

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ester A. Francija Žerajić

**Uloga GluN2A subjedinice NMDA
receptora u procesima sinaptogeneze u
neuroinflamaciji i ponašanju nalik
depresivnom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ester A. Francija Žerajić

**Uloga GluN2A subjedinice NMDA
receptora u procesima sinaptogeneze u
neuroinflamaciji i ponašanju nalik
depresivnom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ester A. Francija Žerajić

**The role of GluN2A subunit of NMDA
receptor in synaptogenesis and
depressive like behaviour in an animal
model of neuroinflammation**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori

dr Miroslav Adžić, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke Vinča, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije

dr Danijela Laketa, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Nina Dragičević, viši naučni saradnik, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Miloš Mitić, naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke Vinča, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Definisanje klastera molekularnih biomarkera za poboljšanje i terapiju poremećaja raspoloženja“ (III41209) pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Miroslavu Adžiću, na ukazanom poverenju, uloženom trudu i vremenu, korisnim savetima i sugestijama tokom realizacije ove doktorske disertacije.

Veliko hvala prof. dr Nadeždi Nedeljković na predusretljivosti i na svojoj pomoći koju mi je pružila tokom doktorskih studija i izradi ove doktorske disertacije.

Najlepše se zahvaljujem prof. dr Danijeli Laketi, prof. dr Nini Dragičević i dr Milošu Mitiću na izuzetnoj efikasnosti i veoma korisnim sugestijama tokom pisanja i finalizovanja ove disertacije.

Najlepše hvala dr Ivi Simić i dr Sanji Ivković koje su uvek bile voljne da saslušaju, pomognu i posavetuju.

Veliko hvala mojim dragim kolegicama, sadašnjim ili bivšim članovima naše laboratorije: Željki, Zorici, Minji i Emi i našem „spoljnom saradniku“ Marini. Rad sa njima je divno iskustvo. Bile su nezamenljiva podrška i učinile da rad na ovoj disertaciji bude lakši.

Na kraju zahvalnice, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami, tati i bratu kao i mom Miljanu na svojoj ljubavi, razumevanju i podršci.

Uloga GluN2A subjedinice NMDA receptora u procesima sinaptogeneze u neuroinflamaciji i ponašanju nalik depresivnom

Sažetak

Inflamatorni medijatori imaju značajnu ulogu u patofiziologiji depresije. U centralnom nervnom sistemu, citokini, između ostalog, mogu da naruše neuroplastičnost i balans unutar neurotransmiterskih sistema. Neuroinflamacija može da izazove produkciju neuroaktivnih metabolita (hinolinska kiselina) koji interferiraju sa aktivnošću N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora i tako dovode do promena u glutamatnoj neurotransmisiji, što za posledicu može imati razvoj depresivnih simptoma. Sa druge strane, pokazano je da antidepresivni efekti neselektivnih antagonista NMDA receptora zavise od aktivacije mTOR signalnog puta koji podstiče lokalnu translaciju sinaptičkih proteina u dendritima i tako promoviše sinaptogenezu. Dakle, ovi podaci nedvosmisleno govore o ulozi NMDA receptora u patofiziologiji depresije, međutim, o ulozi specifičnih subjedinica NMDA receptora i njihovom doprinosu patologiji depresije se ne zna dovoljno, a upravo bi ova saznanja mogla doprineti efikasnijoj antidepresivnoj terapiji.

U svetlu navedenih literaturnih podataka u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je specifična uloga GluN2A subjedinice NMDA receptora u nastanku ponašanja nalik depresivnom kod C57BL/6J miševa, u neuroinflamatornom modelu depresije. Takođe, u sinaptozomima hipokampusa i prefrontalnog korteksa (PFC) ispitivani su molekularni signali koji se mogu nalaziti u osnovi depresivnog fenotipa kod životinja, sa posebnim osvrtom na mTOR signalni put i sinaptogenezu kao i procese neuroplastičnosti.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da miševi sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) ne ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom u neuroinflamatornom modelu depresije, suprotno životinjama divljeg soja (WT) tretiranih lipopolisaharidom (LPS). LPS tretman je doveo do pojave ponašanja nalik depresivnom kod WT životinja, što je bilo praćeno povećanim nivoom citokina IL-6, smanjenim nivoima markera neuroplastičnosti, smanjenom aktivnošću mTOR signalnog puta i smanjenim

nivoima sinaptičkih markera kako u hipokampusu, tako i u PFC. S druge strane LPS tretman nije doveo do pojave ponašanja nalik depresivnom kod GluN2A^{-/-} životinja što je bilo povezano sa nepromenjenim nivoom IL-6, nepromenjenim ili čak povećanim nivoima markera neuroplastičnosti i aktivnosti mTOR signalnog puta kao i održivom sinaptičkom stabilnošću u PFC i hipokampusu.

U ovoj doktorskoj disertaciji, po prvi put je pokazana značajna uloga GluN2A subjedinice NMDA receptora u posredovanju efekata inflamacije na mehanizme koji dovode do nastanka ponašanja nalik depresivnom kod miševa.

