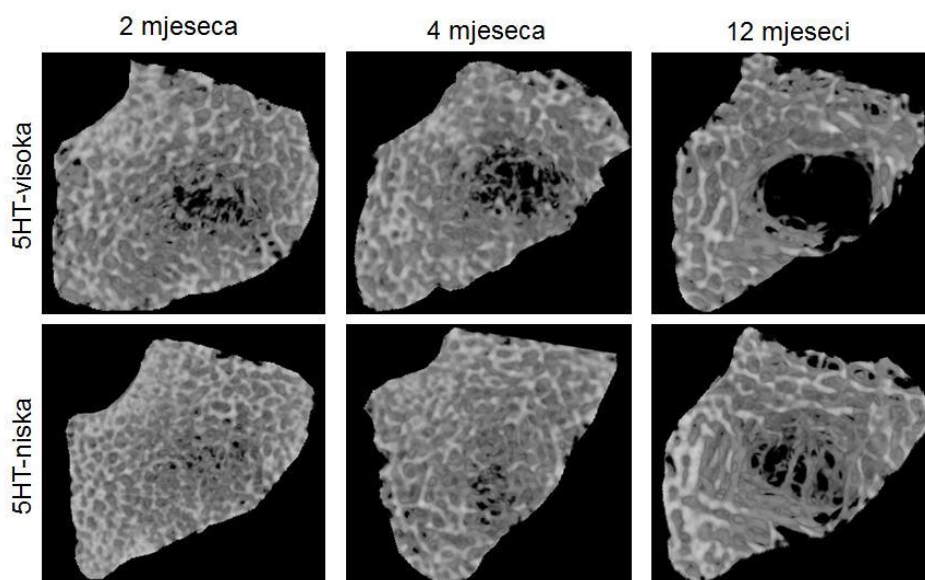
Slika 21. Transaksijalni presjek kroz distalni dio bedrene kosti muških WZ-5HT štakora. Strelicom je označena analizirana trabekularna kost.

U ženki je također u svim dobnim skupinama (Tablica 12) utvrđena značajna razlika (Student t-test,  $p < 0,05$ ) između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u postotku trabekularnog koštanog volumena. Uz smanjeni postotak trabekularnog koštanog tkiva ženke štakora iz 5HT-visoke sublinije imale su i veći razmak između trabekula te manji broj trabekula u području distalnog dijela bedrene kosti. Prilikom analize u ženki nije utvrđena razlika u debljini trabekula između sublinija. Izmjerene razlike u trabekularnoj kosti između sublinija uočljive su na prikazima trabekularne kosti izdvojene prilikom mikro CT analize (Slika 22) kao i u presjecima bedrene kosti (Slika 23).

Tablica 12. Vrijednosti parametara trabekularne kosti izmjerenih u ženskih WZ-5HT štakora na mjestu distalne bedrene kosti.

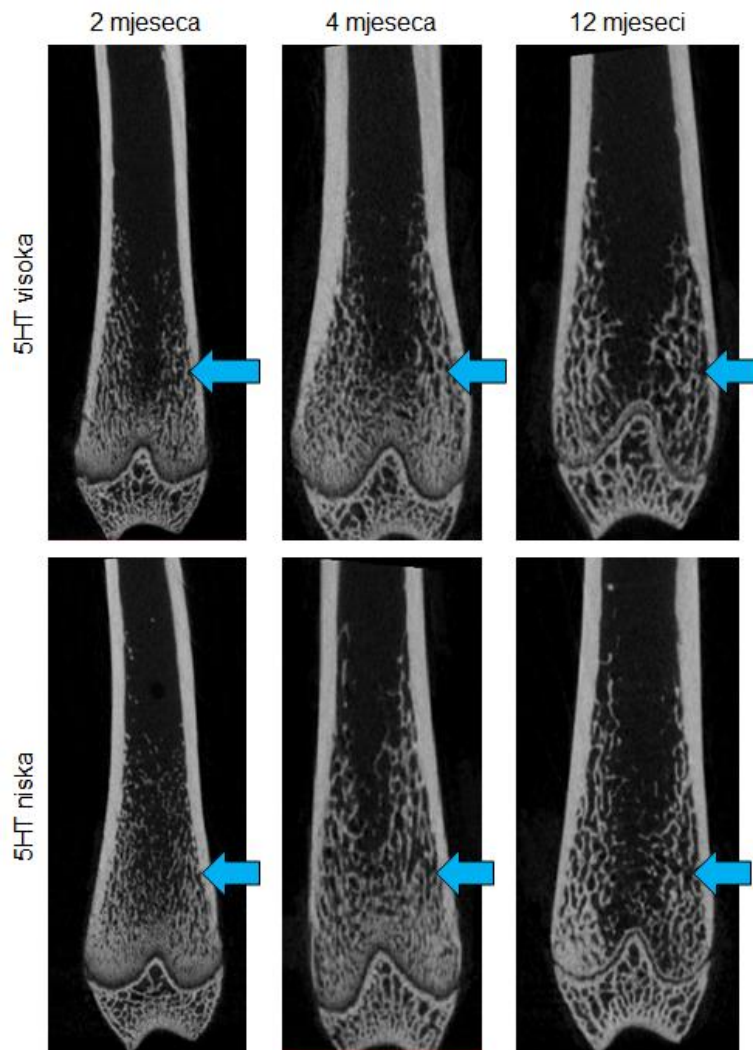
Dob	Sublinija	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (mm <sup>-1</sup> )
2 mjeseca	5HT-visoka	31,72 ± 3,24*	0,099 ± 0,002	0,241 ± 0,054*	3,208 ± 0,283*
	5HT-niska	37,35 ± 3,95	0,097 ± 0,002	0,177 ± 0,032	3,851 ± 0,404
4 mjeseca	5HT-visoka	30,43 ± 2,88*	0,114 ± 0,003	0,263 ± 0,034*	3,195 ± 0,189*
	5HT-niska	35,17 ± 3,39	0,111 ± 0,002	0,209 ± 0,049	3,913 ± 0,286
12 mjeseci	5HT-visoka	20,18 ± 5,55*	0,121 ± 0,006	0,771 ± 0,204*	1,655 ± 0,376*
	5HT-niska	25,16 ± 7,27	0,118 ± 0,003	0,588 ± 0,283	2,129 ± 0,579

\* p<0,05; vs. 5HT-niska sublinija



Slika 22. 3D prikaz izdvojenog područja trabekularne kosti distalnog dijela bedrene kosti za mikro CT analizu kod ženskih WZ-5HT štakora.





Slika 23. Transaksijalni presjek kroz distalni dio bedrene kosti ženskih WZ-5HT štakora. Strelicom je označena analizirana trabekularna kost.

## 5.5. UTJECAJ SEROTONINA NA TRABEKULARNU KOST AKSIJALNOG KOSTURA

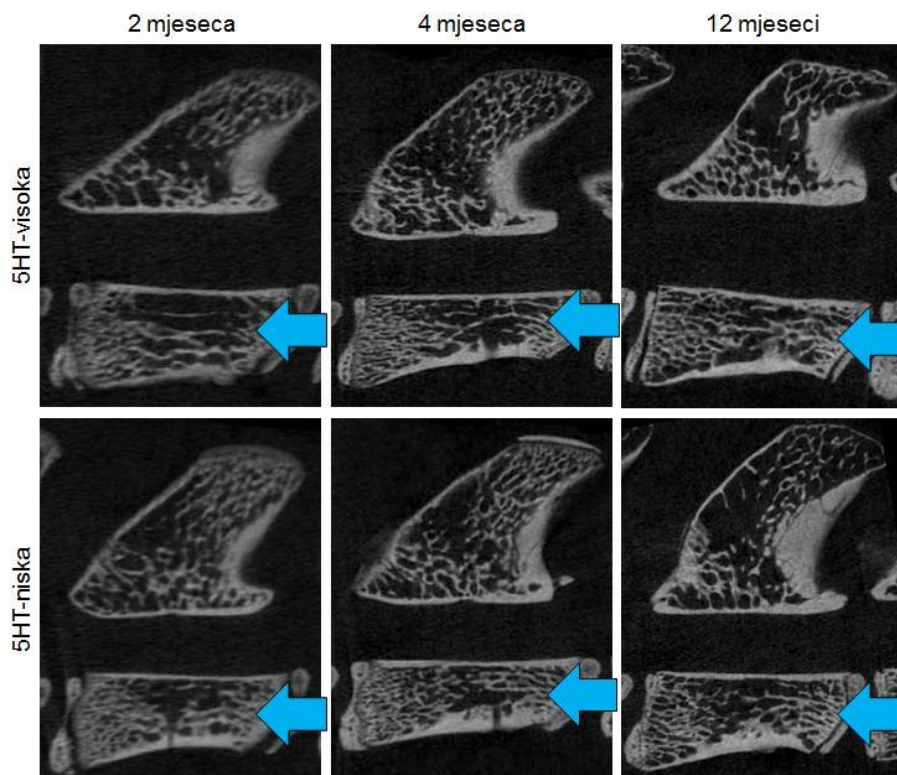
Analizom trabekularne kosti tijela trećeg kralješka u lumbalnom dijelu kralješnice (L3) u svim dobnim skupinama u mužjaka WZ-5HT štakora (Tablica 13) utvrđena je značajna razlika (Student t-test,  $p < 0,05$ ) između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u postotku trabekularnog koštanog volumena. Uz smanjeni postotak trabekularnog koštanog tkiva, štakori iz skupine s povišenim 5-HT-om imali su i veći razmak između trabekula te manji broj trabekula u tijelu trećeg lumbalnog (L3) kralješka. Prilikom analize nije utvrđena razlika u debljini trabekula između sublinija WZ-5HT štakora. Sagitalni presjek kroz treći lumbalni kralješak prikazuje izgled trabekularne kosti u različitoj dobi muških WZ-5HT štakora (Slika 24). Izmjerene razlike u trabekularnoj

kosti između sublinija uočljive su u prikazima L3 kralješka dobivenih mikro CT snimanjem (Slika 25).

Tablica 13. Vrijednosti parametara trabekularne kosti tijela trećeg kralješka u lumbalnom dijelu kralješnice izmjenjenih u muških WZ-5HT štakora.

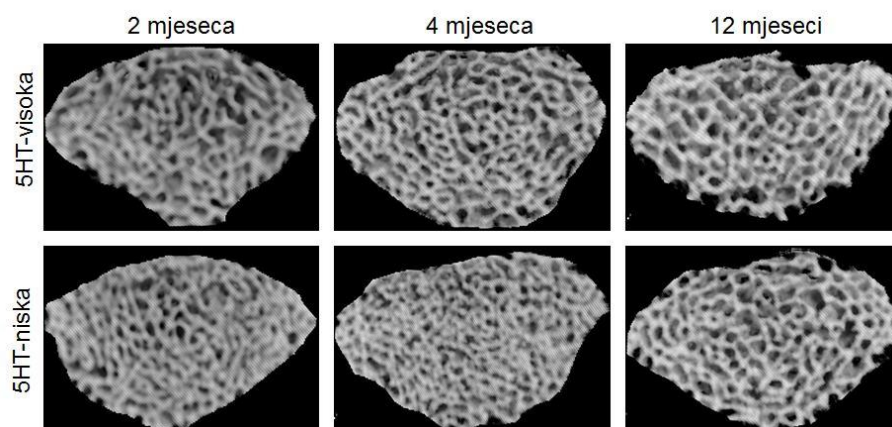
Dob	Sublinija	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (mm <sup>-1</sup> )
2 mjeseca	5HT-visoka	42,62 ± 2,60*	0,125 ± 0,003	0,261 ± 0,011*	3,024 ± 0,075*
	5HT-niska	46,71 ± 3,21	0,130 ± 0,007	0,194 ± 0,013	3,641 ± 0,128
4 mjeseca	5HT-visoka	41,11 ± 1,92*	0,121 ± 0,002	0,218 ± 0,008*	3,392 ± 0,137*
	5HT-niska	47,95 ± 1,94	0,123 ± 0,003	0,180 ± 0,008	3,900 ± 0,084
12 mjeseci	5HT-visoka	39,48 ± 3,07*	0,111 ± 0,002	0,207 ± 0,021*	3,167 ± 0,289*
	5HT-niska	43,66 ± 3,39	0,108 ± 0,004	0,187 ± 0,012	3,678 ± 0,233

\* p<0,05; vs. 5HT-niska sublinija



Slika 24. Sagitalni presjek kroz treći kralješak (L3) lumbalnog dijela kralješnice u muških WZ-5HT štakora. Strelicom je označena analizirana trabekularna kost.





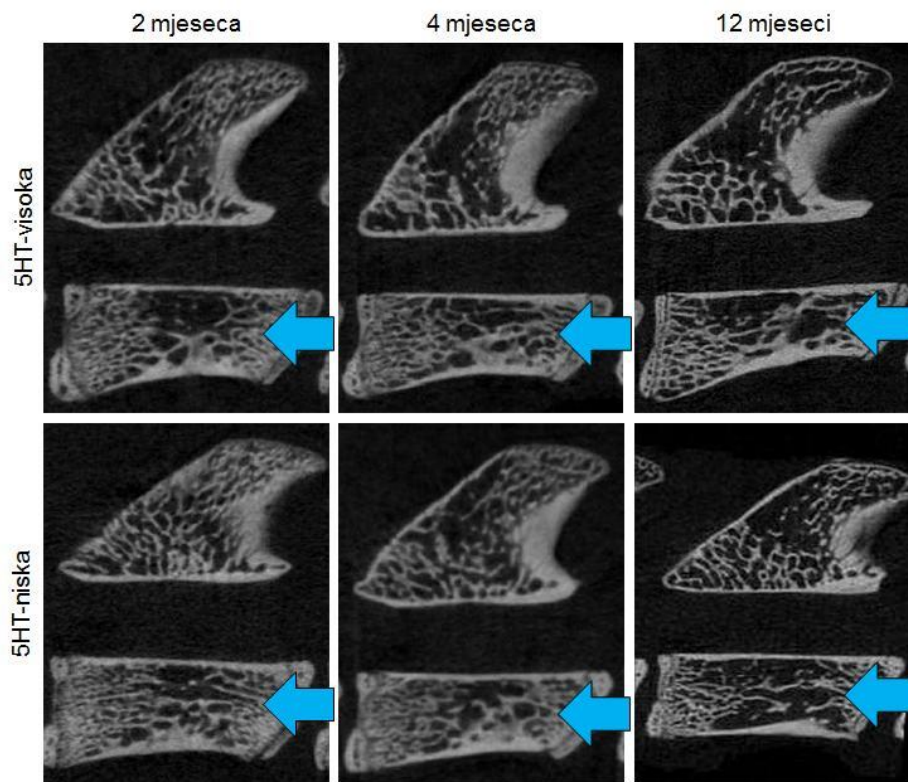
Slika 25. 3D prikaz izdvojenog područja tijela kralješka kod muških WZ-5HT štakora.

U ženki WZ-5HT štakora (Tablica 14) utvrđena je značajna razlika (Student t-test,  $p < 0,05$ ) između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u postotku trabekularnog koštanog volumena. Uz smanjeni postotak trabekularnog koštanog tkiva, ženke štakora iz skupine s povišenim 5-HT-om imale su i veći razmak između trabekula te manji broj trabekula u tijelu trećeg lumbalnog (L3) kralješka. Prilikom analize nije utvrđena razlika u debljini trabekula između sublinija WZ-5HT ženki štakora. Sagitalni presjek kroz treći lumbalni kralješak prikazuje izgled trabekularne kosti u različitoj dobi ženskih WZ-5HT štakora (Slika 26). Izmjerene razlike u trabekularnoj kosti tijela kralješka između sublinija uočljive su u prikazima L3 kralješka dobivenih mikro CT snimanjem (Slika 27).

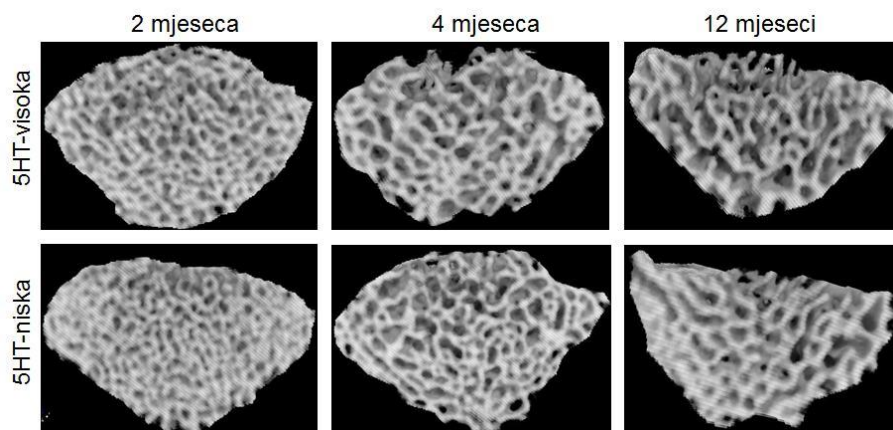
Tablica 14. Vrijednosti parametara trabekularne kosti tijela trećeg kralješka u lumbalnom dijelu kralješnice izmjerenih u ženskih WZ-5HT štakora.

