

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mr Nataša M. Popović

**Delovanje litijuma na neurotransmiterski
i antioksidativni status u prefrontalnom
korteksu i hipokampusu pacova izlaganih
ponavljanom stresu fizičkog sputavanja**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

MSc Nataša M. Popović

**The effects of lithium on the neurotransmitter
and antioxidant status in the
prefrontal cortex and hippocampus of the rats
exposed to restraint stress**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

Gavrilović Ljubica

dr Ljubica Gavrilović, viši naučni saradnik
Instituta za nuklearne nauke „Vinča“
Univerziteta u Beogradu

Predrag Vujović

dr Predrag Vujović, docent Biološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Pajović Snežana B.

Prof. dr Snežana B. Pajović, naučni savetnik
Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta
u Beogradu i redovni profesor Medicinskog
fakulteta Univerziteta u Nišu

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, pod neposrednim rukovodstvom dr Ljubice Gavrilović, višeg naučnog saradnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu.

Dugujem neizmernu zahvalnost mentoru, dr Ljubici Gavrilović, na ukazanom poverenju, strpljenju i razumevanju, a pre svega na dragocenoj pomoći u svim fazama izrade ove disertacije.

Zahvaljujem dr Predragu Vujoviću, docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na korisnim sugestijama i pomoći tokom pisanja disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Snežani B. Pajović, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu i redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, za pomoć tokom izrade i pisanja ove disertacije, kao i za veliku podršku od početka mog rada u Laboratoriji.

Svojim koleginicama i kolegama u grupi i našoj Laboratoriji zahvalna sam za stručnu pomoć i prijateljsku podršku tokom rada na ovoj disertaciji.

Svojoj porodici dugujem zahvalnost na ljubavi i podršci, kao i velikoj motivaciji prilikom rada na disertaciji.

SAŽETAK

Cilj istraživanja je bio da se detaljnije prouče molekularni mehanizmi delovanja litijuma na neurotransmiterski i antioksidativni status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu stresiranih životinja. Specifični cilj rada bio je da se ispita uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana, kao i delovanje litijuma kod pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja na: količinu dopamina (DA) i noradrenalina (NA), ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu (TH) i dopamin β hidroksilazu (DBH) (enzime koji učestvuju u biosintezi DA i NA), ekspresiju gena za dopaminske i noradrenalinske transportere odgovorne za preuzimanje, skladištenje i otpuštanje DA i NA (DAT, NET i VMAT 2), aktivnost i količinu enzima odgovornih za razgradnju DA i NA (MAO A, MAO B i COMT), ekspresiju gena za enzime antioksidativne zaštite (SOD 1, SOD 2, CAT, GPx i GR), ekspresiju gena za BDNF u prefrontalnom korteksu i hipokampusu, koncentraciju ACTH i CORT u plazmi i ponašanje eksperimentalnih životinja.

U eksperimentima je korišćen ponavljani stres fizičkog sputavanja, izvođen na taj način što je pacov podvrgnut stanju nepokretnosti smeštanjem u plastične tube dimenzija 25x7 cm. Pacovi su podvrgnuti opisanom stresu po dva sata tokom 14 dana u različito vreme u periodu od 9-13 h. Rastvor litijum-hlorida (LiCl) je pacovima injeciran intraperitonealno jednom dnevno 14 dana. Početna doza litijuma je bila 1,5 mEq/kg i primenjena je prva dva dana. Zatim je povećana na 2,3 mEq/kg sedam dana, pa na 3 mEq/kg pet dana. Ovakav protokol davanja LiCl pacovima obezbeđuje koncentracije litijuma u plazmi koje su, u poređenju sa pacijentima sa bipolarnim poremećajem, iznad minimalne terapijske koncentracije (*i. e.* 0,4 mM) tokom perioda terapije. U ovom istraživanju korišćene su sledeće metode: 1. Metoda za kvantifikaciju ekspresije TH, DBH, DAT, NET, VMAT 2, SOD 1, SOD 2, CAT, GPx, GR i BDNF gena (RT-PCR-a u realnom vremenu sa TaqMan probama); 2. Metoda za kvantifikaciju sinteze TH, DBH, DAT, NET, VMAT 2, COMT, SOD 1, SOD 2, CAT, GPx, GR i BDNF proteina (Western blot); 3. Metode za određivanje aktivnosti enzima MAO A i MAO B (Amplex Red Monoamine Oxidase Assay kit; molecular Probes), SOD 1, SOD 2, CAT, GPx i GR (Randox Laboratories, Crumlin, UK; metoda po Claiborn-u; metoda po Maral-u; metoda po Glatzle-u); 4. Metoda za određivanje DA i NA u tkivu (kit 3-CAT Research ELISA kits BA E-5600, Labor Diagnostica Nord, Nordhorn, Germany); 5. ELISA esej, metoda za određivanje CORT u plazmi (OCTEIA EIA kit,

Immunodiagnostic Systems Inc.); 6. Hemiluminiscentna metoda za određivanje ACTH u plazmi pomoću automatskog analizatora. Test izdignutog plus lavirinta i test forsiranog plivanja korišćeni su za analizu ponašanja eksperimentalnih životinja.

U obe ispitivane moždane oblasti, u uslovima ponavljanog stresa fizičkog sputavanja, smanjena je ekspresija gena za TH (nema „de novo“ sinteze kateholamina), povećano je preuzimanje neurotransmitera (NA u prefrontalnom korteksu i DA u hipokampusu), povećana je konverzija DA u NA (samo u hipokampusu), povećano je korišćenje i fino podešavanje kapaciteta kateholaminskog sistema i povećana je potreba za razgradnjom oba neurotransmitera. To je uticalo na smanjenje količine DA i povećanje količine NA u obe ispitivane moždane oblasti. Pored toga, uočena je povećana aktivnost SOD 1, SOD 2 i CAT enzima i količina BDNF, a smanjena aktivnost GPx enzima u obe ispitivane moždane oblasti, kao i povećana koncentracija CORT u plazmi. Svi ispitivani parametri, a prvenstveno visoke vrednosti NA i niske vrednosti DA, ukazuju na to da je primenjeni tretman uzrokovao stresni odgovor kod eksperimentalnih životinja, što se odrazilo i na njihovo ponašanje.

Litijum kod stresiranih životinja vraća vrednosti ekspresije gena za TH i DBH na kontrolni nivo i započinje „de novo“ sintezu kateholamina, vraća nivo preuzimanja, konverzije, korišćenja i finog podešavanja kapaciteta kateholaminskog sistema na kontrolni nivo, a povećava potrebu za razgradnjom neurotransmitera NA, što za posledicu ima vraćanje nivoa DA i NA u obe moždane oblasti na nivo karakterističan za nestresirane životinje. U uslovima ponavljanog stresa fizičkog sputavanja, litijum povećava aktivnosti SOD 2, CAT, GPx i GR enzima, što ukazuje na to da litijum s obzirom na vrstu tkiva aktivira sistem antioksidativne zaštite zbog povećane razgradnje stresom akumuliranog NA. Litijum kod stresiranih životinja, vraća ekspresiju gena za BDNF u obe ispitivane moždane oblasti, kao i nivoe ACTH i CORT u plazmi, na vrednosti približne kontrolama. Pored toga, litijum kod stresiranih životinja, vraća indeks anksioznosti i procenat nepokretnosti na kontrolni nivo.

Na osnovu analize dobijenih rezultata možemo zaključiti da litijum u prefrontalnom korteksu i hipokampusu stresiranih životinja vraća neurotransmiterski i antioksidativni status na nivo nestresiranih životinja.

Ključne reči: kateholamini, enzimi antioksidativne zaštite, ponavljani stres fizičkog sputavanja, prefrontalni korteks, hipokampus, litijum, pacovi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neuronauke

UDK broj: [615.214.23 : 546.34] : 616.895 (043.3)

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the molecular mechanisms underlying the effects of lithium on neurotransmitter and antioxidant status in prefrontal cortex and hippocampus of the stressed animals. The specific aim of the work was to investigate the effect of chronic restraint stress in a period of 14 days and also the effect of lithium administration on: the amounts of dopamine (DA) and noradrenaline (NA), the gene expression of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine- β -hydroxylase (DBH) (biosynthetic enzymes for DA and NA), the gene expression of transport proteins for uptake, storage and release of DA and NA (DAT, NET and VMAT 2), the activity and amount of DA and NA degrading enzymes (MAO A, MAO B and COMT), the gene expression of antioxidant enzymes (SOD 1, SOD 2, CAT, GPx and GR), the gene expression of BDNF in prefrontal cortex and hippocampus, the plasma concentrations of ACTH and CORT, as well as on the behavior of experimental animals.

In our experiments the rats were subjected to chronic restraint stress by being placed in the plastic tubes sized 25x7 cm, two hours a day for 14 days, at different times in the period from 9 to 13 h. Lithium-chloride solution (LiCl) was injected to the animals intraperitoneally once a day during 14 days. The initial dose of lithium of 1,5m Eq/kg was applied in the first two days. The dose was increased to 2,3 mEq/kg during the next 7 days and to 3 mEq/kg during the following 5 days. This protocol of LiCl administration provided the concentrations of lithium in the plasma of rats to be higher than the minimal therapeutic concentration (i.e. 0,4 mM) in the patients with bipolar disorder. The following methods were used in this investigation: 1. The expressions of TH, DBH, DAT, NET, VMAT 2, SOD 1, SOD 2, CAT, GPx, GR and BDNF were quantified by using real time RT-PCR with TaqMan assays. 2. Western blot analysis was used to quantify the synthesis of TH, DBH, DAT, NET, VMAT 2, COMT, SOD1, SOD 2, CAT, GPx, GR and BDNF protein. 3. Methods for evaluation of MAO A and MAO B enzyme activity (Amplex Red Monoamine Oxidase Assay kit; molecular Probes), enzyme activities of SOD 1, SOD 2, CAT, GPx i GR (Randox Laboratories, Crumlin, UK; method by Claiborn-u; method by Maral-u; method by Glatzle-u); 4. Methods for measuring DA i NA in the tissue (kit 3-CAT Research ELISA kits BA E-5600, Labor Diagnostica Nord, Nordhorn, Germany); 5. ELISA assay, the method for measuring CORT in the plasma (OCTEIA EIA kit, Immunodiagnostic

Systems Inc.); 6. Hemiluminiscent method for measuring of ACTH in the plasma by automatic analyzer. Plus maze and forced swimming tests were used for the analysis of behavior of the experimental animals.

In the conditions of chronic restraint stress, in both of the investigated brain areas, the gene expression of TH was decreased (confirms absence of *de novo* synthesis of catecholamine), the uptake was increased (NA in prefrontal cortex and DA in hippocampus), the conversion of DA into NA was increased (in hippocampus only), the utilization and fine tuning of catecholamine capacity was increased and the necessity for degradation of both transmitters was increased. This influenced the decrease of DA and the increase of NA amounts in both of the investigated brain areas. In addition, we observed the increased activity of SOD 1, SOD 2 and CAT enzymes and the amount of BDNF, decreased GPx enzyme activity in both brain areas, as well as the increased CORT concentration in plasma. All the investigated parameters, primarily high NA levels and low DA levels, indicate that the applied treatment caused the stress reaction in experimental animals which had an impact on their behavior.

In stressed animals, lithium returns gene expressions of TH and DBH to control levels and initiates *de novo* catecholamine synthesis, returns the levels of uptake, conversion, utilization and fine tuning of catecholamine capacity to the control level and increases the necessity for NA transmitter degradation, which results in returning of DA and NA levels of both brain areas to the levels found in unstressed animals. In the conditions of chronic restraint stress lithium increases the activities of SOD 2, CAT, GPx and GR enzymes, which indicates that lithium activates antioxidant protection system due to increased degradation of stress- accumulated NA. In stressed animals, lithium returns the gene expression of BDNF in both investigated brain areas, as well as ACTH and CORT levels in the plasma, to the levels approximate to the controls. In addition, lithium returns anxiety index and immobility percentage to the control levels.

According to the analysis of the obtained results, we can make a conclusion that lithium returns the neurotransmitter and antioxidant status in the prefrontal cortex and hippocampus of the stressed animals to the level of the unstressed animals.

Key words: catecholamine, chronic restraint stress, antioxidant defense enzymes,
prefrontal cortex, hippocampus, lithium, rats

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Neuroscience

SKRAĆENICE

A	adrenalin
AAAD	aromatična L-aminokiselinska dekarboksilaza
ACTH	adrenokortikotropni hormon
ALS	amiotrofična lateralna skleroza
ANOVA	analiza varijanse (eng. <i>analysis of variance</i>)
AP-1	aktivacioni protein-1
APS	amonijum persulfat
ATP	adenozin trifosfat
AVP	arginin vazopresin
BAG-1	membranski protein (eng. BAG family molecular chaperone regulator 1; <i>syn.</i> Bcl-2-associated athanogene 1)
BCA	bicinhoninična kiselina (eng. bichoninic acid)
Bcl-2	B-ćelijski limfom 2 (eng. B-cell lymphoma 2)
BDNF	neurotrofni moždani faktor (eng. brain-derived neurotrophic factor)
BH4	tetrahidrobiopterin
CA	<i>cornu ammonis</i>
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CAT	katalaza
cDNK	komplementarna DNK
cGPx	ćelijska GPx (GPx1)
CNS	centralni nervni sistem
COMT	katehol-O-metiltransferaza
CORT	kortikosteron
CRE	elementi koji odgovaraju na cAMP (eng. cAMP-response element)
CREB	CRE vezujući protein
CRH	kortikotropni oslobađajući hormon
CuZnSOD	bakar cink superoksid dismutaza (SOD 1)
DA	dopamin

DAG	diacilglicerol
DAT	dopaminski transporter
DBH	dopamin beta-hidroksilaza
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DOPA	dihidroksifenilalanin
DPC	dietilpirokarbonat
ECL	pojačana hemiluminescencija (eng. enhanced chemiluminescence)
EC SOD	vanćelijska SOD (SOD 3)
EDTA	etilendiamintetraacetat
ELISA	enzimski imuno esej (eng. enzyme-linked immunoadsorbent assay)
F	životinje tretirane fiziološkim rastvorom
FGF-2	faktor rasta fibroblasta (eng. basic fibroblast growth factor)
GABA	gama-aminobuterna kiselina
GDNF	neurotrofni faktor glijskih ćelija (eng. glial cell-derived neurotrophic factor)
GLU	glukoza
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GRE	elementi koji odgovaraju na glukokortikoide (eng. glucocorticoid-responsive element)
GSH	redukovana forma glutationa
GSK-3 β	kinaza glikogen sintaze 3 beta (eng. glycogen synthase kinase 3 beta)
GSSG	oksidovana forma glutationa
GST	glutation S-transferaza
GTP	guanozin trifosfat
HDAC	histon deacetilaza
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HPA	hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalni
HRP	peroksidaza iz korena rena (eng. horseradish peroxidase)
5-HT	5-hidroksitriptamin (serotonin)
IL-6	interleukin 6
iRNK	informativna ribonukleinska kiselina

K	kontrolne životinje
LC	lokus ceruleus (<i>locus coeruleus</i>)
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin (levodopa)
Li	životinje tretirane litijumom
LiCl	litijum-hlorid
LTP	dugotrajna potencijacija (eng. long-term potentiation)
MAO	monoamino oksidaza
MARCKS	supstrat protein kinaze C (eng. myristoylated alanine-rich C-kinase substrate)
MnSOD	mangan superoksid dismutaza (SOD 2)
NA	noradrenalin
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NET	noradrenalinski transporter
NFκB	nuklearni faktor kapa B (eng. nuclear factor kappa B)
NGF-β	nervni faktor rasta beta (eng. nerve growth factor beta)
NMDA	N-metil-D-aspartat
O ₂ ⁻	superoksid anjon
OD	optička gustina (eng. optical density)
PC12	ćelijska linija feohromocitoma srži nadbubrežne žlezde pacova
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. polymerase chain reaction)
PEA	feniletilamin
PFC	prefrontalni korteks
PHGPx	fosfolipid hidroperoksid GPx (GPx4)
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PKC	protein kinaza C
PNMT	feniletanolamin N-metiltransferaza
POMC	pro-opiomelanokortin
PSFS	ponavljani stres fizičkog sputavanja
PTSD	post-traumatski stresni poremećaj
PVN	paraventrikularni nukleus
Q10	koenzim Q10
RNK	ribonukleinska kiselina

ROS	reaktivne vrste kiseonika (eng. reactive oxygen species)
Sam	S-adenozil-metionin
SDS	natrijum dodecil sulfat
Sec	seleno-cistein
SOD	superoksid dismutaza
TAR	totalna antioksidativna reaktivnost (eng. total antioxidant reactivity)
TBS-T	pufer (eng. Tris-buffered saline - Tween 20)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TH	tirozin hidroksilaza
TNF	faktor nekroze tumora (eng. tumor necrosis factor)
TRAP	totalni reaktivni antioksidativni potencijal (eng. total reactive antioxidant potential)
U1	neuronsko preuzimanje "uptake 1"
U2	neneuronsko preuzimanje "uptake 2"
VMAT	vezikularni monoaminski transporter

SADRŽAJ

1. UVOD-----	1
1.1. Stres-----	1
1.1.1. Definicija stresa-----	1
1.1.2. Podela stresa s obzirom na vrstu i trajanje stresora-----	2
1.1.3. Ponavljani stres fizičkog sputavanja-----	2
1.2. Kateholamini-----	3
1.2.1. Metabolizam kateholamina-----	4
1.2.1.1. Biosinteza kateholamina-----	4
1.2.1.2. Preuzimanje kateholamina-----	6
1.2.1.3. Razgradnja kateholamina-----	7
1.2.1.3.1. Monoaminooksidaze-----	7
1.2.1.3.2. Katehol-o-metiltransferaza-----	8
1.3. Oksidativni stres-----	9
1.3.1. Enzimi antioksidativne zaštite -----	9
1.3.1.1. Superoksid dismutaze-----	10
1.3.1.1.1. CuZn superoksid dismutaza-----	11
1.3.1.1.2. Mn superoksid dismutaza-----	11
1.3.1.2. Katalaza-----	12
1.3.1.3. Glutation peroksidaza-----	13
1.3.1.4. Glutation reduktaza-----	14
1.4. Stres i psihijatrijski poremećaji-----	15
1.4.1. Uticaj stresa na kateholaminski sistem u mozgu-----	17
1.4.2. Uticaj stresa na sistem antioksidativne zaštite u mozgu-----	22
1.4.3. Uticaj stresa na hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalni sistem-----	24
1.4.3.1. Adrenokortikotropni hormon-----	27
1.4.3.2. Kortikosteron-----	29
1.4.4. Uticaj stresa na nivo glukoze u krvi-----	30
1.4.5. Uticaj stresa na ekspresiju BDNF gena-----	31
1.4.6. Uticaj stresa na ponašanje-----	33

1.5. Delovanje terapijskih doza litijuma u lečenju psihijatrijskih poremećaja-----	33
2. CILJ RADA-----	39
3. MATERIJAL I METODE-----	41
3.1. Eksperimentalni model-----	41
3.2. Eksperimentalni pristup-----	42
3.3. Određivanje ekspresije gena-----	42
3.3.1. Metoda određivanja nivoa iRNK – RT-PCR u realnom vremenu-----	42
3.3.1.1. Izolacija i merenje koncentracije ukupne RNK-----	42
3.3.1.2. Prepis RNK u cDNK-----	43
3.3.1.3. Kvantifikacija ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu-----	43
3.3.2. Metoda određivanja koncentracije i sinteze proteina-----	44
3.3.2.1. Izolacija i merenje koncentracije ukupnih proteina-----	44
3.3.2.2. Elektroforetsko razdvajanje proteina-----	45
3.3.2.3. Transfer proteina sa gela na membranu-----	46
3.3.2.4. Imunodetekcija i denzitometrijsko merenje proteina-----	46
3.3.3. Metode određivanja aktivnosti proteina-----	47
3.3.3.1. Merenje aktivnosti enzima monoaminooksidaze A i monoaminooksidaze B-----	47
3.3.3.2. Merenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze-----	48
3.3.3.3. Merenje aktivnosti enzima katalaze-----	48
3.3.3.4. Merenje aktivnosti enzima glutation peroksidaze-----	49
3.3.3.5. Merenje aktivnosti enzima glutation reduktaze-----	49
3.4. Metoda određivanja kateholamina u tkivu-----	50
3.5. Metoda određivanja adrenokortikotropnog hormona u plazmi-----	50
3.6. Metoda određivanja kortikosterona u plazmi-----	51
3.7. Metoda određivanja glukoze u krvi-----	51
3.8. Metode za praćenje promena u ponašanju eksperimentalnih životinja-----	51
3.8.1. Test izdignutog plus lavirinta („Plus maze test“)-----	52
3.8.2. Test forsiranog plivanja („Forced swimming test“)-----	53
3.9. Statistička analiza rezultata-----	54
4. REZULTATI-----	56

4.1. Delovanje litijuma na koncentraciju neurotransmitera dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	56
4.1.1. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na koncentraciju dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	56
4.1.2. Delovanje litijuma na koncentraciju dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	58
4.1.3. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na koncentraciju dopamina i noradrenalina u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	59
4.1.4. Delovanje litijuma na koncentraciju dopamina i noradrenalina u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	61
4.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime koji učestvuju u biosintezi kateholamina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	62
4.2.1. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	62
4.2.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	64
4.2.3. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	67
4.2.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	68
4.2.5. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	70
4.2.6. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju	

od 14 dana-----	72
4.2.7. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	75
4.2.8. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	76
4.3. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za transportere dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	78
4.3.1. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za noradrenalinski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova---	78
4.3.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za noradrenalinski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	80
4.3.3. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	82
4.3.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	83
4.3.5. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	84
4.3.6. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	87
4.3.7. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	89
4.3.8. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	91
4.3.9. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju	

gena za noradrenalinski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	93
4.3.10. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za noradrenalinski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	94
4.3.11. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova----	96
4.3.12. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	98
4.4. Delovanje litijuma na aktivnost i količinu enzima koji učestvuju u razgradnji dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	101
4.4.1. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na aktivnost enzima monoaminooksidaze A i monoaminooksidaze B u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	101
4.4.2. Delovanje litijuma na aktivnost enzima monoaminooksidaze A i monoaminooksidaze B u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	103
4.4.3. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na količinu enzima katehol-o-metiltransferazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova----	104
4.4.4. Delovanje litijuma na količinu enzima katehol-o-metiltransferaze u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	106
4.4.5. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na aktivnost enzima monoaminooksidaze A i monoaminooksidaze B u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	108
4.4.6. Delovanje litijuma na aktivnost enzima monoaminooksidaze A i monoaminooksidaze B u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	109
4.4.7. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na količinu enzima katehol-o-metiltransferaze u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	111

4.4.8. Delovanje litijuma na količinu enzima katehol-o-metiltransferaze u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	112
4.5. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime antioksidativne zaštite u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	114
4.5.1. Uticaj ponavljanih stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	114
4.5.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	117
4.5.3. Uticaj ponavljanih stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	119
4.5.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	122
4.5.5. Uticaj ponavljanih stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za katalazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	125
4.5.6. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za katalazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	128
4.5.7. Uticaj ponavljanih stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutacion peroksidazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	130
4.5.8. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutacion peroksidazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	132
4.5.9. Uticaj ponavljanih stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutacion reduktazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	134
4.5.10. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutacion reduktazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	136

4.5.11. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	137
4.5.12. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	139
4.5.13. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	141
4.5.14. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	143
4.5.15. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za katalazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	145
4.5.16. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za katalazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	147
4.5.17. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutation peroksidazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	150
4.5.18. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutation peroksidazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	151
4.5.19. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutation reduktazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	154
4.5.20. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutation reduktazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	155
4.6. Delovanje litijuma na ekspresiju transkripcionog faktora BDNF u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	158
4.6.1. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za BDNF u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova-----	158
4.6.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za BDNF u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-	159

4.6.3. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za BDNF u hipokampusu odraslih mužjaka pacova-----	161
4.6.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za BDNF u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	163
4.7. Delovanje litijuma na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	165
4.7.1. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova-----	165
4.7.2. Delovanje litijuma na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	170
4.8. Delovanje litijuma na ponašanje odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	175
4.8.1. Uticaj ponavljanog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na indeks anksioznosti i trajanje nepokretnosti odraslih mužjaka pacova-----	175
4.8.2. Delovanje litijuma na indeks anksioznosti i trajanje nepokretnosti odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana--	182
5. DISKUSIJA-----	189
5.1. Delovanje litijuma na koncentraciju neurotransmitera dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	191
5.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime koji učestvuju u biosintezi kateholamina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	193
5.3. Delovanje litijuma na ekspresiju transportera dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	197
5.4. Delovanje litijuma na aktivnost i količinu enzima koji učestvuju u razgradnji dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka	

pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	200
5.5. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime antioksidativne zaštite u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	202
5.6. Delovanje litijuma na ekspresiju transkripcionog faktora BDNF u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	205
5.7. Delovanje litijuma na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	208
5.8. Delovanje litijuma na ponašanje odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana-----	210
6. ZAKLJUČCI-----	214
7. LITERATURA-----	221
8. PRILOZI	
9. OPŠTI PODACI O AUTORSKIM PRAVIMA	

1. UVOD

1.1. Stres

„Organizam plaća svoje preživljavanje tako što posle svake stresne situacije postaje malo stariji.” Hans Selye

1.1.1. Definicija stresa

Stres je okidač za nastanak važnih adaptivnih procesa, koji omogućavaju organizmu da se izbori i preživi u promenljivoj spoljašnjoj sredini. Međutim, u slučajevima produženog ili ponavljano delovanja stresora, stres može da bude štetan za organizam. Selye-ova ideja da dugotrajni stres može da izazove bolesti i psihijatrijske poremećaje i danas je široko prihvaćena (Selye, 1946; Selye, 1973; Szabo i saradnici, 2012). Savremene teorije stresa definišu stres kao svesno ili nesvesno opažanje faktora koji prete da ugroze homeostazu (Chrousos i Gold, 1992; Goldstein i McEwen, 2002; Goldstein i Kopin, 2007), pri čemu je odgovor u izvesnom stepenu specifičan i zavisi, između ostalog, od prirode pretnje homeostazi, načina na koji organizam opaža stresor i sposobnosti da se sa njim izbori (McEwen i Stellar, 1993; Pacak i Palkovits, 2001). Mozak je centralni organ zadužen za odgovor i adaptaciju organizma na stres zato što uočava opasnost, odnosno registruje efekte stresora i koordiniše odgovarajući neuroendokrini odgovor i ponašanje organizma u odnosu na stresnu situaciju (de Kloet i saradnici, 2005; McEwen, 2012). Adaptivni odgovor organizma na izazove, odnosno na delovanje stresora, podrazumeva aktivan fiziološki odgovor u cilju održavanja homeostaze, što znači da se „stabilnosti postiže kroz promene” (McEwen, 2000 a). Taj proces adaptacije je poznat kao „alostaza”. Mnogi sistemi u organizmu funkcionišu po principu alostaze, uključujući autonomni nervni sistem i hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalni (HPA) sistem i na taj način pomažu da se ponovo uspostavi ili održi stanje homeostaze kroz adaptaciju. Princip alostaze u odgovoru pomenutih sistema na delovanje stresora obuhvata uključivanje procesa sinteze i/ili sekrecije fizioloških posrednika kao što su kateholamini i glukokortikoidi. Funkcionisanje mozga takođe potvrđuje princip alostaze, uključujući procese aktivacije nervnih ćelija i otpuštanja neurotransmitera što za posledicu ima lokalni efekat u smislu ili propagacije ili inhibiranja dalje neuronske aktivnosti. Neurotransmiteri i hormoni se, kao posrednici, po pravilu luče u

određenom periodu po aktivaciji i zatim se isključuju, a sami posrednici se uklanjaju iz međučelijskog prostora procesom preuzimanja ili se metabolišu u cilju završetka njihovog daljeg delovanja. Kada je organizam izložen ponovljenom delovanju stresora ili kada pomenuti sistemi koji su uključeni u proces alostaze ostanu aktivirani i kada to više nije potrebno, odnosno ukoliko ne dođe do isključenja ili uklanjanja ovih posrednika, njihovi efekti na ciljne ćelije se produžavaju i nastaje tzv. “alostatičko opterećenje”. “Alostatičko opterećenje” odnosno “cena adaptacije” je glavni uzročnik brojnih oboljenja (McEwen i Stellar, 1993; McEwen, 1998 a).

1.1.2. Podela stresa s obzirom na vrstu i trajanje stresora

Pod pojmom stresor podrazumeva se stimulus koji remeti homeostazu. Postoje brojne podele stresora. Prema Van de Kar-u i Blair-u (1999) stresori se mogu razvrstati u tri opšte grupe: 1) psihološki stresori, zasnovani na naučenom odgovoru na pretnju od nadolazećih nepovoljnih okolnosti (strah, uznemirenost, izlaganje novom ili nekontrolisanom okruženju); 2) stresori koji se sastoje od fizičkog stimulusa i imaju snažnu psihološku komponentu (bol, imobilizacija); 3) stresori koji ugrožavaju kardiovaskularnu homeostazu (krvarenje, telesna vežba, izlaganje toploti). Pacak i Palkovits (2001) klasifikuju stresore u četiri glavne kategorije: 1) fizički stresori, kao što su hladnoća, toplota, radijacija, buka, vibracije, hemijski stresori, bol i imobilizacija; 2) psihološki stresori koji utiču na emocionalno stanje i mogu da izazovu promene u ponašanju kao što su: anksioznost, strah i frustracija kod ljudi, a kod eksperimentalnih životinja premeštanje i stres fizičkog sputavanja (eng. restraint); 3) socijalni stresori koji odražavaju poremećene interakcije između pojedinaca, npr. kod ljudi: nezaposlenost, razvod, smrt partnera, a kod životinja dominantno ponašanje; 4) stresori koji ugrožavaju kardiovaskularnu i metaboličku homeostazu, kao npr. fizičko vežbanje, poremećaj cirkulacije, hipoglikemija, krvarenje, itd. U pogledu trajanja, stresori mogu biti akutni (pojedinačno i isprekidano izlaganje stresoru) i hronični ili ponovljeni (kontinuirano dugoročno ili isprekidano dugoročno izlaganje stresoru).

1.1.3. Ponavljani stres fizičkog sputavanja

Hronični stres je važan faktor u razvoju depresije, anksioznosti, povišenog pritiska, supresije imunskog sistema, poremećaja reproduktivne funkcije, gastrointestinalnih i mnogih

drugih poremećaja. Da bi se bolje razumeli mehanizmi odgovora na stres i procesi koji dovode do nastanka pomenutih poremećaja pod delovanjem hroničnog stresa, koriste se različiti životinjski modeli. Većina modela hroničnog stresiranja sastoji se od svakodnevnog izlaganja dejstvu određenog stresora. Karakteristika ovog tipa stresiranja je saznanje da ponavljani stres dovodi do adaptacije i habituacije, pa ponavljano izlaganje delovanju istog stresora izaziva sve slabiji neuroendokrini odgovor. To, naravno, veoma zavisi od tipa korišćenog stresora (Pitman i saradnici, 1988; Natelson i saradnici, 1988). Pored toga, individualne razlike u reaktivnosti na stresor, kao i sam intenzitet stresora i učestalost njegove primene mogu da utiču na obrazac odgovora na stres tokom ponavljane primene stresora (Natelson i saradnici, 1988; Pitman i saradnici, 1988). Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) kao procedura stresiranja ima dugu istoriju i veoma često se koristi u cilju izučavanja fiziologije, patologije, farmakologije, imunologije i biologije ponašanja laboratorijskih životinja. Mnogi istraživači podrazumevaju da PSFS neizostavno izaziva odgovor na stres (Kim i Han, 2006). Iz tih razloga tehnika PSFS je postala standardna laboratorijska procedura u proučavanju efekata akutnog i hroničnog stresa. Osim toga, jedan od razloga ove široke upotrebe modela PSFS je njegoa jednostavnost i laka izvodljivost. Hronično stresiranje u ovom modelu podrazumeva da se životinja na određeni broj sati u toku dana, u određenom dužem periodu, smesti u tubu veličine tela koja onemogućava pokrete (Glavin i saradnici, 1994; Sutanto i de Kloet, 1994; Kim i Han, 2006). Iskustva brojnih istraživanja su pokazala da je tehnika stresiranja pacova metodom PSFS veoma korisna i uspešna u izučavanju i centralnih i perifernih mehanizama povezanih sa delovanjem stresa, kao i u ispitivanju efekata lekova na poremećaje uzrokovane stresom.

1.2. Kateholamini

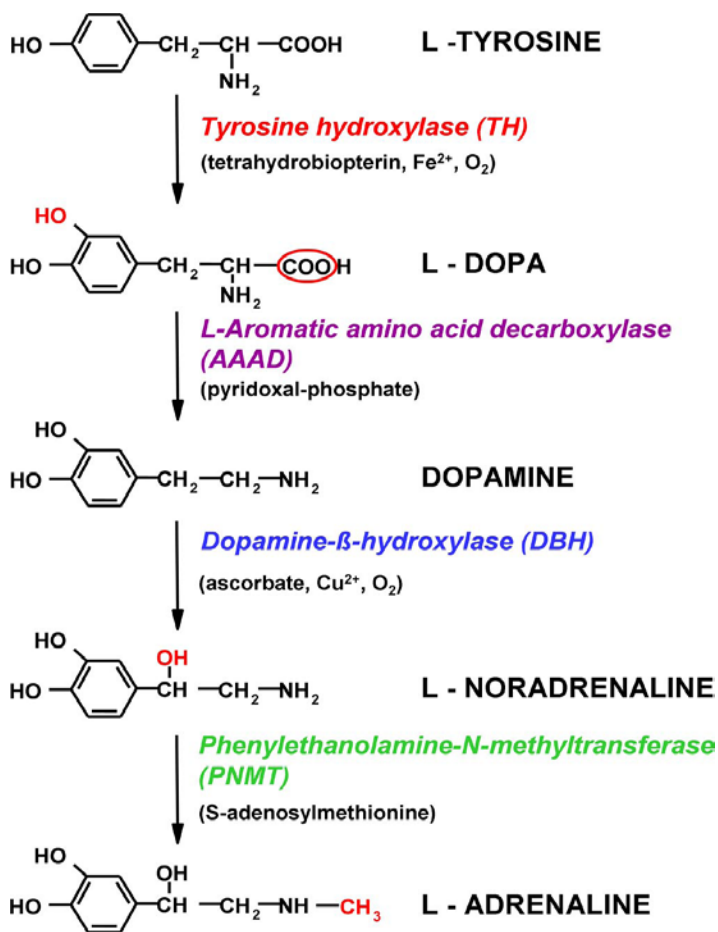
Neposredni odgovor organizma na stres je oslobađanje kateholamina. Kateholamini: dopamin (DA), noradrenalin (NA) i adrenalin (A) nastaju u hromafinim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda, a izlučuju se i kao neurotransmiteri na krajevima postganglijskih simpatičkih nerava i kateholaminskih neurona u mozgu i na taj način deluju na skoro sva tkiva i mnoge funkcije u organizmu. Zajedno sa drugim neurotransmiterima i hormonima, kateholamini regulišu veliki broj fizioloških procesa, lučenje mnogih peptida i steroidnih hormona i mogu da menjaju sintezu hormona tako što utiču na transkripciju gena (Goldstein, 2003; Sabban, 2007).

Po hemijskom sastavu, kateholamini su biogeni amini. To su visoko aktivna jedinjenja, koja u svojoj strukturi sadrže kateholsko jezgro sa amino grupom u bočnom nizu.

1.2.1. Metabolizam kateholamina

1.2.1.1. Biosinteza kateholamina

Kateholamini se sintetišu iz L-tirozina, koji se kada uđe u moždane kateholaminske nervne završetke (Slika 1), pretvara u dihidroksifenilalanin (DOPA) pomoću citosolnog enzima tirozin hidroksilaze (TH). TH je aminokiselinska hidroksilaza koja sadrži gvožđe i zavisna je od



Slika 1. Biosinteza kateholamina (Slika preuzeta iz revijalnog rada Kvetnansky i saradnici, 2009)

biopterina. Ovaj enzim koristi tirozin, tetrahidrobiopterin (BH₄) i molekule kiseonika za stvaranje DOPA, dihidrobiopterina i vode. Kofaktor BH₄ se resintetiše iz dihidropterina pomoću enzima dihidropteridin-reduktaze. Budući da je BH₄ prisutan u malim količinama, aktivnost TH zavisi od njegove raspoloživosti (Nagatsu i Ichinose, 1999). Za *de novo* biosintezu BH₄, enzim GTP-ciklohidrolaza I katalizuje „rate-limiting” stepen (Nichol i saradnici, 1985; Nagatsu i Ichinose, 1999; Thony i saradnici, 2000). Enzim TH je kompleksno regulisan u kratkom i dugom vremenskom periodu. U kratkom vremenskom periodu enzimska aktivnost TH je regulisana negativnom povratnom spregom (Kaufman, 1995; Nagatsu, 1995; Sabban i saradnici, 1995; Kumer i Vrana, 1996; Fitzpatrick, 1999), tako što je inhibira nivo kateholamina (DOPA, NA, DA). Aktivnost TH je takođe regulisana alosteričkom regulacijom i fosforilacijom. TH može biti fosforilisana različitim kinazama na mestu aminokiseline serin (položaj 8, 19, 31 i 40) u NH₂-terminalnom domenu (Dunkley i saradnici, 2004). Osim toga, na aktivnost TH u dužem vremenskom periodu takođe utiču stabilnost enzima, transkripciona regulacija, stabilnost RNK, alternativno spajanje RNK i translaciona aktivnost. Promena ekspresije gena za TH je glavni mehanizam pomoću koga kateholaminski sistem odgovara na stres (Kvetnansky i saradnici, 2009). DOPA se pretvara u DA posredstvom nespecifičnog enzima aromatične L-aminokiselinske dekarboksilaze (AAAD). Aktivnost AAAD zavisi od nivoa njenog kofaktora piridoksal-fosfata. Dopamin se preuzima iz citoplazme i pakuje u vezikule gde se skladišti i pretvara u NA pomoću dopamin-β-hidroksilaze (DBH), enzima koji postoji u rastvorljivoj formi, ali i vezan u membrani vezikula. Obe forme su kodirane istom iRNK (Feng i saradnici, 1992; Lewis i Asnani, 1992). Za aktivnost DBH potrebno je prisustvo askorbinske kiseline, bakra i molekula kiseonika. Izvesna količina DBH se oslobađa egzocitozom zajedno sa NA i A. Ovaj enzim prisutan je i u cerebrospinalnoj tečnosti i plazmi (Weinshilboum i Axelrod, 1971). Dobijeni NA se pretvara u A pomoću rastvorljivog citosolnog enzima feniletanolamin N-metiltransferaze (PNMT) (Axelrod, 1962), koja koristi S-adenozil-metionin (Sam) kao kofaktor. Enzim PNMT može se indukovati pomoću glukokortikoida i uglavnom je lokalizovan u srži nadbubrežnih žlezda, ali i simpatički inervisani organi i neke oblasti mozga su takođe u stanju da sintetišu male količine A.

1.2.1.2. Preuzimanje kateholamina

Biološki efekti kateholamina otpuštenih u sinaptičku pukotinu vrlo brzo prestaju zbog preuzimanja u nervne završetke i/ili efektorske ćelije ili usled razgradnje, odnosno konverzije kateholamina u inaktivne metabolite ili se pak, translociraju u vezikule za deponovanje (Eisenhofer i saradnici, 1988; Goldstein i saradnici, 1988). Mehanizma inaktivacije kateholamina neuronskom reapsorpcijom (Axelrod i saradnici, 1959) i enzimskom razgradnjom otkrio je Julius Axelrod (1957). Neuronsko preuzimanje je poznato kao „uptake 1“ (U1) (Eisenhofer, 2001), a preuzimanje kateholamina od strane neneuronskih tkiva, odnosno ekstraneuronsko preuzimanje, kao „uptake 2“ (U2) (Iveersen, 1965). Proces U1 ima ulogu ponovnog preuzimanja lokalno otpuštenog ili cirkulišućeg NA i njegovog deponovanja u vezikulama unutar neurona za ponovnu upotrebu. Ovo je energetski zahtevan proces i obavlja se posredovanjem proteinskih transportera koji prenose kateholamine nasuprot gradijentu koncentracije. Interesantno je da se tokom izloženosti stresoru U1 povećava istovremeno sa povećanjem sekrecije NA (Eisenhofer i saradnici, 1990 a; Eisenhofer i saradnici, 1991). Oko 90% otpuštenog NA se ponovo preuzima u neurone (Eisenhofer i saradnici, 1989; Eisenhofer i saradnici, 1990 a; Eisenhofer i saradnici, 1991). Preuzimanje i skladištenje kateholamina je posredovano noradrenalinskim transporterom (NET), dopaminskim transporterom (DAT) i vezikularnim monoaminskim transporterom (VMAT). Monoaminski transporteri (NET i DAT) igraju važnu ulogu u fiziološkim funkcijama kateholamina, jer ih uklanjaju i omogućavaju njihovo preuzimanje, a zatim transportuju u vezikule u kojima se čuvaju ili se metabolišu uz pomoć enzima za razgradnju kateholamina. Proširenja na kateholaminskim neuronima u mozgu sadrže citoplazmatične vezikule koje aktivno skladište sintetisane ili preuzete kateholamine iz citoplazme pomoću specifičnih proteinskih prenosilaca VMAT (Johnson, 1988). Utvrđeno je da postoje dve izoforme ovih transportera: VMAT 1 („neuroendokrina“ izoforma) i VMAT 2 („neuronska“ izoforma) (Schuldiner, 1994). Neuroni, bilo da se nalaze na periferiji ili u mozgu, imaju samo izoformu VMAT 2. Nasuprot tome, hromafine ćelije srži nadbubrežnih žlezda imaju obe izoforme VMAT, s tim što je VMAT-1 glavna izoforma kod glodara, a VMAT 2 kod ljudi. Svi kateholamini (DA, NA i A) u načelu su bolji supstrati za izoformu VMAT 2 (Goldstein, 2001). Brza inaktivacija kateholamina otpuštenih u sinaptičku pukotinu je preduslov za preciznu kontrolu efektorskog sistema. Nasuprot uobičajenom shvatanju, vezikularni depoi kateholamina nisu u statičkom stanju čekajući da budu oslobođeni putem egzocitoze. Naprotiv, oni se nalaze u dinamičkoj ravnoteži sa

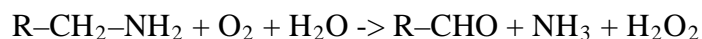
okolnom citoplazmom, uz pasivno isticanje kateholamina u spoljašnjost, uravnoteženo sa aktivnim transportom u unutrašnjost pod kontrolom VMAT (Eisenhofer i saradnici, 2004). Transport pomoću NET i DAT je proces koji zavisi od jona Na^+ i temperature i pokazuje veliki afinitet, ali ima relativno mali kapacitet za kateholamine. NA se translocira pomoću NET dva puta efikasnije nego A. Ovo objašnjava zašto simpatički nervi efikasnije preuzimaju NA nego A. DAT pokazuje veću specifičnost za DA, nego za NA ili A (Eisenhofer, 2001). Simpatički nervi ne preuzimaju O-metilovane metabolite kateholamina (Eisenhofer i saradnici, 1990 b).

1.2.1.3. Razgradnja kateholamina

Kateholamini podležu hemijskoj razgradnji u procesima 3-O-metilacije uz pomoć enzima katehol-O-metiltransferaze (COMT), oksidativne deaminacije uz pomoć enzima monoaminooksidaze (MAO) i vezivanjem u formi sulfata i glukuronida.

1.2.1.3.1. Monoaminooksidaze

Primarna uloga MAO je da razgrađuje amine i da reguliše nivo neurotransmitera, kao i unutarćelijske depoe amina (Shih i saradnici, 1999; Nagatsu, 2004; Shih, 2004). Enzim MAO je flavoprotein i nalazi se na spoljašnjoj membrani mitohondrija presinaptičkog neurona. Sadrži flavin-adenozin-dinukleotid i katalizuje reakciju prevođenja biogenih amina do odgovarajućih aldehida, pri čemu se koristi molekulski kiseonik i stvaraju se kao produkti aldehyd i hidrogenperoksid, što se može uopšteno prikazati kroz jednakost:



Nakon toga se aldehyd kao međuproizvod brzo metaboliše, uglavnom oksidacijom uz pomoć enzima aldehydne dehidrogenaze do odgovarajuće kiseline ili, pod određenim okolnostima do alkohola ili glikola uz pomoć enzima aldehydne reduktaze. Postoje dve izoforme ovog enzima u mozgu, MAO A i MAO B, koje se razlikuju na osnovu afiniteta prema supstratu, kao i na osnovu osetljivosti na inhibitore (Johnston, 1968). Primarni supstrat za MAO u mozgu su neurotransmiteri: A, NA, DA, serotonin (5-HT) i β -feniletilamin (PEA). Pod normalnim fiziološkim uslovima, NA i 5-HT su supstrati koje se prioritarno razgrađuju uz pomoć MAO A, a PEA je prioritetan supstrat za MAO B. Obe izoforme enzima učestvuju u razgradnji tiramina, oktopamina, triptamina i DA, mada za DA u mozgu ljudi veći afinitet ima MAO B. U

dopaminskim neuronima koji sadrže malo ili nimalo MAO B, u razgradnji kateholamina (NA ili DA) učestvuje u najvećoj meri izoforma MAO A. U obrnutom slučaju, kada je reč o astrocitima, gde je MAO B obilno prisutna, smanjuje se količina kateholamina koju razgrađuje MAO A. Kada je u pitanju tkivna zastupljenost, MAO je enzim prisutan u skoro svim tipovima ćelija sisara, osim u eritrocitima (Shih i saradnici, 1999). Izoforma MAO A je najviše zastupljena u placenti, jetri i crevima, a MAO B u mozgu, mada relativni doprinos ove dve izoforme zavisi i od starosti jedinke (Nagatsu, 2004; Shih, 2004). U okviru centralnog nervnog sistema, MAO A je smeštena prvenstveno u kateholaminskim ćelijama (ćelijskom telu i dendritima), na pr. *substantia nigra*, *locus coeruleus* (LC), *nucleus subcoeruleus* i periventrikularni region hipotalamusa. MAO B je lokalizovana u 5-HT ćelijskoj grupi (na pr. ćelije unutar *nucleus raphe dorsalis*, *nucleus centralis superior*), u astrocitima (Nagatsu, 2004; Shih, 2004), kao i u manjoj meri u histaminskim ćelijama u zadnjem delu hipotalamusa (Nagatsu, 2004; Shih, 2004). Dopaminski neuroni imaju samo malu količinu izoforme MAO A, a MAO B nemaju (Nagatsu, 2004; Shih, 2004). Neuroni unutar LC i hipotalamusa pokazuju aktivnost i MAO A i MAO B, što ukazuje na to da obe izoforme mogu da se eksprimiraju u okviru iste ćelije. Interesantan je podatak da, u izvesnim uslovima, postoji posttranslacioni transport ovih enzima posle sinteze van ćelije. Unutar neurona, MAO reguliše nivo prolaska neurotransmitera odmah posle otpuštanja u sinapsu. Preuzimanje neurotransmitera od strane glijskih ćelija i njihova razgradnja enzimom MAO B može da bude u funkciji podešavanja nivoa neurotransmitera unutar kompartmana ovih ćelija. Kao rezultat razgradnje bioamina uz pomoć MAO dolazi do stvaranja potencijalno toksičnih produkata kao što su: vodonik peroksid, amonijak i aldehidi. Posebno je opasan hidrogen peroksid koji se u prisustvu gvožđa(II) pretvara u veoma citotoksičan hidroksilni radikal. Šire gledano, povećanje metabolizma kateholamina, koje je karakteristično za pojedina patološka stanja, dovodi do povećanja produkcije ovakvih međuproizvoda kao što su reaktivni slobodni radikali. Ustanovljeno je da povećan nivo MAO može da ukazuje na faktor rizika u smislu sposobnosti ćelije da prevaziđe poremećaj usled oksidativnog stresa (Nagatsu, 2004; Shih, 2004).

1.2.1.3.2. Katehol-O-metiltransferaza

Kateholamini u cirkulaciji se inaktiviraju preuzimanjem u procesu U₂ i enzimskom razgradnjom uz pomoć enzima COMT (Axelrod, 1957), koji se nalazi u efektorskim ćelijama.

Adrenalne hromafine ćelije sadrže veliku količinu COMT (Eisenhofer i Lenders, 1998), što objašnjava zašto sav metanefrin u plazmi potiče iz O-metilacije kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda (Eisenhofer i saradnici, 1995). Međutim, COMT je u izvesnoj količini prisutan i u neuronima. Ovaj enzim koristi S-adenozilmetionin kao kofaktor. COMT metaboliše cirkulišuće kateholamine uglavnom u jetri i bubrezima. U poređenju sa interneuronskom deaminacijom, ekstraneuronska O-metilacija NA i A predstavlja manje značajan put metabolizma kateholamina.

1.3. Oksidativni stres

Enzim MAO katalizuje oksidaciju biogenih amina, pri čemu nastaju toksični molekuli poput: aldehida, amonijum hidroksida i vodonik peroksida. MAO na taj način izaziva nastanak oksidativnog stresa u CNS i perifernim tkivima. MAO je takođe glavni izvor stvaranja vodonik peroksida tokom ishemičnih promena, kao i tokom procesa starenja (Kwong i Sohal, 1998). Pored toga, MAO dovodi do peroksidacije fosfolipida u mitohondrijama. Naime, nezasićene masne kiseline koje ulaze u sastav fosfolipida u membranama mitohondrija, mogu lako da se oksiduju. Inhibitori MAO smanjuju stvaranje vodonik peroksida i na taj način štite srce (Zhang i saradnici, 1998). Povećana lipidna peroksidacija i smanjena antioksidativna zaštita za posledicu imaju stvaranje epoksida koji mogu spontano da reaguju sa nukleofilnim centrima u ćeliji i na taj način da se kovalentno vezuju za molekule DNK, RNK i proteine (Rikans i Hornbrook, 1997). Takvo delovanje može da dovede do citotoksičnosti, alergija, mutagenosti i/ili kancerogenosti, u zavisnosti od osobina tog epoksida. Sprečavanje lipidne peroksidacije je od suštinske važnosti kod aerobnih organizama, budući da produkti lipidne peroksidacije mogu da dovedu do oštećenja molekula DNK i direktno inhibiraju proteine kao što su NaK-ATPaza i transporteri glutamata (Da Silva i saradnici, 1998; Esterbauer i saradnici, 1992; Patterson i Leake, 1998).

1.3.1. Enzimi antioksidativne zaštite

Antioksidanti se definišu kao „bilo koja supstanca koja odlaže, sprečava ili uklanja oksidativno oštećenje nastalo na ciljnom molekulu“ (Halliwell i Gutteridge, 1995; Halliwell, 2007), odnosno kao „bilo koje supstance koja direktno uklanjaju reaktivne vrste kiseonika ili indirektno deluju tako što povećavaju antioksidativnu zaštitu ili inhibiraju stvaranje reaktivnih

vrsta kiseonika (ROS)“ (Khlebnikov i saradnici, 2007). Drugim rečima, antioksidantima se mogu smatrati bilo koji molekuli koji inhibiraju oksidaciju drugog molekula. Oni dovode do prekidanja procesa oksidacije tako što uklanjaju međuproizvode nastale delovanjem slobodnih radikala i inhibiraju oksidacione reakcije. Na taj način antioksidanti često deluju kao redukciona sredstva (npr. askorbinska kiselina, tioli ili polifenoli) (Sies, 1997). U zavisnosti od ravnoteže između ROS i raspoloživih antioksidanata u ćeliji, antioksidanti mogu da inhibiraju ili odlože otpočinjanje ili širenje oksidativnih lančanih reakcija i tako spreče ili poprave oštećenje koje je u ćeliji nastalo delovanjem ROS. Poznato je da antioksidanti deluju preko pojedinačnih ili kombinovanih mehanizama poput: uklanjanja slobodnih radikala, redukcione aktivnosti, kompleksovanja pro-oksidanata, uklanjanja lipidnih peroksilnih radikala ili suzbijanja tzv. singlet forme kiseonika. Kada je ćelija izložena oksidativnom stresu, u cilju zaštite od nepovoljnog delovanja dolazi do ekspresije i regulacije određenih enzima antioksidativne zaštite kao odbrambenog mehanizma koji štiti ćeliju od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima. Pored toga, u antioksidativnoj odbrani učestvuju i tzv. neenzimski antioksidanti. Enzimski antioksidanti učestvuju u direktnoj ili indirektnoj odbrani od ROS i u njih spadaju enzimi: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR), glutation „s“-transferaze (GST) i drugi. Neenzimski antioksidanti obuhvataju čitav spektar različitih jedinjenja: vitamine (A, C, E i K), enzimske kofaktore (Q10), minerale (Zn, Se itd.), organska sumporna jedinjenja, azotna jedinjenja (mokraćna kiselina), peptide (glutation), prirodne pigmente (karotenoidi) i polifenole (flavonoidi i fenolna kiselina) (Palace i saradnici, 1999; Turunen i saradnici, 2004; Pietta, 2000; Burton i Traber, 1990; Halpner i saradnici, 1998; Vervoort i saradnici, 1997; Rice-Evans i saradnici, 1996; Paiva i Russell, 1999; Duarte i Lunec, 2005; Buettner, 1993).

1.3.1.1. Superoksid dismutaze

Superoksid dismutaze su enzimi antioksidativne zaštite koji katalizuju prevođenje veoma reaktivnog superoksid anjona u molekul kiseonika i manje reaktivni vodonik peroksid. Peroksid se dalje razlaže od strane CAT ili u reakcijama katalizovanim enzimom GPx (Fridovich, 1995; Sandalio i saradnici, 1997; Texeira i saradnici, 1998).



U tkivima sisara postoje tri forme superoksid dismutaza, svaka sa specifičnom unutarćelijskom lokalizacijom i različitom tkivnom distribucijom: citosolna bakar cink SOD (CuZnSOD, SOD 1), mitohondrijalna mangan SOD (MnSOD, SOD 2) i vanćelijska SOD (EC SOD, SOD 3) (Sandstrom i saradnici, 1994). Superoksid dismutaze sadrže kao kofaktore metalne jone: bakra, cinka, mangana ili gvožđa (kod biljaka u hloroplastima), zavisno od vrste izoenzima. SOD eliminiše $O_2^{\cdot -}$ uzastopnim oksidacijama i redukcijama prelaznog metalnog jona u aktivnom centru mehanizmom tzv. ping-pong tipa sa veoma visokom reakcionom stopom (Meier i saradnici, 1998). Svi tipovi SOD vezuju jednovalentne anjone kao što su azidi i fluoridi, ali postoje očigledne razlike u osetljivosti između Fe-, Mn- ili CuZnSOD. Enzim CuZnSOD kompetitivno inhibiraju N_3^- , CN^- (Leone i saradnici, 1998) i F^- (Vance i saradnici, 1998).

1.3.1.1.1. CuZn superoksid dismutaza

Enzim CuZnSOD (SOD 1) je tip enzima superoksid dismutaza, koji se tokom evolucije nije mnogo strukturno menjao. Ovaj enzim ima dve identične proteinske podjedinice molekulske mase od oko 32 kDa, mada može da se nalazi i u monomernoj strukturi kao kod *E. coli* (Battistoni i saradnici, 1996). Svaka podjedinica sadrži aktivno mesto u vidu metalnog centra, sagrađenog od katalitički aktivnih atoma bakra i cinka, premošćenih histaminskim ostatkom (Leah i saradnici, 1998). Opisani enzim je prisutan u citoplazmi i organelama svih sisarskih ćelija. Smatra se da CuZnSOD ima glavnu ulogu u prvoj liniji antioksidativne odbrane. Rezultati dobijeni ispitivanjem SOD „knock-out“ miševa otkrivaju da je enzim MnSOD neophodan za preživljavanje, dok CuZnSOD nije. CuZnSOD „knock-out“ miševi izgledaju normalno i ispoljavaju razlike samo posle traumatskih povreda, dok MnSOD „knock-out“ miševi ne mogu da prežive duže od tri nedelje. Među različitim humanim tkivima, količina MnSOD je otprilike upola manja od količine CuZnSOD (Marklund, 1980).

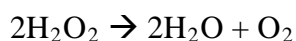
1.3.1.1.2. Mn superoksid dismutaza

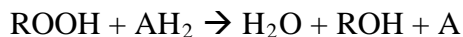
Enzim MnSOD (SOD 2) je homotetramer (96 kDa) i sadrži jedan atom mangana u svakoj od četiri proteinske podjedinice, koji prolazi kroz ciklus od Mn (III) do Mn (II) i nazad do Mn (III) tokom dva koraka prevođenja superoksida (MacMillan-Crow i saradnici, 1998). Aminokiselinska sekvenca MnSOD se veoma razlikuje u odnosu na CuZnSOD. Osim toga, ova

dva enzima se razlikuju i po tome što cijanid ne dovodi do inhibiranja aktivnosti MnSOD i na taj način se određuje udeo aktivnosti ovog enzima u smeši sa CuZnSOD. Ovaj enzim nalazi se u mitohondrijama skoro svih ćelija (Liou i saradnici, 1993). Respiratorni lanac u mitohondrijama je glavni izvor ROS. Na aktivnost MnSOD, u smislu povećanja i smanjenja, veoma utiču citokini, a oksidanti imaju umereni uticaj (Stralin i Marklund, 1994). Inaktiviranje rekombinantne humane mitohondrijalne MnSOD peroksinitritima je izazvano nitracijom određenog tirozinskog ostatka (MacMillan-Crow i saradnici, 1998; Yamakura i saradnici, 1998). Biološki značaj MnSOD očigledan je, između ostalog, imajući u vidu da nedostatak ekspresije MnSOD kod „knock-out“ miševa ima za posledicu jaku kardiomiopatiju i veću neonatalnu smrtnost. Faktor rasta tumora (eng. tumor necrosis factor, TNF) selektivno indukuje MnSOD, ali ne i CuZnSOD, CAT ili GPx iRNK u različitim tkivima miševa i kulturama ćelija (Hachiya i saradnici, 1997; Kizaki i saradnici, 1993). Transfekcija MnSOD cDNK u ćelijsku kulturu omogućava ćelijama otpornost na citotoksičnost koju izazivaju različiti faktori (TNF, adriamicin), kao i na neoplastičnu transformaciju izazvanu zračenjem (St. Clair i saradnici, 1991). Ekspresija humanog MnSOD gena u transgenim miševima štiti ih od povrede pluća izazvane oksigenacijom i toksičnog delovanja adriamicina na srce.

1.3.1.2. Katalaza

Enzim CAT je tetramer koji se sastoji od četiri identične tetraedarski raspoređene proteinske podjedinice od po 60 kDa, od kojih svaka sadrži po jednu feriprotoporfirinsku (hem) grupu i molekul NADPH (Kirkman i saradnici, 1987), a molekulska masa enzima iznosi oko 240 kDa. Nalazi se unutar ćelije, uglavnom u peroksizomima, koji takođe sadrže i većinu enzima sposobnih da stvaraju vodonik peroksid. Najveću aktivnost ovaj enzim ima u jetri i eritrocitima, ali je prisutan u izvesnoj količini u svim tkivima. Prvi je opisan enzim antioksidativne zaštite koji katalizuje konverziju u dva koraka vodonik peroksida, koristeći kao kofaktor gvožđe ili mangan. Na primer, gvožđe kao kofaktor se oksiduje jednim molekulom vodonik peroksida i onda se regeneriše prenošenjem vezanog kiseonika na drugi molekul supstrata. Enzim CAT reaguje veoma efikasno sa vodonik peroksidom, pri čemu se formira voda i molekul kiseonika, kao i sa donorima vodonika (metanol, etanol ili fenoli) sa peroksidaznom aktivnošću:





Kod životinja, vodonik peroksid se detoksifikuje uz pomoć enzima CAT ili GPx. CAT nije neophodna za funkcionisanje pojedinih ćelijskih tipova pod normalnim okolnostima, ali ima značajnu ulogu u sticanju tolerancije na oksidativni stres u adaptivnom odgovoru ćelija. Preživljavanje pacova izloženih kiseoniku je 100% povećano kada im se pre i za vreme izlaganja intravenozno injiciraju lipozomi koji sadrže SOD i CAT (Turrens i saradnici, 1984).

1.3.1.3. Glutation peroksidaza

Glutationski sistem obuhvata: glutation, GR, glutation peroksidaze i glutation „s“-transferaze. Glutation peroksidaze katalizuju oksidaciju glutationa. Hidroperoksidi, kao što je vodonik peroksid i lipidni hidroperoksidi, deluju kao supstrati za ove enzime (Takahashi i Cohen, 1986). Glutation „s“-transferaze pokazuju visoku aktivnost sa lipidnim peroksidima. Visok nivo ovih enzima je naročito karakterističan za jetru. Glutation peroksidaze zavisne od selena sadrže po jedan kofaktor u vidu seleno-cisteinskog (Sec) ostatka u svakoj od četiri identične podjedinice, čije je prisustvo u aktivnom mestu neophodno za aktivnost GPx (Tappel, 1978; Nakane i saradnici, 1998). Enzim GPx ima 80 kDa i katalizuje razgradnju vodonik peroksida i organskih hidroperoksida uz pomoć GSH i na taj način štiti sisarske ćelije od oksidativnog oštećenja. Važno je istaći da metabolizam glutationa ima centralnu ulogu u najvažnijim antioksidativnim odbrambenim mehanizmima (Esterbauer i saradnici, 1992; Rikans i Hornbrook, 1997; Sigalov i Stern, 1998). Najviši nivo aktivnosti ovaj enzim pokazuje u ćelijama jetre, iako je prisutan u gotovo svim tkivima. Enzim GPx se nalazi uglavnom u citosolu i mitohondrijama i predstavlja glavni enzim za uklanjanje vodonik peroksida u ovim subćelijskim kompartmanima. Aktivnost ovog enzima zavisi od stalne dostupnosti redukovane forme glutationa (Holben i Smith, 1999).



Postoji pet GPx izoenzima u sisarskim ćelijama. Iako se eksprimiraju u svim ćelijama, nivo svake izoforme se razlikuje zavisno od tipa tkiva. Citoplazmatične i mitohondrijalne GPx (cGPx ili GPx1) smanjuju nivo hidroperoksida masnih kiselina i vodonik peroksida o trošku glutationa. GPx1 i fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza (PHGPx ili GPx4) se nalazi u većini tkiva i u tzv. citosolnoj i u membranskoj frakciji. PHGPx može direktno da smanji nivo fosfolipidnih

hidroperoksida, hidroperoksida masnih kiselina i holesterola koji se stvaraju u peroksidaciji membrana i oksidaciji lipoproteina (Imai i saradnici, 1998). GPx1 je pretežno prisutna u eritrocitima, bubrezima i jetri, a GPx4 je veoma eksprimirana u bubrežnim epitelijalnim ćelijama i testisima. Citosolna izoforma GPx2 ili GPx-G1 i vanćelijska GPx3 ili GPx-P su prisutne u jedva merljivim količinama u većini tkiva, osim u gastrointestinalnom traktu i bubrezima. Kasnije otkrivena izoforma GPx5, eksprimirana posebno u epididimisu miševa, predstavlja izoformu nezavisnu od selena. Iako GPx koristi vodonik peroksid, isti supstrat kao i enzim CAT, može i samostalno efikasno da reaguje sa lipidima i drugim organskim hidroperoksidima, budući da predstavlja glavni izvor odbrane od delovanja oksidativnog stresa slabijeg intenziteta.

1.3.1.4. Glutation reduktaza

Glutation reduktaza (GR) i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza su deo sekundarnog odbrambenog sistema. Enzim GR redukuje glutation (antioksidant), koji iz oksidovane prelazi u redukovanu formu i na taj način dolazi do „recikliranja“ glutationa koji nastavlja da neutrališe nove slobodne radikale. Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza regeneriše NADPH (koenzim koji se koristi u anaboličkim reakcijama) i stvara redukujuće okruženje (Ratnam i saradnici, 2006). Ova dva enzima ne izazivaju direktno neutralisanje slobodnih radikala, ali pomažu drugim endogenim antioksidantima. Enzim GR zavisi od prisustva flavin nukleotida, a ima sličnu tkivnu distribuciju kao GPx (Gibson i saradnici, 1985). NADPH potreban ovom enzimu da obnovi zalihe redukovanog glutationa, dostavlja se iz pentozno-fosfatnog puta. Za sintezu glutationa se koriste aminokiseline: glicin, glutamat i cistein. Glutation je važan antioksidant, rastvorljiv u vodi, koji u uzajamnom delovanju sa vitaminom C neutrališe slobodne radikale. Glutation ima glavnu ulogu u metabolizmu ksenobiotika i može direktno da neutrališe ROS kao što su lipidni peroksidi. Kada je organizam izložen delovanju ksenobiotika ili toksina, dolazi do povećanja nivoa enzima zaduženih za detoksifikaciju (citohrom P-450 oksidaza). Ksenobiotici konjuguju sa glutationom i stoga su potrebne veće koncentracije enzima za konjugaciju da bi se neutralisali toksini i time je enzim manje dostupan kao antioksidant.

1.4. Stres i psihijatrijski poremećaji

Delovanje nepovoljnih stimulusa, tj. stresora, izaziva čitav niz usaglašenih odgovora čija je svrha povećanje verovatnoće preživljavanja organizma. Ove koordinisane reakcije organizma, označene kao “odgovor na stres”, obuhvataju promene u ponašanju, autonomnim funkcijama, kao i povećano lučenje mnogih hormona: adrenokortikotropnog hormona (ACTH) (eng. adrenocorticotropic hormone) iz hipofize, glukokortikoida (kortizol kod ljudi; kortikosteron (CORT) kod pacova) iz kore nadbubrežnih žlezda, kateholamina (A i NA) sa krajeva simpatičkih neurona i iz srži nadbubrežnih žlezda (Van de Kar i Blair, 1999). Delovanjem stresora narušava se stanje homeostaze, a najvažnije promene u okviru adaptivnog odgovora organizma dešavaju se u regulaciji funkcionisanja HPA sistema (Gold, 2015; Tsigos i Chrousos, 2002). Ovi procesi su precizno kontrolisani aktivnošću limbičkog sistema koji učestvuje u negativnoj povratnoj regulaciji aktivnosti HPA sistema. Kada je organizam u stresu, pojačava se pažnja i mozak se fokusira na opaženu pretnju. Rad srca i disanje su ubrzani, pojačavaju se katabolički procesi i protok krvi se preusmerava da bi se obezbedila bolja snabdevenost pojedinih moždanih struktura, srca, jetre i mišića, koji su ključni u regulaciji odgovora na stres (Chrousos i Gold, 1992). Sve ove usaglašene reakcije su usmerene ka održavanju stabilnosti unutrašnje sredine zbog preživljavanja. Izlaganje organizma stresoru pokreće delovanje brojnih neurotransmitera, neuropeptida i hormona koji, usaglašenom dinamikom pojavljivanja i specifično za određeni stresor, učestvuju u regulaciji adaptivnog odgovora na stres. Kod zdravih osoba neuropeptidi i ostali medijatori uspešno koordinišu proces adaptacije, odnosno pravilno su regulisani procesi uključivanja i isključivanja fizioloških i psiholoških odgovora na stresore. To je naročito važno budući da je adaptacija na delovanje ponavljalog stresora proces povezan sa složenim nizom molekularnih događaja, u rasponu od pomenutog otpuštanja neuropeptida, neurotransmitera i hormona do regulacije genske ekspresije (Hajos-Korcsok i saradnici, 2003). Međutim, kod osoba sa naslednim rizikom za pojavu depresije ta koordinacija je narušena, adaptivni procesi su neuspešni i jedinka nije u stanju da se izbori sa nepovoljnim uticajima sredine, odnosno sa dugotrajnim ili povremenim izlaganjem stvarnoj ili subjektivnoj ugroženosti (Herman i saradnici, 2003). Budući da je glavni element adaptivnog odgovora ponovljeno aktiviranje lučenja glukokortikoidnih hormona u okviru HPA sistema, što omogućava redistribuciju energije do brojnih organskih sistema uključujući i mozak, dugotrajno ili zbirno povećanje lučenja glukokortikoida može da umanjiti korist dobijenu povećanom reaktivnošću na delovanje stresora i

da konačno postane maladaptivno i dovede do psihopatoloških promena. Drugim rečima, kod osoba sa naslednom predispozicijom, hronični stres može da dovede do nastanka brojnih poremećaja poput abdominalne gojaznosti, osteoporoze i kardiovaskularnih problema (Brown i saradnici, 2004), a naročito je važan faktor rizika u etiologiji psihijatrijskih oboljenja poput anksioznih emocionalnih poremećaja, kliničke depresije, kao i poremećaja raspoloženja u koje spada i bipolarni poremećaj (de Kloet i saradnici, 2005; Leuner i Shors, 2013; Popoli i saradnici, 2012). Stanje povišenog nivoa glukokortikoida nastalo usled ove neprilagođenosti na stres, pre svega je tesno povezano sa emocionalnom uznemirenošću, psihotičnim simptomima i kognitivnim oštećenjem (Lupien i saradnici, 1998). Interesantan je podatak da razvoj psihijatrijskih poremećaja može da bude povezan sa pomenutim poremećajem normalne aktivnosti HPA sistema ne samo u smislu povećanja kao kod kliničke depresije i poremećaja raspoloženja, već i smanjenja aktivnosti HPA sistema, što je utvrđeno kod sindroma post-traumatskog stresnog poremećaja (eng. post traumatic stress disorder - PTSD) (Pariante i Lightman, 2008; Shea i saradnici, 2005). Utvrđeno je da hronični stres narušava pamćenje i menja ponašanje životinja, a u osnovi tih promena je izmenjena struktura i funkcija limbičkih regiona mozga izazvana neuroendokrinim promenama, koje obuhvataju promene monoaminskih neurotransmitera, neuropeptida, glukokortikoida i glukokortikoidnih receptora (de Kloet i saradnici, 2005). Za pomenute psihijatrijske poremećaje kod ljudi je karakteristično postojanje glukokortikoidne neravnoteže i strukturno/funkcionalnih promena u limbičkim mrežama neurona, koje su slične onim posle delovanja hroničnog stresa. To ukazuje na mogućnost da je neodgovarajuća obrada stresnih informacija deo patološkog procesa koji dovodi do nastanka ovih oboljenja (Herman, 2013).

U cilju boljeg razumevanja etiologije psihijatrijskih oboljenja, kao i razvijanja što boljih terapijskih tretmana, neophodna su istraživanja na pouzdanim životinjskim modelima (Krishnan i Nestler, 2011). Postoje različite metode hroničnog stresiranja pacova, bilo fizičke ili psihosocijalne, za koje je utvrđeno da izazivaju promene u ponašanju, strukturi određenih moždanih regiona, kao i funkcionisanju neuroendokrinog sistema (Krishnan i Nestler, 2011; Toth i Neumann, 2013; Chiba i saradnici, 2012; McEwen i saradnici, 2015; Cryan i Slattery, 2007). Jedan od takvih modela hroničnog psihosocijalnog stresiranja pacova je i PSFS (Naert i saradnici, 2011; Chiba i saradnici, 2012; Haenisch i saradnici, 2009). Budući da su psihijatrijski poremećaji kod ljudi prevashodno povezani sa socijalnim stresom pre nego fizičkim (Wood i

saradnici, 2012; Lederbogen i saradnici, 2011; Bjorkqvist, 2001; Heinrich i Gullone, 2006), istraživanja su usmerena na razvijanje obrasca hroničnog socijalnog stresiranja životinja da bi se dobio odgovarajući životinjski model analogan psihijatrijskim poremećajima ljudi. To podrazumeva da su takvi modeli hroničnog stresiranja pacova u stanju da indukuju brojne odgovarajuće promene u neuroendokrinom sistemu, strukturi i funkciji određenih moždanih regiona, kao i u ponašanju koje može da bude slično anksioznom ili depresivnom ponašanju kod ljudi (Chiba i saradnici, 2012; Naert i saradnici, 2011; Slattery i saradnici, 2012; Chaouloff, 2013; Kim i Han, 2006). Ovakvi modeli stresiranja životinja omogućavaju istraživanje još nedovoljno razjašnjenih molekulskih mehanizama koji leže u osnovi stresom indukovanih poremećaja kao što su psihijatrijske bolesti kod ljudi.

1.4.1. Uticaj stresa na kateholaminski sistem u mozgu

Kateholaminski sistem mozga podeljen je na noradrenalinski, adrenalinski i dopaminski. Stres aktivira pomenute kateholaminske regione u mozgu, što rezultira rasprostranjenim uticajem na neuronalne odgovore po delovanju stresora. Na primer, u odgovoru na akutni stresor, kateholamini stimulišu određene limbičke regione, poput hipokampusa, amigdale i hipotalamusa. Kateholamini imaju ključnu ulogu u regulaciji stresom indukovano povećanja stanja budnosti i opreznosti. Značaj kateholaminskog sistema u odgovoru na delovanje stresora je potvrđen proučavanjem miševa koji nemaju enzime za sintezu kateholamina tirozin hidroksilazu (TH) i dopamin β -hidroksilazu (DBH). Većina ovakvih miševa ne može da preživi do zrelog doba (Zhou i saradnici, 1995; Kobayashi i saradnici, 1995). Međutim, ako se nedostatak u biosintezi NA nadoknadi ishranom miševa dihidroksifenilserinom, mnogi ovakvi miševi mogu da prežive. Ipak, u određenoj stresnoj situaciji, odrasli miševi bez DBH nisu sposobni da prežive npr. izlaganje hladnoći u trajanju od samo par sati (Thomas i Palmiter, 1997). Kateholaminski sistemi u mozgu obuhvataju NA, A, DA i L-DOPA neurone i predstavljaju anatomske i funkcionalno specifične sisteme koji imaju ključne uloge u centralnoj organizaciji odgovora na stres. Kateholaminski neuroni imaju brojne anatomske karakteristike koje nemaju ostali tipovi neurona u mozgu: 1) većina kateholaminski neurona ili ćelijskih grupa ne mogu anatomske da se ograniče na određene nukleuse u mozgu; 2) ovi neuroni imaju veoma razgranate aksone sa velikim brojem aksonskih kolaterala i hiljadama izlaznih krajeva (sinapsi i aksonskih proširenja); 3) imaju brojne

nesinaptičke nervne završetke i otpuštaju katecholamine na nesinaptički način (tzv. ekstra-sinaptička neurotransmisija); 4) takođe sintetišu brojne neuropeptide kao kotransmitere; 5) sintetišu specifične membranske transportere koji omogućavaju intenzivno preuzimanje kateholamina iz sinaptičke pukotine ili iz vanćelijskog prostora oko aksonskih proširenja; 6) imaju izraženu sposobnost regeneracije oštećenih aksona i 7) ispoljavaju snažan, veoma brz i selektivan odgovor na stresne stimuluse (Kvetnansky i saradnici, 2009). U heterogenoj raspodeli, kateholaminska nervna vlakna i završeci su prisutni u svim delovima CNS. Tela neurona koji ekspimiraju katecholamine međutim, nalaze se samo u određenim regionima mozga odakle njihovi aksoni polaze i formiraju traktove, ali ipak češće u slobodnim projekcijama da bi se dostiglo i delovalo, na sinaptički ili nesinaptički način, na aktivnost gotovo svake nervne ćelije u CNS. Primena različitih neuroanatomskih tehnika, poput histofluorescencije, imunohistohemije ili *in situ* hibridizacije, omogućava tačnu lokalizaciju kateholaminskih neurona u mozgu. Za bolji uvid u kateholaminski sistem i sagledavanje razlika između DA, NA i A, važno je proučavanje ekspresije i prisustva enzima koji učestvuju u njihovoj biosintezi (TH, DBH, PNMT i AAAD) na nivou tela neurona, aksona i njihovih završetaka. Klasifikaciju kateholaminskih neurona u mozgu dali su naučnici Dahlstrom i Fuxe (1964), koji su ih razvrstali u 12 ćelijskih grupa (A1-A12). Kasnije su u klasifikaciju dodate još neke kateholaminergičke ćelijske grupe (A13-A16, C1-C3) od strane više autora (Bjorklund i saradnici, 1975; Bjorklund i saradnici, 1973; Hokfelt i saradnici, 1974).

Stresni stimuli dovode do povećanja brzine prometa kateholamina u mozgu, što može da ima za posledicu pražnjenje zaliha kateholamina. Moždani noradrenalinski i adrenalinski neuroni direktno su uključeni u centralnu regulaciju odgovora na stres, dok tačna uloga centralnih dopaminskih neurona u odgovoru na stres nije potpuno jasna. Pored sinteze i otpuštanja, uloga kateholamina tokom odgovora na stres zavisi i od njihovih receptora i transportera koji su ekspimirani samo u određenim regionima mozga. Adrenalin se vezuje za iste receptore kao i NA i adrenalinske ćelije mogu da koriste NA transportere za preuzimanje A iz sinaptičke pukotine. Dva tipa (α i β) i više podtipova adrenergičkih receptora su klasifikovani i nalaze se u različitim moždanim jedrima. Njihove promene, kao i posledice njihovih promena na aktivnost kateholaminskih neurona i odgovor ovih neurona u mozgu na stres, zavise od tipa, jačine i dužine trajanja stresnih stimulusa (Kvetnansky i saradnici, 2009). Dopaminski neuroni sintetišu sopstvene transportere i deluju preko specifičnih dopaminskih receptora (Kvetnansky i

saradnici, 2009). Akutni stres dovodi do prolaznih promena u moždanom kateholaminskom sistemu, koje je praćeno kratkotrajnom aktivacijom HPA sistema. Posle kraćeg vremenskog perioda, zavisno od karaktera i intenziteta stresnog stimulusa, uspostavlja se narušena homeostaza i aktivnost kateholaminskih neurona se vraća na nivo koji je bio pre stresiranja. Sa druge strane, hronični, dugotrajni ili ponavljani stres mogu da indukuju trajne promene i drže kateholaminske neurone u visoko aktivnom statusu (Mamalaki i saradnici, 1992; Rusnak i saradnici, 2001; Watanabe i saradnici, 1995). Međutim, tokom produženog delovanja stresora od nekoliko nedelja, može da dođe do potpunog pražnjenja zaliha kateholamina, kao i da obim povećanja kateholaminskog prometa nije u stanju da nadoknadi transmisiju ili smanji aktivnost kateholaminskih neurona, što dovodi do nedostatka kateholamina u nervnim završecima (Loughlin i saradnici, 1986; Valles i saradnici, 2006).

Noradrenalinski neuroni moždanog stabla su direktno uključeni u odgovore na većinu stresora. Aktivacija HPA sistema preko kateholaminske inervacije paraventrikularnog nukleusa (PVN) je, međutim, stresor – specifična (Gaillet i saradnici, 1991; Pacak i saradnici, 1998; Pacak i Palkovits, 2001). Čelijska tela neurona koji sintetišu NA u mozgu nalaze se samo u regionima *pons* i *medulla oblongata*, u okviru kojih su klasifikovani u sedam (A1-A7) čelijskih grupa. Noradrenalinske ćelije u čelijskim grupama: A1, A2, A4 i A6 (LC) pripadaju zajedno sa C1-C2 adrenergičkim neuronima tzv. „uzlaznom kateholaminskom sistemu“, koji predstavlja dovodni ogranak centralnog simpatičkog sistema projektovanog do prednjeg mozga i *cerebellum*-a. Ovi kateholaminski neuroni obezbeđuju nervne ulazne signale do tzv. integrativnih centara (hipotalamus, limbički korteks i nukleusi) i utiču na aktivnost HPA sistema. Noradrenalinske ćelije u A5 i A7 čelijskoj grupi u ventralno-kaudalnom delu LC-a i u tzv. *subcoeruleus* oblasti, zajedno sa rostralnim C1 adrenergičkim neuronima, pripadaju „silaznom kateholaminskom sistemu“, koji se projektuje do kičmene moždine, uključujući simpatičke preganglionarne neurone u torakalnim segmentima.

Neki kateholaminski neuroni moždanog stabla koriste A i ekspimiraju NET kao presinaptički membranski transporter. Korišćenjem imunohistohemije, Hokfelt i saradnici (1974) su prvi pokazali postojanje moždanog adrenalinskog sistema 1974. godine. Dve godine kasnije izmeren je sadržaj A u različitim moždanim jedrima kod pacova (Van der Gugten i saradnici, 1976). Detaljnije studije su otkrile da široko rasprostiranje adrenalinskih nervnih vlakana i završetaka potiču iz čelijskih tela neurona koji se nalaze u tri adrenalinske čelijske grupe (C1-C3

ćelijske grupe) regiona *medulla oblongata*. Neuron koji sintetiše A u moždanom stablu primaju direktne signale od neurona u viscerosenzornom neuronskom prenosiocu u jedru tzv. solitarnog trakta i/ili iz površinskih slojeva leđnog roga. U prepoznatljivoj topografskoj šemi, C1-C3 neuroni se projektuju do oblasti prednjeg mozga, uključujući sva jedra osetljiva na delovanje stresa u hipotalamusu i amigdali i imaju udela u adrenargičkoj inervaciji tzv. periakveduktalne sive mase (uključujući i *dorsal raphe nucleus*), LC i kičmenu moždinu (Armstrong i saradnici, 1982; Cunningham i saradnici, 1990; Palkovits i saradnici, 1992; Pieribone i saradnici, 1988; Ruggiero i saradnici, 1985; Sawchenko i Bohn, 1989). Nervni završevi poreklom iz moždanog stabla koji sadrže A prave direktne sinapse sa simpatičkim preganglijskim neuronima u grudnom delu kičmene moždine (Milner i saradnici, 1988).