Ključne reči: lipopolisaharid, ponašanje nalik depresivnom, GluN2A^{-/-}, mTOR signalni put, sinaptogeneza, neuroplastičnost, miš, prefrontalni korteks, hipokampus

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

The role of GluN2A subunit of NMDA receptor in synaptogenesis and depressive-like behavior in an animal model of neuroinflammation

Abstract

Inflammatory mediators play a significant role in the pathophysiology of depression. Within the brain, cytokines, among other things, can affect the neuroplasticity and neurotransmitter systems. Namely, neuroinflammation can induce the production of neuroactive metabolites (quinolinic acid) that interfere with N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-mediated glutamate neurotransmission and lead to depressive-like behavior. On the other hand, it has been shown that the antidepressant effects of nonselective NMDAR antagonists depend on the activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, which stimulates local translation of synaptic proteins in dendrites and thus promotes synaptogenesis. Therefore, the activation of NMDAR with quinolinic acid, associated with the development of depressive-like behavior in neuroinflammatory conditions, as well as the antidepressant properties of NMDAR antagonists unequivocally indicate the involvement of this receptor in the pathophysiology of depression. However, not enough is known about the role of specific NMDAR subunits and their contribution to the pathology of depression, knowledge of which could contribute to more effective antidepressant therapy.

In light of these studies, we examined the specific role of the GluN2A subunit of NMDAR in the development of depressive-like behavior in C57BL/6J mice, in the neuroinflammation-induced model of depression. We also investigated the mechanisms underlying the observed behavioral changes, with emphasis on the activity of mTOR signaling pathway, synaptogenesis and neuroplasticity processes in the synaptosomes of hippocampus and prefrontal cortex (PFC).

The results of this doctoral dissertation showed that GluN2A^{-/-} mice do not exhibit depressive-like behavior after immune challenge, in contrast to wild-type (WT) animals treated with Lypopolisaccharide (LPS). LPS-treated WT animals exhibited increased level of interleukin-6 (IL-6) and decreased levels of neuroplasticity markers, synaptic markers and mTOR signaling pathway activity. On

the other hand, resistance of GluN2A^{-/-} animals to depressive-like behavior after LPS treatment was accompanied by unchanged levels of IL-6, unchanged or even increased levels of markers of neuroplasticity and mTOR signaling pathway activity as well as sustained synaptic stability in the hippocampus and PFC.

In this doctoral dissertation, for the first time, a significant role of the GluN2A subunit of NMDAR as a mediator of the effects of inflammation on mechanisms underlying depressive-like behavior in mice was demonstrated.

Key words: lipopolysaccharide, depressive-like behavior, GluN2A^{-/-}, mTOR signaling pathway, synaptogenesis, neuroplasticity, mice, prefrontal cortex, hippocampus

Research area: Biology

Research field: Neurobiology

SPISAK SKRAĆENICA

Akt - protein kinaza B

AMPAR - receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline

ANA-12 - (*N2-(2-{{(2-oxoazepan-3-yl) amino}carbonyl}phenyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide*

ANOVA - analiza varijansi

BDNF - neurotrofni moždani faktor

BSA - goveđi serumski albumin

CNS - centralni nervni sistem

CRFR1 - kortikotropin-oslobađajući hormonski receptor tipa 1

CRH - kortikotropni-oslobađajući hormon 1

CRP - C reaktivni protein

CSF - cerebrospinalna tečnost

CUS - hronični nepredvidivi stres

dIPFC - dorzolateralni prefrontalni korteks

DMSO - dimetil sulfoksid

dNTP – dezoksi-nukleozid trifosfat

EDTA - etilen diamin-tetrasirćetna kiselina

eEF2K - eukariotski elongacijski faktor 2 kinaza

eEF2 - eukariotski elongacijski faktor 2

eIF-4E - eukariotski faktor inicijacije translacije 4E

eIF-4F - eukariotski faktor inicijacije translacije 4F

EPM - test uzdignutog plus lavirinta

ERK - kinaze regulisane vanćelijskim signalima

FST - test prinudnog plivanja

GABA – γ -aminobuterna kiselina

GluN2A^{-/-} - miševi sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora

GluN2A^{+/-} - heterozigotni miševi za GluN2A subjedinicu NMDA receptora

GR - glukokortikoidni receptor

GSK-3 β - glikogen sintaza kinaza 3 beta

HPA - hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osovina
HRP - peroksidaza iz rena
HSPs - proteini toplotnog šoka
IDO - indolamin 2,3-dioksidogenaza
IL-1 β - interleukin 1 beta
IL-6 - interleukin 6
INF- α - interferon α
KA - kinurenska kiselina
KAR - kainatni receptor
KYN - kinurenin
LMA - lokomotorna aktivnost
LTP - dugotrajna potencijacija
LTD - dugotrajna depresija
LPS - lipopolisaharid
mGluR - metabotropni glutamatni receptori
MEK - mitogenom-aktivirane proteinske kinaze
mTOR - *mammalian target of rapamycin*
NCAM - neuralni adhezivni molekuli
NMDA - N-metil-D-aspartat
NOS - azot oksid sintetaza
NRI - selektivni inhibitor norepinefrina
NSF - test smanjenog interesovanja za hranu u novom okruženju
PBS - natrijum/fosfatni pufer
PFC - prefrontalni korteks
PGs - prostaglandini
PSA - polisijalinska kiselina
PSD-95 - *postsynaptic density protein 95*
PTSD - posttraumatski stresni poremećaj
P70S6K - ribozomalna protein S6 kinaza beta -1
QUON - hinolinska kiselina
RIPA - pufer za ispitivanje radioimunoprecipitacije
ROS - reaktivne vrste kiseonika