Dob	Sublinija	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (mm <sup>-1</sup> )
2 mjeseca	5HT-visoka	45,77 ± 1,45*	0,121 ± 0,003	0,202 ± 0,007*	3,772 ± 0,087*
	5HT-niska	50,89 ± 1,79	0,118 ± 0,002	0,162 ± 0,005	4,316 ± 0,146
4 mjeseca	5HT-visoka	40,75 ± 2,43*	0,124 ± 0,003	0,229 ± 0,011*	3,294 ± 0,153*
	5HT-niska	44,14 ± 1,70	0,121 ± 0,003	0,197 ± 0,008	3,659 ± 0,093
12 mjeseci	5HT-visoka	33,06 ± 3,65*	0,121 ± 0,004	0,311 ± 0,050*	2,740 ± 0,266*
	5HT-niska	37,58 ± 5,36	0,116 ± 0,003	0,222 ± 0,035	3,220 ± 0,399

\*  $p < 0,05$ ; vs. 5HT-niska sublinija



Slika 26. Sagitalni presjek kroz treći kralješak (L3) lumbalnog dijela kralješnice u ženskih WZ-5HT štakora. Strelicom je označena analizirana trabekularna kost.



Slika 27. 3D prikaz izdvojenog područja tijela kralješka kod ženskih WZ-5HT štakora.

## 5.6. BIOMEHANIČKA SVOJSTVA BEDRENE KOSTI WZ-5HT ŠTAKORA

### 5.6.1. TEST UVIJANJA U 3 TOČKE

Biomehanička svojstva kortikalne kosti utvrđena su u ženki WZ-5HT štakora starih 2, 4 i 12 mjeseci testom uvijanja u 3 točke. Pritiskom sonde na srednji dio bedrene kosti utvrđena je sila koja dovodi do loma kost (najveće opterećenje), krutost bedrene kosti te žilavost kao ukupna energija koja se oslobodi prilikom loma kosti.

U ženki (Tablica 15) nije utvrđena razlika između sublinija u najvećem opterećenju kao ni energiji oslobođenoj prilikom loma kostiju. Kod 5HT-visokih životinja starih 2 mjeseca pronađeno je da je bedrena kost značajno elastičnija (Student t-test,  $p < 0,05$ ) u odnosu na životinje s niskom razinom serotonina, dok u dobi od 4 i 12 mjeseci nije pronađena razlika među sublinijama.

Tablica 15. Biomehanička svojstva kortikalne kosti WZ-5HT štakora.

Dob	Sublinija	Najveće opterećenje (N)	Krutost (N/mm)	Žilavost (mJ)
2 mjeseca	5HT-visoka	100.8 ± 14.7	608.9 ± 95.6*	180.9 ± 35.6
	5HT-niska	97.0 ± 14.7	392.1 ± 81.1	171.3 ± 37.8
4 mjeseca	5HT-visoka	112.1 ± 16.3	293.7 ± 76.3	252.4 ± 37.3
	5HT-niska	100.5 ± 20.3	301.8 ± 155.1	219.8 ± 39.4
12 mjeseci	5HT-visoka	117.3 ± 36.1	363.1 ± 120.0	272.4 ± 46.6
	5HT-niska	127.9 ± 22.5	328.8 ± 74.8	291.3 ± 73.9

\*  $p < 0,05$ ; vs. 5HT-niska sublinija

### 5.6.2. TEST UDUBLJENJA

Biomehanička svojstva trabekularne kosti u ženki WZ-5HT štakora starih 2, 4 i 12 mjeseci utvrđena su u distalnom dijelu bedrene kosti testom udubljenja. Ulaskom sonde u medularni kanal mjeri se najveća sila koja je potrebna za lom trabekularne kosti, ukupnu krutost trabekularna te žilavost kosti, kao energija koja se oslobađa prilikom loma, kao i ukupna snaga trabekula u distalnom dijelu bedrene kosti.

U ženki WZ-5HT štakora starih 2 mjeseca nije izmjerena razlika u trabekularnoj kosti prilikom testa udubljenja. U ženki starih 4 i 12 mjeseci vrijednosti najvećeg

opterećenja, krutosti i ukupne čvrstoće bili su značajno niži u 5HT-visoke sublinije u usporedbi s 5HT-niskom. Žilavost kosti se nije razlikovala između sublinija u sve tri dobne skupine (Tablica 16).

Tablica 16. Biomehanička svojstva bedrene trabekularne kosti WZ-5HT štakora.

Dob	Sublinija	Najveće opterećenje(N)	Krutost (N/mm)	Žilavost (mJ)	Ukupna čvrstoća ( $\sigma$ (N/mm <sup>2</sup> ))
2 mjeseca	5HT-visoka	65.6 ± 13.1	193.4 ± 34.6	70.3 ± 31.5	20.9 ± 4.2
	5HT-niska	66.1 ± 16.0	197.6 ± 49.5	78.8 ± 22.9	21.1 ± 5.1
4 mjeseca	5HT-visoka	77.8 ± 20.5*	198.3 ± 41.4*	136.7 ± 49.8	25.4 ± 6.5*
	5HT-niska	106.2 ± 27.4	224.2 ± 36.6	129.9 ± 29.6	33.8 ± 8.7
12 mjeseci	5HT-visoka	60.4 ± 31.1*	77.2 ± 49.3*	136.8 ± 73.6	19.2 ± 8.9*
	5HT-niska	86.6 ± 24.2	159.9 ± 46.8	170.1 ± 84.6	27.59 ± 7.7

\* p<0,05; vs. 5HT-niska sublinija

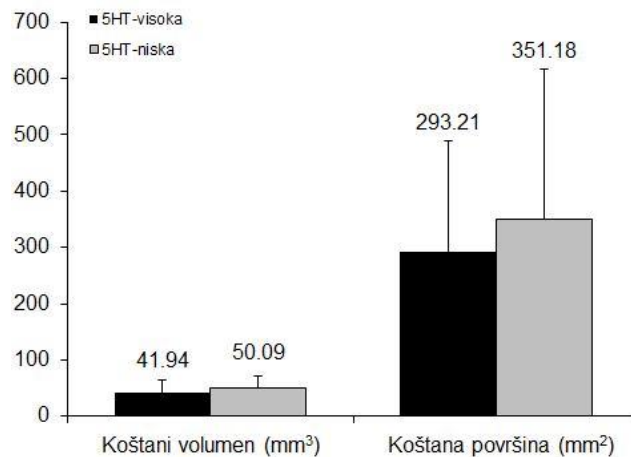
## 5.7. UTJECAJ SEROTONINA NA CIJELJENJE PRIJELOMA

U ženki WZ-5HT štakora starih 8 mjeseci istražen je utjecaj promijenjene serotoninske homeostaze na cijeljenje prijeloma. Nakon 8 tjedana cijeljenje je snimljeno i analizirano metodom mikro CT, dok je mineralizacija koštanog kalusa izmjerena denzitometrijski te je provedena i biomehanička analiza mjesta prijeloma.



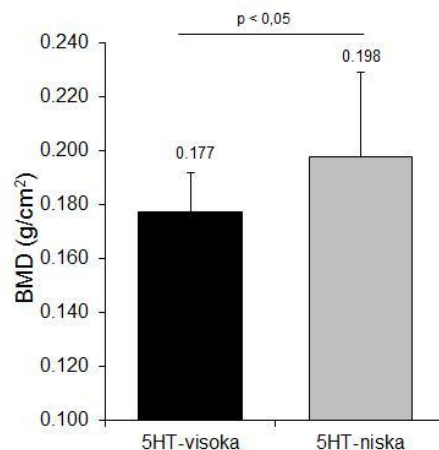
Slika 28. Cijeljenje prijeloma u 5HT-visokih i 5HT-niskih životinja vizualizirano rendgenskom snimkom (RTG) i transaksijalnim presjekom kroz kost nakon mikro CT snimke (mikro CT). Na RTG snimkama je vidljiv metalni intramedularni klin, koji je izvađen prilikom mikro CT snimanja.

Iako analizom koštanog kalusa nastalog na mjestu prijeloma nije dobivena značajna razlika između sublinija u koštanom volumenu i koštanoj površini (Slika 29), vidljiv je trend u kojem životinje s višom koncentracijom serotonina imaju manji volumen i površinu koštanog kalusa.



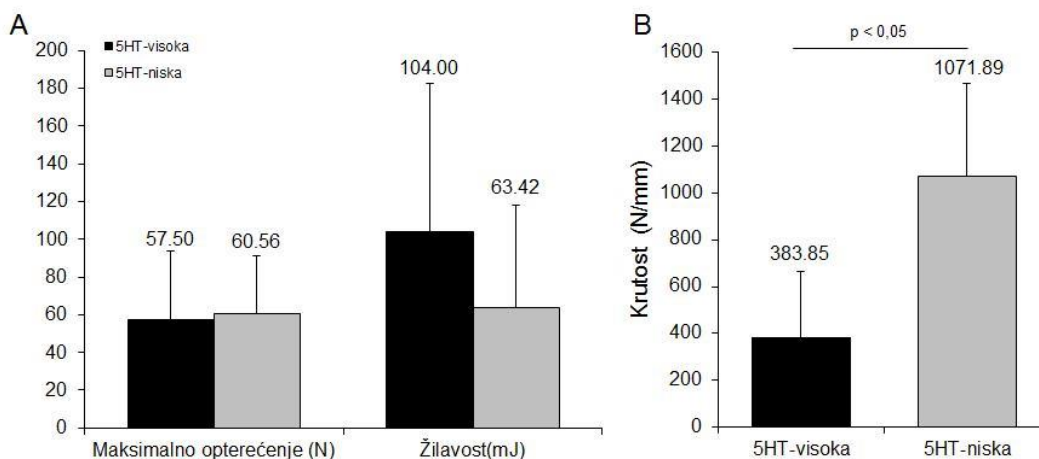
Slika 29. Mikro CT analiza koštanog kalusa na mjestu prijeloma u WZ-5HT štakora.

Okoštavanje novonastalog kalusa na mjestu prijeloma karakterizirano je mjerenjem koštane mineralne gustoće samog mjesta prijeloma. Izmjerene vrijednosti BMD-a pomoću DXA-e su pokazale višu količinu minerala u 5HT-visokih štakora u usporedbi sa 5HT-niskim štakorima (Slika 30).



Slika 30. BMD koštanog kalusa na mjestu zacijeljenog prijeloma u WZ-5HT štakora.

Biomehaničkim testiranjem nije utvrđena razlika u sili potrebnoj za ponovno induciranje prijeloma kao i energiji oslobođenoj prilikom prijeloma između sublinija (Slika 31A). Ipak, mjerenje elastičnosti slomljene kosti pokazalo je značajno smanjenje krutosti mjesta prijeloma kod životinja iz 5HT-visoke sublinije, što ukazuje na smanjenu mineralizaciju izvanstaničnog matriksa na mjestu prijeloma kod tih životinja (Slika 31B).



Slika 31. Biomehaničko testiranje mjesta cijeljenja u WZ-5HT štakora. Određena je sila potrebna za ponovni lom kao i energija oslobođena prilikom prijeloma (A), te krutost zacijeljene kosti (B).

## 5.8. KOŠTANA PREGRADNJA U WZ-5HT ŠTAKORA

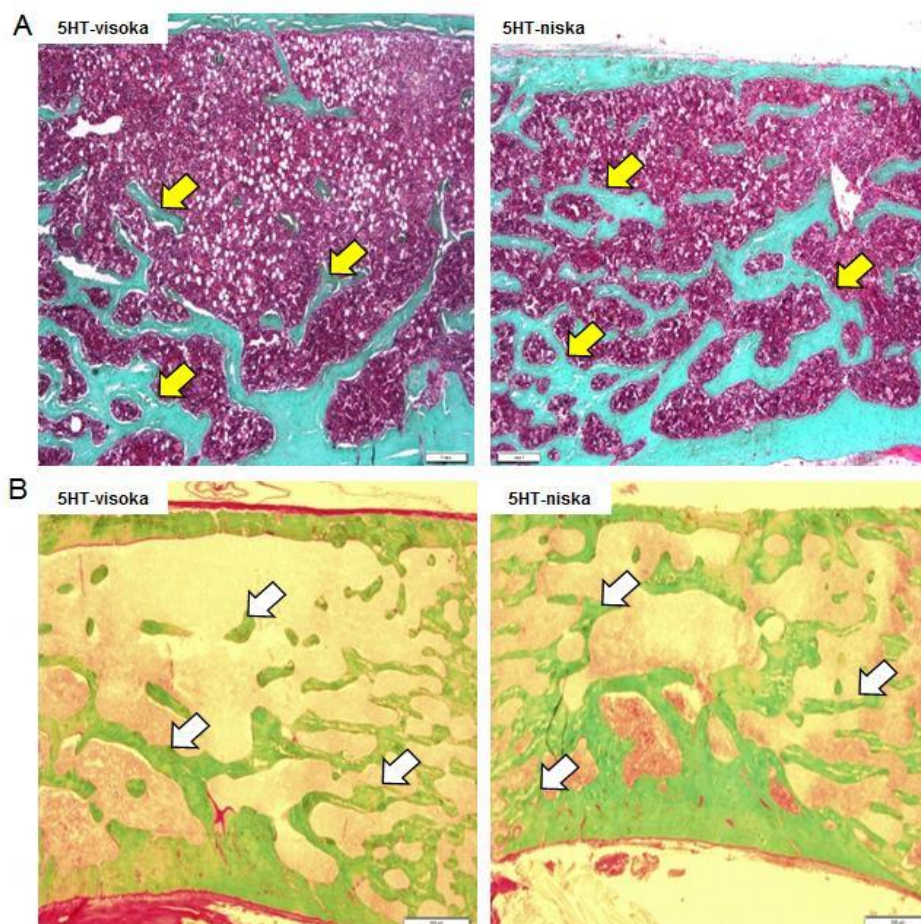
Već kod mladih životinja primijećeno je značajno smanjenje (Student t-test,  $p < 0.05$ ) koštanog volumena i broja trabekula, dok je razmak među trabekulama bio povećan kod 5HT-visoke sublinije. Debljina trabekula bila je jednaka u obje sublinije. U ostarjelih životinja zadržao se specifičan koštani fenotip kojeg karakterizira značajno smanjeni koštani volumen kao i broj trabekula i povećani razmak među trabekulama kod 5HT-visoke sublinije. U odnosu na mlade životinje primijećeno je zadebljanje trabekula starenjem (Tablica 17). Parametri prikazani u tablici 17 vidljivi su na histološkim prerezima L3 kralješka u mladih (Slika 32A) i starih (Slika 32B) ženki WZ-5HT štakora.

Tablica 17. Vrijednosti parametara trabekularne kosti tijela trećeg kralješka u lumbalnom dijelu kralješnice izmjerenih u 2 i 12 mjeseci starih ženki WZ-5HT štakora.

Dob	Sublinija	BV/TV (%)	Tb.Th ( $\mu\text{m}$ )	Tb.Sp ( $\mu\text{m}$ )	Tb.N ( $\text{mm}^{-1}$ )
2 mjeseca	5HT-visoka	$33.42 \pm 4.71^*$	$72.16 \pm 8.03$	$144.59 \pm 15.13^*$	$4.62 \pm 0.19^*$
	5HT-niska	$38.66 \pm 2.85$	$71.69 \pm 6.40$	$113.73 \pm 7.08$	$5.40 \pm 0.23$
12 mjeseci	5HT-visoka	$24.47 \pm 3.98^*$	$83.72 \pm 14.11^*$	$251.39 \pm 77.65^*$	$3.09 \pm 0.56^*$
	5HT-niska	$29.31 \pm 2.97$	$68.94 \pm 7.57$	$190.51 \pm 53.05$	$3.98 \pm 0.69$

\*  $p < 0,05$ ; vs. 5HT-niska sublinija





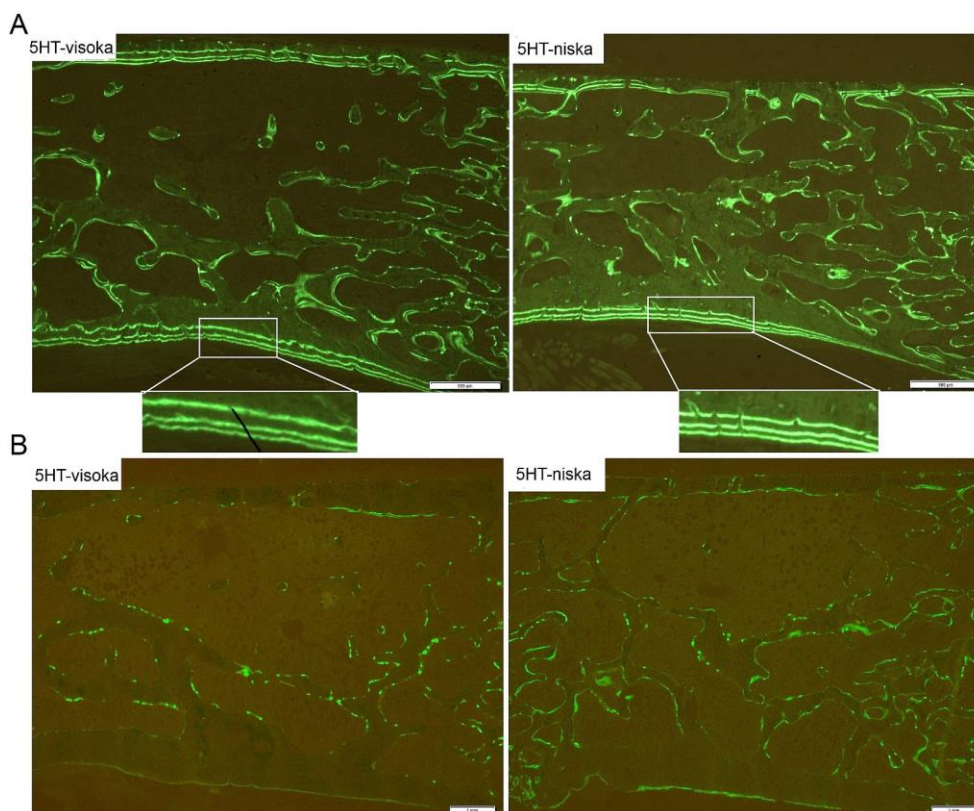
Slika 32. Trabekularna kost (označena strelicama) u tijelu trećeg kralješka (L3) prikazana Masson trichrome bojanjem u 2 mjeseca starih (A) i, bojanjem po Goldneru u 12 mjeseci starih (B) ženki WZ-5HT štakora.