Dosadašnja saznanja o ulozi DA u centralnom mehanizmu odgovora na stres nisu potpuno jasna. U suštini, sve oblasti mozga koje značajno učestvuju u odgovoru na stres imaju snažnu dopaminsku inervaciju (Fallon i Moore, 1978). Nasuprot tome, većina dopaminskih neurona u mozgu (osim dopaminskih ćelija u jedru *arcuate* hipotalamusa) ne odgovara u akutnom stresu ekspresijom *c-Fos* (Pacak i Palkovits, 2001). Dopaminski neuroni u mozgu su organizovani u okviru tri glavna sistema: mezencefaličnog (A8, A9, A10), diencefaličnog (A11, A12, A13, A14, A15) i olfaktornog (A16) dopaminskog sistema (Pacak i Palkovits, 2001). Dopaminska vlakna iz ovih ćelijskih grupa odlaze ili u okviru zbijenih i ciljno-specifičnih snopova ili učestvuju u drugim neuronalnim putevima, inervišući praktično celokupni CNS. Utvrđeno je nekoliko konfliktnih rezultata vezano za moguću umešanost dopaminskih neurona mozga u odgovoru na stres (Flugge i saradnici, 2004; Herman i saradnici, 2003; Sullivan, 2004). Akutni stresni stimuli, poput imobilizacije, hladnoće, hipoglikemije ili krvarenja, ne izazivaju aktiviranje *c-Fos* u moždanim dopaminskim neuronima. Nasuprot tome, jedan sat nakon bolnog stimulusa indukovano formalinom, pojedini TH-pozitivni tuberoinfundibularni dopaminski neuroni (A12 ćelije) ekspresiraju *c-Fos* (Pacak i Palkovits, 2001). Ovi dopaminski neuroni učestvuju u inervisanju zadnjeg režnja hipofize. Dopaminski neuroni u okviru A13 ćelijske grupe u središnjem delu oblasti *zona incerta* koji se projektuju do PVN hipotalamusa i centralnog jedra amigdale (Cheung i saradnici, 1998; Eaton i saradnici, 1994) ne ekspresiraju *c-Fos*, dok se ostali (eng. immediate early) geni brzo aktiviraju u odgovoru na delovanje akutnih stresora (Cullinan i saradnici, 1995; Pacak i Palkovits, 2001). Funkcionalni značaj moždanog dopaminskog sistema ogleda se u situacijama izazvanim delovanjem hroničnog stresa (socijalni izazovi, uslovljeni

stimulusi, audiogeni stres), kao i u psihopatološkim stanjima poput depresije i šizofrenije. Izgleda da je mezokortikalni dopaminski sistem znatno osetljiviji na stres od mezolimbičkog ili mezostriatalnog dopaminskog sistema (Anstrom i Woodward, 2005; Filipenko i saradnici, 2001; Helfferich i Palkovits, 2003; Nikulina i saradnici, 2004; Sullivan, 2004). Mezokortikalni i mezolimbički dopaminski putevi koji izlaze iz A10 dopaminske ćelijske grupe imaju ulogu u stvaranju memorije, učenju i emocionalnim procesima. Mezokortikalni dopaminski putevi takođe imaju adaptivnu ulogu u slabljenju uslovljenog stanja straha i sprečavaju preteranu fiziološku reakciju na stres (Sullivan, 2004). Otpuštanje dopamina je povišeno u medijalnom prefrontalnom korteksu (PFC) prilikom odgovora na akutni i hronični stres, čak i manji stres (kraći, blagi bol) dovodi do povećanja vanćelijskog nivoa dopamina u ovim oblastima mozga (Abercrombie i saradnici, 1989; Finlay i saradnici, 1995; Sullivan, 2004). Regionalni obrazac aktiviranja dopaminskih neurona u mozgu posle određenih fizičkih i fizioloških stresora u limbičkoj (kortikalnoj) oblasti može da se dovede u vezu sa promenama u ponašanju prilikom odgovora na stresne stimulse.

Na osnovu neujednačenih rezultata dobijenih po delovanju stresa koji se odnose na promene nivoa dopamina, kao i na ekspresiju gena za DAT i enzima koji učestvuju u metabolizmu kateholamina, može se pretpostaviti da efekti delovanja stresora zavise od jačine i kontrolisanosti stresora, kao i od naslednog faktora i okruženja kojem je životinja izložena (Kvetnansky i saradnici, 2009). U stresnoj situaciji dolazi do značajnog povećanja biosinteze kateholamina (Kvetnansky i saradnici, 1971 c). Aktivnost enzima koji učestvuju u biosintezi kateholamina (osim AAAD) je znatno povišena u uslovima dugotrajnog stresiranja (Kvetnansky i saradnici, 1971 a; Kvetnansky i saradnici, 1971 b; Kvetnansky i saradnici, 1970; Thoenen, 1970). Dugoročno, ponavljana primena stresora ima za rezultat povećanje nivoa iRNK za TH u odgovoru na nove stresore (Rusnak i saradnici, 2001). Povećanje biosinteze kateholamina koje se pojavljuje tokom odgovora na delovanje ponavljano ili hroničnog izlaganja različitim vrstama stresora, povezano je sa povišenim nivoom aktivnosti enzima koji učestvuju u sintezi kateholamina u perifernim i centralnim kateholaminskim neuronima (Zigmond i saradnici, 1974; Stone i saradnici, 1978; Kvetnansky i saradnici, 1970). Imunohemijske studije potvrđuju da ove promene nastaju usled povećanja količine enzimskog proteina (Baruchin i saradnici, 1990; Nankova i saradnici, 1994; Kvetnansky i Sabban, 1993; Melia i saradnici, 1992).

Uprkos činjenici da se procesi preuzimanja, transporta i razlaganja kateholamina (enzimima MAO i COMT) veoma aktiviraju u stresu, nema puno podataka o stresom indukovanim promenama u aktivnosti i ekspresiji gena za transportere kateholamina lokalizovanim u perifernim neuronima. Postoji samo par studija o NET transporterskom proteinu i njegovoj genskoj ekspresiji tokom oksidativnog stresa u ćelijama feohromocitoma (PC12) (Mao i saradnici, 2005; Mao i saradnici, 2004). Ovi rezultati pokazuju funkcionalnu ulogu oksidativnog stresa u posredovanju neuronalnog preuzimanja NA povezanog sa smanjenjem mesta vezivanja u preuzimanju NA i stvaranja NET proteina, bez promena ekspresije NET gena. Efekat oksidativnog stresa na NET je posttranskripcioni događaj (Mao i saradnici, 2004). Kao rezultat obimnog otpuštanja kateholamina, stres dovodi do opadanja nivoa kateholamina u ćelijama, što se potom nadoknadi njihovom povećanom biosintezom. Na primer, čak i pojedinačna epizoda stresa imobilizacije kod pacova može da dovede do smanjenja nivoa A od oko 30%, koji ostaje snižen neko vreme, ali se vraća na bazalni nivo posle tri nedelje svakodnevno ponavljano stresa imobilizacije (Kvetnansky i Mikulaj, 1970). U mozgu akutno stresiranje izaziva otpuštanje NA u graničnim oblastima neurona koji su lokalizovani u strukturi LC, što dovodi do pražnjenja NA i povećanja koncentracije metabolita NA (Tanaka i saradnici, 1982; Glavin i saradnici, 1983). Zalihe NA u mozgu se dopunjuju tokom ponavljano stresa (Kvetnansky i saradnici, 1977; Weiss i saradnici, 1975).

1.4.2. Uticaj stresa na sistem antioksidativne zaštite u mozgu

Promena oksidativnog statusa i povišeni nivo ROS se sve više prepoznaje kao ključni biohemijski mehanizam oštećenja izazvanih stresom koja dovode do patofizioloških promena u psihijatrijskim poremećajima (Berk, 2007). Usled delovanja stresora dolazi do aktiviranja imuno-inflamatornih procesa, povećanja razgradnje monoamina i poremećaja lipidnog metabolizma, što dalje može da dovede do prevelike produkcije ROS. Oksidativni stres izaziva višestruke štete: oštećenja funkcije mitohondrija, narušavanja regulacije i homeostaze kalcijuma (Amoroso i saradnici, 2000), prekida energetske putanje (Papadopoulos i saradnici, 1997), oštećenja neuronalnih prekursora i procesa neurogeneze (Kroemer, 1997), kao i aktiviranja signalnih događaja koji dovode do apoptotske ćelijske smrti (Cregan i saradnici, 2002). Svi ovi događaji daju značajan doprinos patofiziologiji psihijatrijskih poremećaja.

Kliničke studije pokazuju postojanje atrofičnih morfoloških promena u mozgu karakterističnih za depresije izazvane delovanjem stresa (Sheline i saradnici, 1996; Cotter i saradnici, 2002) i druge poremećaje povezane sa stresiranjem (Koenen i saradnici, 2001). Te promene kod pacijenata obolelih od depresije i poremećaja raspoloženja primećene su u određenim strukturama mozga kao što su PFC i hipokampus (Lorenzetti i saradnici, 2009; Drevets i saradnici, 2008). Svakako jedna od najznačajnijih posledica delovanja stresa na mozak je atrofija hipokampalnih dendrita (Magarinos i McEwen, 1995), pa čak i smanjenje hipokampusa kod individua izloženih delovanju jakog ili hroničnog stresa (Bremner i saradnici, 2000), kao i atrofične promene u amigdali i PFC (Bremner, 2006). Pre nego što dođe do ovakvog stepena oštećenja ćelija i tkiva, na molekularnom nivou se po delovanju stresa dešavaju brojne promene u CNS. Otpuštanje glukokortikoida je jedno od prvih obeležja odgovora na stres, a od svih moždanih struktura poznato je da upravo ćelije hipokampusa imaju najveći broj glukokortikoidnih receptora, što doprinosi ulozi u mehanizmu negativne glukokortikoidne povratne sprege i regulaciji HPA sistema, ali ima za posledicu i veću osetljivost ove moždane strukture na oštećenja usled povišenog nivoa glukokortikoida (Sapolsky, 1996; Eichenbaum, 2004; Tse i saradnici, 2014). Glukokortikoidni hormoni dovode do neurotoksičnosti posredstvom različitih molekularnih mehanizama, uključujući promene energetskeg metabolizma ili preko povećanja ekscitatornih aminokiselina kao što je glutamat u međućelijskom prostoru (Madrigal i saradnici, 2006; Moghaddam, 2002). Postoje brojne studije koje potvrđuju da je poremećeni energetski metabolizam povezan sa poremećajima opisanim u depresiji (Mattson i Liu, 2002; Harvey, 2008; Rezin i saradnici, 2009; Stranahan i Mattson, 2012). Za normalno funkcionisanje ćelije je od vitalnog značaja proizvodnja energije (u obliku ATP-a) procesom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Slobodni radikali mogu da oštete brojne ćelijske makromolekule, uključujući i one u kompleksu respiratornog elektronskog transportnog lanca i time remete normalno funkcionisanje mitohondrija (Madrigal i saradnici, 2006), što je povezano sa narušavanjem oksidativne ravnoteže u ćeliji i dovodi dalje do brojnih poremećaja energetskeg metabolizma i indukuje propadanje ćelije (Calabrese i saradnici, 2005). Smanjena mitohondrijalna funkcija je primećena u prednjem mozgu pacova posle hroničnog stresa (Madrigal i saradnici, 2001). Osim toga, kliničke studije pokazuju smanjen nivo produkcije ATP-a u mitohondrijama u mišićima depresivnih pacijenata (Gardner i saradnici, 2003). S druge strane, dokazano je da promene potencijala mitohondrijalnih membrana indukovane kortizolom, mogu da dovedu do

otpuštanja citohroma c iz mitohondrija u citoplazmu, gde citohrom c aktivira kaspaze i dolazi do apoptoze (Zhang i saradnici, 2006). Ovakve promene u mitohondrijama indukovane stresom koje dovode do ćelijske smrti, za posledicu imaju pomenuto stanje atrofije hipokampusa i PFC i uočene su kod depresivnih pacijenata (Lorenzetti i saradnici, 2009; Drevets i saradnici, 2008; Lee i saradnici, 2002).

Oštećenja izazvana reaktivnim molekulskim vrstama se u ćelijama održavaju pod kontrolom uz pomoć enzimskih i neenzimskih antioksidativnih komponenti (Halliwell i Cross, 1994). Ovakva ćelijska odbrana smanjuje koncentraciju slobodnih radikala i popravlja oksidativna oštećenja u ćeliji. Međutim, izloženost stresnoj situaciji narušava ove mehanizme antioksidativne zaštite i time menja ravnotežu između oksidativnih i antioksidativnih faktora i procesa, što dalje dovodi do različitih posledica oksidativnih oštećenja (McIntosh i saradnici, 1998 a; McIntosh i saradnici, 1998 b) i nastanka različitih oboljenja izazvanih stresom. Kliničke studije pokazuju da se pacijenti oboleli od kliničke depresije i bipolarnih poremećaja nalaze u stanju povećanog oksidativnog stresa, što se ogleda u povećanom nivou lipidne peroksidacije zajedno sa narušenom antioksidativnom odbranom u plazmi (Abdalla i Bechara, 1994; Bilici i saradnici, 2001; Khanzode i saradnici, 2003; Ozcan i saradnici, 2004). Postoje brojna istraživanja u kojima je primenom različitih vrsta hroničnog stresiranja kod pacova postignuto stanje slično depresiji i anksioznosti kod ljudi (Chiba i saradnici, 2012; Naert i saradnici, 2011). U velikom broju studija ispitivani su efekti raznih vidova akutnog ili hroničnog stresiranja eksperimentalnih životinja na parametre oksidativnog statusa, kao što su: stvaranje slobodnih radikala, lipoperoksidacija, totalni antioksidativni kapacitet, uključujući i totalni potencijal za hvatanje radikala (TRAP) i totalni nivo antioksidativne reaktivnosti (TAR) (Fontella i saradnici, 2005), kao i aktivnost enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT i GPx) (Frey i saradnici, 2006 a; Lucca i saradnici, 2009; Tagliari i saradnici, 2010).

1.4.3. Uticaj stresa na hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalni sistem

Hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalni (HPA) sistem ima presudnu ulogu u adaptaciji organizma na promene koje ugrožavaju homeostazu, budući da promene aktivnosti HPA sistema predstavlja ključnu komponentu neuroendokrinog odgovora organizma na delovanje stresora. HPA sistem čine hipotalamus, hipofiza i kora nadbubrežnih žlezda, regulatorni neuronalni signali i brojni hormoni i faktori neophodni za regulaciju njihovog otpuštanja. Centralnu ulogu u

adaptivnom odgovoru na stresore ima PVN hipotalamusa. Promena aktivnosti HPA sistema nastaje kao rezultat sabiranja stimulatornih signala iz različitih moždanih regija u PVN, što dovodi do otpuštanja kortikotropnog-oslobađajućeg hormona (CRH) (eng. corticotropin-releasing hormone) i arginin vazopresina (AVP) (eng. arginine vasopressin) u hipotalamo-hipofizni portni sistem (Tsigos i Chrousos, 2002; Armario, 2006). CRH kao glavni faktor u neuroendokrinoj kontroli otpuštanja ACTH (Cole i Sawchenko, 2002; Penalva i saradnici, 2002) stimuliše prednji režanj hipofize (adenohipofizu) da u roku od oko 5-7 sekundi luči hormon ACTH (Sapolsky i saradnici, 2000; Van de Kar i Blair, 1999). Pod delovanjem ACTH stimulišu se ćelije kore nadbubrežnih žlezda, koje samo par minuta kasnije počinju da pojačano luče glukokortikoidni hormon (kortizol kod ljudi; CORT kod pacova) u cirkulaciju, mada se najviši nivo glukokortikoida u plazmi dostiže tek posle 30-60 minuta od početka delovanja stresora (Paris i saradnici, 1987; Sapolsky i saradnici, 2000). Nakon završetka odgovora na akutni stres, koncentracija glukokortikoida opada zajedno sa smanjenjem lučenja CRH iz centralnih neurona i na taj način se normalizuje gustina glukokortikoidnih receptora i mehanizam negativne povratne sprege se vraća u normalu (Sapolsky i Plotsky, 1990). Promene u okviru HPA sistema po delovanju hroničnog stresa razlikuju se u zavisnosti od toga da li je organizam razvio odgovarajuću strategiju kako da se izbori, odnosno adaptira na dugotrajno ili ponavljano stresiranje ili nema odgovarajući potencijal da adekvatno odgovori i dolazi do tzv. maladaptivnih promena. Osim toga, važno je istaći da izloženost nepredvidivom ili izuzetno snažnom stresu može da izazove dugoročan i trajan poremećaj regulacije HPA sistema, po svemu sudeći usled izmenjene limbičke kontrole efektonih puteva u stresu, čija je glavna komponenta upravo HPA sistem (Tsigos i Chrousos, 2002; Herman, 2013).

Zdrav organizam se adaptira dejstvu hroničnog stresa određenim adaptivnim promenama u neuroendokrinoj reaktivnosti HPA sistema. Pri tome, odgovor HPA sistema na dati stresor zavisi od prethodnog iskustva individue, odnosno od prethodne istorije stresiranja eksperimentalnih životinja, što se može sagledati kroz dualni fenomen procesa habituacije i facilitacije (Natelson i saradnici, 1988; Bhatnagar i Dallman, 1998). Naime, ako se životinja izlaže ponavljanom delovanju istog (homotipičkog) stresora, tada neuroendokrini odgovor HPA sistema na taj stresor opada vremenom u poređenju sa odgovorom dobijenim kod životinja koje su akutno bile izložene tom stresoru (Jaferi i saradnici, 2003; Bhatnagar i saradnici, 2002; Viau i Sawchenko, 2002). Takvo slabljenje adrenokortikalnog odgovora tokom vremena na određene

tipove ponavljano stresiranja naziva se habituacija i predstavlja adaptaciju koja sprečava da povišeno lučenje glukokortikoida u cirkulaciju traje neprekidno i na taj način ograničava štetne posledice dugotrajnog lučenja glukokortikoida (McEwen, 1998 b). Dugoročni uticaj stresa se na taj način drži pod kontrolom ovim procesom kojim se smanjuje reaktivnost HPA sistema na ponavljano izlaganje istom tipu stresora, a u regulaciji procesa habituacije učestvuju limbičke moždane strukture (Herman i saradnici, 2003). U takvoj situaciji, reakciju HPA na stresore mogu da promene mnogi aspekti stresnog stimulusa, kao što je npr. predvidivost (Katz, 1981; Restrepo i saradnici, 1987). Međutim, ukoliko se životinja izlaže ponovljenom delovanju određenog homotipičkog stresora, a potom se izloži delovanju novog (heterotipičkog) stresora, tada neuroendokrini odgovor HPA sistema na taj novi stresor može da sustigne, a često čak i premaši odgovor životinje koja se prvi put i jednom (akutno) sreće sa tim stresorom (Dallman i saradnici, 1991; Bhatnagar i Dallman, 1998). To se dešava nasuprot i odvojeno od opisanog fenomena habituacije aktivnosti HPA sistema na ponovljeni isti stresor. Drugim rečima, hronični stres takođe dovodi i do povećanja osetljivosti i reaktivnosti na nove stimulse i ovakav odgovor HPA sistema se naziva facilitacija ili senzitivizacija. Adaptivni smisao procesa senzitivizacije je u tome što omogućava da aktivnost HPA sistema ostane sposobna da odreaguje na brojne druge stimulse različite prirode (Dallman i saradnici, 1987; Dallman i saradnici, 1991). Važno je napomenuti da proces senzitivizacije prevazilazi signale negativne povratne sprege koji su u okviru HPA sistema indukovani kada se u svakodnevno ponavljano stresiranju podiže nivo glukokortikoida. S obzirom da ovi adaptivni procesi indukovani hroničnim stresom ne mogu u potpunosti da se objasne postojanjem razlika u efikasnosti glukokortikoidne negativne povratne sprege (Jaferi i saradnici, 2003; Bhatnagar i Vining, 2003), pretpostavlja se da se posle hroničnog stresa dešavaju promene u plastičnosti HPA sistema (Tapia-Arancibia i saradnici, 2004). Međutim, dok sa jedne strane pomenuta pojava senzitivizacije (Akana i saradnici, 2001) može da bude važan proces za održanje prilagodljivosti (plastičnosti) neuroendokrinog odgovora na delovanje novog stresora (Bhatnagar i Dallman, 1998; Dallman i Akana, 2004), sa druge strane takođe može da doprinese zbirnom uticaju glukokortikoida na mozak i ostale organe, što naravno ima ulogu u etiologiji mnogih stresom indukovanih oboljenja, a naročito psihijatrijskih poremećaja. Iz svega navedenog očigledno je da promene u ponašanju i fiziološkom odgovoru organizma na hronični stres zavise od prilagođavanja funkcionisanja HPA sistema. Važno je napomenuti da adaptivna reakcija HPA sistema zavisi od osobina stresora, odnosno od tipa,

trajanja i intenziteta režima stresiranja (Blanchard i saradnici, 1998; Aguilera, 1998; Magarinos i McEwen, 1995; Pitman i saradnici, 1990; Laucher i saradnici, 1994; Pitman i saradnici, 1988). Osim toga, uvek treba imati na umu i prilične individualne razlike u adrenokortikalnoj reaktivnosti na isti stresor, odnosno da postoje razlike u tzv. kortikosteronskom odgovoru (promena od bazalnog nivoa kortikosterona izmerenog pre stresiranja do nivoa kortikosterona izmerenog posle primene stresora) eksperimentalnih životinja tokom primene istog stresora (Natelson i saradnici, 1988; Pitman i saradnici, 1988). Pri tome, potrebno je naglasiti da oba ova adaptivna procesa (habituacija i facilitacija) zavise i od sposobnosti individue da prepozna da li je dati stresor već poznat ili nije. Čak i jedno jedino izlaganje određenom poznatom stresoru u okviru delovanja serije novih, nepoznatih stresora, može da dovede do slabijeg odgovora HPA sistema kada se eksperimentalna životinja drugi put podvrgne delovanju tog stresora (Simpkiss i Devine, 2003). Sa druge strane, važan aspekt u okviru odgovora HPA sistema na stresor je i poimanje realne ili procenjene pretnje, odnosno razlikovanje stvarnog od mogućeg (tzv. anticipatornog) stresora, budući da se pri tome pokreću različiti putevi aktivirani stresom (Herman i saradnici, 2003). Pri tome, obeležja tzv. anticipatornih stresora koja pomažu njihovom pamćenju predstavljaju važne odrednice HPA odgovora. Kao što je već pomenuto, HPA odgovor je u energetskom smislu veoma skup i svako prekomerno aktiviranje ima veoma štetne posledice (McEwen, 1998 b). S tim u vezi, u mozgu se stvaraju inhibitorni i ekscitatorni putevi zavisno od pamćenja (osobina) stresora, da bi se kontrolisali glukokortikoidni odgovori. Na primer, moždana kola koja obezbeđuju pamćenje mogu da umanje osetljivost na kontekstualne stimuluse kojima se jedinka ponavljano izlaže (habituacija) ili da aktiviraju odgovore na neškodljive signale koji su udruženi sa iznenadnom pretnjom. Širok spektar ovih odgovora je pod izuzetnom kontrolom limbičke regije mozga, koja obuhvata hipokampus, amigdalnu i prefrontalnu korteks (Herman i saradnici, 2003). Poznato je da HPA sistem ima ključnu ulogu ne samo u neuroendokrinoj adaptaciji na delovanje stresora, već i u patofiziologiji psihijatrijskih bolesti povezanih sa stresom, poput depresije, anksioznosti i poremećaja raspoloženja (de Kloet i saradnici, 2005; McEwen, 2008; Nemeroff i Vale, 2005).

1.4.3.1. Adrenokortikotropni hormon

HPA sistem je izuzetno osetljiv na delovanje širokog spektra emotivnih iskustava i fizioloških poremećaja i njegovo aktiviranje rezultira povećanim otpuštanjem ACTH i

glukokortikoida. Hipotalamus kontroliše lučenje ACTH iz prednjeg režnja hipofize (adenohipofize). Važan segment u okviru normalne aktivnosti HPA sistema čine vremenski regulisani talasi otpuštanja ACTH (Van de Kar i Blair, 1999; Sapolsky i saradnici, 2000; Herman i saradnici, 2003), ključnog faktora regulacije lučenja glukokortikoidnih hormona iz kore nadbubrežnih žlezda. Aktiviranje HPA sistema nastaje kao rezultat sabiranja stimulatornih signala iz različitih moždanih regija u PVN hipotalamusa, gde se stvaraju glavni kortikotropni faktori oslobađanja ACTH. Naime, od limbičkog sistema, hipokampusa, amigdale i moždanog stabla polaze određeni nervi do PVN hipotalamusa, gde depolarizacijom nervnih završetaka podstiču sintezu i lučenje određenih faktora kao odgovor na delovanje stresa. PVN ima centralnu ulogu u adaptivnom odgovoru na stresore i sastoji se iz najmanje osam odeljaka (Swanson i Sawchenko, 1983). Različiti stresori, bilo fizički ili psihološki, podstiču neurosekretorne ćelije, tzv. parvocelularne neurone koji se nalaze u medijalnom parvocelularnom odeljku PVN, a čiji završeci dopiru do strukture *eminencia mediana*, da pojačano luče kortikotropne faktore oslobađanja ACTH, a to su CRH i AVP. Ovi faktori se preko eminencije medijane oslobađaju u hipotalamo-hipofizni portni sistem (Van de Kar i Blair, 1999; Mackin i Young, 2004). Peptid CRH, koji ima ulogu i u aktiviranju simpatičkog nervnog sistema (Penalva i saradnici, 2002), predstavlja glavni faktor stimulacije otpuštanja ACTH iz adenohipofize i u normalnim i u stresnim uslovima (Cole i Sawchenko, 2002; Penalva i saradnici, 2002; Whitnall, 1993). Preko portne vene pars tuberalisa CRH dospeva do adenohipofize, gde u roku od 15 sekundi izaziva oslobađanje ACTH u periferni krvotok. U neuroendokrinoj kontroli otpuštanja ACTH iz adenohipofize učestvuje i peptid AVP, koji se takođe sintetiše u parvocelularnim neuronima i sinergistički deluje sa CRH (Carasco i Van de Kar, 2003; Tsigos i Chrousos, 2002; Armario, 2006). Parvocelularni neuroni takođe proizvode brojne druge peptide i neurotransmitere (Kiss, 1988). Neuroendokrini odgovor na delovanje stresora započinje povećanim lučenjem pomenutih kortikotropina, koji dalje stimulišu otpuštanje produkata pro-opiomelanokortina (POMC), u koje se ubraja pored ACTH i β -endorfin (Carasco i Van de Kar, 2003). Nakon sekrecije, ACTH dalje sistemskim krvotokom dospeva do kore nadbubrežnih žlezda, gde se vezuje za svoje receptore na membrani ćelija fascikularne i retikularne zone i stimuliše sintezu i lučenje glukokortikoidnih hormona u krvotok u roku od nekoliko minuta. Iako je ACTH glavni modulator otpuštanja glukokortikoida, adrenokortikalni izlaz može da se moduliše i neuronalnim signalima koji podešavaju osetljivost na ACTH (Ulrich-Lai i Engeland, 2002). Sa druge strane, povećanje nivoa

glukokortikoida u cirkulaciji mehanizmom negativne povratne sprege inhibira dalje lučenje CRH i ACTH (Akana i saradnici, 2001; Herman i saradnici, 2003).

1.4.3.2. Kortikosteron

Glukokortikoidni hormoni (glukokortikoidi) su signalni molekuli koji učestvuju u regulisanju homeostaze i odgovora organizma na delovanje stresora (Habib i saradnici, 2001). Glukokortikoidi (kod pacova CORT; kod ljudi kortizol) imaju glavnu ulogu u regulaciji telesnih funkcija poput energetskog metabolizma, rasta, imunskih funkcija, a pre svega imaju značajne efekte na mozak i procese neurogeneze, neuronskog preživljavanja, kao i učenja i pamćenja (Herbert i saradnici, 2006). Kontrola svih ovih funkcija je važna zbog odgovarajuće regulacije ponašanja u sklopu adaptacije organizma na stres (Gesing i saradnici, 2001; Stratakis i Chrousos, 1995; Stratakis i saradnici, 1995). Glukokortikoidi ispoljavaju efekte posredstvom svojih citosolnih receptora (Smith i Toft, 1993; Pratt, 1990). Postoje dva podtipa receptora za glukokortikoidne hormone, a to su mineralokortikoidni i glukokortikoidni receptori (Meijer i de Kloet, 1998; Meijer i saradnici, 1998). Ovi receptori deluju kao ligand-zavisni transkripcioni faktori (Evans i Arriza, 1989; Gesing i saradnici, 2001). Mineralokortikoidni receptori nalaze se u pojedinim limbičkim moždanim regijama, poput hipokampusa, dok su glukokortikoidni receptori raspoređeni u više moždanih regija, uključujući frontalni korteks i PVN hipotalamusa (Jacobson i Sapolsky, 1991; Meijer i de Kloet, 1998). Po vezivanju liganda, glukokortikoidni receptori se aktiviraju i transportuju u jedro, gde interaguju sa specifičnim sekvencama (eng. glucocorticoid responsive elements – GREs) unutar molekula DNK i aktiviraju odgovarajuće gene na čiju ekspresiju utiču glukokortikoidni hormoni (Pratt, 1990). Aktivirani receptori takođe mogu da inhibiraju, preko protein – protein interakcija, neke druge transkripcione faktore kao što su *c-jun/c-fos* i NFκB, koji su pozitivni regulatori transkripcije većeg broja gena uključenih u aktiviranje i rast ćelija imunskog sistema i drugih tipova ćelija (Scheinman i saradnici, 1995). Pored toga, glukokortikoidi mogu da menjaju stabilnost iRNK, a time i translaciju većeg broja proteina čija sinteza zavisi od ovih hormona, kao i da utiču na membranski potencijal nervnih ćelija (Lee i saradnici, 2002; de Kloet i saradnici, 2005). Glukokortikoidi imaju ključnu regulatornu ulogu u neuroendokrinoj kontroli HPA sistema i u pogledu održanja bazalne aktivnosti HPA sistema, kao i u procesu odgovora organizma na stres. Koncentracija ACTH u cirkulaciji je ključni faktor regulacije lučenja glukokortikoida iz kore nadbubrežnih žlezda. Drugi

hormoni ili citokini, bilo da su poreklom iz srži nadbubrežnih žlezda, bilo da dolaze iz sistemske cirkulacije, kao i neuronalne informacije koje potiču iz autonomne inervacije kore nadbubrežnih žlezda, takođe mogu da učestvuju u regulaciji lučenja glukokortikoida (Hinson, 1990; Ottenweller i Meier, 1982). Tokom delovanja akutnog stresa glukokortikoidi doprinose preživljavanju na taj način što mobilišu energetske rezerve (Chrousos i Gold, 1992; McKay i Cidlowski, 2000). Pored ovih kratkoročnih adaptivnih promena, glukokortikoidi su takođe uključeni i u dugoročne adaptivne promene nastale usled delovanja stresora, a koje se odnose na regulaciju brojnih različitih fizioloških procesa, npr. u okviru imunskog odgovora ili aktiviranja simpatičkog nervnog sistema. Iako je lučenje glukokortikoida neophodno za preživljavanje, prekomerna produkcija je veoma štetna i povezana je sa narušavanjem normalnog funkcionisanja ćelija, što dovodi do brojnih fizioloških poremećaja. Glukokortikoidni hormoni učestvuju u procesu završetka odgovora na stres na taj način što ispoljavaju negativno povratno delovanje na nivou hipotalamusa i na nivou hipofize (de Kloet, 1995), kao i u nekim gornjim hipotalamičkim strukturama (de Kloet i saradnici, 1986; Gesing i saradnici, 2001; Meaney i saradnici, 1996; Meijer i de Kloet, 1998; Reul i saradnici, 1990). Aktivacija mineralokortikoidnih receptora u hipokampusu inhibira aktivnost HPA sistema (Gesing i saradnici, 2001). Ovi receptori su lokalizovani u piramidalnim (CA1-4) i granularnim (*dentate gyrus*) neuronima hipokampusa (Gerlach i McEwen, 1972; Herman i saradnici, 1989). Nervni signali koji pristižu iz hipokampusa aktiviraju inhibitorne GABA-ergičke neurone u ventrolateralnom septalnom regionu i u tzv. *bed nucleus* u okviru *stria terminalis*, koji imaju projekcije do CRF neurona PVN (Herman i Cullinan, 1997). Stoga glukokortikoidni mehanizam negativne povratne sprege koji inhibira ACTH sekretorni odgovor, deluje tako da ograničava vreme trajanje ukupnog izlaganja tkiva delovanju glukokortikoida i na taj način umanjuje kataboličke, antireproduktivne i imunosupresivne efekte ovih hormona, a pre svega sprečava štetan efekat prekomernog lučenja glukokortikoida na strukturu i funkcije mozga.

1.4.4. Uticaj stresa na nivo glukoze u krvi

U okviru neuroendokrinog odgovora organizma na stres dolazi do povećanja nivoa glukokortikoida u serumu, što utiče na regulisanje metabolizma glukoze (GLU), uključujući stimulaciju glukoneogeneze u jetri. Povećanje nivoa GLU u krvi obezbeđuje energiju neophodnu za odgovor organizma na delovanje stresora (McKay i Cidlowski, 2000). Postoje brojne studije

koje potvrđuju da je stresom izazvan poremećaj energetskeg metabolizma doprinosi razvoju depresivnih poremećaja (Harvey, 2008). Naime, metabolizam GLU je od vitalnog značaja za normalno funkcionisanje mozga i sinaptičku transmisiju (Sokoloff i saradnici, 1977). Istraživanja su pokazala da se lokalno na sinaptičkim vezikulama procesom glikolize stvaraju molekuli ATP-a i da se koriste za transport neurotransmitera (glutamat, GABA, dopamin, serotonin) u sinaptičke vezikule (Ichida i saradnici, 2009). Značaj ovog procesa potvrđuje podatak da je smanjenje akumulacije neurotransmitera u vezikulama povezano sa poremećajem u ponašanju miševa (Tordera i saradnici, 2007).

1.4.5. Uticaj stresa na ekspresiju BDNF gena

Stres može da izazove degenerativne ćelijske procese, odnosno oštećenje i atrofiju neurona prvenstveno u hipokampusu, u kojem je veoma eksprimiran receptor za glukokortikoide (Sapolsky, 1996; McEwen, 1999, McEwen, 2000 b; Sapolsky, 2001; Duman, 2004). Preciznije rečeno, stres može da menja plastičnost hipokampusa (Kim i saradnici, 1996; Kim i Yoon, 1998) tako što utiče na dendritsku morfologiju (Watanabe i saradnici, 1992; Magarinos i saradnici, 1996), neurotoksičnost (McEwen i Sapolsky, 1995) i proces neurogeneze (Gould i saradnici, 1998). Pored toga, svi ovi procesi imaju uticaj na funkcije učenja i pamćenja. Naime, hipokampus je povezan sa amigdalom i PFC, regionima koji su direktnije uključeni u regulaciju emocija i saznanja. Promene u strukturi i funkcionisanju hipokampusa i PFC prilikom odgovora na stres, koje mogu da budu okidač za nastanak brojnih psihijatrijskih poremećaja, ukazuju na važnost izučavanja neurotrofičkih faktora. BDNF je najšire rasprostranjen i najviše eksprimiran trofički faktor u mozgu i ima važnu ulogu u normalnom razvoju CNS tako što učestvuje u različitim ćelijskim procesima poput procesa rasta i očuvanja neurona, povećavajući preživljavanje i diferencijaciju selektivnih populacija neurona (Barde, 1989). Iako nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi kojim BDNF ostvaruje izuzetno važno delovanje u mozgu, pokazano je da učestvuje u modulaciji sinaptičke efikasnosti i da ima neuroprotektivni i morfološki efekat posle nekih povreda mozga (Lindvall i saradnici, 1994; Thoenen, 1995; Poo, 2001). Naime, utvrđeno je da neurotrofini ispoljavaju jake efekte na sinaptičku transmisiju (prenos signala) i takođe da imaju učešća u dugotrajnoj potencijaciji (LTP), koja je povezana sa procesima učenja i pamćenja (Korte i saradnici, 1995; Patterson i saradnici, 1992; Patterson i saradnici, 1996; Figurov i saradnici, 1996; McAllister i saradnici, 1999). Brojne studije ukazuju

da promene u neuroplastičnosti i ćelijskoj elastičnosti mogu da budu tesno povezane sa patogeneom i patofiziologijom neurodegenerativnih i psihijatrijskih oboljenja, kao i sa mehanizmom delovanja efikasnih tretmana (Manji i Duman, 2001). Kod pacijenata sa poremećajem raspoloženja i depresijom utvrđene su neuroplastične promene poput smanjenja volumena hipokampusa i PFC, smanjenja ćelijske gustine glijskih i nervnih ćelija, kao i smanjeni nivo ekspresije BDNF (Huang i Reichardt, 2001; Nawa i saradnici, 2000; Numakawa i saradnici, 2011). Pokazano je da hronični stres, glavni pokretač depresije, takođe dovodi do mnogih identičnih neuroplastičnih promena u životinjskim modelima (Gronli i saradnici, 2006). Rezultati mnogih istraživanja pokazuju da je BDNF uključen u nastanak depresije (Calabrese i saradnici, 2009; Castren i saradnici, 2007; Duman i Monteggia, 2006; Kunugi i saradnici, 2010). Tako su na primer, nivo iRNK za BDNF i proteinski nivo sniženi u *postmortem* mozgu depresivnih pacijenata (Dunham i saradnici, 2009). Osim toga, funkcionalni značaj ove izmenjene ekspresije neurotrofičkih faktora razjašnjen je u istraživanjima koja pokazuju da stres i depresija mogu da dovedu do atrofije neurona, odnosno gubitka ćelija u pomenutim ključnim limbičkim regionima mozga vezanim za nastanak neuropsihijatrijskih poremećaja, uključujući amigdalnu, PFC i hipokampus. Kod depresivnih pacijenata nivo BDNF je smanjen (Karege i saradnici, 2002) i može da se vrati na normalan nivo tretmanom antidepresivima (Hashimoto i saradnici, 2004; Aydemir i saradnici, 2005). Pored toga, ekspresija BDNF u hipokampusu je povećana u *postmortem* mozgu pacijenata koji su bili pod tretmanom antidepresivima u odnosu na netretirane pacijente (Chen i saradnici, 2001). Na isti način i kod pacova, ekspresija BDNF se povećava po tretmanu antidepresivima (Dias i saradnici, 2003), a ubrizgavanje BDNF direktno indukuje antidepresivne efekte u životinjskim modelima sa ponašanjem sličnim depresiji kod ljudi (Siuciak i saradnici, 1997; Shirayama i saradnici, 2002). Pokazano je da neizbežan stres inhibira LTP, dobro poznati model učenja i pamćenja, u *cornu ammonis I* (CA1) regionu hipokampusa (Shors i saradnici, 1989). Budući da su neurotrofički faktori uključeni u regulaciju LTP (O'Dell i saradnici, 1991; Falkenberg i saradnici, 1992; Dragunow i saradnici, 1993), stres može da menja sazajne funkcije preko regulacije neurotrofičkih faktora poput BDNF. Utvrđeno je da je ekspresija BDNF smanjena u hipokampusu pacijenata koji boluju od Alchajmerove bolesti (Connor i Dragunow, 1998) i da se ekspresija povećava tokom procesa vezanih za učenje (Hall i saradnici, 2000). Razumevanje molekularskih mehanizama koji regulišu neuroplastičnost u

uslovima hroničnog stresa može da omogući efikasnije lečenje psihijatrijskih oboljenja nastalih delovanjem stresa.

1.4.6. Uticaj stresa na ponašanje

Hronični stres utiče na različite fiziološke i kognitivne mehanizme koji dovode do promena u učenju i ponašanju u životinjskim modelima. Utvrđeno je da uticaj stresa na učenje zavisi od različitih faktora kao što su: starost, pol, vrsta i osobine stresora, dužina stresiranja, kao i tip učenja (Shors, 2006). Sa druge strane, brojne studije uticaja stresa na ponašanje eksperimentalnih životinja ukazuju da različiti modeli hroničnog stresiranja mogu pouzdano da izazovu ponašanje kod pacova slično depresiji, dok su za ponašanje slično anksioznom dobijeni neprecizni rezultati (Kompagne i saradnici, 2008). Pokazano je da različiti obrasci stresiranja mogu da dovedu do povećanja ponašanja sličnog anksioznom (Bondi i saradnici, 2008; Rygula i saradnici, 2005), smanjenja ovakvog ponašanja (Kompagne i saradnici, 2008) ili da uopšte nemaju efekta na ponašanje slično anksioznom u eksperimentalnim modelima stresiranja glodara (Matuszewich i saradnici, 2007). Ovakvi oprečni rezultati mogli bi da se pripišu razlikama u vrsti stresora, kao i različitom vremenskom periodu između delovanja stresora i procenjivanja anksioznosti. Takođe je potrebno naglasiti da pol životinja, odnosno različiti neuroendokrini status mužjaka i ženki, ima važan uticaj na posredovanje delovanja stresiranja na ponašanje pacova slično depresiji i anksioznosti kod ljudi (Wood i Shors, 1998; Mathews i saradnici, 2008; Mashoodh i saradnici, 2008).

1.5. Delovanje terapijskih doza litijuma u lečenju psihijatrijskih poremećaja

Više od šest decenija litijum predstavlja prvu liniju izbora u tretmanu bipolarnih poremećaja zbog svoje efikasnosti u dugoročnom stabilizovanju raspoloženja (Cade, 1949; Malhi i Gershon, 2009). Pored toga, tretman litijumom značajno smanjuje rizik od samoubistva i ova izuzetna osobina odvaja litijum od ostalih lekova koji se koriste u terapiji bipolarnih poremećaja (Goodwin i saradnici, 2003). Međutim, zanimljivo je da su mehanizmi kojima litijum postiže poznate kliničke efekte ostali u velikoj meri nerazjašnjeni. Svakako je i poteškoća u definisanju poremećaja raspoloženja na osnovu kliničke fenomenologije doprinela ovaj

nejasnoj slici. Pored toga, patofiziologija nastanka ovih poremećaja je veoma složen proces koji uključuje više međusobno povezanih neurotransmiterskih sistema i neuronskih mreža unutar mozga (Bowden, 2008). Postoje brojne teorije o mehanizmu delovanja litijuma, počev od promena u jonskom transportu do modulacije ekspresije gena (Gould i saradnici, 2004; Marmol, 2006). Delovanje litijuma u otklanjanju kliničkih simptoma bipolarnog poremećaja je očigledno na više nivoa: na makroskopskom izaziva promene raspoloženja i sazajnih sposobnosti i može da izmeni strukturu mozga, dok na ćelijskom nivou litijum deluje na brojne unutarćelijske i molekulske procese. Utvrđeno je da litijum menja funkciju nervnih ćelija tako što smanjuje ekscitatornu neurotransmisiju preko delovanja na glutamat i dopamin, a povećava inhibitornu neurotransmisiju delovanjem na GABA (Manji i Chen, 2002). Naime, već više decenija postoji pretpostavka da poremećaji u ponašanju i raspoloženju nastaju usled promena u jonskoj propustljivosti membrana, što dovodi do direktnih oštećenja ekscitabilnosti neurona i provođenja nervnih impulsa. Jedna od preovlađujućih ranijih hipoteza ističe uticaj jona litijuma na ometanje normalnog funkcionisanja Na-K pumpe i direktne efekte te promene na sinaptičku transmisiju, što dovodi zatim do poznatih promena u specifičnim neurotransmiterskim sistemima (Ullrich i saradnici, 1980). Kod poremećaja raspoloženja, uključujući i bipolarni poremećaj, postoje promene i u glutamatergičkoj neurotransmisiji (Sanacora i saradnici, 2008), a glutamat kao najzastupljeniji ekscitatorni neurotransmiter i sastavni deo sinaptičke transmisije u mozgu, predstavlja važan faktor u regulaciji sinaptičke plastičnosti značajne za procese učenja, memorije i uopšte sazajnih sposobnosti (Collingridge i Bliss, 1995). Rezultati brojnih istraživanja ukazuju da litijum direktno deluje na glutamatergičku neuronsku transmisiju. Naročito brojni dokazi ukazuju da litijum menja ekscitabilnost neurona koji su uključeni u sinapse u CA1 regionu hipokampusa. Sposobnost litijuma da poboljša sinaptičku transmisiju u CA1 regionu hipokampusa pripisuje se povećanju presinaptičke ekscitabilnosti, kao i sinaptičke efikasnosti, što za posledicu ima povećanje ekscitatornih postsinaptičkih potencijala (Valentin i saradnici, 1997; Colino i saradnici, 1998; Rinaldi i saradnici, 1986; Keinanen i saradnici, 1990). Pomenuto delovanje litijuma na sinaptičku transmisiju u hipokampusu zasigurno ima poseban značaj za tretman bipolarnih poremećaja i uopšte poremećaja raspoloženja, zato što je hipokampus izuzetno važna komponenta limbičkog sistema i učestvuje u regulaciji emotivnog stanja, sazajnih sposobnosti i pamćenja. Iz tog razloga poremećeno funkcionisanje hipokampusa ima za posledicu promene u ponašanju uočene kod sindroma poremećaja raspoloženja, a to dodatno

potvrđuje i činjenica da ovi pacijenti imaju smanjenu sposobnost pamćenja i reprodukcija naučenog (Altshuler i saradnici, 2004; Bearden i saradnici, 2006). Promene u sinaptičkoj plastičnosti kod CA1 piramidalnih neurona hipokampusa mogu da izazovu promene u modulaciji ne samo hipokampusa, već i više drugih važnih moždanih struktura do kojih se ovi hipokampalni neuroni projektuju, a to su: PFC, amigdala, striatum i hipotalamus (Mayberg, 1997).

Rezultati istraživanja u protekle dve decenije doveli su do hipoteze da u osnovi patoloških procesa kod poremećaja raspoloženja, uključujući i bipolarni poremećaj, ne postoje samo promene na ćelijskom nivou u vidu direktnog oštećenja neuronske ekscitabilnosti i transmisije, već takođe i poremećaji na nivou unutarćelijskih signalnih puteva koji posreduju u strukturalnim i funkcionalnim promenama u sklopu neuronske i sinaptičke plastičnosti (Manji i Duman, 2001). Takođe je utvrđena smanjena funkcionalnost unutarćelijskih signalnih puteva koji su vezani za ćelijsko preživljavanje, rast i metabolizam. U okviru ovih složenih signalnih puteva deluju tzv. sistemi sekundarnih glasnika, koji predstavljaju posrednike u složenim procesima čiji je krajnji ishod promena neurotransmisije i povećanje sposobnosti ćelijskog preživljavanja, u čemu učestvuju brojni različiti proteini. Litijum dovodi do promena ovih sistema sekundarnih glasnika koji deluju unutar neurona, a u koje se ubrajaju: inozitol, diacilglicerol (DAG), protein kinaza C (PKC), unutarćelijski kalcijum, kao i tzv. MARCKS (eng. myristoylated alanine-rich C kinase substrate) i drugi. To su molekularni mehanizmi kojima litijum ostvaruje svoje terapeutsko delovanje u koje se ubraja u obnavljanje oštećenja strukturne i funkcionalne neuronalne plastičnosti. Naime, u prekliničkim i kliničkim studijama utvrđeno je da litijum ispoljava tzv. neurotrofičke i neuroprotektivne efekte. Preciznije rečeno u okviru neuroprotektivnog delovanja litijuma postoji više različitih mehanizama koji obuhvataju brojne neurotrofičke i neuroprotektivne proteine (Chuang, 2005). Novija istraživanja mehanizama kojim litijum ostvaruje tako značajnu ulogu, ukazuju upravo na aktivaciju odgovarajućih unutarćelijskih signalnih puteva koji leže u osnovi ovih procesa (Corbella i Vieta, 2003).

Veoma važan aspekt u terapeutskom delovanju litijuma je njegov pomenuti protektivni efekat koji se odvija na više nivoa, budući da novija istraživanja ukazuju da litijum pored dobro poznatog terapeutskog delovanja u smislu stabilizovanja raspoloženja kod bipolarnih pacijenata, pokazuje i delovanje kao neuroprotektivni agens veoma efikasan u sprečavanju ćelijske smrti izazvane apoptozom (Manji i saradnici, 2000). Takvo neuroprotektivno delovanje odigrava se posredstvom brojnih, međusobno povezanih i izukršanih mehanizama, a interakcija litijuma sa

ovim mehanizmima još uvek nije potpuno proučena. Naime, brojne studije su doprinele da se bipolarni poremećaj sve više sagledava kao degenerativni proces (Berk, 2009; Berk i saradnici, 2011), pri čemu stresori povezani sa ovim poremećajem izazivaju ekscitotoksičnost koja dovodi do apoptoze, što vodi dalje u atrofiju više moždanih regiona. U tom pogledu, pokazano je da litijum povećava dugovečnost ćelija tako što prekida ili umanjuje apoptozu, što predstavlja suštinu njegovog neuroprotektivnog delovanja (Quiroz i saradnici, 2010). Osim toga, litijum dovodi do prekida kaskadnih neurotoksičnih procesa koji dovode do oštećenja tkiva i napredovanja promena u strukturi i funkciji mozga, što je poznato kao neuroprogresija (Berk i saradnici, 2011).

U brojnim istraživanjima je ustanovljeno da litijum dovodi do povećanja ekspresije neurotrofičkog faktora BDNF (Einat i saradnici, 2003; Fukumoto i saradnici, 2001; Frey i saradnici, 2006 b; Jacobsen i Mork, 2004; Yasuda i saradnici, 2009), kao i neuroprotektivnog proteina Bcl-2 (eng. B-cell lymphoma/leukemia-2) (Chen i saradnici, 1999; Zhou i saradnici, 2005). Postoje brojni dokazi da dugotrajni tretman litijumom dovodi do povećanja nivoa neuroprotektivnog proteina Bcl-2 u frontalnom korteksu, hipokampusu i striatumu (Manji i saradnici, 2000). Litijum povećava ćelijsko preživljavanje i pomenutom aktivacijom BDNF i na taj način stimulisanjem aktivnosti anti-apoptotskih signalnih puteva, uključujući fosfatidilinozitol 3-kinaza/Akt (PI3K/Akt) i mitogen-aktiviran protein kinazni put (Rowe i Chuang, 2004).

Pored toga, litijum smanjuje procese koji dovode do apoptoze tako što direktnim ili posrednim delovanjem inhibira aktivnost enzima GSK-3 β (glikogen sintaza kinaza-3 β) i takođe posredstvom inhibicije ulaska kalcijuma. Naime, neuroprotektivno delovanje litijuma obuhvata i inaktivaciju N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora preko kojeg u ćeliju ulazi kalcijum i natrijum. Još jedan važna meta delovanja litijuma je i pomenuti enzim GSK-3 β , iz grupe serin-treonin kinaza, čiju aktivnost inhibiraju terapijske koncentracije litijuma (Klein i Melton, 1996). Ovaj enzim, pored različitih uloga neophodnih za funkcionisanje ćelije, ima i izuzetno važnu ulogu kao regulator procesa apoptoze i ćelijske plastičnosti i predstavlja osnovni faktor regulacije signalnih puteva koji obezbeđuju preživljavanje neurona i ćelijski odgovor na delovanje glukokortikoida i estrogena (Gould i Manji, 2005). Na smanjivanje inače veoma visoke aktivnosti ovog enzima u ćeliji utiču faktori iz brojnih signalnih puteva. Po pravilu, niska aktivnost enzima GSK-3 β sprečava apoptozu (programiranu ćelijsku smrt), dok njegova povišena aktivnost uvodi ćeliju u apoptozu (Gould i Manji, 2002). Ovakva litijumom započeta

regulacija anti- i pro-apoptotskih signalnih puteva dovodi do promena širokog spektra tzv. nizvodnih efektor, uključujući pomenutu Bcl-2 familiju proteina, kao i CREB (eng. cAMP-response-element-binding protein), aktivator protein 1 (AP-1), β -katenin, NF- κ B i druge (Rowe i Chuang, 2004).

Istovremeno, pored opisanog neuroprotektivnog delovanja, litijum takođe pomaže stvaranje novih ćelija, odnosno proces tzv. neuroprolifracije ili neurogeneze (Chen i saradnici, 2000; Post i saradnici, 2003). Novije studije pokazuju da litijum izaziva rast i grananje nervnih završetaka i stimuliše proces neurogeneze u hipokampusu odraslih glodara (Boku i saradnici, 2009; Chen i saradnici, 2000; Wexler i saradnici, 2008), za koji je utvrđeno da doprinosi negativnoj povratnoj regulaciji HPA sistema (Schloesser i saradnici, 2009; Snyder i saradnici, 2011). Na ovaj način, stimulisanjem procesa neurogeneze u hipokampusu, litijum obnavlja regulaciju HPA sistema koja je narušena kod pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja.

Pored višedecenijske primene u lečenju bipolarnog poremećaja, neuroprotektivno delovanje litijuma podrazumeva da litijum može uspešno da se primenjuje i u lečenju i prevenciji oštećenja mozga bilo usled akutne traumatske povrede poput moždanog udara, bilo kod hroničnih neurodegenerativnih bolesti kao što su Alchajmerova, Parkinsonova, Hantingtonova bolest i amiotrofična lateralna skleroza (ALS) (Rowe i Chuang, 2004; Fornai i saradnici, 2008).

Postoje brojne studije koje decenijama unazad izučavaju delovanje litijuma na neurotransmitere i neuromodule, uključujući: monoaminske, serotoninске, holinergičke i GABA sisteme (Segal, 1974; Treiser i saradnici, 1981). Jedan od mehanizama koji bi mogli da objasne terapeutsko i profilaktičko delovanje litijuma kod bipolarnog poremećaja postavljen je u tzv. monoaminskoj hipotezi, koja tumači uticaj litijuma na promene u koncentracijama neurotransmitera u okviru CNS. Pokušaji da se precizno odredi kako litijum utiče na neurotransmiterske sisteme i prenos signala, stavljaju fokus u istraživanjima najviše na modulaciju presinaptičkih procesa, poput prometa (sinteze, otpuštanja, preuzimanja) neurotransmitera, a potom i na postsinaptičke događaje, kao što je regulacija mehanizama ćelijskih signalnih puteva (transdukcije signala) (Lenox i Hahn, 2000). Dugoročni efekat litijuma na neurotransmiterske sisteme ostvaruje se zahvaljujući njegovoj sposobnosti da usklađuje različite signalne puteve u kojima učestvuju neurotransmiteri i neuropeptidi u brojnim moždanim strukturama (Lenox i Frazer, 2002). U tom smislu, postoje brojni dokazi koji potvrđuju važnu ulogu DA u nastanku i razvoju poremećaja raspoloženja, a utvrđeno je da litijum smanjuje

presinaptičku dopaminsku aktivnost i deluje postsinaptički u smislu sprečavanja nastanka uzlazne regulacije receptora (Lenox i Frazer, 2002). Međutim, nema mnogo podataka o delovanju litijuma na ekspresiju gena uključenih u sintezu, preuzimanje i razgradnju DA i NA, kao i na ekspresiju gena za antioksidativne enzime u PFC i hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresu. Detaljnije proučavanje uloge i značaja delovanja litijuma na molekulske mehanizme sinteze, preuzimanja i razgradnje neurotransmitera (DA i NA), kao i na molekulske mehanizme antioksidativne zaštite je od posebnog interesa i značaja u lečenju psihijatrijskih poremećaja izazvanih hroničnim stresom.

2. CILJ RADA

Cilj istraživanja je bio da se detaljnije prouče molekularni mehanizmi delovanja litijuma na neurotransmiterski i antioksidativni status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu stresiranih životinja. Stres utiče na ekspresiju gena za enzime koji učestvuju u sintezi, preuzimanju i razgradnji neurotransmitera, kao i na ekspresiju gena za enzime antioksidativne zaštite. Stresom izazvane dugotrajne promene ekspresije gena za navedene enzime, mogu biti uzrok nastanka psihijatrijskih oboljenja kao što su anksioznosti i depresija. Na osnovu pregleda literature utvrđeno je da nema mnogo podataka o delovanju litijuma na ekspresiju gena uključenih u metabolizam kateholamina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja. **Cilj ove doktorske disertacije** je bio da se ispita delovanje litijuma na ekspresiju gena uključenih u sintezu neurotransmitera, njihovo preuzimanje i razgradnju, kao i delovanje litijuma na antioksidativni status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja. Takođe, ispitivano je i delovanje litijuma na ponašanje pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja.

Specifični cilj rada bio je da se ispita:

Uticaj ponavljanih stresova fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana, kao i delovanje litijuma kod pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) na:

- a) količinu dopamina i noradrenalina,
- b) ekspresiju gena za enzime koji učestvuju u biosintezi dopamina i noradrenalina (TH i DBH),
- c) ekspresiju gena za dopaminske i noradrenalinske transportere odgovorne za preuzimanje, skladištenje i otpuštanje dopamina i noradrenalina (DAT, NET i VMAT 2),
- d) aktivnost i količinu enzima odgovornih za razgradnju dopamina i noradrenalina (MAO A, MAO B i COMT),
- e) ekspresiju gena za antioksidativne enzime (SOD 1, SOD 2, CAT, GPx i GR),

- f) ekspresiju gena za BDNF u prefrontalnom korteksu i hipokampusu,
- g) koncentraciju ACTH i CORT u plazmi i GLU u krvi i
- h) ponašanje eksperimentalnih živalinja.

Opšti cilj istraživanja je da rasvetljavanjem molekularskih mehanizama delovanja litijuma doprinesemo poboljšanju kvaliteta i individualizaciji terapijskih pristupa u neuropsihijatrijskoj kliničkoj praksi.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni model

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, starosti 3 meseca, telesne mase između 330-400 g. Životinje su boravile u prostoriji sa klimatizacijom i sa pravilnom izmenom svetla i mraka u toku 12 časovnog intervala. Hrana i voda davani su *ad libitum*.

Eksperimentalne životinje su nedelju dana pre izvođenja eksperimenta bile smeštene po četiri u kavez veličine 21x37x13 cm i podeljene u šest grupa. Prvu grupu činili su kontrolni pacovi (K). Drugu grupu činili su pacovi izlagani 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). Treću grupu činili su pacovi svakodnevno tretirani fiziološkim rastvorom (F) u trajanju od 14 dana. Četvrtu grupu činili su pacovi svakodnevno tretirani litijumom (Li) u trajanju od 14 dana. Petu grupu činili su pacovi izlagani 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirani fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i šestu grupu činili su pacovi izlagani 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirani litijumom (Li+PSFS).

Rastvor litijum-hlorida (LiCl) je injeciran određenim grupama životinja intraperitonealno (IP) jednom dnevno 14 dana (Nonaka i Chuang, 1998). Početna doza litijuma je bila 1,5 mEq/kg i primenjena je prva dva dana. Zatim je povećana na 2,3 mEq/kg sedam dana, pa na 3 mEq/kg pet dana. Ovakav protokol davanja LiCl pacovima obezbeđuje koncentracije litijuma u plazmi koje su, u poređenju sa pacijentima sa bipolarnim poremećajem, iznad minimalne terapijske koncentracije (*i. e.* 0,4 mM) tokom perioda terapije.

Da bi se smanjile razlike u fiziološkim parametrima zavisnim od cirkadijalnog ritma, sve životinje su žrtvovane u istom vremenskom periodu, između 9 i 11 h, *i. e.*, dan posle poslednjeg tretmana. Pacovi su žrtvovani u uslovima bez stresa brzom dekapitacijom na giljotini (Harvard Apparatus, USA), vađen je mozak i posle kratkog ispiranja fiziološkim rastvorom izolovani su prefrontalni korteks i hipokampus koji su odmah zaleđeni u tečnom azotu, a zatim su uzorci čuvani u zamrzivaču na -70 °C do izolacije ukupne RNK i proteina.

3.2. Eksperimentalni pristup

U eksperimentima je korišćen ponavljani stres fizičkog sputavanja, izvođen na taj način što je pacov podvrgnut stanju nepokretnosti smeštanjem u plastične tube dimenzija 25x7 cm (Slika 2) (Gamaro i saradnici, 1999). Pacovi iz ove grupe podvrgnuti su opisanom stresu po dva sata tokom 14 dana u različito vreme u periodu od 9-13 h, da bi se izbeglo navikavanje na eksperimentalnu proceduru (Kim i Han, 2006).



Slika 2. Stres fizičkog sputavanja (slika preuzeta sa <http://web.jhu.edu>).

3.3. Određivanje ekspresije gena

3.3.1. Metoda određivanja nivoa iRNK – RT-PCR u realnom vremenu

3.3.1.1. Izolacija i merenje koncentracije ukupne RNK

Izolacija ukupne RNK obavljena je na sobnoj temperaturi, metodom fenolske ekstrakcije uz pomoć Trizola (Invitrogen Life Technologies). Tkivo je homogenizovano u Trizolu pomoću staklo-teflon homogenizera Potter-Elvehjem zapremine 20 ml. Nakon kratke inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, obavljena je ekstrakcija, tako što je u homogenat na 500 μ l trizola dodato 100 μ l hloroforma (-20°C). Nakon centrifugiranja i odvajanja hloroformske od fenolske faze, ukupna RNK istaložena je izopropil alkoholom (-20°C) 10

minuta na sobnoj temperaturi. Da bi se RNK istaložila, na 500 μ l trizola dodavano je 250 μ l izopropil alkohola. Istaložena RNK isprana je sa 1 ml 75% etanola, a potom sa 1 ml 96% etanola. Osušena RNK (5 minuta na sobnoj temperaturi) rastvarana je u vodi tretiranoj dietilpirokarbonatom (DPC-H₂O). Koncentracija RNK određivana je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm, na aparatu NanoDrop.

3.3.1.2. *Prepis RNK u cDNK*

Kvantifikacija iRNK urađena je u dva koraka. Najpre je sintetisana cDNK iz 1500 ng ukupne RNK korišćenjem enzima Redy-To-Go You-Prime First-Strand Beads Reverzne Transkriptaze (Amersham) i pd(N)₆ Random Hexamera (Amersham). Prepis je urađen po sledećoj proceduri: 12 μ l uzorka koji je sadžao 1500 ng iRNK inkubiran je 10 min na 65 °C. Nakon toga dodano je 21 μ l reverzne transkriptaze sa pd(N)₆ prajmerom (0.2 μ g finalno) po uzorku i inkubirano 1 h na 37 °C. Posle prepisa iRNK u cDNK urađena je kvantifikacija ekspresije TH, DBH, DAT, NET, VMAT 2, SOD 1, SOD 2, CAT, GPx, GR, BDNF i cyc A gena metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu.

3.3.1.3. *Kvantifikacija ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu*

PCR reakcije su rađene na aparatu ABI Prisma 7000 Sequence Detection System, u finalnoj zapremini od 25 μ l koja je sadržala: 1x TaqMan Universal PCR Master Mix sa AmpErase UNG (Aplid Biosystems, Foster City, CA), TaqMan Pre-Designed Assay i cDNA (1 ng RNK preveden u cDNK). Uzorci su analizirani uz pomoć eseja: esej specifičan za TH ID Rn00562500_m1, esej specifičan za DBH ID Rn00565819_m1, esej specifičan za NET ID Rn00580207_m1, esej specifičan za DAT ID Rn00562224_m1, esej specifičan za VMAT 2 ID Rn00564688_m1, SOD 1 ID Rn00566938_m1, esej specifičan za SOD 2 ID Rn00690587_g1, esej specifičan za CAT ID Rn00560930_m1, esej specifičan za GPx ID Rn00577994_g1, esej specifičan za GR ID Rn01482159_m1, esej specifičan za BDNF ID Rn01484924_m1 i kao endogena kontrola korišćen je esej specifičan za cycA ID Rn00690933_m1 (svi eseji poručeni su od Applied Biosystems). Temperaturni profil reakcija bio je sledeći: 2 minuta na 50 °C, 10 minuta na 95 °C i 40 ciklusa po 15 sekundi na 95 °C, 1 minut na 60 °C. Svi uzorci su rađeni u

triplikatu. Kvantitativne vrednosti su dobijene iz broja ciklusa (Ct vrednosti) u kom je porast signala iznad nivoa šuma („threshold“), udružen sa ulaskom u eksponencijalnu fazu PCR koji detektuje analitički softver aparata. Unos ukupne RNK (baziran na spektrofotometrijskom merenju) u reakciju reverzne transkripcije, njen kvalitet (manji ili veći stepen degradacije), kao i efikasnost reverzne transkripcije mogu da variraju od uzorka do uzorka. Zbog toga, istovremeno je amplifikovan i gen za cyc A kao endogena kontrola, te je svaki uzorak normalizovan na bazi njegovog sadržaja cyc A. Geni koji se koriste kao endogene kontrole imaju stabilan nivo ekspresije u pojedinim tkivima nezavisno od fizioloških uslova. Relativna ekspresija ciljnih iRNK TH, DBH, DAT, NET, VMAT 2, SOD 1, SOD 2, CAT, GPx, GR i BDNF je izražena u odnosu na kalibrator. Kao kalibrator izabran je jedan uzorak iz kontrolne grupe koji je bio približan srednjoj vrednosti svih uzoraka kontrolne grupe. Konačan rezultat, izražen je u relativnim jedinicama kao N-puta razlika u odnosu na kalibrator, (a normalizovan prema cycA-referentnom genu) po jednakosti:

Jednakost 1. $N_{uzorka} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoda $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl 2001)

gde je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ uzorka} - \Delta Ct \text{ kalibratora}$$

$$\Delta Ct \text{ uzorka} = Ct \text{ cilj.trans.} - Ct \text{ cyc A}$$

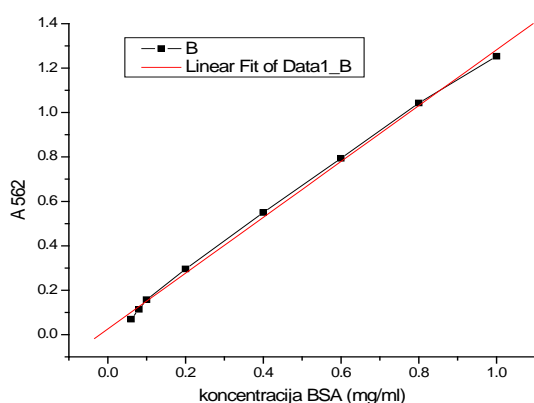
$$\Delta Ct \text{ kalibratora} = Ct \text{ cilj.trans.} - Ct \text{ cyc A}$$

3.3.2. Metode određivanja koncentracije i sinteze proteina

3.3.2.1. Izolacija i merenje koncentracije ukupnih proteina

Tkiva su homogenizovana u dve zapremine 0.5 M fosfatnog pufera (pH 6.65) sa 0.2% Triton x-100 (deterdžent) sa 30 zaveslaja u staklo-teflon homogenizeru Potter-Elvehjem zapremine 20 ml na +4 °C. Nakon homogenizacije, uzorci su ostavljeni da liziraju 1h na +4 °C, a zatim su centrifugirani 20 min na 12000 rpm. Supernatant je odpipetiran u prohlađene epruvete. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su na -70 °C do početka rada.

Koncentracija proteina određivana je BCA metodom (Stich, 1990) korišćenjem komercijalnog BCA protein assay Reagent A i Reagent B (Pierce). Reagens A i reagens B mešani su u odnosu 50:1, dok se mešavina rastvora reagensa A i B dodaje u odnosu na uzorak 20:1. Uzorci sa reagensom inkubirani su 30 minuta na 37 °C. Ova spektrofotometrijska metoda zasniva se na merenju apsorbancije svetlosti na 562 nm na aparatu LKB BIOCHROM ULTROSPEC II. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji ukupnih proteina. Koncentracija proteina u uzorcima se određuje na osnovu standardne krive koja se pravi na osnovu osam različitih razblaženja poznate koncentracije BSA (Slika 3).



Parameter	Value	Error	

A	0.0257	0.01267	
B	1.25598	0.02406	
R	SD	N	P

0.9989	0.02292	8	<0.0001

Slika 3. Standardna kriva poznatih koncentracija BSA na osnovu koje se određuje koncentracija proteina. $Y = A + B * X$

3.3.2.2. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina na SDS-poliakrilnom gelu izvedeno je u skladu sa Leammli-evom procedurom (1970). Uzorcima je dodavana ista zapremina pufera (0.5 M TRIS, glicerol, SDS, 0.1% bromfenol plavo, merkaptotanol), posle čega su inkubirani 5 minuta na 95 °C i potpuno denaturisani. Po 30 µg proteina je podvrgnuto elektroforetskom razdvajanju u 5% akrilamidnom gelu za koncentrovanje (0.5 M TRIS pH 6.8, akrilamid, bisakrilamid, 10% SDS, 10% APS, TEMED i H₂O) i 10% akrilamidnom gelu za razdvajanje (1.5M TRIS pH 8.8, akrilamid, bisakrilamid, 10% SDS, 10% APS, TEMED i H₂O). Korišćena je aparatura Mini-protean 3 electrophoresis Cell, Bio-Rad. Elektroforeza je u proseku trajala 100 min, pri naponu od 100 V. Na svaki gel su nanošeni i proteini poznatih molekulske masa (PageRegular™

Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas) radi lokalizovanja ispitivanih proteina po završetku elektroforeze i standardni uzorak radi anuliranja grešaka u proceduri. Pufer za elektroforezu sadrži TRIS, glicin, 10% SDS i H₂O.

3.3.2.3. Transfer proteina sa gela na membranu

Elektroforetski razdvojeni proteini prenošeni su sa gela na nitroceluloznu membranu (Hybond TM C Extra, Amersham Bioscience). Zatim je pravljen „sendvič“: ređana su tri filter papira, membrana, gel i opet tri filter papira (sve natopljeno puferom za transfer). „Sendvič“ je stavljan u modul tako da se membrana okrene prema anodi, a gel prema katodi. Tako orijentisani moduli su stavljeni u aparat za transfer (Mini Trans-Blot Cell Bio-Rad) zajedno sa puferom za transfer (TRIS, glicin, metanol i H₂O). Transfer se odvijao u toku 2 h pri jačini struje od 0.4 A.

3.3.2.4. Imunodetekcija i denzitometrijsko merenje proteina

Nakon transfera membrana je nekoliko puta ispirana u TBS-T puferu (TRIS, Na Cl, Tween 20 i H₂O), a zatim 2 h inkubirana u rastvoru za blokiranje (5% nemasno mleko), kako bi se umanjilo nespecifično vezivanje. Posle toga je membrana isprana u TBS-T puferu, a potom inkubirana 90 min sa primarnim antitelima koja specifično prepoznaju ispitivane proteine. Za merenje nivoa proteina: TH (ab51191), DBH (ab63939), NET (ab41559), DAT (ab18548), VMAT 2 (ab70808) i BDNF (ab6201) korišćena su antitela nabavljena od Abcam, za merenje nivoa proteina SOD 1 i SOD 2 antitela nabavljena od Stressgen (SOD-101 i SOD-110), za merenje nivoa proteina CAT antitelo nabavljeno od Calbiochem (219010), a za merenje nivoa proteina GPx i GR antitela nabavljena od Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-30147 i sc-32886). Nakon inkubacije primarnim antitelom, membrana je isprana puferom TBS-T, a potom inkubirana u sekundarnom antitelu konjugovanom sa peroksidazom 1 h. Sekundarna antitela (anti-mouse i anti-rabbit) korišćena su iz kita Amersham ECLTM Western Blotting Analysis System razblažena u odnosu 1:5000. Kao endogena kontrola korišćen je izmereni nivo proteina β actin (ab8227, Abcam). Membrana je nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom isprana više puta sa TBS-T, a zatim inkubirana 1 minut u mračnoj sobi sa rastvorom za detekciju (Amersham ECLTM Western Blotting Analysis), koji se zasniva na reakciji luminiscencije, koja je brza i veoma osetljiva. U prisustvu H₂O₂, peroksidaza katalizuje oksidaciju luminola. Nastali

intermedijarni produkt prelazi u stabilnu formu uz emisiju svetlosti koja osvetli film. Detekcija se vrši u mračnoj sobi sa crvenom svetlošću. Membrana je postavljena između dve providne folije u kaseti za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science), a preko membrane je stavljen film (Amersham HyperfilmTM ECL). Nakon toga kasetu se zatvori. Posle nekoliko sekundi do jednog minuta (zavisno od vrste tkiva) film je izvađen iz kasete i razvijen (razvijatelj(1:7)-fiksir(1:4)-voda). Otisci koji su na njemu dobijeni odgovaraju proteinima koji se nalaze na membrani i za koje su vezana odgovarajuća primarna i sekundarna antitela sa peroksidazom. Intenzitet signala, odnosno koncentracija ispitivanih proteina, određeni su densitometrijski. Filmovi su skenirani, a intenzitet signala se kvantifikuje korišćenjem računarskog programa Image J. Prosečan broj piksela po otisku kontrolnih životinja definiše se kao 1 arbitrarna jedinica (AJ)/ μg proteina, a vrednosti dobijene kod tretiranih životinja se porede sa kontrolom i takođe izražavaju u AJ/ μg proteina.

3.3.3. Metode određivanja aktivnosti proteina

3.3.3.1. Merenje aktivnosti enzima monoamino oksidaze A i monoamino oksidaze B

Aktivnost enzima monoamino oksidaza A i B određena je korišćenjem komercijalnog kita (Amplex Red Monoamine Oxidase Assay kit; molecular Probes), metode fluorometrijskog merenja nivoa aktivnosti zasnovane na merenju H_2O_2 u HRP-kuplovanoj reakciji uz korišćenje 10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazina (Amplex red reagent), visoko osetljive i stabilne probe za H_2O_2 , pri čemu se kao produkt dobija jedinjenje rezorufin sa apsorpcijom na 571 nm i fluorescentnom emisijom na 585 nm. Da bi se prilikom merenja jasno razdvojile vrednosti nivoa aktivnosti enzima MAO A i enzima MAO B, postoje dva supstrata i dva inhibitora koja se koriste u okviru kita: *p*-tiramin je supstrat za oba enzima, dok je benzilamin supstrat samo za MAO B. Specifični inhibitor MAO A aktivnosti je klogilin, a specifični inhibitor MAO B aktivnosti pargilin. Fluorescencija uzoraka je merena tako što je na fluorometru zadata ekscitacija u opsegu od 530-560 nm, a detekcija emisije na 590 nm. Aktivnost MAO A i MAO B izražena je u U/mg protein.

3.3.3.2. *Merenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze*

Za merenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite SOD 1 (CuZnSOD) i SOD 2 (MnSOD) u moždanim strukturama prefrontalnom korteksu i hipokampusu, korišćen je komercijalni kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK). Ovaj metod koristi ksantin/ksantin oksidaza sistem za stvaranje superoksid radikala koji reaguju sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom i stvaraju crvenu formazan boju. Jedna jedinica aktivnosti je definisana kao količina proteina potrebnog da inhibira 50% redukciju 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hlorida. Najpre je izmerena ukupna aktivnost SOD, dok je aktivnost SOD 2 enzima merena 30 min nakon dodavanja 4mM KCN koji inhibira enzimsku aktivnost SOD 1. Iz razlike ukupne aktivnosti i aktivnosti SOD 2 enzima je dobijena vrednost aktivnosti SOD 1 enzima.

Aktivnost enzima se izračunava po sledećoj formuli:

$$U/mg = ((\Delta A \text{ blanka} - \Delta A \text{ uzorka}/IU) \times R) / C_p$$

gde je: ΔA blanka – promena apsorbance blanka, ΔA uzorka – promena apsorbance uzorka, IU – definisana jedinična aktivnost, R – razblaženje uzorka, C_p – koncentracija proteina u mg/ml.

Rezultati su predstavljeni u jedinicama enzima SOD 1 i SOD 2 po mg proteina.

3.3.3.3. *Merenje aktivnosti enzima katalaze*

Aktivnost enzima katalaze je određena po metodi Claiborn-a (1985). Jedna jedinica aktivnosti katalaze se definiše kao količina enzima koja razgrađuje 1 μ mol vodonik – peroksida (H_2O_2) u minutu po mg proteina. Kako H_2O_2 pokazuje maksimalnu apsorbancu na talasnoj dužini od 240 nm, aktivnost katalaze se određuje praćenjem razlaganja H_2O_2 na 240 nm, pri čemu je pad apsorbance proporcionalan aktivnosti katalaze. Pripremljeni 0.05 M fosfatni pufer pH 7.0 (0.05 M K_2HPO_4 titrovani sa 0.05 M KH_2PO_4 do pH 7.0) se titruje 30% rastvorom H_2O_2 dok apsorbance ovakve probe na 240 nm ne dostigne vrednost između 0.525-0.550. Za blank je korišćen čist rastvor fosfatnog pufera bez H_2O_2 . Originalni uzorci čije su koncentracije oko 20 mg/ml su razblaženi 60 puta i to tako što smo im dodali ekvivalentnu zapreminu etanola i 58 puta veću zapreminu vode. Etanol se dodaje da bi se sav endogeno vezani H_2O_2 uklonio sa katalaze, kako bi se merila stvarna aktivnost enzima. Uzorak se do početka merenja drži na ledu. Na 15-40 μ l ovako pripremljenog uzorka se dodaje 3 ml podešenog rastvora H_2O_2 u fosfatnom puferu. Praćen je pad apsorbance na

240 nm u toku 3 min na 25 °C. Promena apsorbance u toku jednog minuta bi trebalo da bude u opsegu 0.04-0.06.

Aktivnost katalaze se izražava u jedinicama aktivnosti po mg protein, a izračunava po sledećoj formuli:

$$\text{specifična aktivnost} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000 \times V_{rs} / 43.6 \times C_{pr} \times V_{uz}$$

gde je: ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti, V_{rs} – zapremina reakcione smeše (ml), C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku (mg/ml), V_{uz} – zapremina uzorka (ml).

3.4.3.4. Merenje aktivnosti enzima glutacion peroksidaze

Aktivnost enzima GPx merena je po metodi Maral-a i saradnika (1977), koja koristi t-butil hidroperoksid i GSH kao supstrate. Aktivnost se prati merenjem promene apsorbance na 340 nm, pri temperaturi od 37 °C. Reakcionu smešu čine: 0.3 ml 0.5 M fosfatnog pufera pH 7.0, 0.1 ml 1mM Na₂EDTA, 0.6 ml 0.2 mM NADPH (u 1% NaHCO₃), 0.3 ml 1 mM GSH, 0.1ml 0.03 M t-butil hidroperoksid, 0.1 ml 1mMNaN₃, 5 µl GLR-a i 1.5 ml vode. Pre dodavanja u smešu, osnovnu koncentraciju GLR smo razblaživali sve dok promena apsorbancije na 340 nm u blanku (ΔA_{bl}) nije dostigla vrednost 0.014/min. U ovakvu reakcionu smešu se dodaje 60-100 µl uzorka i meri promena apsorbance na 340 nm u trajanju od 150 sekundi. Aktivnost enzima GPx se računa po sledećoj formuli:

$$\text{specifična aktivnost} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000 \times V_{rs} / 6.22 \times 0.835 \times C_{pr} \times V_{uz}$$

gde je: ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti, V_{rs} – zapremina reakcione smeše (ml), C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku (mg/ml), V_{uz} – zapremina uzorka (ml).

Aktivnost enzima GPx je izražena u jedinicama po miligramu proteina.

3.3.3.5. Merenje aktivnosti enzima glutacion reduktaze

Aktivnost enzima GR je merena po metodi Glatzle i saradnika (1974). GR katalizuje redukciju oksidovanog glutaciona uz pomoć NADPH. Oksidacija NADPH se prati merenjem promene apsorbance na 340 nm. U kivetu se dodaje 0.6 ml 0.5 M fosfatnog pufera (0.5 M K₂HPO₄ titruje se sa 0.5 M KH₂PO₄ do pH 7.4), 0.1 ml 2 mM GSSG, 0.1 ml 0.5 mM EDTA i 2 ml vode. Pre

dodavanja 0.1 ml 0.1 mM NADPH, čijim dodavanjem otpočinje reakcija, dodaje se i uzorak (5, 10, 15 μ l). Kao blank je korišćen fosfatni pufer. Optimalna temperatura reakcije je 37 °C. Praćena je promena apsorbance u toku 3 minuta, a aktivnost se izračunava pomoću jednačine:

$$\text{specifična aktivnost} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000 \times V_{rs} / 6.22 \times C_{uz} \times V_{uz}$$

gde je: ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti (0.004-0.01), ΔA_{bl} – srednja promena apsorbance blanka u minuti (0.0011-0.0012), V_{rs} – zapremina reakcione smeše (ml), C_{uz} – koncentracija proteina u uzorku (mg/ml), V_{uz} – zapremina uzorka (ml), 6.22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH.

Aktivnost enzima GR je izražena u jedinicama po miligramu proteina (nM NADPH/min/mg prot).

3.4. Metoda određivanja kateholamina u tkivu

Tkivo moždanih struktura prefrontalnog korteksa i hipokampusa homogenizovano je u 0,01 N HCl u prisustvu EDTA i Na-metabisulfita. Pod ovakvim uslovima kateholamini su naelektrisani pozitivno, što umanjuje mogućnost vezivanja proteina i optimizuje njihovu rastvorljivost. Za određivanje koncentracije kateholamina u pomenutom tkivu korišćen je komercijalni kit 3-CAT Research ELISA kits BA E-5600 (Labor Diagnostica Nord, Nordhorn, Germany). Vrednost apsorbancije rastvora očitana je u roku od 10 minuta korišćenjem aparata Microplate reader Stat Fax 2100 na 450 nm, a referentna vrednost je merena u opsegu od 620-650 nm. Vrednosti su izražene kao ng kateholamina u g tkiva.

3.5. Metoda određivanja adrenokortikotropnog hormona u plazmi

ACTH u plazmi je meren hemiluminiscentnom metodom uz pomoć automatskog analizatora Immulite Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA. U.S.A. Krv je sakupljana u posebne epruvete sa EDTA i centrifugirana 10 min na 3500 obrtaja na +4 °C. Uzorak je stavljen u serumsku čašicu analizatora, a na nju je stavljena reakciona čašica. U reakcionoj čašici nalazi se anti ACTH antitelo sa puferom. Nakon toga u frižideru aparata, u reakcionu čašicu, dodata su dva reagensa LACA (proteinski pufer/serum) i LACB (alkalna

fosfataza). Poslednji reagens koji je dodavan je hemiluminiscentni supstrat. Nakon toga, aparat je očitavao vrednost ACTH u pg ACTH/ml seruma.

3.6. Metoda određivanja kortikosterona u plazmi

Krv je sakupljena u epruvete i ostavljena da koaguliše na sobnoj temperaturi 30 min, nakon čega je centrifugirana 15 min na 3000 rpm (Heraus centrifuga). Dobijeni serum su čuvani na -20 °C do merenja. Koncentracija kortikosterona u serumu je određena esejem specifičnim za pacovski serum (OCTEIA EIA kit, Immunodiagnostic Systems Inc.). To je kompetitivni ELISA esej u kome je poliklonsko antitelo na kortikosteron vezano za unutrašnju površinu mikrotitar ploče. Kalibratori (standardi), kontrolni uzorci i razblaženi uzorci nepoznate koncentracije kortikosterona su nanošeni na ploču u duplikatu i inkubirani preko noći na 2-8 °C sa antitelom koje je konjugovano sa HRP. Ploča se zatim tri puta sukcesivno ispira i dodaje se hromogeni supstrat tetrametilbenzidin (TMB) koji dovodi do razvijanja boje. Enzimska reakcija se prekida dodavanjem STOP rastvora (0.5 M HCl), nakon čega se očitava apsorbancu na 450 nm i 650 nm (650 nm je korekciona OD) na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, Perkin Elmer). Intenzitet razvijene boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji kortikosterona u uzorku. Vrednosti koncentracije CORT su očitane sa semilogaritamske standardne krive i izražene u ng/ml.

3.7. Metoda određivanja glukoze u krvi

Koncentracija GLU u krvi određena je pomoću komercijalnih traka za merenje GLU (Accutrend strips). Na traku se nanosi po 10 µl krvi odmah po žrtvovanju pacova i koncentracija glukoze se automatski očitava sa Accutrend aparata (Accutrend GCT Reader; Roche, Mannheim, Germany).

3.8. Metode za praćenje promena u ponašanju eksperimentalnih životinja

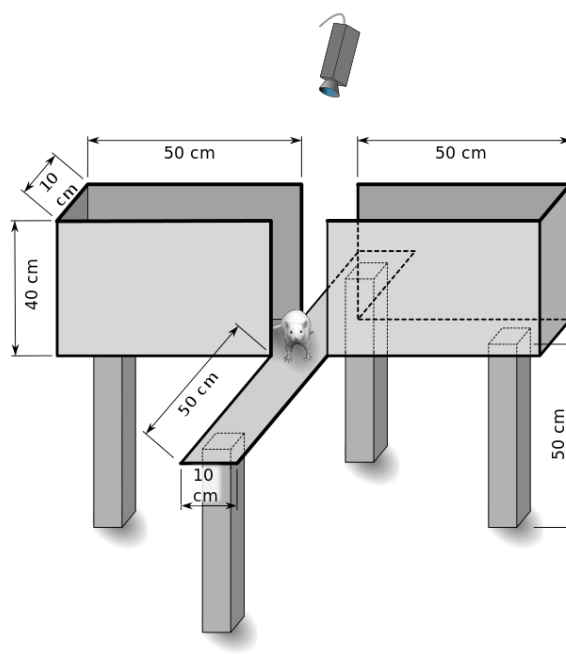
Testovi ponašanja rađeni su da bi se utvrdilo da li ponavljani stres fizičkog sputavanja izaziva promene u ponašanju eksperimentalnih životinja, koje su nalik na anksiozno i depresivno

ponašanje i da li tretman litijumom moduliše eventualne promene u ponašanju izazvane stresom. U tu svrhu korišćeni su test za analizu anksioznog ponašanja i test za analizu depresivnog ponašanja. Oba testa izvođena su tokom dana, u periodu između 9-12 h u zatamnjenoj prostoriji. Životinje su 1 h pre testiranja prebačene u prostoriju gde su izvođeni testovi ponašanja. Testiranje je izvođeno u sobi sa kontrolisanom temperaturom, bukom i osvetljenjem.