SEM - standardna greška

SDS - natrijum dodecil sulfat

SNAP-25 - *synaptosomal associated protein 25*

SNRI - selektivni inhibitor preuzimanja serotonin-norepinefrin

SPT - test sklonosti ka saharozi

SSRI - selektivni inhibitor preuzimanja serotonina

TCA - triciklični antidepresivi

TLR 3 i 4 - Toll-like receptor 3 i 4

TNF- α - faktor nekroze tumora alfa

TRD - depresija rezistentna na terapiju

TrkB - receptor tropomiozinske kinaze B

TRP - triptofan

TSC1/2 - *tuberous sclerosis complex 1/2*

TST - test kačenja za rep

VTA-NAc - ventralno tegmentalno područje/nucleus accumbens

WT - miševi divljeg soja

YLD - godine života sa nesposobnošću

5-HT1A - serotonin 1A receptor

4E-BP1 - eukariotski translacijski factor 4E vezujući protein 1

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Depresija	2
1.1.1. Kliničke karakteristike i dijagnostika depresije.....	3
1.1.2. Epidemiologija depresije	4
1.1.3. Životinjski modeli depresije	6
1.1.4. Etiologija i hipoteze depresije.....	7
1.1.4.1. Genetska komponenta depresije.....	8
1.1.4.2. Glukokortikoidna hipoteza depresije.....	9
1.1.4.3. Monoaminska hipoteza	10
1.1.4.4. Glutamatna hipoteza depresije.....	11
1.1.4.5. Citokinska hipoteza depresije.....	12
1.2. Neuroplastičnost mozga i depresija.....	14
1.2.1. Neurotrofni faktori.....	14
1.2.2. Neuralni adhezivni molekuli	15
1.2.3. Sinaptička plastičnost i sinaptogeneza.....	16
1.3. Neuroinflamacija i depresija.....	18
1.3.1. Neuroinflamacija - od periferije do mozga.....	19
1.3.2. Komponente neuroinflamatornog odgovora	20
1.3.2.1. Inflamacija i glutamatna neurotransmisija	20
1.3.2.2. Inflamacija i neuroplastičnost.....	22
1.3.3. Neuroinflamatorni model depresije	23
1.4. NMDA receptor - jonotropni glutamatni receptor	24
1.4.1. Strukturna i funkcionalna karakterizacija NMDA receptora	25
1.4.2. Uloga NMDA receptora u depresiji.....	26
1.4.2.1. Antagonisti NMDA receptora kao potentni antidepresivi	27
1.4.2.2. Mehanizmi delovanja antagonista NMDA receptora	28
1.5. Signalni put mTOR.....	30
1.5.1. Sinaptogeneza i mTOR.....	31
1.5.2. Uloga mTOR signalnog puta u depresiji.....	33
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	34

3. MATERIJAL I METODE	36
3.1. Gajenje eksperimentalnih životinja.....	37
3.2. Tretmani i eksperimentalni dizajn	38
3.2.1. Eksperimentalni dizajn.....	39
3.2.1.1. <i>Eksperiment I</i>	39
3.2.2.2. <i>Eksperiment II</i>	40
3.2.2.3. <i>Eksperiment III</i>	41
3.3. Lokomotorna aktivnost i testovi ponašanja	43
3.3.1. Lokomotorna aktivnost	44
3.3.2. Test prinudnog plivanja	44
3.3.3. Test sklonosti ka saharozi	45
3.4. Analiza proteina.....	46
3.4.1. Izolacija ukupnog ćelijskog ekstrakta	46
3.4.2. Izolacija sinaptozomalne frakcije	46
3.4.3. Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za imunoblot analizu	48
3.4.4. Imunoblot analiza proteina.....	49
3.4.5. Kvantifikacija signala.....	51
3.5. Statistička analiza podataka.....	51
4. REZULTATI	52
4.1. Analiza lokomotorne aktivnosti i ponašanja WT i GluN2A ^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (<i>Eksperiment I</i>)	53
4.2. Analiza nivoa citokina IL-6 kod WT i GluN2A ^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (<i>Eksperiment I</i>).....	54
4.3. Analiza markera neuroplastičnosti kod WT i GluN2A ^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (<i>Eksperiment I</i>)	55
4.3.1. Analiza nivoa BDNF proteina	55
4.3.2. Analiza PSA-NCAM nivoa i nivoa NCAM izoformi	56
4.4. Analiza nivoa subjedinica NMDA i AMPA receptora kod WT i GluN2A ^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (<i>Eksperiment I</i>).....	58
4.4.1. Analiza nivoa subjedinica NMDA receptora	58
4.4.2. Analiza nivoa subjedinica AMPA receptora.....	59
4.5. Analiza aktivnosti mTOR signalnog puta i sinaptogeneze kod WT i GluN2A ^{-/-} miševa (<i>Eksperiment I</i>).....	61