Koštana pregradnja u mladih životinja bila je viša u 5HT-visoke sublinije gdje su odlaganje minerala u kost i stopa stvaranja kosti bili značajno viši, dok razlika u broju osteoblastičnih i osteoklastičnih stanica između sublinija nije primijećena. Starenjem životinja dolazi do usporavanja koštane pregradnje te nije primijećena promjena u odlaganju minerala u kost i stopi stvaranja kosti kao niti u broju osteoblastičnih i osteoklastičnih stanica na površini kosti između sublinija (Tablica 18). Ugradnja kalceina u novostvorenu kost vidljiva je na histološkim preparatima snimljenih fluorescentnim mikroskopom kod 2 mjesec (Slika 33A) i 12 mjeseci (Slika 33B) starih ženki WZ-5HT štakora.

Tablica 18. Vrijednosti parametara dinamičke histomorfometrije izmjerene u tijelu trećeg kralješka u lumbalnom dijelu kralješnice kod 2 i 12 mjeseci starih ženki WZ-5HT štakora.

Dob	Sublinija	MAR ( $\mu\text{m}/\text{dan}$ )	BFR/BS ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{godina}$ )	Oc.S/BS (%)	OB/BS (%)
2 mjeseca	5HT-visoka	$1.54 \pm 0.24^*$	$131.74 \pm 32.84^*$	$4.43 \pm 1.34$	$3.28 \pm 1.33$
	5HT-niska	$1.12 \pm 0.1$	$81.99 \pm 16.47$	$5.24 \pm 0.79$	$2.83 \pm 0.63$
12 mjeseci	5HT-visoka	$1.25 \pm 0.16$	$105.94 \pm 49.11$	$5.01 \pm 1.39$	$7.37 \pm 2.98$
	5HT-niska	$1.17 \pm 0.13$	$84.08 \pm 27.87$	$4.14 \pm 0.81$	$8.21 \pm 3.02$

\*  $p < 0,05$ ; vs. 5HT-niska sublinija

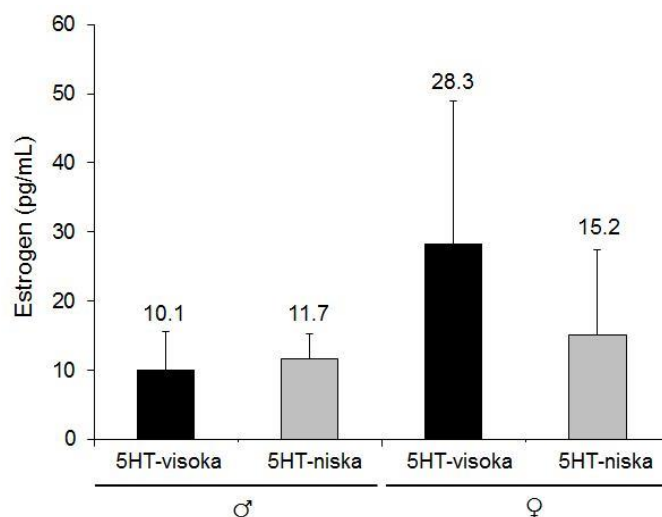


Slika 33. Koštana pregradnja promatrana pod fluorescentnim mikroskopom ugradnjom kalceina u novostvorenu kost tijela trećeg kralješka (L3) u 2 (A) i 12 mjeseci (B) starih ženki WZ-5HT štakora.

## 5.9. HORMONALNI STATUS WZ-5HT ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti estrogena nisu se razlikovale u mužjaka WZ-5HT štakora. U ženki, zbog neusklađenosti mjesečnih ciklusa istraživanih životinja, varijacija izmjerenih vrijednosti je bila dosta visoka, ali nije dobivena značajna razlika u vrijednostima estrogena između sublinija (Slika 34).

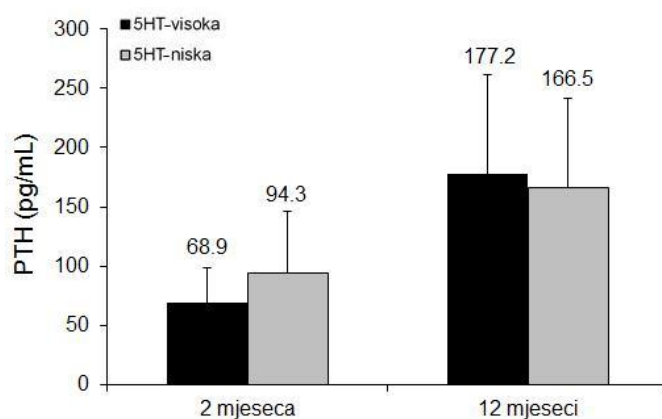




Slika 34. Vrijednosti estrogena u krvi muških (♂) i ženskih (♀) WZ-5HT štakora starih 2 mjeseca.

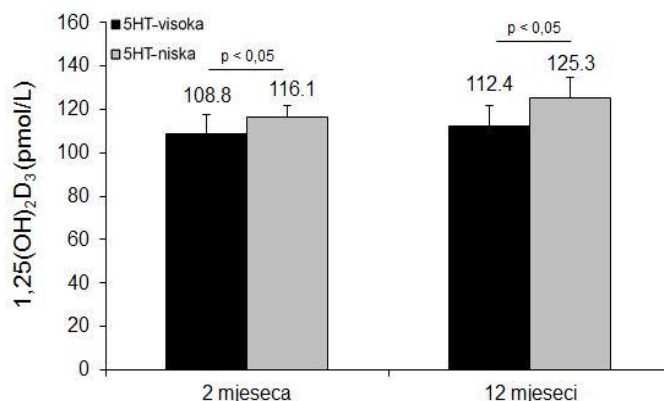
Iz dobivenih rezultata zaključeno je da estrogen ne utječe na 5HT sustav u WZ-5HT štakora te su zbog primjene 3R načela (eng. *Replacement, Reduction, Refinement*) u smanjenju broja životinja, u daljnjim pokusima utjecaja promijenjene homeostaze 5-HT na koštano tkivo korištene samo ženke iz obje sublinije WZ-5HT štakora, stare 2 mjeseca i 12 mjeseci.

Promijenjena homeostaza 5-HT-a nije imala utjecaj na koncentracije PTH u krvi WZ-5HT mladih i starih životinja (Slika 35).



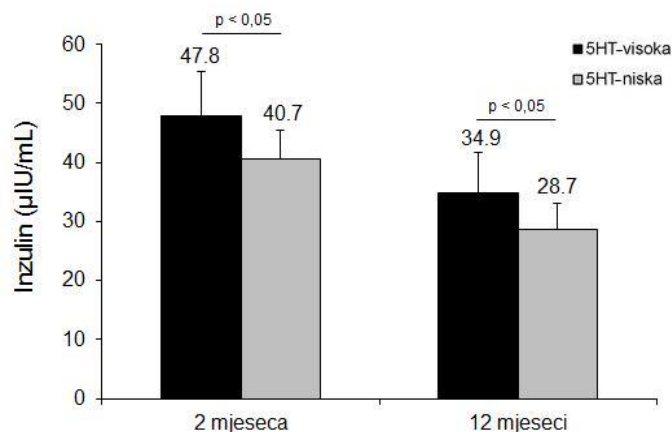
Slika 35. PTH vrijednosti u plazmi ženki WZ-5HT štakora starih 2 i 12 mjeseci.

Značajno smanjene vrijednosti hormona kalcitriola izmjerene su u mladim i u starih ženki 5HT-visoke sublinije (Slika 36).



Slika 36. Vrijednosti aktivnog metabolita vitamina D3, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, izmjerenih u serumu ženki WZ-5HT štakora starih 2 i 12 mjeseci.

Mjerenjem inzulina u plazmi dobivena je značajna razlika kod mladih životinja s promijenjenom homeostazom 5-HT-a. Starenjem životinja vrijednosti inzulina su smanjene, ali su životinje iz 5HT-visoke sublinije i dalje imale značajno više vrijednosti inzulina (Slika 37).

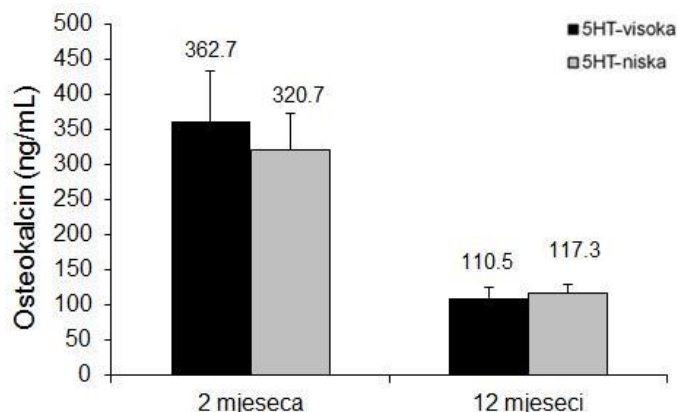


Slika 37. Vrijednosti inzulina izmjerene plazmi u ženki WZ-5HT štakora starih 2 i 12 mjeseci.

## 5.10. BIOKEMIJSKI PROFIL WZ-5HT ŠTAKORA

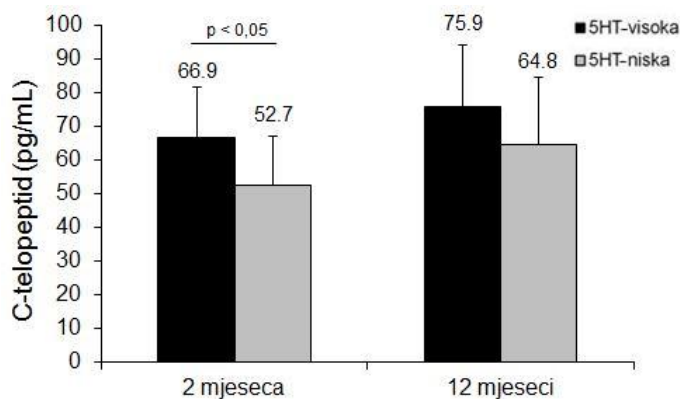
Kod određivanja biokemijskog profila u 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije WZ-5HT štakora, u obzir su uzeti parametri povezani s koštanim tkivom te metabolizmom glukoze i masti.

Vrijednosti osteokalcina, kao markera koštane izgradnje, u plazmi nisu pokazale razliku između sublinija kod mladih i starih životinja (Slika 38).



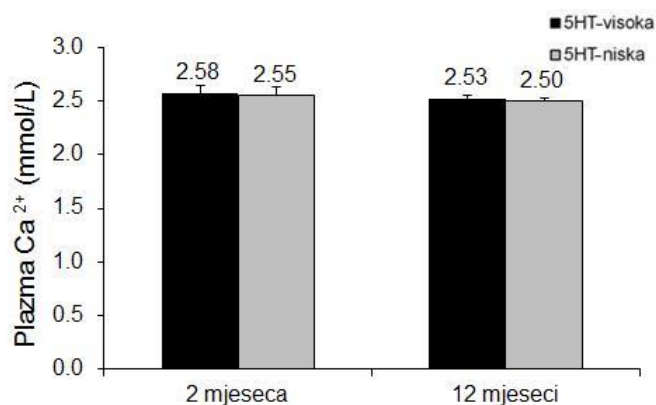
Slika 38. Vrijednosti osteokalcina u serumu 2 mjeseca i 12 mjeseci starih ženki WZ-5HT štakora.

Razlika u vrijednostima c-telopeptida u plazmi, kao markera koštane razgradnje, dobivena je u mladih životinja gdje su štakori iz 5HT-visoke sublinije imali značajno više koncentracije u plazmi, dok kod ostarjelih životinja nije dobivena značajna razlika (Slika 39).



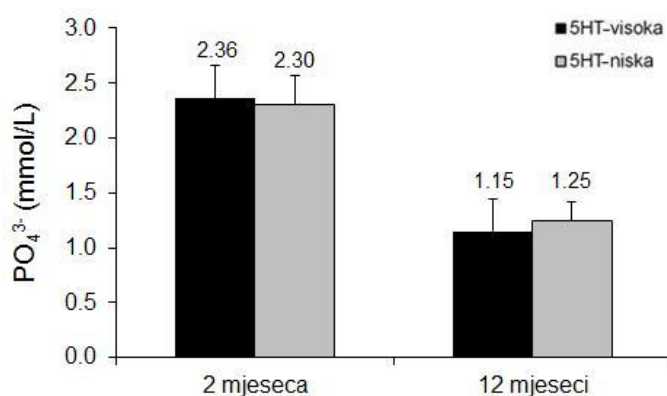
Slika 39. Vrijednosti c-telopeptida u plazmi 2 mjeseca i 12 mjeseci starih ženki WZ-5HT štakora.

Promijenjena homeostaza 5HT-a nije utjecala na fiziološku regulaciju koncentracije kalcija u krvi u WZ-5HT životinja, gdje nije bilo razlike u obje dobne skupine između sublinija (Slika 40).



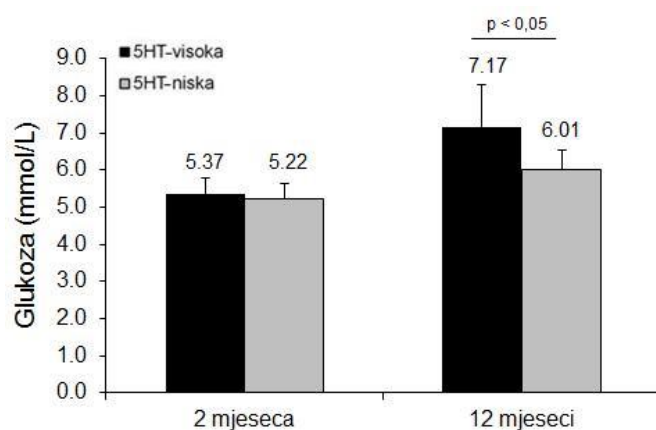
Slika 40. Koncentracija kalcijevih iona u serumu 2 i 12 mjeseci starih ženki WZ-5HT štakora.

Koncentracija fosfatnih iona u krvi nije se razlikovala između sublinija u mladih, kao ni u starih WZ-5HT štakora (Slika 41).



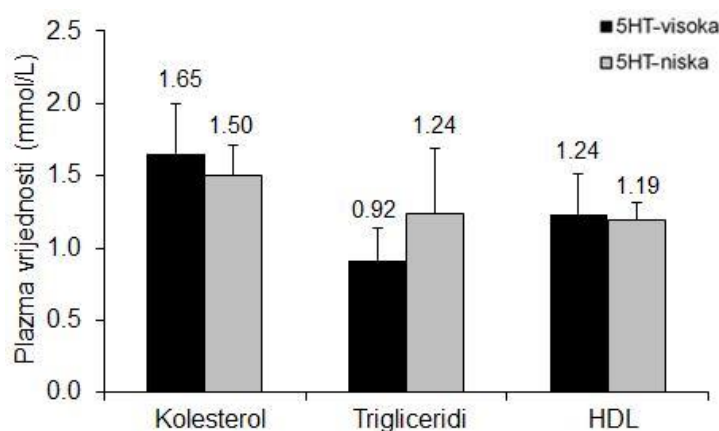
Slika 41. Koncentracija fosfatnih iona u serumu 2 i 12 mjeseci starih WZ-5HT štakora.