3.8.1. Test izdignutog plus lavirinta („Plus maze test“)

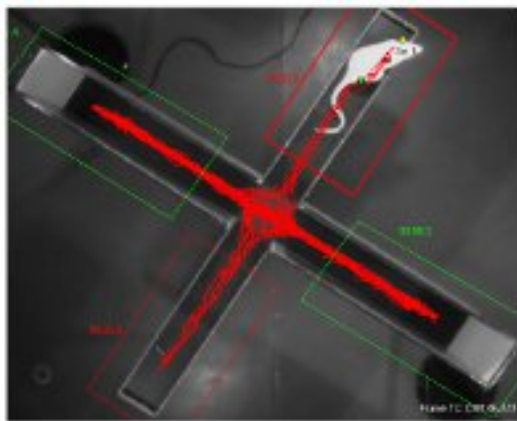
Test izdignutog plus lavirinta se koristi za procenu anksioznog ponašanja životinja (Walf i Frye 2007). Pacovi i miševi prirodno izbegavaju jako osvetljena, nepoznata mesta i otvoren prostor, tako da okruženje koje im je ponuđeno u ovom testu (otvoreni krakovi) za njih predstavlja anksiogeni stimulus, što omogućava eksperimentatoru da merenjem vremena koje životinja provede u zatvorenim krakovima lavirinta odredi da li se životinja ponaša anksiozno.

Improvizovana aparatura koja je korišćena za ovaj test se sastoji od 4 kraka izdignutih na platformu visine 50 cm. Dva naspramna kraka dimenzija 50 x 10 cm su otvorena, a druga dva istih dimenzija imaju zidove visine 50 cm (Slika 4). Životinja se postavlja u centar platforme tako da bude okrenuta otvorenom kraku, nakon čega se započinje snimanje kamerom u trajanju od 5 minuta (Slika 5, preuzeta sa <http://www.biobserve.com>).



Slika 4. Izdignuti plus lavirint (slika preuzeta sa <https://en.wikipedia.org>).

U testu su praćeni sledeći elementi ponašanja: ukupan broj ulaza (kada je životinja sa 3 šape u kraku), broj ulaza u otvorena i zatvorena polja lavirinta, kao i vreme koje životinja provodi u otvorenim poljima lavirinta. Posle svakog testiranja prostor za testiranje je očišćen rastvorom 90% etanola. Video snimke pojedinačnih testiranja analizirani su subjektivnom metodom od strane dva eksperimentatora.



Slika 5. Kretanje pacova po plus lavirintu snimljeno infracrvenom kamerom

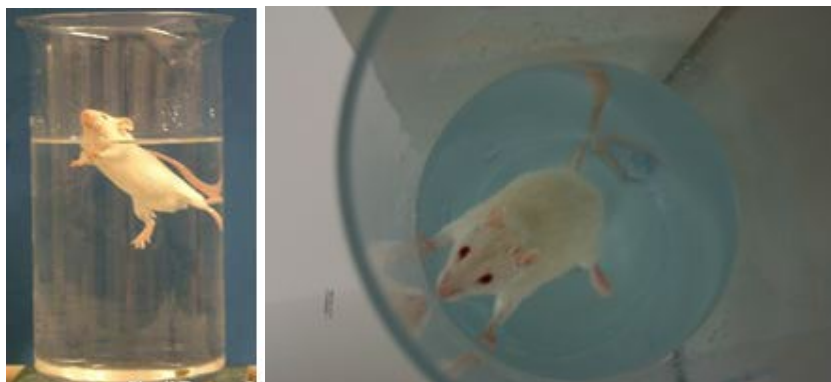
Na osnovu vremena provedenog u otvorenom polju, broju ulazaka u otvoreno polje i broju ukupnih ulazaka izračunali smo indeks anksioznosti za svaku eksperimentalnu grupu.

$$\text{INDEKS ANKSIOZNOSTI} = 1 - \left[\frac{\text{vreme provedeno u otvorenom polju} / 5 \text{ min} + \text{broj ulazaka u otvoreno polje} / \text{ukupan broj ulazaka}}{2} \right]$$

3.8.2. Test forsiranog plivanja („Forced swimming test“)

Test forsiranog plivanja se smatra standardnim testom za praćenje ponašanja koje je nalik depresivnom ponašanju (eng. depressive-like behavior). Ovaj test po metodi Porsolta (Porsolt i saradnici, 1977) rađen je jedan dan nakon testiranja u izdignutom plus lavirintu. Životinje su unešene u sobu za testiranje 30 minuta pre početka testa. Improvizovana aparatura koja je korišćena predstavlja cilindar od pleksiglasa (visine 50 cm i prečnika 20 cm), koji je napunjen vodom temperature 24.0 ± 0.5 °C, do visine od 30 ± 1.5 cm (Slika 6). Životinja je spuštana u cilindar sa vodom gde joj je dozvoljeno da pliva u uslovima u kojima izlazak iz cilindra nije moguć u trajanju od 5 minuta. Nakon svakog testiranja cilindar je očišćen i napunjen svežom

vodom, jer je pokazano da korišćenje vode u kojoj je prethodno plivala druga životinja menja njihovo ponašanje.



Slika 6. Test forsiranog plivanja u cilindru od pleksiglasa (slika preuzeta sa <http://scicurious.scientopia.org>).

Svako pojedinačno testiranje je snimano u zamračenoj sobi video kamerom iznad cilindra, a snimak je naknadno analiziran na isti način kao i test izdignutog plus lavirinta. Sa snimka je određena učestalost jednog od tri dominantna ponašanja: nepokretnost, plivanje ili penjanje. Nepokretnost je definisana kao izostanak pokreta celog tela, osim malih pokreta, neophodnih da životinja održi glavu iznad vode, plivanje kao namerno horizontalno kružno kretanje životinje po cilindru, po površini vode, a pod penjanjem se podrazumevaju intenzivni pokreti šapama po površini vode ili uz zid cilindra, gde životinja pokušava da izađe iz cilindra. Naši rezultati fokusirani su na broju i trajanju nepokretnosti. Trajanje nepokretnosti izraženo je u procentima (%).

3.9. Statistička analiza rezultata

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška. Rezultati eksperimenta analizirani su statistički, primenom analize varijanse (ANOVA 1) sa ciljem da se utvrdi da li postoje razlike između srednjih vrednosti različitih eksperimentalnih grupa. „Post-hoc“ analizom utvrđen je efekat svih tretmana u odnosu na intaktne kontrole i kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom, kao i efekat jednog tretmana u odnosu na drugi tretman korišćenjem „Tukey“ testa. Za graničnu značajnost uzimane su vrednosti $p < 0.05$; $p < 0.01$ i $p < 0.001$. Step

povezanosti nivoa proteina sa nivoima aktivnosti enzima, kao i sa nivoima neurotransmitera, analiziran je „Pearson“ testom.

4. REZULTATI

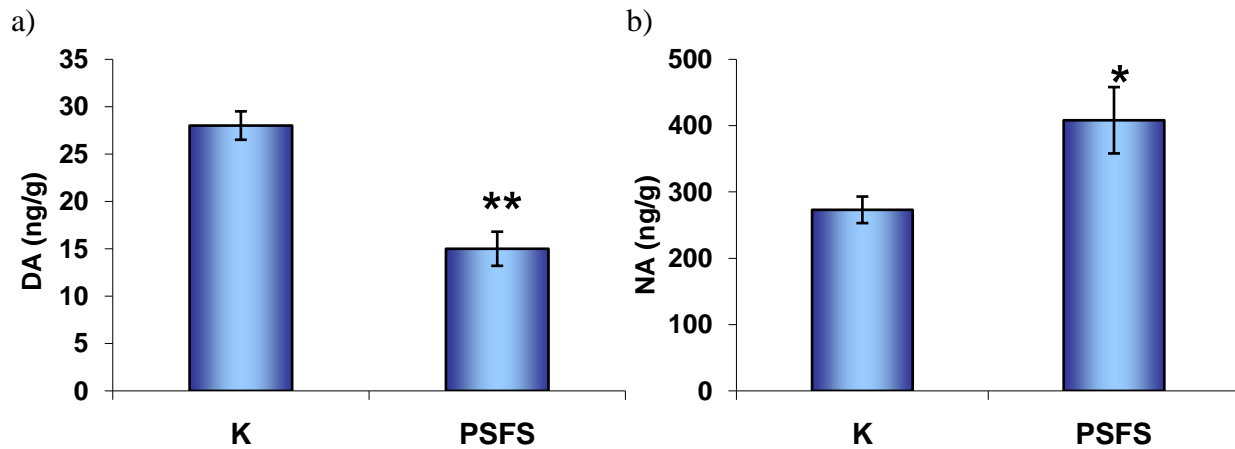
U ovim eksperimentima merena je koncentracija neurotransmitera (DA i NA), ekspresija enzima koji učestvuju u biosintezi neurotransmitera (TH i DBH), ekspresija dopaminskih i noradrenalinskih transportera (DAT, NET i VMAT 2), aktivnost i količina enzima koji učestvuju u razgradnji neurotransmitera (MAO A, MAO B i COMT), ekspresija antioksidativnih enzima (SOD 1, SOD 2, CAT, GPx i GR), kao i ekspresija transkripcionog faktora BDNF u prefrontalnom korteksu i hipokampusu intaktnih pacova, pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS), kontrolnih pacova svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F) u trajanju od 14 dana, pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) u trajanju od 14 dana, pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). Takođe, u ovim eksperimentima merena je koncentracija ACTH, CORT i GLU u plazmi svih ispitivanih grupa i testirano je ponašanje eksperimentalnih životinja na osnovu čega je izračunavan indeks anksioznosti i procenat nepokretnosti.

4.1. Delovanje litijuma na koncentraciju dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

4.1.1. Uticaj ponavljanoг stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na koncentraciju dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

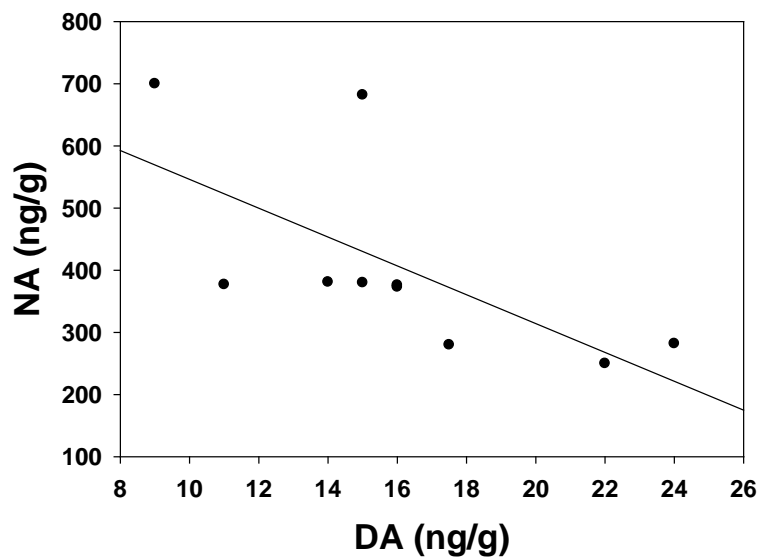
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja koncentracije DA ($p < 0.01$) i NA ($p < 0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da u prefrontalnom korteksu, PSFS smanjuje koncentraciju DA (sl. 7a.), a povećava koncentraciju NA (sl. 7b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS koncentracija DA manja za 47% ($p < 0.01$,

Tukey test), dok je koncentracija NA veća za 49% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 7. Koncentracija a) DA (ng/g) i b) NA (ng/g) u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p < 0.05$, $p < 0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

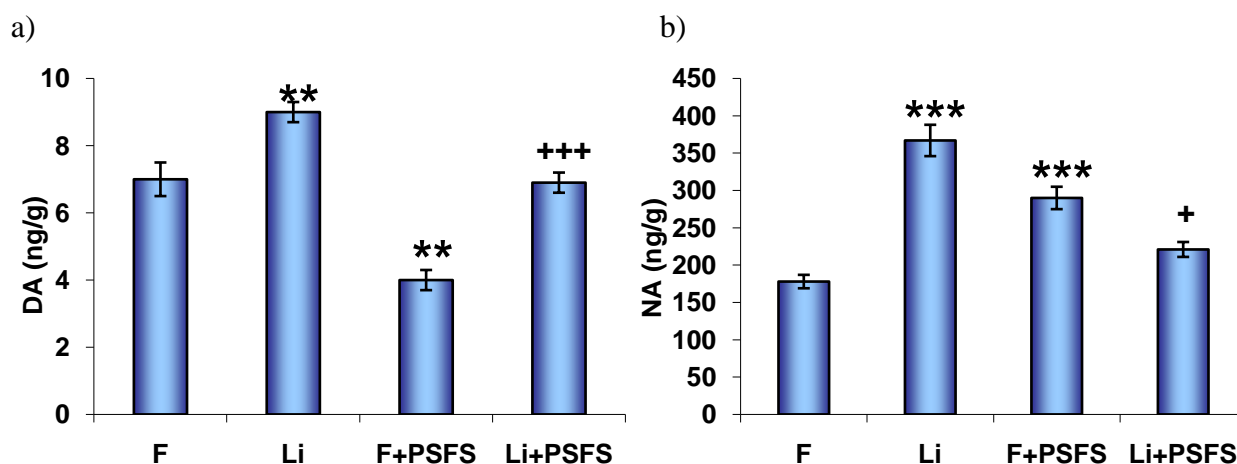
Na slici 8., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 8. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R = -0.664$; $p < 0.05$.

4.1.2. Delovanje litijuma na koncentraciju dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

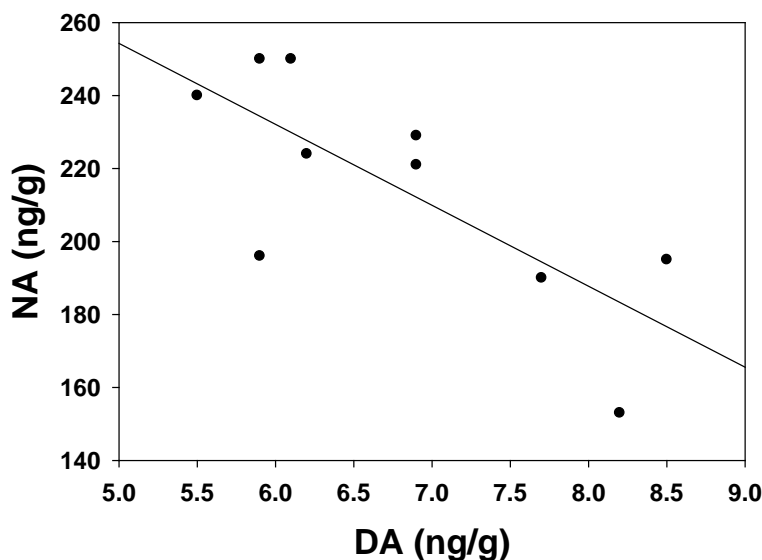
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja koncentracije DA ($p < 0.001$) i NA ($p < 0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS koncentracija DA smanjena (sl. 9a.), dok je koncentracija NA (sl. 9b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS vraća količine DA i NA na kontrolne vrednosti. Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) koncentracija DA veća za 28% ($p < 0.01$, Tukey test), dok je koncentracija NA veća za 106% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Međutim, kod pacova izlaganih F+PSFS koncentracija DA je manja za 43% ($p < 0.01$, Tukey test), dok je koncentracija NA veća za 62% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava koncentraciju DA za 72% ($p < 0.001$, Tukey test), a koncentraciju NA smanjuje za 24% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 9. Koncentracija a) DA (ng/g) i b) NA (ng/g) u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F),

statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

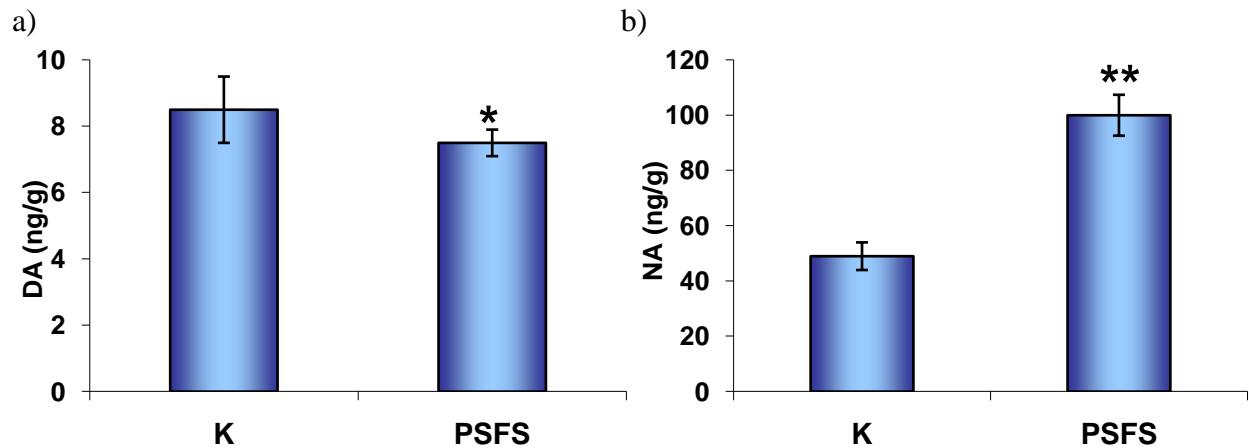
Na slici 10., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 10. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R = -0.749$; $p < 0.05$.

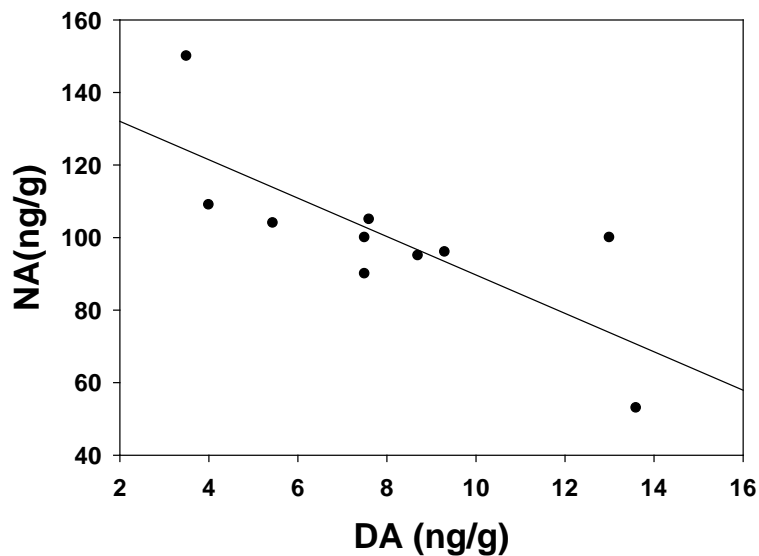
4.1.3. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na koncentraciju dopamina i noradrenalina u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

Na slici 11., može se uočiti da PSFS u hipokampusu utiče na smanjenje koncentracije DA (sl. 11a.) i povećanje koncentracije NA (sl. 11b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja koncentracije DA ($p < 0.05$) i NA ($p < 0.01$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS koncentracija DA manja za 12% ($p < 0.05$, Tukey test), dok je koncentracija NA veća za 104% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 11. Koncentracija a) DA (ng/g) i b) NA (ng/g) u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^*<0.05$, $p^{**}<0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

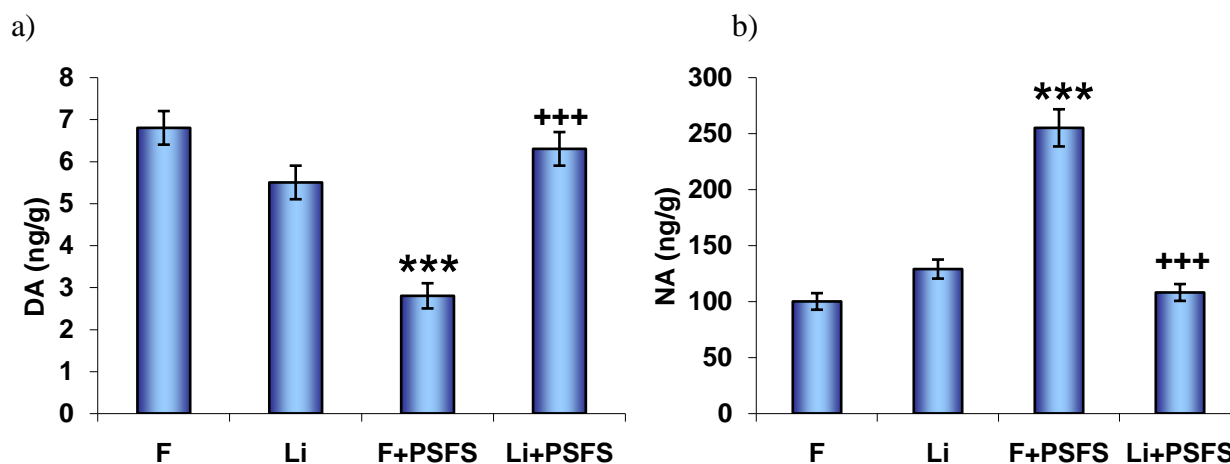
Na slici 12., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 12. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.758$; $p<0.05$.

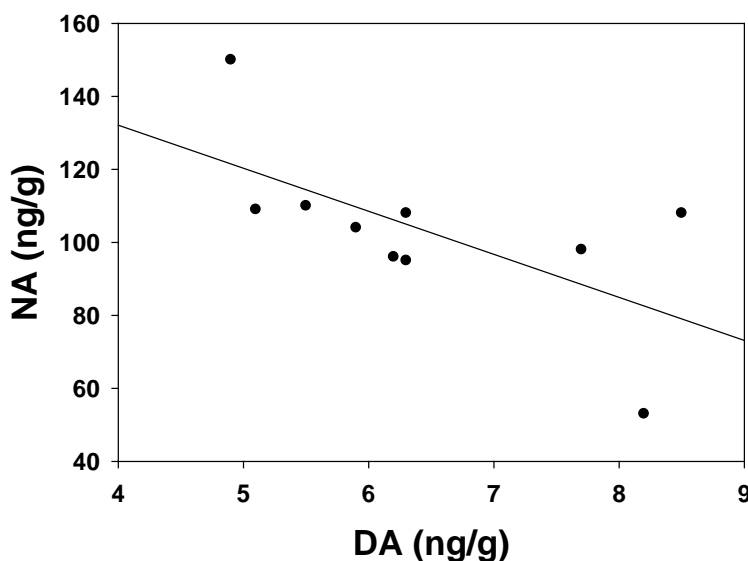
4.1.4. Delovanje litijuma na koncentraciju dopamina i noradrenalina u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Dobijeni rezultati pokazuju da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS koncentracija DA smanjena (sl. 13a.), dok je koncentracija NA (sl. 13b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS vraća količine DA i NA na kontrolne vrednosti. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja koncentracije DA ($p < 0.001$) i NA ($p < 0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih F+PSFS koncentracija DA manja za 59% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je koncentracija NA veća za 150% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava koncentraciju DA za 125% ($p < 0.001$, Tukey test), dok koncentraciju NA smanjuje za 58% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 13. Koncentracija a) DA (ng/g) i b) NA (ng/g) u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

Na slici 14., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.

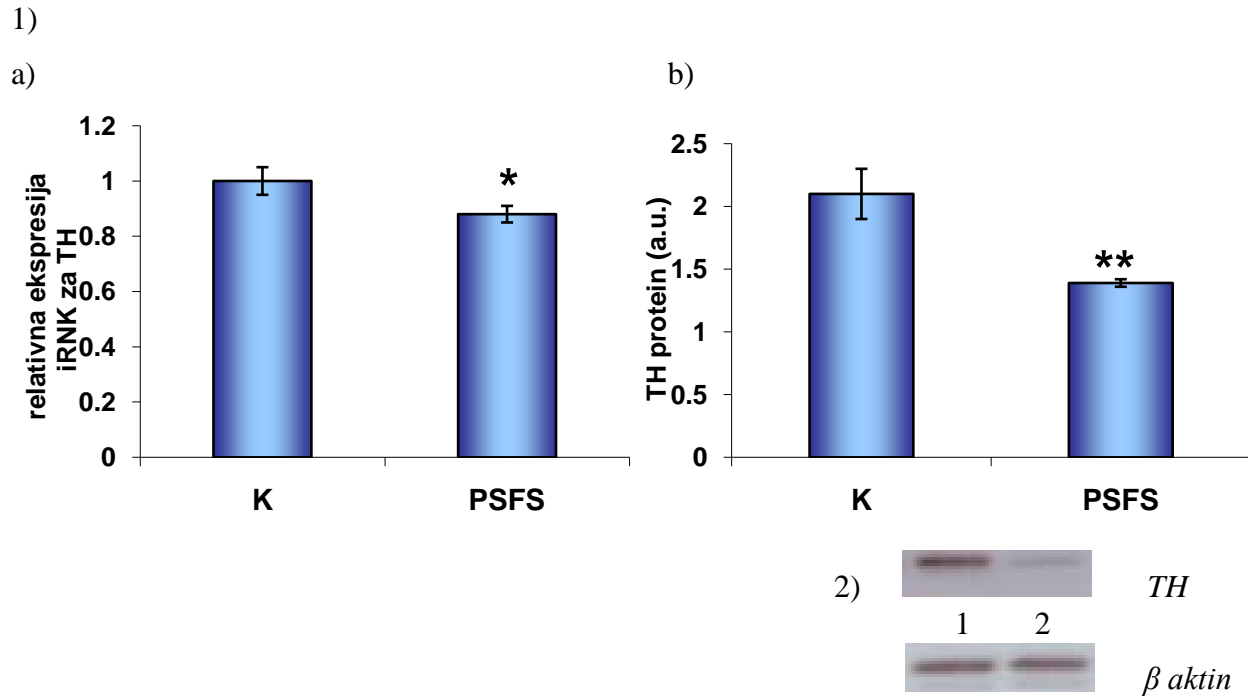


Sl. 14. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.633$; $p < 0.05$.

4.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime koji učestvuju u biosintezi kateholamina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

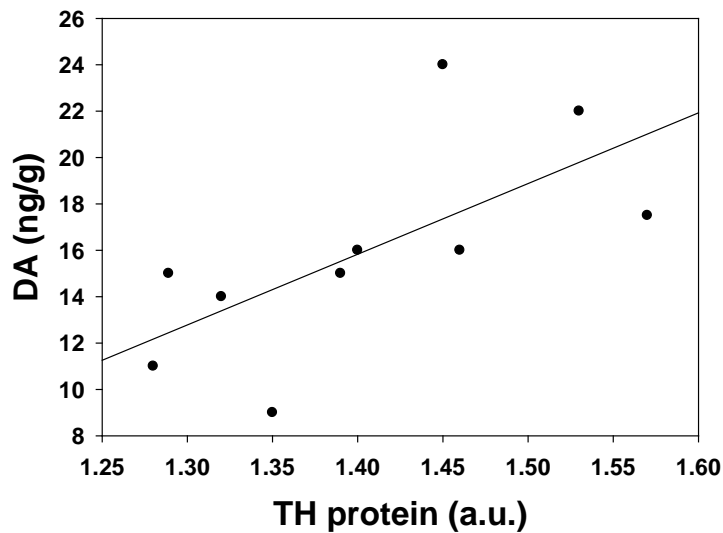
4.2.1. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za TH ($p < 0.01$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS smanjuje nivo iRNK za TH (sl. 15a.) i smanjuje količinu TH enzima (sl. 15b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za TH manji za 12% ($p < 0.05$, Tukey test), a da je količina TH enzima manja za 34% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 15. 1) Ekspresija gena za TH [a) nivo iRNK za TH; b) nivo enzima TH] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

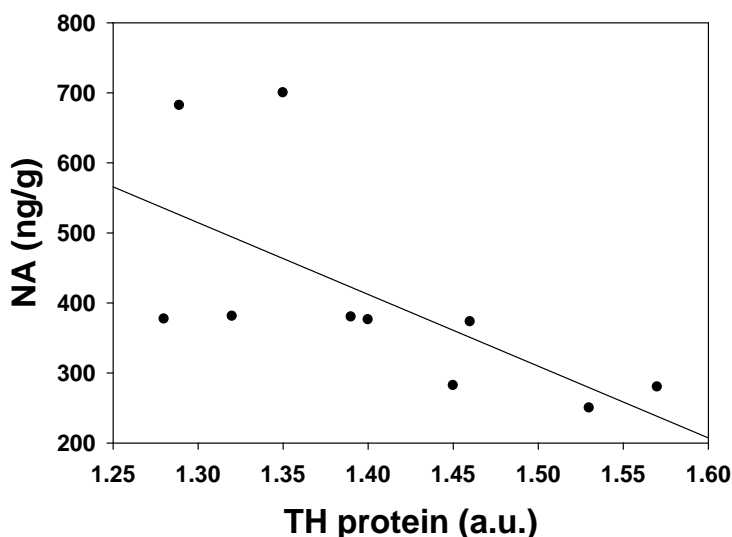
2) Sadržaj TH enzima meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).



Sl. 16. Pozitivna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.668$; $p < 0.05$.

Na slici 16., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.

Na slici 17., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 17. Negativna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.642$; $p<0.05$.

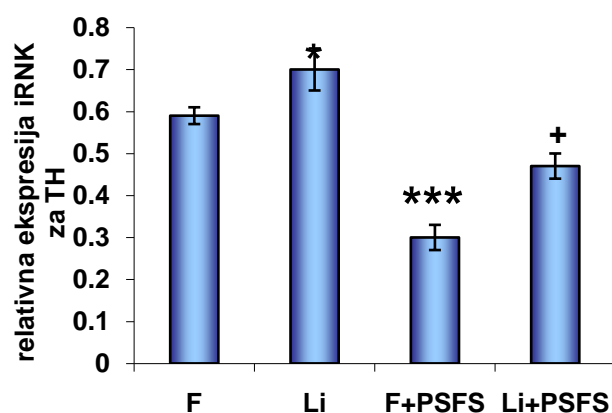
4.2.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za TH ($p<0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da su u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za TH (sl. 18a.) i količina TH enzima (sl. 18b.) smanjeni u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS vraća nivo iRNK za TH i količinu TH enzima na kontrolne vrednosti. Post-hoc analiza je pokazala da su nivo iRNK za

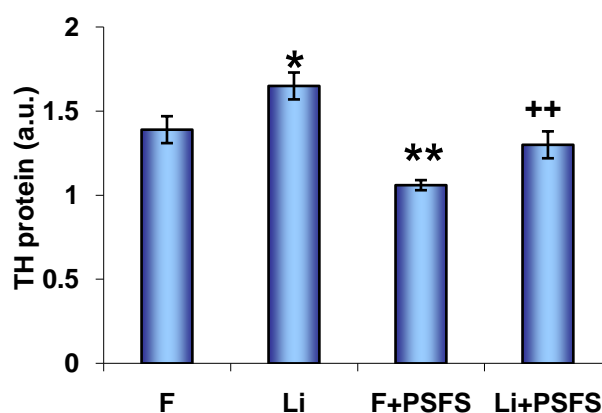
TH i količina TH enzima u prefrontalnom korteksu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) veći za 18% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za TH manji je za 67% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je količina TH enzima manja je za 24% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za TH za 56% ($p < 0.05$, Tukey test), a količinu TH enzima za 22% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

1)

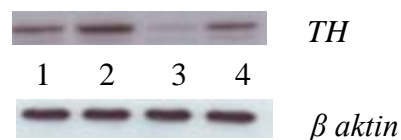
a)



b)



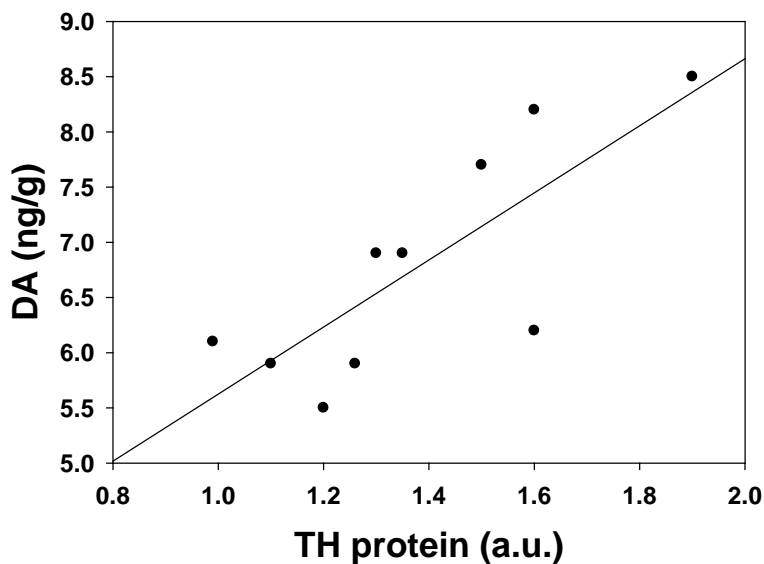
2)



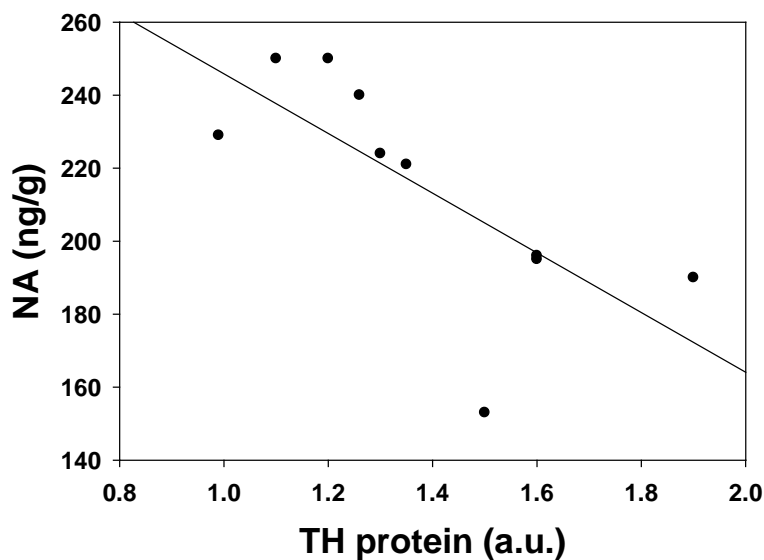
Sl. 18. 1) Ekspresija gena za TH [a) nivo iRNK za TH; b) nivo enzima TH] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{++} < 0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj TH enzima meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 19., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 19. Pozitivna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.791$; $p<0.01$.



Sl. 20. Negativna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.719$; $p<0.05$.

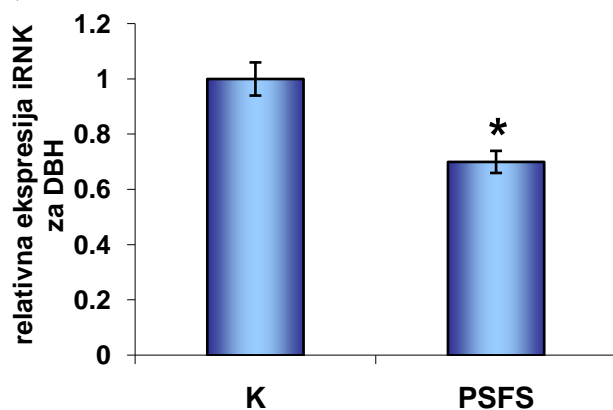
Na slici 20., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.

4.2.3. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

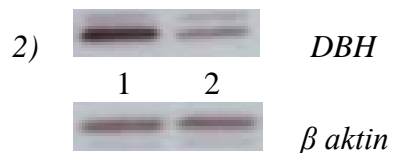
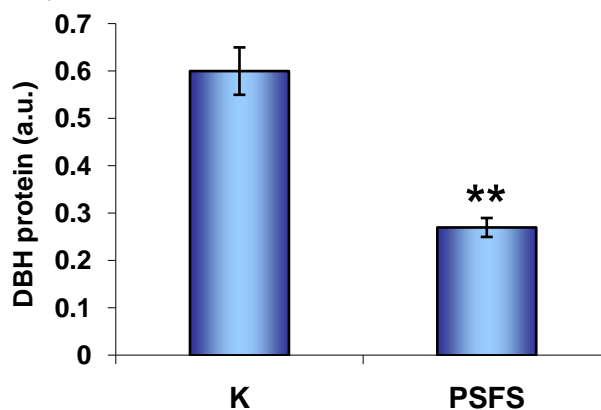
Rezultati prikazani na slici 21., predstavljaju ekspresiju gena za DBH nakon izlaganja pacova PSFS. Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS smanjuje nivo iRNK za DBH (sl. 21a.), kao i količinu DBH enzima (sl. 21b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivane grupe došlo do statistički značajnog variranja nivoa iRNK za DBH ($p < 0.05$) i količine DBH enzima ($p < 0.01$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za DBH manji za 30% ($p < 0.05$, Tukey test), a da je količina DBH enzima manja za 55% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)

a)



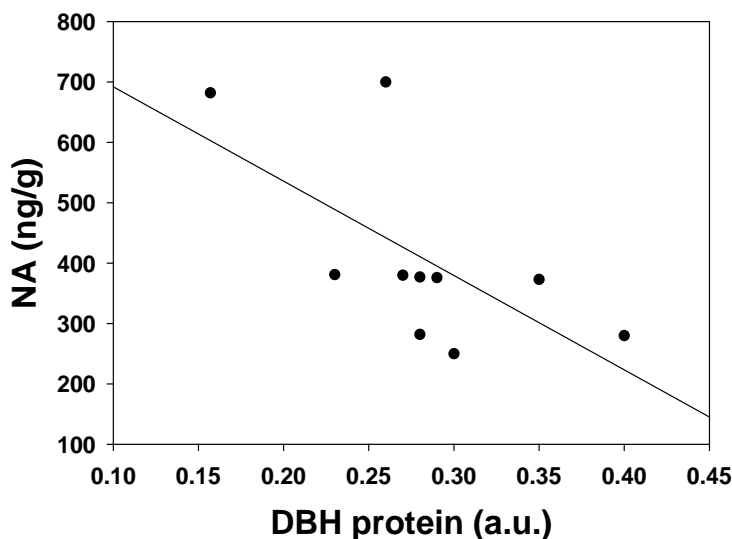
b)



Sl. 21. 1) Ekspresija gena za DBH [a) nivo iRNK za DBH; b) nivo enzima DBH] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljalom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj DBH enzima meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 22., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa DBH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.

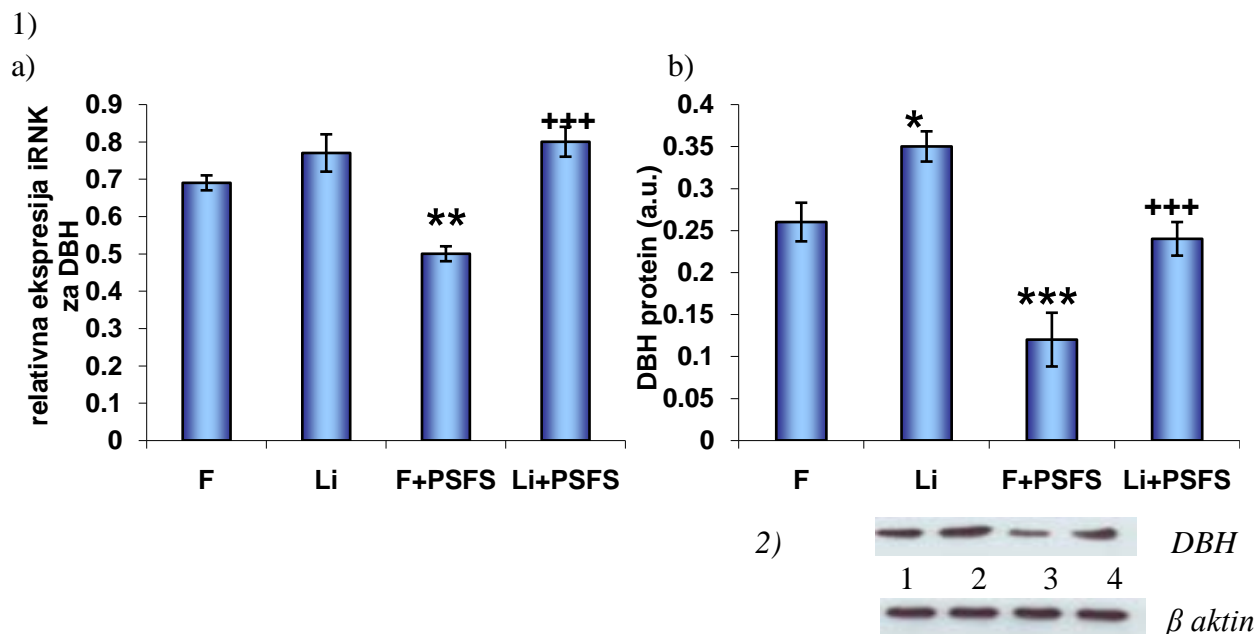


Sl. 22. Negativna korelacija u nivou sinteze DBH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $\rho=-0.645$; $p<0.05$.

4.2.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja nivoa iRNK za DBH ($p<0.001$) i količine DBH enzima ($p<0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da su u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za DBH (sl. 23a.) i količina DBH enzima (sl. 23b.) smanjeni u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS vraća nivo iRNK za DBH i količinu DBH enzima na kontrolne vrednosti. Post-hoc analiza je pokazala da je količina DBH enzima u prefrontalnom korteksu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) veća za 34% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu

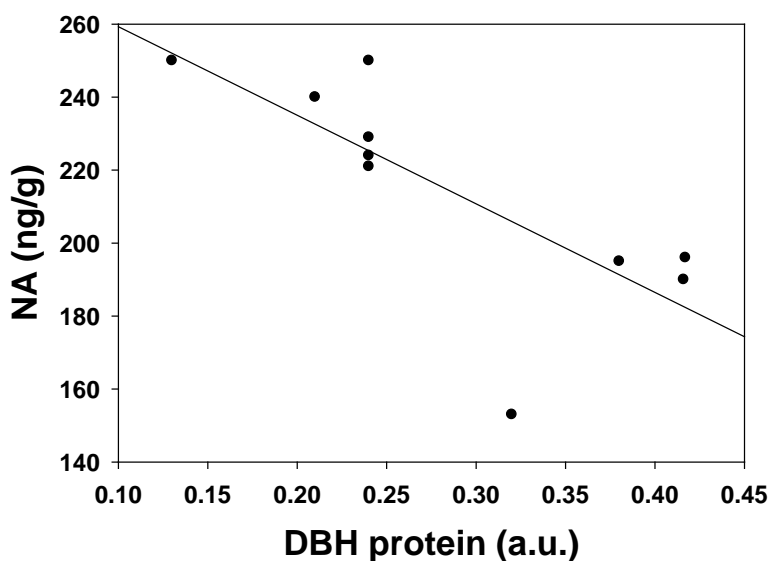
svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za DBH manji je za 28% ($p < 0.01$, Tukey test), a količina DBH enzima manja je za 54% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za DBH za 40% ($p < 0.001$, Tukey test), a količinu DBH enzima za 100% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 23. 1) Ekspresija gena za DBH [a) nivo iRNK za DBH; b) nivo enzima DBH] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj DBH enzima meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

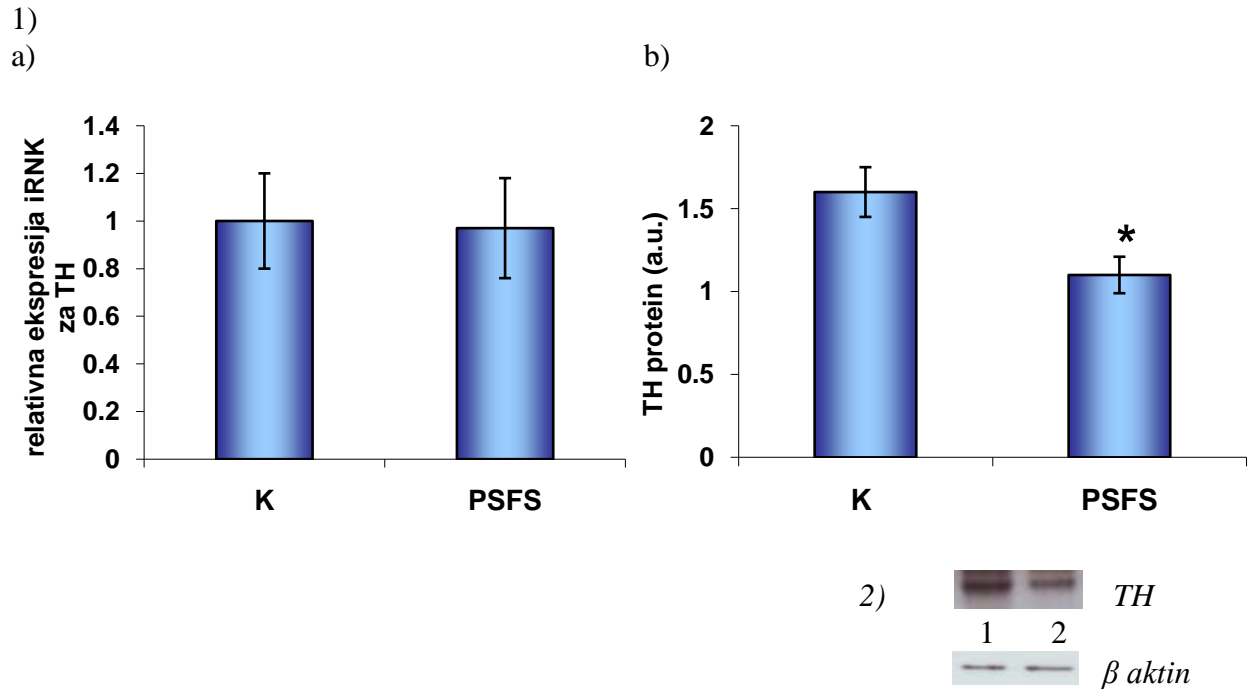
Na slici 24., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa DBH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 24. Negativna korelacija u nivou sinteze DBH enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.751$; $p<0.05$.

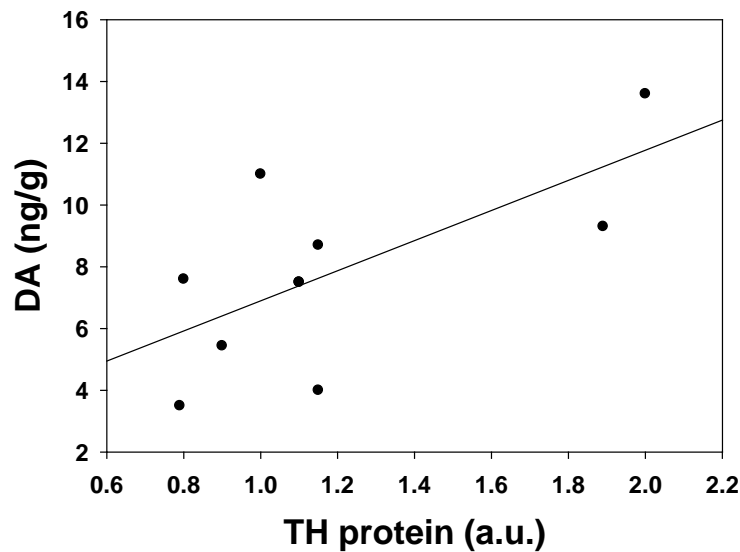
4.2.5. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenje količine TH enzima (sl. 25b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivane grupe došlo do statistički značajnog variranja količine TH enzima ($p<0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS količina TH enzima manja za 32% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 25. 1) Ekspresija gena za TH [a) nivo iRNK za TH; b) nivo enzima TH] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. (n=10). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

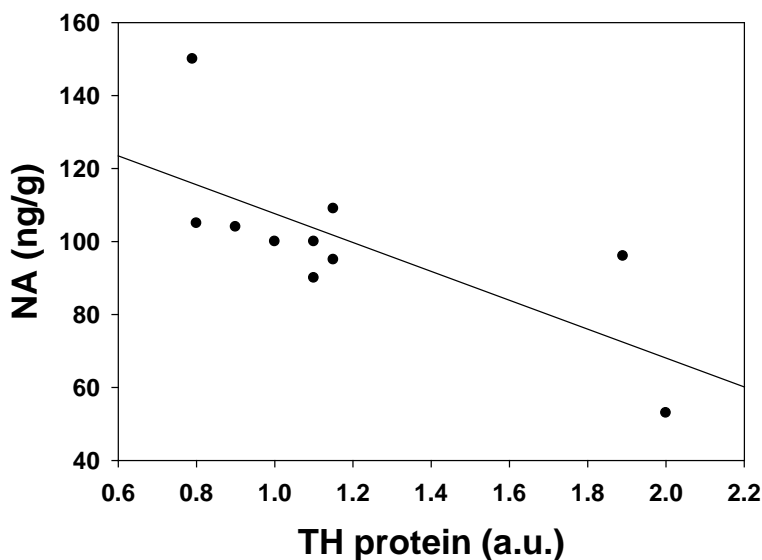
2) Sadržaj TH proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).



Sl. 26. Pozitivna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.666$; $p < 0.05$.

Na slici 26., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.

Na slici 27., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 27. Negativna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $\rho=-0.710$; $p<0.05$.

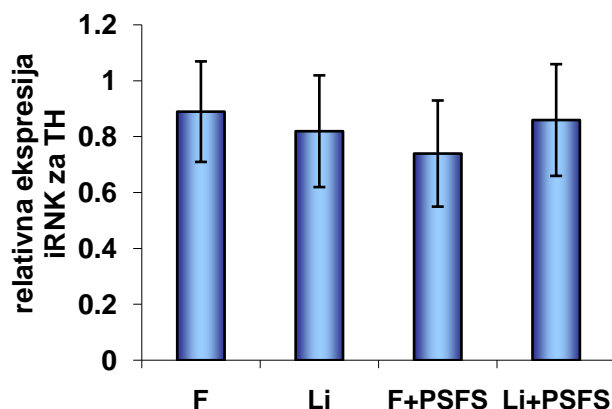
4.2.6. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za tirozin hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Na slici 28b., može se uočiti da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS količina TH enzima smanjena u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu TH enzima, odnosno vraća nivo TH enzima na kontrolnu vrednost. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine TH enzima ($p<0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je količina TH enzima u hipokampusu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) manja za 37% ($p<0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS količina TH enzima je

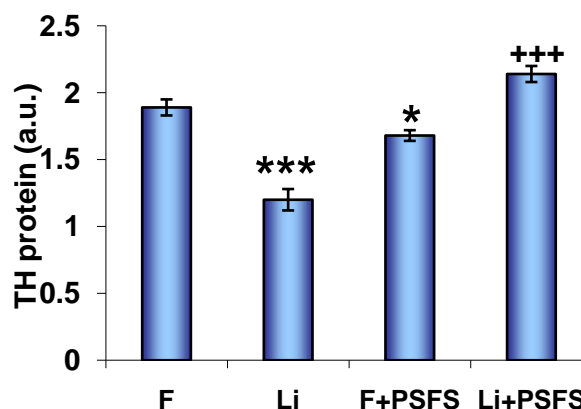
manja za 12% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu TH enzima za 26% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

1)

a)



b)



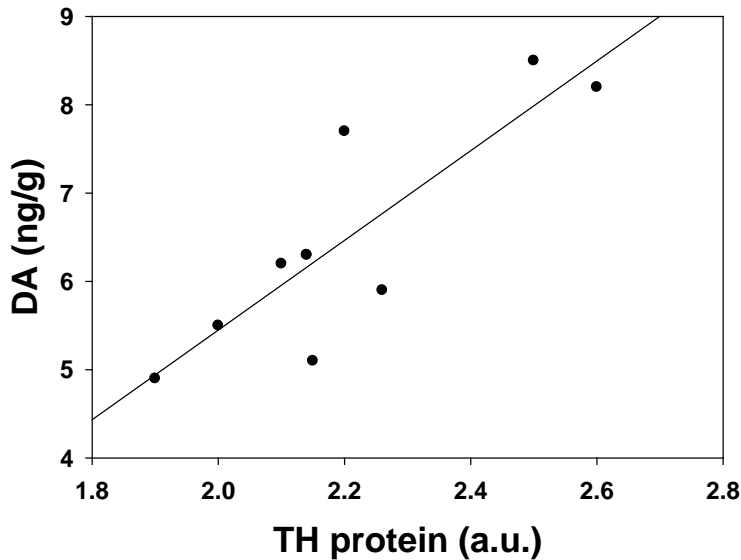
2)



Sl. 28. 1) Ekspresija gena za TH [a) nivo iRNK za TH; b) nivo enzima TH] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

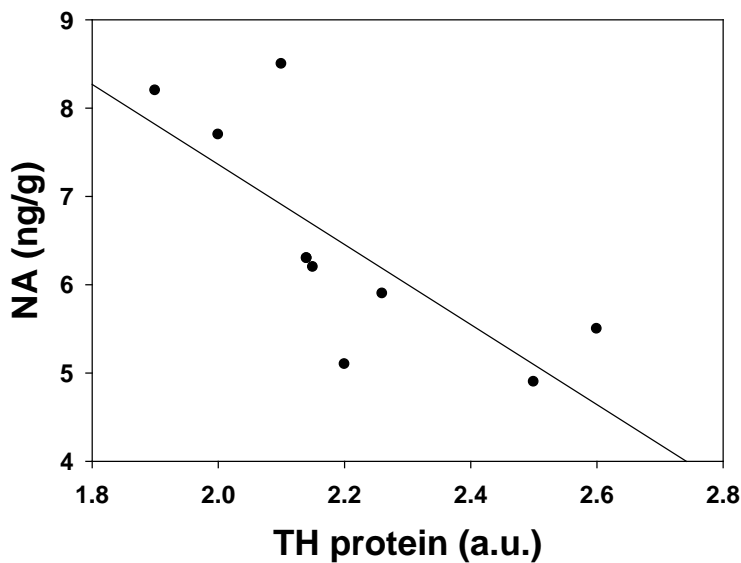
2) Sadržaj TH proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 29., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 29. Pozitivna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.851$; $p<0.01$.

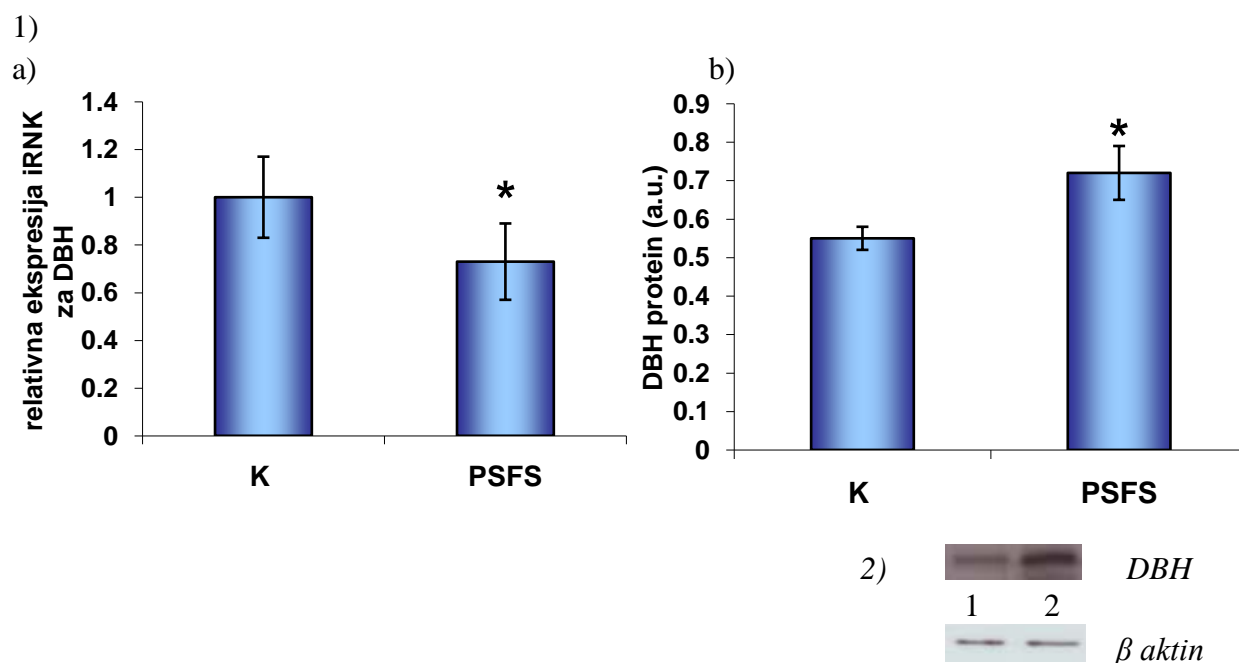
Na slici 30., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa TH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 30. Negativna korelacija u nivou sinteze TH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.759$; $p<0.05$.

4.2.7. Uticaj ponavljano σ g stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

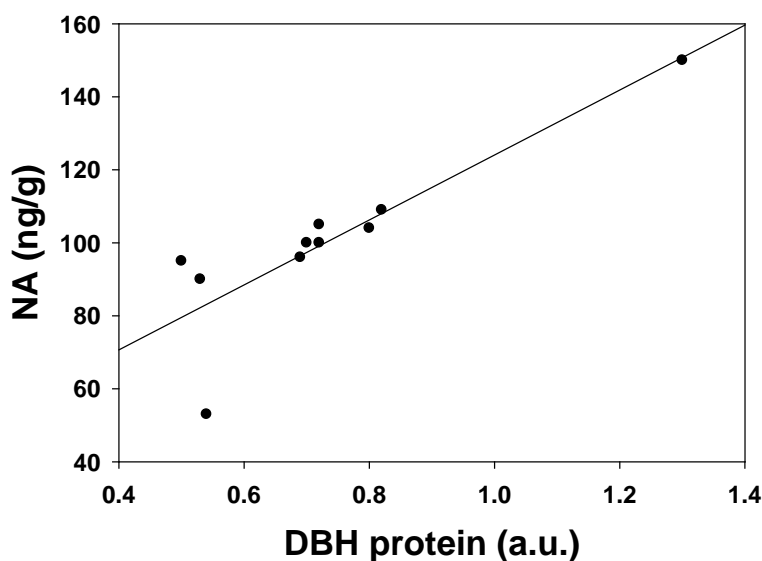
Rezultati prikazani na slici 31., predstavljaju ekspresiju gena za DBH u hipokampusu pacova izlaganih PSFS. Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenje nivoa iRNK za DBH (sl. 31a.), kao i na povećanje količine DBH enzima (sl. 31b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za DBH ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za DBH manji za 27% ($p < 0.05$, Tukey test), a da je količina DBH enzima veća za 30% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 31. 1) Ekspresija gena za DBH [a) nivo iRNK za DBH; b) nivo enzima DBH] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljano σ m stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj DBH proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljano σ m stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

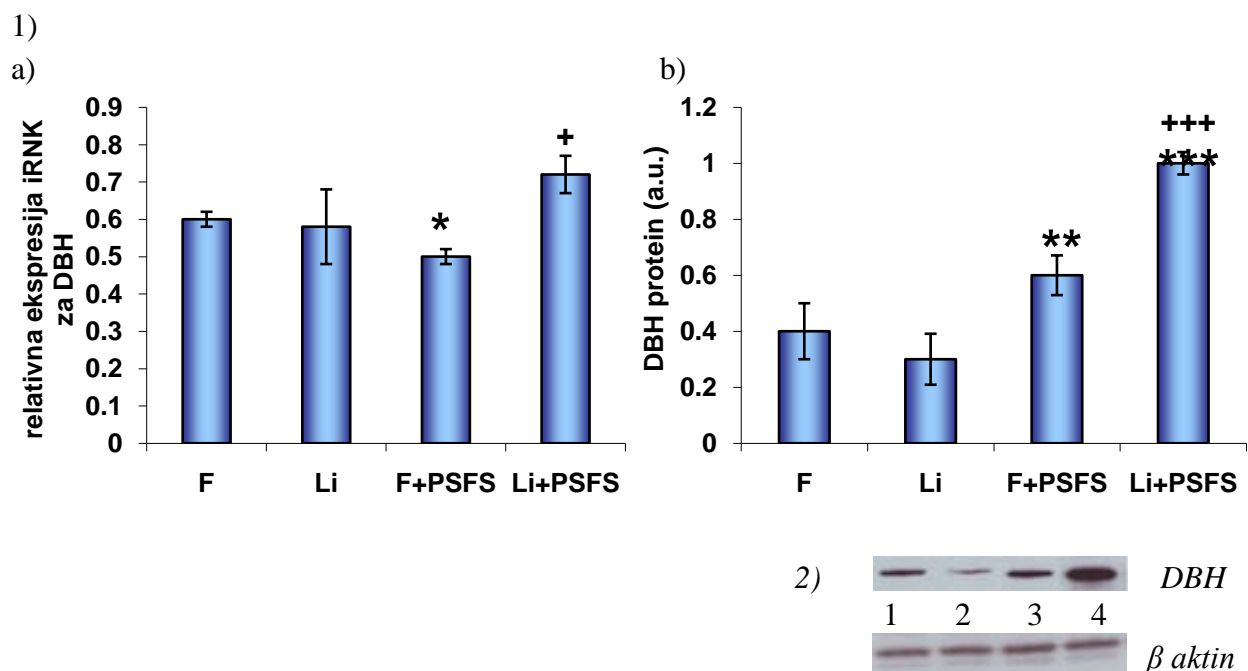
Na slici 32., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa DBH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 32. Pozitivna korelacija u nivou sinteze DBH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.865$; $p<0.01$.

4.2.8. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopamin β hidroksilazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

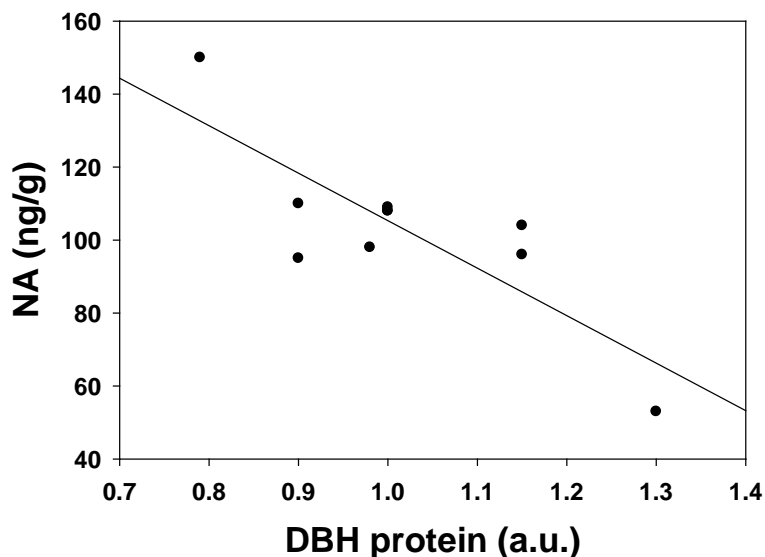
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja iRNK za DBH ($p<0.05$), kao i nivoa DBH enzima ($p<0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da su u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za DBH (sl. 33a.) smanjena, a količina DBH enzima (sl. 33b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za DBH i količinu DBH enzima. Post-hoc analiza je pokazala da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za DBH manji za 20% ($p<0.05$, Tukey test), a da je količina DBH enzima veća za 50% ($p<0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za DBH za 40% ($p<0.05$, Tukey test), a količinu DBH enzima povećava za 40% ($p<0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 33. 1) Ekspresija gena za DBH [a) nivo iRNK za DBH; b) nivo enzima DBH] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. (n=10). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj DBH proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 34., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa DBH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 34. Negativna korelacija u nivou sinteze DBH enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.817$; $p<0.01$.

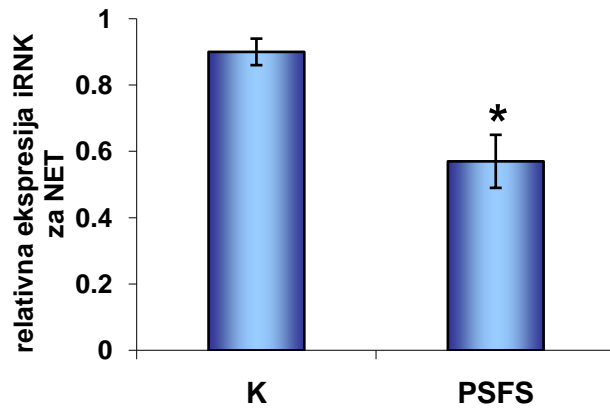
4.3. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za transportere dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

4.3.1. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za noradrenalinski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

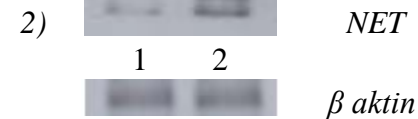
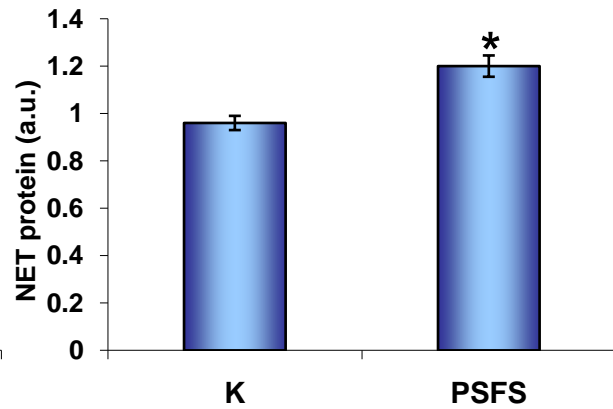
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za NET ($p<0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenje nivoa iRNK za NET (sl. 35a.), kao i na povećanje količine NET proteina (sl. 35b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za NET manji za 37% ($p<0.05$, Tukey test), a da je količina NET proteina veća za 25% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)

a)

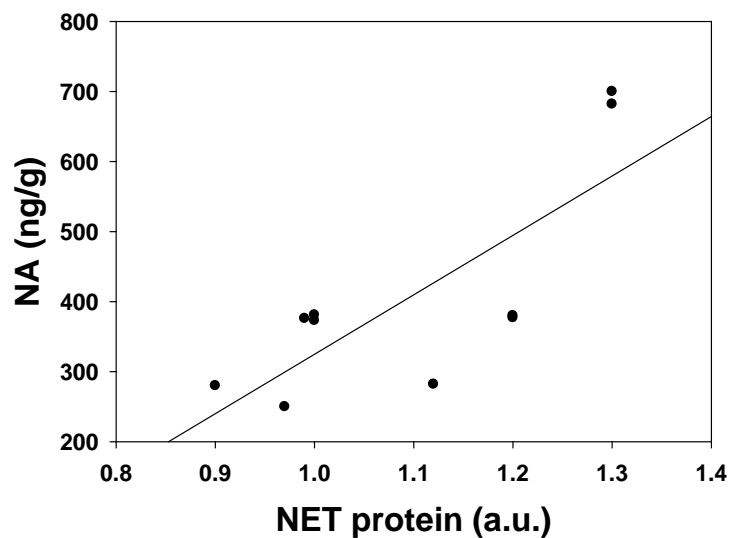


b)



Sl. 35. 1) Ekspresija gena za NET [a) nivo iRNK za NET; b) nivo proteina NET] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanoj stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj NET proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanoj stresu fizičkog sputavanja (PSFS).



Sl. 36. Pozitivna korelacija u nivou sinteze NET proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.782$; $p < 0.01$.

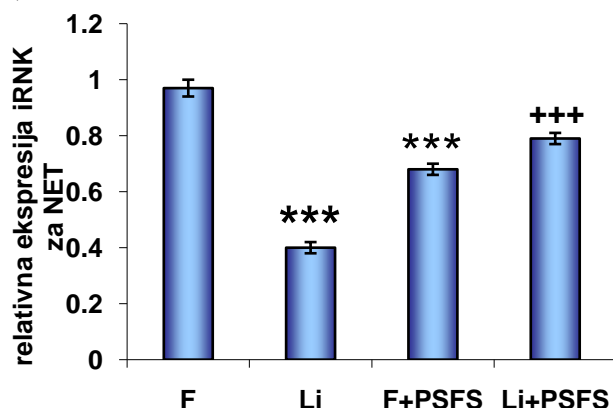
Na slici 36., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa NET proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.

4.3.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za noradrenalinski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

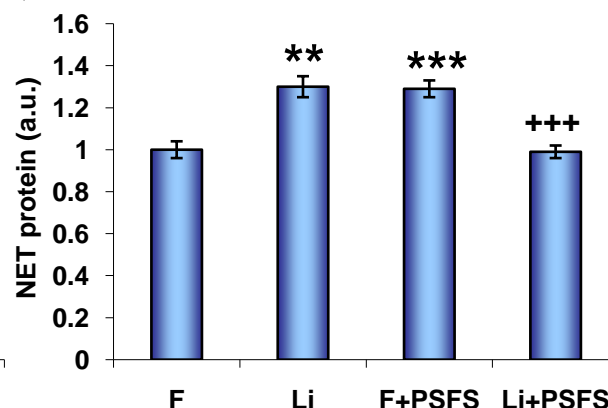
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za NET ($p < 0.001$).

1)

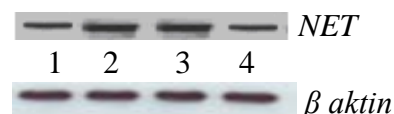
a)



b)



2)



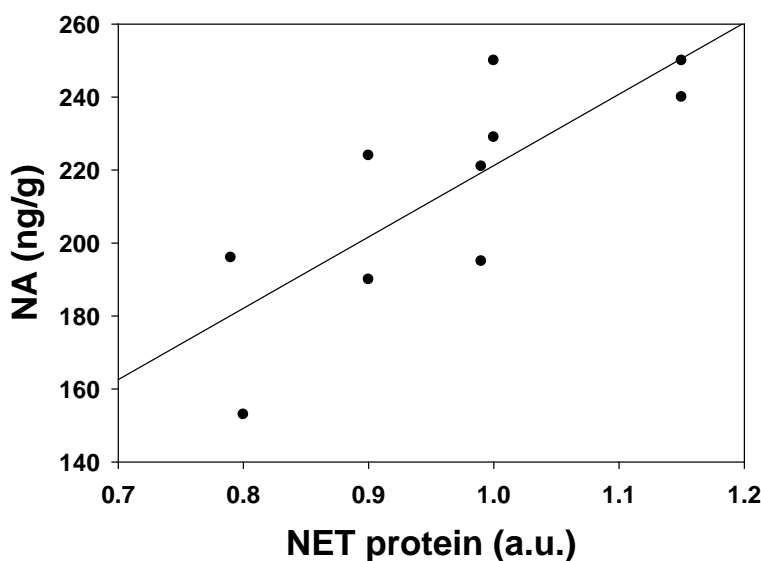
Sl. 37. 1) Ekspresija gena za NET [a) nivo iRNK za NET; b) nivo proteina NET] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj NET proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom

(F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Dobijeni rezultati pokazuju da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za NET smanjen (sl. 37a.), a da je količina NET proteina (sl. 37b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS vraća nivo iRNK za NET i količinu NET proteina na kontrolne vrednosti. Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) nivo iRNK za NET manji za 56% ($p < 0.001$, Tukey test), a da je količina NET proteina veća za 24% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za NET manji je za 30% ($p < 0.001$, Tukey test), a količina NET proteina veća je za 23% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za NET za 16% ($p < 0.001$, Tukey test), a količinu NET proteina smanjuje za 23% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

Na slici 38., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa NET proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.

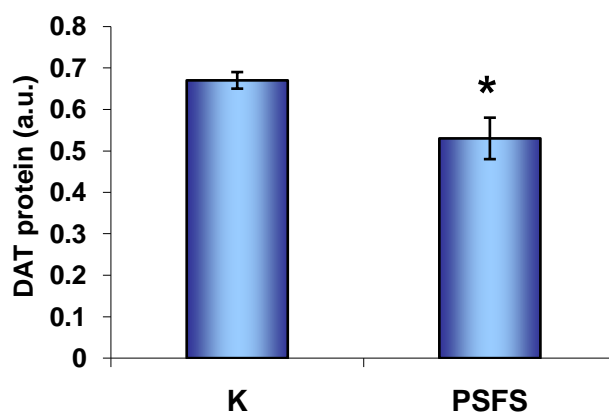


Sl. 38. Pozitivna korelacija u nivou sinteze NET proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.784$; $p < 0.01$.

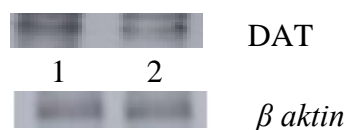
4.3.3. Uticaj ponavljano^g stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

Rezultati prikazani na slici 39., predstavljaju količinu DAT proteina u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS. Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenje količine DAT proteina u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine DAT proteina ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS količina DAT proteina manja za 26% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)



2)



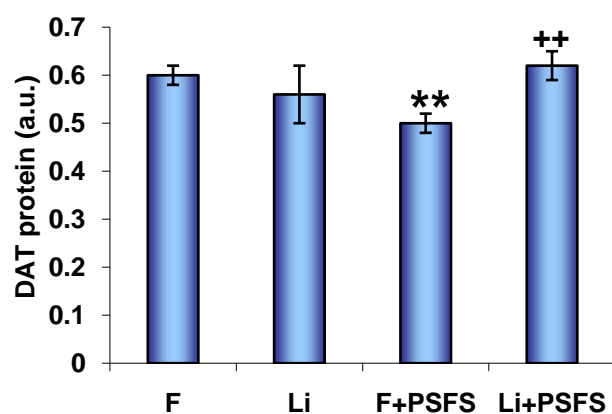
Sl. 39. 1) Nivo proteina DAT u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljano^m stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj DAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljano^m stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

4.3.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 40., može se zaključiti da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS količina DAT proteina smanjena u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu DAT protein, odnosno vraća količinu DAT na kontrolnu vrednost. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine DAT proteina ($p < 0.01$). Post-hoc analiza pokazala je da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS količina DAT proteina manja za 20% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu DAT proteina za 21% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

1)



2)

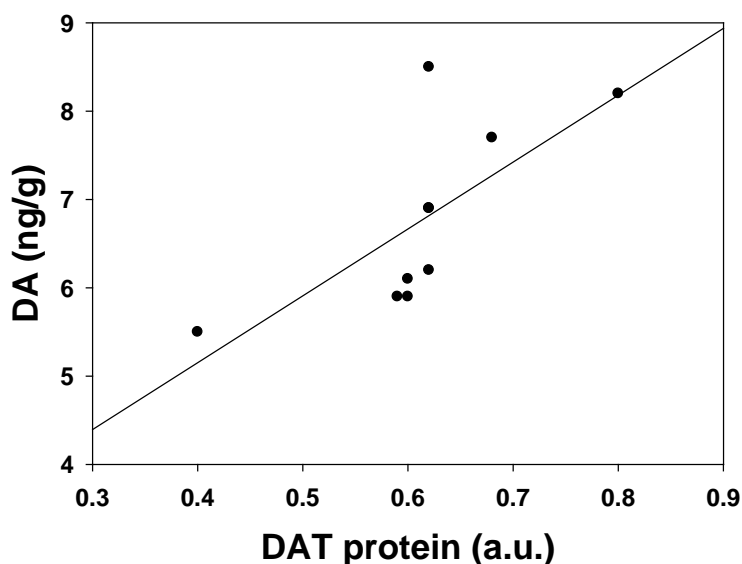


Sl. 40. 1) Nivo proteina DAT u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost

$p^{++} < 0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj DAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 41., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa DAT proteina i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.

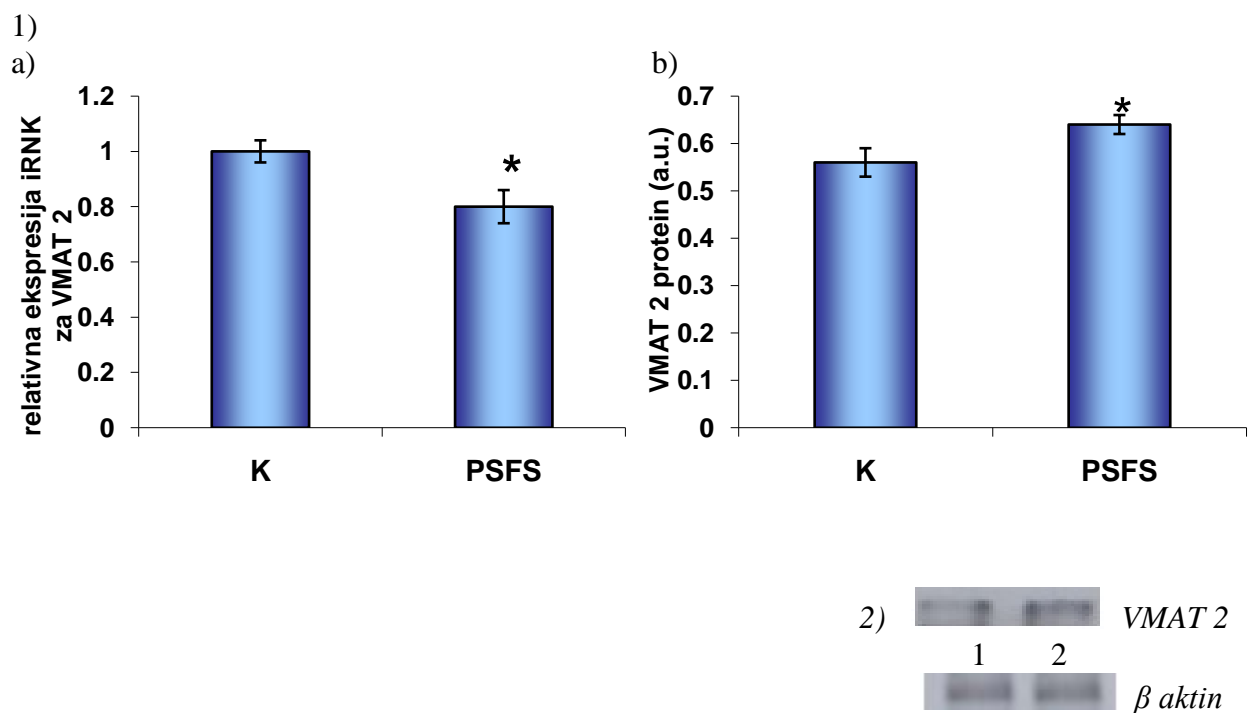


Sl. 41. Pozitivna korelacija u nivou sinteze DAT proteina i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.707$; $p<0.05$.

4.3.5. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

Dobijeni rezultati pokazuju da pacovi izlagani PSFS u prefrontalnom korteksu imaju smanjen nivo iRNK za VNAT 2 (sl. 42a.), a povećanu količinu VMAT 2 proteina (sl. 42b.) u

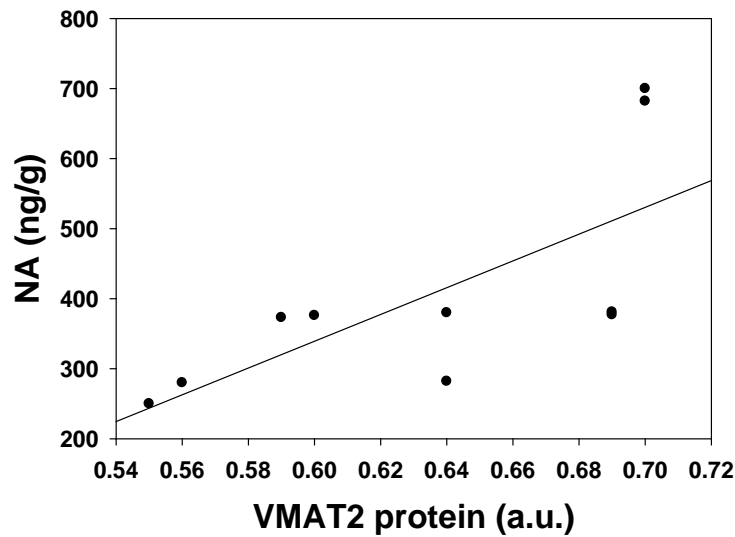
odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za VMAT 2 ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za VMAT 2 manji za 20% ($p < 0.05$, Tukey test), a da je količina VMAT 2 proteina veća za 12% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 42. 1) Ekspresija gena za VMAT 2 [a) nivo iRNK za VMAT 2; b) nivo proteina VMAT 2] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

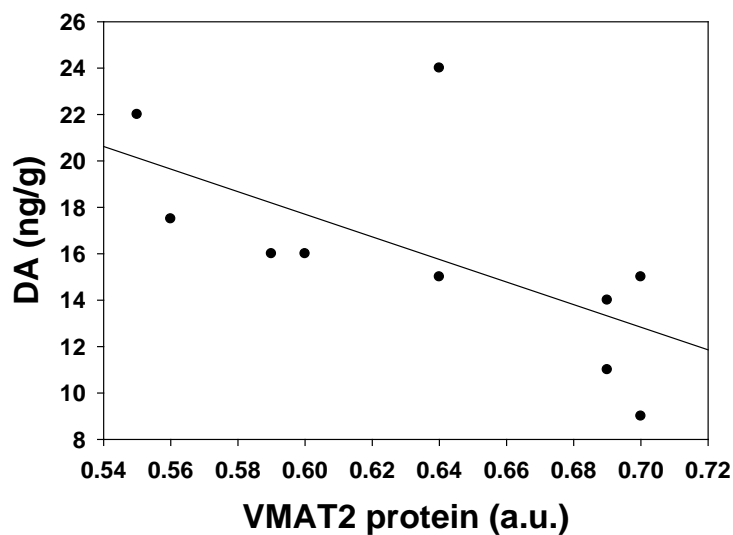
2) Sadržaj VMAT 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 43., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 43. Pozitivna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.709$; $p<0.05$.

Na slici 44., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



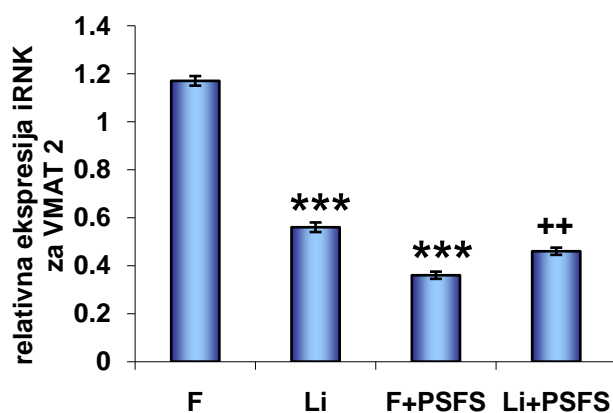
Sl. 44. Negativna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.631$; $p<0.05$.