4.5.1. Analiza uzvodnih regulatora mTOR aktivnosti - Akt, ERK i GSK-3 β	61
4.5.2. Analiza mTOR aktivnosti i njegovog nizvodnog efektor, p70S6K	63
4.5.3. Analiza nivoa sinaptičkih proteina PSD-95 i GluA1.....	63
4.6. Analiza efekata antagoniste TrkB receptora, ANA-12, na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta GluN2A-/- miševa u neuroinflamatornom modelu depresije (<i>Eksperiment II</i>)	65
4.7. Analiza efekata ERK inhibitora, UO126, na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta GluN2A-/- miševa u neuroinflamatornom modelu depresije (<i>Eksperiment III</i>).....	66
5. DISKUSIJA	72
5.1. Efekat LPS tretmana na ponašanje WT i GluN2A-/- miševa.....	73
5.2. Efekat LPS tretmana na nivo IL-6 u mozgu WT i GluN2A-/- miševa.....	75
5.3. Efekti LPS tretmana na markere neuroplastičnosti kod WT i GluN2A-/- miševa	76
5.4. Efekti LPS tretmana na nivoe subjediničica AMPA i NMDA receptora kod WT i GluN2A-/- miševa	79
5.5. Efekti LPS tretmana na aktivnost mTOR signalnog puta kod WT i GluN2A-/- miševa	81
5.6. Efekat inhibicije komponenti mTOR signalnog puta na ponašanje GuN2A-/- miševa	83
5.6.1. Efekti antagoniste TrkB receptora na ponašanje i aktivnost mTOsignalnog puta kod GluN2A-/- miševa tretiranih sa LPS.	83
5.6.2. Efekti ERK inhibitora na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta kod GluN2A-/- miševa tretiranih sa LPS	86
6. ZAKLJUČCI	89
7. LITERATURA	92
8. PRILOZI	122
Прилог 1.	124
Прилог 2.	125
Прилог 3.	126

1. UVOD

1.1. Depresija

Depresija (depresivni poremećaj, klinička depresija ili unipolarna depresija) je hronično mentalno oboljenje koje pogađa milione ljudi širom sveta. Ova bolest je mnogo više od pukog osećaja neraspoloženja koje u svakodnevnom životu osoba može da iskusi. Depresija je dobro definisan medicinski pojam koju karakteriše dugoročan poremećaj mišljenja, pamćenja, motivacije, emocionalne regulacije, motoričke i neurovegetativne funkcije i kao takva uzrok je ozbiljnog invaliditeta obolelog.

Procenjuje se da na globalnom nivou više od 280 miliona ljudi boluje od depresije (Institute of Health Metrics and Evaluation, 2021). Depresija je vodeće psihijatrijsko oboljenje koje se povezuje sa samoubistvima. Procenjuje se da je ova bolest prisutna kod polovine do dve trećine osoba koje izvrše samoubistvo (Conwell i sar., 1996; Harwood i sar., 2001). Takođe, ono što sve više zabrinjava jeste činjenica da je prevalenca depresije sve veća kod dece i tinejdžera, a da je samoubistvo drugi uzrok smrti kod ljudi starosti od 15 do 29 godina (Bachmann, 2018).

Iako se neurobiologija depresije proučava nekoliko decenija, njena osnovna etiopatologija i dalje nije u potpunosti otkrivena. Nepotpuno znanje o patofiziologiji depresije, kao i nedostatak objektivne dijagnostike (nepostojanje adekvatnih biomarkera), može biti razlog za nedovoljnu efikasnost postojećih tretmana. Nažalost, mnogi pacijenti imaju parcijalni terapijski odgovor na postojeću antidepresivnu terapiju ili čak potpuni izostanak odgovora na terapiju tj. imaju depresiju rezistentnu na terapiju (eng. *treatment-resistant depression*, TRD) (Al-Harbi, 2012). Oko jedne trećine depresivnih pacijenata doživi remisiju bolesti nakon prve antidepresivne terapije, dok se kod dve trećine pacijenata remisija bolesti postiže tek nakon četiri tretmana (Al-Harbi, 2012). Takođe, depresija je visoko rekurentno oboljenje, gde više od 50% pacijenata, koji se oporave od prve depresivne epizode, doživljava još jednu ili više depresivnih epizoda tokom života (Burcusa i Iacono, 2007).

Shodno svemu navedenom, možemo zaključiti da je depresija jedan od vodećih problema današnjice od javnog značaja jer zbog visoke incidence i ne tako

adekvatne dijagnostike i terapije, ova bolest predstavlja veliko finansijsko i socijalno opterećenje na globalnom nivou.

1.1.1. Kliničke karakteristike i dijagnostika depresije

Depresija pogađa sve aspekte života, dovodi do narušenih socijalnih aktivnosti, disfunkcionalnosti u radnom i porodičnom okruženju, a ovaj poremećaj prate simptomi emocionalne, fizičke i kognitivne prirode koji se mogu javljati u kombinacijama i menjati tokom vremena. Prema tome, dijagnostički pristup zasnovan na simptomima, a bez specifičnih biomarkera, stvara značajna ograničenja u interpretaciji i proučavanju depresije, a samim tim i njenom lečenju.

Dva najpoznatija i najčešće korišćena kriterijuma za dijagnostikovanje depresije su: Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje *V* (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V, DSM-V*) koji se koristi u Sjedinjenim Američkim Državama i Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema 10 (eng. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10, ICD-10*), priručnik koji se primenjuje uglavnom u Evropi a koji predstavlja službenu klasifikaciju bolesti i u našoj zemlji, MKB-10 (*Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, deseta revizija*). Po MKB-10, simptomi depresije mogu se svesti na sledeće:

- 1) depresivno raspoloženje;
- 2) gubitak interesa i užitka u uobičajenim aktivnostima koje pružaju zadovoljstvo;
- 3) smanjenje energije ili povišen zamor;
- 4) gubitak samopouzdanja i samopoštovanja;
- 5) bezrazložan osećaj samoprekora ili intenzivne i neprimerene krivice;
- 6) ponavljajuće misli o smrti ili samoubistvu ili bilo koje suicidalno ponašanje;
- 7) otežano mišljenje i koncentracija (kao što su neodlučnost ili kolebljivost);
- 8) promena u psihomotornoj aktivnosti u vidu agitacija ili retardacije;
- 9) poremećaj spavanja (nesanica ili stalna pospanost);
- 10) poremećaj apetita (smanjen ili pojačan) povezan sa promenom telesne težine;