U WZ-5HT životinja nije izmjerena značajno viša koncentracija glukoze u krvi u dobi od 2 mjeseca. Starenjem se koncentracija glukoze povećava te je u ostarjelih životinja iz 5HT-visoke sublinije izmjerena značajno viša koncentracija koja izlazi iz okvira fiziološkog raspona regulacije glukoze (Slika 42).



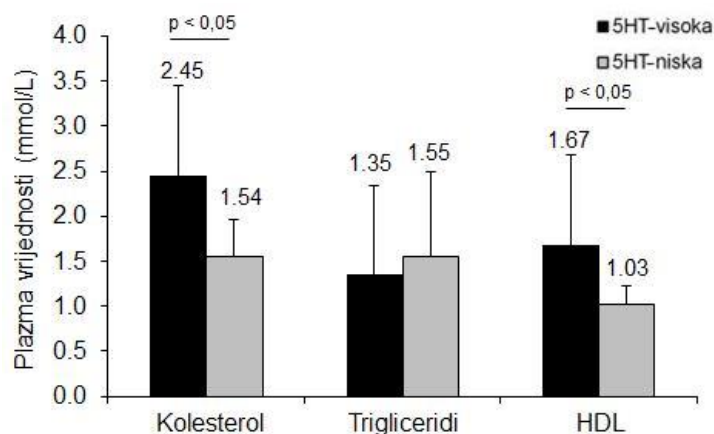
Slika 42. Koncentracija glukoze u krvi 2 i 12 mjeseci starih WZ-5HT štakora.

U WZ-5HT životinja starih 2 mjeseca nije primijećen utjecaj promijenjene količine 5-HT na metabolizam lipida jer nije bilo razlike u izmjeranim vrijednostima kolesterola, triglicerida i HDL-a između sublinija (Slika 43).



Slika 43. Vrijednosti kolesterola, triglicerida i HDL-a izmjerene u plazmi 2 mjeseca starih WZ-5HT štakora.

U životinja starih 12 mjeseci izmjerena je razlika u kolesterolu i HDL-u gdje su životinje iz 5HT-visoke sublinije imale značajno više vrijednosti u plazmi u usporedbi sa životinjama iz 5HT-niske sublinije (Slika 44). U vrijednostima triglicerida nije primijećena razlika između sublinija.



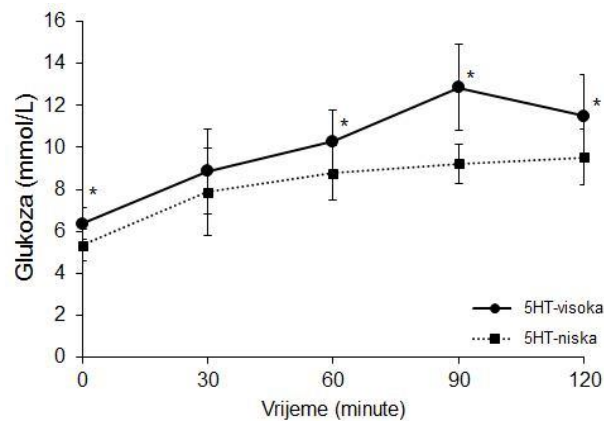
Slika 44. Vrijednosti kolesterola, triglicerida i HDL-a izmjerene u plazmi 12 mjeseci starih WZ-5HT štakora.

## 5.11. GLUKOZNI METABOLIZAM U WZ-5HT ŠTAKORA

Zbog izmjerenih razlika između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u količini inzulina i glukoze u krvi, napravljeni su testovi opterećenja glukozom (*GTT*, od eng. *glucose tolerance test*) i inzulinom (*ITT*, od eng. *insulin tolerance test*) kako bi se utvrdila

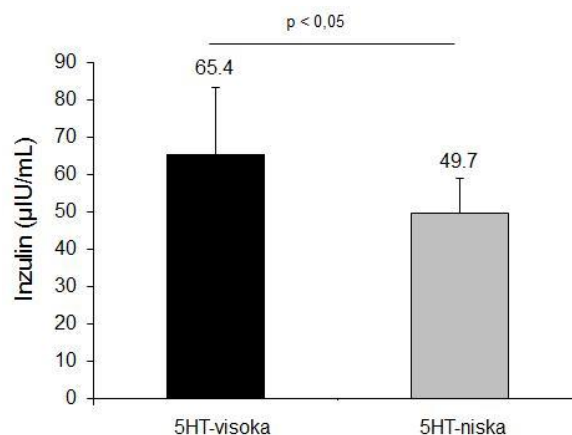
učinkovitost održavanja fiziološke razine glukoze u krvi u obje sublinije. U testu opterećenja glukozom ženke WZ-5HT štakora su injicirane otopinom glukoze te im je mjerena koncentracija glukoze u krvi tokom 120 minuta, a u testu opterećenja inzulinom, kao direktni pokazatelj, također je mjerena koncentracija glukoze u krvi tokom 180 minuta.

Razlike u količini glukoze između sublinija prisutne su kod 6 mjeseci starih ženki, gdje je 5HT-visoka sublinija imala značajno višu koncentraciju glukoze u krvi prije početka testa. Nakon 30 minuta od injiciranja glukoze nije izmjerena značajna razlika između sublinija, dok je nakon 60, 90 i 120 minuta izmjerena značajno viša razina glukoze u 5HT-visokoj subliniji (Slika 45).



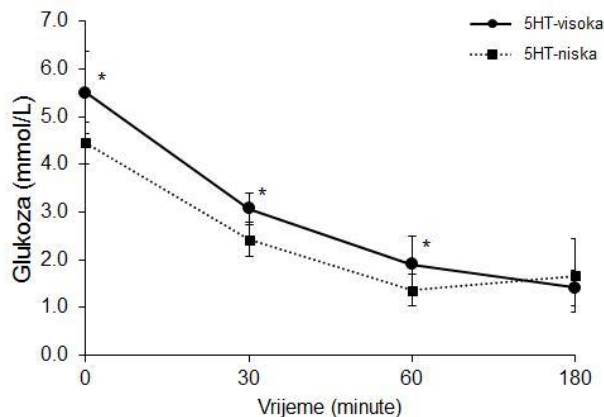
Slika 45. Test opterećenja glukozom u 6 mjeseci starih WZ-5HT ženskih štakora. Mjerene su vrijednosti glukoze u krvi u vremenskim točkama od 30, 60, 90 i 120 minuta (\*  $p < 0,05$ ; vs. 5HT-niska sublinija).

Koncentracija inzulina izmjerena prije početka testa opterećenja glukozom bila je značajno viša u 6 mjeseci starih ženki 5HT-visoke sublinije (Slika 46).



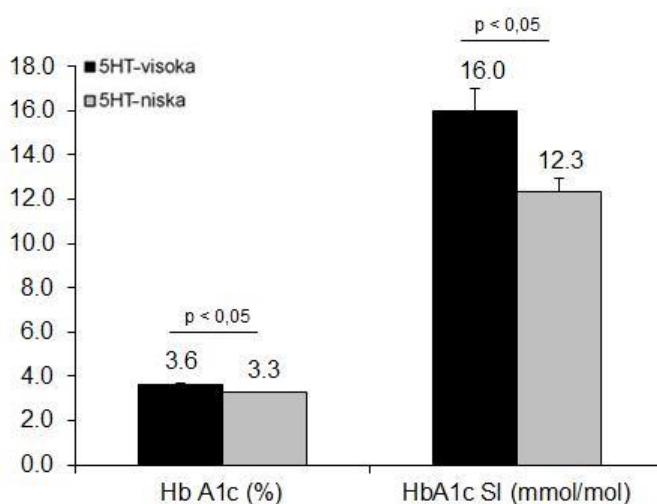
Slika 46. Koncentracije inzulina izmjerene u plazmi 6 mjeseci starih ženki WZ-5HT štakora.

Nakon injiciranja inzulina dolazi do pada glukoze u krvi u obje sublinije, ali se razlika između sublinija zadržava u vremenskim točkama od 30 i 60 minuta, gdje su ženke iz 5HT-visoke sublinije imale značajno više vrijednosti. Nakon 180 minuta vrijednosti glukoze se izjednačavaju između sublinija (Slika 47).



Slika 47. Test opterećenja inzulinom (ITT) u 6 mjeseci starih WZ-5HT ženskih štakora. Mjerene su vrijednosti glukoze u krvi u vremenskim točkama od 30, 60 i 180 minuta (\*  $p < 0,05$ ; vs. 5HT niska sublinija).

Glicirani hemoglobin ili hemoglobin A1c (Hb A1c) se koristi kao robustan parametar dugotrajnog poremećaja metabolizma glukoze. U ženki WZ-5HT štakora starih 6 mjeseci je mjerenjem Hb A1c pronađena statistički značajna razlika u količini ovog markera. Životinje iz 5HT-visoke sublinije imale su viši postotak Hb A1c u odnosu na normalni hemoglobin kao i više Hb A1c u krvi u usporedbi sa životinjama iz 5HT-niske sublinije (Slika 48).

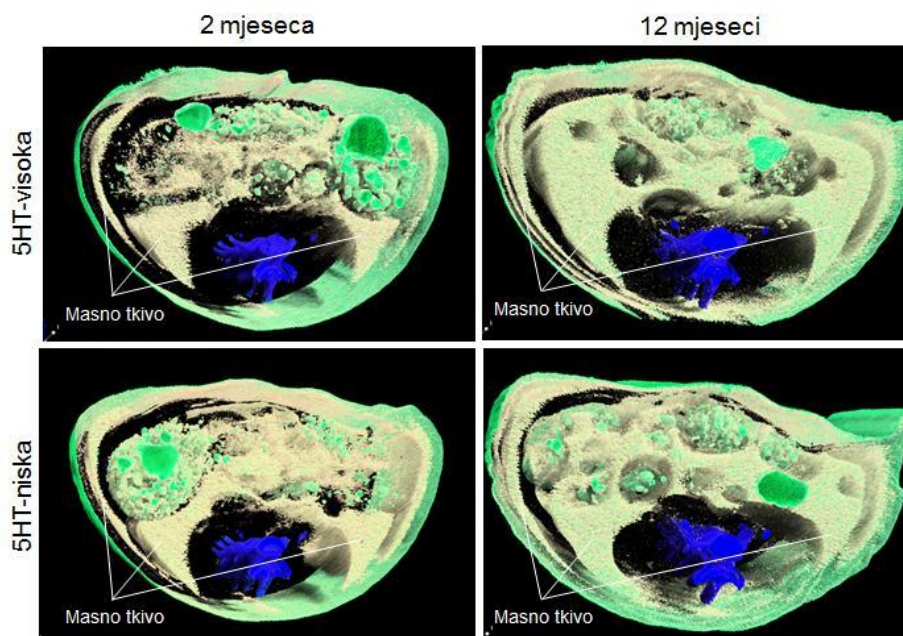


Slika 48. Vrijednosti hemoglobina A1c izmjerene u plazmi 6 mjeseci starih ženki WZ-5HT štakora.

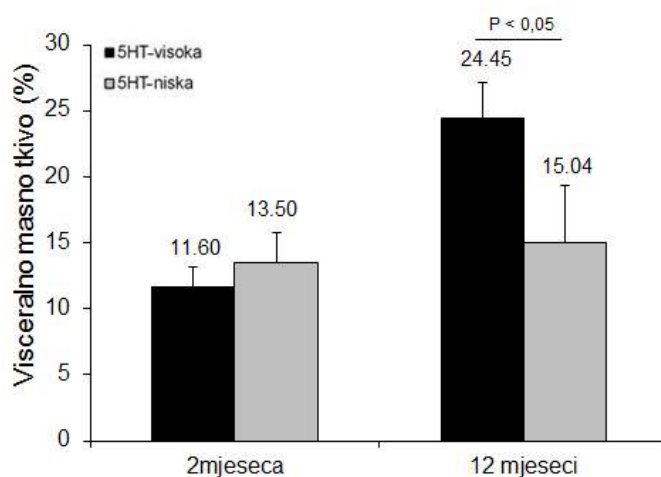


## 5.12. MASNO TKIVO U WZ-5HT ŠTAKORA

U životinja starih 2 mjeseca 5HT-niska sublinija je imala nešto više masnog tkiva, ali razlika nije bila statistički značajna. U životinja starih 12 mjeseci je primijećen značajni porast u visceralnom masnom tkivu kod 5HT-visoke sublinije (Slika 49 i Slika 50).



Slika 49. Poprečni presjek tijela WZ-5HT štakora starih 2 i 12 mjeseci dobiven rekonstrukcijom mikro CT snimaka. Koža i čestice hrane u crijevima su zelene boje, kralješnica je plave boje dok mišićno tkivo nije prikazano na slici.



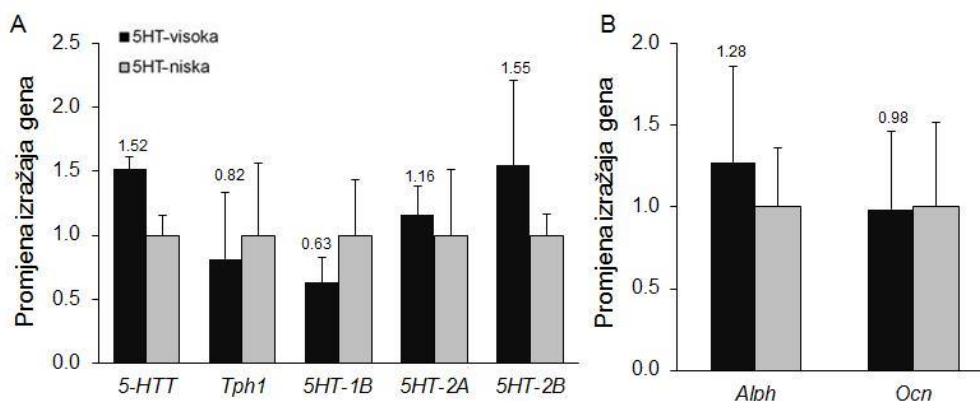
Slika 50. Postotak visceralnog masnog tkiva u 2 i 12 mjeseci starih WZ-5HT štakora.



## 5.13. IZRAŽAJ GENA U OSTEOLASTA WZ-5HT ŠTAKORA

Izražaj gena u primarnoj kulturi osteoblastičnih stanica izoliranih iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije štakora istražen je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (eng. *real time PCR*). Za usporedbu između sublinija korišten je relativan izražaj gena gdje su vrijednosti dobivene za 5HT-nisku subliniju postavljene kao referentne s vrijednosti izražaja gena jednakim 1. Prilikom analize utvrđen je izražaj gena povezanih sa serotonininskim metabolizmom. U stanica osteoblasta utvrđen je izražaj gena za serotoniniski transporter (*5HTT*), triptofan hidoksilazu 1 (*Tph1*) te serotoniniske receptore 1B (*5HT-1B*), 2A (*5HT-2A*) i 2B (*5HT-2B*). Također je analiziran izražaj gena za alkalnu fosfatazu (*Alph*) i osteokalcin (*Ocn*) kao markera diferencijacije osteoblasta.

Analizom nije utvrđena razlika između sublinija u izražaju gena povezanih sa serotonininskim metabolizmom jer su vrijednosti za obje sublinije bile gotovo jednake (Slika 51A). Nije utvrđena značajna razlika u markerima diferencijacije osteoblasta (Slika 51B).

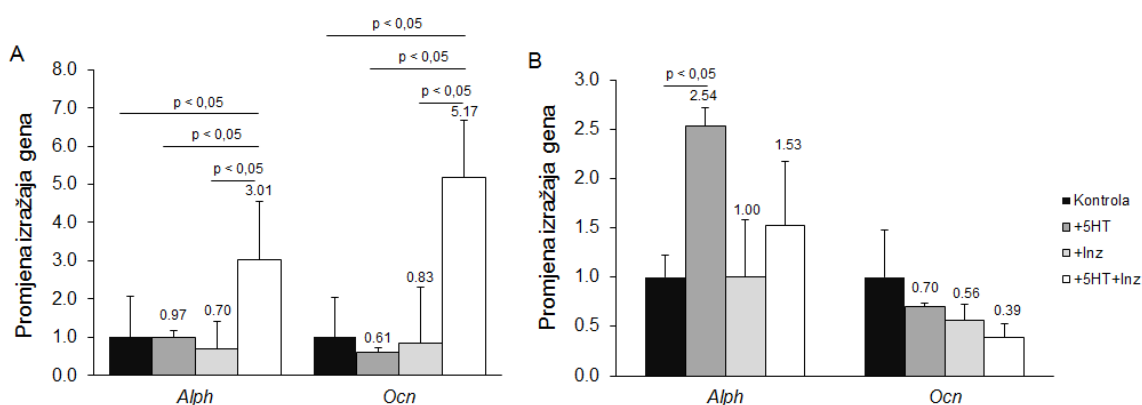


Slika 51. Izražaj gena povezanih sa serotonininskim metabolizmom (A) i markera diferencijacije osteoblasta (B) u primarnoj kulturi osteoblasta izoliranih iz WZ-5HT štakora.