4.3.6. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljano stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

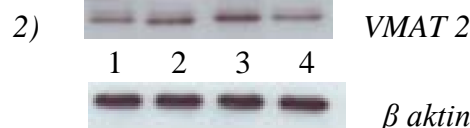
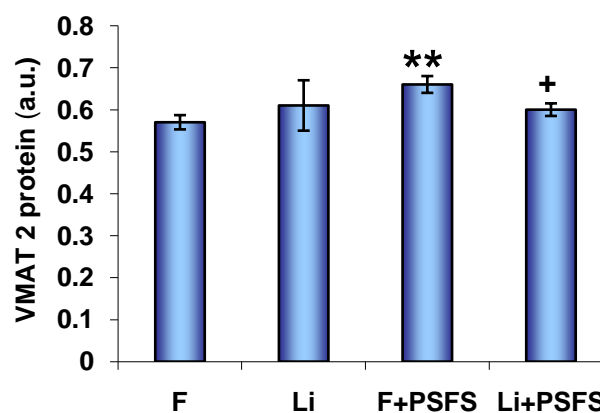
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 45., može se zaključiti da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za VMAT 2 smanjen (sl. 45a.), a da je količina VMAT 2 povećana (sl. 45b.) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za VMAT 2, a vraća količinu VMAT 2 proteina na kontrolnu vrednost. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za VMAT 2 ($p < 0.001$).

1)

a)



b)

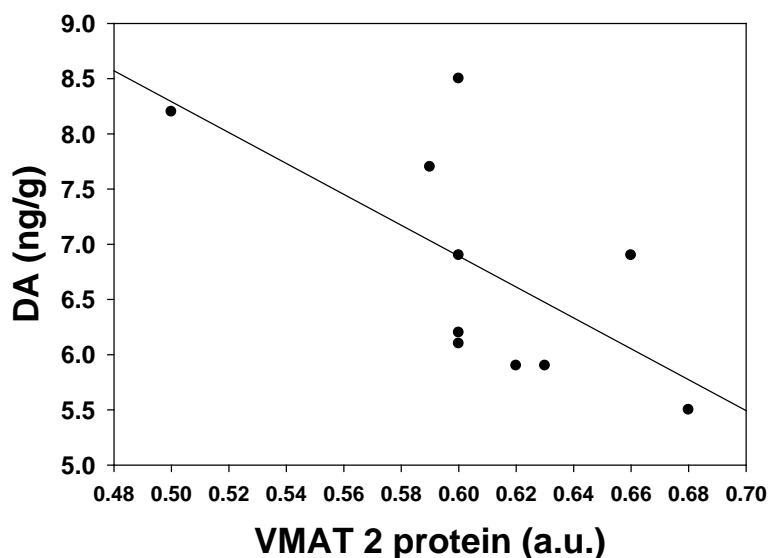


Sl. 45. 1) Ekspresija gena za VMAT 2 [a) nivo iRNK za VMAT 2; b) nivo enzima VMAT 2] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+} < 0.05$, $p^{++} < 0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj VMAT 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

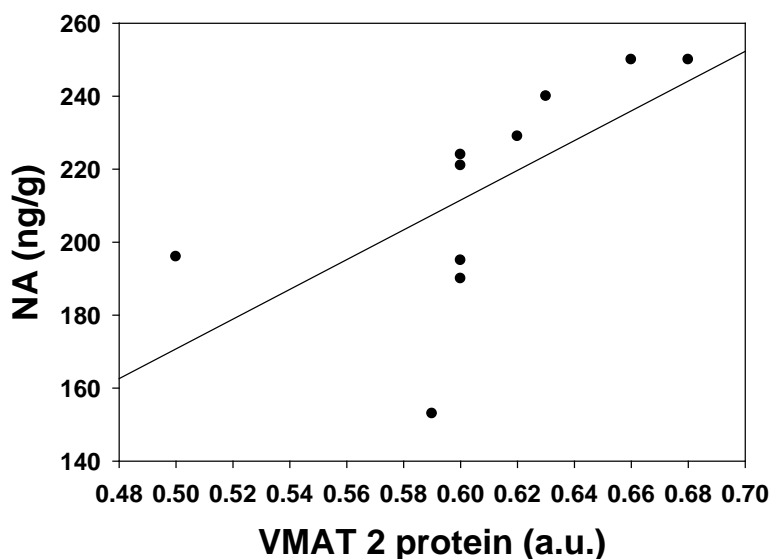
Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) nivo iRNK za VMAT 2 manji za 53% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za VMAT 2 je manji za 70% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je količina VMAT 2 proteina veća za 14% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za VMAT 2 za 27% ($p < 0.01$, Tukey test), a količinu VMAT 2 proteina smanjuje za 10% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

Na slici 46., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 46. Negativna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R = -0.643$; $p < 0.05$.

Na slici 47., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



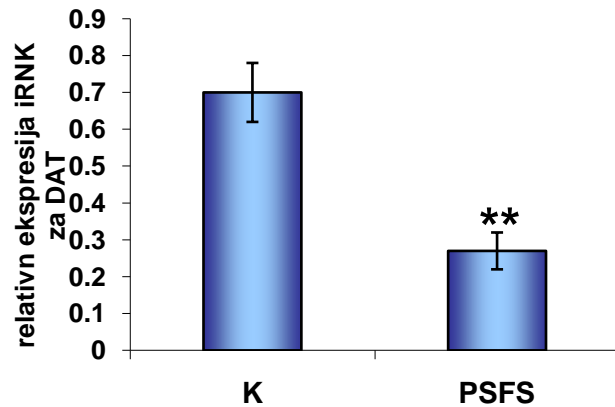
Sl. 47. Pozitivna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.633$; $p<0.05$.

4.3.7. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za dopaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

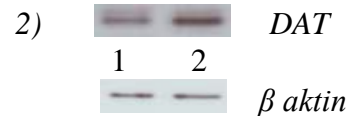
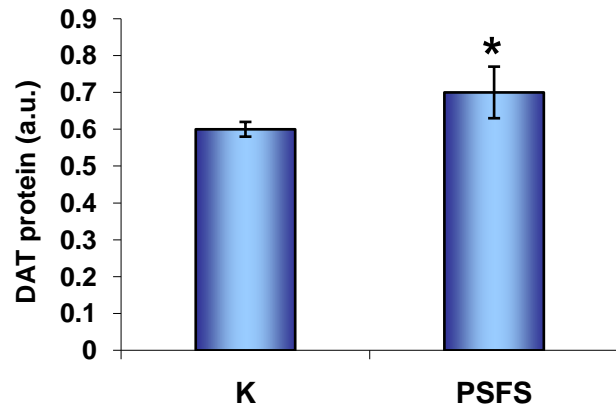
Rezultati prikazani na slici 48., predstavljaju ekspresiju gena za DAT u hipokampusu pacova izlaganih PSFS. Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenje nivoa iRNK za DAT (sl. 48a.), kao i na povećanje količine DAT proteina (sl. 48b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za DAT ($p<0.01$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za DAT manji za 62% ($p<0.01$, Tukey test), a da je količina DAT proteina veća za 15% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)

a)

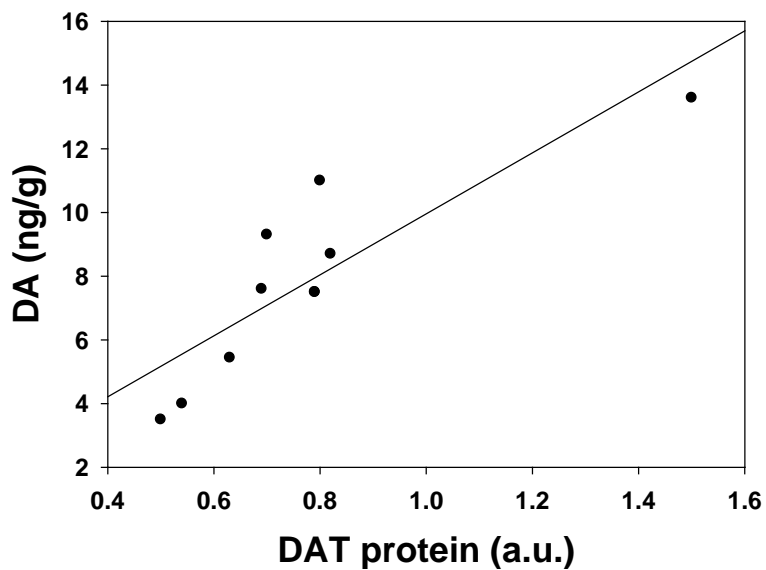


b)



Sl. 48. 1) Ekspresija gena za DAT [a) nivo iRNK za DAT; b) nivo proteina DAT] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. (n=10). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj DAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

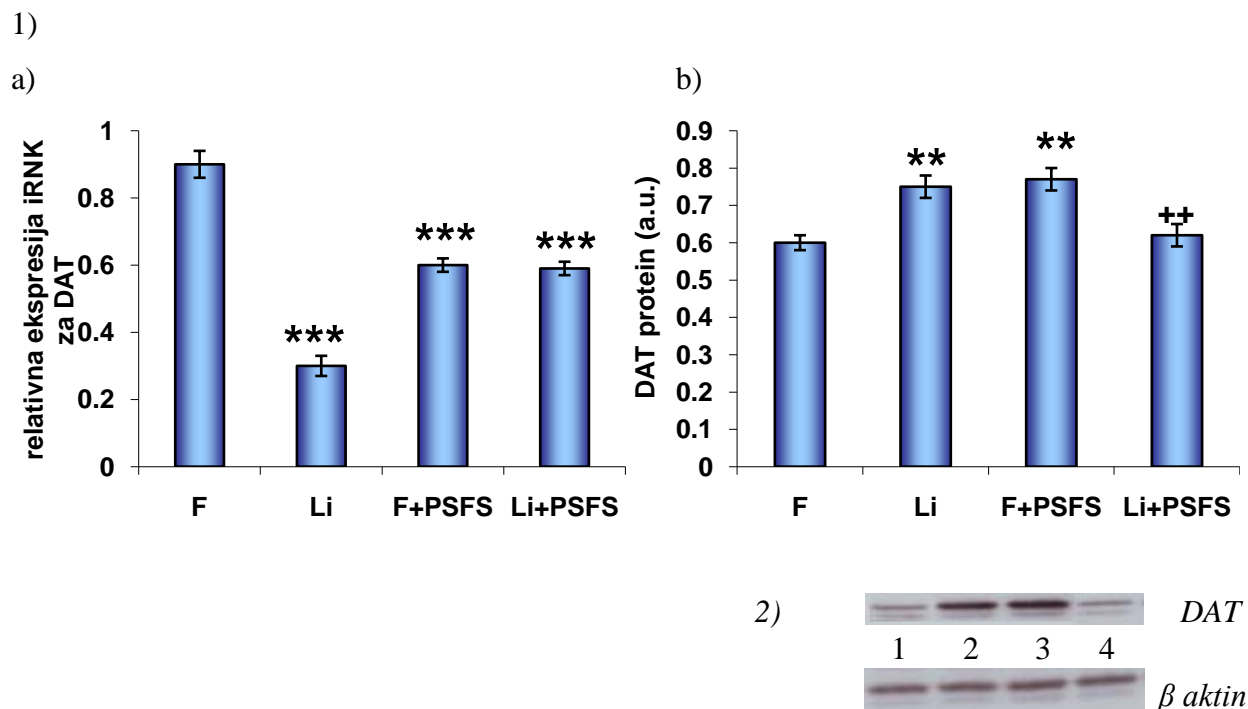


Sl. 49. Pozitivna korelacija u nivou sinteze DAT proteina i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.861$; $p < 0.01$.

Na slici 49., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa DAT proteina i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.

4.3.8. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za dopaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

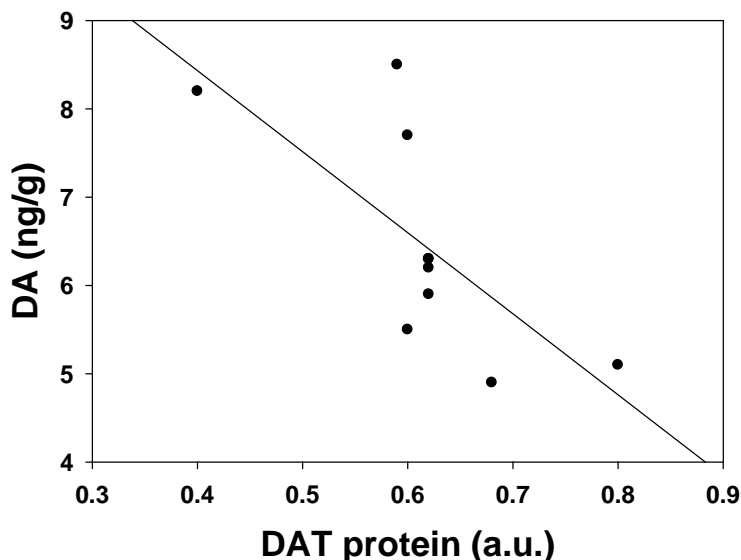
Dobijeni rezultati pokazuju da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za DAT (sl. 50a.) smanjena, a da je količina DAT proteina (sl. 50b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS smanjuje nivo iRNK za DAT u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F), a količinu DAT protein vraća na kontrolni nivo. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za DAT ($p < 0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je u hipokampusu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) nivo iRNK za DAT manji za 67% ($p < 0.001$, Tukey test), a da je količina DAT proteina veća za 20% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za DAT manji je za 34% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je količina DAT proteina veća za 23% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Kod pacova izlaganih Li+PSFS nivo iRNK za DAT smanjen je za 35% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F), dok je količina DAT proteina smanjena za 20% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 50. 1) Ekspresija gena za DAT [a) nivo iRNK za DAT; b) nivo proteina DAT] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{++}<0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj DAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

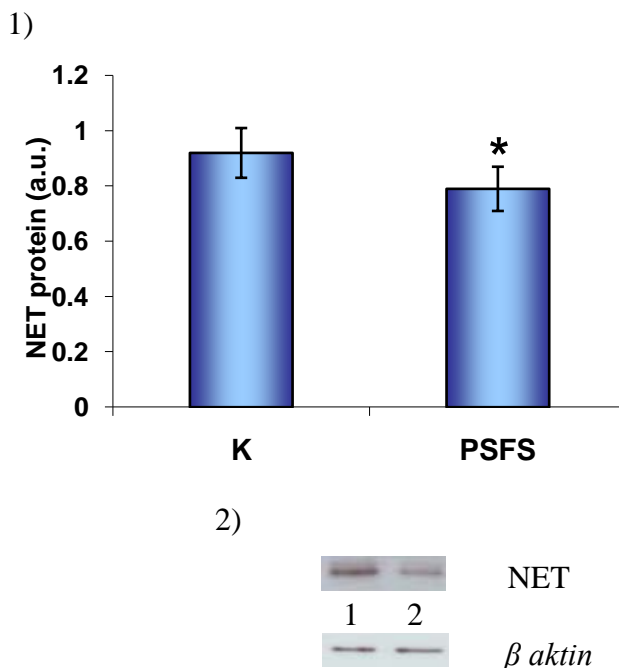
Na slici 51., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa DAT proteina i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 51. Negativna korelacija u nivou sinteze DAT proteina i koncentracije DA hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.710$; $p<0.05$.

4.3.9. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za noradrenalinski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

Rezultati prikazani na slici 52., predstavljaju količinu NET proteina u hipokampusu pacova izlaganih PSFS. Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenje količine NET proteina u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine NET proteina ($p<0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS količina NET proteina manja za 16% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



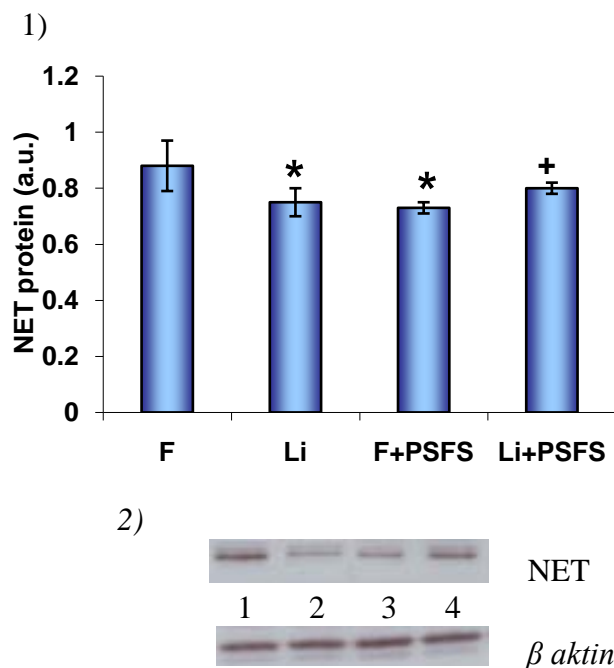
Sl. 52. 1) Nivo proteina NET u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. (n=10). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj NET proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

4.3.10. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za noradrenalinski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 53., može se zaključiti da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS količina NET proteina smanjena u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu NET protein, odnosno vraća je na kontrolni nivo. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine NET proteina ($p < 0.05$). Post-hoc analiza pokazala je da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS količina NET proteina manja za 20% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno

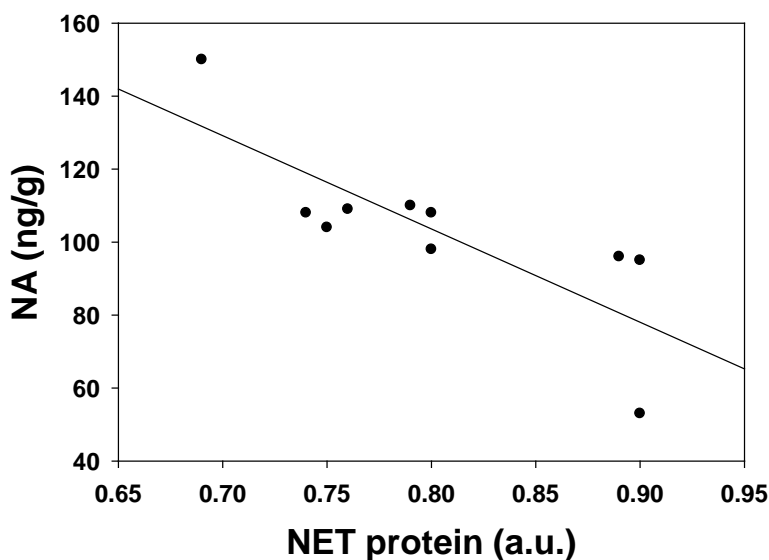
tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu NET proteina za 10% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 53. 1) Nivo proteina NET u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na kontrolu svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj NET proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

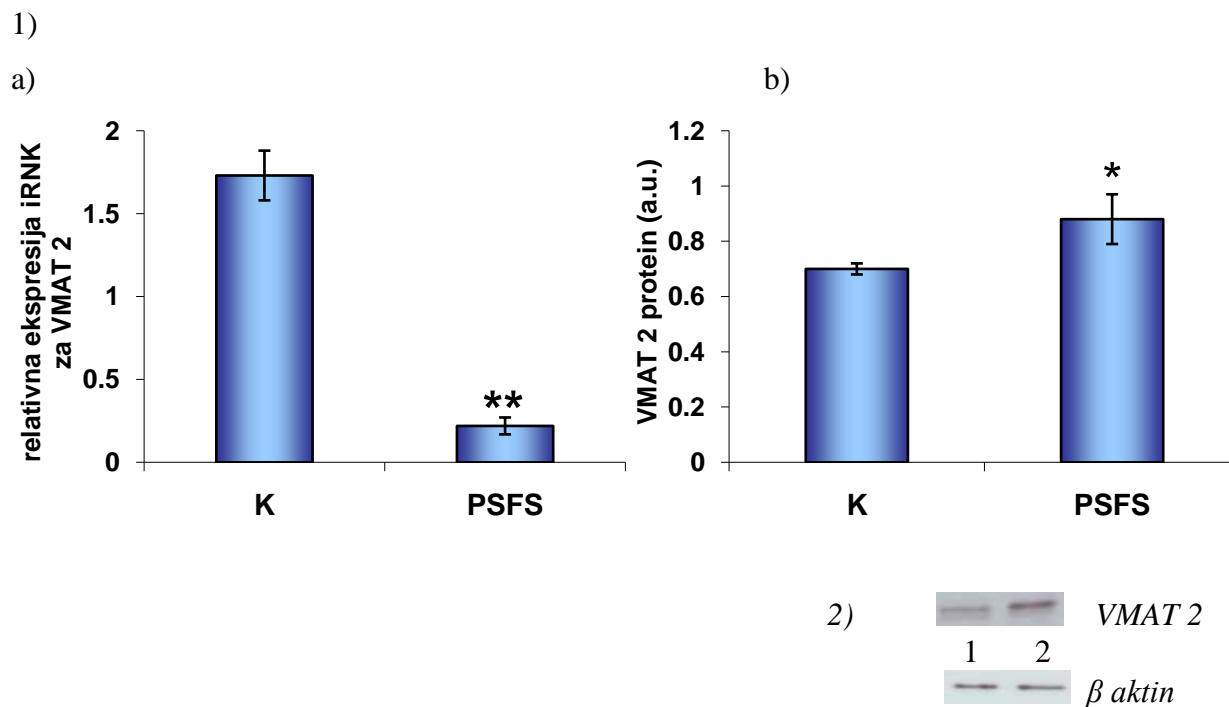
Na slici 54., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa NET proteina i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 54. Negativna korelacija u nivou sinteze NET proteina i koncentracije NA hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.793$; $p<0.01$.

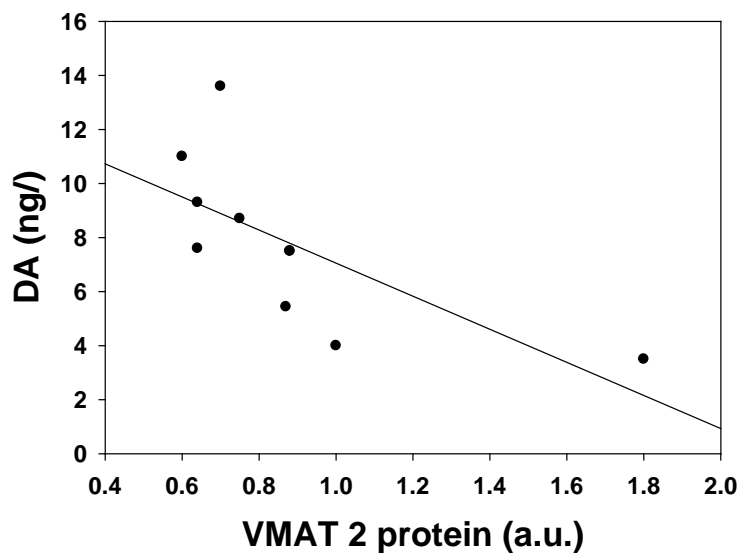
4.3.11. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivane grupe došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za VMAT 2 ($p<0.01$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenje nivoa iRNK za VMAT 2 (sl. 55a.), kao i na povećanje količine VMAT 2 proteina (sl. 55b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za VMAT 2 manji za 88% ($p<0.01$, Tukey test), a da je količina VMAT 2 proteina veća za 11% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 55. 1) Ekspresija gena za VMAT 2 [a) nivo iRNK za VMAT 2; b) nivo proteina VMAT 2] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

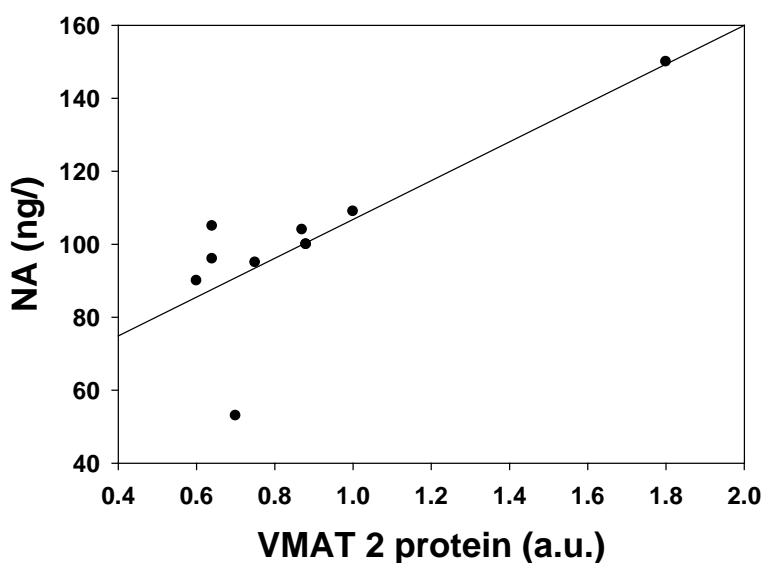
2) Sadržaj VMAT 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).



Sl. 56. Negativna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R = -0.695$; $p < 0.05$.

Na slici 56., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.

Na slici 57., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.

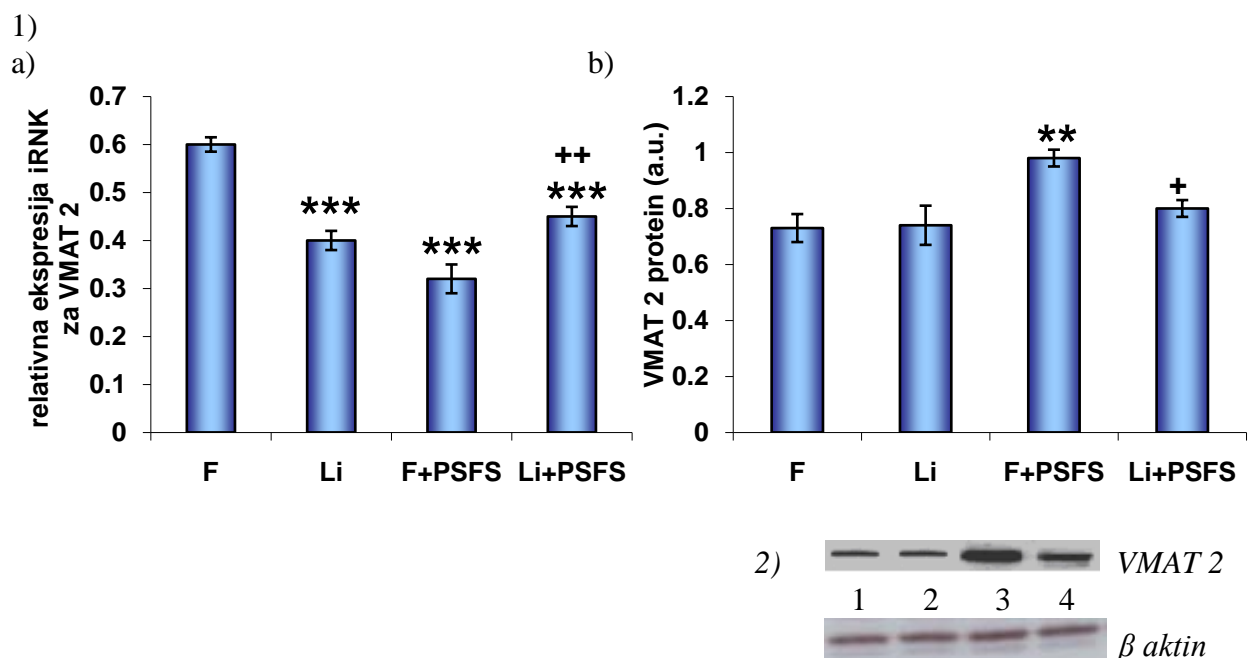


Sl. 57. Pozitivna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.793$; $p<0.05$.

4.3.12. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za vezikularni monoaminski transporter u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Na slici 58., može se uočiti da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za VMAT 2 (sl. 58a.) smanjen, a da je količina VMAT 2 proteina (sl. 58b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za VMAT 2, a smanjuje količinu VMAT 2 proteina, odnosno vraća nivo proteina na kontrolnu vrednost. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za VMAT 2

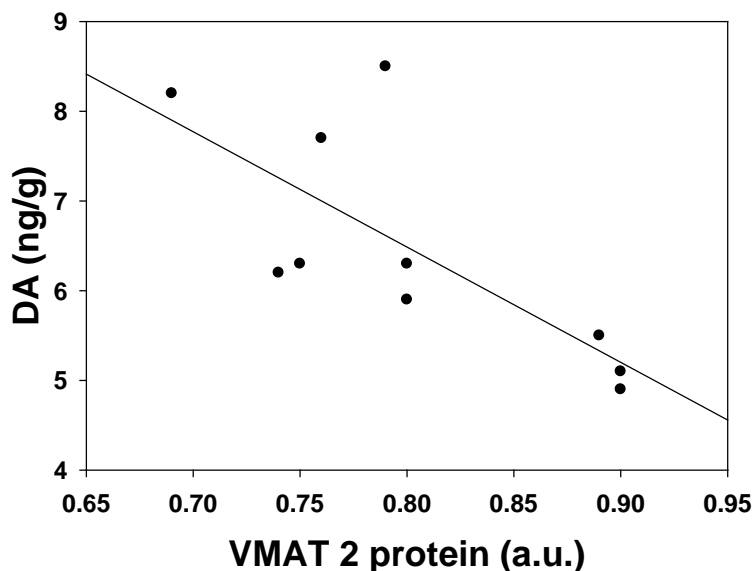
($p < 0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je u hipokampusu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) nivo iRNK za VMAT 2 manji za 34% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za VMAT 2 manji je za 50% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je količina VMAT 2 proteina veća za 27% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava nivo iRNK za VMAT 2 za 40% ($p < 0.01$, Tukey test), a količinu VMAT 2 proteina smanjuje za 22% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 58. 1) Ekspresija gena za VMAT 2 [a) nivo iRNK za VMAT 2; b) nivo proteina VMAT 2] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+} < 0.05$, $p^{++} < 0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

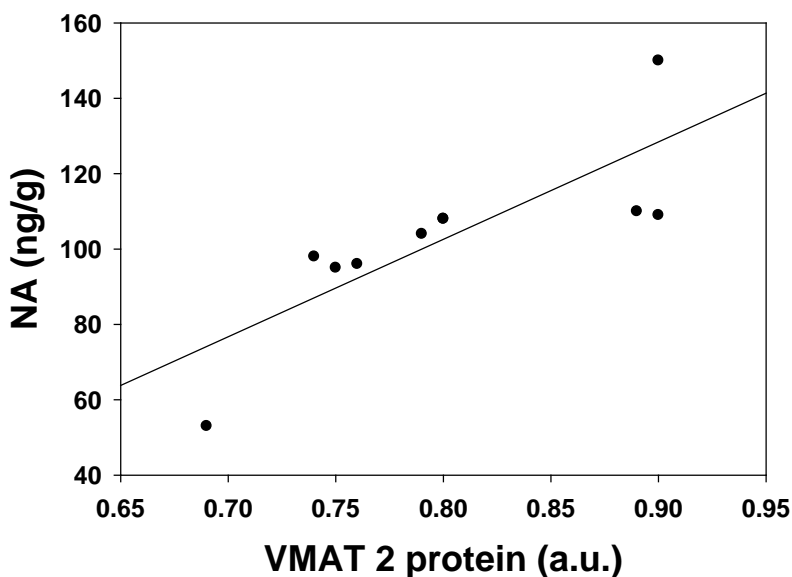
2) Sadržaj VMAT 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 59., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 59. Negativna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije DA hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.742$; $p<0.05$.

Na slici 60., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa VMAT 2 proteina i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.

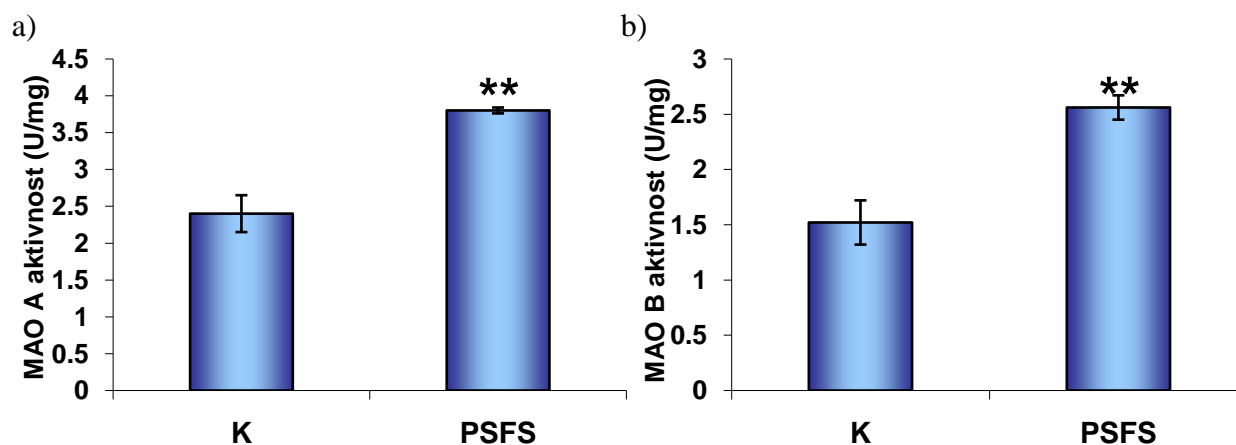


Sl. 60. Pozitivna korelacija u nivou sinteze VMAT 2 proteina i koncentracije NA hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.802$; $p<0.01$.

4.4. Delovanje litijuma na aktivnost i količinu enzima koji učestvuju u razgradnji dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

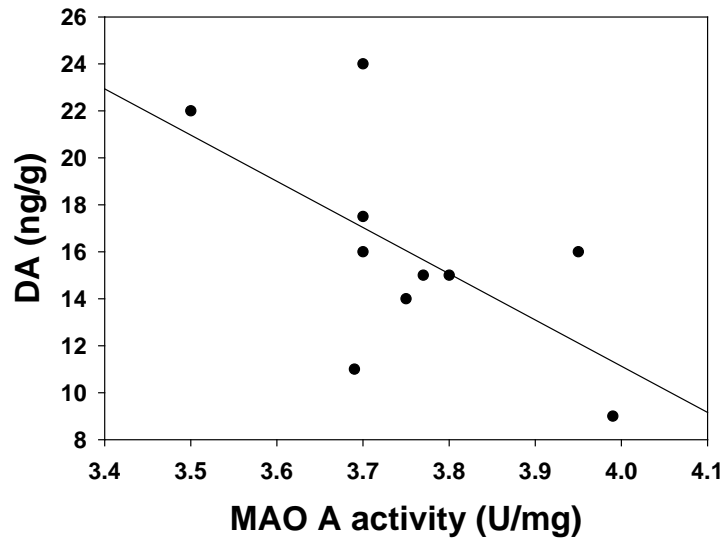
4.4.1. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na aktivnost enzima monoaminooksidaze A i monoaminooksidaze B u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti MAO A i MAO B enzima ($p<0.01$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na povećanu aktivnost MAO A (sl. 61a.) i MAO B (sl. 61b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu kod pacova izlaganih PSFS aktivnost MAO A veća za 58% ($p<0.01$, Tukey test), a da je aktivnost MAO B veća za 68% ($p<0.01$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



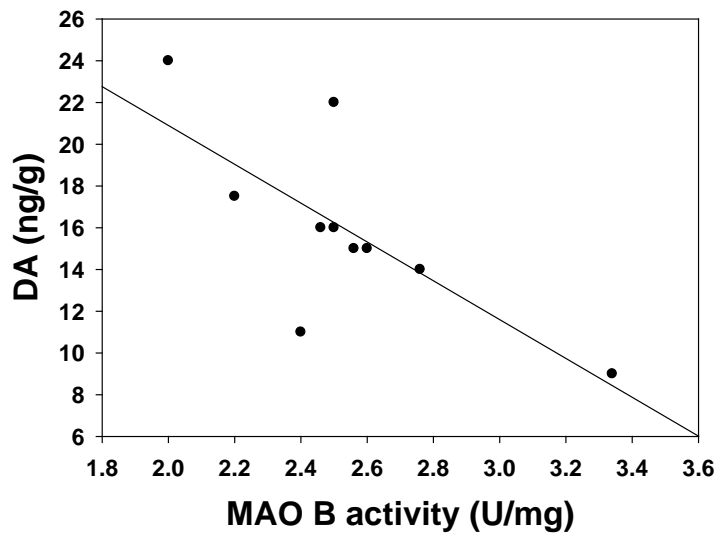
Sl. 61. Aktivnost enzima a) MAO A (U/mg) i b) MAO B (U/mg) u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**}<0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

Na slici 62., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa aktivnosti MAO A enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 62. Negativna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.608$; $p<0.05$.

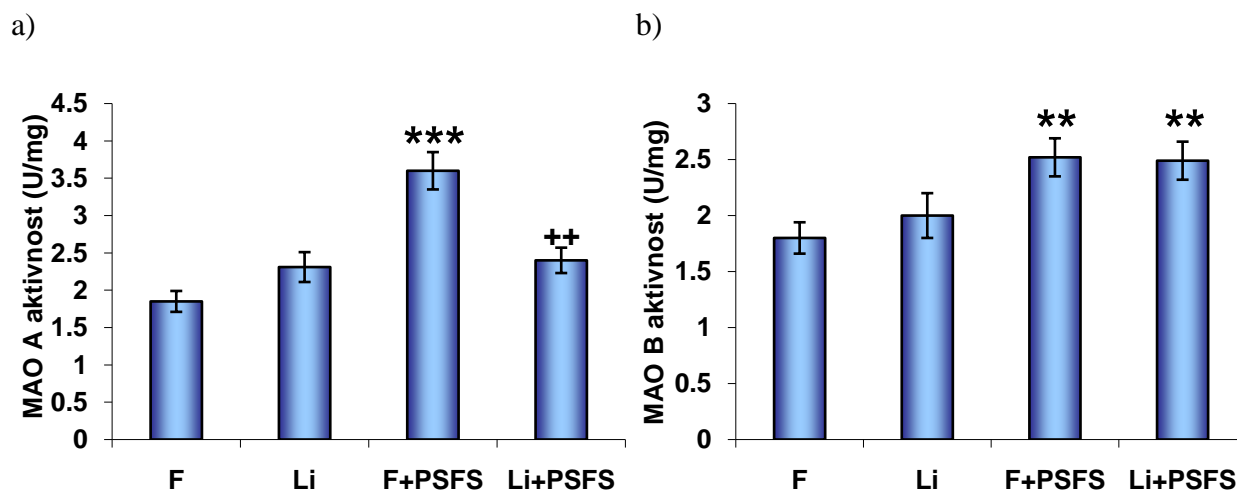
Na slici 63., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa aktivnosti MAO B enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 63. Negativna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.732$; $p<0.05$.

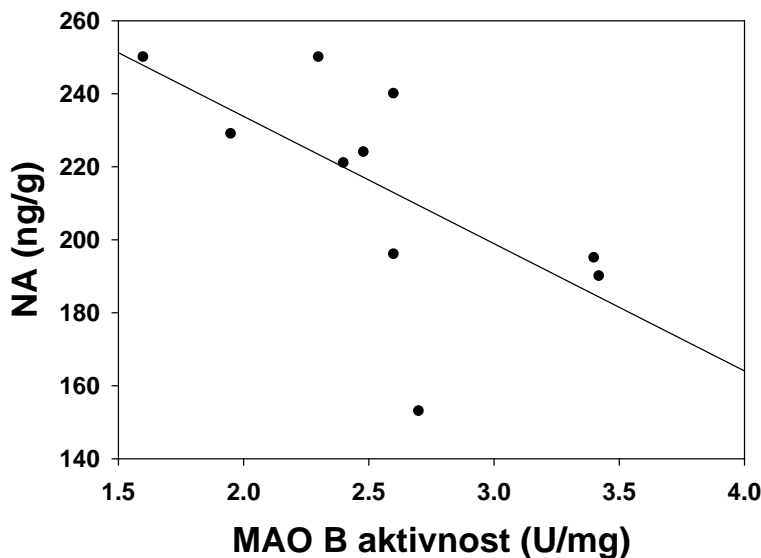
4.4.2. Delovanje litijuma na aktivnost enzima monoaminooksidaze A i monoaminooksidaze B u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti MAO A ($p < 0.001$) i MAO B enzima ($p < 0.01$). Dobijeni rezultati pokazuju da su u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS aktivnost MAO A (sl. 64a.) i aktivnost MAO B (sl. 64b.) povećane u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS smanjuje aktivnost samo MAO A enzima, dok je aktivnost MAO B ostala i dalje povećana. Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS aktivnost MAO A enzima veća za 94% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je aktivnost MAO B enzima veća za 40% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS smanjuje aktivnost samo MAO A za 34% ($p < 0.01$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 64. Aktivnost enzima a) MAO A (U/mg) i b) MAO B (U/mg) u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{++} < 0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

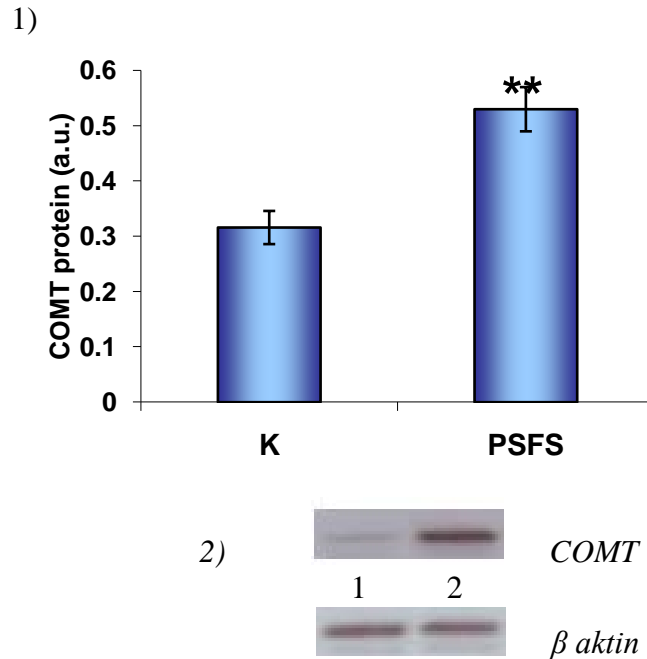
Na slici 65., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa aktivnosti MAO B enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 65. Negativna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.635$; $p<0.05$.

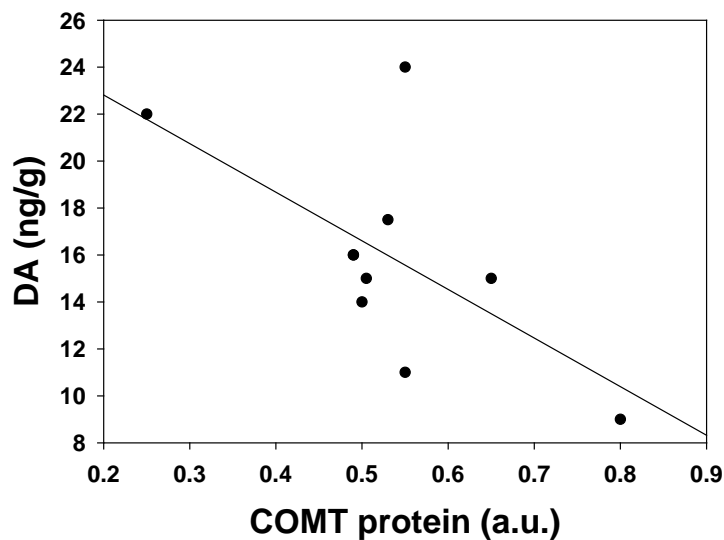
4.4.3. Uticaj ponavljanoг stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na količinu enzima katehol-O-metiltransferaze u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine COMT enzima ($p<0.01$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na povećanje količine COMT enzima (sl. 66.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS količina COMT enzima veća za 59% ($p<0.01$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 66. 1) Nivo enzima COMT u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{***}<0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj COMT proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (PSFS).



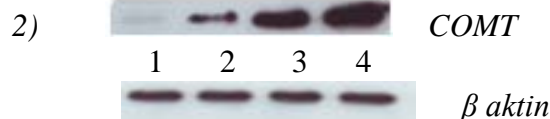
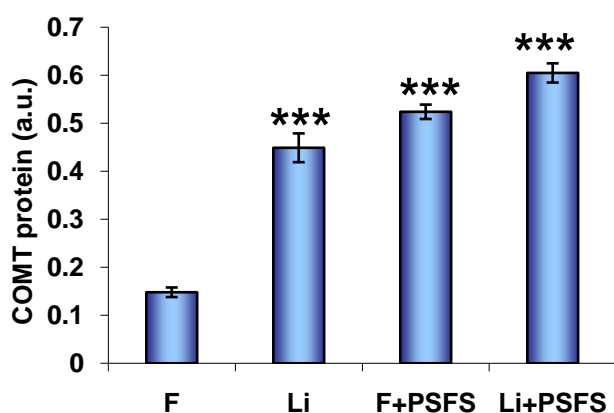
Sl. 67. Negativna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.634$; $p<0.05$.

Na slici 67., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa COMT enzima i koncentracije DA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.

4.4.4. Delovanje litijuma na količinu enzima katehol-O-metiltransferaze u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Dobijeni rezultati pokazuju da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS količina COMT enzima (sl. 68.) veća u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu COMT enzima.

1)



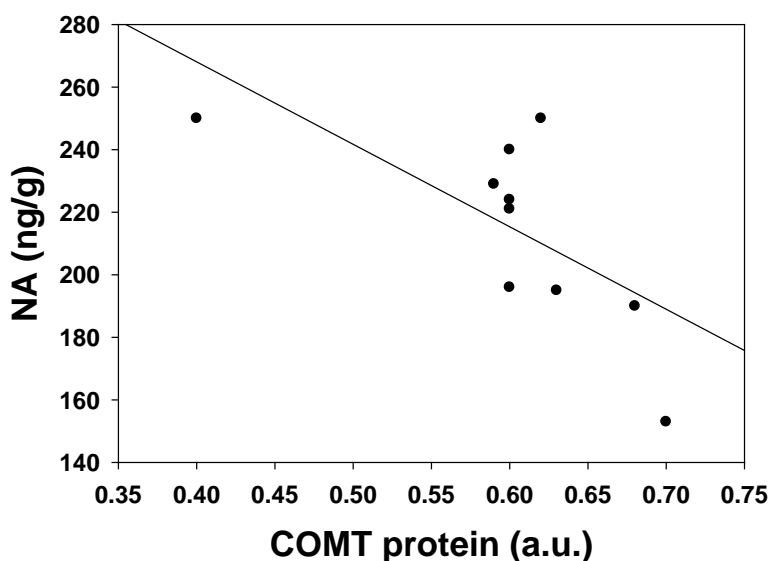
Sl. 68. 1) Nivo enzima COMT u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. (n=10). Statistička značajnost $p^{***}<0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F).

2) Sadržaj COMT proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim

rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine COMT enzima ($p < 0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) količina COMT enzima veća za 197% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS količina COMT enzima veća je za 251% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu COMT enzima za 308% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F).

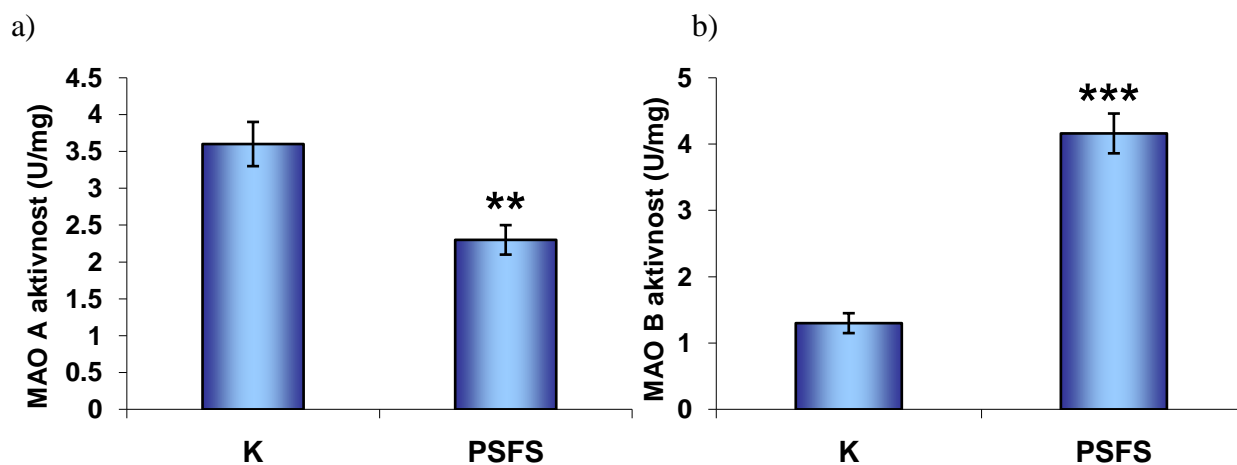
Na slici 69., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa nivoa COMT enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 69. Negativna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R = -0.683$; $p < 0.05$.

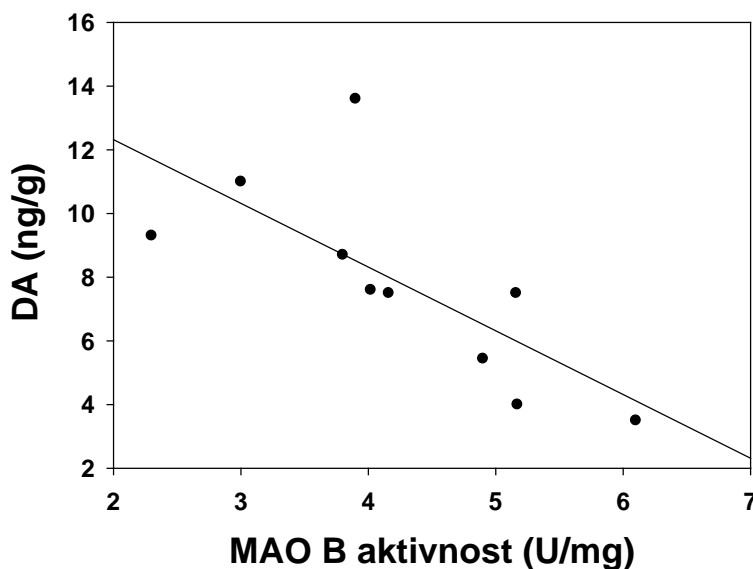
4.4.5. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na aktivnost enzima monoaminoooksidaze A i monoaminoooksidaze B u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

Analiza varijanse (ANOVA 1) pokazala je da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti MAO A ($p < 0.01$) i MAO B enzima ($p < 0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na smanjenu aktivnost MAO A (sl. 70a.) i povećanu aktivnost MAO B enzima (sl. 70b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS aktivnost MAO A manja za 46% ($p < 0.01$, Tukey test), a da je aktivnost MAO B veća za 220% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 70. Aktivnost enzima a) MAO A (U/mg) i b) MAO B (U/mg) u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$, je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

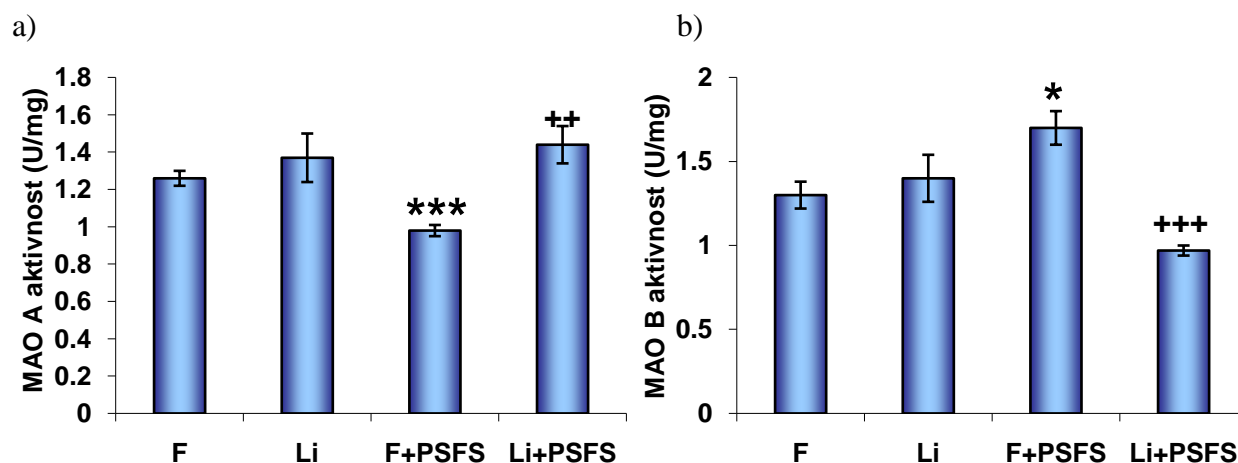
Na slici 71., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



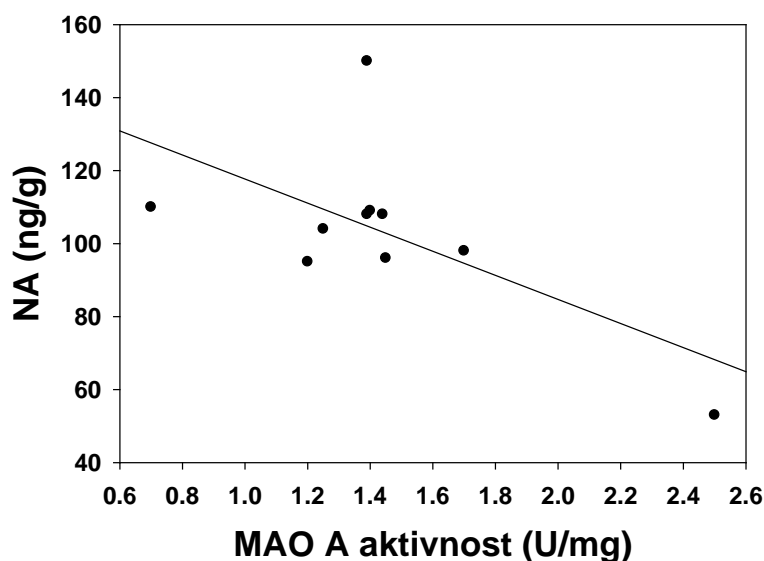
Sl. 71. Negativna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.726$; $p<0.05$.

4.4.6. Delovanje litijuma na aktivnost enzima monoaminoooksidaze A i monoaminoooksidaze B u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Dobijeni rezultati pokazuju da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS aktivnost MAO A smanjena (sl. 72a.), dok je aktivnost MAO B (sl. 72b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava aktivnosti MAO A i vraća aktivnost MAO B enzima na kontrolnu vrednost. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti MAO A i MAO B enzima ($p<0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS manja aktivnost MAO A za 23% ($p<0.001$, Tukey test), a da je aktivnost MAO B veća za 30% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava aktivnost MAO A za 46% ($p<0.01$, Tukey test), dok aktivnost MAO B smanjuje za 43% ($p<0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 72. Aktivnost enzima a) MAO A (U/mg) i b) MAO B (U/mg) u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{++} < 0.01$, $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

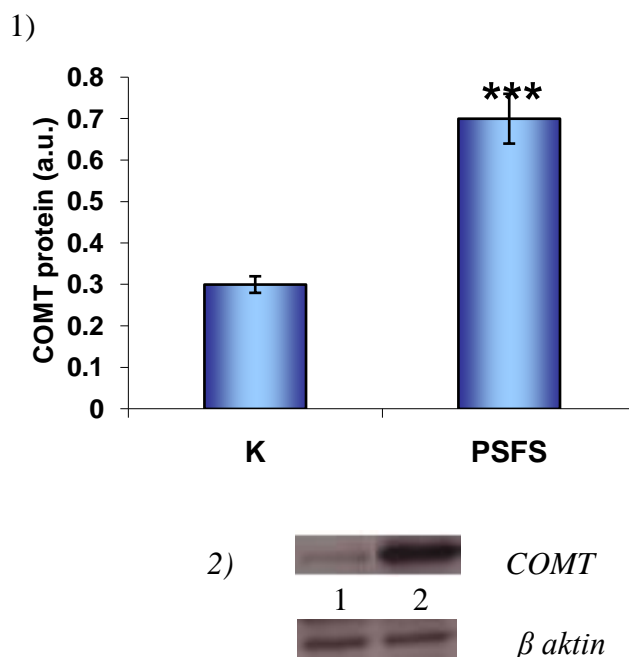


Sl. 73. Negativna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R = -0.634$; $p < 0.05$.

Na slici 73., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO A enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.

4.4.7. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na količinu enzima katehol-O-metiltransferaze u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

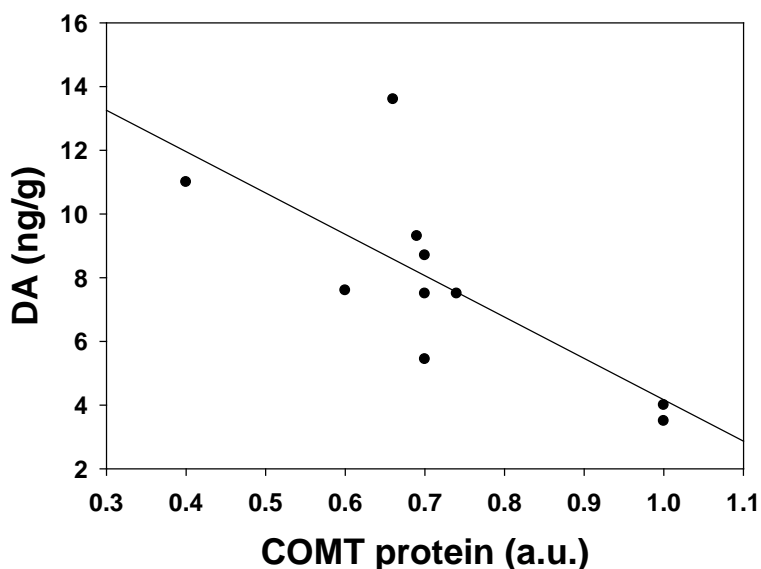
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine COMT enzima ($p < 0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na povećanje količine COMT enzima (sl. 74.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS količin COMT enzima veća za 133% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 74. 1) Nivo enzima COMT u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanoom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj COMT proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanoom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 75., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.

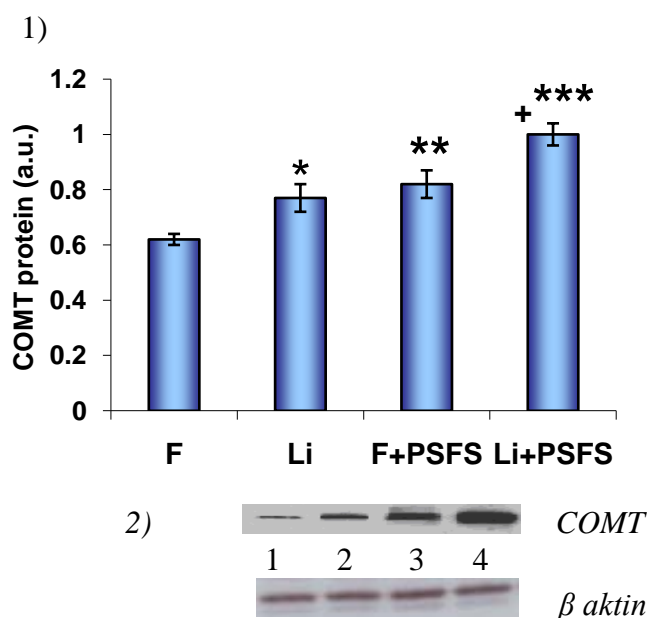


Sl. 75. Negativna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i koncentracije DA u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=-0.742$; $p<0.05$.

4.4.8. Delovanje litijuma na količinu enzima katehol-O-metiltransferaze u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja količine COMT enzima ($p<0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS količina COMT enzima (sl. 76.) veća u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava količinu COMT enzima. Post-hoc analiza pokazala je da je u hipokampusu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) nivo količine COMT enzima veći za 24% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS količina COMT enzima veća je za 32% ($p<0.01$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod

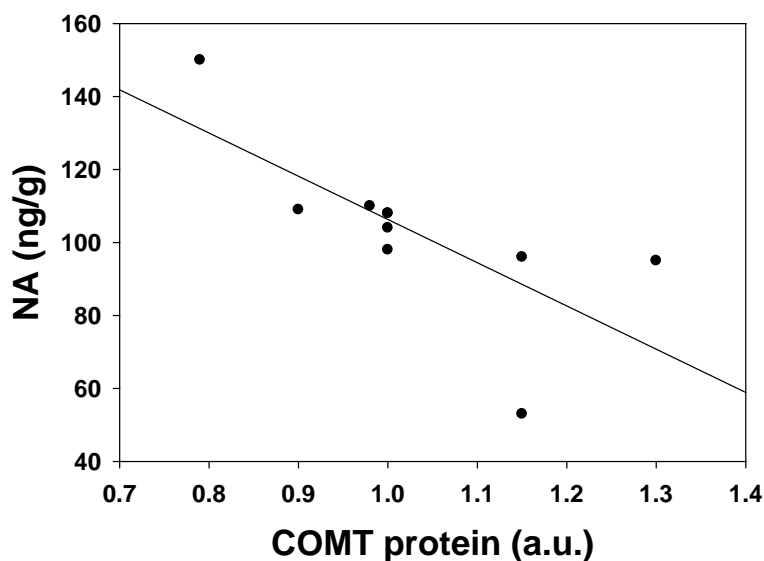
pacova izlaganih PSFS povećava količinu COMT enzima za 21% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 76. 1) Nivo enzima COMT u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrolu svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj COMT proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 77., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.

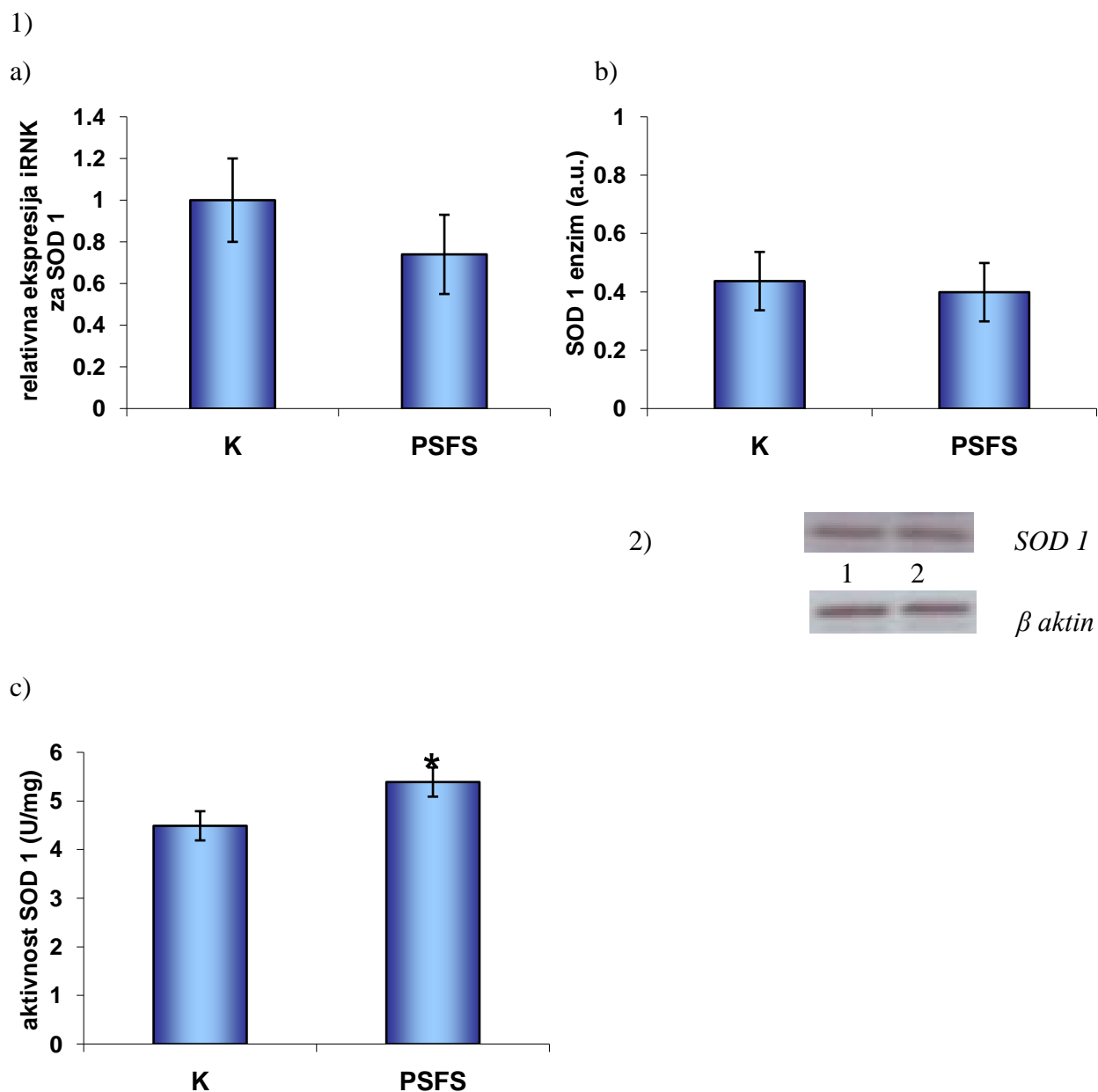


Sl. 77. Negativna korelacija u nivou količine COMT enzima i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.716$; $p<0.05$.

4.5. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime antioksidativne zaštite u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

4.5.1. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

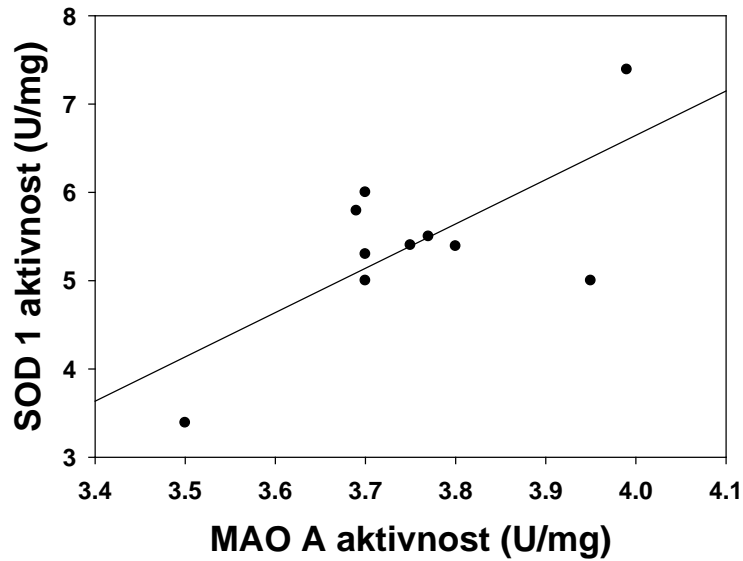
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja samo aktivnosti SOD 1 enzima ($p<0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS povećava aktivnost SOD 1 enzima (sl. 78c.), dok su nivo iRNK za SOD 1 gen (sl. 78a.) i količina enzima SOD 1 (sl. 78b.) ostali nepromenjeni. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS aktivnost SOD 1 enzima veća za 20% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



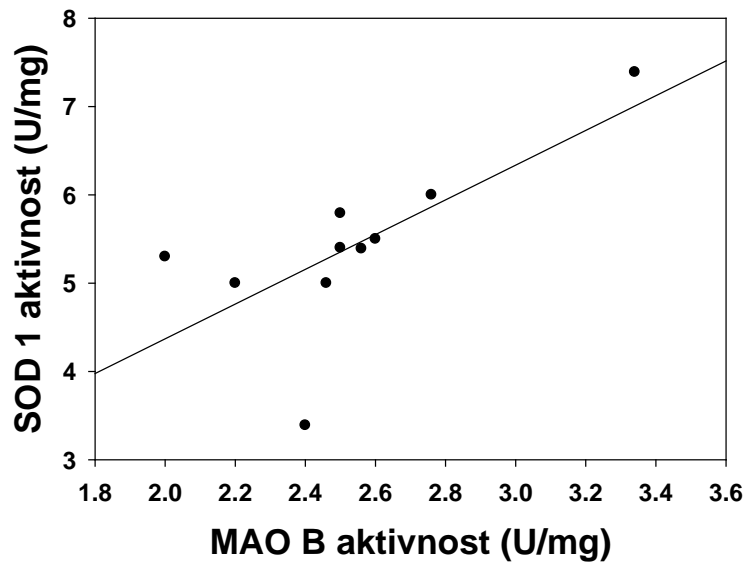
Sl. 78. 1) Ekspresija gena za SOD 1 [a) nivo iRNK za SOD 1, b) nivo enzima SOD 1 i c) aktivnost SOD 1 enzima] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj SOD 1 proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 79., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



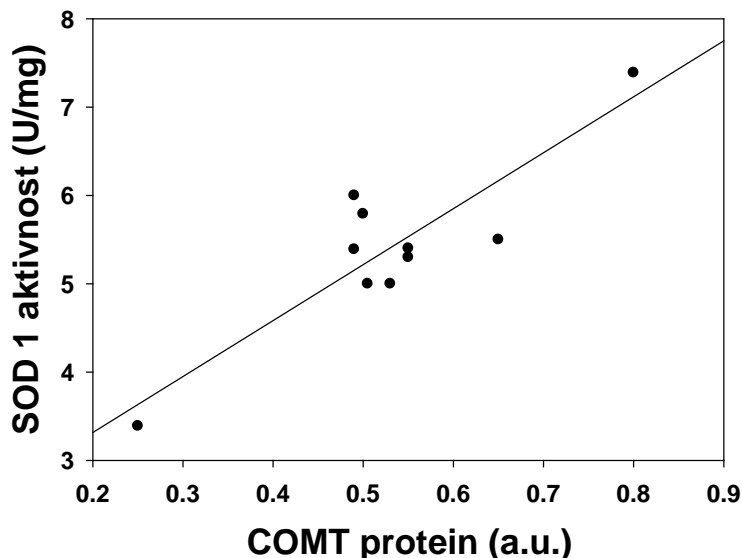
Sl. 79. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.703$; $p<0.05$.



Sl. 80. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.702$; $p<0.05$.

Na slici 80., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.

Na slici 81., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT protein i aktivnosti SOD 1 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 81. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.881$; $p<0.001$.

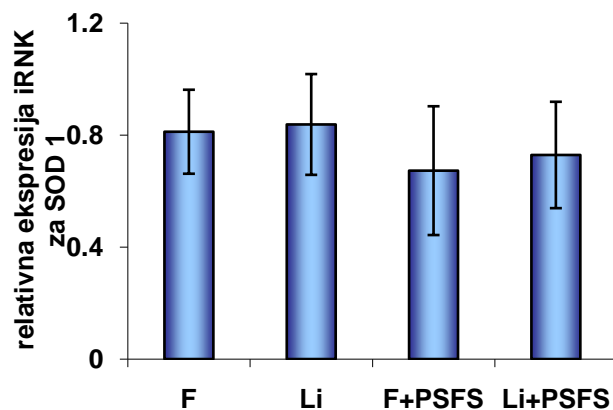
4.5.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

U prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS aktivnost SOD 1 je veća, dok je kod pacova izlaganih Li+PSFS manja u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F) (sl. 82c.). Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti SOD 1 enzima ($p<0.001$). Post-hoc analiza pokazala je da u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nema statistički značajnih promena nivoa iRNK za SOD 1 i količine SOD 1 enzima. Međutim, kod pacova izlaganih F+PSFS aktivnost SOD 1 enzima veća je za 12% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Kod pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost SOD 1 je manja za 44% ($p<0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove

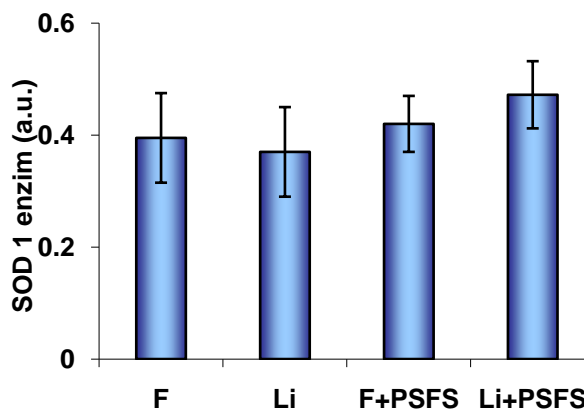
izlagane F+PSFS, dok je u odnosu na pacove tretirane samo fiziološkim rastvorom aktivnost SOD 1 manja za 25% ($p < 0.001$, Tukey test).

1)

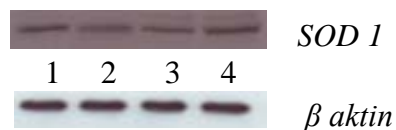
a)



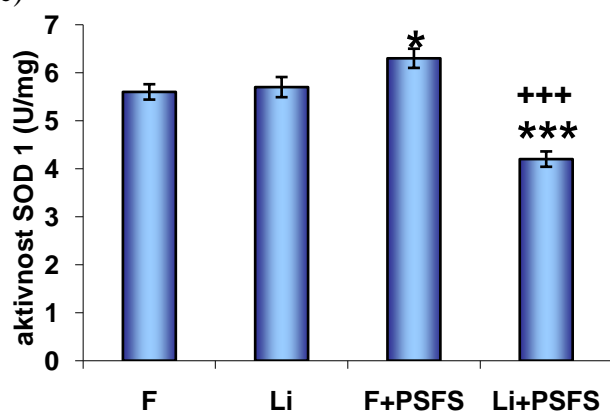
b)



2)



c)



Sl. 82. 1) Ekspresija gena za SOD 1 [a) nivo iRNK za SOD1, b) nivo enzima SOD 1 i c) aktivnost SOD 1 enzima] u prefrontalnom korteksu kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

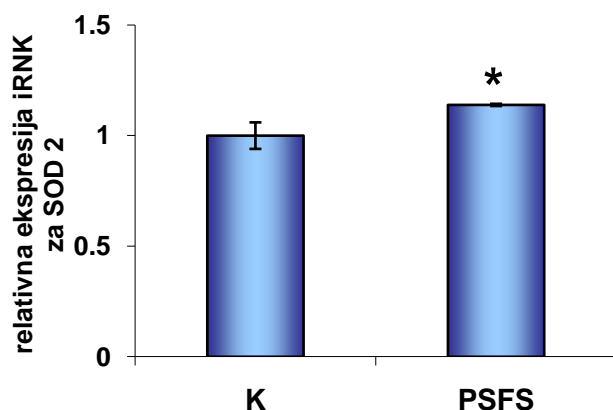
2) Sadržaj SOD 1 proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

4.5.3. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

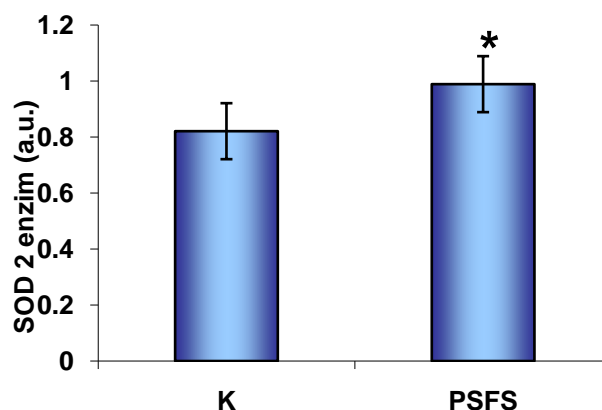
Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 83a., 83b. i 83c., možemo zaključiti da PSFS utiče na povećanje ekspresije gena za SOD 2 u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja nivoa iRNK za SOD 2 ($p < 0.05$), količine SOD 2 enzima ($p < 0.05$) i aktivnosti SOD 2 enzima ($p < 0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za SOD 2 veći za 13% ($p < 0.05$, Tukey test), količina SOD 2 enzima veća za 20% ($p < 0.05$, Tukey test), dok je aktivnost SOD 2 enzima veća za 100% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)

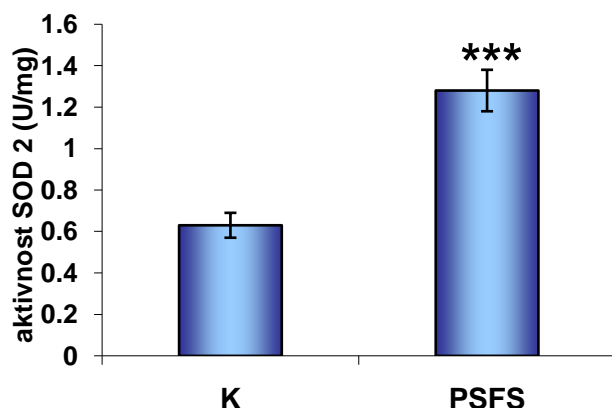
a)



b)



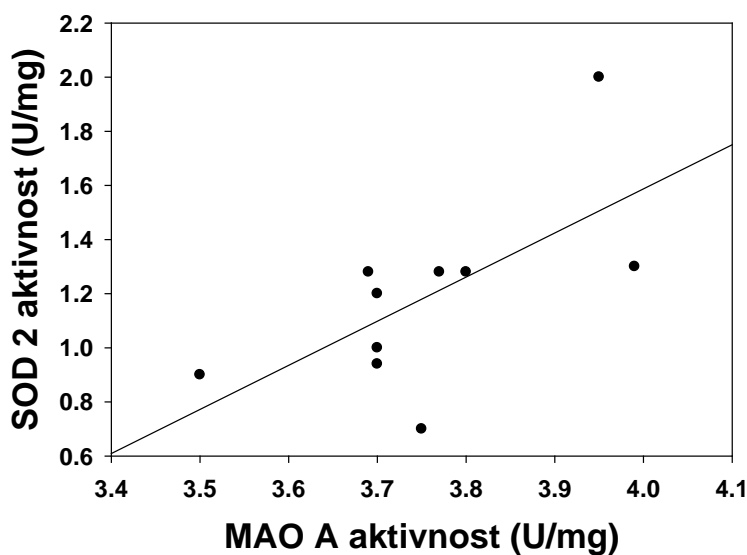
c)



Sl. 83. 1) Ekspresija gena za SOD 2 [a) nivo iRNK za SOD 2, b) nivo enzima SOD 2 i c) aktivnost SOD 2 enzima] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

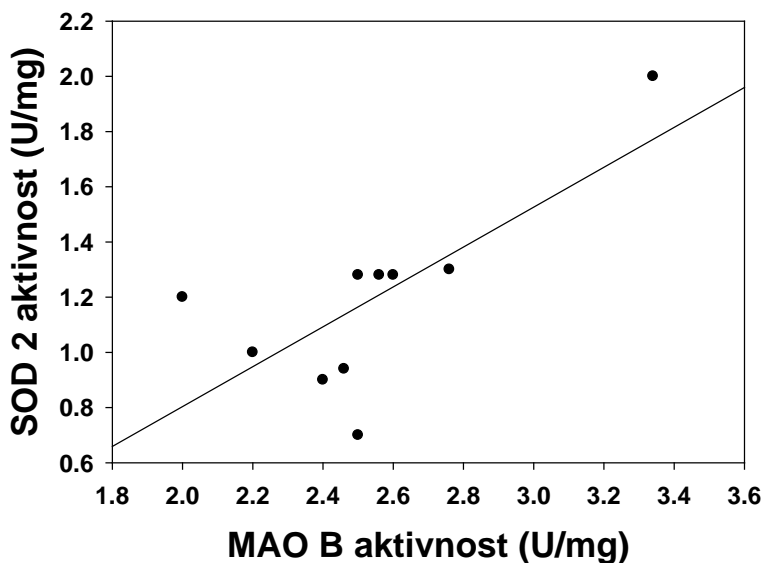
2) Sadržaj SOD 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 84., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.

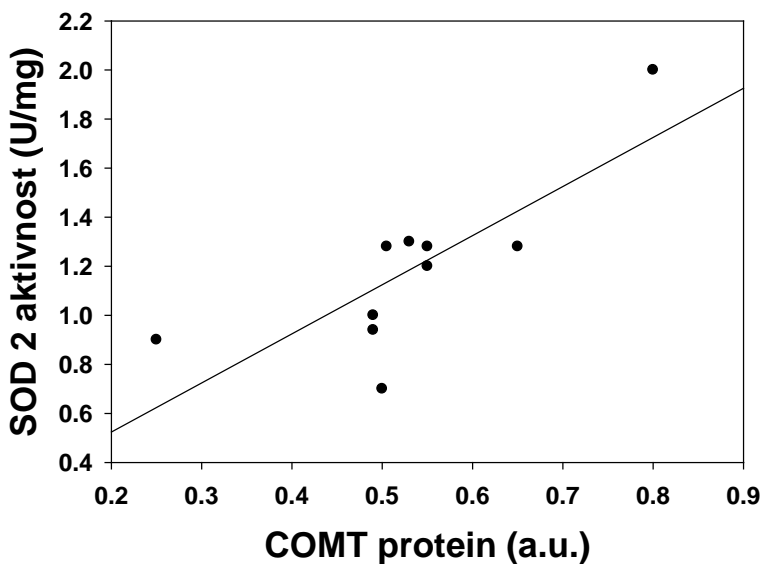


Sl. 84. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.644$; $p < 0.05$.

Na slici 85., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 85. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.727$; $p<0.05$.

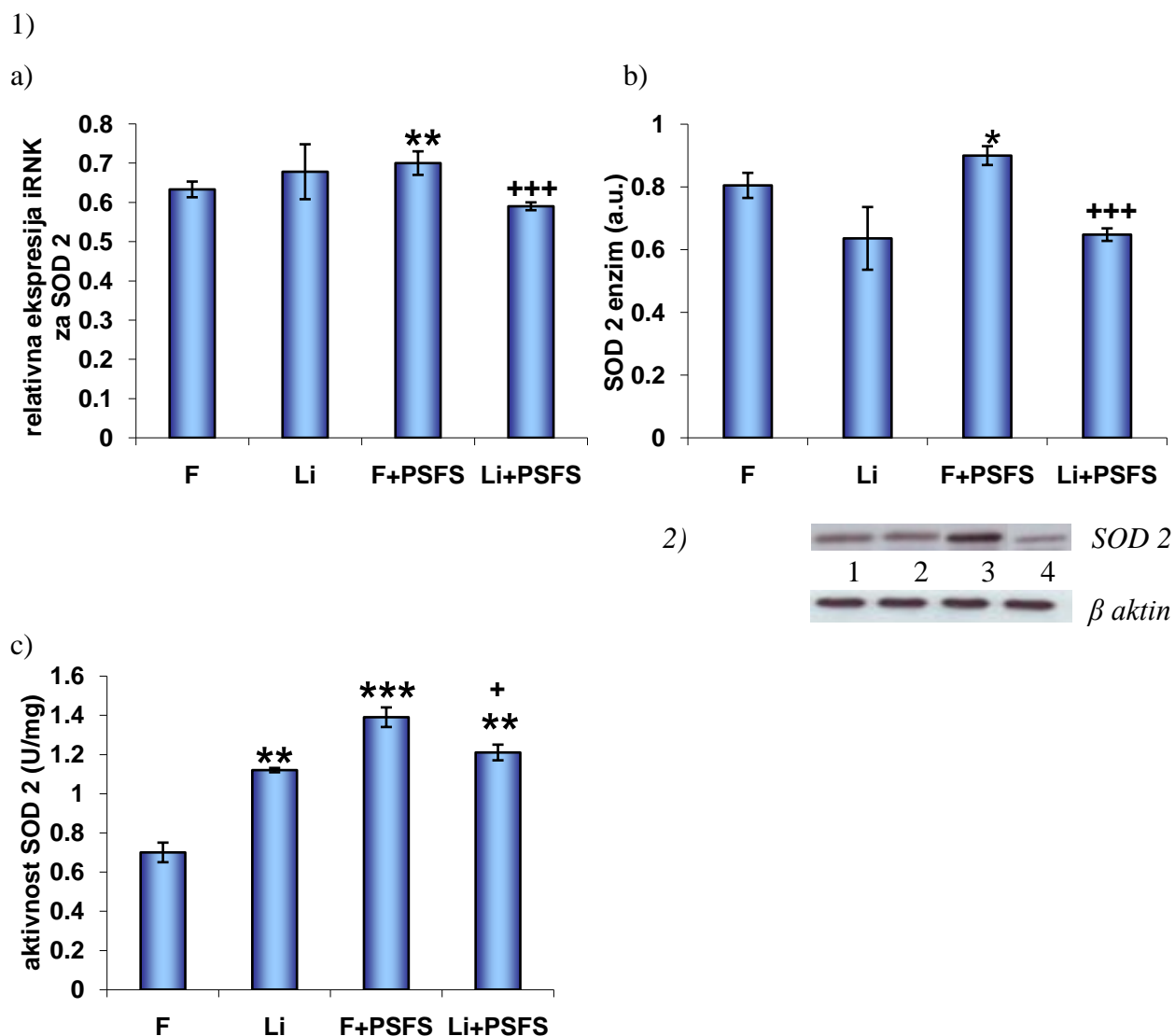


Sl. 86. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.784$; $p<0.01$.