Da bi se postavila dijagnoza depresije potrebno je da su navedeni simptomi prisutni kod obolelog veći deo dana, gotovo svaki dan, u trajanju od najmanje dve nedelje. U zavisnosti od broja prisutnih simptoma, razlikuju se blage depresivne epizode (prisustvo bar 4 simptoma), umerene depresivne epizode (prisustvo bar 6 simptoma) i teška depresivna epizoda bez psihotičkih simptoma (prisustvo bar 8 simptoma).

Bitno je napraviti distinkciju izmedju depresivnog i bipolarnog poremećaja. Ukoliko se kod osobe tokom života javljaju isključivo depresivne epizode, bez maničnih ili hipomaničnih epizoda, onda govorimo o unipolarnom depresivnom poremećaju ili depresiji, entitetu o kome će zapravo i biti reč u ovoj disertaciji.

Depresivni poremećaji u Međunarodnoj klasifikaciji bolesti podeljeni su na:

- 1) depresivnu epizodu, različitog intenziteta (blaga, umerena, teška) i kvaliteta (sa „somatskim simptomima“, sa „psihotičnim simptomima“);
- 2) rekurentni depresivni poremećaj koji podrazumeva najmanje dve depresivne epizode koje razdvaja interval bez simptoma u trajanju od 2 meseca;
- 3) perzistentni depresivni poremećaj ili distimija, koja se najčešće javlja u dvadesetim ili ranim tridesetim i traje minimum dve godine; (Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2011).

1.1.2. Epidemiologija depresije

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO), procenjuje se da 3,8% svetske populacije boluje od depresije (Institute of Health Metrics and Evaluation, 2021.). Sa druge strane životna prevalenca ovog oboljenja je veća i iznosi oko 16 % (WHO, 2003), a ovaj procenat varira kroz različite studije i u različitim zemljama, počevši od Tajvana gde je životna prevalenca depresije 0,9%, do 17,1% u Sjedinjenim Američkim Državama (Tsuang i sar., 2011) pa čak i 19% koliko se procenjuje da je u Libanu (Lépine i sar., 2001).

Period od sredine adolescencije do sredine četrdesetih godina je najosetljiviji za pojavu prve depresivne epizode, a kod 40% depresivnih pacijenata prva

depresivna epizoda javlja se u njihovim dvadesetim (najčešće u 25. godini života) (Kessler i sar., 2005.; Moffitt i sar., 2009).

Dobro je poznat uticaj polnih razlika na nastanak depresije. Pojava depresije je oko 1.5 puta češća kod osoba ženskog pola (5.1%) u odnosu na muškarce (3.6%) (WHO, 2017). Ovakav odnos učestalosti depresije povezuje se sa polnim razlikama u podložnosti za nastanak ovog oboljenja (biološke i psihološke polne razlike) kao i različiti sredinski faktori. Socioekonomski status, urbano - ruralne razlike kao i bračni status, takođe predstavljaju faktore rizika za pojavu depresije (Horwath i sar., 2003; Ayuso-Mateos i sar., 2001).

Komorbiditet je česta karakteristika depresije, gde se ona javlja u kombinaciji sa drugim vrstama poremećaja - anksioznim poremećajem, alkoholizmom, poremećajem ličnosti, anoreksijom, bulimijom i hipohondrijom (Bostwick i Pankratz, 2000; Paykel, 2006). Takođe, depresija je učestalija i kod pacijenata sa somatskim oboljenjima. Više od trećine hospitalizovanih pacijenata ima blage do umerene simptome depresije, a pacijenti sa somatskim oboljenjima i depresijom imaju višu stopu mortaliteta i morbiditeta u odnosu na pacijente bez komorbidne depresije (Ishak i sar., 2017). Depresija predstavlja i rizik za pojavu psihosomatskih bolesti poput hipertenzije, dijabetesa, iritabilnog kolona i nekih oblika tumora (Dorfman, 1974).

Uzimajući u obzir primarnu onesposobljenost koju depresija uzrokuje, kao i sekundarnu kroz njenu komorbidnost sa hroničnim bolestima, ova bolest spada u jednu od "najskupljih" bolesti današnjice. Procenjuje se da se samo u Americi za tretman depresije (troškovi samog lečenja, novac usmeren ka prevenciji samoubistava, troškovi bolovanja i smanjene produktivnosti na radnom mestu uzrokovane depresijom) potroši 83.1 milijardi dolara godišnje (Greenberg i sar., 2003)

Prava veličina problema depresije može se sagledati kroz zbirni pokazatelj koji uzima u obzir izgubljene godine "zdravog" života zbog nesposobnosti uzrokovane depresijom tj. broj godina života sa nesposobnošću (engl. *Years Lost due to Disability*, YLD) (Murray et al., 2001). Depresija je 1990. godine činila 8,2% svih YLD u svetu a od 1990. do 2007. YLD koji se odnosio samo na depresiju povećan je za 33.4%, i tako depresiju doveo na treće mesto opterećenosti bolestima u svetu. Od

2007. do 2017. primećen je dalji porast YLD za depresiju za još 14.3 % (James et al., 2018). U našoj zemlji, po preseku iz 2000. godine, depresivni poremećaji su svrstani na četvrto mesto uzroka opterećenja društva bolestima (Janković i sar., 2006).