### 5.13.1. UČINAK SEROTONINA I INZULINA NA MARKERE DIFERENCIJACIJE OSTEOLASTA

U svrhu određivanja učinka tretmana serotoninom i inzulinom na osteoblastične stanice izolirane iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije, izmjerene su vrijednosti izražaja gena za alkalnu fosfatazu (*Alph*) i osteokalcin (*Ocn*), kao markera diferencijacije osteoblasta.

U osteoblasta izoliranih iz 5HT-visoke sublinije nije pronađen učinak tretmana serotoninom (+5HT) niti inzulinom (+Inz) na izražaj gena za alkalnu fosfatazu i osteokalcin. Kombinacijom tretmana serotoninom i inzulinom (+5HT+Inz) dobiveno je značajno povećanje u izražaju oba markera diferencijacije osteoblasta u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 52A). U osteoblasta izoliranih iz 5HT-niske sublinije pronađen je samo učinak serotonina (+5HT) na izražaj gena za alkalnu fosfatazu, ali ne i na izražaj gena za osteokalcin, dok ostali tretmani nisu imali učinak na izražaj osteoblastičnih markera (Slika 52B).



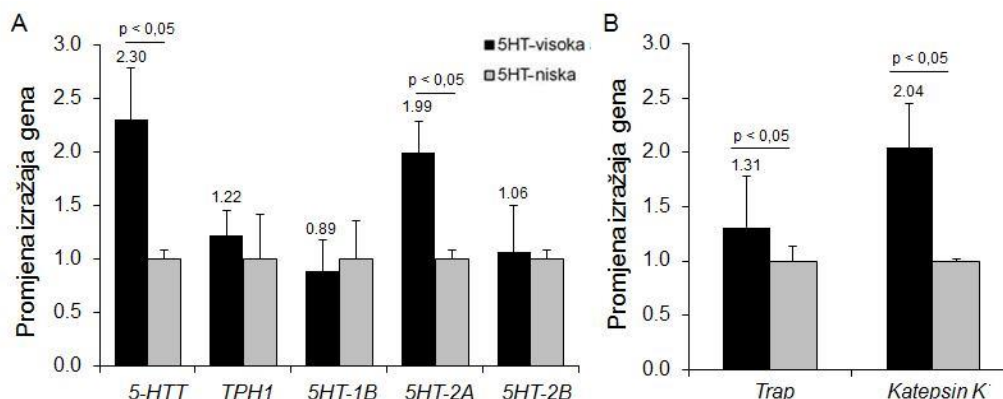
Slika 52. Učinak serotonina i inzulina na izražaj osteoblastičnih markera u primarnoj kulturi osteoblasta izoliranih iz 5HT-visoke (A) i 5HT-niske (B) sublinije WZ-5HT štakora.

## 5.14. IZRAŽAJ GENA U OSTEOKLASTA WZ-5HT ŠTAKORA

Relativan izražaj gena u primarnoj kulturi osteoklastičnih stanica izoliranih iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije štakora analiziran je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Za usporedbu između sublinija korišten je relativan izražaj gena gdje su vrijednosti dobivene za 5HT-nisku subliniju postavljena kao referentne sa vrijednosti izražaja gena jednakog 1. Prilikom analize o osteoklastičnih stanica utvrđen je izražaj gena povezanih sa serotoninским metabolizmom: serotoninски prijenosnik (*5HTT*), triptofan hidroksilaza 1 (*TPH1*) te serotoninски receptori 1B (*5HT-1B*), 2A (*5HT-2A*) i 2B (*5HT-2B*). Također je analiziran izražaj gena za kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (*Trap*, od eng. *tartarat-resistant acidic phosphatase*) i katepsin K (eng. *cathepsin K*) kao markera diferencijacije osteoklasta.

Analizom je utvrđena razlika u izražaju gena za serotoninски prijenosnik i serotoninски receptor 2A gdje su osteoklasti iz 5HT-visoke sublinije imali značajno više vrijednosti u usporedbi s 5HT-niskom sublinijom (Slika 53A). *In vitro* diferencijacija osteoklasta

izoliranih iz 5HT-visoke sublinije bila je viša sa značajno višim izražajem osteoklastičnih markera (Slika 53B).

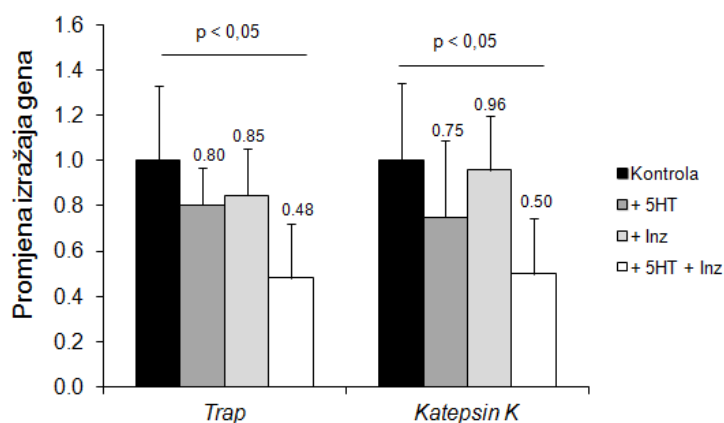


Slika 53. Izražaj gena povezanih sa serotoninskim metabolizmom (A) i markera diferencijacije osteoklasta (B) u primarnoj kulturi osteoklasta izoliranih iz WZ-5HT štakora.

#### 5.14.1. UČINAK SEROTONINA I INZULINA NA MARKERE DIFERENCIJACIJE OSTEOKLASTA

U svrhu određivanja učinka tretmana serotoninom i inzulinom na osteoklastične stanice izolirane iz WZ-5HT neselektiranih životinja, izmjerene su vrijednosti izražaja gena za kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (*Trap*) i katepsin K kao markera diferencijacije osteoklasta.

U kulturi osteoklastičnih stanica nije pronađen učinak serotonina (+5HT) niti inzulina (+Inz) na izražaj gena za kiselu fosfatazu otpornu na tartarat i katepsin K. Kombinacijom tretmana serotonina i inzulina (+5HT+Inz) dobiveno je značajno smanjenje u izražaju oba markera diferencijacije osteoklasta u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 54).



Slika 54. Učinak serotonina i inzulina na izražaj osteoklastičnih markera u primarnoj kulturi osteoklasta.

## 6. RASPRAVA

Serotonin u kralješnjaka ostvaruje učinke preko svog prijenosnika i velikog broja receptora, njegovo složeno djelovanje ulazi u sfere sistemske biologije. Zbog tako širokog utjecaja 5-HT-a, gotovo je nemoguće izdvojiti utjecaj na pojedinačni sustav ili organ u organizmu te je kod zaključivanja o djelovanju 5-HT-a na koštani sustav, potrebno povezati znanja iz različitih područja dostupna u literaturi.

Upotreba miševa s izbačenim genom (*KO*, od eng. *knock out*) ima prednosti u otkrivanju karakteristika koje izbačeni gen kontrolira, ali nedostaci se mogu očitovati utjecajem na sustav koji nije u fokusu istraživanja. Zbog izrazitih promjena koje mogu nastati kod miševa s izbačenim genima uključenim u homeostazu 5-HT-a, može doći do promijenjene regulacije u čitavom nizu organa što može utjecati na krajnji ishod i rezultate istraživanja.

U ovom istraživanju korišten je Wistar-Zagreb 5HT štakorski model s promijenjenom serotoninском homeostazom koja se očituje promjenama u aktivnosti serotoninškog prijenosnika, a razvijen je u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta „Ruđer Bošković“ (69). Životinjski model je dobiven selekcijom životinja za ekstremne vrijednosti količine 5-HT-a i brzine unosa 5-HT-a u trombocite (107) te predstavlja fiziološki model mnogo bliži translaciji prema ljudskoj fiziologiji od genetski promijenjenih modela.

### 6.1. FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE WZ-5HT ŠTAKORA

Razdvajanje sublinija prema količini 5-HT-a u trombocitima je napravljeno prije daljnjih analiza koštanog sustava te je razlika između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije i u mužjaka i u ženki iznosila oko 100%. Mjerenjem tjelesne mase životinja u ovom istraživanju je pokazano da mužjaci i ženke iz 5HT-visoke sublinije imaju veću tjelesnu masu od životinja iz 5HT-niske sublinije. Promjena je zamijećena već u dobi od 2 mjeseca i održala se i u životinja starih 12 mjeseci. Iz ovih rezultata vidljivo je da 5-HT ima utjecaj na rast i razvoj organizma od najranije dobi i da je taj utjecaj primjetan kroz čitav životni vijek štakora. Ova razlika u tjelesnoj masi već je opisana prilikom karakterizacije WZ-5HT modela (69; 108).

Utjecaj na rast i razvoj životinja utjecao je i na rast i razvoj kostiju te je mjerenjem dužine bedrenih kostiju utvrđena razlika između sublinija. Životinje oba spola iz 5HT-visoke sublinije imale su između 5-10% duže kosti od životinja iz 5HT-niske sublinije što je odgovaralo i razlici u tjelesnoj masi koja se kretala između 5 i 10%.

U miševa s izbačenim genom za 5-HTt ( $5-HTt^{-/-}$  miševi) nisu pronađene morfološke abnormalnosti niti razlika u tjelesnoj masi i dužini bedrene kosti u usporedbi sa životinjama divljeg tipa (*WT*, od eng. *wild type*) (90). Ipak, u kasnije provedenom istraživanju, u kojem su također korišteni miševi s izbačenim genom za 5-HTt, pokazano je da ti miševi imaju povećanu tjelesnu masu usprkos smanjenom unosu hrane i da su razvili dijabetes (109). Izbacivanje gena za 5HT-2B receptor u miševa ( $5-HT_{2B}R^{-/-}$  miševi) nije utjecalo na razliku u tjelesnoj masi i veličini životinja u usporedbi s *WT* miševima (87).

## 6.2. KOŠTANI FENOTIP

Proučavanje strukture kostiju može se provoditi različitim metodama. Zbog visoke količine kalcija kosti imaju sposobnost velike apsorpcije rendgenskih zraka. Prva metoda analize koštanog tkiva je rendgensko snimanje, koje je nezamjenjivo u početnoj dijagnozi niza koštanih oboljenja kao i prijeloma, ali u opisivanju koštane strukture i parametara ima velika ograničenja. Koštana mineralna gustoća može se mjeriti pomoću DXA uređaja. DXA kao metoda ima slične nedostatke rendgenskom snimanju, ali njezino korištenje kao brze, rasprostranjene i lako dostupne metode je opravdano kao jedan od početnih koraka u analizi koštanog tkiva malih laboratorijskih životinja.

Kompjuterizirana tomografija (CT) je kao metoda razvijena prije 40-ak godina te je zapravo evolucija rendgenskog snimanja (97). Daljnjim razvojem razvijen je mikro CT (100) koji je omogućio veće rezolucije, ali i više doze zračenja, zbog čega je još uvijek prihvatljiva samo u istraživačke svrhe, a ne i u dijagnostici kod ljudi. Ipak, mikro CT omogućava nedestruktivno proučavanje strukture koštanog tkiva u rezoluciji od nekoliko mikrometara.

### 6.2.1. KOŠTANA MINERALNA GUSTOĆA

Koštana mineralna gustoća u WZ-5HT životinja izmjerena je na mjestu bedrene kosti i trećem lumbalnom kralješku. Mužjaci iz 5HT-visoke sublinije imali su manju mineralnu gustoću u oba mjerena lokaliteta u sve tri promatrane životne dobi, ali na mjestu bedrene kosti kod mužjaka starih 12 mjeseci nije dobivena značajna razlika između sublinija. U ženki WZ-5HT dobiveni su trendovi identični onima kod mužjaka, ali kod ženki u dobi od 12 mjeseci nije zamijećena značajna razlika između sublinija na oba promatrana lokaliteta.

Istraživanje koštanog fenotipa u *5-HTT*<sup>-/-</sup> miševa pokazalo je smanjenu koštanu masu, promijenjenu arhitekturu kosti te njezina slabija biomehanička svojstva u usporedbi s miševima divljeg tipa (90). Pritom je smanjena koštana mineralna gustoća izmjerena na mjestu distalne bedrene kosti. U usporedbi s WZ-5HT modelom ovi miševi su pokazali jednak trend u koštanjoj mineralnoj gustoći, iako je kod njih aktivnost 5-HTT-a u potpunosti dokinuta, dok je kod 5HT-visoke sublinije WZ-5HT modela aktivnost 5-HTT-a pojačana. U ženskih miševa s izbačenim genom za 5HT-2B receptor pronađeno je smanjenje BMD-a starenjem (87). U tom istraživanju u miševa starih 5 tjedana nije nađena razlika, ali je kod miševa starih 18 mjeseci dobivena značajna razlika u BMD-u između WT i KO miševa, što bi ukazivalo na utjecaj 5HT-2B receptora na odlaganje minerala u odrasloj dobi. U miševa s izbačenim genom za *Tph1* (*Tph1*<sup>-/-</sup> miševi) proizvodnja 5-HT-a na periferiji je gotovo u potpunosti onemogućena (53). U takvih miševa je izmjeren veći BMD u mladih životinja, dok su se starenjem vrijednosti BMD-a izjednačile s WT životinjama. Također, ti rezultati upućuju na to da smanjenje količine 5-HT u krvotoku ima pozitivan utjecaj na BMD, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja gdje je pronađen viši BMD u životinja iz 5HT-niske sublinije. Istraživanje o povezanosti serumskog 5-HT-a i koštane gustoće u žena pokazalo je da je ukupni BMD u vratu bedrene kosti obrnuto proporcionalan količini 5-HT-a u serumu, dok utjecaj količine 5-HT-a na BMD kortikalne kosti vrata bedrene kosti nije pronađen (110). Pritom je negativan utjecaj povišene količine serumskog 5-HT-a na BMD pronađen samo kod žena u menopauzi koje nisu primale hormonsko nadomjesno liječenje. Ovo istraživanje dobro korelira s rezultatima dobivenim na WZ-5HT štakorima u kojih također povišene razine 5-HT-a imaju negativan utjecaj na BMD.

Modulacijom homeostaze 5-HT-a pomoću lijekova utječe se na 5-HT u SŽS-u, ali i na periferiji organizma. Lijekovi iz skupine SSRI (eng. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) inhibiraju aktivnost 5-HTT-a i onemogućuju povratni unos 5-HT-a iz sinaptičke pukotine u neurone te tako pojačavaju 5-HT transmisiju i djeluju na raspoloženje. Osim toga, ista skupina lijekova djeluju i na 5-HTT na periferiji organizma gdje onemogućuju unos 5-HT-a u trombocite. Istraživanje na ženskim miševima 4 tjedna tretiranim fluoksetinom, kao predstavnikom SSRI skupine lijekova, pokazalo je smanjenje BMD-a goljenične kosti *in vivo* te bedrene kosti i kralješnice *ex vivo* u usporedbi s kontrolnom skupinom (111).

Mjerenjem slobodnog 5-HT-a u plazmi WZ-5HT štakora pokazalo je povećanu količinu u 5HT-visoke sublinije (107) što bi moglo ukazivati na to da i povišena količina 5-HT-a, a ne samo povećana aktivnost 5-HTT-a, uzrokuje smanjenje BMD-a.

Zbog niske rezolucije uređaja i veličine snimanih kostiju štakora, određivanje BMD-a podložno je većim varijacijama prilikom mjerenja. Usprkos ovom nedostatku, metoda DXA je pokazala trend smanjenja BMD-a u štakora 5HT-visoke sublinije što je u skladu s podacima iz literature.

### **6.2.2. KORTIKALNA KOST**

Utjecaj 5-HT-a na kortikalnu kost u WZ-5HT štakora okarakteriziran je na dvije razine, mjerenjem strukturnih parametara pomoću snimanja mikro CT-om i biomehaničkim parametarima pomoću testa savijanja u tri točke. Kortikalna kost okarakterizirana je samo na perifernom kosturu, dok na kralješcima nije, budući da je tijelo kralješka gotovo u potpunosti sačinjeno od trabekularne kosti. Mužjaci i ženke iz 5HT-visoke sublinije imali su veće bedrene kosti u sve tri promatrane životne dobi te je ta razlika uočena i kod mikro CT analize gdje je ukupni tkivni volumen kortikalne kosti bio veći u životinja iz 5HT-visoke sublinije. Ipak, koštani volumen i debljina kortikalne kosti nisu se značajno razlikovali između sublinija u oba spola i sve tri životne dobi. Daljnjom analizom utvrđeno je da je volumen medularnog kanala bedrene kosti bio veći kod 5HT-visokih štakora. Dobiveni rezultati upućuju na povećano periostalno širenje i endostealnu resorpciju dugih kostiju u životinja s povišenom razinom 5-HT-a.