Na slici 86., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.

4.5.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

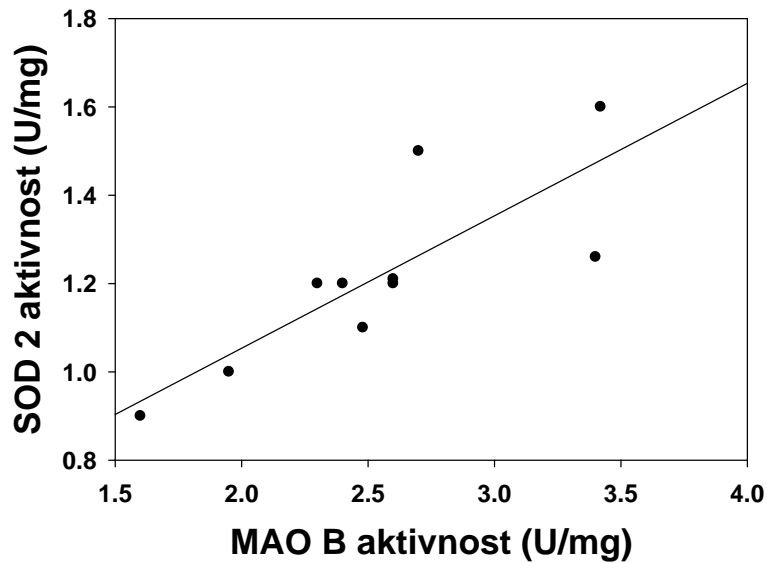
Na slici br. 87., možemo videti da je u prefrontalnom korteksu kod ispitivanih grupa došlo do statistički značajnih promena ekspresije gena za SOD 2. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja nivoa iRNK za SOD 2 ($p < 0.001$), količine SOD 2 enzima ($p < 0.001$) i aktivnosti SOD 2 enzima ($p < 0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je aktivnost SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova tretiranih Li veća za 60% ($p < 0.01$, Tukey test). Kod pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za SOD 2 je veći za 10% ($p < 0.01$, Tukey test), količina SOD 2 je veća za 12% ($p < 0.05$, Tukey test), dok je aktivnost SOD 2 enzima veća za 98% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Kod pacova izlaganih Li+PSFS nivo iRNK za SOD 2 je manji za 16% ($p < 0.001$, Tukey test), količina SOD 2 je manja za 28% ($p < 0.001$, Tukey test), aktivnost SOD 2 enzima je manja za 13% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS, dok je u odnosu na pacove tretirane samo fiziološkim rastvorom aktivnost SOD 2 veća za 72% ($p < 0.01$, Tukey test).



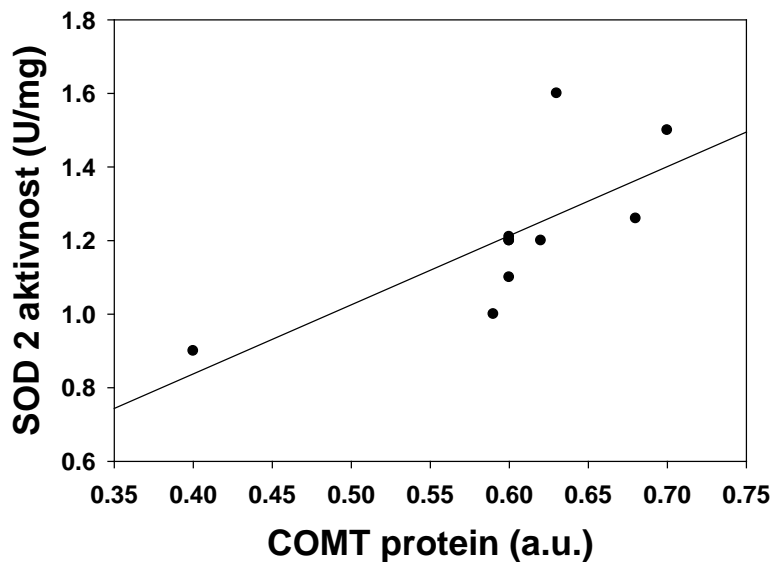
Sl. 87. 1) Ekspresija gena za SOD 2 [a) nivo iRNK za SOD 2, b) nivo enzima SOD 2 i c) aktivnost SOD 2 enzima] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. (n=10). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj SOD 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 88., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 88. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.811$; $p<0.01$.



Sl. 89. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.722$; $p<0.05$.

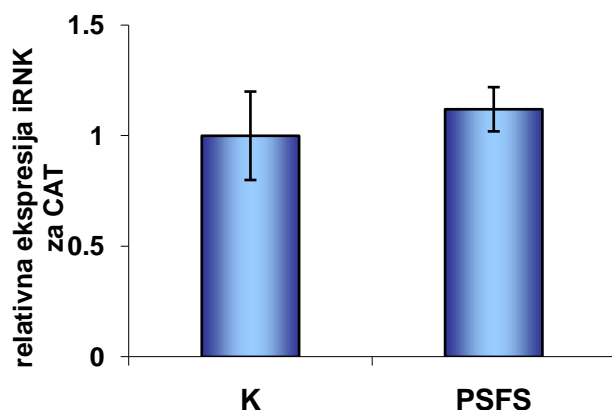
Na slici 89., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.

4.5.5. Uticaj ponavljanoг stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za katalazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

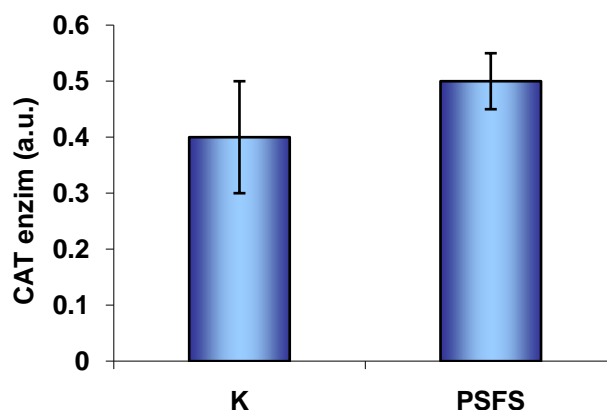
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja samo aktivnosti CAT enzima ($p < 0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS povećava aktivnost CAT enzima (sl. 90c.), dok su nivo iRNK za CAT gen (sl. 90a.) i količina enzima CAT (sl. 90b.) ostali nepromenjeni. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS aktivnost CAT enzima veća za 12% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)

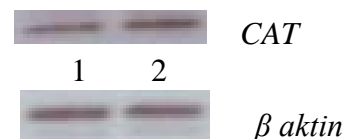
a)



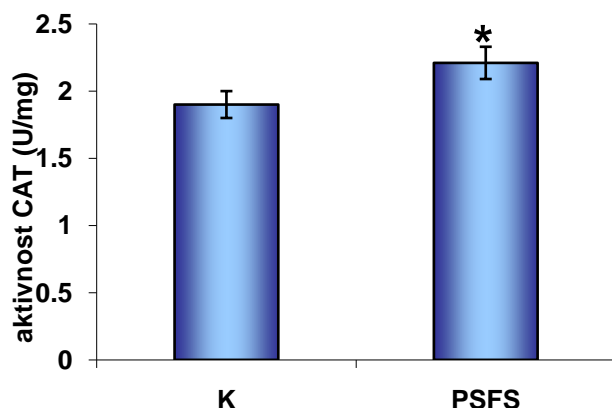
b)



2)



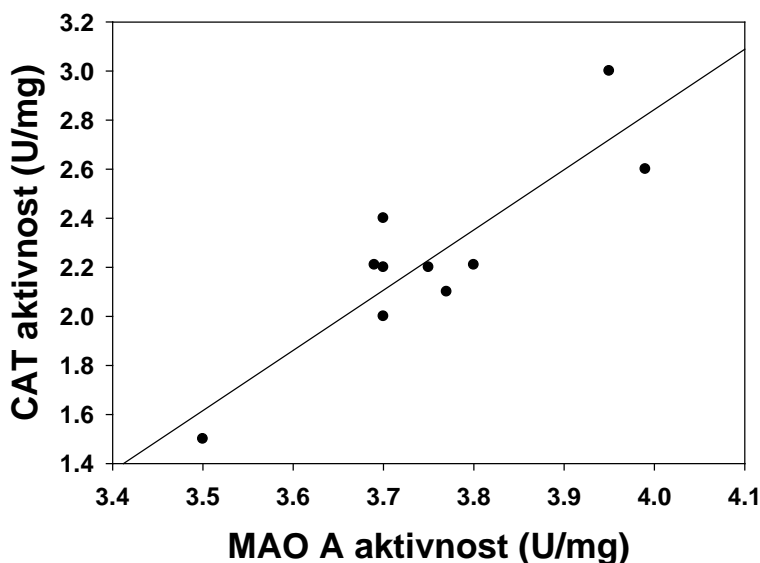
c)



Sl. 90. 1) Ekspresija gena za CAT [a) nivo iRNK za CAT, b) nivo enzima CAT i c) aktivnost CAT enzima] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. (n=10). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

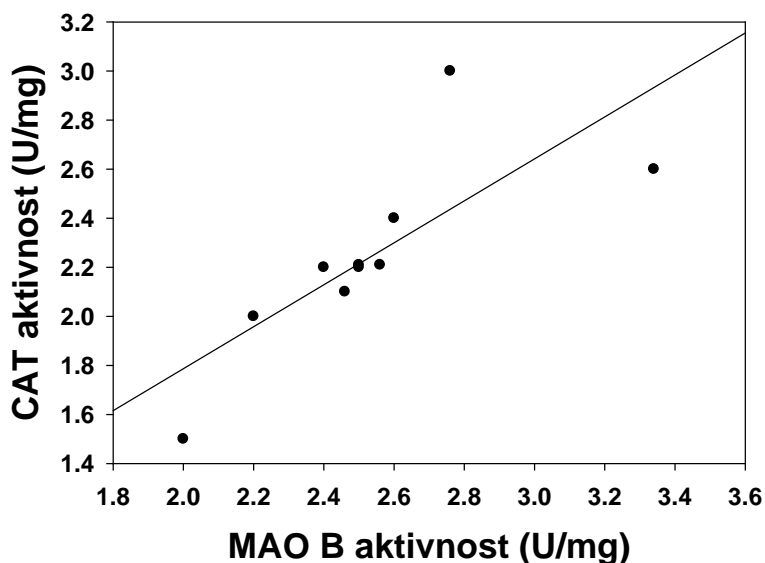
2) Sadržaj CAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 91., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



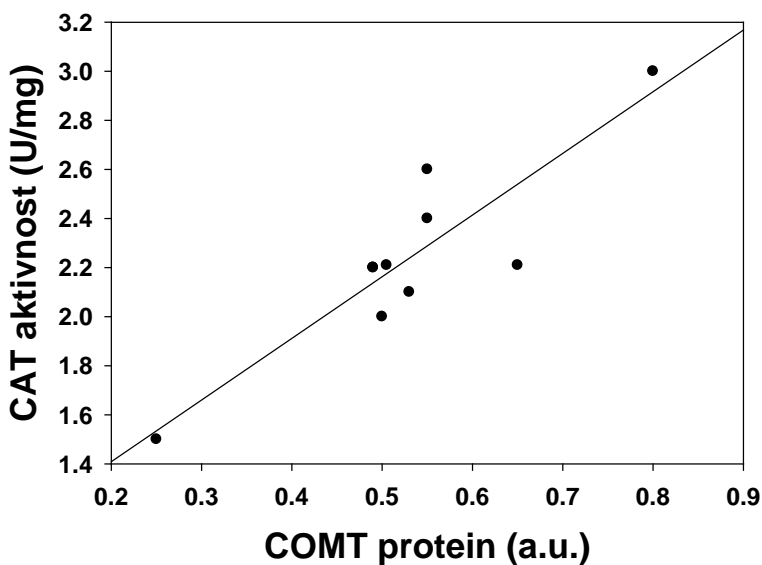
Sl. 91. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.877$; $p < 0.001$.

Na slici 92., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 92. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $\rho=0.778$; $p<0.01$.

Na slici 93., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



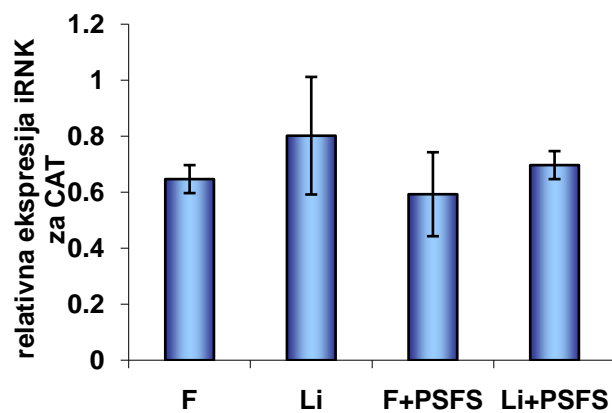
Sl. 93. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.891$; $p<0.001$.

4.5.6. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za katalazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljano stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

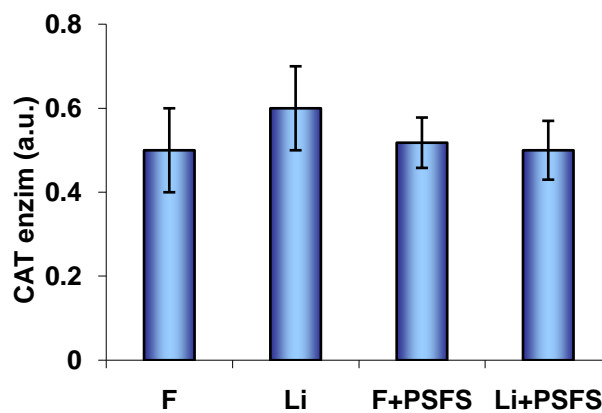
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti CAT enzima ($p < 0.05$), dok su nivo iRNK za CAT gen i količina CAT enzima ostali bez statistički značajnih promena.

1)

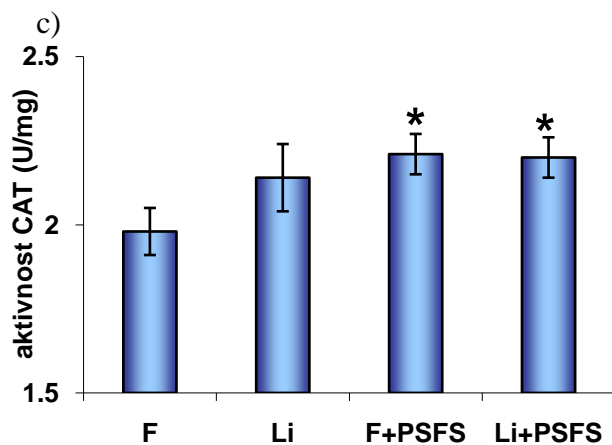
a)



b)



2)



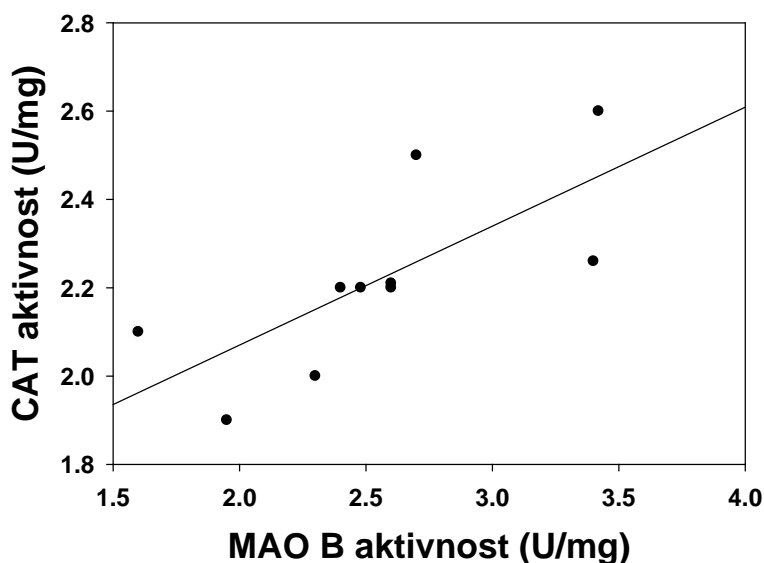
Sl. 94. 1) Ekspresija gena za CAT [a) nivo iRNK za CAT, b) nivo enzima CAT i c) aktivnost CAT enzima] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm

s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F).

2) Sadržaj CAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

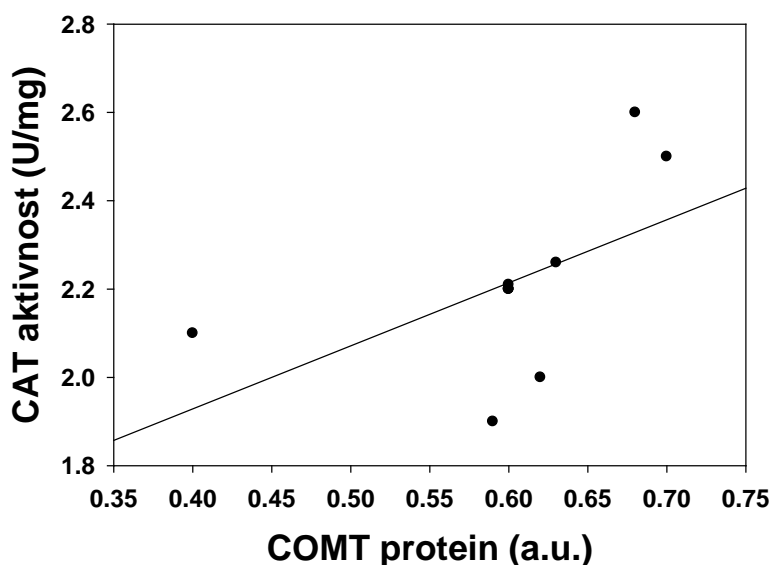
Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS i pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost CAT enzima veća je za 12% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F) (sl. 94c.). Litijum održava povećanu aktivnost CAT enzima kod pacova izlaganih PSFS (sl. 94c.).

Na slici 95., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 95. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.729$; $p=0.05$.

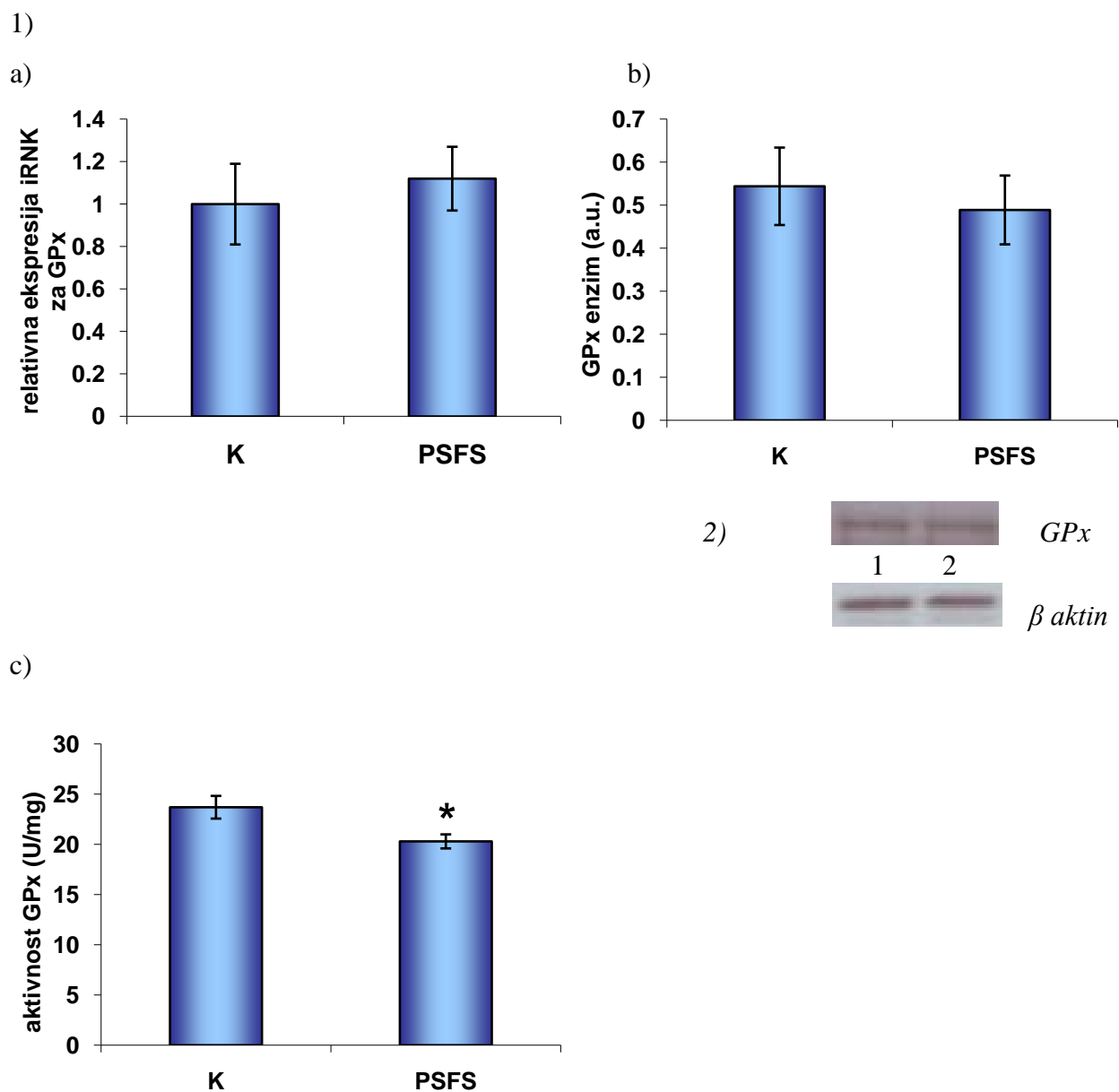
Na slici 96., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 96. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.753$; $p<0.01$.

4.5.7. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutathion peroksidazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 97a., 97b. i 97c., možemo zaključiti da PSFS utiče samo na smanjenje aktivnosti GPx enzima. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti GPx enzima ($p<0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS aktivnost GPx enzima manja za 15% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



Sl. 97. 1) Ekspresija gena za GPx [a) nivo iRNK za GPx, b) nivo enzima GPx i c) aktivnost GPx enzima] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

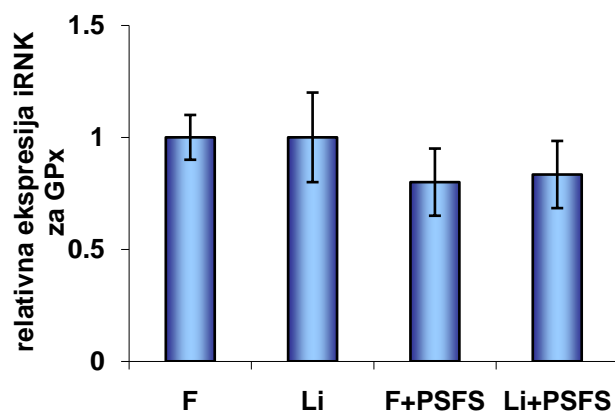
2) Sadržaj GPx proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

4.5.8. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutation peroksidazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

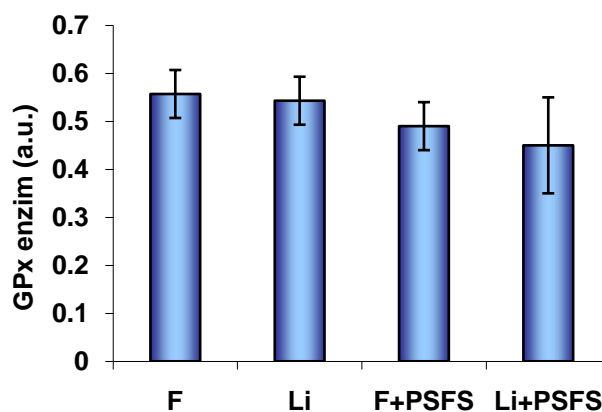
Na slici br. 98., možemo videti da je u prefrontalnom korteksu kod ispitivanih grupa došlo do statistički značajne promene samo aktivnosti GPx enzima.

1)

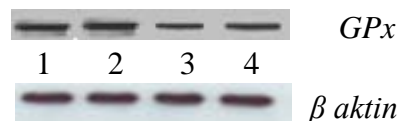
a)



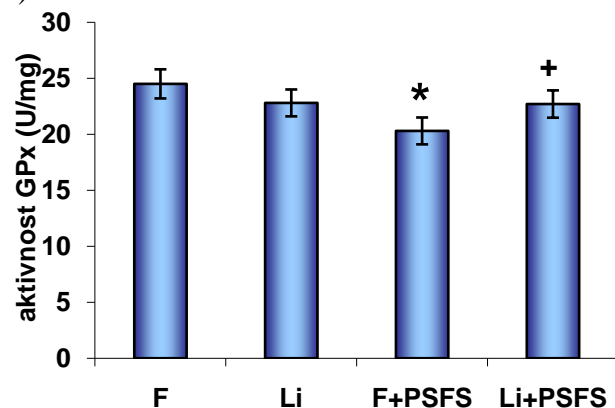
b)



2)



c)



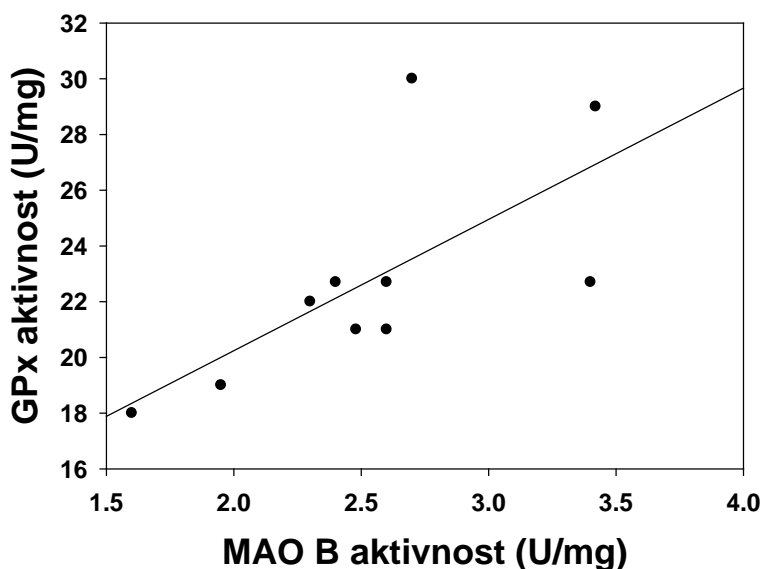
Sl. 98. 1) Ekspresija gena za GPx [a) nivo iRNK za GPx, b) nivo enzima GPx i c) aktivnost GPx enzima] u prefrontalnom korteksu kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). ±

s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj GPx proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

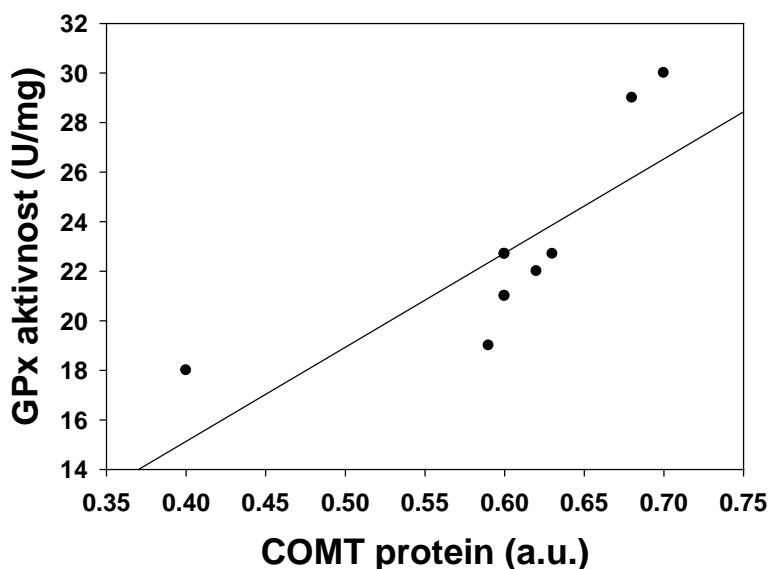
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti GPx enzima ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih F+PSFS aktivnost GPx enzima manja za 18% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Kod pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost GPx enzima je veća za 11% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

Na slici 99., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti GPx enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 99. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti GPx enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.686$; $p < 0.05$.

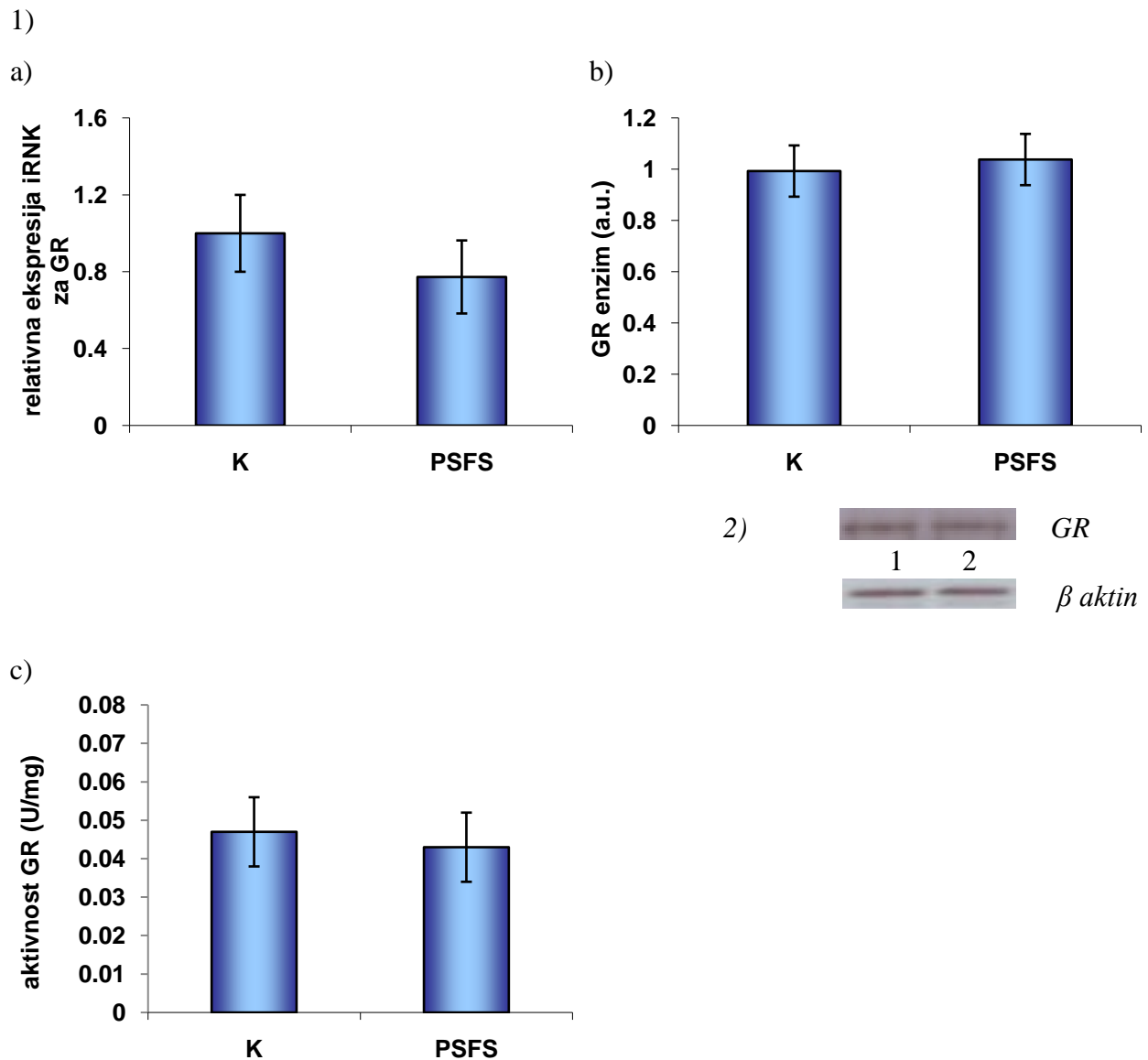
Na slici 100., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti GPx enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 100. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti GPx enzima u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.786$; $p=0.01$.

4.5.9. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutathion reduktazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

Dobijeni rezultati pokazuju da u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS nema statistički značajnih promena u ekspresiji GR enzima (sl. 101a., 101b. i 101c.).



Sl. 101. 1) Ekspresija gena za GR [a) nivo iRNK za GR, b) nivo enzima GR i c) aktivnost GR enzima] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$).

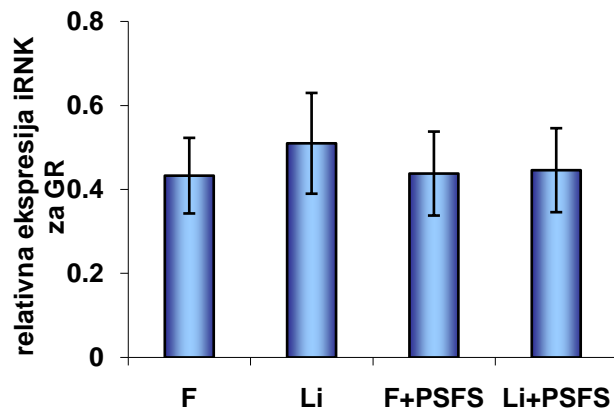
2) Sadržaj GR proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

4.5.10. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutation reduktazu u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

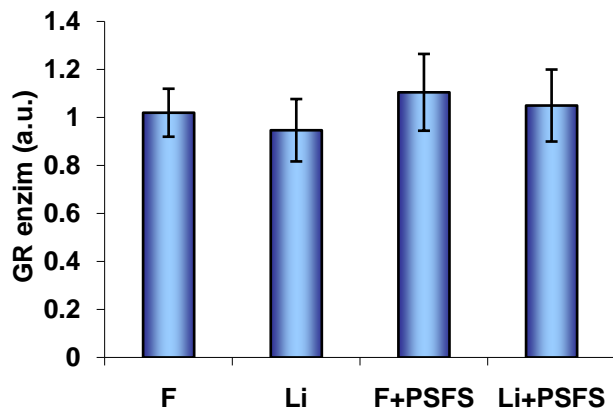
Na slikama 102a., 102b. i 102c., možemo uočiti da u prefrontalnom korteksu svih ispitivanih grupa nema statistički značajnih promena u ekspresiji GR enzima.

1)

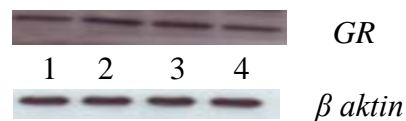
a)



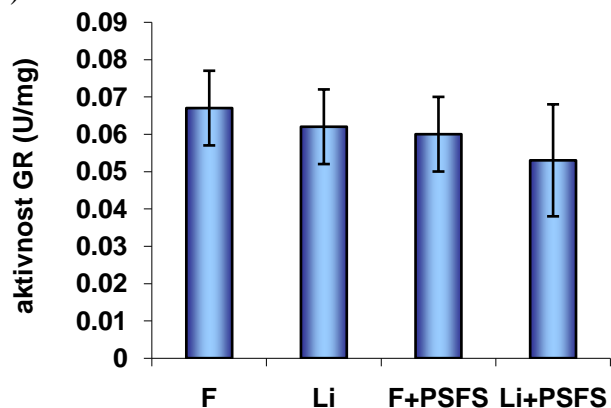
b)



2)



c)



Sl. 102. 1) Ekspresija gena za GR [a) nivo iRNK za GR, b) nivo enzima GR i c) aktivnost GR enzima] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. (n=10).

2) Sadržaj GR proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom

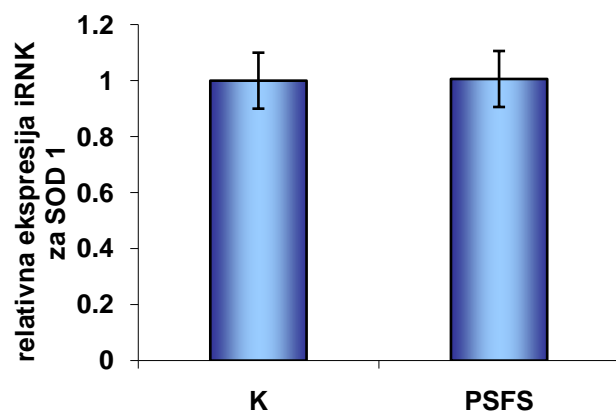
(*F+PSFS*) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (*Li+PSFS*).

4.5.11. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

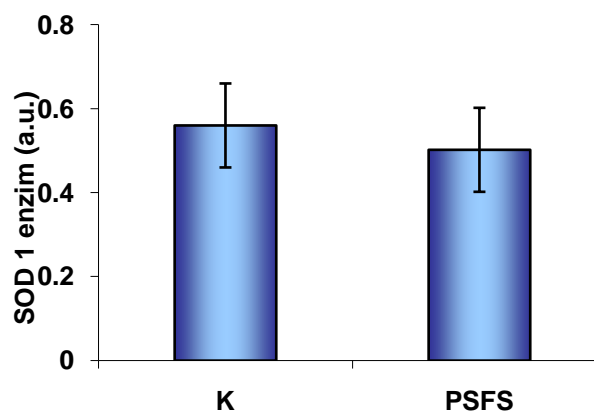
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja samo aktivnosti SOD 1 enzima ($p < 0.05$).

1)

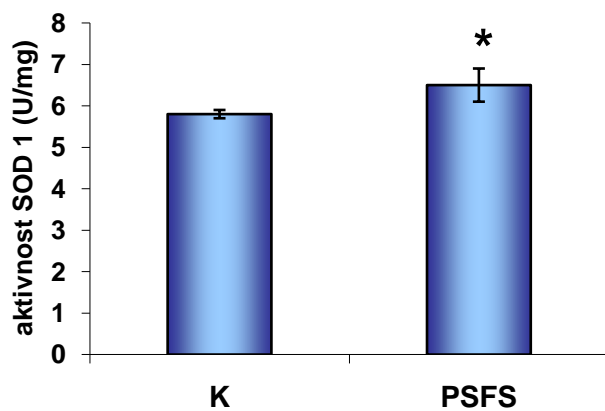
a)



b)



c)



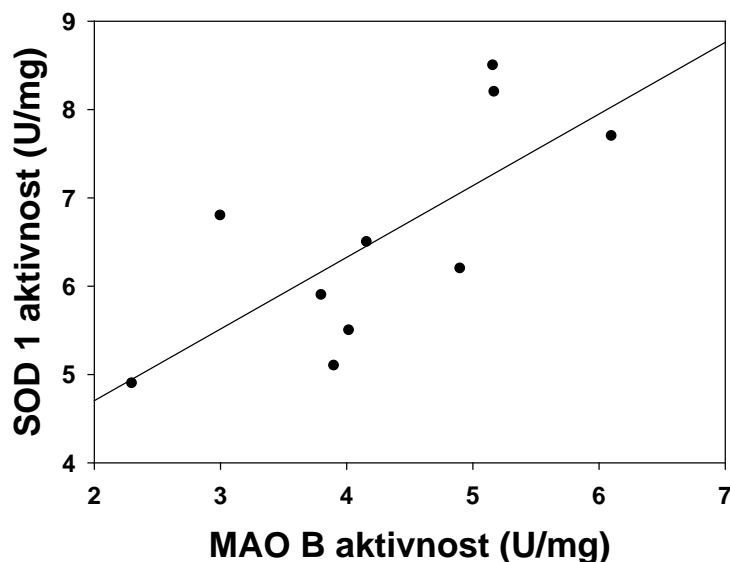
Sl. 103. 1) Ekspresija gena za SOD 1 [a) nivo iRNK za SOD 1, b) nivo enzima SOD 1 i c) aktivnost SOD 1 enzima] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana

ponavljjanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj SOD 1 proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljjanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

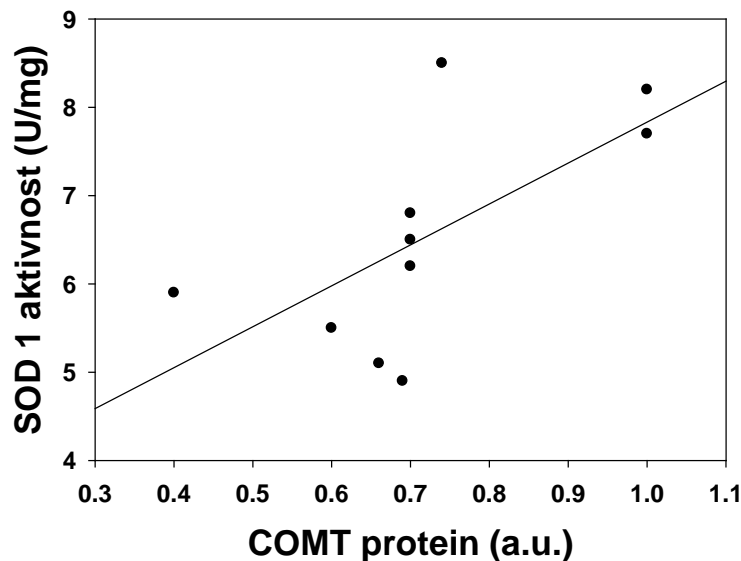
Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS aktivnost SOD 1 enzima veća za 12% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu (sl. 103c.).

Na slici 104., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 104. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.718$; $p < 0.05$.

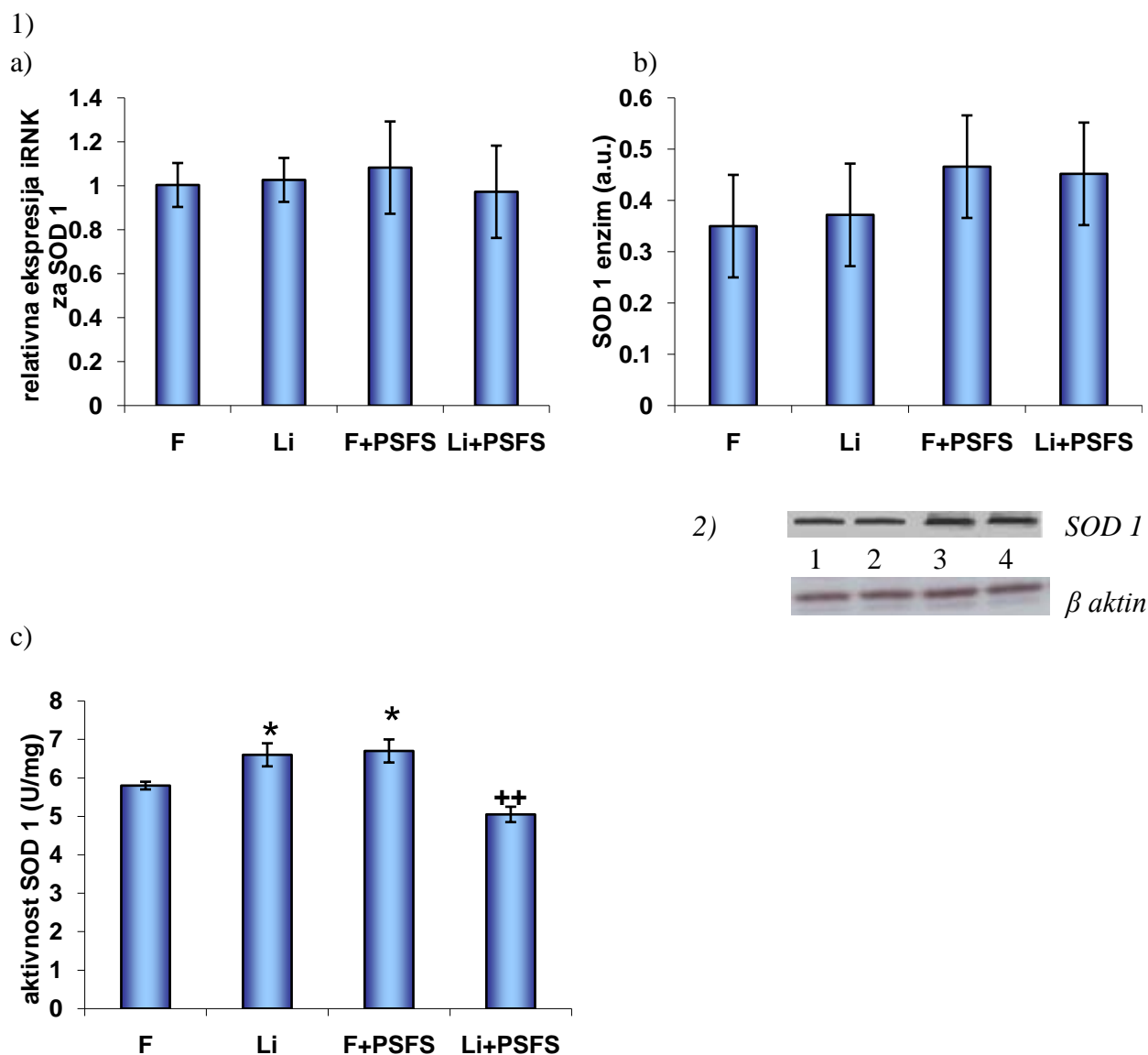
Na slici 105., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 105. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti SOD 1 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.646$; $p<0.05$.

4.5.12. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 1 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Na slici br. 106c., možemo videti da je u hipokampusu kod pacova tretiranih litijumom i pacova izlaganih F+PSFS aktivnost SOD 1 veća u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F), dok je kod pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost ispitivanog enzima manja u odnosu na pacove izlagane F+PSFS. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja samo aktivnosti SOD 1 enzima ($p<0.01$). Post-hoc analiza je pokazala da je aktivnost SOD 1 enzima u hipokampusu pacova tretiranih Li veća za 14% ($p<0.05$, Tukey test), a da je kod pacova izlaganih F+PSFS aktivnost veća za 15% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Kod pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost SOD 1 je manja za 25% ($p<0.01$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



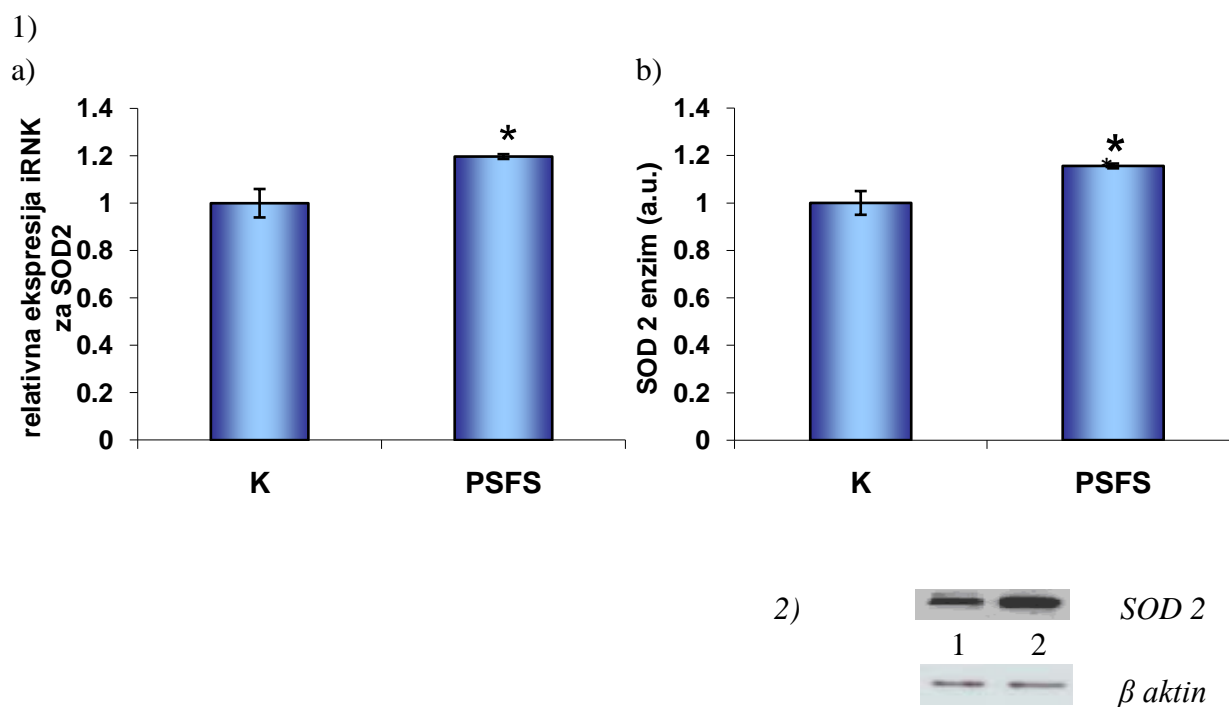
Sl. 106. 1) Ekspresija gena za SOD 1 [a) nivo iRNK za SOD 1, b) nivo enzima SOD 1 i c) aktivnost SOD 1 enzima] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{++} < 0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj SOD 1 proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom

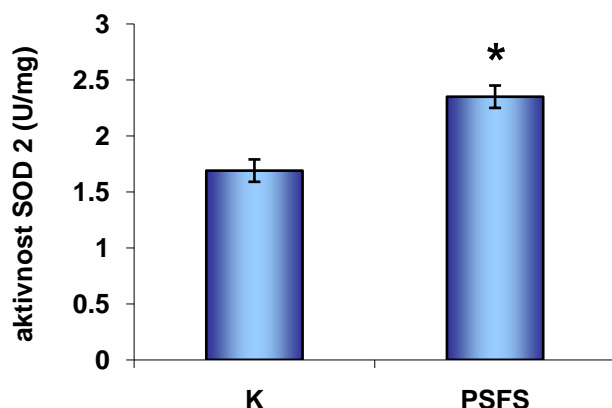
(F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

4.5.13. Uticaj ponavljnog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na povećanje ekspresije gena za SOD 2 (sl. 107.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja nivoa iRNK za SOD 2 ($p < 0.05$), količine SOD 2 enzima ($p < 0.05$) i aktivnosti SOD 2 enzima ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK veći za 19% ($p < 0.05$, Tukey test), količina SOD 2 enzima veća za 15% ($p < 0.05$, Tukey test), dok je aktivnost SOD 2 enzima veća za 39% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



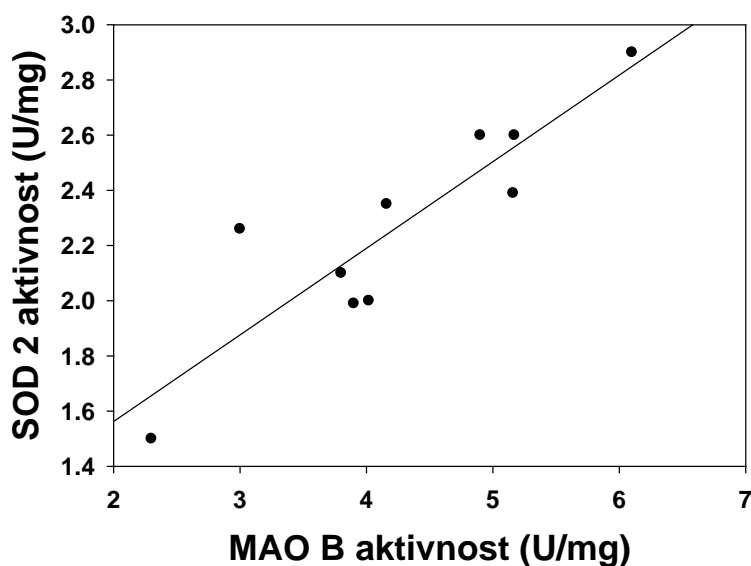
c)



Sl. 107. 1) Ekspresija gena za SOD 2 [a) nivo iRNK za SOD 2, b) nivo enzima SOD 2 i c) aktivnost SOD 2 enzima] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

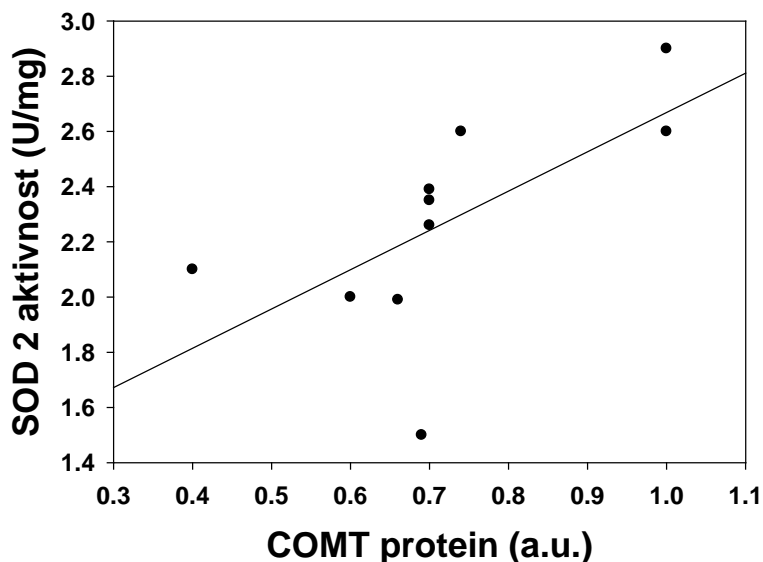
2) Sadržaj SOD 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 108., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 108. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.887$; $p < 0.001$.

Na slici 109., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



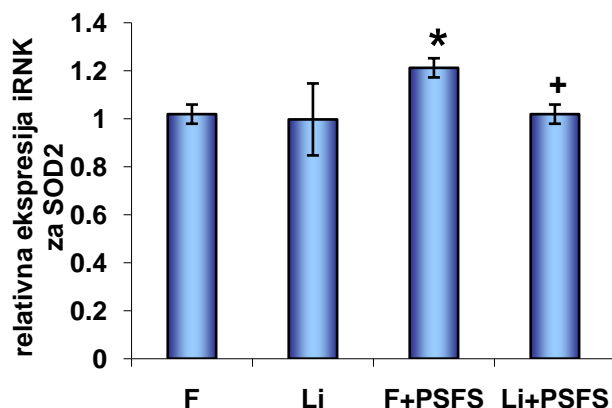
Sl. 109. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti SOD 2 enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.635$; $p=0.05$.

4.5.14. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za superoksid dismutazu 2 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

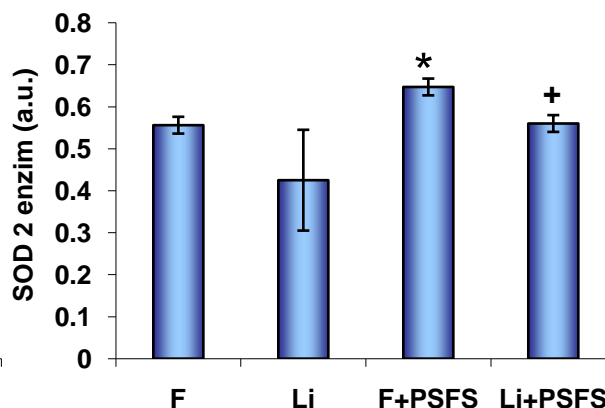
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za SOD 2 ($p<0.01$). Post-hoc analiza je pokazala da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za SOD 2 (sl. 110a.) veći za 12% ($p<0.05$, Tukey test), količina SOD 2 enzima (sl. 110b.) je veća za 16% ($p<0.05$, Tukey test), dok je aktivnost SOD 2 enzima veća za 24% ($p<0.01$, Tukey test) (sl. 110c.) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Međutim, kod pacova izlaganih Li+PSFS nivo iRNK za SOD 2 manji je za 16% ($p<0.05$, Tukey test), količina SOD 2 enzima manja je za 14% ($p<0.05$, Tukey test), dok je aktivnost SOD 2 enzima manja za 37% ($p<0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

1)

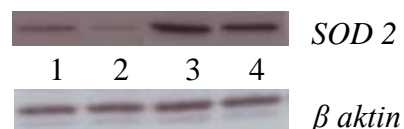
a)



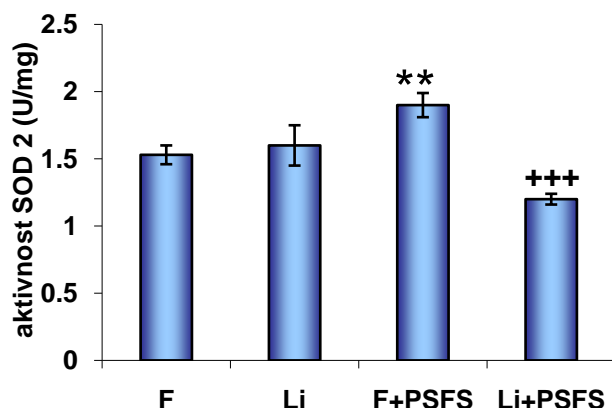
b)



2)



c)



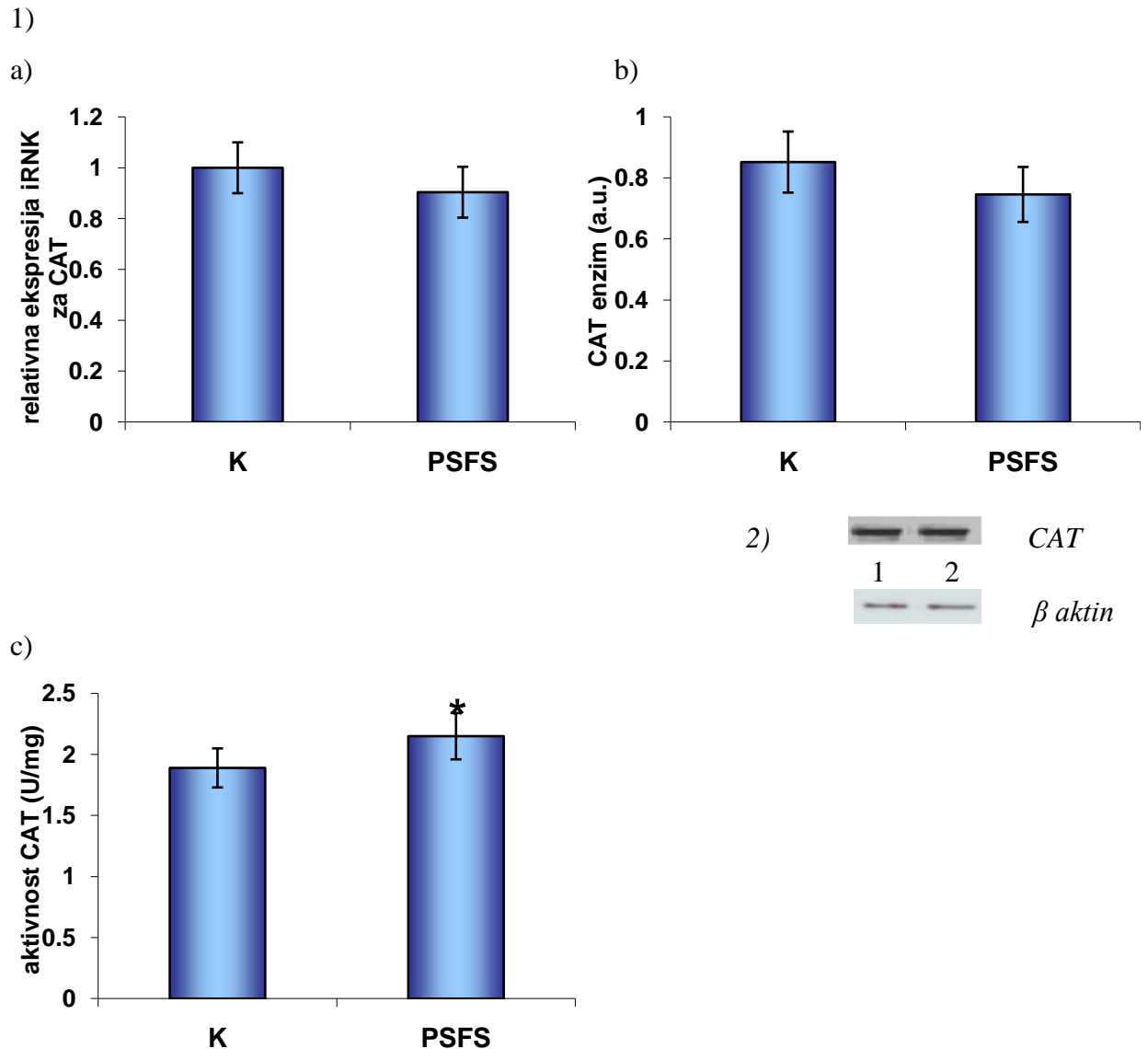
Sl. 110. 1) Ekspresija gena za SOD 2 [a) nivo iRNK za SOD 2, b) nivo enzima SOD 2 i c) aktivnost SOD 2 enzima] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na kontrolu svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj SOD 2 proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom

(F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

4.5.15. Uticaj ponavljnog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za katalazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče samo na aktivnost CAT enzima (sl. 111.).

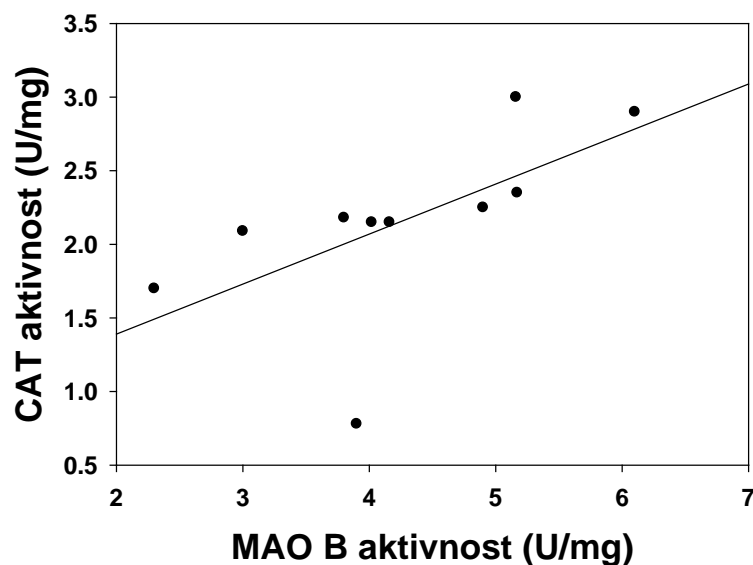


Sl. 111. 1) Ekspresija gena za CAT [a) nivo iRNK za CAT, b) nivo enzima CAT i c) aktivnost CAT enzima] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj CAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

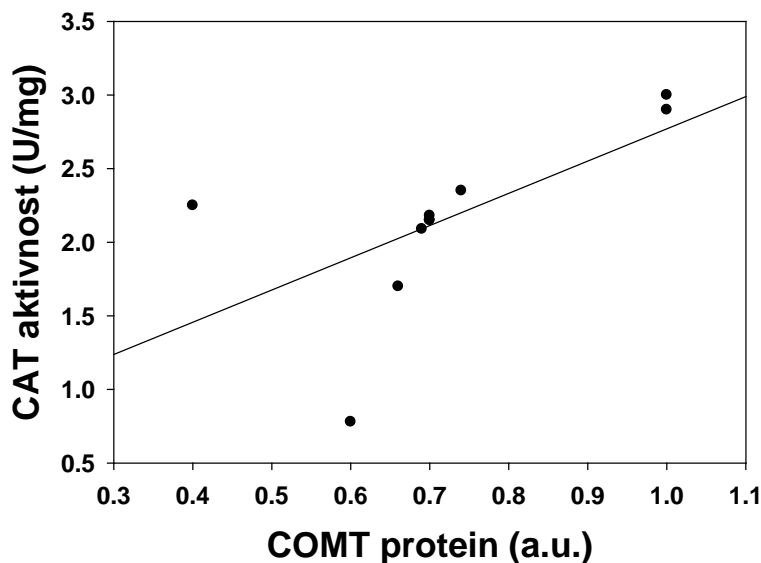
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja aktivnosti CAT enzima ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS aktivnost CAT enzima veća za 14% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu (sl. 111c.).

Na slici 112., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 112. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO B enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.636$; $p < 0.05$.

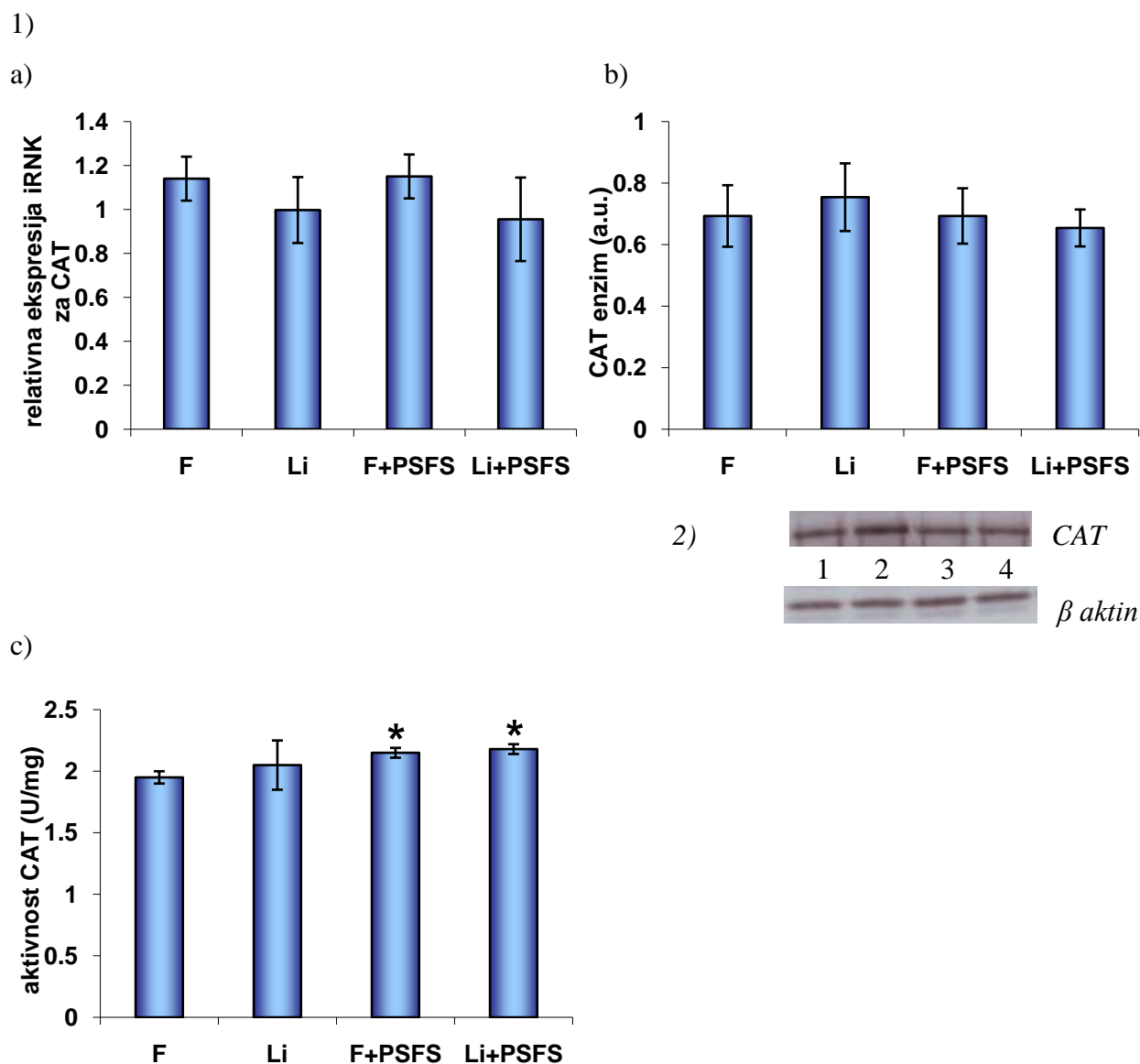
Na slici 113., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 113. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.637$; $p<0.05$.

4.5.16. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za katalazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

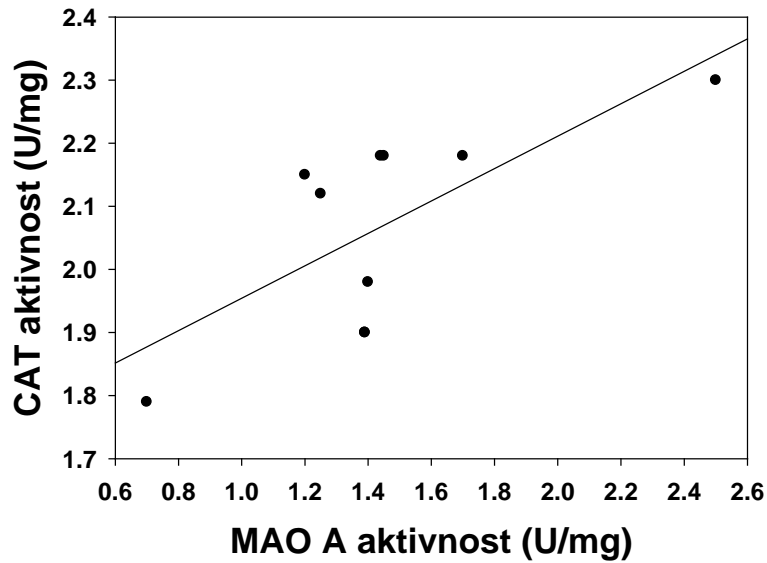
Na slici 114., možemo uočiti da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnih promena samo aktivnosti CAT enzima. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih F+PSFS aktivnost CAT enzima veća za 10% ($p<0.05$, Tukey test), dok je kod pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost ispitivanog enzima veća za 11% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F).



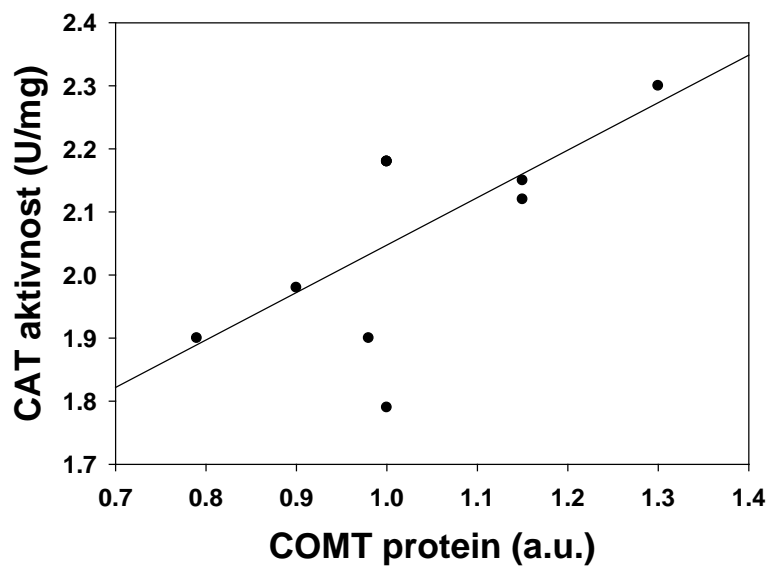
Sl. 114. 1) Ekspresija gena za CAT [a) nivo iRNK za CAT, b) nivo enzima CAT i c) aktivnost CAT enzima] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F).

2) Sadržaj CAT proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljano stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 115., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 115. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.708$; $p<0.05$.



Sl. 116. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.653$; $p<0.05$.

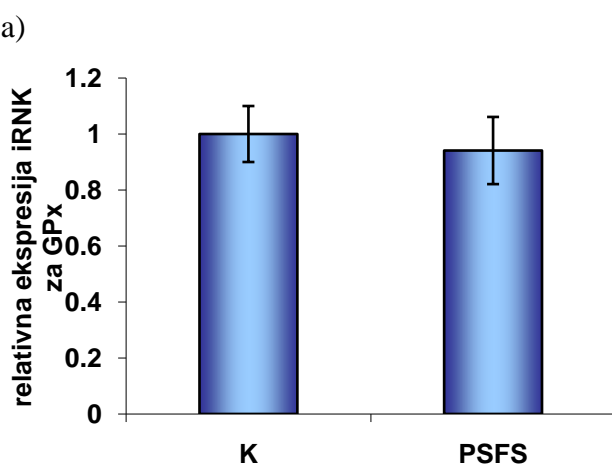
Na slici 116., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti CAT enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.

4.5.17. Uticaj ponavljanoog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutation peroksidazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

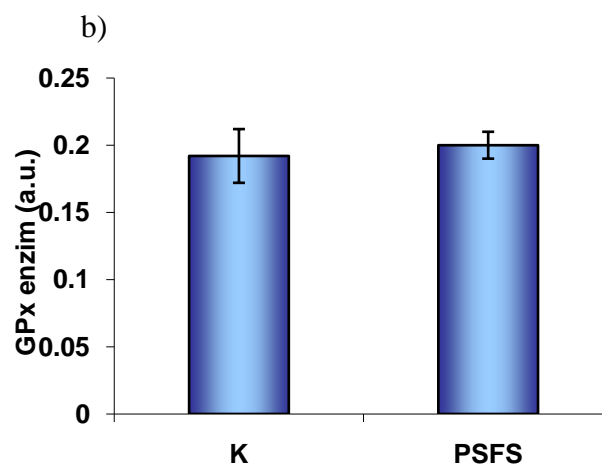
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja samo aktivnosti GPx enzima ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS aktivnost GPx enzima manja za 28% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu (sl. 117.).

1)

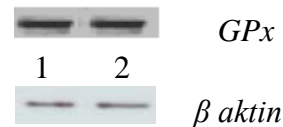
a)



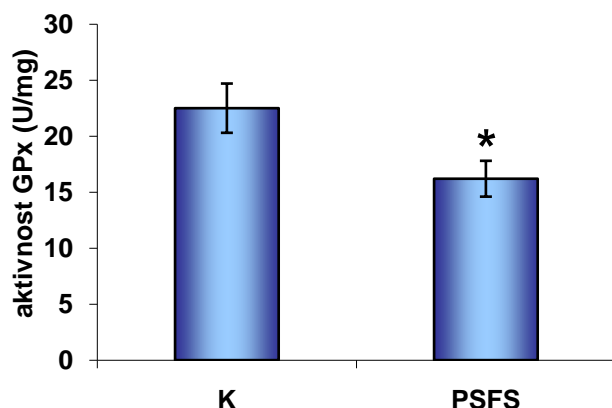
b)



2)



c)

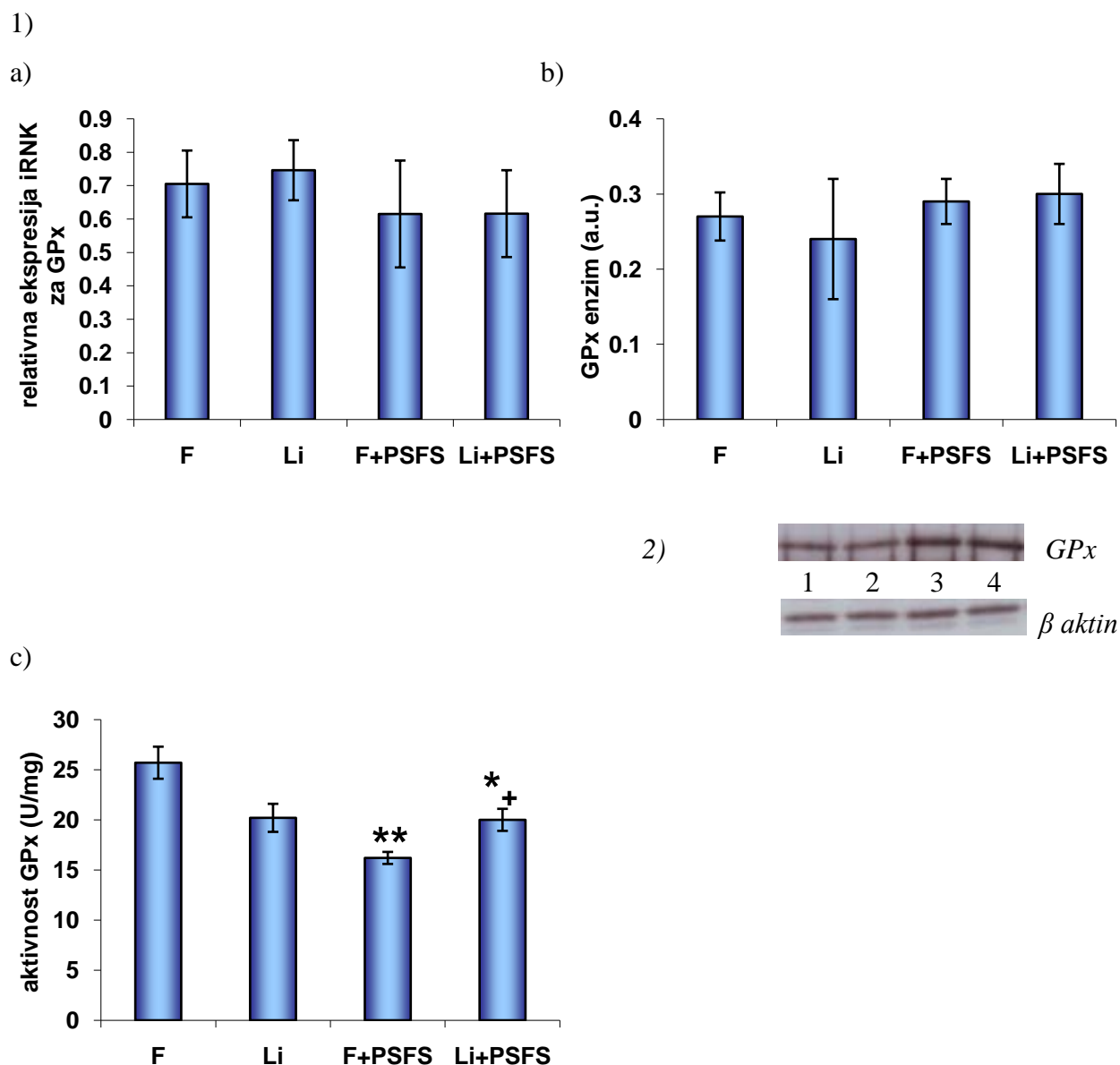


Sl. 117. 1) Ekspresija gena za GPx [a) nivoio iRNK za GPx, b) nivo enzima GPx i c) aktivnost GPx enzima] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj GPx proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

4.5.18. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutathion peroksidazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja samo aktivnosti GPx enzima ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS aktivnost GPx enzima manja za 37% ($p < 0.05$, Tukey test), dok je kod pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost GPx enzima manja za 30% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Međutim, kod pacova izlaganih Li+PSFS aktivnost GPx enzima veća je za 23% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS (sl. 118.).

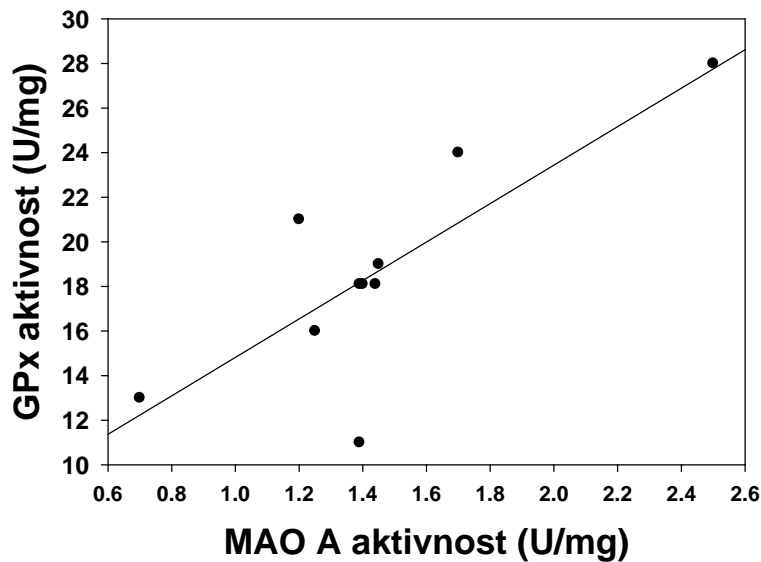


Sl. 118. 1) Ekspresija gena za GPx [a) nivo iRNK za GPx, b) nivo enzima GPx i c) aktivnost GPx enzima] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

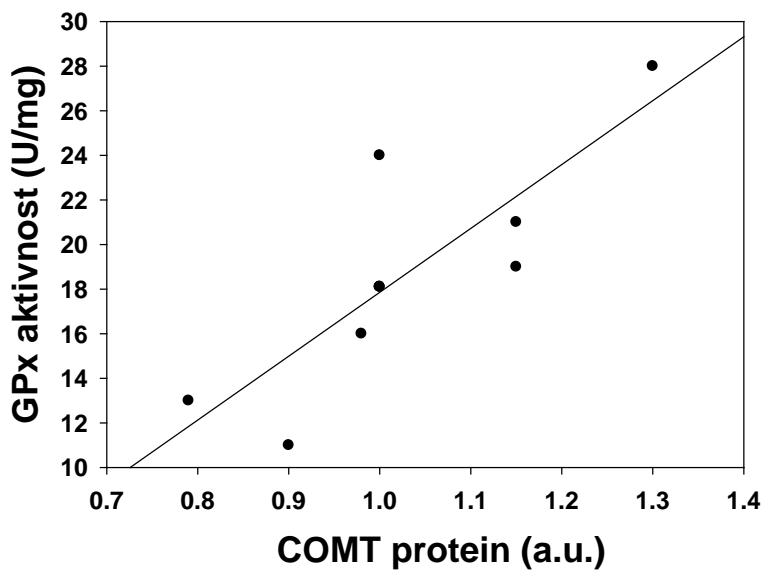
2) Sadržaj GPx proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom

(*F+PSFS*) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (*Li+PSFS*).

Na slici 119., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti GPx enzima u hipokampusu pacova izlaganih *Li+PSFS*.



Sl. 119. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti GPx enzima u hipokampusu pacova izlaganih *Li+PSFS*, $R=0.788$; $p<0.01$.



Sl. 120. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti GPx enzima u hipokampusu pacova izlaganih *Li+PSFS*, $R=0.824$; $p<0.01$.

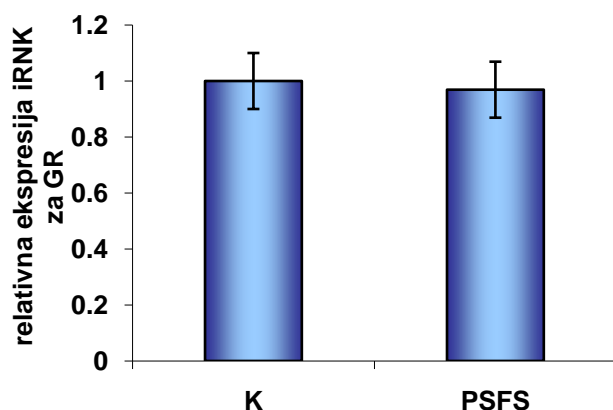
Na slici 120., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti GPx enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.