1.1.3. Životinjski modeli depresije

U kliničkim istraživanjima patofiziologije depresije, istraživanja se mogu vršiti na uzorcima periferne krvi i obdukcijским uzorcima mozga pacijenata sa depresijom. Nažalost, humani uzorci sa sobom nose mnoge faktore koji mogu uticati na validnost zaključaka studija poput: istorije korišćenih lekova pre smrti, starosti pacijenata, vreme uzimanja uzoraka nakon smrti kao i uslova života pacijenata. Sa druge strane, životinjski modeli depresije prevazilaze sve ove varijable i predstavljaju osnovni pristup u ispitivanju molekularnih mehanizama ključnih za ispoljavanje ove bolesti.

U početku je postojala sumnja vezano za upotrebu životinjskih modela depresije u istraživanjima jer pored toga što životinje i ljudi imaju različite biohemijske procese, njihove kognitivne i emocionalne sposobnosti se razlikuju. Međutim, tokom godina, životinjski modeli depresije unapređeni su tako da simuliraju neke aspekte depresivnog i kognitivnog ponašanja koje srećemo kod ljudi.

Animalni modeli depresije se uspostavljaju na osnovu 3 kriterijuma (1) pojavna validnost - kada životinje pokazuju fenotip bolesti sličan onome kod ljudi; (2) etiološka validnost - kada su patofiziološki procesi kod životinja slični procesima koji se smatraju odgovornim za nastanak bolesti kod ljudi; (3) farmakološka osetljivost (prediktivna vrednost) - kada životinje uspešno odgovaraju na antidepresivan tretman koji se pokazao efikasnim kod ljudi (Nestler i Hyman, 2010; Willner, 1990). Međutim mnogi životinjski modeli ne ispunjavaju sve ove kriterijume. Uglavnom se etiološka validnost u životinjskim modelima depresije razlikuje od stvarnog stanja stvari kod ljudi, s obzirom na različite spoljašnje i unutrašnje faktore koji mogu da utiču na nastanak depresije i činjenice da patofiziološke mehanizme depresije tek treba razjasniti. Međutim, uzimajući u obzir heterogenost simptoma depresije i njenu kompleksnu patofiziologiju treba istaći da

ne postoji idealan životinjski model koji zadovoljava sve kriterijume depresivnog fenotipa.

Dobro je poznata činjenica da negativni sredinski faktori poput izloženosti različitim stresorima mogu izazvati depresiju, pa se tako mnogi životinjski modeli depresije zasnivaju na uvođenju različitih vrsta stresora, bilo u periodu razvoja ili u odrasloj dobi životinja. Neki drugi životinjski modeli depresije direktno simuliraju neke od bioloških osnova depresije poput narušenog funkcionisanja hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne (eng. *hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) osovine ili stimulacije aktivnosti imunog sistema - neuroinflamatorni model depresije, o kome ćemo više govoriti u poglavlju 1.3.3.

Testiranje ponašanja kod glodara zasniva se na nekim karakteristikama ponašanja koje se mogu smatrati sličnim simptomima depresije kod ljudi, zbog toga kada opisujemo životinjske modele depresije koristimo izraz „ponašanje nalik depresivnom“. Simptomi depresije poput anhedonije, apatije, poremećaja sna, poremećaja apetita i težine, anksioznosti, socijalne izolacije i psihomotornih promena mogu se lako izmeriti kod životinja i to tačno definisanim testovima ponašanja. Međutim neke simptome depresije, koji su prisutni kod ljudi poput osećaja tuge, krivice, suicidalnih misli ne mogu se analizirati u životinjskom modelu.

Testovi koji se koriste za merenje ponašanja nalik depresivnom kod životinja su: (1) test prinudnog plivanja (eng. *forced swim test*, *FST*) i test kačenja za rep (eng. *tail suspension test*, *TST*), kojima se meri bespomoćnost kod životinja; (2) test sklonosti ka saharozi (eng. *sucrose preference test*, *SPT*) kojim se meri nivo anhedonije; (3) test uzdignutog plus lavirinta (eng. *elevated plus maze*, *EPM*) i test smanjenog interesovanja za hranu u novom okruženju (eng. *test novelty suppression of feeding*, *NSF*) kojim se meri nivo anksioznog ponašanja; (4) test kvašenja krzna slatkim rastvorom (eng. *splash-test*) kojim se meri nivo apatije kod životinja.

1.1.4. Etiologija i hipoteze depresije

Depresija je multifaktorski poremećaj na čiji nastanak utiče čitav niz bioloških i psihosocijalnih faktora. Kada govorimo o biološkim faktorima koji se nalaze u osnovi depresije govorimo o međusobno povezanim mehanizmima genetske predispozicije, strukturne i funkcionalne promene u mozgu, narušene

funkcije neurotransmiterskih i neuroendokrinih sistema (Saveanu i Nemeroff, 2012). Ono što poslednjih godina privlači sve veću pažnju jeste uloga imunog sistema u nastanku ove bolesti (Miller i Raison, 2016). Iako su dosadašnje studije dosta doprinele razumevanju biološke osnove depresije, ta saznanja još uvek nisu dovoljna da bi se unapredila dijagnostika i uspešnost lečenja ove bolesti.