U miševa s izbačenim genom za 5-HTT nije nađen utjecaj na longitudinalni rast bedrene kosti, ali su KO životinje imale manji ukupni tkivni volumen kortikalne kosti u odnosu na životinje divljeg tipa (90). Pritom su KO životinje imale smanjeni periostalni i endostealni perimetar te je u konačnici debljina kortikalne kosti bila jednaka onoj u WT životinja. U skladu s time, kod štakora 5HT-visoke sublinije, koju karakterizira povećana aktivnost serotoniniskog transportera, uočeno je povećanje periostalne i endostealne površine, što je opet dovodi do jednake debljine kortikalne kosti u usporedbi sa životinjama iz 5HT-niske sublinije. Utjecaj na rast kostiju i debljinu kortikalne kosti primijećen je i u miševa s dijabetesom tipa II (112). Kod mladih miševa, u kojih se nije razvio dijabetes, nije primijećena razlika u debljini kortikalne kosti, ali razvojem dijabetesa u starijih miševa povećala se resorpcija na koštanim površinama što je uzrokovalo tanje kosti. Ipak, istraživanja na ljudima su pokazala da povećana koštana resorpcija uzrokuje i povećano periostalno širenje. Naime, uočeno je (113) da mladi ljudi s povećanom resorpcijom kosti i sniženim vrijednostima BMD-a imaju veće kosti zbog povećane koštane izgradnje na periostalnim površinama. Ti rezultati se mogu povezati s WZ-5HT štakorima gdje je kod 5HT-visoke sublinije pronađen sličan trend, smanjenog BMD-a i povećanja periostalne površine kao posljedice povećane endostealne resorpcije kosti.

Biomehanička svojstva kortikalne kosti nisu se razlikovala između sublinija WZ-5HT štakora u oba spola, vjerojatno zbog gotovo identične debljine kortikalne kosti. Tako uređaj nije mogao izmjeriti razlike između sublinija, niti su parametri dobiveni analizom bili drugačiji.

S druge strane, također biomehaničkim testiranjem kostiju pronađeno je da miševi s izbačenim genom za 5-HTT imaju smanjenu čvrstoću, žilavosti i krutost kostiju u usporedbi s WT miševima (90).

Kod životinja s promijenjenom homeostazom 5-HT-a primijećene su promjene u ponašanju i aktivnosti (108). Životinje s povišenom koncentracijom 5-HT-a pokazale su manju pokretljivost i slabije motoričke sposobnosti u usporedbi sa životinjama sa sniženom koncentracijom 5-HT. Kako je kost organ koji reagira na mehaničke podražaje (45), za pretpostaviti je da je takva vrsta podražaja, uslijed smanjene pokretljivosti, smanjena kod štakora 5HT-visoke sublinije. Ipak, taj nedostatak je kod životinja 5HT-visoke sublinije vjerojatno kompenziran mehaničkim opterećenjem



izazvanim povećanom tjelesnom masom što ujedno izjednačava i utjecaj na koštani volumen. U *5-HT<sup>f</sup>* miševa je također uočena smanjena pokretljivost i samim time, opterećenje kostiju, ali je pronađeno smanjenje koštane mase i u kostima koje nisu pod mehaničkim opterećenjem, kao što su kosti lubanje, čime je pokazano da je učinak 5-HT-a na kost neovisan o mehaničkom opterećenju (90). Dobiveni rezultati navode na zaključak da 5-HT preko 5-HTT-a ima izravan utjecaj na rast i pregradnju kortikalne kosti.

U pokusu prijeloma bedrene kosti promatran je učinak promijenjene homeostaze 5-HT-a na cijeljenje kortikalne kosti. Prilikom cijeljenja bedrene kosti u WZ-5HT štakora nije pronađena značajna razlika u količini stvorenog koštanog kalusa između dviju sublinija. Biomehaničkim testiranjem pronađeno je da su životinje iz 5HT-visoke sublinije imale značajno manju krutost i trend prema višoj elastičnosti zacijeljenog mjesta prijeloma, što upućuje na slabiju mineralizaciju novostvorenog koštanog kalusa. Mjerenje mineralne gustoće na mjestu prijeloma ukazalo je na smanjenu mineralizaciju mjesta prijeloma i potvrdilo rezultate dobivene biomehaničkim testiranjem.

Povećanje rizika prijeloma u osoba s promijenjenom količinom 5-HT-a pronađeno u mnogim istraživanjima (84) je uglavnom vezano i s raznim neurološkim stanjima i bolestima jer 5-HT snažno utječe na SŽŠ. Uzroci prijeloma ne mogu se pripisati samo smanjenom BMD-u u takvih pacijenata jer kod njih dolazi i do depresije, otežanog kretanja, smanjene percepcije prostora što sve zajedno povećava mogućnost pada i rizik od prijeloma.

### **6.2.3. TRABEKULARNA KOST**

Kao i kod karakterizacije kortikalne kosti, trabekularna kost kod WZ-5HT životinja je istražena metodom mikro CT, kojom su izmjereni strukturni parametri i biomehaničkim testiranjem pomoću testa udubljenja. Trabekularna kost je istražena u perifernom, ali i u aksijalnom kosturu. Dva lokaliteta mjerenja su izabrana zbog velikog utjecaja 5-HT-a na SŽS, gdje je aksijalni kostur usko vezan sa SŽS-om i služi mu kao potpora i zaštita. Uz ove testove napravljena je i statička i dinamička histomorfometrija u tijelu trećeg lumbalnog kralješka.

Povišena koncentracija 5-HT-a je povezana sa smanjenjem trabekularne kosti kod WZ-5HT štakora oba spola i u sve tri promatrane životne dobi. Vrijednosti dobivene statičkom histomorfometrijom u tijelu kralješka mladih i ostarjelih ženskih WZ-5HT su bile usporedive s vrijednostima dobivenim mikro CT analizom.

Istraživanja na miševima s izbačenim *5-HTt* genom i posljedično ograničenim unosom 5-HT-a u stanice, pronašla su značajno smanjenje trabekularne kosti u lumbalnom dijelu kralješnice (114) kao i na mjestu distalne bedrene kosti kod mužjaka i ženki u mladoj i odrasloj dobi (90). Kao jedan od faktora koji regulira izražaj Tph1 enzima, istražen je *Lrp-5* gen (91). U *Lrp5<sup>-/-</sup>* miša pronađen je pojačani izražaj Tph1 enzima te time i povećanje 5-HT-a u trombocitima. U takvih miševa količina trabekularne kosti u kralješnici je bila značajno niža nego u WT miševa. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s WZ-5HT štakorskim modelom gdje je također pronađen negativan utjecaj povišene koncentracije 5-HT-a na trabekularnu kost.

Biomehanički parametri trabekularne kosti bili su slabiji u 5HT-visoke sublinije, osim u dobi od 2 mjeseca, gdje zbog vrlo visoke količine trabekularne kosti u obje sublinije, osjetljivost uređaja nije bila dovoljna da zabilježi razliku. Istraživanje smanjenja unosa 5-HT-a u miševa tretiranih 4 tjedna sa fluoksetinom snizilo je ukupnu čvrstoću trabekularne kosti petog lumbalnog kralješka (L5) za gotovo 20% (111).

Dinamička histomorfometrija je pokazala vrlo neobičan trend. Kod mladih štakora 5HT-visoke sublinije količina ugrađenog kalceina u kost je bila značajno viša nego kod 5HT-niske. Kako životinje 5HT-visoke sublinije imaju manje trabekularne kosti, ovo je naizgled paradoksalna situacija jer te životinje imaju veću koštanu izgradnju. Mjerenjem broja osteoblasta i osteoklasta nije dobivena značajna razlika između sublinija u mladih životinja, ali je primjetan trend u kojem životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju veći broj osteoblasta i manji broj osteoklasta. Starenjem se usporava cjelokupni, pa i koštani, metabolizam pa je kod ostarjelih životinja proces koštane pregradnje jednak između sublinija kao i broj osteoblasta i osteoklasta. Ipak, razlika u koštanoj masi između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije se održala i kod ostarjelih životinja.

Histomorfometrijska analiza u *5-HTt<sup>-/-</sup>* miševa je otkrila da je razlog smanjenog koštanog volumena i promijenjene arhitekture smanjeno stvaranje trabekularne kosti

(90). Pritom, mjerenjem broja osteoklasta nije nađena razlika između WT i KO životinja što bi, kao i u slučaju WZ-5HT štakora moglo upućivati na utjecaj 5-HT-a na aktivaciju koštanih stanica, a ne na njihovu proliferaciju. U *Tph1<sup>-/-</sup>* miševa broj osteoklasta u histomorfometrijskoj analizi je bio smanjen u mladih i odraslih jedinki, dok se broj osteoblasta smanjio tek u odraslih životinja (53). Rezultati su donekle oprečni s istraživanjem u WZ-5HT štakora, gdje je uočena pojačana aktivacija i osteoblasta i osteoklasta. Istraživanje o utjecaju 5-HT-a na kost u osteoporotičnih miševa i štakora pokazalo je da se inhibicijom sinteze 5-HT u crijevu može spriječiti ili čak vratiti izgubljena trabekularna kost u kralješcima (115). Taj model je u skladu s rezultatima dobivenim na WZ-5HT štakorima gdje je vidljiv negativan utjecaj povišene koncentracije 5-HT-a na trabekularnu kost.

Kako je koštana izgradnja povezana s koštanom razgradnjom u procesu pregradnje, izmjereni parametri c-telopeptida u krvi mladih WZ-5HT štakora ukazuju na povećanu koštanu razgradnju kod životinja s povišenom razinom 5-HT-a. Količina osteokalcina u krvi, kao markera koštane izgradnje, nije se razlikovala između sublinija što nije bilo u skladu s dobivenim histomorfometrijskim parametrima, ali iako se koristi kao biomarker, količina osteokalcina ne mora korelirati s koštanom izgradnjom u životinja (87). Mjerenjem parametara c-telopeptida u miševa s izbačenim *5-HTt* genom nije nađena razlika između WT i KO životinja (90). To bi upućivalo na to da 5-HTT nema izravan učinak na osteoklaste, nego da djeluje na osteoblaste, što se slaže s rezultatima na WZ-5HT štakorima gdje je koštano stvaranje bilo značajno više u 5HT-visoke sublinije. Ipak, sprega osteoblasta i osteoklasta u procesu koštane pregradnje, kao i smanjenje koštane mase u životinja s povećanim koštanom stvaranjem, ukazuje na indirektan učinak 5-HT-a na osteoklaste, koji se odvija preko osteoblasta i to mogućim mehanizmom djelovanja sličnim PTH-u ili  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Ostarjeli *5-HT<sub>2B</sub>R<sup>-/-</sup>* miševi su imali sniženu količinu osteokalcina (87). Miševi sa smanjenom proizvodnjom 5-HT-a također su imali smanjenu količinu osteokalcina, ali tek u dobi od 4 mjeseca, dok kod 6 tjedana starih životinja nije bilo razlike između WT i KO (53). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da WZ-5HT štakori s povišenom koncentracijom 5-HT-a imaju povećanu koštanu pregradnju koja dovodi do gubitka kosti (116).

Dobiveni rezultati na WZ-5HT štakorima se djelomično preklapaju s rezultatima drugih istraživanja gdje promjena homeostaze 5-HT-a u životinjskim modelima dovodi do negativnog utjecaja na trabekularnu kost.

### **6.3. BIOKEMIJSKI I HORMONALNI STATUS**

Mehanizam djelovanja 5-HT-a na koštano tkivo istražen je određivanjem hormonalnog statusa WZ-5HT životinja mjerenjem hormona koji su povezani s koštanim metabolizmom te metabolizmom glukoze. Izmjerena je i količina estrogena u muških i ženskih životinja kako bi se vidio utjecaj ovog spolnog hormona u sinergiji s promijenjenom serotoninskom homeostazom. Pritom nije uočena razlika između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije u mužjaka i ženki WZ-5HT štakora te je isključena povezanost 5-HT-a i estrogena. Zbog koštanog fenotipa, koji je bio karakterističan za oba spola WZ-5HT štakora, te isključenja utjecaja estrogena na promijenjene koštane parametre, prema načelu 3R, za daljnja istraživanja mehanizma djelovanja 5-HT-a na kost odabrani su ženski štakori. Promjena hormona i biokemijskih parametara istražena je u mladim ženki štakora starih 2 mjeseca i ostarjelih ženki starih 12 mjeseci, dok je utjecaj 5-HT-a na glukozni metabolizam izmjeren u 6 mjeseci starih ženki.

#### **6.3.1. HORMONI KOJI UTJEČU NA KOŠTANO TKIVO**

Mjerenjem količine PTH-a u serumu nije dobivena razlika između sublinija kod mladih niti kod ostarjelih štakora što se odrazilo i na razinu iona  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ , gdje također nije bilo razlike između sublinija. Za 5-HT je već prije pokazano da ne utječe na kost preko PTH-a jer je u miševa s izbačenim genom za 5-HTT izmjerena količina PTH-a i iona fosfora bila jednaka količini u WT životinja, iako im se koštani fenotip razlikovao (90).

Utjecaj 5-HT-a na količinu aktivnog metabolita vitamina D3 je vidljiv jer je u mladim i starih životinja 5HT-visoke sublinije izmjerena smanjena količina  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Prethodno je pokazano da je smanjena količina  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  povezana s negativnim utjecajem na kost i nižim vrijednostima BMD (117). U štakora 5HT-visoke sublinije su izmjerene niže vrijednosti BMD-a kao i smanjenje trabekularne kosti. Količina kalcija u serumu u WZ-5HT štakora nije bila različita između sublinija što ukazuje da je

količina  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u životinja 5HT-visoke sublinije dovoljna za održavanje fiziološkog raspona kalcija.

### 6.3.2. GLUKOZNI METABOLIZAM WZ-5HT ŠTAKORA

Mjerenjem inzulina u WZ-5HT životinja pokazano je da životinje iz 5HT-visoke sublinije imaju značajno više vrijednosti u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije.

Paulmann i suradnici (118) su pronašli da povećana koncentracija 5-HT-a u beta stanicama gušterače uzrokuje povećano lučenje inzulina. Kako WZ-5HT štakori iz 5HT-visoke sublinije imaju pojačanu aktivnost 5-HTT-a u trombocitima, za očekivati je da je aktivnost 5-HTT-a pojačana i u beta stanicama te da, u konačnici, povećana koncentracija 5-HT-a u tim stanicama uzrokuje i pojačano lučenje inzulina. U skotnih miševa je pokazano da povišena količina 5-HT-a stimulira proliferaciju beta stanica u gušterači i tako djeluje na povećanu količinu inzulina u trudnoći (51; 119). Izbacivanje gena za 5-HTT u miševa utjecalo je na lučenje inzulina te su takvi miševi imali povišene razine inzulina u odnosu na divlji tip (109) što bi moglo ukazivati na povezanost inzulina i 5-HTT-a čije poremećeno djelovanje dovodi do povećanja u izlučivanju inzulina.

U svrhu provjere djelovanja inzulina na količinu glukoze u krvi, u WZ-5HT štakora je izmjerena koncentracija glukoze u krvi. U mlađih životinja nije bilo razlike između sublinija, dok je kod ostarjelih životinja pronađena značajna razlika i to s višom koncentracijom glukoze u štakora 5HT-visoke sublinije, čije su vrijednosti glukoze znatno premašivale normalni fiziološki raspon. Očekivana niža razina glukoze zbog više razine inzulina u tih životinja je izostala. Daljnjim testovima tolerancije na glukozu i inzulin potvrđen je razvitak otpornost na inzulin u štakora 5HT-visoke sublinije.

U *Tph1*<sup>-/-</sup> miševa količina 5-HT-a u beta stanicama iznosila je 10% količine u WT miševa te je u krvi tih miševa zabilježena povećana koncentracija glukoze, ali i smanjeno lučenje inzulina prilikom testa opterećenja glukozom (118) što potvrđuje ulogu 5-HT-a u lučenju inzulina iz gušterače. U *5-HTT*<sup>-/-</sup> miševa je pronađena povišena koncentracija glukoze u krvi kao i netolerancija u testovima opterećenja glukozom i inzulinom (109).

Hemoglobin A1c, ili glicirani hemoglobin, se već duže vremena koristi kao precizan marker dugotrajno promijenjenog metabolizma glukoze (120). Mjerenje količine hemoglobina A1c u 6 mjeseci starih WZ-5HT štakora potvrdilo je poremećaj glukoznog metabolizma jer su životinje iz 5HT-visoke sublinije imale značajno više vrijednosti ovog markera.