4.5.19. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za glutation reduktazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

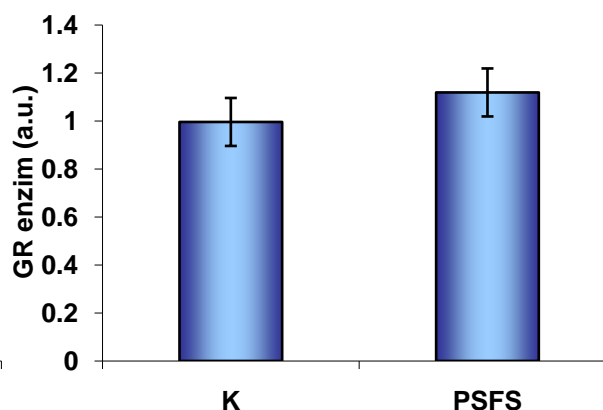
Dobijeni rezultati pokazuju da u hipokampusu pacova izlaganih PSFS ne dolazi do statistički značajnih promena ekspresije GR enzima (sl. 121a., 121b. i 121c.).

1)

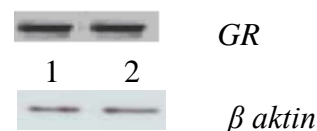
a)



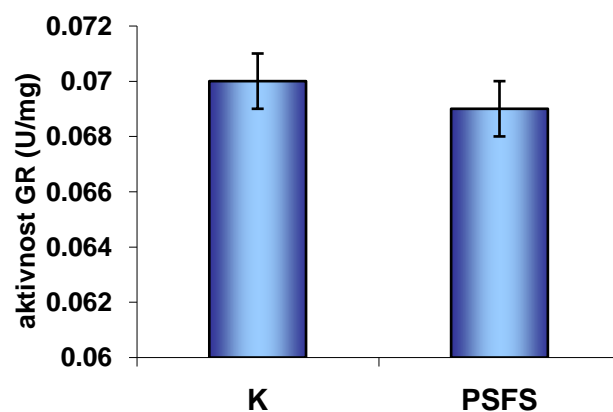
b)



2)



c)



Sl. 121. 1) Ekspresija gena za GR [a) nivo iRNK za GR, b) nivo enzima GR i c) aktivnost GR enzima] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. (n=10).

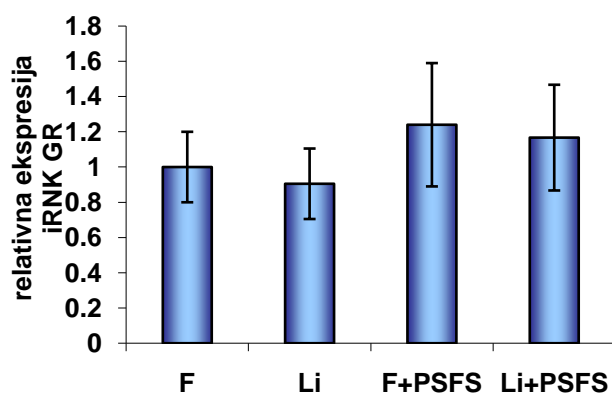
2) Sadržaj GR proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

4.5.20. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za glutation reduktazu u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

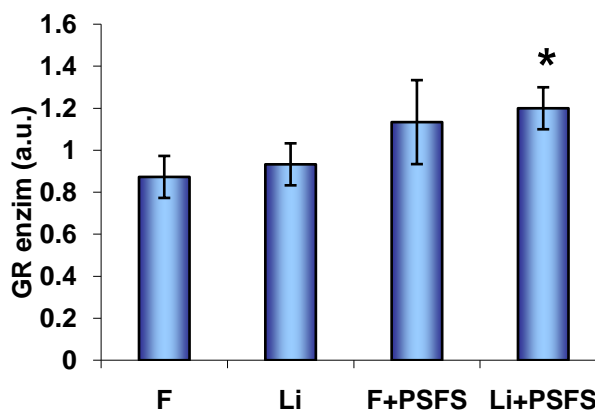
Na slikama 122b. i 122c., možemo uočiti da u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS dolazi do statistički značajnih promena količine i aktivnosti GR enzima. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih Li+PSFS količina GR enzima veća za 37% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova svakodnevno izlaganih PSFS povećava aktivnost GR enzima za 27% ($p < 0.001$, Tukey test).

1)

a)

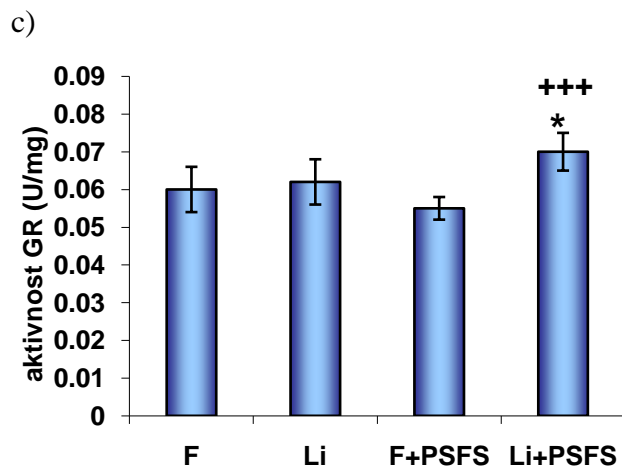


b)



2)

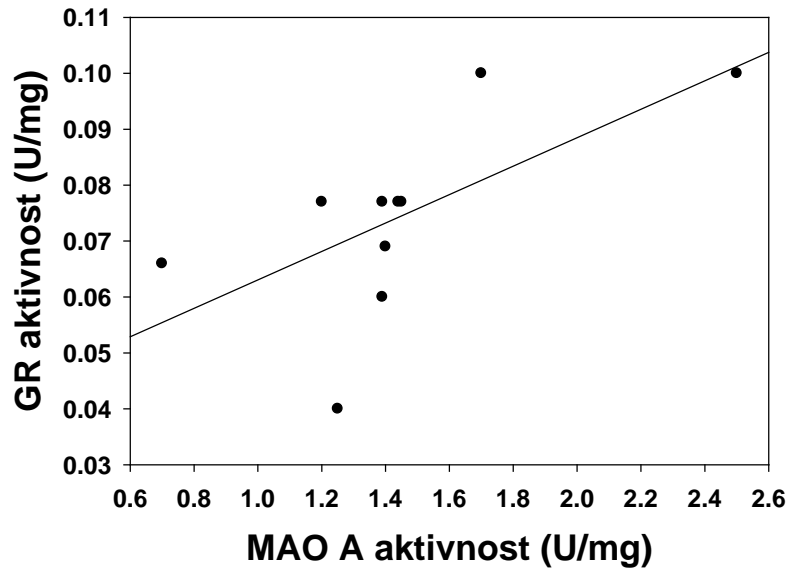




Sl. 122. 1) Ekspresija gena za GR [a) nivo iRNK za GR, b) nivo enzima GR i c) aktivnost GR enzima] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

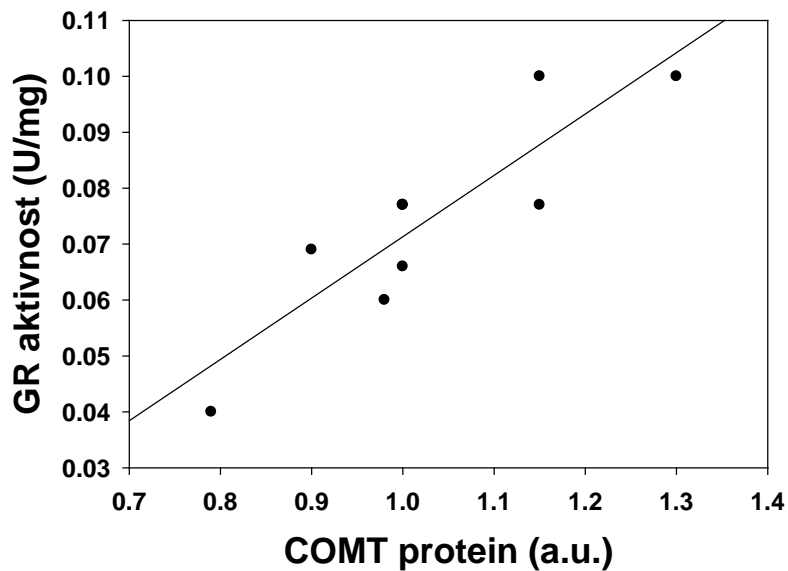
2) Sadržaj GR proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 123., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti GR enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 123. Pozitivna korelacija u nivou aktivnosti MAO A enzima i aktivnosti GR enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.648$; $p<0.05$.

Na slici 124., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine COMT enzima i aktivnosti GR enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 124. Pozitivna korelacija u nivou sinteze COMT enzima i aktivnosti GR enzima u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.881$; $p<0.001$.

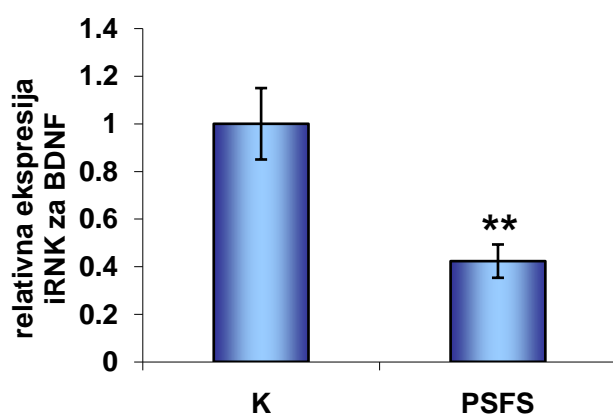
4.6. Delovanje litijuma na ekspresiju transkripcionog faktora BDNF u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

4.6.1. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za BDNF u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova

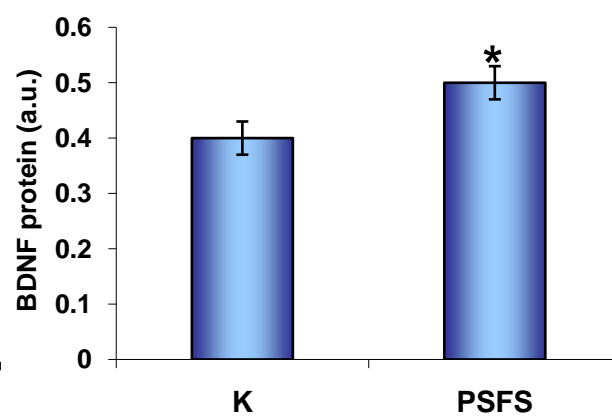
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za BDNF ($p < 0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS smanjuje nivo iRNK za BDNF (sl. 125a.) i povećava količinu BDNF proteina (sl. 125b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za BDNF manji za 50% ($p < 0.01$, Tukey test), dok je količina BDNF proteina veća za 25% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)

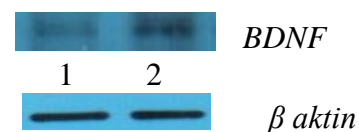
a)



b)



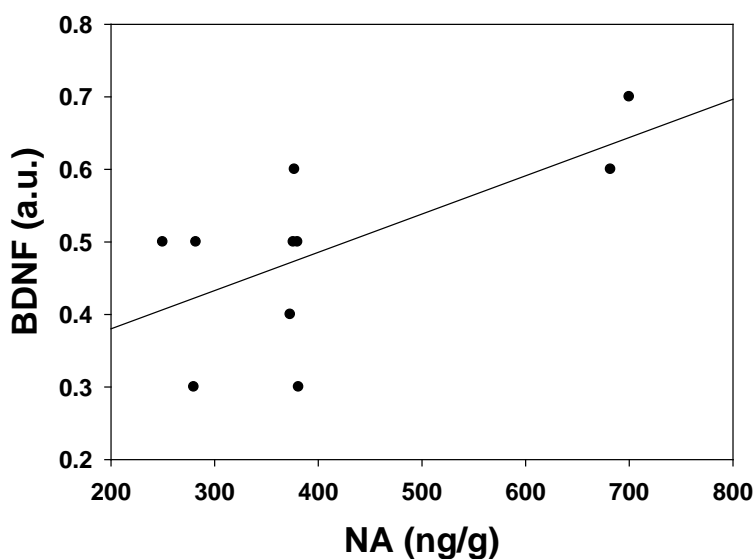
2)



Sl. 125. 1) Ekspresija gena za BDNF [a) nivo iRNK za BDNF; b) nivo proteina BDNF] u prefrontalnom korteksu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj BDNF proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

Na slici 126., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa BDNF proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS.



Sl. 126. Pozitivna korelacija u nivou sinteze BDNF proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih PSFS, $R=0.644$; $p<0.05$.

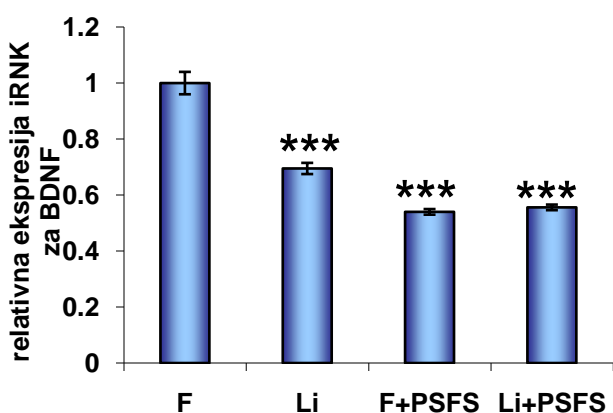
4.6.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za BDNF u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Dobijeni rezultati pokazuju da je u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za BDNF (sl. 127a.) smanjen, dok je količina BDNF proteina (sl. 127b.) povećana u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS smanjuje nivo iRNK za BDNF, a količinu BDNF proteina vraća na kontrolni nivo. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za BDNF ($p<0.001$). Post-hoc analiza je pokazala da je u prefrontalnom korteksu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) nivo iRNK za BDNF manji za 30% ($p<0.001$, Tukey test), dok je količina BDNF

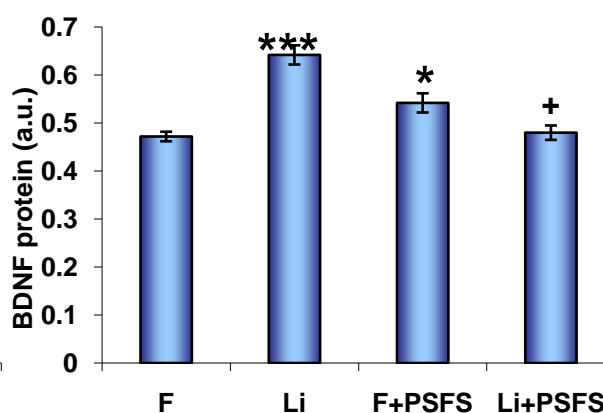
proteina veća za 36% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U prefrontalnom korteksu pacova izlaganih F+PSFS i pacova izlaganih Li+PSFS nivi iRNK za BDNF su manji za 50% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je količina BDNF proteina kod pacova izlaganih F+PSFS veća za 14% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS smanjuje količinu BDNF proteina za 15% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

1)

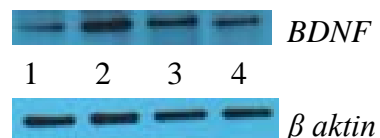
a)



b)



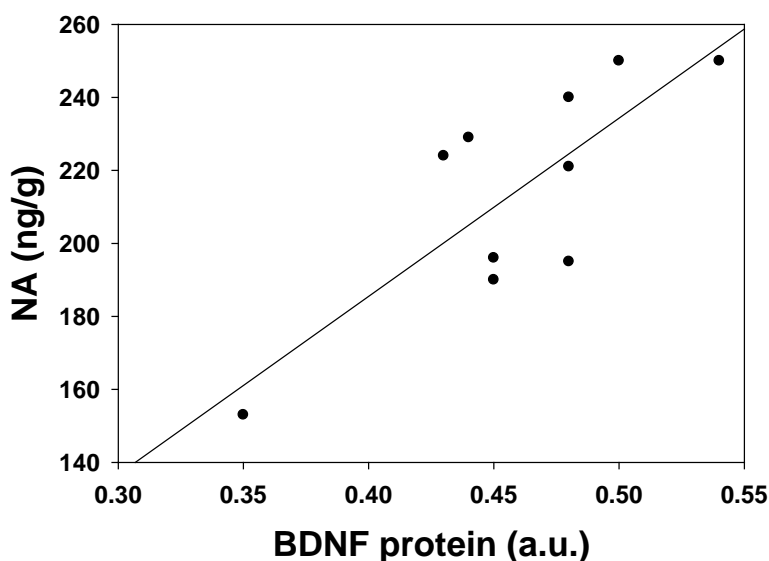
2)



Sl. 127. 1) Ekspresija gena za BDNF [a) nivo iRNK za BDNF; b) nivo proteina BDNF] u prefrontalnom korteksu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

2) Sadržaj BDNF proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanim stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 128., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između nivoa BDNF proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS.



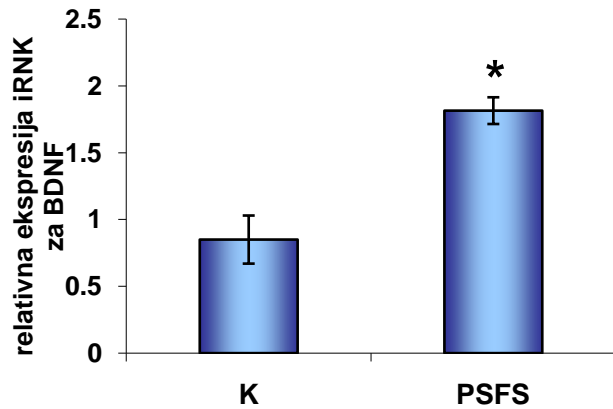
Sl. 128. Pozitivna korelacija u nivou sinteze BDNF proteina i koncentracije NA u prefrontalnom korteksu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.794$; $p<0.01$.

4.6.3. Uticaj ponavljalog stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za BDNF u hipokampusu odraslih mužjaka pacova

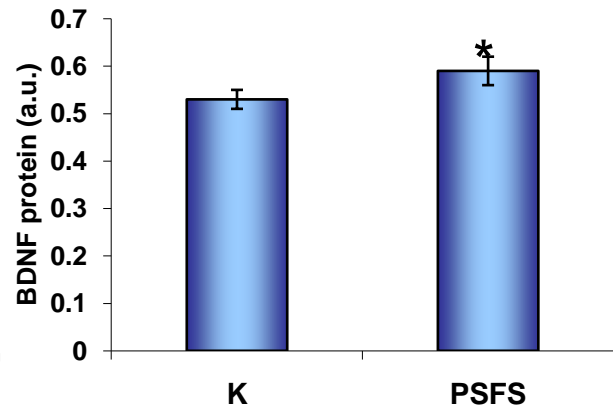
Rezultati prikazani na slici 129., predstavljaju ekspresiju gena za BDNF u hipokampusu pacova izlaganih PSFS. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova ispitivane grupe došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za BDNF ($p<0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS utiče na povećanje nivoa iRNK za BDNF (sl. 129a.) i povećanje nivoa BDNF proteina (sl. 129b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS nivo iRNK za BDNF veći za 113% ($p<0.05$, Tukey test), dok je količina BDNF proteina veća za 11% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.

1)

a)



b)

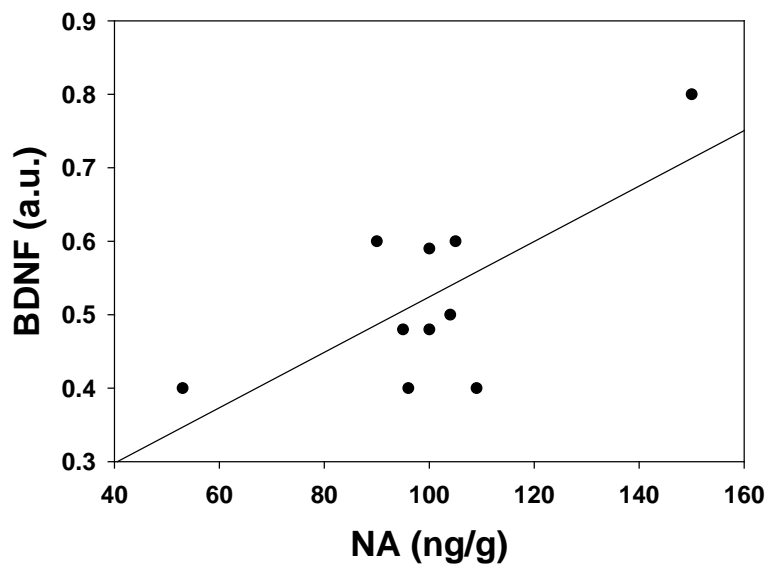


2)



Sl. 129. 1) Ekspresija gena za BDNF [a) nivo iRNK za BDNF; b) nivo proteina BDNF] u hipokampusu intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

2) Sadržaj BDNF proteina meren Western blot analizom kod: 1) intaktnih kontrola (K) i 2) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS).

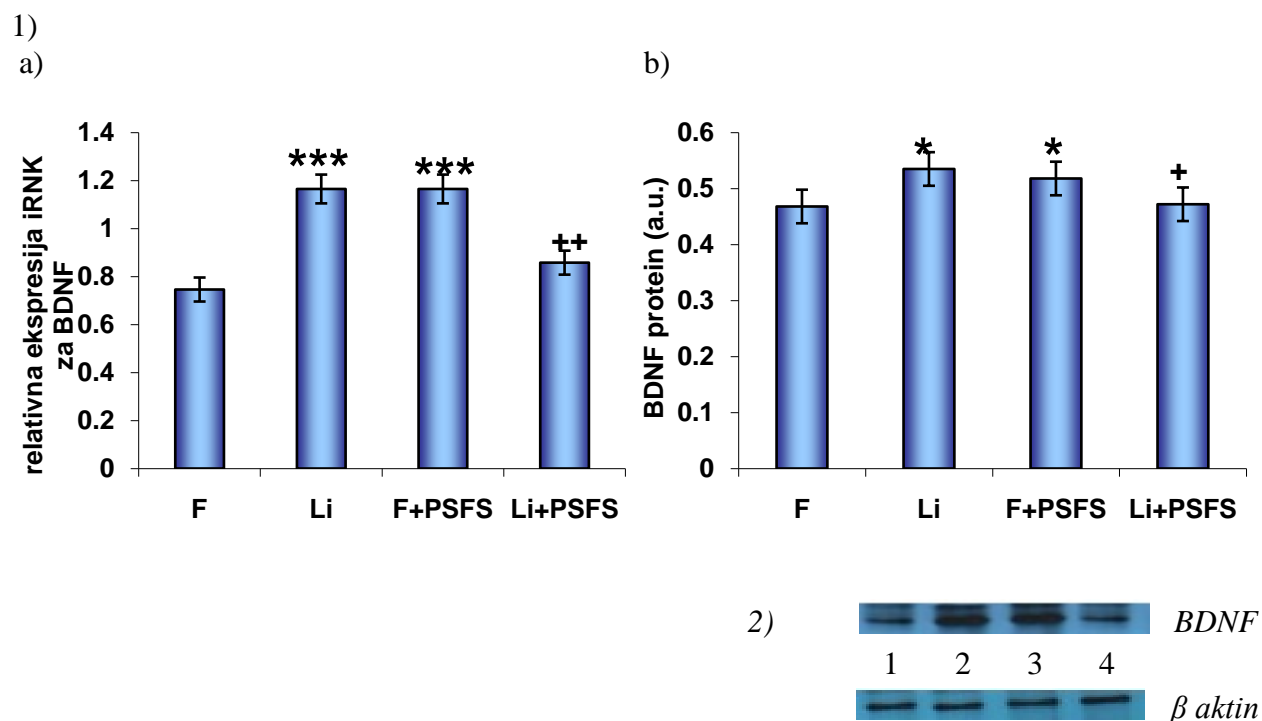


Sl. 130. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA i sinteze BDNF proteina u hipokampusu pacova izlaganih PSFS, $R=0.704$; $p < 0.05$.

Na slici 130., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA i količine BDNF proteina u hipokampusu pacova izlaganih PSFS.

4.6.4. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za BDNF u hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

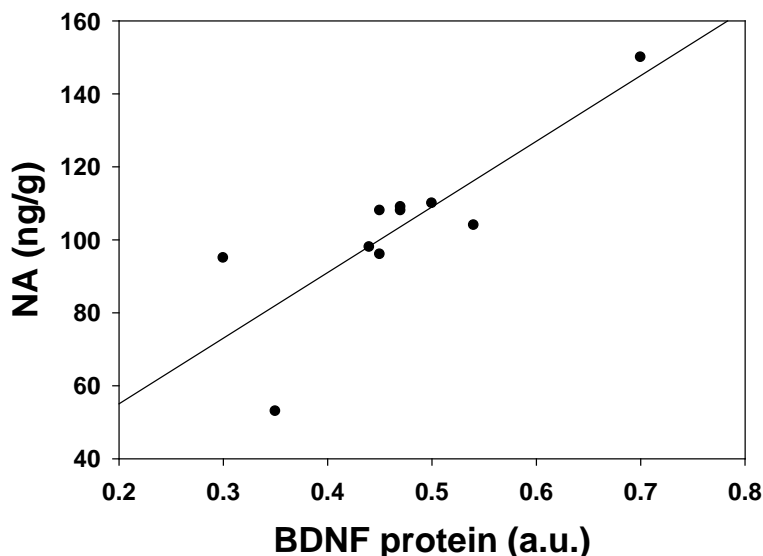
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u hipokampusu pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja ekspresije gena za BDNF ($p < 0.001$). Dobijeni rezultati pokazuju da su u hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za BDNF (sl. 131a.) i količina BDNF proteina (sl. 131b.) povećani u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS vraća nivo iRNK za BDNF i količinu BDNF proteina na kontrolne nivoe. Post-hoc analiza je pokazala da je u hipokampusu pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) nivo iRNK za BDNF veći za 56% ($p < 0.001$, Tukey test), a da je količina BDNF proteina veća za 14% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). U hipokampusu pacova izlaganih F+PSFS nivo iRNK za BDNF veći je za 56% ($p < 0.001$, Tukey test), a količina BDNF proteina veća je za 10% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS smanjuje nivo iRNK za BDNF za 36% ($p < 0.01$, Tukey test), a količinu BDNF proteina smanjuje za 10% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl. 131. A) Ekspresija gena za BDNF [a) nivo iRNK za BDNF; b) nivo proteina BDNF] u hipokampusu: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{++} < 0.01$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

B) Sadržaj BDNF proteina meren Western blot analizom kod: 1) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), 2) pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), 3) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i 4) pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS).

Na slici 132., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine BDNF proteina i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS.

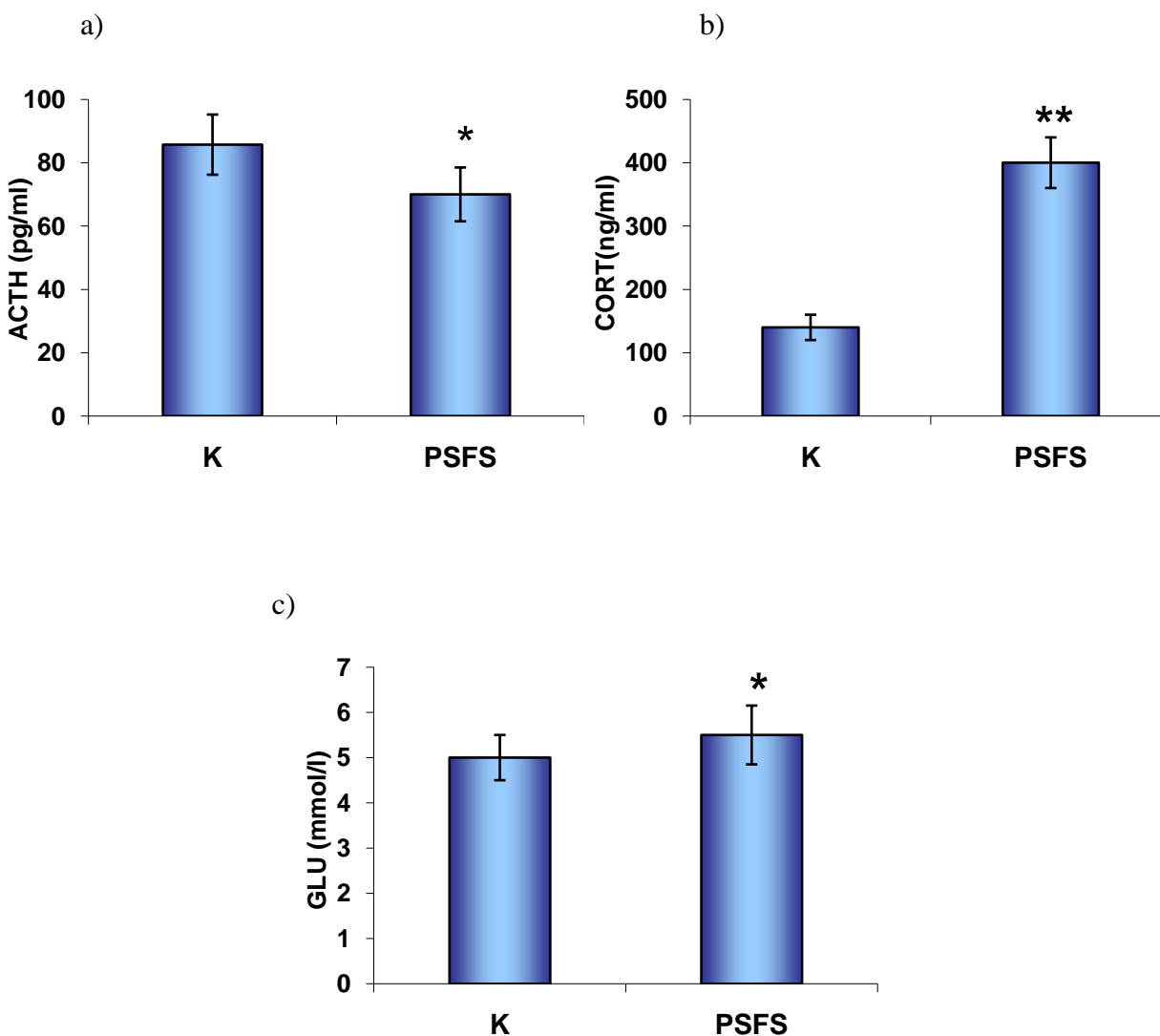


Sl. 132. Pozitivna korelacija u nivou sinteze BDNF proteina i koncentracije NA u hipokampusu pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.820$; $p<0.01$.

4.7. Delovanje litijuma na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

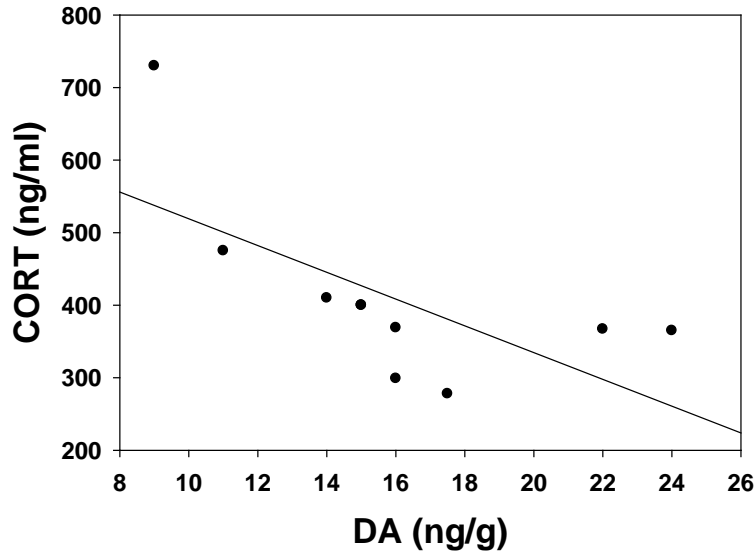
4.7.1. Uticaj ponavljanoг stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u plazmi pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja koncentracije ACTH ($p<0.05$), CORT ($p<0.01$) i GLU ($p<0.05$). Na slici 133., može se uočiti da je u plazmi pacova izlaganih PSFS smanjena koncentracija ACTH (sl. 133a.), a da su koncentracije CORT (sl. 133b.) i GLU (sl. 133c.) povećane u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS koncentracija ACTH manja za 18% ($p<0.05$, Tukey test), dok je koncentracija CORT veća za 280% ($p<0.01$, Tukey test), a da je koncentracija GLU veća za 10% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



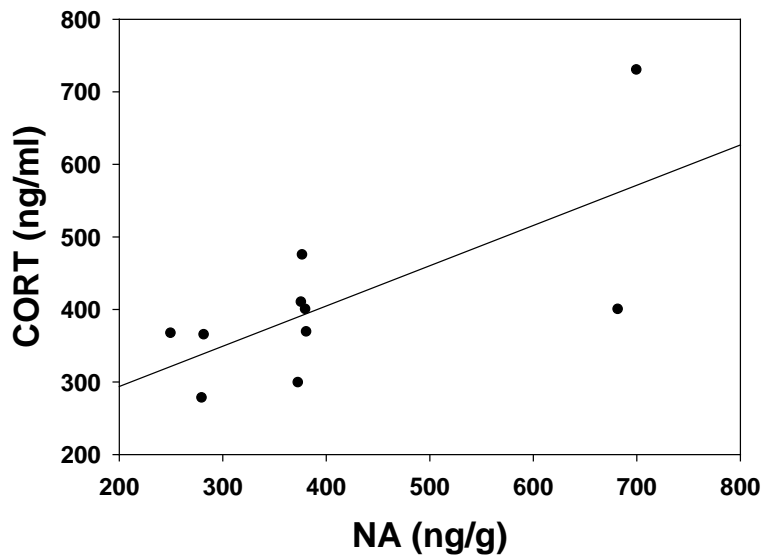
Sl. 133. Koncentracija a) ACTH (pg/ml), b) CORT (ng/ml) i c) GLU (mmol/l) u plazmi intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

Na slici 134., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS.



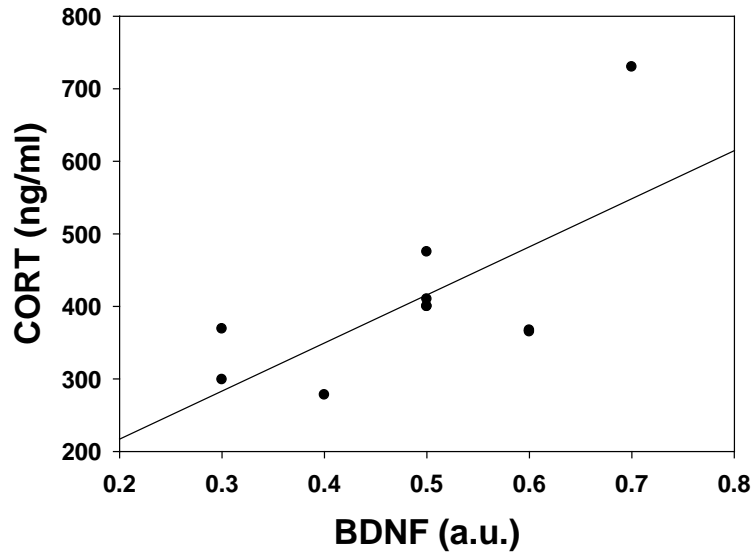
Sl. 134. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS, $R=-0.661$; $p<0.05$.

Na slici 135., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS.



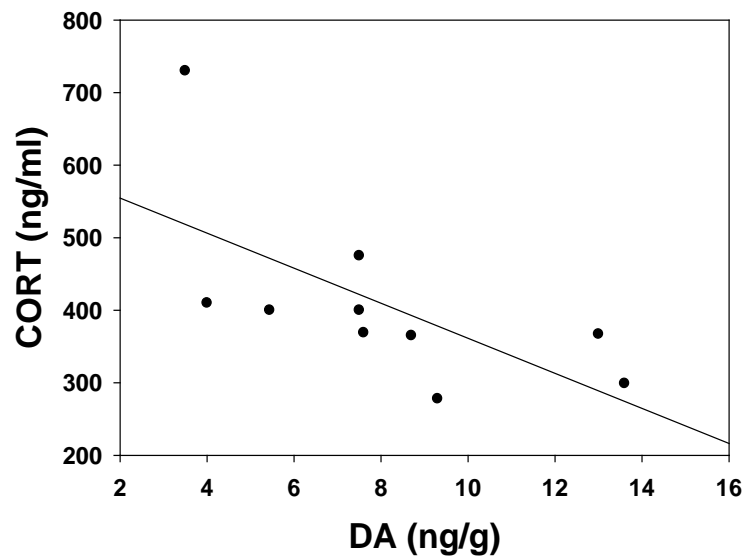
Sl. 135. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS, $R=0.694$; $p<0.05$.

Na slici 136., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine BDNF proteina u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS.



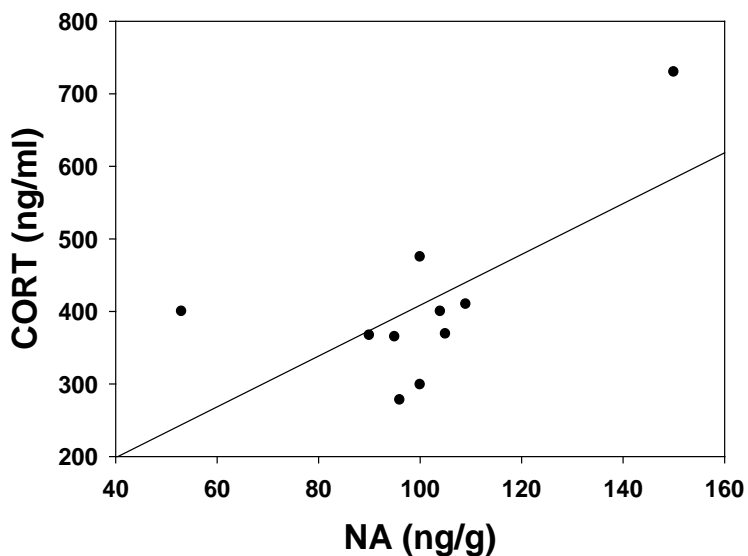
Sl. 136. Pozitivna korelacija u nivou sinteze BDNF proteina u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS, $R=0.678$; $p<0.05$.

Na slici 137., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS.



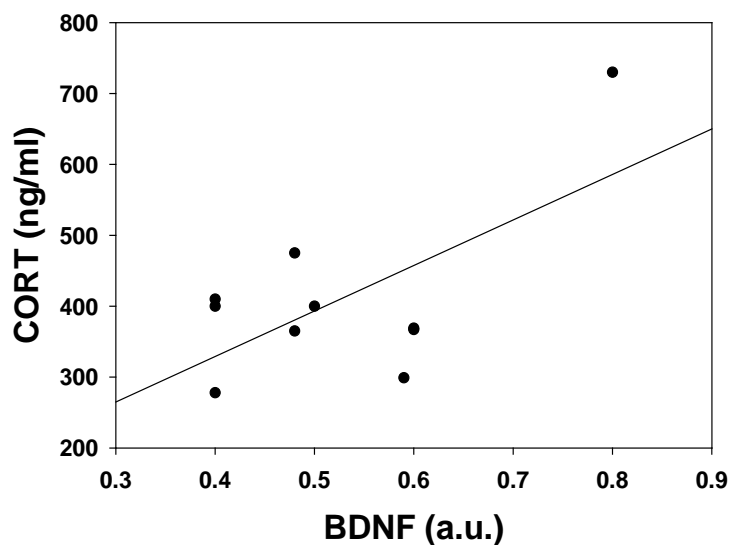
Sl. 137. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS, $R=-0.647$; $p<0.05$.

Na slici 138., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS.



Sl. 138. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS, $R=0.655$; $p<0.05$.

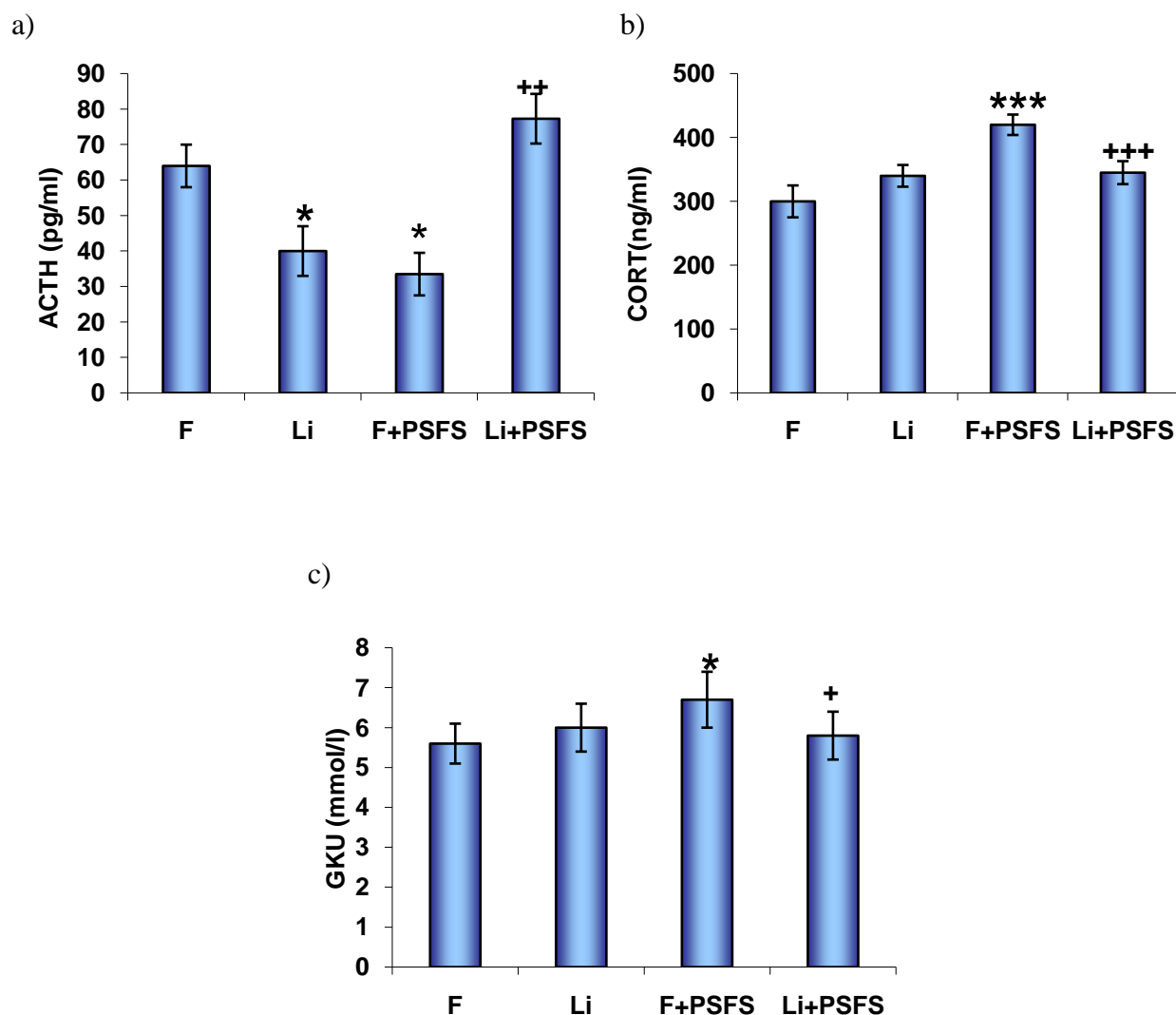
Na slici 139., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine BDNF proteina u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS.



Sl. 139. Pozitivna korelacija u nivou sinteze BDNF proteina u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih PSFS, $R=0.643$; $p<0.05$.

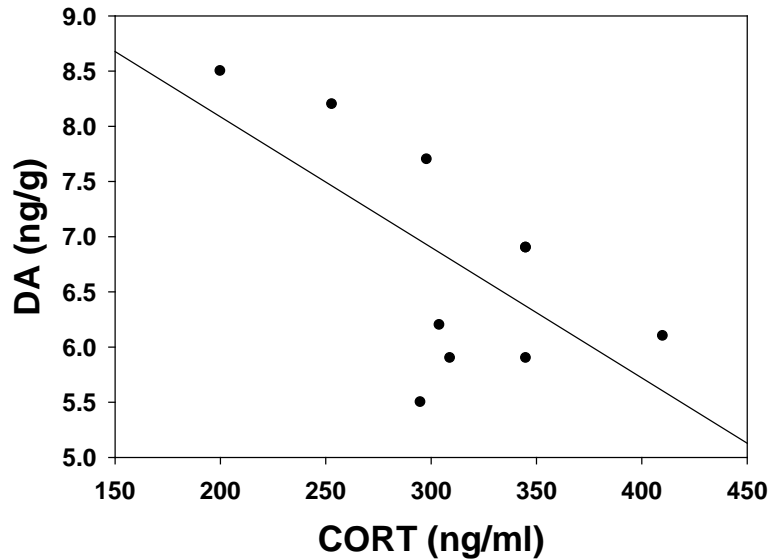
4.7.2. Delovanje litijuma na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Na slici 140., može se uočiti da je u plazmi pacova izlaganih F+PSFS količina ACTH smanjena (sl. 140a.), dok su količine CORT (sl. 140b.) i GLU (sl. 140c.) povećane u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS vraća količine ACTH, CORT i GLU na kontrolne vrednosti. Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je u plazmi pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja koncentracije ACTH ($p < 0.01$), CORT ($p < 0.001$) i GLU ($p < 0.05$). Post-hoc analiza je pokazala da je koncentracija ACTH u plazmi pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li) manja za 38% ($p < 0.05$, Tukey test), a da je kod pacova izlaganih F+PSFS koncentracija ACTH manja za 48% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Kod pacova izlaganih F+PSFS koncentracija CORT veća je za 40% ($p < 0.001$, Tukey test), dok je koncentracija GLU veća za 19% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrolu svakodnevno tretiranu fiziološkim rastvorom (F). Litijum kod pacova izlaganih PSFS povećava koncentraciju ACTH za 130% ($p < 0.01$, Tukey test), smanjuje koncentraciju CORT za 18% ($p < 0.001$, Tukey test) i smanjuje koncentraciju GLU za 14% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



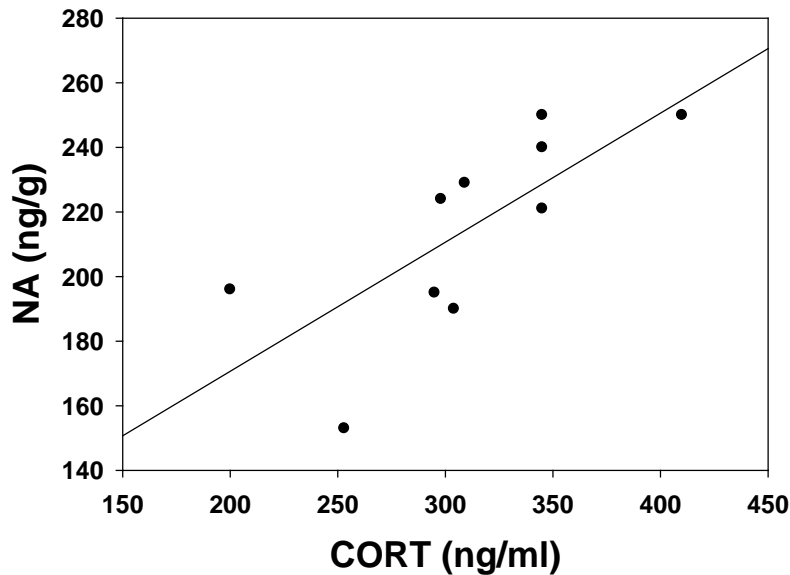
Sl. 140. Koncentracija a) ACTH (pg/ml), b) CORT (ng/ml) i c) GLU (mmol/l) u plazmi: kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{++} < 0.01$, $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

Na slici 141., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS.



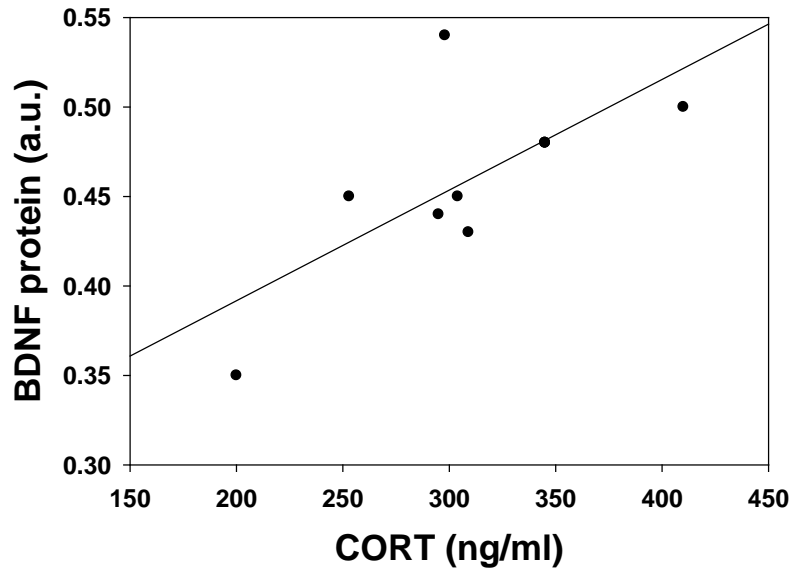
Sl. 141. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.647$; $p<0.05$.

Na slici 142., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS.

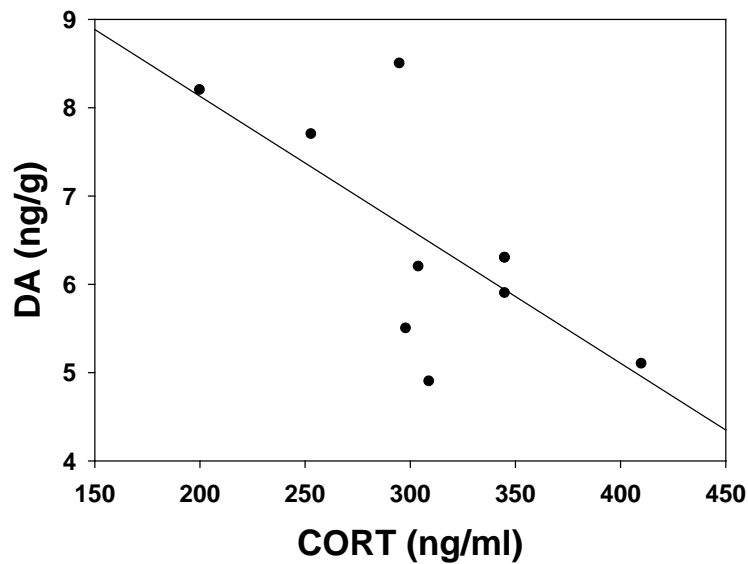


Sl. 142. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.739$; $p<0.05$.

Na slici 143., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine BDNF proteina u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS.



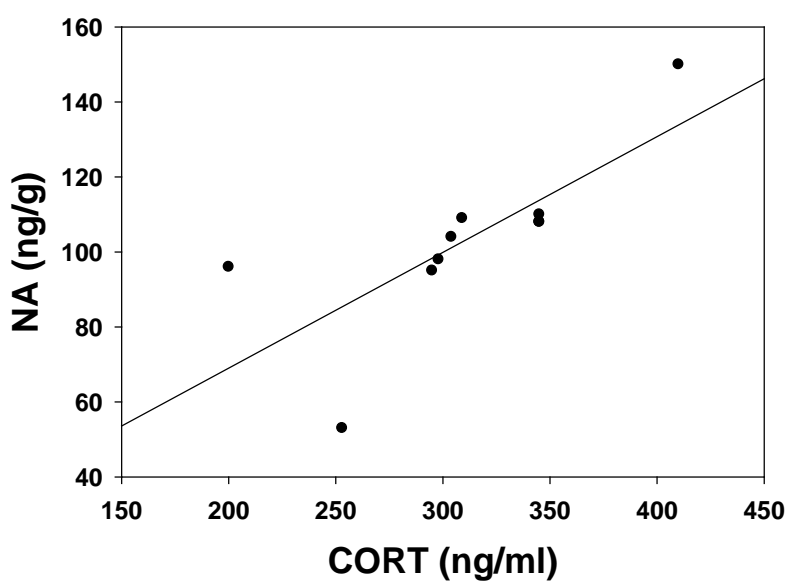
Sl. 143. Pozitivna korelacija u nivou sinteze BDNF proteina u prefrontalnom korteksu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.703$; $p<0.05$.



Sl. 144. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.684$; $p<0.05$.

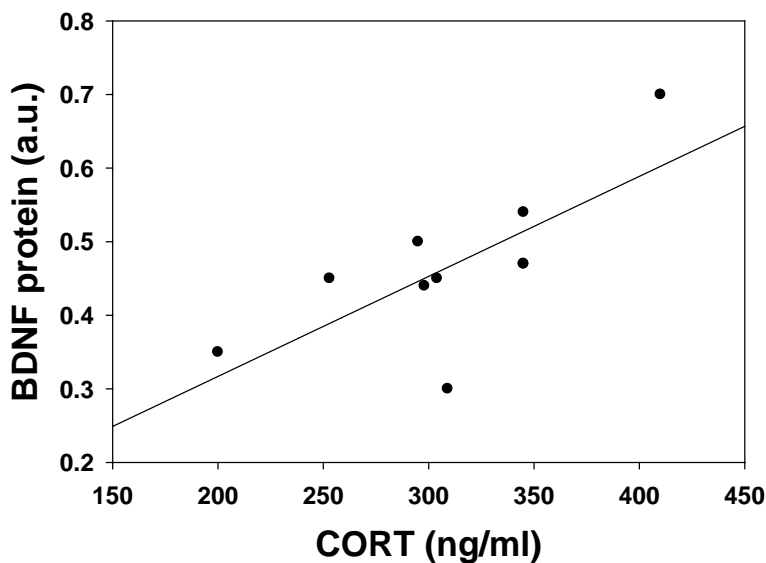
Na slici 144., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS.

Na slici 145., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS.



Sl. 145. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.750$; $p<0.05$.

Na slici 146., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između količine BDNF proteina u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS.

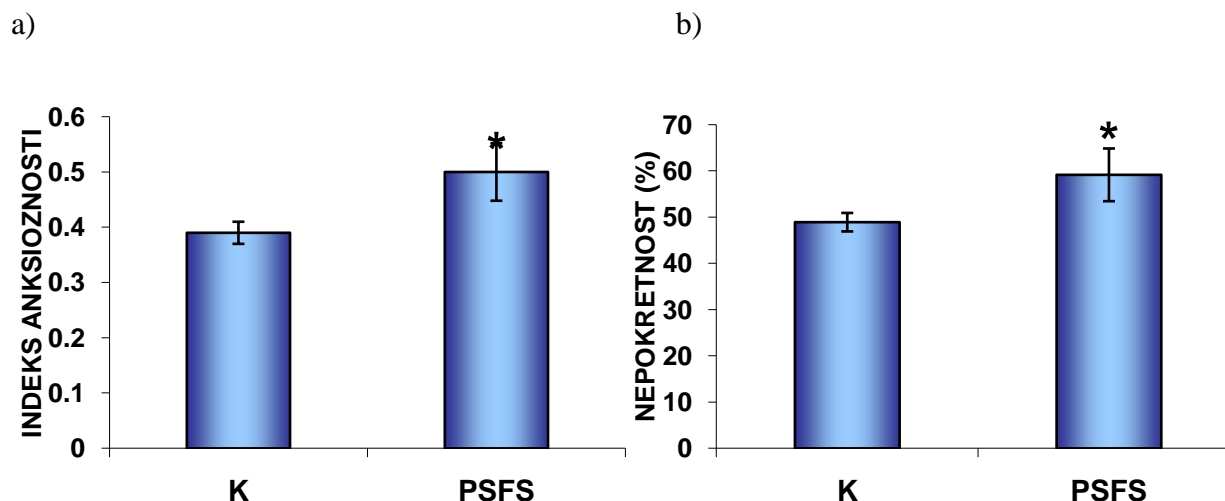


Sl. 146. Pozitivna korelacija u nivou sinteze BDNF proteina u hipokampusu i koncentracije CORT u plazmi pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.724$; $p<0.05$.

4.8. Delovanje litijuma na ponašanje odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

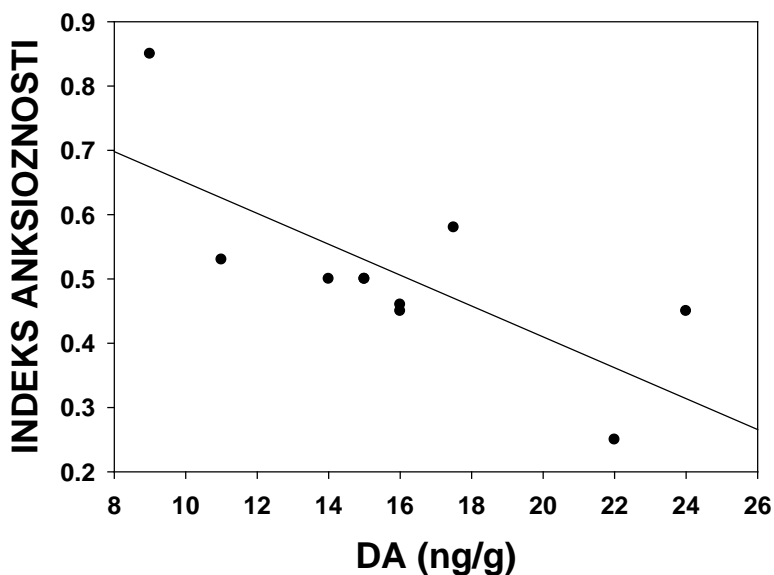
4.8.1. Uticaj ponavljanoг stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na indeks anksioznosti i trajanje nepokretnosti odraslih mužjaka pacova

Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je kod pacova ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja indeksa anksioznosti ($p<0.05$) i procenta nepokretnosti ($p<0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da PSFS povećava indeks anksioznosti (sl. 147a.) i procenat nepokretnosti (sl. 147b.) u odnosu na intaktnu kontrolu. Post-hoc analiza je pokazala da je kod pacova izlaganih PSFS indeks anksioznosti veći za 28% ($p<0.05$, Tukey test), a da je procenat nepokretnosti veći za 20% ($p<0.05$, Tukey test) u odnosu na intaktnu kontrolu.



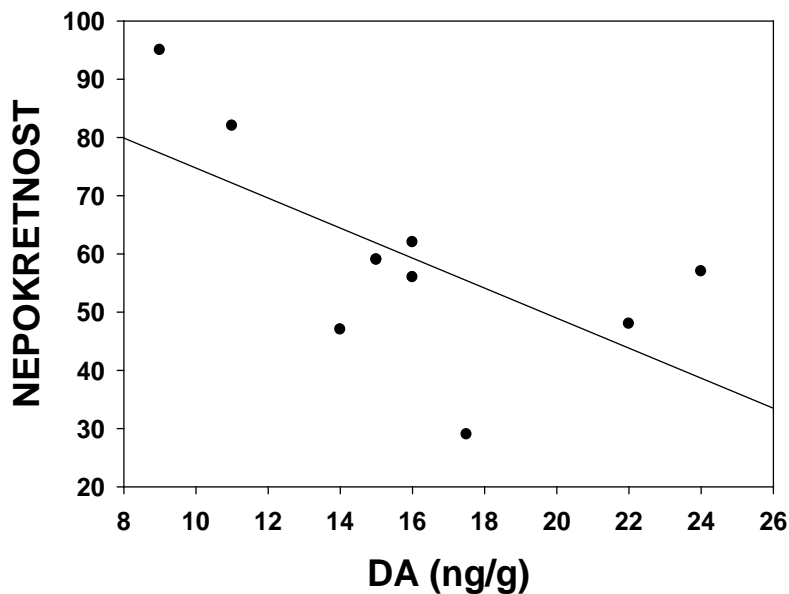
Sl. 147. Indeks anksioznosti (a) i procenat nepokretnosti (b) intaktnih kontrola (K) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$ je izražena u odnosu na intaktnu kontrolu (K).

Na slici 148., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS.

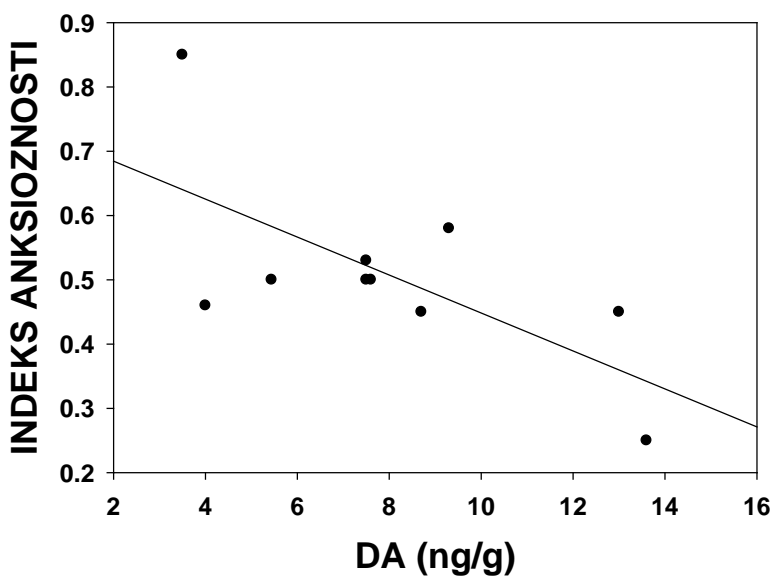


Sl.148. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS, $R = -0.728$; $p < 0.05$.

Na slici 149., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS.



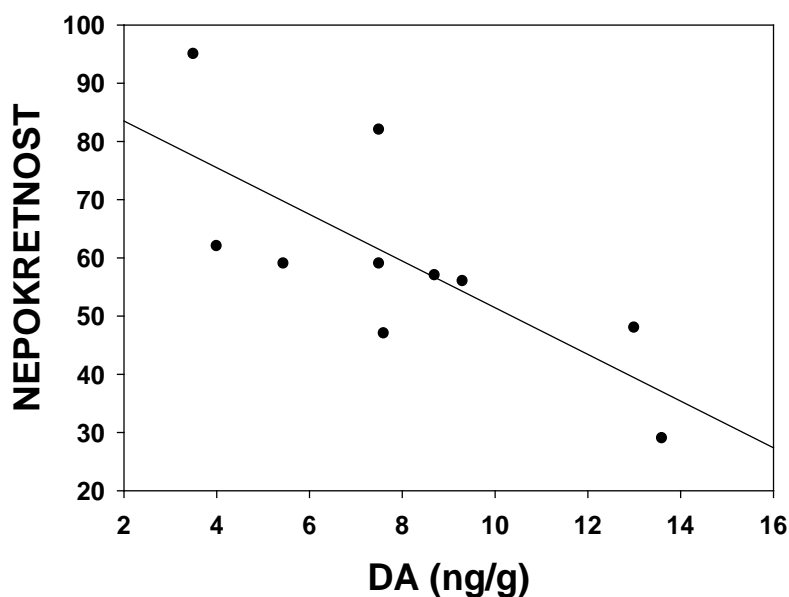
Sl. 149. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS, $R=-0.634$; $p<0.05$.



Sl. 150. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS, $R=-0.670$; $p<0.05$.

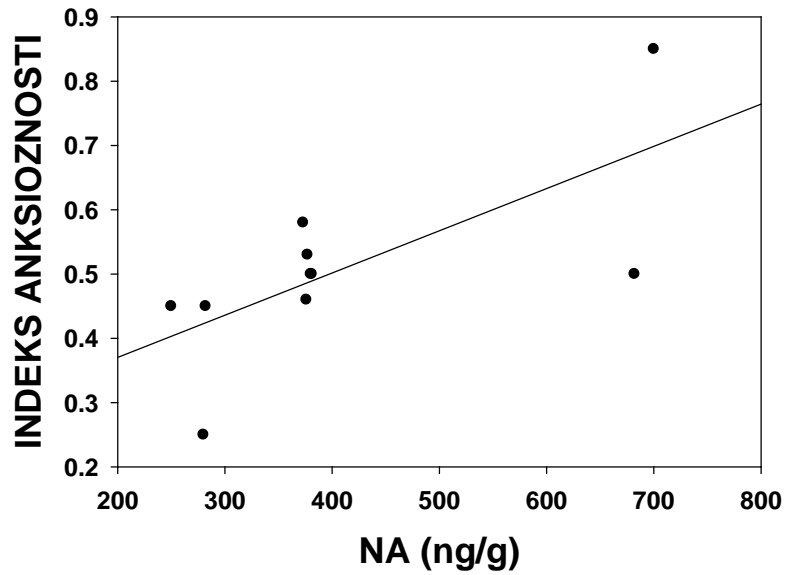
Na slici 150., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS.

Na slici 151., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS.



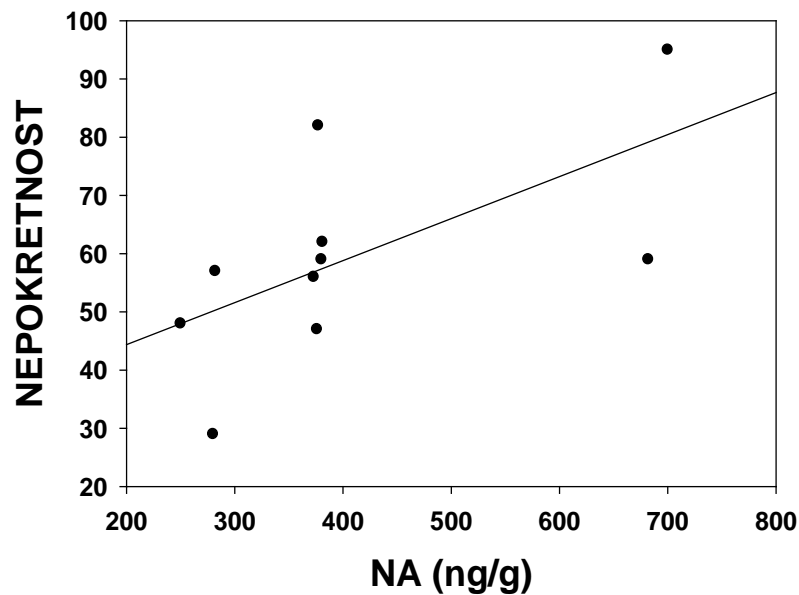
Sl. 151. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS, $R=-0.738$; $p<0.05$.

Na slici 152., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS.



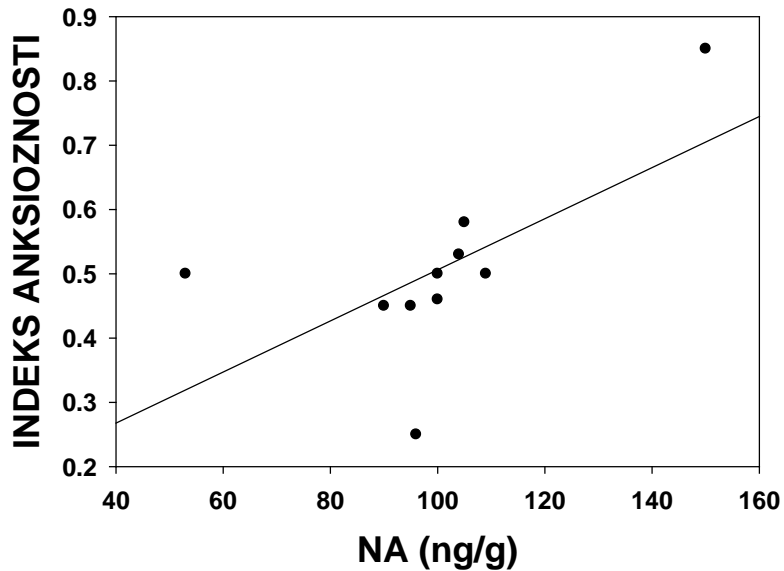
Sl. 152. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS, $R=0.695$; $p<0.05$.

Na slici 153., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS.

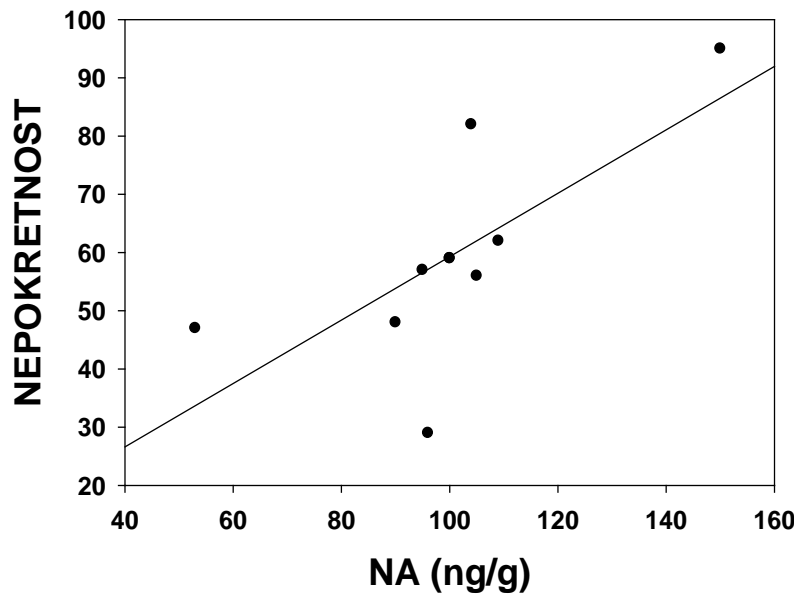


Sl. 153. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS, $R=0.627$; $p<0.05$.

Na slici 154., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS.



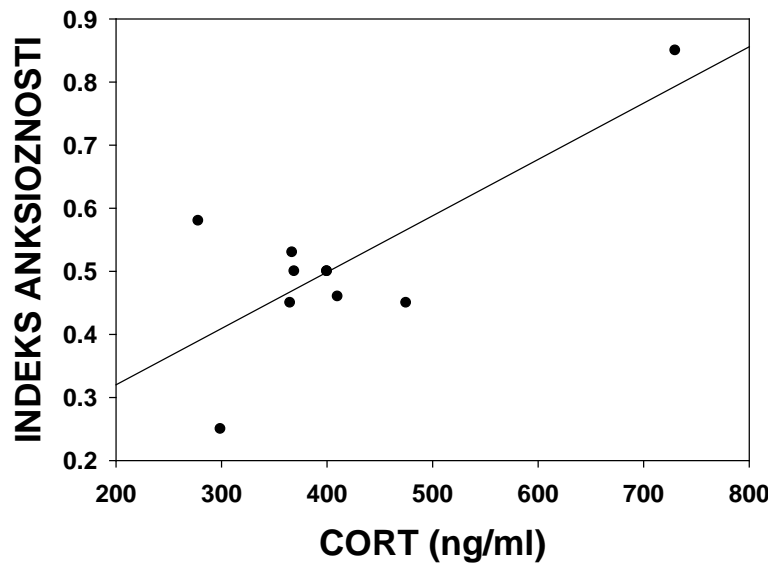
Sl. 154. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS, $R=0.629$; $p<0.05$.



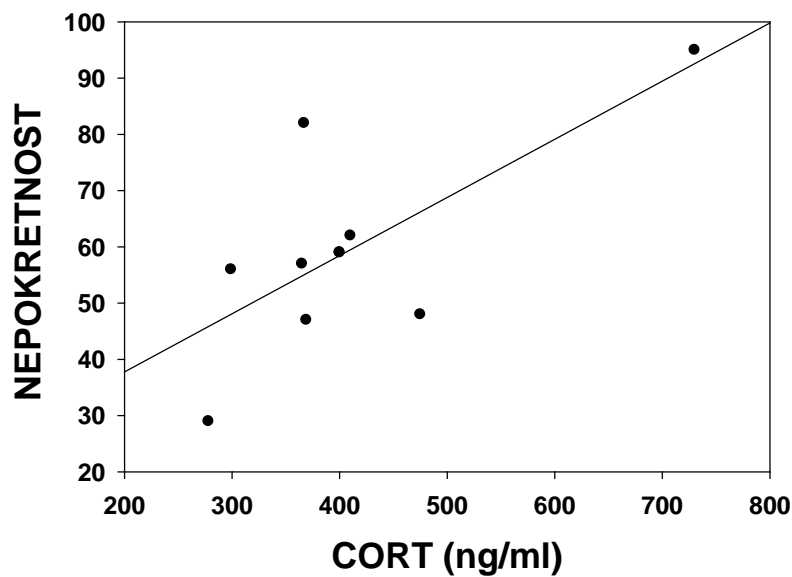
Sl. 155. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS, $R=0.700$; $p<0.05$.

Na slici 155., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS.

Na slici 156., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije CORT u plazmi i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS.



Sl. 156. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije CORT u plazmi i indeksa anksioznosti pacova izlaganih PSFS, $R=0.756$; $p<0.05$.

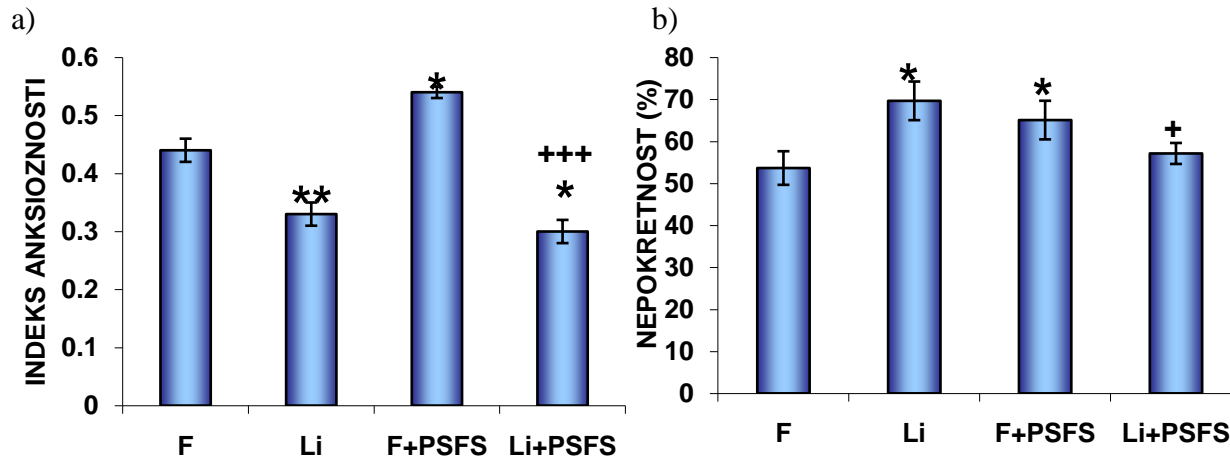


Sl. 157. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije CORT u plazmi i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS, $R=0.710$; $p<0.05$.

Na slici 157., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije CORT u plazmi i nepokretnosti pacova izlaganih PSFS.

4.8.2. Delovanje litijuma na indeks anksioznosti i trajanje nepokretnosti odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

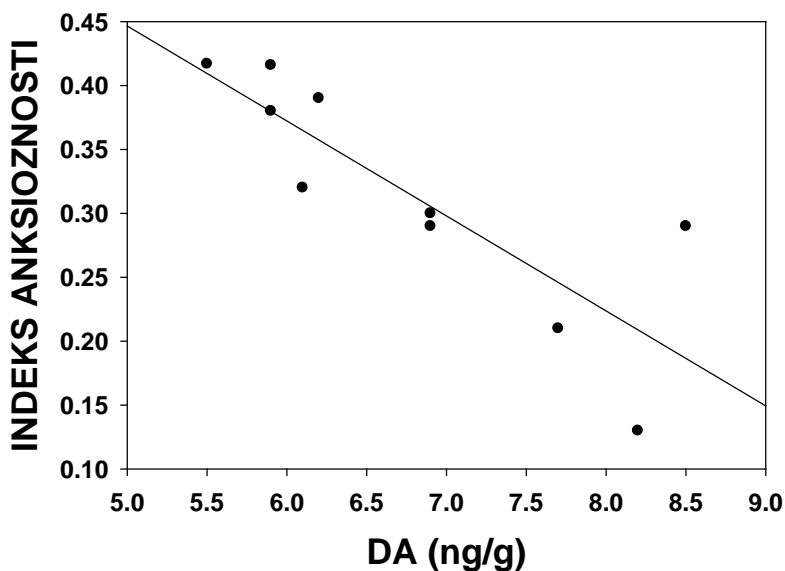
Analiza varijanse (ANOVA 1) je pokazala da je kod pacova svih ispitivanih grupa došlo do statistički značajnog variranja indeksa anksioznosti ($p < 0.001$) i procenta nepokretnosti ($p < 0.05$). Dobijeni rezultati pokazuju da litijum kod pacova izlaganih PSFS smanjuje indeks anksioznosti (sl. 158a.) i vraća procenat nepokretnosti na kontrolni nivo (sl. 158b.). Post-hoc analiza je pokazala da je indeks anksioznosti kod pacova tretiranih litijumom (Li) manji za 25% ($p < 0.01$, Tukey test), kod pacova izlaganih F+PSFS veći za 22% ($p < 0.05$, Tukey test), dok je kod pacova izlaganih Li+PSFS manji za 32% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F). Kod pacova izlaganih Li+PSFS indeks anksioznosti je manji za 45% ($p < 0.001$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.



Sl.158. Indeks anksioznosti (a) i procenat nepokretnosti (b) kontrola svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F), pacova svakodnevno tretiranih litijumom (Li), pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih fiziološkim rastvorom (F+PSFS) i pacova izlaganih 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretiranih litijumom (Li+PSFS). \pm s.e.m. ($n=10$). Statistička značajnost $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ je izražena u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F), statistička značajnost $p^+ < 0.05$, $p^{+++} < 0.001$ je izražena u odnosu na pacove izlagane 14 dana ponavljanom stresu fizičkog sputavanja svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F+PSFS).

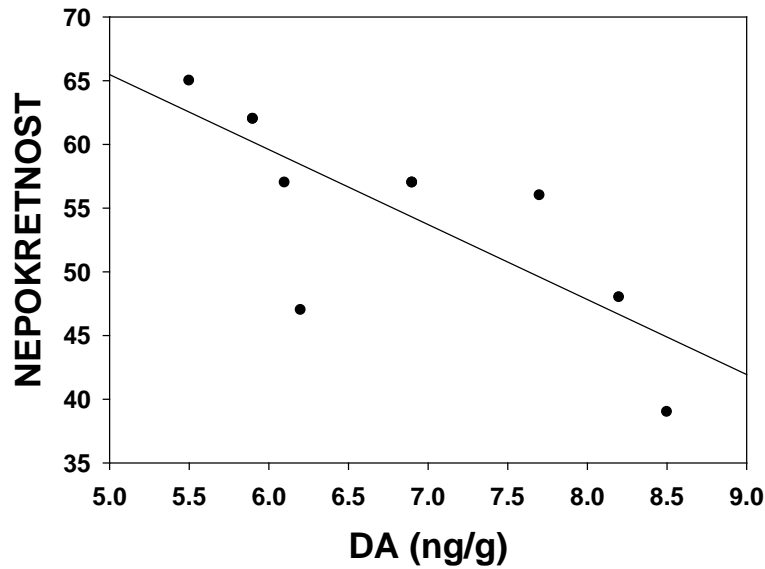
Procenat nepokretnosti, kod pacova tretiranih litijumom (Li) veći je za 21% ($p < 0.05$, Tukey test), dok je kod pacova izlaganih F+PSFS veći za 20% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na kontrole svakodnevno tretirane fiziološkim rastvorom (F). Međutim, kod pacova izlaganih Li+PSFS procenat nepokretnosti je manji za 13% ($p < 0.05$, Tukey test) u odnosu na pacove izlagane F+PSFS.

Na slici 159., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS.



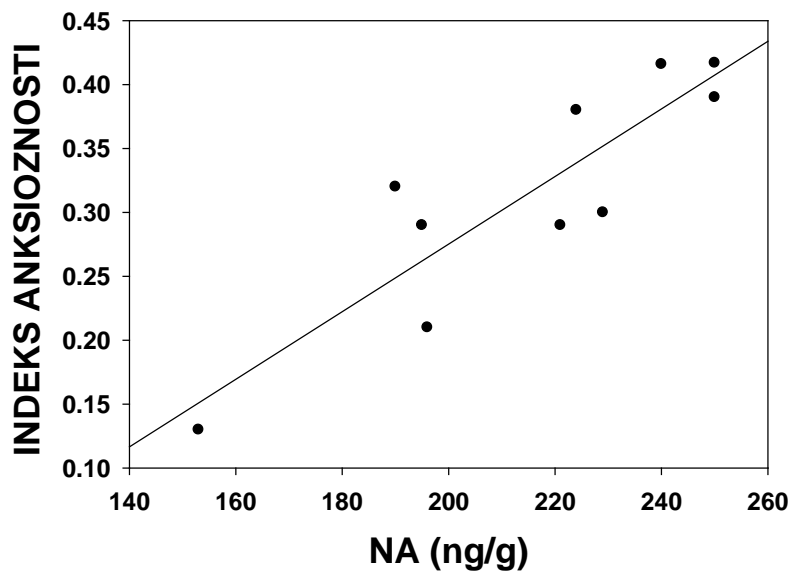
Sl. 159. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R = -0.838$; $p < 0.01$.

Na slici 160., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS.



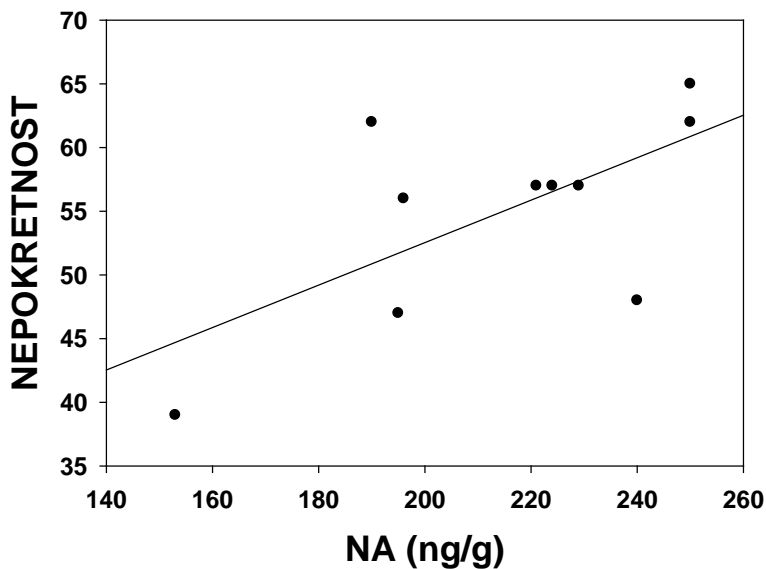
Sl. 160. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.767$; $p<0.01$.

Na slici 161., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS.