1.1.4.1. Genetska komponenta depresije

Porodične studije i studije na blizancima pružile su dokaze o umešanosti genetičkih faktora u rizik za pojavu depresije. Meta-analiza studija na blizancima pokazala je da stopa naslednosti za depresiju iznosi 37%, dok porodične studije pokazuju da prvi rođaci pacijenata sa depresijom imaju tri puta veći rizik da obole od ovog poremećaja u odnosu na one koji u porodici nemaju depresivne rođake prvog stepena (Sullivan i sar., 2000).

Međutim, pouzdana identifikacija gena odgovornih za nastanak depresije čini se veoma teškom. Genetska istraživanja ukazuju na poligensku osnovu depresije kao i da važan uticaj na nastanak i tok ove bolesti imaju interakcije različitih gena i interakcije genskih varijanti i sredinskih faktora (Shadrina i sar., 2018). Studije asocijacije celokupnog genoma (eng. *Genome Wide Association Studies*, GWAS) bave se analizom polimorfizama kroz ceo genom radi pronalaženja genetičkih markera koji su povezani sa depresijom. Do 2018. godine ove studije identifikovale su mnoštvo genskih polimorfizama, ali sa malim pojedinačnim efektom na nastanak depresije. Međutim, nedavna istraživanja pokazuju uspeh u identifikaciji kombinacije rizičnih gena koji se mogu dovesti u vezu sa depresijom i koja će možda u budućnosti pružiti informacije o tačnoj genetskoj osnovi ove bolesti (*A Mega-Analysis of Genome-Wide Association Studies for Major Depressive Disorder Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium 1*, 2013; Howard i sar., 2018). Neki od tih gena su NEGR1 (eng. *Neural Growth Regulator 1*); gen za glutamatne metabotropne i kainatne receptore - GRM 5 (eng. *glutamate metabotropic receptor 5*) i GRIK3 (eng. *glutamate ionotropic receptor kainate type 3*); geni za transmembranske i kalcijum-vezujuće proteine - TMEM106B (eng. *transmembrane protein 106B*), CABP1 (eng. *calcium binding protein 1*) i gen za

dopaminski receptor tip 2, DRD2 (eng. *dopamine receptore D2*) (Howard i sar., 2018).

Identifikaciju gena za podložnost za nastanak depresije dodatno komplikuje i prisustvo epigenetičkih mehanizama (Nestler, 2014), gde sredinski faktori mogu da modulišu funkciju gena bez promene u samoj DNK sekvenci i upravo se ovi epigenetički mehanizmi intenzivno istražuju.

1.1.4.2. Glukokortikoidna hipoteza depresije

Psihosocijalna istraživanja 70-ih godina prošlog veka isticala su značajnost stresnih životnih događaja u nastanku depresije. Ova istraživanja pokazala su da su stresni događaji u detinjstvu značajan faktor za pojavu depresije kasnije u životu (Polansky, 1979). Nekoliko godina kasnije studije su pokazale da je kod depresivnih pacijenata prisutna narušena aktivnost HPA osovine (Carroll, 1982), kao osnovnog sistema odgovornog za neuroendokrinu adaptaciju organizma na stres. Ova otkrića pružila su osnovu za postavljanje glukokortikoidne hipoteze depresije po kojoj je narušena glukokortikoidna signalizacija i aktivnost HPA osovine uzrok nastanka ovog oboljenja.

Narušena homeostaza unutar HPA osovine je najpostojaniji klinički nalaz kod ljudi obolelih od depresije, a prisutan je kod 50% depresivnih pacijenata (Carroll, 1982; Schü i sar., 2009). Glukokortikoidnu hipotezu depresije podržavaju mnoge kliničke i prekliničke studije. Naime, studije na animalnim modelima depresije pokazuju da kod glodara hronični blagi stres izaziva niz simptoma nalik depresivnim, uključujući smanjen unos saharoze i želju za parenjem i čišćenjem, kao i smanjenu pokretljivost (Willner, 2005). Sa druge strane, humane studije na nekoliko nivoa beleže disfunkcionalnost HPA osovine, što za posledicu ima prenaplašen odgovor na stres koji je prisutan kod depresivnih pacijenata. Shodno tome, kod depresivnih pacijenata je primećena povećana sekrecija kortikotropnog-oslobađajućeg hormona (eng. *corticotrophin-releasing hormone, CRH*) iz paraventrikularnog nukleusa hipotalamusa, povećan volumen nadbubrežne žlezde, povećan bazalni nivo hormona stresa kortizola, narušena negativna povratna sprega unutar HPA osovine kao posledice rezistencije glukokortikoidnog receptora na kortizol (Pruessner i sar., 2003). Takođe, prisutna je i narušena inhibicija lučenja

kortizola u odgovoru na tretman deksametazonom koji je poznat kao snažan supresor aktivnosti HPA osovine (Pruessner i sar., 2003).

Narušena aktivnost HPA osovine javlja se i u drugim psihijatrijskim poremećajima poput posttraumatskog stresnog poremećaja (eng. *post-traumatic stress disorder*, PTSD)(Marshall i sar., 2002) i anoreksije (Putignano i sar., 2001). Takođe, primećeno je da rekurentnost depresije pozitivno korelira sa HPA disfunkcijom (Zobel i sar., 1999), što je usmerilo istraživanja u pravcu ispitivanja benefita lekova koji utišavaju preterano aktivnu HPA osovinu kod depresivnih pacijenata. Antagonisti glukokortikoidnog receptora (eng. *glucocorticoid receptor*, GR) i kortikotropin-oslobađajućeg hormonskog receptora tipa 1 (eng. *type 1 corticotropin-releasing factor receptor*, CRFR1) kao i inhibitori sinteze kortizola su se u nekoj meri pokazali kao uspešni u poboljšavanju depresivnih simptoma (Thomson i Craighead, 2008). I pored obećavajućih naučnih rezultata, lekovi koji se baziraju na manipulaciji aktivnosti HPA osovine se još uvek ne primenjuju u kliničkoj praksi za lečenje depresije.