Mjerenjem masnog tkiva u WZ-5HT životinja nije zamijećena razlika između sublinija u mlađoj dobi, dok starenjem životinje iz 5HT-visoke sublinije nakupljaju značajno više visceralnog masnog tkiva. U skladu s povećanjem masnog tkiva izmjerene su i veće količine kolesterola i HDL-a u ostarjelih štakora iz 5HT-visoke sublinije, dok kod mladih životinja nije primijećena razlika između sublinija. Vidljivo je da promjena homeostaze 5-HT-a u WZ-5HT štakorima, a posebno aktivnosti 5-HTT-a, utječe na izlučivanje inzulina. Dugotrajan učinak povećanog unosa 5-HT-a na izlučivanje inzulina uzrokuje razvitak otpornosti na inzulin i nastanak dijabetesa tipa 2 (*T2DM* od eng. *Type 2 Diabetes Mellitus*) u starijih štakora iz 5HT-visoke sublinije što je dodatno potvrđeno povećanjem hemoglobina A1c i visceralne masti. U ljudi je nađeno da je pretilost jedan od glavnih preduvjeta za razvitak T2DM (121). Kao glavni uzroci pretilosti su navedeni: nedostatak fizičke aktivnosti, loša prehrana i genetska osnova. U štakora 5HT-visoke sublinije postoji više parametara koji bi mogli utjecati na razvoj T2DM pa tako i fiziološka osnova promijenjene homeostaze 5-HT-a koja uzrokuje i smanjenu aktivnost životinja.

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> utječe na izlučivanje inzulina (122) te je smanjena količina vitamina D u ljudi povezana s razvojem T2DM (123). Smanjena količina 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u 5HT-visoke sublinije WZ-5HT mogla bi se povazati ne samo s koštanim fenotipom, nego i s promijenjenim metabolizmom glukoze u tih životinja.

#### **6.4. DJELOVANJE 5-HT-a NA KOŠTANE STANICE**

Kako bi se pobliže istražio mehanizam djelovanja 5-HT-a na koštane stanice u ovom su istraživanju korištene primarne kulture osteoblasta i osteoklasta izoliranih iz WZ-5HT štakora. U stanicama je analiziran izražaj gena uključenih u serotoninergički sustav kao i specifičnih markera za diferencijaciju osteoblasta i osteoklasta. Kako bi se simulirali *in vivo* uvjeti povećane količina 5-HT-a i inzulina u krvi, koštane stanice

su tretirane 5-HT-om i inzulinom te su istraženi učinci ovakvog tretmana na izražaj diferencijacijskih markera karakterističnih za svaki tip stanica.

#### 6.4.1. UTJECAJ NA OSTEOLASTE

U osteoblastičnih stanica izoliranih iz WZ-5HT štakora je pronađen izražaj gena za proizvodnju i unos 5-HT-a u stanice kao i gena za receptore *5HT-1B*, *-2A* i *-2B*. Osim 5-HT elemenata, proučen je i izražaj gena za alkalnu fosfatazu i osteokalcin što je pokazalo da su mezenhimalne stanice izolirane iz koštane srži diferencirale u osteoblastične stanice. Stanice izolirane iz 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije WZ-5HT štakora nisu se razlikovale u izražaju niti jednog od promatranih gena. S obzirom da su u *in vivo* uvjetima pokazane razlike u aktivnosti osteoblasta kod mlađih životinja, razlog gotovo jednakih vrijednosti izražaja gena mogla bi biti dužina trajanja primarne kulture. Naime, osteoblasti su bili u kulturi 21 dan. Za to vrijeme bi nedostatak 5-HT-a i inzulina iz *in vivo* okoliša mogao izjednačiti izražaj gena između sublinija.

U već objavljenim istraživanjima izražaja 5-HT receptora u koštanim stanicama nađen je visok izražaj gena za *5HT-2B* u osteoblasta i osteocita (85). Daljnjim istraživanjima u primarnim štakorskim osteoblastima, kao i u većem broju osteoblastičnih staničnih linija, nađen je izražaj gena i proizvodnja funkcionalnih receptora *5HT-1A*, *-1D* i *-2B* kao i gena za *5-HTT* (86). Osim toga, pronađeno je da receptor *5HT-2B* kontrolira diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta (87), a mehanizam inhibicije proliferacije osteoblasta predložen je preko *5HT-1B* receptora uz sudjelovanje CREB (od eng. *cAMP response element-binding protein*) proteina (91). Najnovija istraživanja ipak ukazuju na djelovanje 5-HT-a na osteoblaste preko *5HT-2B* receptora i posljedičnog prijenosa signala u jezgru preko prostaciklina i Ppar- $\beta/\delta$  (od eng. *Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta*) (124).

Tretman primarnih kultura osteoblasta 5HT-visoke sublinije 5-HT-om ili inzulinom nije imao utjecaj na markere diferencijacije osteoblasta, dok je kombinacija 5-HT-a i inzulina značajno povisila izražaj gena za alkalnu fosfatazu i osteokalcin. Ovi rezultati ukazuju na sinergistički učinak 5-HT i inzulina na proliferaciju i aktivaciju osteoblasta, jer u *in vivo* uvjetima s povišenom koncentracijom 5-HT-a i inzulina također vidimo pojačanu aktivnost osteoblasta u mlađih životinja. Kod osteoblasta izoliranih iz 5HT-niske sublinije tretman 5-HT-om je povisio izražaj gena za alkalnu fosfatazu, ali je

izostao sinergistički učinak 5-HT-a i inzulina. Zbog razlika u izražaju gena između osteoblasta izoliranih iz dviju sublinija WZ-5HT štakora, može se pretpostaviti da su osteoblasti izolirani iz 5-HT visoke sublinije bili kondicionirani *in vivo* uvjetima prije izolacije stanica i da je zato njihov odgovor na kombinirani tretman bio značajno veći.

Pretpostavljeno je da inzulin potiče izlučivanje osteokalcina i tim mehanizmom utječe na glukozni metabolizam koštanih mišića i masnog tkiva (125). U osteoblasta izoliranih iz WZ-5HT sam inzulin nije povećao izražaj gena za osteokalcin, ali u kombinaciji s 5-HT-om i inzulinom u osteoblasta iz 5HT-visoke sublinije izražaj osteokalcina je značajno povećan u usporedbi s 5HT-niskom sublinijom.

#### **6.4.2. UTJECAJ NA OSTEOKLASTE**

Diferencirane stanice izolirane iz WZ-5HT štakora su izražavale gene za *Trap* i *Katepsin K* kao specifične markere osteoklastičnih stanica. U tih stanica je pronađen i izražaj gena za *Tph1*, enzim odgovoran za proizvodnju 5-HT-a. U skladu s tim nalazima, u stanicama izoliranim iz slezene miša i tretiranim RANKL-om kako bi se potakla diferencijacija, pronađen je izražaj gena za *Tph1*, koji nije bio više mjerljiv kod potpuno diferenciranih osteoblastičnih stanica (53).

U osteoklasta iz WZ-5HT su također bili izraženi geni za *5-HTT* kao i receptore *5-HT1A*, *-2A* i *-2B*. Razlika u izražaju gena za *5-HTT* između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije ukazuje na promjenu izražaja tog gena u stanicama monocitno-makrofagne zametne loze. Slična razlika je prethodno pronađena u trombocitima, koji nastaju iz megakariocita (126; 127).

Istraživanjem djelovanja 5-HT-a na osteoklaste pronađeno je da se učinak 5-HT ostvaruje preko *5-HTT*-a (89). Pritom je nađeno da 5-HT u citoplazmi djeluje na proliferaciju osteoklasta. Ovo otkriće se može povezati s učinkom 5-HT-a na beta stanice gušterače, gdje također citoplazmatski 5-HT djeluje na proliferaciju stanica i lučenje inzulina, a ti učinci 5-HT-a uvelike ovise o aktivnosti *5-HTT*-a (118). Razlika u izražaju gena za *5HT-2A* receptor između sublinija WZ-5HT štakora ukazuje na moguće djelovanje 5-HT-a na osteoklaste preko tog receptora. U prijašnjim istraživanjima u osteoklastima je nađeno izražaj gena za *5HT-1B*, *-2B* i *-4* receptor, gdje su receptori 5HT-1B i -4 bili odgovorni za ranu diferencijaciju osteoklasta (89). U



daljnjim istraživanjima na prekursorima osteoklasta pronađeni su geni za *5HT-1B*, -*2A* i -*2B* (53), ali ne i za *5HT-1A* i -*4*.

Izražaj osteoklastičnih markera, *Trap* i *Katepsin K*, je bio viši u stanica izoliranih iz 5HT-visoke sublinije, što ukazuje na pojačanu diferencijaciju osteoklasta u te sublinije. U skladu s time, prethodno je pronađeno da blokiranje 5-HTT-a u osteoklastima rezultira smanjenom proliferacijom kao i smanjenim izražajem gena za *Trap*, *Katepsin K* i *Mmp-9* (od eng. *Matrix Metalloproteinase - 9*) (89). Iz svega navedenog, može se zaključiti da je aktivnost 5-HTT ključna u diferencijaciji i aktivaciji osteoblastičnih stanica.

Tretman primarne kulture osteoklasta izoliranih iz WZ-5HT štakora 5-HT-om ili inzulinom nije imao utjecaj na markere diferencijacije osteoklasta, dok je kombinacija 5-HT-a i inzulina značajno snizila izražaj gena za *Trap* i *Katepsin K*. Takvi rezultati navode na zaključak da sinergistički učinak 5-HT-a i inzulina ima negativan utjecaj na diferencijaciju osteoklasta, za razliku od učinka na osteoblaste. Suprotno tome, pokazano je i da je tretman stanične linije osteoklasta 5-HT-om doveo do povećanja izražaja gena za *Katepsin K* i *Mmp-9* ovisno o dozi te do posljedične diferencijacije stanica (89). Razlog razlika u odnosu na rezultate istraživanja na WZ-5HT modelu može biti u korištenim staničnim linijama kao i reagensima, posebice hranjivim medijima ili serumima. S druge strane, u primarnoj kulturi osteoklastičnih stanica izoliranih iz miša i tretiranih inzulinom nije nađen utjecaj na izražaj gena za *Katepsin K* ili *Rank*, ali su visoke koncentracije glukoze i inzulina imale inhibitorni sinergistički učinak (128). Kao i u našem istraživanju, sam inzulin nije imao učinak na diferencijaciju osteoklasta, što bi ukazivalo na to da za inhibitorni učinak na osteoklaste inzulin treba sinergističko djelovanje, bilo s 5-HT-om ili glukozom.

Moguće je da inhibitorni učinak 5-HT-a i inzulina na osteoklaste, a aktivacijski učinak na osteoblaste omogućuje početno veće stvaranje koštanog tkiva. Kako su osteoblasti i osteoklasti povezani u procesu koštane pregradnje, povećana aktivacija osteoblasta aktivira i osteoklaste što dovodi do povećane koštane pregradnje koja uvijek vodi gubitku kosti (116; 129).

Rezultati istraživanja na WZ-5HT štakorima mogu razjasniti određene odnose između 5HT-a i glukoznog metabolizma te pridonjeti cjelokupnom razumijevanju mehanizma djelovanja 5-HT-a na koštani metabolizam u kralješnjaka.

## 7. ZAKLJUČCI

Iz prikazanih rezultata se može zaključiti sljedeće:

1. Povećana aktivnost serotoninskog sustava uzrokovala je povećani rast kostiju u mužjaka i ženki WZ-5HT štakorskog modela promijenjene serotoninske homeostaze.
2. U životinja 2, 4 i 12 mjeseci starosti u oba spola 5HT-visoke sublinije koštana mineralna gustoća bedrene kosti i lumbanog dijela kralješnice bila je smanjena.
3. Kod štakora iz 5HT-visoke sublinije je primjećeno povećano periostalno širenje i enodstealna resorpcija zbog čega, usprkos većim kostima u tih životinja, nije izmjerena razlika u koštanom volumenu niti biomehaničkim svojstvima bedrene kortikalne kosti između sublinija.
4. Cijeljenje prijeloma bilo je produženo u štakora iz 5HT-visoke sublinije zbog sporije mineralizacije kalusa nastalog na mjestu prijeloma.
5. U mlađoj dobi štakora iz 5HT-visoke sublinije koštana pregradnja je bila povišena i uzrokovala je smanjene parametara trabekularne kosti u distalnom dijelu bedrene kosti i lumbalnom dijelu kralješnice što se zadržalo i u starijoj dobi.
6. Poremećena serotoninska homeostaza uzrokovala je povećano lučenje inzulina u životinja iz 5HT-visoke sublinije koje starenjem uzrokuje razvitak fenotipa nalik dijabetesu tipa II.
7. 5-HT i inzulin sinergistički negativno djeluju na koštano tkivo uzrokujući pojačanu aktivaciju osteoblasta koji posljedično u procesu koštane pregradnje aktiviraju osteoklaste što dovodi do gubitka kosti.

## 8. SAŽETAK

Mehanizam djelovanja serotonina (5-HT) na koštano tkivo nije u potpunosti razjašnjen. U ovom radu istražen je utjecaj promijenjene homeostaze 5-HT-a na koštano tkivo u WZ-5HT štakorskom modelu. Mineralna gustoća i koštani parametri bedrene kosti i 3. lumbalnog kralješka izmjereni su DXA i mikro CT uređajima. Povećana aktivnost 5-HT sustava u WZ-5HT štakora uzrokovala je povećanu tjelesnu masu i rast kostiju. Kod kortikalne kosti primjećeno je povećano periostalno širenje i endostealna resorpcija u životinja iz 5HT-visoke sublinije. Značajno povećana stopa koštanog stvaranja, uz povišenu koncentraciju markera koštane razgradnje, upućuju na povećanje koštane pregradnje u štakora iz 5HT-visoke sublinije. Visoka stopa koštane pregradnje uzrokovala je smanjenje trabekularne kosti distalne bedrene kosti i lumbalnog dijela kralješnice u tih životinja. U štakora iz 5HT-visoke sublinije je cijeljenje prijeloma bilo usporeno zbog smanjene mineralizacije koštanog kalusa. Životinje s povišenom količinom 5-HT-a imale su smanjenu količinu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  te su starenjem razvile hiperglikemiju, hiperinzulinemiju i povećano nakupljanje visceralnog masnog tkiva, što su indikatori razvoja fenotipa dijabetesa melitusa tipa II. Pojedinačno, 5-HT i inzulin nisu pokazali učinak na osteoblaste i osteoklaste, ali zajedno su sinergistički pojačali diferencijaciju osteoblasta i smanjili diferencijaciju osteoklasta. Pokazano je da 5-HT djeluje na koštano tkivo u sinergiji s inzulinom potičući aktivaciju osteoblasta koji dalje aktiviraju osteoklaste i tako povećavaju koštanu pregradnju.

## 9. SUMMARY

### Effect of Serotoninemia on Bone Remodeling Metabolism

Igor Erjavec, 2014

The mechanism of serotonin (5-HT) effect on bone is still unclear. In this research the effect of altered 5-HT homeostasis on bone was further investigated in WZ-5HT rat model. Mineral density and bone parameters of femur and 3<sup>rd</sup> lumbar vertebrae were resolved using DXA and micro CT, respectively. Elevated blood 5-HT caused increased body weight and bone growth in WZ-5HT rats. Cortical bone had increased periosteal formation and endosteal resorption in animals from 5HT-high subline. Significant increase in bone formation rate followed by increase in bone resorption marker indicate high bone remodelling in high-5HT rats, which decreased trabecular bone at the site of distal femur and lumbar spine. Fracture healing was delayed in high-5HT animals due to prolonged mineralization of bone callus. Animals with elevated 5-HT level had decreased level of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and they developed hyperglycemia, hyperinsulinemia and increased accumulation of visceral fat tissue with ageing, a symptoms of diabetes melitus type II phenotype development. In osteoblasts and osteoclasts neither 5-HT nor insulin had effect, while their synergistic effect caused increased differentiation of osteoblasts and decreased differentiation of osteoclasts, respectively. It has been shown that 5-HT exerts its effect on bone together with insulin promoting osteoblast activation which in turn activates osteoclasts and increases bone turnover.

## 10. LITERATURA

1. Marks SC, Jr., Odgren PR. Structure and Development of the Skeleton. U: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, ur. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002, str. 3-16.
2. Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. Clin Chem 1999; 45: 1359-68.
3. Currey JD. The Structure and Mechanics of Bone. J Materl Sci 2012; 47: 41-54.
4. Currey JD. The Structure of Bone Tissue. U: ur. Bones : structure and mechanics. Princeton, NJ: Princeton University Press; 2002, str. 3-28.
5. Gentili C, Cancedda R. Cartilage and bone extracellular matrix. Curr Pharm Des 2009; 15: 1334-48.
6. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. Osteoporos Int 2003; 14 Suppl 3: S35-42.
7. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. FASEB J 1991; 5: 2814-23.
8. Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. J Biol Chem 2002; 277: 4223-31.
9. Rossert J, de Crombrughe B. Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation. U: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, ur. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002, str. 189-210.
10. Gehron Robey P. Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. U: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, ur. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002, str. 225-38.
11. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3 Suppl 3: S131-9.
12. Mallein-Gerin F, Garrone R, van der Rest M. Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes. Eur J Cell Biol 1991; 56: 364-73.
13. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. Curr Rheumatol Rep 2003; 5: 222-6.
14. Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. Bone 1995; 16: 533-44.