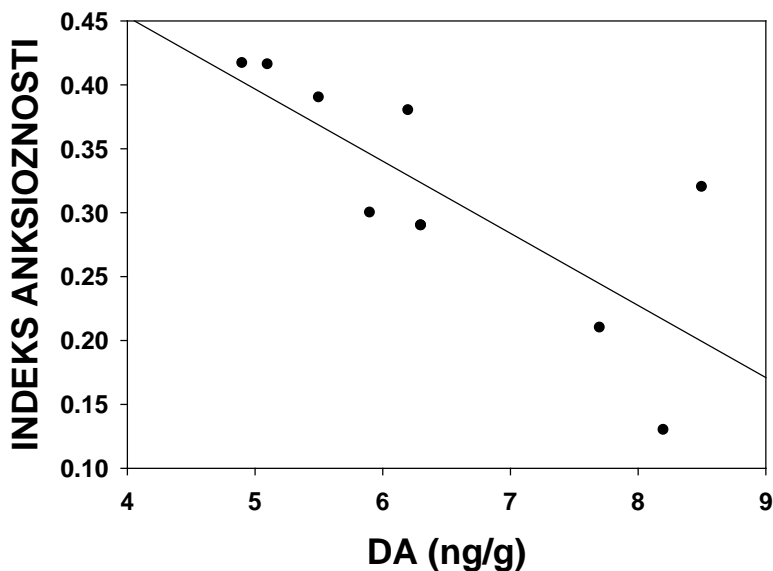
Sl. 161. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.883$; $p<0.001$.

Na slici 162., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS.



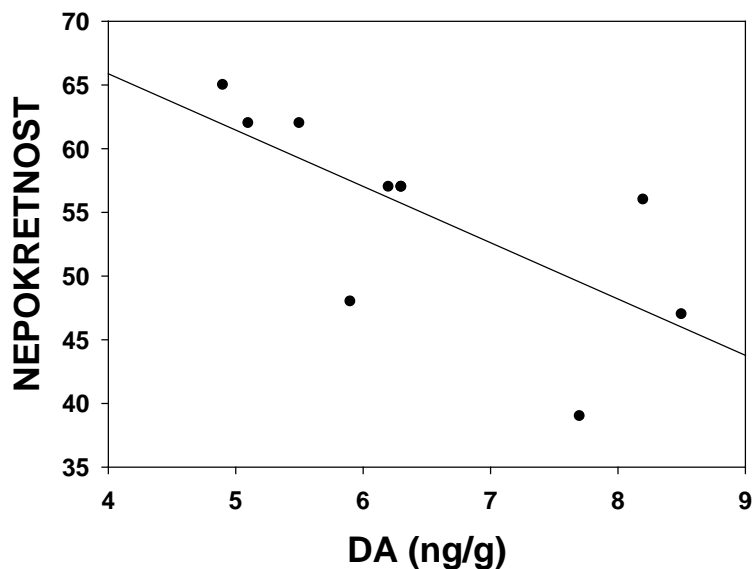
Sl. 162. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u prefrontalnom korteksu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.642$; $p<0.05$.

Na slici 163., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS.



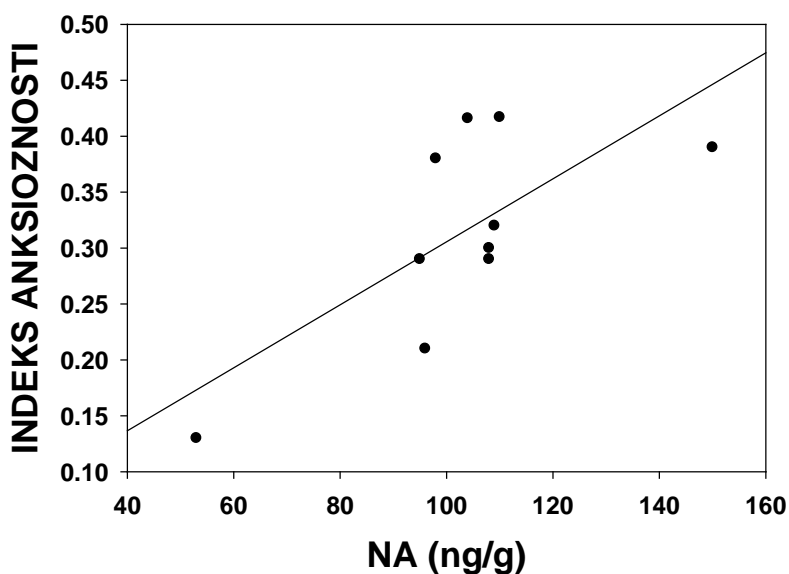
Sl. 163. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.770$; $p<0.01$.

Na slici 164., grafički je prikazana značajna negativna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije DA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS.



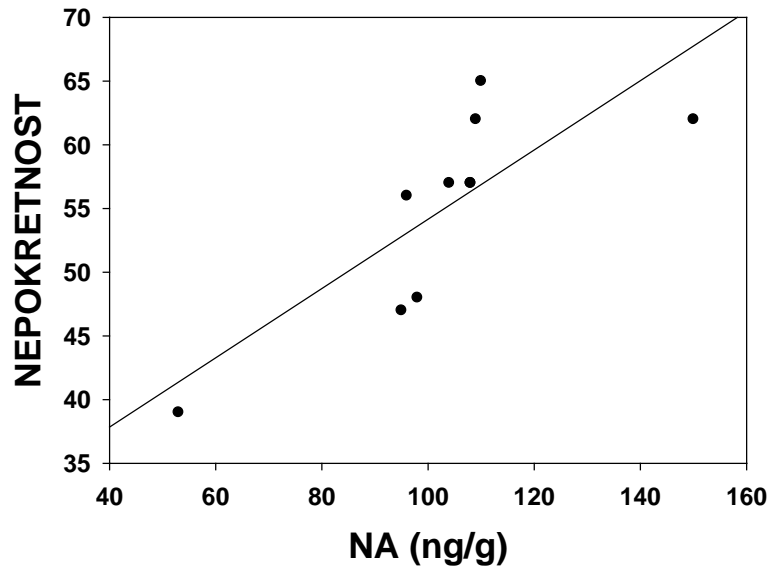
Sl. 164. Negativna korelacija u nivou koncentracije DA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=-0.696$; $p<0.05$.

Na slici 165., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS.

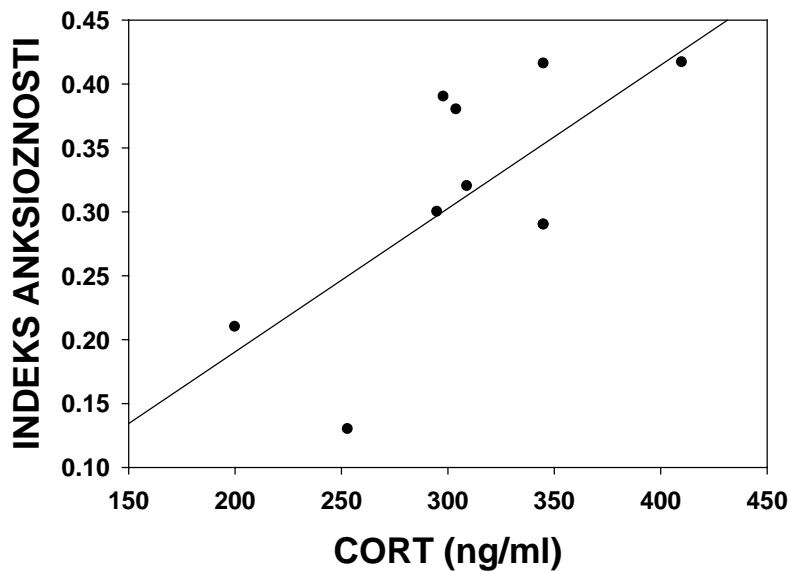


Sl. 165. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u hipokampusu i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.715$; $p<0.05$.

Na slici 166., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije NA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS.



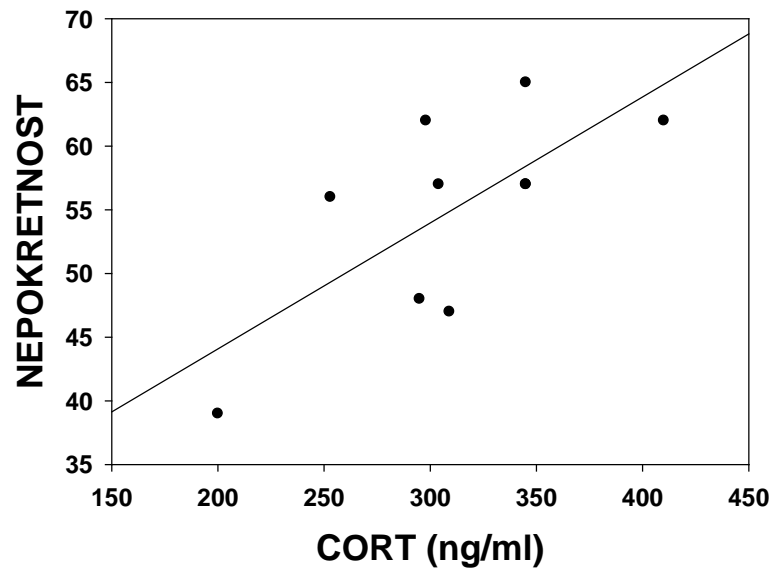
Sl. 166. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije NA u hipokampusu i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.797$; $p<0.01$.



Sl. 167. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije CORT u plazmi i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.693$; $p<0.05$.

Na slici 167., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije CORT u plazmi i indeksa anksioznosti pacova izlaganih Li+PSFS.

Na slici 168., grafički je prikazana značajna pozitivna korelacija (analizirana Pearson testom sume rangova) između koncentracije CORT u plazmi i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS.

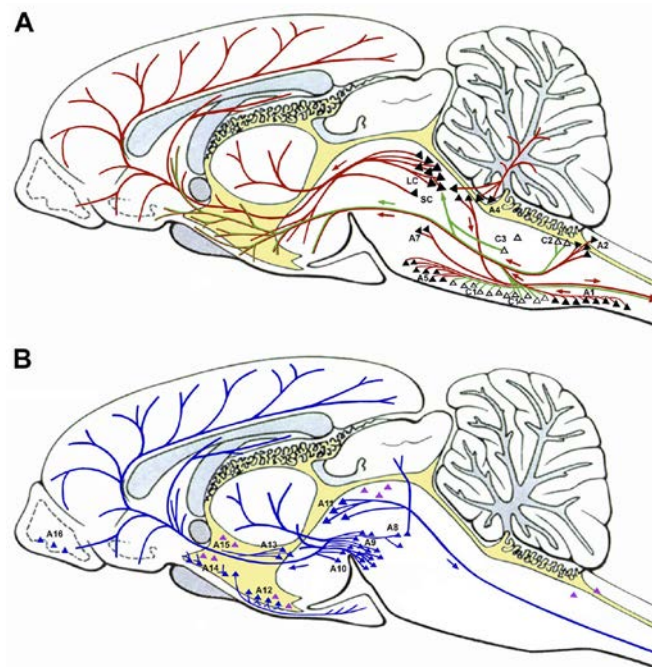


Sl. 168. Pozitivna korelacija u nivou koncentracije CORT u plazmi i nepokretnosti pacova izlaganih Li+PSFS, $R=0.704$; $p<0.05$.

5. DISKUSIJA

Hronični stres izaziva strukturna i funkcionalna oštećenja nekoliko različitih regiona mozga, uključujući PFC i hipokampus (McEwen i Magarinos, 1997; Sotiropoulos i saradnici, 2011). Hipokampus i amigdala, moždane strukture u sastavu limbičkog sistema, imaju važnu ulogu u regulaciji neuroendokrinih funkcija, emocionalnih reakcija, kao i procesa učenja i pamćenja. PFC kao najsloženiji moždani region, učestvuje u regulaciji kognitivnih funkcija, kao i u regulaciji emocija posredstvom veza sa drugim regionima mozga uključujući *LC*, *substantia nigra*, ventralne tegmentalne oblasti i amigdale (Goldman-Rakic, 1995; Arnsten, 2009). Pomenute moždane oblasti su veoma osetljive na štetne efekte delovanja hroničnog stresa (Arnsten, 2009). Brojna istraživanja su potvrdila da hronični stres može da utiče na nastanak depresije, bipolarnog poremećaja, Parkinsonove bolesti, šizofrenije i drugih oboljenja (Schwab i Zieper, 1965; Mazure, 1995; Glahn i saradnici, 2006; Goldman-Rakic, 1994; Shin i saradnici, 2006). Istraživanja ukazuju da smanjenje plastičnosti i veza između hipokampusa, PFC i amigdale predstavlja osnovu patologije psihijatrijskih poremećaja, poput anksioznosti i depresije (Chiba i saradnici, 2012).

Monoaminska signalizacija je ključni mehanizam modulacije moždanih funkcija (Slika, 169). Značajne promene dopaminskog i noradrenalinog sistema potvrđene su u hipokampusu, amigdali i PFC u odgovoru na stres (Patki i saradnici, 2015). Postoje brojni dokazi da je kateholaminski sistem uključen u patofiziologiju psihijatrijskih poremećaja (Manji i Potter, 1997). Normalni promet kateholamina je rezultat balansa između procesa sinteze, otpuštanja i preuzimanja kateholamina, međutim nedovoljno su proučeni molekularni mehanizmi koji uzrokuju promene prometa kateholamina u PFC i hipokampusu u uslovima izazvanim delovanjem hroničnog stresa. Intenziviranje razgradnje monoaminskih neurotransmitera dovodi do povećanog nastajanja visoko reaktivnih molekularnih vrsta, koje mogu uzrokovati oštećenje mitohondrija i apoptozu neurona, a samim tim i poremećaj funkcije PFC i hipokampusa, ključnih moždanih oblasti koje učestvuju u odgovoru na stres. Antioksidativni enzimi sprečavaju i/ili popravljaju oštećenja nastale usled oksidativnog stresa i delovanja ROS na biomolekulske strukture u ćeliji. Iz literature je poznato da PSFS može da izazove neurodegenerativne



Slika 169. Kateholaminski neuroni u mozgu pacova, A) noradrenalinski i adrenalinski sistem, B) dopaminski sistem. A1, A2, A4, A5, i A7, noradrenalinski neuroni; C1, C2, i C3, adrenalinski neuroni; A8-A16, dopaminski neuroni; LC, locus coeruleus; SC, subcoeruleus area. Slika preuzeta iz revijalnog rada Kvetnansky i saradnici (2009).

procesu (Liu i saradnici, 2013; Wang i saradnici, 2014; Ferraz i saradnici, 2011). PSFS kod pacova može da se uporedi sa psihosocijalnim stresom kod ljudi, koji je uključen u patofiziologiju poremećaja raspoloženja. U eksperimentalnom delu ovog doktorata primenjen je PSFS jer je u brojnim studijama potvrđeno da predstavlja efikasan model–sistem kod glodara za postizanje simptoma karakterističnih za depresiju (Levinstein i Samuels, 2014; Kim i Han, 2006). Ispitivane su moždane oblasti PFC i hipokampus, budući da je poznato da su ove strukture među najvažnijim za odgovor organizma na hronično stresiranje, a takođe su ključne u patofiziologiji psihijatrijskih poremećaja. Pošli smo od pretpostavke da PSFS može da izazove fiziološke maladaptivne procese u prometu kateholamina, oksidativna oštećenja u PFC i hipokampusu, kao i stanje slično depresiji kod ljudi. Depresija se smatra jednim od najvažnijih zdravstvenih problema savremenog društva. Danas postoje brojne metode i lekovi koji se koriste u lečenju psihijatrijskih poremećaja. Litijum je antipsihotik i koristi se za dugoročnu stabilizaciju raspoloženja kod ljudi sa bipolarnim poremećajem (Malhi i Gershon, 2009). Međutim,

zanimljivo je da su mehanizmi kojim litijum ispoljava svoje dobro poznate kliničke efekte i izaziva tako širok spektar delovanja u sklopu patofiziologije poremećaja raspoloženja ostali u velikoj meri nerazjašnjeni. Postoje brojne teorije o mehanizmu delovanja litijuma, počev od promena u jonskom transportu do modulacije ekspresije gena (Gould i saradnici, 2004; Marmol, 2006). Detaljnije proučavanje uloge i značaja delovanja litijuma na mehanizme regulacije ekspresije gena koji učestvuju u sintezi, preuzimanju i razgradnji neurotransmitera (DA i NA), kao i na molekulske mehanizme antioksidativne zaštite kod pacova koji su u stanju sličnom stanju depresije kod ljudi, veoma je važno za lečenje psihijatrijskih oboljenja nastalih usled delovanja hroničnog stresa.

5.1. Delovanje litijuma na koncentraciju dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Brojne studije potvrđuju da je monoaminska signalizacija jedan od ključnih mehanizama modulacije moždanih funkcija, a poznato je i da količina monoaminskih neurotransmitera u mozgu zavisi od vrste i trajanja stresora (Kvetnansky i saradnici, 2009). Tako je na primer, u PFC zabeleženo povećanje nivoa DA posle delovanja akutnog stresa (Deutch i saradnici, 1990; Imperato i saradnici, 1992; Sorg i Kalivas, 1993). Međutim, kod hroničnog stresiranja rezultati su oprečni. Pojedini autori su pokazali smanjenje količine DA (Imperato i saradnici, 1992; Mangiavacchi i saradnici, 2001), dok istraživanja drugih autora pokazuju povećanje dopaminske neurotransmisije (Thierry i saradnici, 1976; Roth i saradnici, 1998). Naši rezultati su pokazali da PSFS u trajanju od 14 dana značajno smanjuje količinu DA i povećava količinu NA u PFC i hipokampusu odraslih mužjaka pacova, što predstavlja potencijalno negativne fiziološke adaptacije. Poznato je da je normalana količina monoaminskih neurotransmitera u hipokampusu amigdali i frontalnom korteksu bitna za procese učenja i pamćenja (Arnsten, 2009). Primećeno je da je smanjena dopaminska transmisija u PFC odgovorna za narušavanje prostorne radne memorije u neuropsihijatrijskim poremećajima (Mizoguchi i saradnici, 2000). Smanjenje koncentracije DA i povećanje koncentracije NA su primećeni u mozgu pacova izlaganih hroničnom stresu koji su pokazivali agresivno ponašanje (Patki i saradnici, 2015). Takođe je utvrđeno da postoji značajan gubitak DA aksona kod pacijenata obolelih od šizofrenije i da

zmanjenje vanćelijskog DA može da doprinese simptomima bolesti (Venator i saradnici, 1999). Međutim, delovanje različitih antidepresivnih lekova povećava nivo DA u PFC (Tanda i saradnici, 1994). Povećanje nivoa DA kod tretiranih pacijenata sa Parkinsonovom bolešću dovodi do poboljšanja njihove narušene radne memorije (Lange i saradnici, 1992). Uporedna ispitivanja više moždanih oblasti pokazuju da hronični stres povećava koncentraciju metabolita DA u frontalnom korteksu i striatumu, dok u hipokampusu nisu zabeležene promene (Ahmad i saradnici, 2010).

Naši rezultati su pokazali značajnu negativnu korelaciju između sniženog nivoa DA i povećane količine NA u PFC i hipokampusu životinja izlaganih PSFS. Poznato je da u odgovoru na stres jakog intenziteta, smanjenje nivoa DA nastaje kao posledica povećane potražnje za sintezom NA, budući da je DA prekursor za sintezu NA (Menniti i Diliberto, 1989).

Iako postoje brojne studije koje potvrđuju povezanost poremećaja nivoa NA i DA sa depresijom i bipolarnim poremećajem, samo mali broj istraživanja je posvećen proučavanju delovanja litijuma na promet ovih monoaminskih neurotransmitera. Naši rezultati su potvrdili da litijum kod pacova izlaganih PSFS u trajanju od 14 dana vraća količine DA i NA na kontrolni nivo u obe ispitivane moždane oblasti. Jedan od mehanizama koji bi mogao da objasni terapeutsko i profilaktičko delovanje litijuma kod bipolarnog poremećaja postavljen je u tzv. monoaminskoj hipotezi, koja tumači uticaj litijuma na promene u koncentracijama neurotransmitera u okviru CNS. Dugoročni efekat litijuma na neurotransmitterske sisteme ostvaruje se zahvaljujući njegovoj sposobnosti da menja balans između različitih signalnih puteva u kojima učestvuju neurotransmiteri i neuropeptidi u brojnim moždanim strukturama (Lenox i Frazer, 2002). Pomenuti autori smatraju da litijum smanjuje osetljivost postsinaptičkih receptora za NA i tako doprinosi sprečavanju povratka simptoma bipolarnog poremećaja. Pored toga, utvrđeno je da litijum smanjuje presinaptičku dopaminsku aktivnost i deluje postsinaptički u smislu sprečavanja nastanka uzlazne regulacije receptora (Lenox i Frazer, 2002). Dugotrajan tretman litijumom sprečava razvoj preterane osetljivosti receptora za DA, odnosno stabilizuje osetljivost dopaminskog receptora i tako verovatno doprinosi sprečavanju povratka simptoma bipolarnog poremećaja (Pert i saradnici, 1978). Ahluwalia i Singhal (1980) uočili su da se posle dvanaestodnevnog tretmana litijumom beleži značajno smanjeni nivo NA u moždanom stablu, hipotalamusu i srednjem mozgu, povećan u korteksu, dok su u striatumu i hipokampusu promene bile neznatne.

Da bismo dobili jasniju sliku o delovanju litijuma na promet neurotransmitera u uslovima hroničnog stresa, veoma je važno da se utvrdi delovanje litijuma na specifičnije parametre, kao što je ekspresija gena za ključne enzime koji učestvuju u biosintezi, preuzimanju i razgradnji kateholamina u PFC i hipokampusu hronično stresiranih životinja.

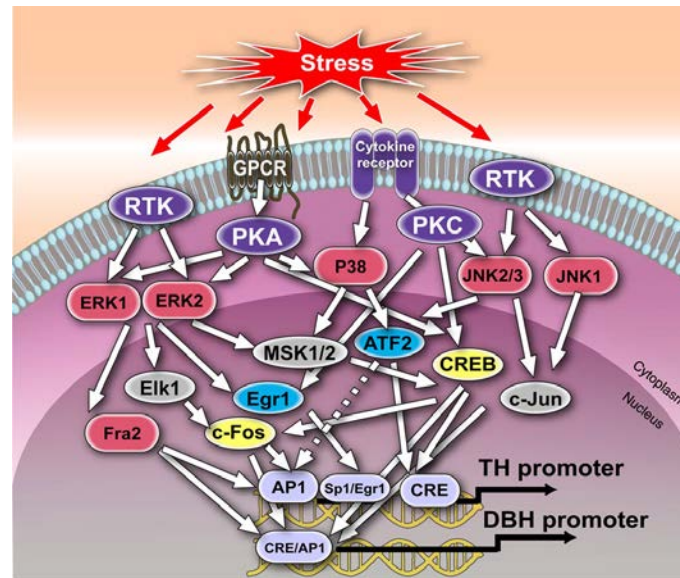
5.2. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime koji učestvuju u biosintezi kateholamina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Tirozin hidroksilaza (TH) je “rate limiting” enzim uključen u biosintezu kateholamina i prisutan je u svim ćelijama koje proizvode kateholamine (Kvetnansky i saradnici, 2004). Najnovije studije Qiu i saradnika (2015) potvrdile su prisutnost iRNK za TH u PFC kod pacova. U našoj studiji je PCR metodom u realnom vremenu detektovana iRNK za TH kako u PFC, tako i hipokampusu odraslih mužjaka pacova. Naši rezultati su pokazali da PSFS u trajanju od 14 dana značajno smanjuje ekspresiju gena za TH i gena za DBH u PFC odraslih mužjaka pacova, dok u hipokampusu smanjuje ekspresiju gena za TH i povećava sintezu DBH proteina. Podaci iz literature potvrđuju povećanje ekspresije TH unutar NA aksona u PFC po delovanju hroničnog stresa (Miner i saradnici, 2006). Naši rezultati su pokazali da je smanjeni nivo TH proteina u pozitivnoj korelaciji sa smanjenom koncentracijom DA u PFC i hipokampusu hronično stresiranih životinja. Taj podatak mogao bi da potvrdi odsustvo *de novo* sinteze kateholamina u obe ispitivane moždane oblasti. Objašnjenje bi moglo da bude da je hronični stres izazvao desenzitizaciju monoaminskih ćelija, što rezultira smanjenjem sinteze DA u obe ispitivane moždane oblasti. Ovi rezultati su saglasni sa rezultatima autora Gavrilović i saradnici (2013), koji su potvrdili da hronični stres izaziva desenzitizaciju adrenomedularnih ćelija i smanjenje sinteze kateholamina. Studije autora Qiu i saradnika (2015) takođe su pokazale smanjen nivo iRNK za TH u PFC pacova izlaganih hroničnom stresu. Arnsten i Goldman-Rakic (1985) su pokazali da su DA i NA ključni za funkciju PFC. Markeri poput nivoa DA i NA u PFC i hipokampusu često se koriste za potvrdu učešća moždanih struktura: LC, *substantia nigra*, ventralne tegmentalne oblasti i amigdale u odgovoru na stres. Poznato je da PFC reguliše sopstveni sadržaj kateholamina preko veza sa telima monoaminskih neurona u LC (odakle

započinju NA projekcije), kao i u *substantia nigra* i ventralnoj tegmentalnoj oblasti (odakle započinju DA projekcije) (Arnsten, 2009). Mnogi autori su potvrdili da amigdala ima važnu ulogu u promeni prometa kateholamina u PFC tokom stresa. Na primer, lezije amigdale sprečavaju povećanje otpuštanja DA i NA koje se dešava u PFC u odgovoru na psihološki stresor (Goldstein i saradnici, 1996). Naši rezultati su pokazali negativnu korelaciju između povećane količine NA i smanjene ekspresije gena za TH što ukazuje na egzogeni izvor NA u obe ispitivane moždane oblasti. Pretpostavljamo da su LC, *substantia nigra*, ventralna tegmentalna oblast i amigdala odgovorni za povećanje nivoa NA u PFC i hipokampusu u odgovoru na PSFS. Naše pretpostavke su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da je ekscitabilnost neurona u LC povećana posle delovanja hroničnog stresa (Jedema i Grace, 2003). Pored toga, klinička *post mortem* istraživanja mozga pokazuju povećanu ekspresiju TH proteina u LC depresivnih pacijenata (Zhu i saradnici, 1999). Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da PSFS dovodi do kontinuiranog povećanja koncentracije NA i smanjenja koncentracije DA u obe moždane oblasti što može da predstavlja potencijalnu negativnu fiziološku adaptaciju na primenjeni stresor. Važan rezultat ove disertacije je da pozitivna korelacija između povećane količine NA i nivoa DBH enzima u hipokampusu potvrđuje konverziju DA u NA. Upravo ova zavisnost objašnjava smanjenu količinu DA i povećanu količinu NA u hipokampusu hronično stresiranih životinja. Poremećaj u nivou monoamina u mozgu povezan je sa nastankom brojnih neuropsihijatrijskih bolesti (Shildkraut, 1965; Snyder i saradnici, 1974).

Litijum kod pacova izlaganih PSFS u trajanju od 14 dana vraća vrednosti ekspresije gena za TH i DBH na nivo kontrola u PFC, dok u hipokampusu vraća ekspresiju gena za TH na nivo kontrola, a sintezu DBH proteina značajno povećava. Pozitivne korelacije između nivoa TH enzima i količine DA u obe ispitivane moždane oblasti ukazuju da litijum u obe ispitivane moždane oblasti hronično stresiranih životinja, koje su inače imale sniženi nivo DA, podstiče *de novo* sintezu kateholamina i vraća količinu DA na kontrolnu vrednost. Chen i saradnici (1998) su utvrdili da hronična primena litijuma u terapijski relevantnim koncentracijama dovodi do značajnog povećanja nivoa TH enzima u frontalnom korteksu, hipokampusu i striatumu pacova. Pored toga, pokazano je i da hronična primena litijuma dovodi do povećanja nivoa TH enzima u kulturi humanih neurona (Chen i saradnici, 1998) i ćelija neuroblastoma (Zigova i saradnici, 1999). To ukazuje da litijum verovatno povećava nivo TH direktnim delovanjem na ćelije. Zigova i saradnici (1999) su proveravali da li litijum reguliše ekspresiju proteina i odgovarajućih

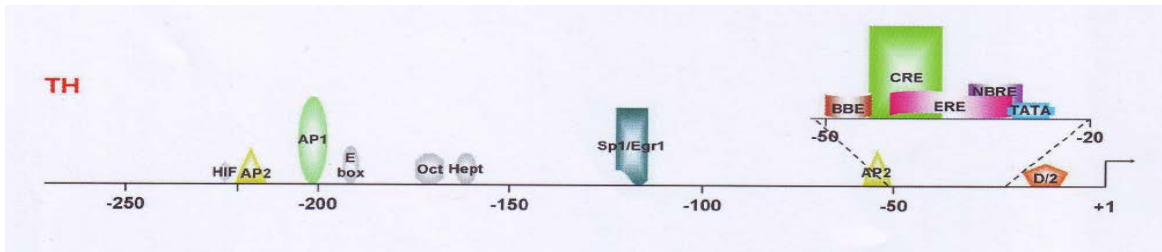
gena za koje je poznato da su regulisani transkripcionim faktorima AP-1. Naime, poznato je da za ekspresiju gena TH bitna aktivacija promotora koji sadrži AP-1 vezujuća mesta i pokazano je da su transkripcioni faktori AP-1 uključeni u regulaciju ekspresije gena za TH u neuronima (Slika, 170) (Kumer i Vrana, 1996). Istraživanja su takođe pokazala da je dugotrajno povećanje



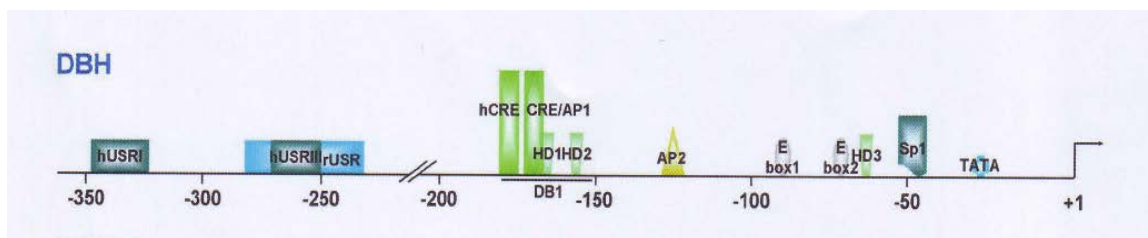
Slika 170. Promotor gena za TH (AP1, Sp1/Egr1 i CRE vezujuća mesta) i DBH (CRE/AP1 vezujuće mesto); Slika preuzeta iz revijalnog rada Kvetnansky i saradnici (2009).

nivoa TH enzima u pozitivnoj korelaciji sa povišenim nivoom iRNK za TH (Hughes i Dragunow, 1995; Kumer i Vrana, 1996). Pored toga, poznato je da promotor gena za TH sadrži i CRE mesto za koje se veže transkripcioni faktor CREB koji je takođe uključen u regulaciju ekspresije TH (Slika, 170). Poznato je da je za ekspresiju gena DBH bitna aktivacija promotora koji sadrži CRE/AP1 vezujuća mesta (Slika, 170) (Sabban i Nankova, 1998). Litijum započinje regulacija tzv. nizvodnih efektor, uključujući pomenute AP-1 proteine, kao i CREB, β -katenin, NF- κ B i druge (Rowe i Chuang, 2004). Zahvaljujući PCR metodi u realnom vremenu uspeli smo detektovati iRNK za TH u PFC i hipokampusu. Pretpostavljamo da litijum aktivira ekspresiju transkripcionih faktora AP-1 i CREB koji se vezuju za odgovarajuća mesta na promotoru gena za TH (Slika, 171a). Nakon toga dolazi do ekspresije TH gena i *de novo* sinteze katecholamina u

PFC i hipokampusu hronično stresiranih pacova. Pored toga, pretpostavljamo da litijum aktivira ekspresiju transkripcionih faktora AP 1 i CREB koji se vezuju za CRE/AP1 mesto na



Slika 171a. Promotor gena za TH; slika preuzeta iz revijalnog rada Kvetnanski i saradnici (2009).



Slika 171b. Promotor gena za DBH; slika preuzeta iz revijalnog rada Kvetnanski i saradnici (2009).

promotoru gena za DBH (Slika, 171b). Nakon toga gen za DBH se eksprimira i dolazi do konverzije DA u NA u PFC i hipokampusu hronično stresiranih pacova.

Kognitivne funkcije hipokampusa kao važnog dela limbičkog sistema, zavise od održavanja normalnog nivoa monoaminskih neurotransmitera (Singh i saradnici, 2013). Održavanje plastičnosti hipokampusa je poremećeno delovanjem hroničnog stresa (Magarinos i saradnici, 1996; Brown i saradnici, 1999; Reagan i saradnici, 2004). Posledice delovanja hroničnog stresa na hipokampus uzrokovane su promenom prometa monoaminskih neurotransmitera (Joca i saradnici, 2007), što je u skladu sa našim rezultatima.

Veoma bitan rezultat ove disertacije je da litijum u hipokampusu stresiranih životinja vraća nivo NA na kontrolnu vrednost, iako je količina DBH enzima statistički značajno povećana. Smanjenje količine NA na kontrolni nivo u hipokampusu po delovanju litijuma verovatno može da bude posledica smanjene aktivnosti DBH enzima i/ili povećane razgradnje

NA. Akumulacija DBH enzima u hipokampusu stresiranih životinja, ukazuje na to da litijum može da utiče na povećanje kapaciteta stresiranih životinja da konvertuju DA u NA u cilju povećanja spremnosti organizma da odgovori na novi stresor. Dodatno izlaganje eksperimentalnih životinja akutnom stresu npr. imobilizacije (IMO) potvrdilo bi tu hipotezu.

5.3. Delovanje litijuma na ekspresiju transportera dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Transporter za DA (DAT) je važan protein koji učestvuje u regulaciji DA neurotransmisije i ima centralnu ulogu u određivanju dužine trajanja delovanja DA tako što veoma brzo preuzima DA iz vanćelijske tečnosti u presinaptičke završetke (Horn, 1990; Gainetdinov i saradnici, 1998). DAT je primarni pokazatelj ekstraneuronske koncentracije i vremenske dinamike delovanja DA (Borland i Michael, 2004), kao i važna meta terapijskog delovanja neurostimulansa koji se koriste u lečenju raznih psihijatrijskih poremećaja ponašanja (Whyte i saradnici, 2004). Naši rezultati su pokazali da PSFS značajno smanjuje nivo DAT proteina u PFC, dok u hipokampusu povećava sintezu ovog proteina. Smanjena količina DAT koincidira sa smanjenjem nivoa DA. Ovi rezultati ukazuju na moguće odsustvo preuzimanja neurotransmitera DA preko DAT u PFC u uslovima PSFS. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da hronični stres smanjuje prefrontalnu dopaminsku neurotransmisiju (Mizoguchi i saradnici, 2008).

Vremenska i prostorna dinamika NA transmisije je potencijalno regulisana procesom preuzimanja posredstvom NET membranskog transportera (Blakely i Bauman, 2000). Veoma važan rezultat koji je dobijen ovim istraživanjem je da PSFS značajno povećava nivo proteina NET i da povećanje nivoa NET koincidira sa povećanjem nivoa NA u PFC. Ovi rezultati potvrđuju preuzimanje neurotransmitera NA uz pomoć NET u PFC kod životinja koje su bile izložene PSFS. Na to ukazuje značajna pozitivna korelacija između nivoa NET i NA u PFC hronično stresiranih životinja. Veća ekspresija NET ukazuje na povećanu potrebu za preuzimanjem NA u PFC hronično stresiranih životinja. Ovaj adaptivni odgovor je verovatno neophodan za održanje kapaciteta NA (visok nivo NA) u PFC po delovanju hroničnog stresa. Naši rezultati potvrđuju da PSFS dovodi do adaptacije koje su očekivane po delovanju hroničnog stresa. Ekstremno stresiranje ili traumatično iskustvo obično su povezani sa povećanjem

aktivnosti noradrenalinskog sistema koji polazi od LC i amigdale (Francati i saradnici, 2007; Bremner i saradnici, 2008). Brojne studije pokazuju da je povećana aktivnost noradrenalinskog sistema povezana sa nastankom depresije, PTSD i hiperaktivnog poremećaja nedostatka pažnje (Callado i saradnici, 1998; Biederman i Spencer, 1999; Southwick i saradnici, 1999). Brojne studije su pokazale da lekovi koji blokiraju NET efikasno otklanjanju simptome obolelih od poremećaja raspoloženja i hiperaktivnog poremećaja nedostatka pažnje, verovatno preko delovanja u okviru PFC (Frazer, 2000; Bymaster i saradnici, 2002; Michelson i saradnici, 2003).

Važno je istaći da su naši rezultati pokazali smanjenu količinu NET proteina u hipokampusu životinja izlaganih hroničnom stresu. Pored toga, uočili smo povećan nivo DAT proteina u hipokampusu hronično stresiranih životinja, što ukazuje na povećano preuzimanje DA. Dopamin ubrzo biva konvertovan u NA. Pozitivna korelacija između povećane količine NA i nivoa DBH enzima u hipokampusu to potvrđuje. Upravo ova zavisnost objašnjava smanjenje količine DA i povećanje količine NA u hipokampusu hronično stresiranih životinja.

Poznato je da kateholamini mogu da se skladište u vezikule uz pomoć vezikularnih monoaminskih transportera (VMAT) ili da se razgrađuju enzimima MAO i COMT (Flierl i saradnici, 2007). VMAT 2 je odgovoran za preuzimanje i skladištenje monoamina iz citosola u unutarćelijske vezikule i eksprimiran je u neuronima koji su uključeni u regulaciju raspoloženja i ponašanja (Schwartz i saradnici, 2003). VMAT ima ključnu ulogu ne samo u odabiru, deponovanju i otpuštanju monoamina, već takođe i u finom podešavanju nervnih i endokrinih izlaznih signala (Eiden i saradnici, 2000). Naše istraživanje pokazuje da PSFS značajno povećava nivo VMAT 2 proteina u oba ispitivana moždana regiona i da povećanje nivoa VMAT 2 koincidira sa povećanjem nivoa NA. Ovaj rezultat ukazuje na preuzimanje, skladištenje i veću spremnost za otpuštanje neurotransmitera NA u PFC i hipokampusu pacova izloženih PSFS. Na to ukazuje značajna pozitivna korelacija između nivoa VMAT 2 i NA hronično stresiranih životinja u obe ispitivane moždane oblasti. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su utvrdili da ponavljani stres IMO povećava ekspresiju VMAT 2 nivoa u mnogim ćelijama koje sintetisu NA (Tillinger i saradnici, 2010). Povećana ekspresija VMAT 2 proteina, predstavlja adaptaciju na dugotrajno delovanje snažnog stresora. Dobijeni rezultat predstavlja mehanizam za ubrzano korišćenje povećanog kateholaminskog kapaciteta u uslovima hroničnog stresa. Povećan VMAT 2 u talamusu i ventralnom srednjem mozgu je utvrđen kod pacijenata sa bipolarnim poremećajem (Zubieta i saradnici, 2001). U trombocitima depresivnih pacijenata koji

nisu tretirani antidepresivima postoji značajno povećanje ekspresije VMAT 2 u poređenju sa zdravim osobama (Zucker i saradnici, 2002).

Veoma važan rezultat je da PCR metodom u realnom vremenu sa Taq Man probama nismo uspjeli detektovati iRNK za DAT u PFC, kao i iRNK za NET u hipokampusu. Međutim, Western blot metodom uspjeli smo da kvantifikujemo smanjenje DAT u PFC, a NET u hipokampusu hronično stresiranih životinja. Pored toga uspjeli smo da kvantifikujemo snižene nivoe iRNK za NET u PFC, iRNK za DAT u hipokampusu i iRNK za VMAT 2 u obe ispitivane moždane oblasti, dok su nivoi pomenutih proteina bili povećani. Dobijeno neslaganje između nivoa iRNK i nivoa proteina može da bude povezano sa razlikama u stabilnosti iRNK ili efikasnosti procesa translacije (Gomi i Matsuo, 2001). Regulacija ekspresije može da deluje na pojedine iRNK u smislu blokiranja njihove translacije, što može uticati na razgradnju iRNK (Garcia-Lopez i saradnici, 2007). Na osnovu izloženih rezultata moglo bi se zaključiti da je primarni target u regulaciji ekspresije gena za preuzimanje neurotransmitera, u uslovima hroničnog stresa, razgradnja iRNK.

Inerantan rezultat ove disertacije je da litijum kod pacova izlaganih PSFS u trajanju od 14 dana u obe ispitivane moždane oblasti vraća ekspresiju gena za DAT, NET i VMAT 2 na vrednosti približne kontrolnim vrednostima. Veoma bitno je naglasiti da korelacije između nivoa ispitivanih transportera i količine DA i NA, potvrđuju da litijum u obe ispitivane moždane oblasti vraća na kontrolni nivo preuzimanje kateholamina što za posledicu ima vraćanje nivoa kateholamina na nivo karakterističan za nestresirane životinje. Uticaj litijuma na promet DA je po mišljenju nekih autora inhibitoran (Engel i Berggren, 1980; Friedman i Gershon, 1973), dok drugi smatraju da je stimulativan (Fadda i saradnici, 1980; Hesketh, 1978). Neki pak tvrde da litijum nema efekta na promet DA u mozgu (Bliss i Ailion, 1970; Ho i saradnici, 1970). Utvrđeno je da u interakciji DA i DAT značajnu ulogu ima ćelijski membranski potencijal (Chen i Reith, 2004). Borre i saradnici (2014) su pokazali da DAT kontroliše homeostazu DA tako što reguliše proces preuzimanje DA, koji zavisi od koncentracije jona Na^+ i Cl^- , kao i da na DAT postoje mesta vezivanja jona Na^+ koja kontrolišu promet katjona i regulisana su jonima Cl^- . To je u skladu sa poznatom činjenicom da litijum kao katjon utiče na transport i promet jona i aktivnost enzima NaK ATPaze (El-Mallakh, 2004). Iz literature je poznato da postoje regionalne razlike u efektu litijuma kada je u pitanju ekspresija VMAT. Naime, nivo iRNK za gen VMAT 2 je statistički značajno povećan u oblastima *raphe nuclei*, *ventral tegmental area* i *substantia*

nigra, a smanjen u LC (Cordeiro i saradnici, 2002). Budući da se neuroni u kojima je VMAT 2 eksprimiran nalaze u moždanim oblastima od izuzetnog značaja za regulaciju raspoloženja i ponašanja (Cordeiro i saradnici, 2002), naši rezultati doprinose potvrdi hipoteze da promene u ekspresiji VMAT 2 doprinose terapeutskom delovanju litijuma kod hronično stresiranih pacova koji su u stanju sličnom depresiji.

5.4. Delovanje litijuma na aktivnost i količinu enzima koji učestvuju u razgradnji dopamina i noradrenalina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Enzim MAO je vezan za membranu mitohondrija, katalizuje oksidativnu deaminaciju monoaminskih neurotransmitera i ima ključnu ulogu u metabolizmu amina u CNS. Posledica ovih reakcija razgradnje je povećano nastajanje potencijalno neurotoksičnih molekula, kao što su vodonik-peroksid i amonijak. Vodonik-peroksid može da bude okidač za dalju povećanu proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i da indukuje oštećenje mitohondrija i izazove apoptozu neurona. Poznata je povezanost između povišene produkcije ROS i povećanja aktivnosti MAO u trombocitima kod depresivnih poremećaja (Herken i saradnici, 2007). Važan rezultat dobijen našim istraživanjem je da izlaganje pacova PSFS u trajanju od 14 dana značajno povećava aktivnost enzima MAO A i MAO B, kao i sintezu COMT enzima u PFC odraslih mužjaka pacova, dok u hipokampusu primenjeni stresor značajno povećava aktivnost MAO B enzima i sintezu COMT enzima. Povećana aktivnost i sinteza enzima odgovornih za razgradnju kateholamina može da ukaže na povećane potrebe za razgradnjom ispitivanih neurotransmitera u obe proučavane moždane oblasti u uslovima hroničnog stresa. Kod životinja izlaganih PSFS utvrđena je značajna negativna korelacija između enzimske aktivnosti MAO A i nivoa DA, enzimske aktivnosti MAO B i nivoa DA, kao i nivoa COMT proteina i DA u PFC. Pored toga, kod životinja izlaganih PSFS utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između enzimske aktivnosti MAO B i nivoa DA, kao i nivoa COMT i DA u hipokampusu. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost povećane razgradnje neurotransmitera DA u PFC i hipokampusu kod životinja izloženih PSFS, što verovatno ima za posledicu poremećenu regulaciju redoks ravnoteže i oštećenje mitohondrija. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su ustanovili da stresom indukovana aktivacija MAO može da dovede do oksidativnog

oštećenja mitohondrija (Bortolato i saradnici, 2008). Takođe je utvrđeno da stres IMO dovodi do oksidativnog stresa u mozgu pacova (Zaidi i Banu, 2004). Povećanje nivoa ROS u CNS je povezano sa razvojem brojnih neuropsihijatrijskih oboljenja (Halliwell i Cross, 1994). Poznato je da oksidativni stres ima ključnu ulogu u degenerativnim procesima DA neurona kod obolelih od Parkinsonove bolesti (Prasad i saradnici, 1999). Utvrđeno je da je aktivnost mitohondrijske MAO A povišena u mozgu depresivnih pacijenata (Hu i saradnici, 2011). Pored toga, pokazano je da povećanje aktivnosti MAO B u astrocitima može da dovede do simptoma Parkinsonove bolesti (Mallajosyula i saradnici, 2008). Podaci iz literature potvrđuju da su ključne terapijske strategije u lečenju mnogih neuropsihijatrijskih poremećaja upravo inhibicija aktivnosti MAO i/ili povećanje nivoa monoaminskih neurotransmitera. Na primer, poznato je da se selektivni MAO A inhibitori koriste kao antidepresivi i u lečenju drugih sličnih neurodegenerativnih oboljenja (Youdim i saradnici, 2006). Pored toga, utvrđeno je povećanje nivoa DA izazvano delovanjem inhibitora MAO B (Cesura i saradnici, 1992; Knoll, 2000). Takođe, podaci iz literature potvrđuju da se inhibitori COMT koriste u lečenju Parkinsonove bolesti (Muller, 2015).

Iz literature je poznato da litijum menja stereoselektivnost enzima MAO u mozgu pacova, što ukazuje da litijum dovodi do konformacionih promena MAO enzima (Smith, 1989). Takođe je utvrđeno da lekovi efikasni u terapiji psihijatrijskih poremećaja utiču na funkciju centralnih monoaminskih neurotransmitera, koji se primarno razgrađuju enzimima MAO. Ispitivanjem efekata antidepresiva i litijuma na aktivnost MAO A i MAO B u mitohondrijama mozga pacova i utvrđeno je da antidepresivi smanjuju aktivnost ovih enzima, dok litijum nije uticao na inhibiciju enzimske aktivnosti nijedne izoforme MAO u mitohondrijama mozga pacova (Nag, 2004). Međutim, Fišar i saradnici (2010) su utvrdili da litijum u određenoj meri utiče na inhibiranje obe izoforme MAO. Fiziološka značaj inhibicije MAO farmakološki različitim vrstama antidepresiva i stabilizatora raspoloženja mogao bi da se tumači kroz doprinos procesima modulacije monoaminske neurotransmisije u mozgu i regulacije raspoloženja i emocija. Naši rezultati su pokazali da litijum kod pacova izlaganih PSFS u trajanju od 14 dana smanjuje aktivnost enzima MAO A u PFC i MAO B u hipokampusu, što za posledicu ima povećanje nivoa DA do kontrolnih vrednosti. Proces inhibicije MAO u mozgu lekovima, najverovatnije, ima za posledicu usporavanje povratnih procesa neurodegeneracije (npr. u dopaminskim neuronima) koji su pokrenuti oksidativnim stresom (Youdim i saradnici, 2006). Naime, ustanovljeno je da je neuroprotekcija uobičajeni efekat koji se postiže dugotrajnim

tretmanom poremećaja raspoloženja i Parkinsonove bolesti različitim antidepresivima, stabilizatorima raspoloženja i antipsihoticima. Nije u potpunosti razjašnjen molekularni mehanizam uočenog neuroprotektivnog delovanja ovih lekova. Međutim, očigledno je da glavnu komponentu neuroprotekcije čine procesi koji na lokalnom nivou dovode do smanjenja oksidativnog stresa, kao i da inhibicija MAO enzima doprinosi ovom smanjenju stvaranja visoko reaktivnih molekularskih vrsta. Važan rezultat ove disertacije je da litijum povećava aktivnost MAO B u PFC, a da aktivnost MAO A enzima u hipokampusu, kao i nivoi COMT enzima u obe ispitivane moždane oblasti ostaju povišeni. Ovi rezultati ukazuju na povećanu potrebu za razgradnjom NA akumuliranog u uslovima hroničnog stresa. Kateholaminski sistem u obe ispitivane moždane oblasti funkcioniše u cilju smanjenja nivoa NA akumuliranog u uslovima hroničnog stresa. Negativne korelacije između povećane aktivnosti MAO B u PFC, MAO A u hipokampusu i COMT u obe ispitivane oblasti i smanjene količine NA u obe ispitivane moždane oblasti to potvrđuju.

5.5. Delovanje litijuma na ekspresiju gena za enzime antioksidativne zaštite u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Poznato je da je stanje oksidativnog stresa rezultat delovanja hroničnog stresa, a štetne posledice poremećene redoks ravnoteže doprinose i patologiji stresom izazvanih psihijatrijskih oboljenja kod ljudi. Oksidativni stres i povećano stvaranje ROS može da izazove oštećenje mitohondrija i apoptozu neurona, što dovodi do atrofije pomenutih moždanih oblasti koje su naročito osetljive na povišeni nivo CORT i povećano stvaranje ROS (Lee i saradnici, 2002). Pokazano je da je PSFS, koji se često koristi kao model emocionalnog stresa kod pacova, praćen povećanjem procesa lipidne peroksidacije (Liu i saradnici, 1994; Manoli i saradnici, 2000), kao i promenom aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (Fontella i saradnici, 2005; Derin i saradnici, 2006). Naši rezultati su pokazali da pozitivna korelacija između povećane aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i povećane aktivnosti enzima odgovornih za razgradnju neurotransmitera u obe ispitivane moždane oblasti, ukazuje na uključivanje sistema antioksidativne odbrane u cilju smanjenja eventualnih oksidativnih oštećenja nastalih usled povećane razgradnje kateholamina u uslovima hroničnog stresa. Istraživanja Fontella i saradnika

(2005) su pokazala da PSFS indukuje oksidativni stres u hipokampusu pacova, tako što se posle stresiranja u hipokampusu pacova značajno povećava samo aktivnost GPx, dok se aktivnosti SOD i CAT ne menjaju značajno. Naša istraživanja su pokazala da kod životinja izloženih PSFS u trajanju od 14 dana nije došlo do promena nivoa iRNK i proteina SOD 1, CAT, GPx i GR, ali je zabeleženo značajno povećanje ekspresije gena za SOD 2. Međutim, tretman PSFS izaziva značajno povećanje aktivnosti SOD 1, SOD 2 i CAT, kao i značajno smanjenje aktivnosti GPx, dok aktivnost enzima GR ostaje nepromenjena u obe ispitivane moždane oblasti. Dobijeno neslaganje između nivoa iRNK i aktivnosti enzima može da bude povezano sa razlikama u stabilnosti iRNK ili efikasnosti procesa translacije (Gomi i Matsuo, 2001). Pored toga, ekspresija iRNK za enzime antioksidativne zaštite može na početku delovanja hroničnog stresa biti povećana, a zatim nakon određenog vremena smanjena (Garcia-Lopez i saradnici, 2007). Takođe, regulacija ekspresije može da deluje na pojedine iRNK u smislu blokiranja njihove translacije, što može uticati na razgradnju iRNK (Garcia-Lopez i saradnici, 2007). Dakle, primarni target regulacije ekspresije gena za enzime antioksidativne zaštite u uslovima hroničnog stresa, mogao bi da bude razgradnja iRNK. Ovi rezultati mogu da se posmatraju kao mehanizmi adaptacije sistema antioksidativne zaštite na delovanje hroničnog stresa (Garcia-Lopez i saradnici, 2007). Povećana aktivnost antioksidativnih enzima (SOD 1, SOD 2 i CAT) u obe ispitivane moždane oblasti može da predstavlja značajan adaptivni fenomen sistema antioksidativne zaštite kod pacova izlaganih PSFS. Povećanje aktivnosti SOD tokom režima stresiranja je indikator relativnog povećanja stvaranja superoksidnih radikala, što može da stimuliše sekundarnu liniju odbrane, uključujući CAT (Fridovich, 1995). Terapija antidepresivima značajno smanjuje enzimsku aktivnost SOD i CAT kod depresivnih pacijenata (Abdalla i Bechara, 1994; Bilici i saradnici, 2001; Khanzode i saradnici, 2003). Naši rezultati su pokazali da pacovi stresirani PSFS pokazuju statistički značajno smanjenje aktivnosti GPx i saglasni su sa rezultatima istraživanja drugih autora (Nilakantan i saradnici, 2005), koji su utvrdili da reaktivne molekulske vrste poput azotnih oksida ili njihovih derivata inhibiraju aktivnost GPx enzima. Smanjenje endogene antioksidativne zaštite je indukovano lipidnom peroksidacijom, a to doprinosi ulozi hroničnog stresa u nastanku depresije (Che i saradnici, 2015).

Modulatorno delovanje litijuma u smislu ublažavanja stanja oksidativnog stresa nije dovoljno istraženo. Studija de Vasconcellos i saradnika (2006) pokazuje da u hipotalamusu i

hipokampusu pacova stresiranih hroničnim nepredvidivim stresom, hronični tretman litijumom pokazuje antioksidativna svojstva. Frey i saradnici (2006) su ispitivali delovanje litijuma u životinjskom modelu manije izazvane amfetaminom i merili aktivnosti SOD i CAT u PFC i hipokampusu odraslih mužjaka pacova soja Wistar. U ovom modelu bipolarnog poremećaja, tretman pacova litijumom je značajno smanjio aktivnost SOD u PFC, a aktivnost CAT u hipokampusu. Klinička ispitivanja antioksidativnog statusa kod pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja pokazuju da postoji povišena aktivnost SOD i CAT u plazmi netretiranih maničnih pacijenata u odnosu na zdrave kontrole. Nasuprot tome, akutni tretman litijumom doveo je do značajnog smanjenja odnosa SOD/CAT. Drugim rečima, litijum vraća aktivnost SOD na vrednost zdravih kontrola, a aktivnost CAT se dodatno povećava u odnosu na netretirane pacijente (Machado-Vieira i saradnici, 2007). Sousa i saradnici (2014) su ispitivali pacijente u ranoj fazi bipolarnog poremećaja i ustanovili da postoji neravnoteža enzima antioksidativne zaštite, sa povećanim nivoima aktivnosti CAT i GPx i smanjenim odnosom SOD/CAT u plazmi netretiranih pacijenata u odnosu na zdrave kontrole, a da tretman pacijenata litijumom statistički značajno smanjuje SOD aktivnost u plazmi. Naša istraživanja su pokazala da litijum kod pacova izlaganih PSFS u trajanju od 14 dana u PFC povećava aktivnost SOD 2, CAT i GPx enzima, smanjuje aktivnost SOD 1, dok aktivnost GR enzima, pod delovanjem litijuma, ostaje nepromenjena. Međutim, litijum u hipokampusu povećava aktivnosti enzima CAT, GPx i GR, dok aktivnosti enzima SOD 1 i SOD 2 vraća na nivo kontrolnih vrednosti. U skladu sa već diskutovanim rezultatima, usled potražnje za povećanom razgradnjom NA čiji je nivo povišen po delovanju PSFS i očekivanog stanja oksidativnog stresa, moglo bi se pretpostaviti da se terapijski efekat litijuma na normalizaciju nivoa monoaminskih neurotransmitera po delovanju stresa verovatno ostvaruje i njegovom regulacijom molekulskih mehanizama antioksidativne zaštite. Na to ukazuju pozitivne korelacije između povećane aktivnosti MAO B u PFC i MAO A u hipokampusu, povećane COMT u obe moždane oblasti i povećane aktivnosti enzima antioksidativnih zaštite. Dakle, rezultati ukazuju da litijum posreduje u uključivanju sistema antioksidativne odbrane u cilju smanjenja eventualnih oksidativnih oštećenja nastalih usled povećane razgradnje NA. Na osnovu dobijenih rezultata mogli bismo da pretpostavimo da litijum utiče na veću spremnost antioksidativnog sistema u obe ispitivane moždane oblasti na eventualne nove izazove (dodatni stres). Dodatni akutni stres IMO bi

verovatno potvrdio, da litijum kod hronično stresiranih životinja utiče na veću spremnost antioksidativnog sistema na novi izazov.

5.6. Delovanje litijuma na ekspresiju transkripcionog faktora BDNF u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Poznato je da BDNF reguliše otpuštanja neurotransmitera (Lessmann i saradnici, 1994), aktivnosti HPA sistema (Naert i saradnici, 2011), kao i ponašanje jedinke. Dokazi koji povezuju dejstvo BDNF i nastanak depresije dobijeni su iz studija koje pokazuju da stres, koji se smatra okidačem depresije, menja i ekspresiju BDNF. Socijalna izolacija, forsirano plivanje ili odvajanje od majke, dovode do smanjenja ekspresije BDNF u hipokampusu. Ekspresija BDNF je takođe smanjena i uslovljenim raspoloženjem udruženim sa zasecanjem repa, što pokazuje da prethodno iskustvo može da dovede do dugoročnih promena u ekspresiji BDNF (Rasmussen i saradnici, 2002). Neke studije pokazuju da i pojedinačni i ponavljani stres imobilizacije dovodi do smanjenja nivoa iRNK za BDNF u hipokampusu, što je utvrđeno metodom *in situ* hibridizacije (Smith i saradnici, 1995; Ueyama i saradnici, 1997). Postoje i studije u kojima nije utvrđen efekat PSFS na BDNF (Kuroda i McEwen, 1998). Međutim, naša istraživanja su pokazala da PSFS u trajanju od 14 dana značajno povećava sintezu proteina transkripcionog faktora BDNF. Postoje i studije koje su, poput naše, utvrdile da je stresiranje izazvalo povećanje sinteze ovog faktora. Na primer, pojedinačni stres imobilizacije dovodi do naglog povećanja ekspresije BDNF u hipokampusu, hipotalamusu i hipofizi (Givalois i saradnici, 2001; Rage i saradnici, 2002; Marmigere i saradnici, 2003), pri čemu su najveći efekti uočeni u granularnom ćelijskom sloju dentatnog girusa, ali takođe i u CA3 i CA1 piramidalnim ćelijskim slojevima. Istraživanja su pokazala da razlog ovog neslaganja nije potpuno jasan, ali mogao bi da bude povezan sa različitim vremenskim periodom od poslednje epizode stresiranja do trenutka kada je određivan nivo BDNF. Važno je da se istakne da uspešnosti procesa adaptacije na stres, doprinosi i složena struktura gena za BDNF koja omogućava da se određene varijante prepisa gena za BDNF različito eksprimiraju u zavisnosti od subćelijske lokalizacije, od vrste moždane oblasti, kao i od specifičnosti stresnog stimulusa (Ieraci i saradnici, 2015; Lyons i West, 2011; Baj i saradnici, 2012; Musazzi i saradnici, 2014) i njegove dužine trajanja (Capocchia i saradnici,

2013). Ovi autori su pokazali da u PFC i hipokampusu socijalna izolacija odraslih mužjaka miševa na različit način reguliše ekspresiju određenih varijanti prepisa, na taj način što selektivno smanjuje samo nivo iRNK za BDNF za transkript BDNF-7, dok se transkripti ostalih varijanti BDNF ne menjaju. Murakami i saradnici (2005) ustanovili su da i akutni i hronični stres smanjuju nivo iRNK za BDNF u hipokampusu pacova. Poznato je da gen za BDNF pacova ima kompleksnu strukturu (Timmusk i saradnici, 1993) i više promotora. Različitim izborom ovih promotora, kao i različitim iskrajanjem prepisa, kao rezultat se dobijaju 4 različite iRNK koje imaju različite neprevodive egzone i isti kodirajući egzon, a interesantno je da sve kodiraju identičan BDNF protein i nije razjašnjen biološki smisao postojanja različitih iRNK za BDNF. Smatra se da postojanje više različitih promotora određuje tkivno-specifičnu ekspresiju gena za BDNF pacova (Timmusk i saradnici, 1993). Tako je pokazano da su dobijeni prepisi različito eksprimirani u pojedinim moždanim oblastima. Naša istraživanja su pokazala da PSFS u trajanju od 14 dana značajno povećava sintezu proteina transkripcionog faktora BDNF, kao i da je povećanje BDNF proteina koreliše sa povećanjem NA u obe ispitivane moždane oblasti. Ovaj adaptivni fenomen moglo bi se objasniti na sledeći način: poznato je da BDNF deluje u smislu nadoknađivanja zaliha neurohormona za kojima postoji povišena potražnja tokom delovanja hroničnog stresa (Nawa i saradnici, 1993; Givalois i saradnici, 2004a; Givalois i saradnici, 2004b; Naert i saradnici, 2006). Na taj način BDNF ostvaruje svoje "zaštitno" dejstvo u stresnim uslovima. Pored toga, utvrdili smo da je smanjen nivo iRNK za BDNF u PFC, što ukazuje na to da PSFS u trajanju od 14 dana povećava sintezu BDNF verovatno bez delovanja na transkripcione procese. Za razliku od PFC, u hipokampusu PSFS uzrokuje promene BDNF i na nivou transkripcije i na nivou translacije. Ovaj adaptivni odgovor je potreban radi održavanja kapaciteta BDNF u hipokampusu u uslovima izazvanim PSFS, budući da je hipokampus region koji ima ključnu ulogu u procesima učenja i pamćenja, a takođe predstavlja i moždani region koji je posebno osetljiv na delovanje hroničnog stresa (Eichenbaum, 2004; Tse i saradnici, 2014). Marmigere i saradnici (2003) su pokazali da akutni stres imobilizacije dovodi do naglog povećanja nivoa iRNK za BDNF u hipokampusu pacova. Pored toga, kod odraslih pacova, hipokampus predstavlja region mozga koji sadrži najviši nivo iRNK za BDNF (Conner i saradnici, 1997) i nivo BDNF proteina (Nawa i saradnici, 1995). Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da povećan nivo iRNK za BDNF u hipokampusu potvrđuje veću spremnost hipokampusa kao regiona vrlo osetljivog na stres, na novi izazov (stres). Poznato je da BDNF

ima važnu ulogu u mnogobrojnim procesima koji doprinose nervnoj strukturalnoj i funkcionalnoj plastičnosti (Tapia-Arancibia i saradnici, 2004). Iz literature je poznato da BDNF ima ulogu u modulaciji aktivnosti monoaminskog sistema u mozgu odraslih nestresiranih pacova (Siuciak i saradnici, 1996). Sinteza BDNF u hipokampusu je regulisana različitim neurotransmiterima (serotonin, noradrenalin) i hormonima (CORT) (Thoenen i saradnici, 1991; Lindholm i saradnici, 1994). Važno je još jednom istaći da su naši rezultati pokazali pozitivnu korelaciju između povećanog nivoa BDNF i količine NA u obe ispitivane moždane oblasti što ukazuje na značajnu fiziološku ulogu BDNF u procesima koji su potrebni da bi neuroni mogli da održavaju povećanu količinu NA u uslovima izazvanim delovanjem PSFS. Naši rezultati potvrđuju značajnu fiziološku ulogu BDNF u regulaciji monoaminskog sistema u uslovima hroničnog stresa. Sa druge strane, poznato je i da NA utiče na ekspresiju faktora rasta (BDNF, NGF- β , GDNF, FGF-2 i IL-6) u glijskim ćelijama (Day i saradnici, 2014).

Litijum u PFC i hipokampusu kontrolnih životinja povećava ekspresiju gena za BDNF. Dobijeni rezultat potvrđuje neuroprotektivno delovanje litijuma. Međutim, litijum kod pacova izlaganih PSFS u trajanju od 14 dana snižava povećane vrednosti sinteze BDNF proteina, odnosno vraća ih na kontrolni nivo u obe ispitivane moždane oblasti. Rezultati drugih autora pokazuju da se u životinjskom modelu manične depresije količina BDNF smanjuje u PFC i hipokampusu pacova, a da primena litijuma dovodi do povratnih promena i vraćanja nivoa BDNF u ovim moždanim oblastima stresiranih pacova (Cechinel-Recco i saradnici, 2012; Frey i saradnici 2006). Yasuda i saradnici (2009) su pokazali da litijum selektivno aktivira promotor IV gena za BDNF u neuronima pacova. Naime, poznato je da različite varijante prepisa BDNF pacova pokazuju specifičan profil ekspresije u različitim moždanim oblastima, a pokazuju i različitu regulaciju zavisno od vrste primenjenog leka. Litijum je direktan inhibitor enzima GSK3 i HDAC (histon deacetilaza). Ovi autori su prvi utvrdili da su GSK3 i HDAC početne mete delovanja litijuma u aktiviranju promotora IV gena za BDNF i da ta indukcija BDNF podrazumeva novi odgovarajući region u promotoru IV gena za BDNF. Ovi procesi imaju značajan udeo u terapijskom delovanju litijuma.

5.7. Delovanje litijuma na koncentraciju adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u plazmi i glukoze u krvi odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Stres izaziva promene sekrecije hormona, kojima se postiže adaptacija jedinke na novonastalu situaciju. Osnovna odlika endokrinog odgovora na stres je povećanje koncentracije CORT u krvi. Brojni autori potvrdili su da PSFS utiče na lučenje CORT (Kim i Han, 2006; Uchida i saradnici, 2008). Dugotrajno izlaganje delovanju glukokortikoida povezano je sa brojnim metaboličkim poremećajima, uključujući povećanje koncentracije GLU i smanjenje iskoristivosti glukoze (Munck, 1971; Doyle i saradnici, 1994; Horner i saradnici, 1990). Stoga je od interesa da se analizira delovanje litijuma na nivo ACTH, CORT i GLU kod pacova koji su izloženi dugotrajnom stresiranju, odnosno PSFS. Interesantni rezultati dobijeni su merenjem parametara koji ukazuju na aktivnost HPA sistema. Pokazano je da PSFS u trajanju od 14 dana značajno smanjuje nivo ACTH u plazmi, a povećava nivo CORT u plazmi i GLU u krvi odraslih mužjaka pacova. Adaptivni mehanizmi HPA sistema mogli bi da se objasne delovanjem ekstra-hipotalamičkih puteva u kontroli CORT (Naert i saradnici, 2011), pogotovo splahnhičke simpatičke inervacije (Charlton, 1990; Whitworth i saradnici, 2003), koji su pod kontrolom neurona PVN hipotalamusa (Pacak i saradnici, 1995). Osim toga, porastu nivoa CORT u plazmi tokom odgovora na hronični stres dodatno doprinosi lučenje arginin vazopresina (AVP) iz hipotalamusa (Dinan i saradnici, 1999), koji direktno stimuliše lučenje CORT (Grazzini i saradnici, 1998) i tako doprinesi adaptivnom odgovoru HPA sistema (Naert i saradnici, 2011). Potrebno je naglasiti da i porast nivoa pro-inflamatornih citokina, koji se često dešava kod depresivnih poremećaja, dodatno još povećava lučenje glukokortikoida (Dinan, 1994). Utvrđeno je da centralna administracija BDNF menja aktivnost HPA sistema (Givalois i saradnici, 2004; Naert i saradnici, 2006). Nagli porast ekspresije BDNF prethodi aktivaciji neurona PVN koji u odgovoru na stres luče AVP i CRH utiče na lučenje CORT (Givalois i saradnici, 2004). Naši rezultati su pokazali pozitivnu korelaciju između povećanog nivoa BDNF u obe ispitivane moždane oblasti i koncentracije CORT u plazmi. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu fiziološku ulogu BDNF u regulaciji aktivnosti HPA sistema u uslovima PSFS.

Dobijeni rezultati u našem model-sistemu pokazali su da izlaganje PSFS dovodi do povećanog nivoa CORT u plazmi i GLU u krvi eksperimentalnih životinja. Poznato je da

glukokortikoidi indukuju glukoneogenezu u jetri, što dovodi do povećanja nivoa GLU u krvi (McKay i Cidlowski, 2000).

Kod individua sa određenom naslednom predispozicijom, hronični stres kao glavni faktor rizika za pojavu psihijatrijskih bolesti, može da rezultira pojačanim i prekomernim lučenjem glukokortikoida iz kore nadbubrežnih žlezda i neprekidnom aktivacijom centralnog i perifernog nervnog sistema (Irwin i saradnici, 1991). Poznato je da ponavljana primena stresnih stimulusa snažno utiče na aktivnost centralnog noradrenalinskog sistema (Rusnak i saradnici, 2001) i na otpuštanje CRH (Givalois i saradnici, 2004). Osim toga, utvrđeno je da su nivoi kortizola i NA povišeni kod depresivnih pacijenata (Leonard, 2001). Iz literature je poznato da može da dođe čak i do smanjenja veličine hipokampusa kod depresivnih pacijenata koji nisu imali tretman antidepressivima (Bremner i saradnici, 2000), što je verovatno posledica dugotrajnog povišenog nivoa kortizola (Leonard, 2001). Naši rezultati su pokazali da PSFS značajno povećava koncentraciju NA u obe ispitivane moždane oblasti. Interesantan podatak dobijen u našem istraživanju je mala, ali značajna pozitivna korelacija između nivoa NA u PFC i hipokampusu i nivoa CORT u plazmi pacova izloženih PSFS. Takođe, dobijena je i statistički značajna negativna korelacija između nivoa DA u PFC i hipokampusu i nivoa CORT u plazmi pacova izloženih PSFS. Dobijene korelacije potvrđuju povezanost kateholaminskog sistema u obe ispitivane moždane oblasti sa HPA sistemom u uslovima hroničnog stresa. Sposobnost HPA sistema da bude neprekidno u stanju da odgovori na delovanje hroničnog ili ponavljanoog stresora povezana je sa kontinuiranom aktivacijom PVN od strane uzlaznih NA neurona iz moždanog stabla.

Naši rezultati su pokazali da primena litijuma kod kontrolnih životinja dovodi do povećanja nivoa CORT u plazmi i GLU u krvi. Poznato je da je litijum uključen u regulaciju adrenokortikalne funkcije tako što stimuliše i sintezu i otpuštanje CORT (Chaudhuri-Sengupta i saradnici, 2003) i porast GLU u krvi (Ghosh, 2007). Pored toga, istraživanja delovanja litijuma na HPA sistem kod laboratorijskih životinja pokazuju da je kod pacova već posle dve nedelje tretmana litijumom povećan broj glukokortikoidnih receptora u hipokampusu i PVN hipotalamusa (Budziszewska i Lason, 1994; Peiffer i saradnici, 1991; Semba i saradnici, 2000). Međutim, litijum kod pacova izloženih PSFS u trajanju od 14 dana vraća nivoe ACTH i CORT u plazmi i GLU u krvi na kontrolne nivoe. Dakle, litijum dovodi do smirivanja hiperaktivnosti HPA sistema nastale usled primene PSFS. Dobijeni rezultat ukazuje da primena litijuma otklanja

efekat PSFS. Pretpostavlja se da litijum dovodi do smanjenja funkcije glukokortikoidnih receptora verovatno tako što interaguje sa glukokortikoidnim receptorskim kompleksom, pogotovo sa proteinom BAG-1, konstituentom kompleksa (Basta-Kaim i saradnici, 2004; Zhou i saradnici, 2005). Pored navedenog, delovanje litijuma takođe bi moglo da se objasni i direktnim delovanjem na posttranslacione modifikacije (poput fosforilacije) nekih ključnih enzima, kao što je GSK3 (Rodriguez-Gil i saradnici, 2000; Bosch i saradnici, 1986).

5.8. Delovanje litijuma na ponašanje odraslih mužjaka pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

Depresija je jedan od najvažnijih zdravstvenih problema savremenog društva. Oko 350 miliona ljudi širom sveta obolelo je od depresije (Meekums i saradnici, 2015). Hronični stres izaziva hiperaktivaciju i disfunkciju stresom aktiviranih kateholaminskih sistema i HPA sistema, kao i sistema antioksidativne odbrane, što dovodi do strukturnih i funkcionalnih oštećenja mozga i ponašanja sličnog depresiji (Sorrells i saradnici, 2009; Popoli i saradnici, 2011). Naši rezultati su pokazali da mužjaci pacova izloženi PSFS pokazuju smanjenje ukupnog broja ulazaka, kao i smanjenje broja ulazaka u otvorene krake i vremena provedenog u otvorenim kracima tokom testa EPM, što ukazuje na ponašanje slično anksioznosti. Takođe je primećeno povećanje trajanja nepokretnosti u FST, što je pokazatelj ponašanja sličnog depresiji. Pored toga, važno je istaći da rezultati pokazuju da primenjeni tip stresiranja PSFS izaziva značajno povećanje indeksa anksioznosti kod životinja. Dobijeni rezultati su u skladu sa hipotezom da PSFS kod pacova izaziva ponašanje slično anksioznosti i depresiji kod ljudi (Chiba i saradnici, 2012; Haenisch i saradnici, 2009).

Naši rezultati pokazuju da izloženost PSFS dovodi do smanjenja koncentracije DA i do povećanja koncentracije NA u obe ispitivane moždane strukture, povećanja koncentracije CORT u plazmi, kao i do ponašanja sličnog anksioznosti i depresiji. Ovi rezultati potvrđuju hipotezu da su kateholaminski i HPA sistem uključeni u regulaciju ponašanja, što je saglasno sa studijama drugih autora (Patki i saradnici, 2015; Anstrom i saradnici, 2009; Leonard, 2001; Nemeroff i saradnici, 1984). Pozitivna korelacija između nivoa NA u oba ispitivana moždana regiona i indeks anksioznosti, kao i između nivoa NA u oba moždana regiona i trajanja nepokretnosti to potvrđuju. U studijama drugih autora (Leonard, 2001) pokazana je značajna negativna korelacija

između agresivnog ponašanja eksperimentalnih životinja i kapaciteta za sintezu DA, pogotovo u regionu međumozga. Naši rezultati pokazuju značajnu negativnu korelaciju između nivoa DA u oba moždana regiona i indeksa anksioznosti, kao i između nivoa DA u oba moždana regiona i trajanja nepokretnosti. Dakle, naši podaci potkrepljuju hipotezu da u okviru odgovora na stres postoji veliki stepen povezanosti između promena u aktivnosti centralnog kateholaminskog sistema i promenjenog ponašanja životinja koje je slično anksioznosti i depresiji kod ljudi (Leonard, 2001). Psihijatrijski poremećaji uglavnom su praćeni poremećajem ravnoteže između neurotransmitera glutamata i dopamina (Moghaddam, 2002) i promenama u noradrenalinskom neurotransmiterskom sistemu (Pardon i saradnici, 2002; Brunello i saradnici, 2003) u određenim moždanim oblastima.

Potvrdili smo da je stresom izazvana promena u ponašanju životinja povezana sa povećanom koncentracijom CORT u plazmi, što je saglasno sa rezultatima drugih autora (Patki i saradnici, 2015). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa CORT u plazmi i indeksa anksioznosti, kao i između nivoa CORT u plazmi i nepokretnosti životinja, što ukazuje na to da je adaptivni mehanizam (odgovor) HPA sistema veoma važan u regulaciji ponašanja u uslovima izazvanim delovanjem PSFS. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima brojnih autora. Povišeni nivo glukokortikoida kao okidač nepovoljno utiče na mehanizme biohemijskih procesa posredovane povišenim nivoom ROS (Chakraborti i saradnici, 2007; Lee i saradnici, 2002), kao i na strukturno remodelovanje ključnih moždanih oblasti izmenom neuroplastičnih mehanizama (Naert i saradnici, 2011; Ieraci i saradnici, 2016), što sve zajedno dovodi do maladaptivnih posledica koje se ogledaju u izmenjenom ponašanju (Chiba i saradnici, 2012).

Pored toga, povećanje aktivnosti enzima MAO u oba moždana regiona u uslovima hroničnog stresa može da dovede do oksidativnih oštećenja usled povećane razgradnje kateholamina. Smanjena aktivnost GPx u obe ispitivane moždane oblasti ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa. Nilakantan i saradnici (2005) utvrdili su da azot oksid i njihovi derivati inhibiraju aktivnost GPx enzima. Istraživanja Masood i saradnika (2008) su potvrdila značaj i ulogu oksidativnog stresa kao mehanizma koji je direktno povezan sa ponašanjem sličnim anksioznosti kod miševa, kao i sa nastankom depresije (Che i saradnici, 2015).

Osim toga, brojne studije idu u prilog hipotezi da je BDNF povezan sa stanjem depresije i drugih psihijatrijskih poremećaja (Castren i saradnici, 2007). Kod depresivnih pacijenata nivo BDNF je smanjen (Karege i saradnici, 2002) i može da se vrati na normalan nivo tretmanom

antidepresivima (Hashimoto i saradnici, 2004; Aydemir i saradnici, 2005). Osim toga, pokazano je da je nivo iRNK za BDNF i nivo BDNF proteina smanjen u *postmortem* mozgu depresivnih pacijenata (Dunham i saradnici, 2009), kao i u animalnom modelu depresije (Gronli i saradnici, 2006). Očigledno postoje brojni dokazi za hipotezu da je BDNF povezan sa stanjem depresije i drugim psihijatrijskim poremećajima (Castren i saradnici, 2007). Postoji pretpostavka da je nishodna regulacija ekspresije i funkcije BDNF povezana sa nastankom depresije (Numakawa i saradnici, 2011). Međutim, naši rezultati su potvrdili da povećan nivo BDNF u obe moždane oblasti koincidira i proporcionalan je sa promenama ponašanja stresiranih životinja.

Među najzastupljenijim psihijatrijskim poremećajima nalaze se poremećaji raspoloženja (Kessler, 2007). Poremećaji raspoloženja obuhvataju simptome od blagih do snažnih emocionalnih poremećaja i podrazumevaju pojavu oba krajnja tipa afektivnog spektra ponašanja: sa jedne strane preteranu tugu, a sa druge pojačano ushićenje i maniju. Pomenuto je da se pretpostavlja da litijum svoju visoku terapijsku efikasnost kod ovih pacijenata postiže smanjenjem hiperaktivnosti HPA sistema, kao i vraćanjem u ravnotežu metabolizma i sadržaja monoaminskih neurotransmitera, što se odražava na popravljavanje raspoloženja pacijenata i normalizacije njihovog afektivnog ponašanja. Ova istraživanja su potvrdila da litijum kod pacova izlaganih PSFS u trajanju od 14 dana smanjuje indeks anksioznosti, kao i trajanje nepokretnosti. Dakle, litijum stabilizuje ponašanje hronično stresiranih pacova. Rezultati većine drugih autora takođe pokazuju da litijum utiče na normalizaciju hiperaktivnog ponašanja u animalnom modelu manije (Cechinel-Recco i saradnici, 2012). Enzim GSK3 ima značajnu ulogu u delovanju litijuma na blokiranje stresom izazvane promene u smislu ponašanja sličnog depresiji kod pacova (Silva i saradnici, 2008). Utvrđeno je da litijum preko signalne kaskade posredstvom kompleksa AKT/GSK3 deluje antagonistički na ponašanje koje je zavisno od DA (Beaulieu i saradnici, 2004; Beaulieu i Caron, 2008). Naši rezultati potvrdili su značajnu negativnu korelaciju između povećanog nivoa DA u obe moždane oblasti i smanjenog indeksa anksioznosti, kao i značajnu negativnu korelaciju između povećanog nivoa DA u obe moždane oblasti i smanjenog trajanja nepokretnosti hronično stresiranih životinja tretiranih litijumom. To ukazuje da litijum preko regulacije nivoa DA učestvuje u normalizaciji ponašanja. Negativna korelacija između smanjene aktivnosti MAO A u PFC i MAO B u hipokampusu i povećane koncentracije DA u oba moždana regiona, ukazuju da litijum i preko smanjenja aktivnosti MAO enzima utiče na regulaciju ponašanja hronično stresiranih pacova. Smanjene aktivnosti pomenutih MAO enzima u PFC i

hipokampusu verovatno utiču na smanjenje oksidativnih oštećenja nastalih usled povećanja razgradnje neurotransmitera u uslovima hroničnog stresa. Na to ukazuje povećanje aktivnosti GPx enzima u obe ispitivane moždane oblasti. Dakle, litijum povećava aktivnost GPx enzima u obe moždane oblasti, odnosno vraća ih na nivo karakterističan za nestresirane životinje. Te promene su u skladu sa normalizacijom ponašanja stresiranih životinja.

Osim toga, delovanje litijuma na ponašanje svakako uključuje i poznati efekat litijuma na smanjenje sposobnosti vezikula da skladište NA u nervnim završecima, što promenom metabolizma NA dovodi do smanjenja njegove koncentracije na postsinaptičkim receptorima (Ozawa i saradnici, 1975). Naši rezultati potvrdili su značajnu pozitivnu korelaciju između smanjenog nivoa NA u obe moždane oblasti i smanjenog indeksa anksioznosti, kao i značajnu pozitivnu korelaciju između smanjenog nivoa NA i smanjenog trajanja nepokretnosti hronično stresiranih životinja tretiranih litijumom. Pomenute korelacije ukazuju da litijum preko regulacije nivoa NA učestvuje u normalizaciji ponašanja. Povoljno delovanje litijuma na stresom promenjenu aktivnost HPA sistema i vraćanje nivoa CORT na nestresirani nivo, takođe značajno doprinosi normalizaciji ponašanja (Semba i saradnici, 2000) što je u skladu sa našim rezultatima. Značajna pozitivna korelacija između nivoa CORT u plazmi i indeksa anksioznosti, kao i između nivoa CORT u plazmi i trajanja nepokretnosti hronično stresiranih životinja tretiranih litijumom potvrđuje uticaj normalizacije HPA sistema na normalizaciju ponašanja. Pored toga, naši rezultati su potvrdili da litijum deluje na promene nivoa BDNF u obe moždane oblasti i da one koincidiraju sa promenama ponašanja stresiranih životinja.

Na osnovu rezultata dobijenih ovim istraživanjem, možemo zaključiti da litijum, u oba ispitivana moždana regiona, vraća neurotransmiterski i antioksidativni status na nivo nestresiranih životinja. Pored toga, tretman litijumom je kod stresiranih životinja vratio koncentracije hormona stresa na nivo karakteristične za nestresirane životinje. Sve pomenute promene su u skladu sa normalizacijom ponašanja stresiranih životinja.

6. ZAKLJUČCI

1) Uticaj ponavljano g stresa fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana na neurotransmitterski i antioksidativni status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova

a) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana** smanjuje količinu DA i povećava količinu NA u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih mužjaka pacova.

b) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana** smanjuje ekspresiju gena za TH i gena za DBH u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova, dok u hipokampusu, smanjuje ekspresiju gena za TH i povećava nivo DBH enzima. **Pozitivne korelacije između smanjene količine DA i TH ukazuju da u obe ispitivane moždane oblasti, primenjeni stresor ne utiče na „de novo“ sintezu kateholamina. Pored toga, negativna korelacija između povećane količine NA i smanjenog nivoa TH enzima ukazuju na egzogeni izvor kateholamina u obe ispitivane moždane oblasti hronično stresiranih životinja. Negativna korelacija između povećane količine NA i smanjenog nivoa DBH enzima u prefrontalnom korteksu hronično stresiranih životinja ukazuje na odsustvo konverzije DA u NA. Međutim, pozitivna korelacija između povećane količine NA i nivoa DBH enzima u hipokampusu hronično stresiranih životinja ukazuje na konverziju DA u NA.**

c) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana** povećava sintezu NET proteina i smanjuje sintezu DAT proteina u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova, dok u hipokampusu povećava sintezu DAT proteina i smanjuje sintezu NET proteina. U obe moždane oblasti primenjeni stresor povećava sintezu VMAT 2 proteina. **Pozitivna korelacija između povećane količine NA i nivoa NET proteina ukazuje na povećano preuzimanje NA u prefrontalnom korteksu hronično stresiranih životinja. Povećan nivoa DAT proteina u hipokampusu hronično stresiranih životinja ukazuje na povećano preuzimanje DA. Pozitivna korelacija između povećane količine NA i nivoa DBH enzima u hipokampusu**

hronično stresiranih životinja ukazuje na konverziju DA u NA. Dakle, povećana količina NA u hipokampusu posledica je povećane konverzije DA u NA. Značajno povećana sinteza VMAT 2 proteina u obe ispitivane moždane oblasti ukazuje na veću spremnost stresiranih životinja za korišćenje (skladištenje ili otpuštanje) kateholamina, kao i povećano fino podešavanje kapaciteta kateholaminskog sistema u uslovima primenjenog stresora. **Pozitivne korelacije između povećane količine NA i nivoa VMAT 2 proteina u obe moždane oblasti hronično stresiranih životinja ukazuju na fiziološku ulogu VMAT 2 proteina za skladištenje NA u uslovima stresa.**

d) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana povećava aktivnost MAO A i MAO B enzima, kao i sintezu COMT enzima u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova. U hipokampusu odraslih mužjaka pacova, primenjeni stresor, povećava aktivnost MAO B enzima i sintezu COMT enzima. Povećana aktivnost i sinteza enzima odgovornih za razgradnju kateholamina, ukazuje na povećanu potrebu za razgradnjom ispitivanih neurotransmitera u obe ispitivane moždane oblasti u uslovima primenjenog stresora.**

► *Na osnovu analize ekspresije gena za enzime koji su uključeni u metabolizam DA i NA, kao i količine oba ispitivana neurotransmitera, možemo zaključiti, da u obe ispitivane moždane oblasti, u uslovima primenjenog stresora:*

- *nema „de novo“ sinteze kateholamina,*
- *povećano je preuzimanje NA u prefrontalnom korteksu i DA u hipokampusu,*
- *povećana je konverzija DA u NA u hipokampusu,*
- *olakšano je korišćenje i povećana mogućnost finog podešavanja kapaciteta kateholaminskog sistema,*
- *smanjena je količina DA, a povećan je količina NA,*
- *povećana je potreba za razgradnjom ispitivanih neurotransmitera.*

e) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana povećava ekspresiju gena za SOD 2, povećava aktivnost SOD 1 i CAT enzima, a smanjuje aktivnost GPx enzima u**

obe moždane oblasti. **Pozitivna korelacija između povećane aktivnosti antioksidativnih enzima i povećane aktivnosti enzima odgovornih za razgradnju neurotransmitera u obe moždane oblasti ukazuje na uključivanje sistema antioksidativne odbrane u cilju smanjena eventualnih oksidativnih oštećenja nastalih usled povećane razgradnje neurotransmitera.**

► *Na osnovu analize ekspresije gena za enzime antioksidativne zaštite u uslovima primenjenog stresora, možemo zaključiti da je u obe moždane oblasti:*

- povećan nivo iRNK za SOD 2 i sinteza SOD 2 proteina,

- povećana aktivnost SOD 1, SOD 2 i CAT enzima,

- dok je oksidativni stres verovatno inhibirao aktivnost GPx enzima.

f) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana povećava sintezu proteina transkripcionog faktora BDNF u obe ispitivane moždane oblasti. Pozitivna korelacija između povećanog nivoa BDNF i količine NA u obe ispitivane moždane oblasti ukazuje na značajnu fiziološku ulogu BDNF u regulaciji količine NA u uslovima primenjenog stresora.**

g) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana smanjuje nivo ACTH, a povećava nivo CORT i GLU u plazmi. Pozitivna korelacija između povećanog nivoa BDNF u obe ispitivane moždane oblasti i koncentracije CORT u plazmi ukazuje na značajnu fiziološku ulogu BDNF u regulaciji aktivnosti HPA ose u uslovima primenjenog stresora.**

h) **Ponavljani stres fizičkog sputavanja (PSFS) u trajanju od 14 dana povećava indeks anksioznosti, kao i trajanje nepokretnosti eksperimentalnih životinja. Negativne korelacije između količine DA i indeksa anksioznosti i nepokretnosti, pozitivne korelacije između količine NA i indeksa anksioznosti i nepokretnosti, kao i pozitivne korelacije između koncentracije CORT i indeksa anksioznosti i nepokretnosti ukazuju na to da kateholaminski sistem, kao i HPA sistem učestvuju u regulaciji ponašanja u uslovima primenjenog stresora.**

2) Delovanje litijuma na neurotransmitterski i antioksidativni status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja u trajanju od 14 dana

a) **Litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana** vraća količine DA i NA na kontrolni nivo u obe ispitivane moždane oblasti.

b) **Litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana** vraća vrednosti ekspresije gena za TH i DBH na kontrolni nivo u prefrontalnom korteksu, dok u hipokampusu vraća ekspresiju gena za TH na kontrolni nivo, a nivo DBH enzima značajno povećava. **Pozitivne korelacije između povećanog nivoa TH enzima i količine DA u obe ispitivane moždane oblasti ukazuju, da litijum u obe ispitivane moždane oblasti hronično stresiranih životinja, koje su inače imale sniženi nivo DA, podstiče „de novo“ sintezu kateholamina i vraća količinu DA na kontrolni nivo.** Međutim, veoma bitan rezultat ove disertacije je da litijum u hipokampusu stresiranih životinja vraća nivo NA na kontrolnu vrednost, iako je količina DBH enzima značajno povećana. Opadanje količine NA na bazalni nivo u hipokampusu verovatno može biti posledica smanjene aktivnosti DBH enzima i/ili povećane razgradnje NA. Povećana vrednost DBH na translacionom nivou, odnosno akumulacija DBH enzima u hipokampusu stresiranih životinja, ukazuje na to da litijum utiče na veću spremnost stresiranih životinja da povećaju konverziju DA u NA u cilju povećanja količine NA u hipokampusu u uslovima koji mogu da nastupe kasnije (npr. veća spremnost na novi stresor). **Na osnovu analize ekspresije gena za enzime koji učestvuju u biosintezi DA i NA i na osnovu količine oba ispitivana neurotransmitera, možemo zaključiti da litijum, kod stresiranih životinja, utiče na „de novo“ sintezu DA i NA i vraća njihove nivoe na kontrolne vrednosti u obe ispitivane moždane oblasti.**

c) **Litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana** u obe ispitivane moždane oblasti vraća ekspresiju gena za DAT, NET i VMAT 2 na vrednosti približne kontrolnim vrednostima. **Korelacije između nivoa ispitivanih**

transportera i količine oba ispitivana neurotransmitera ukazuju da litijum, u prefrontalnom korteksu i hipokampusu stresiranih životinja, vraća na kontrolni nivo preuzimanje, skladištenje, otpuštanje i fino podešavanje kapaciteta kateholaminskog sistema.

d) Litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana smanjuje aktivnosti enzima MAO A u prefrontalnom korteksu i MAO B u hipokampusu, što za posledicu ima povećanje nivoa DA do kontrolnih vrednosti. Međutim, litijum povećava aktivnost MAO B enzima u prefrontalnom korteksu i aktivnost MAO A enzima u hipokampusu, kao i nivo COMT enzima u obe ispitivane moždane oblasti što ukazuje na povećanu potrebu razgradnjom akumuliranog NA u uslovima PSFS. **Negativne korelacije između povećane aktivnosti pomenutih enzima (MAO B u prefrontalnom korteksu, MAO A u hipokampusu i COMT u obe ispitivane moždane oblasti) i smanjene količine NA u obe ispitivane moždane oblasti to potvrđuju.**

► *Na osnovu analize ekspresije gena za enzime koji su uključeni u metabolizam DA i NA i na osnovu količine oba neurotransmitera u ispitivanim moždanim oblastima, možemo zaključiti da litijum kod stresiranih životinja, vraća na kontrolni nivo:*

- „de novo“ sintezu kateholamina,
- preuzimanje NA u prefrontalnom korteksu i DA u hipokampusu,
- korišćenje i fino podešavanje kapaciteta kateholaminskih sistema,
- povećava nivo DA i smanjuje nivo NA do kontrolnih vrednosti,
- povećava potrebu za razgradnjom stresom povećanog NA.

Sve pomenute promene imaju za posledicu vraćanje nivoa DA i NA na kontrolne vrednosti u obe ispitivane moždane oblasti, dok povećana vrednost DBH na translacionom nivou u hipokampusu ukazuje da litijum utiče na veću spremnost kateholaminskog sistema u odgovoru na eventualne nove izazove (npr. novi stres) kod životinja izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja.

e) Litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana u prefrontalnom korteksu povećava aktivnost SOD 2, CAT i GPx enzima, dok aktivnost SOD 1 smanjuje, a aktivnost GR vraća do vrednosti koje su približne kontrolnim vrednostima. Međutim, u hipokampusu, litijum povećava aktivnost CAT, GPx i GR enzima, dok aktivnost SOD 1 i SOD 2 vraća na nivo kontrolnih vrednosti. **Povećana razgradnja NA u obe moždane oblasti, povećane aktivnosti MAO B u prefrontalnom korteksu i MAO A u hipokampusu, kao i povećan nivo COMT u obe moždane oblasti pozitivno korelišu sa povećanim aktivnostima pomenutih antioksidativnih enzima. Rezultati ukazuju da litijum utiče na uključivanje sistema antioksidativne odbrane u cilju smanjena eventualnih oksidativnih oštećenja nastalih usled povećane razgradnje NA.**

► *Na osnovu analize ekspresije gena za enzime antioksidativne odbrane, možemo zaključiti da litijum povećava aktivnost SOD 2, CAT i GPx enzima u prefrontalnom korteksu, kao i aktivnost CAT, GPx i GR u hipokampusu stresiranih životinja, što ukazuje na veću spremnost antioksidativnog sistema da odgovori na povećanu razgradnju stresom akumuliranog NA, kao i na veću spremnost na eventualne nove izazove (novi, dodatni stres). Pored toga, litijum povećava aktivnosti GPx u obe moždane oblasti hronično stresiranih životinja (vraća aktivnost na nivo karakterističan za nestresirane životinje). To bi moglo ukazati na smanjenje oksidativnog stresa.*

f) Litijum, u prefrontalnom korteksu i hipokampusu kontrolnih životinja, povećava ekspresiju gena za BDNF. Dobijeni rezultat potvrđuje neuroprotektivno delovanje litijuma. Međutim, **litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana** snižava povećane vrednosti sinteze BDNF proteina, odnosno vraća ih na kontrolni nivo u obe ispitivane moždane oblasti.

g) Litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana vraća nivo ACTH, CORT i GLU u plazmi na kontrolne nivo.

h) Litijum kod pacova izlaganih ponavljanom stresu fizičkog sputavanja (Li+PSFS) u trajanju od 14 dana smanjuje indeks anksioznosti, kao i trajanje nepokretnosti.

Na osnovu naših rezultata mogu se izvesti sledeći generalni zaključci:

1) U obe ispitivane moždane oblasti, u uslovima ponavljanog stresa fizičkog sputavanja, smanjena je ekspresija gena za TH (nema „*de novo*“ sinteze kateholamina), povećano je preuzimanje (NA u prefrontalnom korteksu i DA u hipokampusu), povećana je konverzija DA u NA (samo u hipokampusu), povećano je korišćenje i fino podešavanje kapaciteta kateholaminskog sistema i povećana je potreba za razgradnjom oba neurotransmitera. To je uticalo na smanjenje količine DA i povećanje količine NA u obe ispitivane moždane oblasti. Pored toga, uočena je povećana aktivnost SOD 1, SOD 2 i CAT enzima i količina BDNF, a smanjena aktivnost GPx enzima u obe ispitivane moždane oblasti, kao i povećana koncentracija CORT u plazmi. Svi ispitivani parametri, a prvenstveno visoke vrednosti NA i niske vrednosti DA, ukazuju na to da je primenjeni tretman uzrokovao stresni odgovor kod eksperimentalnih životinja, što se odrazilo i na njihovo ponašanje.

2) Litijum kod stresiranih životinja vraća vrednosti ekspresije gena za TH i DBH na kontrolni nivo i započinje „*de novo*“ sintezu kateholamina, vraća nivo preuzimanja, konverzije, korišćenja i finog podešavanja kapaciteta kateholaminskog sistema na kontrolni nivo, a povećava potrebu za razgradnjom neurotransmitera NA, što za posledicu ima vraćanje nivoa DA i NA u obe moždane oblasti na nivo karakterističan za nestresirane životinje. U uslovima ponavljanog stresa fizičkog sputavanja, litijum povećava aktivnosti SOD 2, CAT, GPx i GR enzima, što ukazuje na to da litijum s obzirom na vrstu tkiva aktivira sistem antioksidativne zaštite zbog povećane razgradnje stresom akumuliranog NA. Litijum kod stresiranih životinja, vraća ekspresiju gena za BDNF u obe ispitivane moždane oblasti, kao i nivo ACTH, CORT i GLU u plazmi, na vrednosti približne kontrolama. Pored toga, litijum kod stresiranih životinja, vraća indeks anksioznosti i procenat nepokretnosti na kontrolni nivo.

Na osnovu analize dobijenih rezultata možemo zaključiti da litijum u prefrontalnom korteksu i hipokampusu stresiranih životinja vraća neurotransmitterski i antioksidativni status na nivo nestresiranih životinja. Ova predklinička istraživanja imaju izuzetan značaj za poboljšanje kvaliteta i individualizaciju terapijskih protokola u kliničkoj praksi.

7. LITERATURA

Abdalla DS, Bechara EJ. (1994) The effect of chlorpromazine and Li₂CO₃ on the superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of rat brain, liver and erythrocytes. *Biochem Mol Biol Int* 34(6):1085-90.

Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ. (1989) Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* 52:1655–1658.

Aguilera G. (1998) Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 9:329–36.

Ahluwalia P, Singhal RL. (1980) Effect of low-dose lithium administration and subsequent withdrawal on biogenic amines in rat brain. *Br J Pharmacol* 71(2):601-7.

Ahmad A, Rasheed N, Banu N, Palit G. (2010) Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress* 13(4):355-64.

Akana SF, Chu A, Soriano L, Dallman MF. (2001) Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotrophic hormone, insulin and fat depots. *J Neuroendocrinol* 13(7):625-37.

Altshuler LL, Ventura J, van Gorp WG, Green MF, Theberge DC, Mintz J. (2004) Neurocognitive function in clinically stable men with bipolar I disorder or schizophrenia and normal control subjects. *Biol Psychiatry* 56(8):560-9.

Amoroso S, D'Alessio A, Sirabella R, Di Renzo G, Annunziato L. (2000) Ca (2p)-independent caspase- 3 but not Ca(2p)-dependent caspase-2 activation induced by oxidative stress leads to SH-SY5Y human neuroblastoma cell apoptosis. *J Neurosci Res* 68:454–62.

Anstrom KK, Miczek KA, Budygin EA. (2009) Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience* 161(1):3-12.

Anstrom KK, Woodward DJ. (2005) Restraint increases dopaminergic burst firing in awake rats. *Neuropsychopharmacology* 30:1832–40.

Armario A. (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(5):485-501.

Armstrong DM, Ross CA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. (1982) Distribution of dopamine-, noradrenaline-, and adrenaline-containing cell bodies in the rat medulla oblongata: demonstrated

by the immunocytochemical localization of catecholamine biosynthetic enzymes. *J Comp Neurol* 212:173–87.

Arnsten AFT. (2009) Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci* 10:410–22.

Arnsten AF, Goldman-Rakic PS. (1985) Alpha 2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science* 230(4731):1273–6.

Axelrod J. (1957) O-methylation of (epinephrine and other catecholamines) catecholamines *in vitro* and *in vivo*. *Science* 126:400–1.

Axelrod J. (1962) Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *J Biol Chem* 237:1657–60.

Axelrod J, Weil-Malherbe H, Tomchick R. (1959) The physiological disposition of H³-epinephrine and its metabolite metanephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 127:251–6.

Aydemir O, Deveci A, Taneli F. (2005) The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:261–5.

Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L, Mallei A, Sartori CR, Sciancalepore M, Tardito D, Langone F, Popoli M, Tongiorgi E. (2012) Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology* 37(7):1600–11.

Barde YA. (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2:1525–34.

Baruchin A, Weisberg EP, Miner LL, Ennis D, Nisenbaum LK, Naylor E, Stricker EM, Zigmond MJ, Kaplan BB (1990) Effects of cold exposure on rat adrenal tyrosine hydroxylase: an analysis of RNA, protein, enzyme activity, and cofactor levels. *J Neurochem* 54(5):1769–75.

Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Tetich M, Kubera M, Leśkiewicz M, Lasoń W. (2004) Mood stabilizers inhibit glucocorticoid receptor function in LMCAT cells. *Eur J Pharmacol* 495(2–3):103–10.

Battistoni A, Folcarelli S, Gabbianelli R, Capo C, Rotilio G. (1996) The Cu,Zn superoxide dismutase from *Escherichia coli* retains monomeric structure at high protein concentration. Evidence for altered subunit interaction in all the bacteriocupreins. *Biochem J* 320:713–16.

Bearden CE, Glahn DC, Monkul ES, Barrett J, Najt P, Kaur S, Sanches M, Villarreal V, Bowden C, Soares JC. (2006) Sources of declarative memory impairment in bipolar disorder: mnemonic processes and clinical features. *J Psychiatr Res* 40(1):47–58.

Beaulieu JM, Caron MG. (2008) Looking at lithium: molecular moods and complex behaviour. *Mol Interv* 8(5):230-41.

Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG. (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):5099-104.

Berk M. (2009) Neuroprogression: pathways to progressive brain changes in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12(4):441-5.

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhaes PV, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. (2011) Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 35(3):804-17.

Berk M. (2007) Oxidative biology: new intervention opportunities in psychiatry. *Acta Neuropsychiatr* 19:259-60.

Bhatnagar S, Dallman MF. (1998) Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 84 (4), 1025-39.

Bhatnagar S, Huber R, Nowak N, Trotter P. (2002) Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *J Neuroendocrinol* 14(5):403-10.

Bhatnagar S, Vining C. (2003) Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm Behav* 43(1):158-65.

Biederman J, Spencer T. (1999) Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 46(9):1234-42.

Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O. (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64(1):43-51.

Bjorkqvist K (2001) Social defeat as a stressor in humans. *Physiology and Behavior* 73(3):435-42.

Bjorklund A, Lindvall O, Nobin A. (1975) Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. *Brain Res* 89: 29-42.

Bjorklund A, Moore RY, Nobin A, Stenevi U. (1973) The organization of tubero-hypophyseal and reticulo-infundibular catecholamine neuron systems in the rat brain. *Brain Res* 51:171-91.

Blakely RD, Bauman AL. (2000) Biogenic amine transporters: regulation in flux. *Curr Opin Neurobiol* 10(3):328-36.

Blanchard RJ, Nikulina JN, Sakai RR, Mckittrick C, McEwen B, Blanchard C. (1998) Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav* 63:561-9.

Bliss EL, Ailion J. (1970) The effect of lithium upon brain neuroamines. *Brain Res* 24(2):305-10.

Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa H, Kato A, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T. (2009) Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3beta and beta-catenin/TCF pathway. *Neuropsychopharmacology* 34(3):805-15.

Bondi CO, Rodriguez G, Gould GG, Frazer A, Morilak DA. (2008) Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. *Neuropsychopharmacology* 33(2):320-31.

Borland LM, Michael AC. (2004) Voltammetric study of the control of striatal dopamine release by glutamate. *J Neurochem* 91(1):220-9.

Borre L, Andreassen TF, Shi L, Weinstein H, Gether U. (2014) The second sodium site in the dopamine transporter controls cation permeation and is regulated by chloride. *J Biol Chem* 289(37):25764-73.

Bortolato M, Chen K, Shih JC. (2008) Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 60(13-14):1527-33.

Bosch F, Gomez-Foix AM, Arino J, Guinovart JJ. (1986) Effects of Lithium Ions on Glycogen Synthase and Phosphorylase in Rat Hepatocytes. *J Biol Chem* 261(36):16927-31.

Bowden CL. (2008) Bipolar pathophysiology and development of improved treatments. *Brain Res* 1235:92-7.

Bremner JD. (2006) Stress and brain atrophy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(5):503-12.

Bremner JD, Elzinga B, Schmahl C, Vermetten E. (2008) Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. *Prog Brain Res* 167:171-86.

Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157(1):115-8.

Brown ES, Rush AJ, McEwen BS. (1999) Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 21(4):474-84.

Brown ES, Varghese FP, McEwen BS. (2004) Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol. Psychiatry* 55:1-9.

Brunello N, Blier P, Judd LL, Mendlewicz J, Nelson CJ, Souery D, Zohar J, Racagni G. (2003) Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *Int Clin Psychopharmacol* 18(4):191-202.

Budziszewska B, Lason W. (1994) Pharmacological modulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the rat central nervous system. *Pol J Pharmacol* 46(3):97-102.

Buettner GR. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300:535-43.

Burton GW, Traber MG. (1990) Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10:357-82.

Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG, Heiligenstein JH, Morin SM, Gehlert DR, Perry KW. (2002) Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 27(5):699-711.

Cade JF. (1949) Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust* 2:349-52.

Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA. (2005) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 233(1-2):145-62.

Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva MA. (2009) Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34(Suppl.1):S208-16.

Callado LF, Meana JJ, Grijalba B, Pazos A, Sastre M, Garcia-Sevilla JA. (1998) Selective increase of alpha2A-adrenoceptor agonist binding sites in brains of depressed suicide victims. *J Neurochem* 70(3):1114-23.

Capoccia S, Berry A, Bellisario V, Vacirca D, Ortona E, Alleva E, Cirulli F. (2013) Quality and Timing of Stressors Differentially Impact on Brain Plasticity and Neuroendocrine-Immune Function in Mice. *Neural Plasticity* 2013, Article ID 971817, doi:10.1155/2013/971817.

Carrasco GA, Van de Kar LD. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463(1-3):235-72.

Castren E, Voikar V, Rantamaki T. (2007) Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7:18-21.

Cechinel-Recco K, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Arent CO, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J. (2012) Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. *J Psychopharmacol* 26(12):1594-604.

Cesura AM, Pletscher A. (1992) The new generation of monoamine oxidase inhibitors. *Prog Drug Res* 38:171-297.

Chakraborti A, Gulati K, Banerjee BD, Ray A. (2007) Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. *Behav Brain Res* 179(2):321-5.

Chaouloff F. (2013) Social stress models in depression research: what do they tell us? *Cell and Tissue Research* 354(1):179-90.

Charlton BG. (1990) Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. *J Endocrinol* 126(1):5-8.

Chaudhuri-Sengupta S, Sarkar R, Maiti BR. (2003) Lithium action on adrenomedullary and adrenocortical functions and serum ionic balance in different age-groups of albino rats. *Arch Physiol Biochem* 111(3):246-53.

Che Y, Zhou Z, Shu Y, Zhai C, Zhu Y, Gong S, Cui Y, Wang JF. (2015) Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci Lett* 584:208-13.

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50:260-5.

Chen G, Yuan PX, Jiang YM, Huang LD, Manji HK. (1998) Lithium increases tyrosine hydroxylase levels both *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 70(4):1768-71.

Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Zhao ZH, Manji HK. (1999) The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem* 72(2):879-82.

Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. (2000) Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 75(4):1729-34.

Chen N, Reith ME. (2004) Interaction between dopamine and its transporter: role of intracellular sodium ions and membrane potential. *J Neurochem* 89(3):750-65.

Cheung S, Ballew JR, Moore KE, Lookingland KJ. (1998) Contribution of dopamine neurons in the medial zona incerta to the innervation of the central nucleus of the amygdala, horizontal diagonal band of Broca and hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 808:174-81.

Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates gluco- corticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 39(1):112-9.

Chrousos GP, Gold PW. (1992) The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *J Am Med Assoc* 267(9):1244-52.

Chuang DM. (2005) The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Ann NY Acad Sci* 1053:195-204.

Claiborne A. (1985) Catalase activity. In: *Handbook of Methods for Oxygene Radical Research*. Greenwald RA (ed), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 283-4.

Cole RAL, Sawchenko PE. (2002) Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 22:959-69.

Colino A, García-Seoane JJ, Valentín A. (1998) Action potential broadening induced by lithium may cause a presynaptic enhancement of excitatory synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10(7):2433-43.

Collingridge GL, Bliss TV. (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 18:54-56.

Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17:2295-313.

Connor B, Dragunow M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 27:1-39.

Corbella B, Vieta E. (2003) Molecular targets of lithium action. *Acta Neuropsychiatr* 15(6):316-40.

Cordeiro ML, Gundersen CB, Umbach JA. (2002) Lithium ions modulate the expression of VMAT2 in rat brain. *Brain Res* 953(1-2):189-94.

Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP. (2002) Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex* 12:386-94.

Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158:507-17.

Cryan JF, Slattery DA. (2007) Animal models of mood disorders: recent developments. *Current Opinion in Psychiatry* 20(1):1–7.

Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477-505.

Cunningham ET Jr, Bohn MC, Sawchenko PE. (1990) Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 292: 651-67.

Dahlstrom A, Fuxe K. (1964) Evidence of the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 62:1–55.

Dallman MF, Akana SF, Jacobson L, Levin N, Cascio CS, Shinsako J. (1987) Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Ann N Y Acad Sci* 512:402-14.

Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Scribner KS, Pecoraro N, La Fleur SE, Houshyar H, Gomez F. (2004) Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Ann N Y Acad Sci* 1018:141-50.

Dallman M, Akan, S, Scribner K, Bradbury M, Walker C, Strack A. (1991) Stress, feedback and facilitation in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 4(5):517–26.

Da Silva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J. (1998) Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett* 430:405–8.

Day JS, O'Neill E, Cawley C, Aretz NK, Kilroy D, Gibney SM, Harkin A, Connor TJ. (2014) Noradrenaline acting on astrocytic β_2 -adrenoceptors induces neurite outgrowth in primary cortical neurons. *Neuropharmacology* 77:234-48.

De Kloet ER. (1995) Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol* 16:416-25.

De Kloet ER, Joels M, Holsboer F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6(6):463-75.

De Kloet ER, Sybesma H, Reul HMHM. (1986) Selective control by corticosterone of serotonin receptor capacity in raphe – hippocampal system. *Neuroendocrinology* 42:513-21.

Derin N, Yargicoglu P, Aslan M, Elmas O, Agar A, Aiciguzel Y. (2006) The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health* 22(6):233-40.

Deutch AY, Clark WA, Roth RH. (1990) Prefrontal cortical dopamine depletion enhances the responsiveness of mesolimbic dopamine neurons to stress. *Brain Res* 521(1-2):311-5.

De Vasconcellos AP, Nieto FB, Crema LM, Diehl LA, de Almeida LM, Prediger ME, da Rocha ER, Dalmaz C. (2006) Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochem Res* 31(9):1141-51.

Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA. (2003). Differential regulation of brain- derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology* 45:553-63.

Dinan TG. (1994) Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry* 164(3):365-71.

Dinan TG, Lavelle E, Scott LV, Newell-Price J, Medbak S, Grossman AB. (1999) Desmopressin normalizes the blunted adrenocorticotropin response to corticotropin-releasing hormone in melancholic depression: evidence of enhanced vasopressinergic responsivity. *J Clin Endocrinol Metab* 84(6):2238-40.

Doyle P, Guillaume-Gentil C, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. (1994) Effects of corticosterone administration on local cerebral glucose utilization of rats. *Brain Res* 645:225-30.

Dragunow M, Beilharz E, Mason B, Lawlor P, Abraham W, Gluckman P. (1993) Brain-derived neurotrophic factor expression after long-term potentiation. *Neurosci Lett* 160:232–236.

Drevets WC, Price JL, Furey ML. (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* 213(1-2):93-118.

Duarte TL, Lunec J. (2005) Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Rad Res* 39:671–86.

Duman R (2004) Depression: A case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 56:140 –145.

Duman RS, Monteggia LM. (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116–27.

Dunham JS, Deakin JFW, Miyajima F, Payton A, Toro CT. (2009) Expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Stanley consortium brains. *J Psychiatr Res* 43:1175–84.

Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW. (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91:1025–43.

Eaton MJ, Wagner CK, Moore KE, Lookingland KJ. (1994) Neurochemical identification of A13 dopaminergic neuronal projections from the medial zona incerta to the horizontal limb of the diagonal band of Broca and the central nucleus of the amygdala. *Brain Res* 659: 201–207.

Eichenbaum H. (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44(1):109-20.

Eiden LE. (2000) The vesicular neurotransmitter transporters: current perspectives and future prospects. *FASEB J* 14(15):2396-400.

Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G. (2003) The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* 23(19):7311-6.

Eisenhofer G. (2001) The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* 91:35-62.

Eisenhofer G, Cox HS, Esler MD. (1990a) Parallel increases in noradrenaline reuptake and release into plasma during activation of the sympathetic nervous system in rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342:328-35.

Eisenhofer G, Esler MD, Cox HS, Meredith IT, Jennings GL, Brush JE Jr, Goldstein DS. (1990b) Differences in the neuronal removal of circulating epinephrine and norepinephrine. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1710-20.

Eisenhofer G, Esler MD, Meredith IT, Ferrier C, Lambert G, Jennings G. (1991) Neuronal reuptake of noradrenaline by sympathetic nerves in humans. *Clin Sci* 80:257-63.

Eisenhofer G, Goldstein DS, Kopin IJ. (1989) Plasma dihydroxyphenylglycol for estimation of noradrenaline neuronal re-uptake in the sympathetic nervous system *in vivo*. *Clin Sci* 76:171-82.

Eisenhofer G, Goldstein DS, Ropchak TG, Nguyen HQ, Keiser HR, Kopin IJ. (1988) Source and physiological significance of plasma 3,4-dihydroxyphenylglycol and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. *J Auton Nerv Syst* 24:1-14.

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. (2004) Leaky catecholamine stores: undue waste or a stress response coping mechanism? *Ann NY Acad Sci* 1018:224-30, 2004.

Eisenhofer G, Lenders JW. (1998) Clues to the diagnosis of pheochromocytoma from the differential tissue metabolism of catecholamines. *Adv Pharmacol* 42:374-7.

Eisenhofer G, Rundquist B, Aneman A, Friberg P, Dakak N, Kopin IJ, Jacobs MC, Lenders JW. (1995) Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3009-17.

El-Mallakh RS. (2004) Ion homeostasis and the mechanism of action of lithium. *Clinical Neuroscience Research* 4(3-4):227-31.

Engel J, Berggren U. (1980) Effects of lithium on behaviour and central monoamines. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 280:133-43.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13:341–90.

Evans RM, Arriza JL. (1989) A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron* 2:1105-12.

Fadda F, Serra G, Argiolas A, Melis MR, Gessa GL. (1980) Effect of lithium on 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) concentrations in different brain areas of rats. *Pharmacological Research Communications* 12(7):689-693.

Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindfors N. (1992) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 138:153-6.

Fallon JH, Moore RY. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-80.

Feng Z, Angeletti RH, Levin BE, Sabban EL. (1992) Glycosylation and membrane insertion of newly synthesized rat dopamine beta-hydroxylase in a cell-free system without signal cleavage. *J Biol Chem* 267:21808–15.

Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, Andersen ML, Tufik S, Lima MM. (2011) Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav Brain Res* 219(1):116-22.

Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. 1996. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381:706-9.

Filipenko ML, Alekseyenko OV, Beilina AG, Kamynina TP, Kudryavtseva NN. (2001) Increase of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter mRNA levels in ventral tegmental area of male mice under influence of repeated aggression experience. *Brain Res* 96: 77–81.

Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED. (1995) Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience* 64:619–628.

Fišar Z, Hroudová J, Raboch J. (2010) Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett* 31(5):645-56.

Fitzpatrick PF. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 68:355–81.

Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA. (2007) Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 449(7163):721-5.

Flugge G, Van Kampen M, Mijster MJ. (2004) Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tissue Res* 315:1-14.

Fontella FU, Siqueira IR, Vasconcellos AP, Tabajara AS, Netto CA, Dalmaz C. (2005) Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochem Res* 30(1):105-11.

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsiuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A. (2008) Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2052-7.

Francati V, Vermetten E, Bremner JD. (2007) Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings. *Depress Anxiety* 24(3):202-18.

Frazer A. (2000) Norepinephrine involvement in antidepressant action. *J Clin Psychiatry* 61(Suppl.10):25-30.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. (2006a) Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 31(5):326-32.

Frey BN, Andreazza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. (2006b) Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* 79(3):281-6.

Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112.

Friedman E, Gershon S. (1973) Effect of lithium on brain dopamine. *Nature* 243:520-1.

Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. (2001) Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 158(1):100-6.

Gaillet S, Lachuer J, Malaval F, Assenmacher I, Szafarczyk A. (1991) The involvement of noradrenergic ascending pathways in the stress-induced activation of ACTH and corticosterone secretions is dependent on the nature of stressors. *Exp Brain Res* 87: 173-180.

Gainetdinov RR, Jones SR, Fumagalli F, Wightman RM, Caron MG. (1998) Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis. *Brain Res Rev* 26(2-3):148-53.

Gamaro GD, Michalowski MB, Catelli DH, Xavier MH, Dalmaz C. (1999) Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. *Braz J Med Biol Res* 32(3):341-7.

Garcia-Lopez D, Hakkinen K, Cuevas MJ, Lima E, Kauhanen A, Mattila M, Sillanpaa E, Ahtiainen JP, Karavirta L, Almar M, Gonzalez-Gallego J. (2007) Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. *Scand J Med Sci Sports* 17(5):595-604.

Gardner A, Johansson A, Wibom R, Nennesmo I, von Döbeln U, Hagenfeldt L, Hallström T. (2003) Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J Affect Disord* 76(1-3):55-68.

Gavrilović L, Stojiljković V, Kasapović J, Popović N, Pajović SB, Dronjak S. (2013) Treadmill exercise does not change gene expression of adrenal catecholamine biosynthetic enzymes in chronically stressed rats. *An Acad Bras Cienc* 85(3):999-1012.

Gerlach JL, McEwen BS. (1972) Rat brain binds adrenal steroid hormone: radioautography of hippocampus with corticosterone. *Science* 175:1133-6.

Gesing A, Bilang-Bleuel A, Droste SK, Linthorst ACE, Holsboer F, Reul JMHM. (2001) Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 21:4822-9.

Ghosh S. (2007) Effect of lithium chloride on the endocrine pancreas of domestic pigeon (*Columba livia*). *Asian J Exp Sci* 21:323-6.

Gibson DG, Hawrylko J, McCay PB. (1985) GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids* 20:704-10.

Givalois L, Marmigere F, Rage F, Ixart G, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. (2001) Immobilization stress rapidly and differentially modulates BDNF and TrkB mRNA expression in the pituitary gland of adult male rats. *Neuroendocrinology* 74:148-59.

Givalois L, Naert G, Rage F, Ixart G, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. (2004) A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol Cell Neurosci* 27(3):280-95.

Glahn DC, Bearden CE, Cakir S, Barrett JA, Najt P, Serap Monkul E, Maples N, Velligan DI, Soares JC. (2006) Differential working memory impairment in bipolar disorder and schizophrenia: effects of lifetime history of psychosis. *Bipolar Disord* 8(2):117-23.

Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. (1974) Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 30:665-7.

Glavin GB, Pare WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. (1994) Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev* 18(2):223-49.

- Glavin GB, Tanaka M, Tsuda A, Kohno Y, Hoaki Y, Nagasaki N. (1983) Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav* 19(2):287-90.
- Gold PW. (2015) The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Molecular Psychiatry* 20(1):32–47.
- Goldman-Rakic PS. (1994) Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 6(4):348-57.
- Goldman-Rakic PS. (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14(3):477-85.
- Goldstein DS. (2001) *The Autonomic Nervous System in Health and Disease*. New York: Marcel Bekker, p. 618.
- Goldstein DS. (2003) Catecholamines and stress. *Endocr Regul* 37:69–80.
- Goldstein DS, Eisenhofer G, Stull R, Folio CJ, Keiser HR, Kopin IJ. (1988) Plasma dihydroxyphenylglycol and the intraneuronal disposition of norepinephrine in humans. *J Clin Invest* 81:213–20.
- Goldstein DS, Kopin IJ. (2007) Evolution of concepts of stress. *Stress* 10(2):109-20.
- Goldstein DS, McEwen B. (2002) Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress* 5(1):55-8.
- Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, Roth RH. (1996) Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J Neurosci* 16(15):4787-98.
- Gomi F, Matsuo M. (2001) Effects of 60% oxygen inhalation on the survival and antioxidant enzyme activities of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 123(10):1295-304.
- Goodwin FK, Fireman B, Simon GE, Hunkeler EM, Lee J, Revicki D. (2003) Suicide risk in bipolar disorder during treatment with lithium and divalproex. *JAMA* 290(11):1467-73.
- Gould TD, Manji HK. (2005) Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology* 30:1223-37.
- Gould TD, Manji HK. (2002) The wnt signalling pathway in bipolar disorder. *Neuroscientist* 8:497-511.
- Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA, Manji HK. (2004) Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol Psychiatry* 9:734-55.

- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3168-71.
- Grazzini E, Boccara G, Joubert D, Trueba M, Durroux T, Guillon G, Gallo-Payet N, Chouinard L, Payet MD, Serradeil Le Gal C. (1998) Vasopressin regulates adrenal functions by acting through different vasopressin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol* 449:325-34.
- Gronli J, Bramham C, Murison R, Kanhema T, Fiske E, Bjorvatn B, Ursin R, Portas CM. (2006) Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacol Biochem Behav* 85:842-9.
- Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. (2001) Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30:695-728.
- Hachiya M, Shimizu S, Osawa Y, Akashi M. (1997) Endogenous production of tumour necrosis factor is required for manganese superoxide dismutase expression by irradiation in the human monocytic cell line THP-1. *Biochem J* 328:615-23.
- Haenisch B, Bilkei-Gorzo A, Caron MG, Bonisch H. (2009) Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* 111:403-16.
- Hajos-Korcsok E, Robinson DD, Yu JH, Fitch CS, Walker E, Merchant KM. (2003) Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74(3):609-16.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3:533-5.
- Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35:1147-50.
- Halliwell B, Cross CE. (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102(Suppl.10):5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18:125-6.
- Halpner AD, Handelman GJ, Belmont CA, Harris JM, Blumberg JB. (1998) Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes. *J Nutr Biochem* 9:355-9.
- Harvey BH. (2008) Is major depressive disorder a metabolic encephalopathy? *Hym Psychopharmacol* 23(5):371-84.
- Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. (2004) Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev* 45:104-14.

Heinrich LM, Gullone E. (2006) The clinical significance of loneliness: a literature review, *Clinical Psychology Review* 26(6):695–718.

Helfferrich F, Palkovits M. (2003) Acute audiogenic stress-induced activation of CRH neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. *Brain Res* 975:1–9.

Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR. (2006) Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol* 18: 393–411.

Herken H, Gurel A, Selek S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, Kap O, Yumru M, Savas HA, Akyol O. (2007) Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res* 38(2):247–52.

Herman JP. (2013) Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci* 7:61. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00061.

Herman JP, Cullinan WE. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78–84.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151–80.

Herman JP, Schafer MKH, Sladek CD, Day R, Young EA, Akil H, Watson SJ. (1989) Chronic electroconvulsive shock treatment elicits upregulation of CRF and AVP mRNA in select populations of neuroendocrine neurons. *Brain Res* 501:235–46.

Hesketh JE, Nicolaou NM, Arbuthnott GW, Wright AK. (1978) The effect of chronic lithium administration on dopamine metabolism in rat striatum. *Psychopharmacology (Berl)* 56(2):163–6.

Hinson JP. (1990) Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medulla? *J Endocrinol* 124:7 – 9.

Ho AK, Loh HH, Craves F, Hitzemann RJ, Gershon S. (1970) The effect of prolonged lithium treatment on the synthesis rate and turnover of monoamines in brain regions of rats. *Eur J Pharmacol* 10(1):72–8.

Hokfelt T, Fuxe K, Goldstein M, Johansson O. (1974) Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. *Brain Res* 66:235–51.

Holben DH, Smith AM. (1999) The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 99:836–43.

Horn AS. (1990) Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Prog Neurobiol* 34(5):387-400.

Horner H, Packan D, Sapolsky R. (1990) Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 52:57-63.

Hu Y, Liu M, Liu P, Guo DH, Wei RB, Rahman K. (2011) Possible mechanism of the antidepressant effect of 3,6'-disinapoyl sucrose from *Polygala tenuifolia* Willd. *J Pharm Pharmacol* 63(6):869-74.

Huang EJ, Reichardt LF. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.

Hughes P, Dragunow M. (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47(1):133-78.

Ieraci A, Mallei A, Musazzi L, Popoli M. (2015) Physical exercise and acute restraint stress differentially modulate hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts and epigenetic mechanisms in mice. *Hippocampus* 25(11):1380-92.

Ieraci A, Mallei A, Popoli M. (2016) Social isolation stress induces anxious-depressive-like behavior and alterations of neuroplasticity-related genes in adult male mice. *Neural Plast* 2016:6212983. doi: 10.1155/2016/6212983.

Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y. (1998) Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 273:1990-7.

Imperato A, Angelucci L, Casolini P, Zocchi A, Puglisi-Allegra S. (1992) Repeated stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress. *Brain Res* 577(2):194-9.

Irwin M, Hauger RL, Jones L, Provencio M, Britton KT. (1990) Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 255(1):101-7.

Ishida A, Noda Y, Ueda T. (2009) Synaptic vesicle-bound pyruvate kinase can support vesicular glutamate uptake. *Neurochem Res* 34(5):807-18.

Iversen L. (1965) The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. *Br J Pharmacol* 25:18-33.

Jacobsen JP, Mork A. (2004) The effect of escitalopram, desipramine, electroconvulsive seizures and lithium on brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the rat brain and the correlation to 5-HT and 5-HIAA levels. *Brain Res* 1024:183-92.

Jacobson L, Sapolsky R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic – pituitary – adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118-34.

Jaferi A, Nowak N, Bhatnagar S. (2003) Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiol Behav* 78(3):365-73.

Jedema HP, Grace AA. (2003) Chronic exposure to cold stress alters electrophysiological properties of locus coeruleus neurons recorded in vitro. *Neuropsychopharmacology* 28(1):63-72.

Joca SR, Ferreira FR, Guimarães FS. (2007) Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress* 10(3):227-49.

Johnson GRJ. (1988) Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 68:232–307.

Johnston JP. (1968) Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 17:1285–97.

Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry J.M. (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109:143-8.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 5(2):247-51.

Kaufman S. (1995) Tyrosine hydroxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 70:103–220.

Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH. (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249(4968):556-60.

Kessler RC. (2007) The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) findings into perspective. *J Clin Psychiatry* 68(Suppl.2):10-19.

Khanzode SD, Dakhale GN, Khanzode SS, Saoji A, Palasodkar R. (2003) Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep* 8(6):365-70.

Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. (2007) Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem* 15(4):1749-70.

Kim JJ, Foy MR, Thompson RF. (1996) Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4750-3.

- Kim JJ, Yoon KS. (1998) Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends Neurosci* 21:505-9.
- Kim KS, Han PL. (2006) Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. *J Neurosci Res* 83(3):497-507.
- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. (1987) The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 262:660-5.
- Kiss JZ. (1988) Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* 20:699-708.
- Kizaki M, Sakashita A, Karmakar A, Lin CW, Koeffler HP. (1993) Regulation of manganese superoxide dismutase and other antioxidant genes in normal and leukemic hematopoietic cells and their relationship to cytotoxicity by tumor necrosis factor. *Blood* 82:1142-50.
- Klein PS, Melton DA. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8455-9.
- Knoll J. (2000) (-)Deprenyl (selegiline): past, present and future. *Neurobiology (Bp)* 8(2):179-99.
- Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Hata T, Watanabe Y, Fujita K, Nagatsu T. (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J Biol Chem* 270(45):27235-43.
- Koenen KC, Driver KL, Oscar-Berman M, Wolfe J, Folsom S, Huang MT, Schlesinger L. (2001) Measures of prefrontal system dysfunction in posttraumatic stress disorder. *Brain Cogn* 45:64-78.
- Kompagne H, Bardos G, Szenasi G, Gacsalyi I, Harsing LG, Levay G. (2008) Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behavioural Brain Research* 193(2):311-4.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856-60.
- Krishnan V, Nestler EJ. (2011) Animal models of depression: molecular perspectives. *Current Topics in Behavioral Neuro-sciences* 7(1):121-47.
- Kroemer G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3:614-20.
- Kumer SC, Vrana KE. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67:443-62.

Kunugi H, Hori H, Adachi N, Numakawa T. (2010) Interface between hypothalamic–pituitary–adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression. *Psychiatry Clin Neurosci* 64:447–59.

Kuroda Y, McEwen BS. (1998) Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 59:35-9.

Kvetnansky R, Gewirtz GP, Weise VK, Kopin IJ. (1971a) Catecholamine-synthesizing enzymes in the rat adrenal gland during exposure to cold. *Am J Physiol* 220: 928-31.

Kvetnansky R, Gewirtz GP, Weise VK, Kopin IJ. (1971b) Enhanced synthesis of adrenal dopamine beta-hydroxylase induced by repeated immobilization in rats. *Mol Pharmacol* 7:81-6.

Kvetnansky R, Micutkova L, Rychkova N, Kubovcakov L, Mravec B, Filipenko M, Sabban EL, Krizanova O. (2004) Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic Ganglia of stressed rats. *Ann N Y Acad Sci* 1018:356-69.

Kvetnansky R, Mikulaj L. (1970) Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87, 738–743.

Kvetnansky R, Palkovits M, Mitro A, Torda T, Mikulaj L. (1977) Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. *Neuroendocrinology* 23(5):257-67.

Kvetnansky R, Sabban EL. (1993) Stress-induced changes in TH and other catecholamine-synthesizing enzymes. In *Tyrosine Hydroxylase* (Naoi, M. et al., eds), pp. 253–281, VSP Press, International Science Press.

Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89(2):535-606.

Kvetnansky R, Weise VK, Gewirtz GP, Kopin IJ. (1971c) Synthesis of adrenal catecholamines in rats during and after immobilization stress. *Endocrinology* 89:46-9.

Kvetnansky R, Weise VK, Kopin IJ. Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase by repeated immobilization of rats. *Endocrinology* 87: 744–749, 1970.

Kwong LK, Sohal RS. (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 350:118-26.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

Lange KW, Robbins TW, Marsden CD, James M, Owen AM, Paul GM. (1992) L-dopa withdrawal in Parkinson's disease selectively impairs cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 107(2-3):394-404.

Laucher J, Delton I, Buda M, Tappaz M. (1994) The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 638:196-202.

Leah RB, Casareno DW, Gitlin JD. (1998) The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 273:23625-8.

Lederbogen F, Kirsch P, Haddad L, Streit F, Tost H, Schuch P, Wüst S, Pruessner JC, Rietschel M, Deuschle M, Meyer-Lindenberg A. (2011) City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans. *Nature* 474(7352):498-501.

Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. (2002) Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord* 4(2):117-28.

Lenox RH, Frazer A. (2002) Mechanism of action of antidepressants and mood stabilizers. In: Davis DL, Charney D, Coyle JT, editors. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Nashville, American College of Neuropharmacology,; pp. 1139-63.

Lenox RH, Hahn HK. (2000) Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update. *J Clin Psychiatry* 61:5-15.

Leonard BE. (2001) Stress, norepinephrine and depression. *J Psychiatry Neurosci* 26 (Suppl): S11-S16.

Leone M, Cupane A, Militello V, Stroppolo ME, Desideri A. (1998) Fourier transform infrared analysis of the interaction of azide with the Aactive site of oxidized and reduced bovine Cu,Zn superoxide dismutase. *Biochemistry* 37(13):4459-64.

Lessmann V, Gottmann K, Heumann R. (1994) BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport* 6(1):21-5.

Leuner B, Shors TJ. (2013) Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? *Neuroscience* 251:108-19.

Levinstein MR, Samuels BA. (2014) Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. *Front Behav Neurosci* 8: Article 208.

Lewis EJ, Asnani LP. (1992) Soluble and membrane-bound forms of dopamine beta-hydroxylase are encoded by the same mRNA. *J Biol Chem* 267:494-500.

Lindholm D, Castren M, Hengerer B, Leingartner A, Castren E, Thoenen H. (1994) Glucocorticoids and neurotrophin gene regulation in the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 746:195-202; discussion 202-3.

Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. 1994. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 17:490-6.

Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, Slot JW. (1993) Distribution of Cu Zn superoxide dismutase in rat liver. *Free Rad Biol Med* 14:201-7.

Liu J, Wang X, Mori A. (1994) Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *Int J Biochem* 26(4):511-7.

Liu Y, Zhuang X, Gou L, Ling X, Tian X, Liu L, Zheng Y, Zhang L, Yin X. (2013) Protective effects of nifedipine administration on the cognitive impairments induced by chronic restraint stress in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 103(3):474-80.

Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, Yucel M. (2009) Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. *J Affect Disord* 117(1-2):1-17.

Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R. (1986) Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307-19.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J. (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 54(5-6):358-62.

Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NPV, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neurosci* 1:69-73.

Lyons MR, West AE. (2011) Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Progress in Neurobiology* 94(3):259-95.

Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V Jr, da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, Gentil V. (2007) Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 421(1):33-6.

Mackin P, Young AH. (2004) The role of cortisol and depression: exploring new opportunities for treatments. *Psychiatric Times* 92. *Academic OneFile*.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37:1613-22.

Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Caso JR, Pérez-Nievas BG, Leza JC. (2006) Stress-induced oxidative changes in brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(5):561-8.

Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC. (2001) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24(4):420-9.

Magarinos AM, McEwen BS. (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 69:83-8.

Magarinos AM, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. (1996) Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 16(10):3534-40.

Malhi GS, Gershon S. (2009) Ion men and their mettle. *Aust N Z J Psychiatry* 43:1091-5.

Mallajosyula JK, Kaur D, Chinta SJ, Rajagopalan S, Rane A, Nicholls DG, Di Monte DA, Macarthur H, Andersen JK. (2008) MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. *PLoS ONE* 3(2):e1616. doi:10.1371/journal.pone.0001616.

Mamalaki E, Kvetnansky R, Brady LS, Gold PW, Herkenham M. (1992) Repeated immobilization stress alters tyrosine hydroxylase, corticotrophin-releasing hormone and corticosteroid receptor messenger ribonucleic acid levels in rat brain. *J Neuroendocrinol* 4:689-99.

Mangiavacchi S, Masi F, Scheggi S, Leggio B, De Montis MG, Gambarana C. (2001) Long-term behavioral and neurochemical effects of chronic stress exposure in rats. *J Neurochem* 79(6):1113-21.

Manji HK, Chen G. (2002) PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Mol Psychiatry* 7(Suppl.1):S46-56.

Manji HK, Duman RS. (2001) Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol Bull* 35:5-49.

Manji HK, Moore GJ, Chen G. (2000) Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS *in vivo*: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. *J Clin Psychiatry* 61 (Suppl.9):82-96.

Manji HK, Potter WZ. (1997) Monoaminergic mechanisms in bipolar disorder, in *Bipolar Disorder: Biological models and their clinical application* (Joffe RT, Young LT, eds), pp. 235-54. Marcel Dekker, New York.

Manoli LP, Gamaro GD, Silveira PP, Dalmaz C. (2000) Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochem Res* 25(7):915-21.

Mao W, Iwai C, Qin F, Liang CS. (2005) Norepinephrine induces endoplasmic reticulum stress and downregulation of norepinephrine transporter density in PC12 cells via oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H2381–H2389.

Mao W, Qin F, Iwai C, Vulapalli R, Keng PC, Liang CS. (2004) Extracellular norepinephrine reduces neuronal uptake of norepinephrine by oxidative stress in PC12 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H29–H39.

Maral J, Puget K, Michelson AM. (1977) Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1525-35.

Marklund S. (1980) Distribution of Cu/Zn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:19–23.

Marmigere F, Givalois L, Rage F, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. (2003) Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus* 13:646-55.

Marmol F. (2006) Lithium: 55 years of history in the therapy of bipolar affective disorder. *Med Clin (Barc)* 127:189-95.

Mashoodh R, Wright LD, Hébert K, Perrot-Sinal TS. (2008) Investigation of sex differences in behavioural, endocrine, and neural measures following repeated psychological stressor exposure. *Behav Brain Res* 188(2):368-79.

Masood A, Nadeem A, Mustafa SJ, O'Donnell JM. (2008) Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 326(2):369-79.

Mathews IZ, Wilton A, Styles A, McCormick CM. (2008) Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats. *Behav Brain Res* 190(1):33-40.

Mattson MP, Liu D. (2002) Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2(2):215-31.

Matuszewich L, Karney JJ, Carter SR, Janasik SP, O'Brien JL, Friedman RD. (2007) The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. *Physiol Behav* 90(4):674-81.

Mayberg HS. (1997) Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:471-481.

Mazure CM. (1995) Does stress cause psychiatric illness? (American Psychiatric Press, Washington, DC) *Progress in Psychiatry* no.46:270-98.

McAllister AK, Katz LC, Lo DC. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:295–318.

McEwen BS. (1998a) Stress, adaptation, and disease: allostasis and allostatic load. *Ann NY Acad Sci* 840:33–41.

McEwen BS. (1998b) Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338:171–9.

McEwen B (1999): Stress and hippocampal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 5:205–216.

McEwen BS. (2000a) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172–89.

McEwen B (2000b): Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 48:721–731.

McEwen BS. (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583:174–85.

McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. (2012) Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62(1):3-12.

McEwen BS, Magarinos AM. (1997) Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 821:271-84.

McEwen BS, Nasca C, Gray JD. (2016) Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 41(1):3-23.

McEwen BS, Sapolsky RM. (1995) Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5:205-16.

McEwen BS, Stellar E. (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153(18):2093-101.

McIntosh LJ, Cortopassi KM, Sapolsky RM. (1998a) Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. *Brain Res* 791(1-2):215-22.

McIntosh LJ, Hong KE, Sapolsky RM. (1998b) Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res* 791(1-2):209-14.

McKay LI, Cidlowski JA. (2000) Corticosteroids, In: *Cancer Medicine* 54, 5th ed. (Eds. Bast Jr RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, Gansler TS), BC Decker Inc., Hamilton, Canada, vol. 54, pp. 730-42.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18:49-72.

Meekums B, Karkou V, Nelson EA. (2015) Dance movement therapy for depression. *Cochrane Database Syst Rev* doi:10.1002/14651858.CD009895.pub2.

Meier B, Scherk C, Schmidt M, Parak F. (1998) pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 331:403-7.

Meijer OC, De Kloet ER. (1998) Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus-functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol* 12:1-20.

Meijer OC, Kortekaas R, Oitzl MS, De Kloet ER. (1998) Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT_{1A} receptor-mediated behavioural responses. *Eur J Pharmacol* 351:7-14.

Melia KR, Rasmussen K, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ, Duman RS. (1992) Coordinate regulation of the cyclic AMP system with firing rate and expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus: effects of chronic stress and drug treatments. *J Neurochem* 58(2):494-502.

Menniti FS, Diliberto EJ Jr. (1989) Newly synthesized dopamine as the precursor for norepinephrine synthesis in bovine adrenomedullary chromaffin cells. *J Neurochem* 53(3):890-7.

Michelson D, Adler L, Spencer T, Reimherr FW, West SA, Allen AJ, Kelsey D, Wernicke J, Dietrich A, Milton D. (2003) Atomoxetine in adults with ADHD: two randomized, placebo-controlled studies. *Biol Psychiatry* 53(2):112-20.

Milner TA, Morrison SF, Abate C, Reis DJ. (1988) Phenylethanolamine *N*-methyltransferase-containing terminals synapse directly on sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Res* 448: 205-222.

Miner LH, Jedema HP, Moore FW, Blakely RD, Grace AA, Sesack SR. (2006) Chronic stress increases the plasmalemmal distribution of the norepinephrine transporter and the coexpression of tyrosine hydroxylase in norepinephrine axons in the prefrontal cortex. *J Neurosci* 26(5):1571-8.

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. (2000) Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci* 20(4):1568-74.

Mizoguchi K, Shoji H, Ikeda R, Tanaka Y, Tabira T. (2008) Persistent depressive state after chronic stress in rats is accompanied by HPA axis dysregulation and reduced prefrontal dopaminergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* 91(1):170-5.

Moghaddam B. (2002) Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 51(10):775-87.

Muller T. (2015) Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs* 75(2):157-74.

Munck A. (1971) Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: old and new evidences, molecular mechanisms and physiological significance. *Perspect Biol Med* 14:265-9.

Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E. (2005) Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res* 53(2):129-39.

Musazzi L, Rimland JM, Ieraci A, Racagni G, Domenici E, Popoli M. (2014) Pharmacological characterization of BDNF promoters I, II and IV reveals that serotonin and norepinephrine input is sufficient for transcription activation. *Int J Neuropsychopharmacol* 17(5):779-91.

Naert G, Ixart G, Maurice T, Tapia-Arancibia L, Givalois L. (2011) Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Mol Cell Neurosci* 46:55-66.

Naert G, Ixart G, Tapia-Arancibia L, Givalois L. (2006) Continuous i.c.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, locomotor activity and body temperature rhythms in adult male rats. *Neuroscience* 139(2):779-89.

Nag M. (2004) Effect of chlorpromazine, imipramine and lithium on MAO-A and MAO-B activity in rat brain mitochondria. *Indian J Exp Biol* 42(9):941-4.

Nagatsu T. (1995) Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochem* 30:15-35.

Nagatsu T. (2004) Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering. *Neurotoxicology* 25:11-20.

Nagatsu T, Ichinose H. (1999) Regulation of pteridine-requiring enzymes by the cofactor tetrahydrobiopterin. *Mol Neurobiol* 19:79-96.

Nakane T, Asayama K, Kodera K, Hayashibe H, Uchida N, Nakazawa S. (1998) Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Radic Biol Med* 25:504-11.

- Nankova B, Kvetnansky R, McMahon A, Viskupic E, Hiremagalur B, Frankle G, Fukuhara K, Kopin IJ, Sabban EL. (1994) Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by a nonneuronal nonpituitary-mediated mechanism in immobilization stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13):5937-41.
- Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN. (1988) Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* 43(1):41-6.
- Nawa H, Bessho Y, Carnahan J, Nakanishi S, Mizuno K. (1993) Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 60(2):772-5.
- Nawa H, Carnahan J, Gall C. (1995) BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 7:1527-35.
- Nawa H, Takahashi M, Patterson PH. (2000) Cytokine and growth factor involvement in schizophrenia-support for the developmental model. *Mol Psychiatry* 5:594-603.
- Nemeroff CB, Vale WW. (2005) The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J Clin Psychiatry* 66(Suppl.7):5-13.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226(4680):1342-4.
- Nichol CA, Smith GK, Duch DS. (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu Rev Biochem* 54:729-64.
- Nikulina EM, Covington HE, Ganschow L, Hammer RP Jr, Miczek KA. (2004) Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala. *Neuroscience* 123: 857-865.
- Nilakantan V, Zhou X, Hilton G, Roza AM, Adams MB, Johnson CP, Pieper GM. (2005) Hierarchical change in antioxidant enzyme gene expression and activity in acute cardiac rejection: role of inducible nitric oxide synthase. *Mol Cell Biochem* 270(1-2):39-47.
- Nonaka S, Chuang DM. (1998) Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* 9(9):2081-4.
- Numakawa T, Chiba S, Richards M, Wakabayashi C, Adachi N, Kunugi H. (2011) Production of BDNF by stimulation with antidepressant-related substances. *J Biol Med* 1:1-10.
- O'Dell TJ, Kandel ER, Grant SGN. (1991) Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 353:558-560.

Ottenweller JE, Meier AH. (1982) Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats. *Endocrinology* 111:1334-8.

Ozawa H, Miyauchi T, Sugawara K. (1975) Potentiating effect of lithium chloride on aggressive behavior induced in mice by nialamide plus L-DOPA and by clonidine. *Eur J Pharmacol* 34(1):169-79.

Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. (2004) Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 19(2):89-95.

Pacak K, Baffi JS, Kvetnansky R, Goldstein DS, Palkovits M. (1998) Stressor-specific activation of catecholaminergic systems: implications for stress-related hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses. *Adv Pharmacol* 42: 561–564.

Pacak K, Palkovits M. (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22(4):502-48.

Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS. (1995) Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: *in vivo* microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 16(2):89-150.

Paiva SA, Russell RM. (1999) β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr* 18:426–33.

Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 26:746-61.

Palkovits M, Mezey E, Skirboll LR, Hokfelt T. Adrenergic projections from the lower brainstem to the hypothalamic paraventricular nucleus, the lateral hypothalamic area and the central nucleus of the amygdala in rats. *J Chem Neuroanat* 5: 407–415, 1992.

Papadopoulos M, Koumenis I, Dugan L, Giffard R. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res* 1997;748:151–6.

Pardon MC, Gould GG, Garcia A, Phillips L, Cook MC, Miller SA, Mason PA, Morilak DA. (2002) Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. *Neuroscience* 115(1):229-42.

Pariante CM, Lightman SL. (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences* 31(9):464-8.

Paris JM, Lorens SA, Van de Kar LD, Urban JH, Richardson-Morton KD, Bethea CL. (1987) A comparison of acute stress paradigms: hormonal responses and hypothalamic serotonin. *Physiol Behav* 39:33-43.

Patki G, Atrooz F, Alkadhi I, Solanki N, Salim S. (2015) High aggression in rats is associated with elevated stress, anxiety-like behavior, and altered catecholamine content in the brain. *Neurosci Lett* 584:308-13.

Patterson SL, Abel T, Deuel TAS, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-45.

Patterson SL, Grover LM, Schwartzkroin PA, Bothwell M. (1992) Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9:1081-8.

Patterson RA, Leake DS. (1998) Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH. *FEBS Lett* 434:317-21.

Peiffer A, Veilleux S, Barden N. (1991) Antidepressant and other centrally acting drugs regulate glucocorticoid receptor messenger RNA levels in rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 16(6):505-15.

Penalva RG, Flachskamm C, Zimmermann S, Wurst W, Holsboer F, Reul JM, Linthorst ACE. (2002) Corticotropin-releasing hormone receptor type 1-deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: an *in vivo* microdialysis study in mutant mice. *Neuroscience* 109:253-66.

Pert A, Rosenblatt JE, Sivitt C, Pert CB, Bunney WE Jr. (1978) Long-term treatment with lithium prevents the development of dopamine receptor supersensitivity. *Science* 201(4351):171-3.

Pieribone VA, Aston-Jones G, Bohn MC. (1988) Adrenergic and non-adrenergic neurons in the C1 and C3 areas project to locus coeruleus: a fluorescent double labeling study. *Neurosci Lett* 85: 297-303.

Pietta P. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035-42.

Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav* 43(1):47-55.

Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. (1990) Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behav Neurosci* 104(1):28-36.

Poo MM. 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Rev Neurosci* 2:24-32.

Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13(1):22-37.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229(2):327-36.

Post RM, Speer AM, Hough CJ, Xing G. (2003) Neurobiology of bipolar illness: implications for future study and therapeutics. *Ann Clin Psychiatry* 15(2):85-94.

Prasad KN, Cole WC, Kumar B. (1999) Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *J Am Coll Nutr* 18(5):413-23.

Pratt WB. (1990) Glucocorticoid receptor structure and the initial events in signal transduction. *Prog Clin Biol Res* 322:119-32.

Qiu HM, Yang JX, Jiang XH, Hu XY, Liu D, Zhou QX. (2015) Enhancing tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase expression and improving oxidative stress involved in the antidepressant effect of sodium valproate on rats undergoing chronic unpredicted stress. *Neuroreport* 26(18):1145-50.

Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate CA Jr, Manji HK. (2010) Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology* 62(1):50-60.

Rage F, Givalois L, Marmigère F, Tapia-Arancibia L, Arancibia S. (2002) Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience* 112:309-18.

Rasmussen AM, Shi L, Duman RS. (2002) Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology* 27(2):133-42.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release* 113:189-207.

Reagan LP, Rosell DR, Wood GE, Spedding M, Muñoz C, Rothstein J, McEwen BS. (2004) Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: reversal by tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7):2179-84.

Restrepo C, Armario A. (1987) Chronic stress alters pituitary-adrenal function in prepubertal male rats. *Psychoneuroendocrinology* 12(5):393-8.

Reul JM, Sutanto W, Van Eekelen JAM, Rothuizen J, De Kloet ER. (1990) Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. *Adv Exp Med Biol* 274:243-56.

Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. (2009) Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res* 34(6):1021-9.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933–56.

Rikans LE, Hornbrook KR. (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1362:116–27.

Rinaldi PC, Fairchild MD, Kusske JA. (1986) Perfusion with lithium modifies neurophysiological responses in the CA1 region of the hippocampal slice preparation. *Brain Res* 375(2):302-12.

Rodriguez-Gil JE, Fernandez-Novell JM, Barbera A, Guinovart JJ. (2000) Lithium's effects on rat liver glucose metabolism *in vivo*. *Arch Biochem Biophys* 375:377-84.

Roth J, Radil T, Ruzicka E, Jech R, Tichy J. (1998) Apomorphine does not influence olfactory thresholds in Parkinson's disease. *Funct Neurol* 13(2):99-103.

Rowe MK, Chuang DM. (2004) Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 6(21):1-18.

Ruggiero DA, Ross CA, Anwar M, Park DH, Joh TH, Reis DJ. (1985) Distribution of neurons containing phenylethanolamine *N*-methyltransferase in medulla and hypothalamus of rat. *J Comp Neurol* 239:127-54.

Rusnak M, Kvetnansky R, Jelokova J, Palkovits M. (2001) Effect of novel stressors on gene expression of tyrosine hydroxylase and monoamine transporters in brainstem noradrenergic neurons of long-term repeatedly immobilized rats. *Brain Res* 899:20–35.

Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Rütther E, Havemann-Reinecke U. (2005) Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162(1):127-34.

Sabban EL, Hiremagalur B, Nankova B, Kvetnansky R. (1995) Molecular biology of stress-elicited induction of catecholamine biosynthetic enzymes. *Ann NY Acad Sci* 771:327–38.

Sabban EL. (2007) Catecholamines in stress: molecular mechanisms of gene expression. *Endocr Regul* 41:61–73.

Sabban EL, Nankova BB, (1998) Multiple pathways in regulation of dopamine beta-hydroxylase. *Adv Pharmacol* 42:53-6.

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7(5):426-37.

Sandalio LM, Lopez-Huertas E, Bueno P, Del Rio LA. (1997) Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radic Res* 26:187–94.

Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. (1994) 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 269(29):19163–6.

Sapolsky R (1996): Glucocorticoids and atrophy of the human hippocampus. *Science* 273:749 – 750.

Sapolsky R (2001): Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12320-2.

Sapolsky RM, Plotsky PM. (1990) Hypercortisolism and its possible neural bases. *Biological Psychiatry* 27(9):937-52

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55-89.

Sawchenko PE, Bohn MC. (1989) Glucocorticoid receptor-immunoreactivity in C1, C2, and C3 adrenergic neurons that project to the hypothalamus or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 285:107-16.

Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995;15:943 – 53.

Schildkraut JJ. (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122(5):509-22.

Schloesser RJ, Manji HK, Martinowich K. (2009) Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport* 20(6):553-7.

Schuldiner S. (1994) A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *J Neurochem* 62:2067–78.

Schwab RS, Zieper I. (1965) Effects of mood, motivation, stress and alertness on the performance in Parkinson's disease. *Psychiatr Neurol (Basel)* 150(6):345-57.

Schwartz K, Yadid G, Weizman A, Rehavi M. (2003) Decreased limbic vesicular monoamine transporter 2 in a genetic rat model of depression. *Brain Res* 965(1-2):174-9.

Segal, M. (1974) Lithium and the monoamine neurotransmitters in the rat hippocampus. *Nature* 250:71-3.

Selye H. (1946) The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab* 6:117-230.

- Selye H. (1973) The evolution of the stress concept. *American Scientist* 61(6):692-99.
- Semba J, Watanabe H, Suhara T, Akanuma N. (2000) Chronic lithium chloride injection increases glucocorticoid receptor but not mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain. *Neurosci Res* 38(3):313-9.
- Shea A, Walsh C, MacMillan H, Steiner M. (2005) Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. *Psychoneuroendocrinology* 30(2):162-78.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG. (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3908-13.
- Shih JC. (2004) Cloning, after cloning, and knock-out mice, physiological functions of MAO A and B. *Neurotoxicology* 25:21-30.
- Shih JC, Chen K, Ridd MJ. (1999) Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 22:197-217.
- Shin LM, Rauch SL, Pitman RK. (2006) Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071:67-79.
- Shirayama Y, Chen ACH, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22:3251-61.
- Shors TJ. (2006) Stressful experience and learning across the lifespan. *Annu Rev Psychol* 57:55-85.
- Shors TJ, Seib TB, Levine S, Thompson RF. (1989) Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science* 244:224-226.
- Sies H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Expl Physiol* 82:291-5.
- Sigalov AB, Stern LJ. (1998) Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett* 433:196-200.
- Silva R, Mesquita AR, Bessa J, Sousa JC, Sotiropoulos I, Leao P, Almeida OF, Sousa N. (2008) Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. *Neuroscience* 152(3):656-69.
- Simpkiss JL, Devine DP. (2003) Responses of the HPA axis after chronic variable stress: effects of novel and familiar stressors. *Neuro Endocrinol Lett* 24(1-2):97-103.

Singh C, Bortolato M, Bali N, Godar SC, Scott AL, Chen K, Thompson RF, Shih JC. (2013) Cognitive abnormalities and hippocampal alterations in monoamine oxidase A and B knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(31):12816-21.

Siuciak JA, Boylan C, Fritsche M, Altar CA, Lindsay RM. (1996) BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res* 710(1-2):11-20.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. (1997) Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 56:131-7.

Slattery DA, Uschold N, Magoni M, Bar J, Popoli M, Neumann ID, Reber SO. (2012) Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: anxiety without depression. *Psychoneuroendocrinology* 37(5):702-14.

Smith DF. (1989) Lithium alters the stereoselectivity of monoamine oxidase in rat brain. *J Neural Transm* 76(3):205-10.

Smith DF, Toft DO. (1993) Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7(1):4 – 11.

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15:1768-77.

Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. (2011) Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476(7361):458-61.

Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D. (1974) Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Science* 184(4143):1243-53.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. (1977) The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28(5):897-916.

Sorg BA, Kalivas PW. (1993) Effects of cocaine and footshock stress on extracellular dopamine levels in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 53(3):695-703.

Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM. (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* 64:33-9.

Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF. (2011) Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. *J Neurosci* 31(21):7840-7.

Sousa RT, Zarate CA Jr, Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, Machado-Vieira R. (2014) Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. *J Psychiatr Res* 50:36-41.

Southwick SM, Bremner JD, Rasmusson A, Morgan CA III, Arnsten A, Charney DS. (1999) Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 46(9):1192-204.

Stich TM. (1990) Determination of protein covalently bound to agarose supports using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 191(2):343-6.

Stone EA, Freedman LS, Morgano LE. (1978) Brain and adrenal TH activity after chronic footshock stress. *Pharmacol Biochem Behav* 9(4):551-3.

Stralin P, Marklund SL. (1994) Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochem J* 298:347-52.

St. Clair DK, Oberley TD, Ho YS. (1991) Overproduction of human Mn-superoxide dismutase modulates paraquat-mediated toxicity in mammalian cells. *FEBS Lett* 293:199-203.

Stranahan AM, Mattson MP. (2012) Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. *Nat Rev Neurosci* 13(3):209-16.

Stratakis CA, Chrousos GP. (1995) Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* 771:1-18.

Stratakis CA, Gold PW, Chrousos GP. (1995) Neuroendocrinology of stress: implications for growth and development. *Horm Res* 43:162-7.

Sullivan RM. (2004) Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress* 7: 131-43.

Sutanto W, de Kloet ER. (1994) The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. *Lab Anim* 28(4):293-306.

Swanson LW, Sawchenko PE. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6:269-324.

Szabo S, Tache Y, Somogyi A. (2012) The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature. *Stress* 15(5):472-8.

Tagliari B, dos Santos TM, Cunha AA, Lima DD, Delwing D, Sitta A, Vargas CR, Dalmaz C, Wyse AT. (2010) Chronic variable stress induces oxidative stress and decreases butyrylcholinesterase activity in blood of rats. *J Neural Transm (Vienna)* 117(9):1067-76.

Takahashi K, Cohen HJ. (1986) Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood* 68:640–6.

Tanaka M, Kohno Y, Nakagawa R, Ida Y, Takeda S, Nagasaki N. (1982) Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacol Biochem Behav* 16(2):315-9.

Tanda G, Carboni E, Frau R, Di Chiara G. (1994) Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology (Berl)* 115(1-2):285-8.

Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function, *Front Neuroendocrinol* 25(2):77-107.

Tappel AL. (1978) Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 52:506–13.

Teixeira HD, Schumacher RI, Meneghini R. (1998) Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells over-expressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 95:7872–5.

Thierry AM, Tassin JP, Blanc G, Glowinski J. (1976) Selective activation of mesocortical DA system by stress. *Nature* 263(5574):242-4.

Thoenen H. (1970) Induction of tyrosine hydroxylase in peripheral and central adrenergic neurones by cold-exposure of rats. *Nature* 228: 861–862.

Thoenen H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-8.

Thoenen H, Zafra F, Hengerer B, Lindholm D. (1991) The synthesis of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal and cortical neurons is regulated by specific transmitter systems. *Ann N Y Acad Sci* 640:86-90.

Thomas SA, Palmiter RD. (1997) Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature* 387:94-7.

Thony B, Auerbach G, Blau N. (2000) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 347:1–16.

Tillinger A, Sollas A, Serova LI, Kvetnansky R, Sabban EL. (2010) Vesicular monoamine transporters (VMATs) in adrenal chromaffin cells: stress-triggered induction of VMAT2 and expression in epinephrine synthesizing cells. *Cell Mol Neurobiol* 30(8):1459-65.

Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H. (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10:475-89.

Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B, Del Rio J. (2007) Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with

reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *Eur J Neurosci* 25(1):281-90.

Toth I, Neumann ID. (2013) Animal models of social avoidance and social fear. *Cell and Tissue Research* 354(1):107-18.

Treiser SL, Cascio CS, O'Donohue TL, Thoa NB, Jacobowitz DM, Kellar KJ. (1981) Lithium increases serotonin release and decreases serotonin receptors in the hippocampus. *Science* 213(4515):1529-31.

Tse YC, Montoya I, Wong AS, Mathieu A, Lissemore J, Lagace DC, Wong TP. (2014) A longitudinal study of stress-induced hippocampal volume changes in mice that are susceptible or resilient to chronic social defeat. *Hippocampus* 24(9):1120-8.

Tsigos C, Chrousos GP. (2002) Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53:865–71.

Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. (1984) Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 73:87–95.

Turunen M, Olsson J, Dallner G. (2004) Metabolism and function of coenzyme. *Q Biochim Biophys Acta* 1660:171-99.

Uchida S, Nishida A, Hara K, Kamemoto T, Suetsugi M, Fujimoto M, Watanuki T, Wakabayashi Y, Otsuki K, McEwen B S, Watanabe Y. (2008) Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *Eur J Neurosci* 27(9):2250-61.

Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Tone S, Senba E. (1997) Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci Res* 28:103-10.

Ullrich A, Baierl P, ten Bruggencate G. (1980) Extracellular potassium in rat cerebellar cortex during acute and chronic lithium application. *Brain Res* 192(1):287-90.

Ulrich-Lai YM, Engeland WC. (2002) Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology* 76(2):79-92.

Valentin A, Garcia-Seoane JJ, Colino A. (1997) Lithium enhances synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *Neuroscience* 78(2):385-91.

Valles A, Marti O, Armario A. (2006) Long-term effects of a single exposure to immobilization: a *c-fos* mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain. *J Neurobiol* 66: 591–602.

Vance CK, Miller AF. (1998) Spectroscopic comparisons of the pH dependence of Fe-substituted (Mn)superoxide dismutase and Fe-superoxide dismutase. *Biochemistry* 37:5518–27.

Van de Kar LD, Blair ML. (1999) Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 20:1–48.

Van der Gugten J, Palkovits M, Wijnen HL, Versteeg DH. Regional distribution of adrenaline in rat brain. *Brain Res* 107: 171–175, 1976.

Venator DK, Lewis DA, Finlay JM. (1999) Effects of partial dopamine loss in the medial prefrontal cortex on local baseline and stress-evoked extracellular dopamine concentrations. *Neuroscience* 93(2):497-505.

Vervoort LM, Ronden JE, Thijssen HH. (1997) The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 54:871-6.

Viau V, Sawchenko PE. (2002) Hypophysiotropic neurons of the paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs. repeated restraint stress. *J Comp Neurol* 445:293-307.

Walf AA, Cheryl AF. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2(2):322-8.

Wang Y, Kan H, Yin Y, Wu W, Hu W, Wang M, Li W, Li W. (2014) Protective effects of ginsenoside Rg1 on chronic restraint stress induced learning and memory impairments in male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 120:73-81.

Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. (1992) Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588:341–345.

Watanabe Y, McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. (1995) Effects of chronic social stress on tyrosine hydroxylase mRNA and protein levels. *Brain Res* 32: 176–180.

Weinshilboum R, Axelrod J. (1971) Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ Res* 28:307–15.

Weiss JM, Glazer HI, Pohorecky LA, Brick J, Miller NE. (1975) Effects of chronic exposure to stressors on avoidance-escape behavior and on brain norepinephrine. *Psychosom Med* 37(6):522-34.

Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD. (2008) Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation. *Mol Psychiatry* 13(3):285-92.

Whitnall MH. (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40:573-629.

Whitworth EJ, Kosti O, Renshaw D, Hinson JP. (2003) Adrenal neuropeptides: regulation and interaction with ACTH and other adrenal regulators. *Microsc Res Tech* 61(3):259-67.

Whyte J, Hart T, Vaccaro M, Grieb-Neff P, Risser A, Polansky M, Coslett HB. (2004) Effects of methylphenidate on attention deficits after traumatic brain injury: a multidimensional, randomized, controlled trial. *Am J Phys Med Rehabil* 83(6):401-20.

Wood GE, Shors TJ. (1998) Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7):4066-71.

Wood M, Boyce CJ, Moore SC, Brown GDA. (2012) An evolutionary based social rank explanation of why low income predicts mental distress: a 17 year cohort study of 30,000 people, *Journal of Affective Disorders* 136(3):882-8.

Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. (1998) Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273:14085-9.

Yasuda S, Liang MH, Marinova Z, Yahyavi A, Chuang DM. (2009) The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Mol Psychiatry* 14(1):51-9.

Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7(4):295-309.

Zaidi SM, Banu N. (2004) Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 340(1-2):229-33.

Zhang L, Yu L, Yu CA. (1998) Generation of superoxide anion by succinatecytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 273:33972-6.

Zhang L, Zhou R, Li X, Ursano RJ, Li H. (2006) Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. *Med Hypotheses* 66:1205-8.

Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 374(6523):640-3.

Zhou R, Gray NA, Yuan P, Li X, Chen J, Chen G, Damschroder-Williams P, Du J, Zhang L, Manji HK. (2005) The anti-apoptotic, glucocorticoid receptor cochaperone protein BAG-1 is a long-term target for the actions of mood stabilizers. *J Neurosci* 25(18):4493-502.

Zhu MY, Klimek V, Dilley GE, Haycock JW, Stockmeier C, Overholser JC, Meltzer HY, Ordway GA. (1999) Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry* 46(9):1275-86.

Zigmond RE, Schon F, Iversen LL. (1974) Increased tyrosine hydroxylase activity in the locus coeruleus of rat brain stem after reserpine treatment and cold stress. *Brain Res* 70(3):547-52.

Zigova T, Willing AE, Tedesco EM, Borlongan CV, Saporta S, Snable GL, Sanberg PR. (1999) Lithium chloride induces the expression of tyrosine hydroxylase in hNT neurons. *Exp Neurol* 157(2):251-8.

Zubieta JK, Taylor SF, Huguelet P, Koeppe RA, Kilbourn MR, Frey KA. (2001) Vesicular monoamine transporter concentrations in bipolar disorder type I, schizophrenia, and healthy subjects. *Biol Psychiatry* 49(2):110-6.

Zucker M, Aviv A, Shelef A, Weizman A, Rehavi M. (2002) Elevated platelet vesicular monoamine transporter density in untreated patients diagnosed with major depression. *Psychiatry Res* 112(3):251-6.

8. PRILOZI

BIOGRAFIJA

Nataša Popović je rođena 26. februara 1968. godine u Titovom Velesu. Osnovno i srednje obrazovanje završila je u Beogradu. Diplomirala je 1995. godine na studijskoj grupi za Molekularnu biologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sa prosečnom ocenom 9,46. Eksperimentalni deo diplomskog rada uradila je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, a diplomski rad na temu „Efekat korteksolona na aktivnost tirozin aminotransferaze indukovane hidrokortizonom u jetri pacova“ odbranila je 1995. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Zaposlena je od 1995. godine u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča". Posle diplomske studije upisala je školske 1995/96 godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i biohemija. Magistarsku tezu pod naslovom „Karakterizacija izoformi i analiza funkcije glukokortikoidnog receptora u kvašćevim i sisarskim ćelijama“, odbranila je 1998. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Na sednici Naučnog veća Instituta za nuklearne nauke "Vinča" održanoj 17. jula 2014. izabrana je u zvanje stručni savetnik. Doktorska disertacija, pod naslovom: „Delovanje litijuma na neurotransmiterski i antioksidativni status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova izlaganih ponavljanim stresu fizičkog sputavanja“ je prihvaćena na X redovnoj sednici Naučno-nastavnog veća Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 13.09.2013. godine. Članovi komisije za ocenu ispunjenosti uslova i naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije koju su činili dr Ljubica Gavrilović, dr Predrag Vujović, Prof. dr Snežana B. Pajović i Prof. dr Lidija Radenović pozitivno su ocenili prijavljenu temu.

Nataša Popović je na projektu pod nazivom “Ćelijske i molekulske osnove malignih i kardiovaskularnih oboljenja-kliničke implikacije” koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Svoje naučno-istraživačko obrazovanje kandidatkinja je proširivala i kraćim boravcima i radom u laboratorijama na Univerzitetu u Pitsburgu 1996. godine, Univerzitetu u Glazgovu 1997. godine i na Univerzitetu u Mančesteru 2009.

U toku dosadašnjeg rada, mr Nataša Popović je pored magistarske teze, objavila 18 naučnih publikacija koje obuhvataju: 13 radova u međunarodnim časopisima (3-M21, 5-M22, 4-M23 i 1-M14), 1 rad u časopisu nacionalnog značaja (1-M24) i 4 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampana u celini (4-M33).

9. OPŠTI PODACI O AUTORSKIM PRAVIMA

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Наташа Поповић

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Деловање литијума на неуротрансмитерски и антиоксидативни статус у

префронталном кортексу и хипокампусу пацова излаганих понављаном

стресу физичког спутавања

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 19.07.2016.

Наташа Поповић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Наташа Поповић

Број индекса

Студијски програм

Наслов рада Деловање литијума на неуротрансмитерски и антиоксидативни статус у префронталном кортексу и хипокампусу пацова излаганих понављаном стресу физичког спутавања

Ментор Др Љубица Гавриловић, виши научни сарадник Института за нуклеарне науке "Винча" Универзитета у Београду

Др Предраг Вујовић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 19.07.2016.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Деловање литијума на неуротрансмитерски и антиоксидативни статус у

префронталном кортексу и хипокампусу пацова излаганих понављаном

стресу физичког спутавања

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 19.07.2016.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.