15. Simic P, Culej JB, Orlic I i sur. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J Biol Chem* 2006; 281: 25509-21.
16. Musculoskeletal System. U: Standring S, ur. *Gray's Anatomy 39th Ed.* New York: Elsevier; 2004, str. 83-135.
17. Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. *Clin Orthop Relat Res* 1977; 236-47.
18. Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML. Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng* 1991; 113: 191-7.
19. Mullender MG, Huiskes R. Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law. *J Orthop Res* 1995; 13: 503-12.
20. Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* 2008; 118: 421-8.
21. Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 1985; 76: 155-65.
22. Everts V, Delaisse JM, Korper W i sur. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 77-90.
23. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-42.
24. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 638-49.
25. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113 ( Pt 3): 377-81.
26. Teitelbaum SL, Abu-Amer Y, Ross FP. Molecular mechanisms of bone resorption. *J Cell Biochem* 1995; 59: 1-10.
27. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45: 1353-8.
28. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 2000; 108: 153-64.
29. Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res* 1984; 5: 243-52.
30. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993; 8 Suppl 2: S505-10.

31. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR i sur. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-19.
32. Lacey DL, Timms E, Tan HL i sur. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-76.
33. Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 576-88.
34. Rickard D, Harris S, Turner R, Khosla S, Spelsburg T. Estrogens and Progestins. U: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, ur. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002, str. 655-76.
35. Hock JM, Fitzpatrick LA, Bilezikian J. Actions of Parathyroid Hormone. U: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, ur. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002, str. 463-82.
36. Norman AW, Henry HL, Bishop JE, Song XD, Bula C, Okamura WH. Different shapes of the steroid hormone 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$  act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids* 2001; 66: 147-58.
37. Gillespie WJ, Henry DA, O'Connell DL, Robertson J. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involutional and post-menopausal osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD000227.
38. Wasserman RH, Fullmer CS. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *J Nutr* 1995; 125: 1971S-9S.
39. Sneddon WB, Barry EL, Coutermarsh BA, Gesek FA, Liu F, Friedman PA. Regulation of renal parathyroid hormone receptor expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$  and retinoic acid. *Cell Physiol Biochem* 1998; 8: 261-77.
40. Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol* 1984; 246: E493-8.
41. Bain S, Ramamurthy NS, Impeduglia T, Scolman S, Golub LM, Rubin C. Tetracycline prevents cancellous bone loss and maintains near-normal rates of bone formation in streptozotocin diabetic rats. *Bone* 1997; 21: 147-53.
42. Cornish J, Callon KE, Reid IR. Insulin increases histomorphometric indices of bone formation In vivo. *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 492-5.
43. Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995; 44: 775-82.
44. Thrailkill KM, Lumpkin CK, Jr., Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E735-45.



45. Cullinane MD, Einhorn AT. Biomechanics of Bone. U: Bilezikian J, Raisz L and Rodan G, ur. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 2002, str. 17-32.
46. Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 1948; 176: 1243-51.
47. Mann JJ, McBride PA, Brown RP i sur. Relationship between central and peripheral serotonin indexes in depressed and suicidal psychiatric inpatients. *Arch Gen Psychiatry* 1992; 49: 442-6.
48. van Donkelaar EL, Blokland A, Ferrington L, Kelly PA, Steinbusch HW, Prickaerts J. Mechanism of acute tryptophan depletion: is it only serotonin? *Mol Psychiatry* 2011; 16: 695-713.
49. Walther DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1673-80.
50. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007; 132: 397-414.
51. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC i sur. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* 2010; 16: 804-8.
52. Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK i sur. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *J Cell Biochem* 2006; 98: 139-51.
53. Chabbi-Achengli Y, Coudert AE, Callebert J i sur. Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 2567-72.
54. Ni W, Geddes TJ, Priestley JR, Szasz T, Kuhn DM, Watts SW. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 663-74.
55. Slominski A, Pisarchik A, Semak I i sur. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 2002; 16: 896-8.
56. Deguchi T, Sinha AK, Barchas JD. Biosynthesis of serotonin in Raphe nuclei of rat brain: effect of p-chlorophenylalanine. *J Neurochem* 1973; 20: 1329-36.
57. Knowles RG, Pogson CI. Tryptophan uptake and hydroxylation in rat forebrain synaptosomes. *J Neurochem* 1984; 42: 677-84.
58. Pardridge WM. Tryptophan transport through the blood-brain barrier: in vivo measurement of free and albumin-bound amino acid. *Life Sci* 1979; 25: 1519-28.
59. Kobayashi Y, Schayer RW. Action of rat liver monoamine oxidase on multiple substrates. *Arch Biochem Biophys* 1955; 58: 181-8.

60. Squires RF. Additional evidence for the existence of several forms of mitochondrial monoamine oxidase in the mouse. *Biochem Pharmacol* 1968; 17: 1401-9.
61. Adeghate E, Parvez H. The effect of diabetes mellitus on the morphology and physiology of monoamine oxidase in the pancreas. *Neurotoxicology* 2004; 25: 167-73.
62. Billett EE. Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology* 2004; 25: 139-48.
63. Alabaster VA, Bakhle YS. Removal of 5-hydroxytryptamine by rat isolated lung. *Br J Pharmacol* 1970; 38: 440P-1P.
64. Curzon G. A rapid chromatographic test for high urinary excretion of 5-hydroxy-indole-acetic acid and 5-hydroxytryptamine. *Lancet* 1955; 269: 1361-2.
65. Fitch-Tewfik JL, Flaumenhaft R. Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 77.
66. Stahl S. Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons U: Longnecker G, ur. *The Platelets : Pharmacology and Physiology*. New York: Academic Press; 1985, str. 307-40.
67. Rudnick G. Serotonin transport in plasma and dense granules membrane vesicles. U: Holmsen H, ur. *Platelet responses and metabolism*. Boca Ratom: CRC Press Inc.; 1987, str. 119-33.
68. Rudnick G, Humphreys CJ, Dean GE. Serotonin transport by platelet plasma and granule membranes. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 456: 277-8.
69. Cicin-Sain L, Froebe A, Bordukalo-Niksic T, Jernej B. Serotonin transporter kinetics in rats selected for extreme values of platelet serotonin level. *Life Sci* 2005; 77: 452-61.
70. Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT, Jr. i sur. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 1991; 354: 66-70.
71. Kilic F, Rudnick G. Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3106-11.
72. Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 2003; 301: 610-5.
73. Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 2003; 301: 616-20.
74. Morgenstern E, Neumann K, Patscheke H. The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis. *Eur J Cell Biol* 1987; 43: 273-82.

75. Flaumenhaff R. Platelet Secretion. U: Michelson A, ur. Platelets. London: Academic Press; 2013, str. 343-66.
76. Ginsberg MH, Taylor L, Painter RG. The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. *Blood* 1980; 55: 661-8.
77. Escolar G, White JG. The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells* 1991; 17: 467-85; discussion 86-95.
78. Green AR. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1: S145-52.
79. Kobilka BK, Frielle T, Collins S i sur. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 1987; 329: 75-9.
80. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2013; 494: 185-94.
81. Barnes NM, Hales TG, Lummis SC, Peters JA. The 5-HT<sub>3</sub> receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 2009; 56: 273-84.
82. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A i sur. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 179-212.
83. Michelson D, Stratakis C, Hill L i sur. Bone mineral density in women with depression. *N Engl J Med* 1996; 335: 1176-81.
84. Rabenda V, Nicolet D, Beaudart C, Bruyere O, Reginster JY. Relationship between use of antidepressants and risk of fractures: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2013; 24: 121-37.
85. Westbroek I, van der Plas A, de Rooij KE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ. Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem* 2001; 276: 28961-8.
86. Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone* 2001; 29: 477-86.
87. Collet C, Schiltz C, Geoffroy V, Maroteaux L, Launay JM, de Vernejoul MC. The serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J* 2008; 22: 418-27.
88. Young MR, Matthews JP. Serotonin regulation of T-cell subpopulations and of macrophage accessory function. *Immunology* 1995; 84: 148-52.
89. Battaglini R, Fu J, Spate U i sur. Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1420-31.

90. Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Bliziotes MM, Turner CH. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology* 2005; 146: 685-93.
91. Yadav VK, Ryu JH, Suda N i sur. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 2008; 135: 825-37.
92. Cui Y, Niziolek PJ, MacDonald BT i sur. Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat Med* 2011; 17: 684-91.
93. Warden SJ, Bliziotes MM, Wiren KM, Eshleman AJ, Turner CH. Neural regulation of bone and the skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine). *Mol Cell Endocrinol* 2005; 242: 1-9.
94. Yadav VK, Oury F, Suda N i sur. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 2009; 138: 976-89.
95. Jernej B, Banovic M, Cicin-Sain L i sur. Physiological characteristics of platelet/circulatory serotonin: study on a large human population. *Psychiatry Res* 2000; 94: 153-62.
96. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
97. Ambrose J, Hounsfield G. Computerized transverse axial tomography. *Br J Radiol* 1973; 46: 148-9.
98. Goldman LW. Principles of CT and CT technology. *J Nucl Med Technol* 2007; 35: 115-28; quiz 29-30.
99. Guldborg RE, Lin AS, Coleman R, Robertson G, Duvall C. Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72: 250-9.
100. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 3-11.
101. Johns HE, Cunningham JR. The physics of radiology. 4th Springfield, Ill., U.S.A.: Charles C. Thomas; 1983, str.
102. Judex S, Luu YK, Ozcivici E, Adler B, Lublinsky S, Rubin CT. Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT. *Methods* 2010; 50: 14-9.
103. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. Bone histomorphometry. New York: Raven Press; 1994, str. 1-12.
104. Gruber HE. Adaptations of Goldner's Masson trichrome stain for the study of undecalcified plastic embedded bone. *Biotech Histochem* 1992; 67: 30-4.

105. Moorehead WR, Biggs HG. 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. *Clin Chem* 1974; 20: 1458-60.
106. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
107. Jernej B, Cicin-Sain L. Wistar-Zagreb 5-HT rats : a rodent model with constitutional upregulation/downregulation of serotonin transporter. U: Kalueff AV and LaPorte JL, ur. *Experimental models in serotonin transporter research*. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; 2010, str. 214-43.
108. Hranilovic D, Cicin-Sain L, Bordukalo-Niksic T, Jernej B. Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 2005; 165: 271-7.
109. Chen X, Margolis KJ, Gershon MD, Schwartz GJ, Sze JY. Reduced serotonin reuptake transporter (SERT) function causes insulin resistance and hepatic steatosis independent of food intake. *PLoS One* 2012; 7: e32511.
110. Modder UI, Achenbach SJ, Amin S, Riggs BL, Melton LJ, 3rd, Khosla S. Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 415-22.
111. Warden SJ, Hassett SM, Bond JL i sur. Psychotropic drugs have contrasting skeletal effects that are independent of their effects on physical activity levels. *Bone* 2010; 46: 985-92.
112. Kawashima Y, Fritton JC, Yakar S i sur. Type 2 diabetic mice demonstrate slender long bones with increased fragility secondary to increased osteoclastogenesis. *Bone* 2009; 44: 648-55.
113. Kemp JP, Sayers A, Paternoster L i sur. Does bone resorption stimulate periosteal expansion? A cross-sectional analysis of beta-C-telopeptides of type I collagen (CTX), genetic markers of the RANKL pathway, and periosteal circumference as measured by pQCT. *J Bone Miner Res* 2014; 29: 1015-24.
114. Bliziotis M, Gunness M, Eshleman A, Wiren K. The role of dopamine and serotonin in regulating bone mass and strength: studies on dopamine and serotonin transporter null mice. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; 2: 291-5.
115. Inose H, Zhou B, Yadav VK, Guo XE, Karsenty G, Ducy P. Efficacy of serotonin inhibition in mouse models of bone loss. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 2002-11.
116. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 337-49.

117. Holick MF. The role of vitamin D for bone health and fracture prevention. *Curr Osteoporos Rep* 2006; 4: 96-102.
118. Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP i sur. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000229.
119. Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M i sur. Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 19420-5.
120. Larsen ML, Horder M, Mogensen EF. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; 323: 1021-5.
121. Schuster DP. Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2010; 3: 253-62.
122. Clark SA, Stumpf WE, Sar M. Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on insulin secretion. *Diabetes* 1981; 30: 382-6.
123. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65: 1005-15.
124. Chabbi-Achengli Y, Launay JM, Maroteaux L, de Vernejoul MC, Collet C. Serotonin 2B receptor (5-HT<sub>2B</sub> R) signals through prostacyclin and PPAR- $\alpha$ /delta in osteoblasts. *PLoS One* 2013; 8: e75783.
125. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T i sur. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010; 142: 296-308.
126. Bordukalo-Niksic T, Cicin-Sain L, Jernej B. Expression of brain and platelet serotonin transporters in sublines of rats with constitutionally altered serotonin homeostasis. *Neurosci Lett* 2004; 369: 44-9.
127. Jernej B, Hranilovic D, Cicin-Sain L. Serotonin transporter on rat platelets: levels of mRNA underlie inherited differences in uptake kinetics. *Neurochem Int* 1998; 33: 519-23.
128. Xu F, Ye YP, Dong YH, Guo FJ, Chen AM, Huang SL. Inhibitory effects of high glucose/insulin environment on osteoclast formation and resorption in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013; 33: 244-9.
129. Garnero P, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, Delmas PD. Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1614-21.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 21. travnja 1982. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio sam u Dugom Selu, dok sam opću gimnaziju završio u Sesvetama. Prirodoslovno-matematički fakultet, smjer molekularna biologija, upisao sam 2000. godine, a diplomirao sam 2007. godine s radom pod naslovom "Aktivnost ljudskog rekombinantnog koštanog morfogenetskog protein-6 u životinjskom modelu". U Laboratoriju za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zaposlen sam 2007. godine kao vanjski suradnik, a od 2008. godine sam zaposlen kao znanstveni novak na projektu "Uloga TSH u modelu osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom koštanom masom". Poslijediplomski doktorski studij "Biomedicina i zdravstvo" Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2009. godine. Od 2010. godine sudjelujem u nastavi u sklopu kolegija "Proteomika u biomedicinskim istraživanjima" u okviru poslijediplomskog dokorskog studija "Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Od 2013. godine sudjelujem u nastavi kolegija "Molekularna biologija mineraliziranih tkiva" poslijediplomskog studija na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2014. godine sudjelujem u nastavi kolegija „Temeljne i primjenjene znanosti u ortopediji“ poslijediplomskog specijalističkog studija Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Dobitnik sam „New Investigator“ nagrade Europskog društva za kalcificirana tkiva (ECTS) za 2012. godinu.

Član sam Hrvatskog društva za kalcificirana tkiva i Europskog društva za kalcificirana tkiva.

## Popis publikacija:

Urine release of systemically administered bone morphogenetic protein hybrid molecule. Grgurevic L, Macek B, **Erjavec I**, Mann M, Vukicevic S. *J Nephrol*. 2007 May-Jun;20(3):311-9.

Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. Grgurevic L, Macek B, Healy DR, Brault AL, **Erjavec I**, Cipic A, Grgurevic I, Rogic D, Galesic K, Brkljacic J, Stern-Padovan R, Paralkar VM, Vukicevic S. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Apr;22(4):681-92.

Bone morphogenetic protein (BMP)1-3 enhances bone repair. 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 29;408(1):25-31.

The proteome and gene expression profile of cementoblastic cells treated by bone morphogenetic protein-7 in vitro. Bozic D, Grgurevic L, **Erjavec I**, Brkljacic J, Orlic I, Razdorov G, Grgurevic I, Vukicevic S, Plancak D. *J Clin Periodontol*. 2012 Jan;39(1):80-90.

Effect of bone morphogenetic protein-7 on gene expression of bone morphogenetic protein-4, dentin matrix protein-1, insulin-like growth factor-I and -II in cementoblasts in vitro. Bozic D, Grgurevic L, **Erjavec I**, Razdorov G, Brkljacic J, Orlic I, Plancak D. *Coll Antropol*. 2012 Dec;36(4):1265-71.

Computed microtomography visualization and quantification of mouse ischemic brain lesion by nonionic radio contrast agents. Dobrivojevic M, Bohacek I, **Erjavec I**, Gorup D, Gajovic S. *Croat Med J*. 2013 Feb;54(1):3-11.

Exogenous heparin binds and inhibits bone morphogenetic protein 6 biological activity. Brkljacic J, Pauk M, **Erjavec I**, Cipic A, Grgurevic L, Zadro R, Inman GJ, Vukicevic S. *Int Orthop*. 2013 Mar;37(3):529-41.

Differential expression of proteins with heparin affinity in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis: a preliminary study. Grazio S, Razdorov G, **Erjavec I**, Grubisic F, Kusic Z, Punda M, Anticevic D, Vukicevic S, Grgurevic L. *Clin Exp Rheumatol*. 2013 Sep-Oct;31(5):665-71.

The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, Brkljacic J, Pauk M, **Erjavec I**, Francetic I, Dumic-Cule I, Jelic M, Durdevic D, Vlahovic T, Novak R, Kufner V, Bordukalo Niksic T, Kozlovic M, Banic Tomisic Z, Bubic-Spoljar J, Bastalic I, Vikic-Topic S, Peric M, Pecina M, Grgurevic L. *Int Orthop*. 2014 Mar;38(3):635-47.