1.1.4.3. Monoaminska hipoteza

Monoaminska hipoteza depresije je osnovna neurobiohemijska teorija ove bolesti po kojoj je depresija posledica disbalansa nivoa jednog ili više monoaminskih neurotransmitera serotonina, norepinefrina i dopamina u centralnom nervnom sistemu (eng. *central nervous system*, CNS) (Dean i Keshavan, 2017). Potvrda da je deficit monoamina jedan od osnovnih poremećaja koji se vezuje za nastanak depresije ogleda se i u činjenici da mehanizmi delovanja najveće grupe danas primenjivanih antidepresiva povećavaju dostupnost monoamina u mozgu, pokazujući efikasnost u ublažavanju simptoma depresije. Kod depresivnih pacijenata primećuje se smanjen nivo serotonina u mozgu, a antidepresivi poput tricikličnih antidepresiva (eng. *tricyclic antidepressant*, TCA), selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) i selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina i norepinefrina (eng. *serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors*, SNRI) povećavaju nivo serotonina u mozgu, što je praćeno ublažavanjem depresivnih simptoma (Dean i Keshavan, 2017). Takođe, antidepresivi koji smanjuju ekspresiju serotonin 1A receptora (eng. *5-HT1A*

receptors), kao negativnog regulatora serotoninskog otpuštanja, obezbeđuju povećanu dostupnost serotonina u mozgu što dovodi do antidepresivnog odgovora (Richelson, 2001). Slične studije ističu značajnost norepinefrina i dopamina u regulaciji raspoloženja. Lekovi koji inhibiraju preuzimanje norepinefrina poput selektivnih inhibitora norepinefrina (eng. *norepinephrine reuptake inhibitors*, NRI) kao i oni koji povećavaju otpuštanje norepinefrina poput leka mirtazapina, su se pokazali kao efikasni antidepresivi (Leonard, 2001). Takođe, antidepresiv bupropion povećava nivo dopamine u mozgu, ukazujući na ulogu dopaminskog sistema u regulaciji raspoloženja (Watt i Panksepp, 2009).

1.1.4.4. Glutamatna hipoteza depresije

Iako najveći broj danas primenjivanih antidepresiva deluje na povećanje raspoloživosti monoaminskih neurotransmitera na nivou sinapse, ovaj vid tretmana ima značajna ograničenja. Naime, pored zakasnelog antidepresivnog odgovora i rezistentnosti na monoaminsku terapiju, kod mnogih pacijenata primećuju se neželjeni efekti ovakvog vida lečenja, pa je u 20 % slučajeva neophodno prekinuti sa terapijom (Musazzi i sar., 2012). Zbog navedenih nedostataka postojeće terapije depresije, mnoga istraživanja se okreću ispitivanju uloge drugih neurotransmiterskih sistema u etiologiji depresije. Veliki broj nedavnih studija ističe značajnost glutamatne neurotransmisije kao glavnog ekscitatornog neurotransmiterskog sistema u mozgu, u patofiziologiji i tretmanu neuropsihijatrijskih poremećaja (Sanacora i sar., 2012).

Interesantno je da se glutamat u CNS nalazi u značajno većoj koncentraciji u odnosu na monoamine. Pokazano je da 80% neurona neokorteksa čine ekscitatorni glutamatni neuroni (Sanacora i sar., 2012). Važno je napomenuti i da je homeostatska ravnoteža između glutamatne, ekscitatorne neurotransmisije i glavne inhibitorne neurotransmisije posredovane GABA (eng. *γ-aminobutyric acid*, GABA) esencijalna za normalno funkcionisanje CNS (Schoepp, 2001). S obzirom na široku rasprostranjenost glutamata i njegovu ulogu u osnovnim funkcijama CNS, mnoga istraživanja skreću fokus sa monoaminskog na glutamatni neurotransmiterski sistem u cilju boljeg razumevanja patofiziologije depresije i razvoja efikasnijih terapijika u lečenju ove bolesti.

O glutamatnoj hipotezi depresije govori se od 90-ih godina prošlog veka kada su se pojavili prvi podaci o antidepresivnim svojstvima antagonista jonotropnog glutamatnog N-metil-D-aspartatnog (NMDA) receptora, a mnoge postmortem studije neurooslikavanja pružaju dokaze o umešanosti glutamata u patofiziologiji depresije. Promene u nivou glutamata primećene su u plazmi (Kim i sar., 1982), serumu (Mitani i sar., 2006), cerebrospinalnoj tečnosti (Levine i sar., 2000) i moždanom tkivu (Francis i sar., 1989) osoba sa psihijatrijskim poremećajima i poremećajima raspoloženja, kao i kod žrtava suicida (Holemans i sar., 1993; Nowak i sar., 1995). Takođe, smanjena ekspresija transportera za glutamat je primećena u animalnom modelu depresije (Zink i sar., 2010).

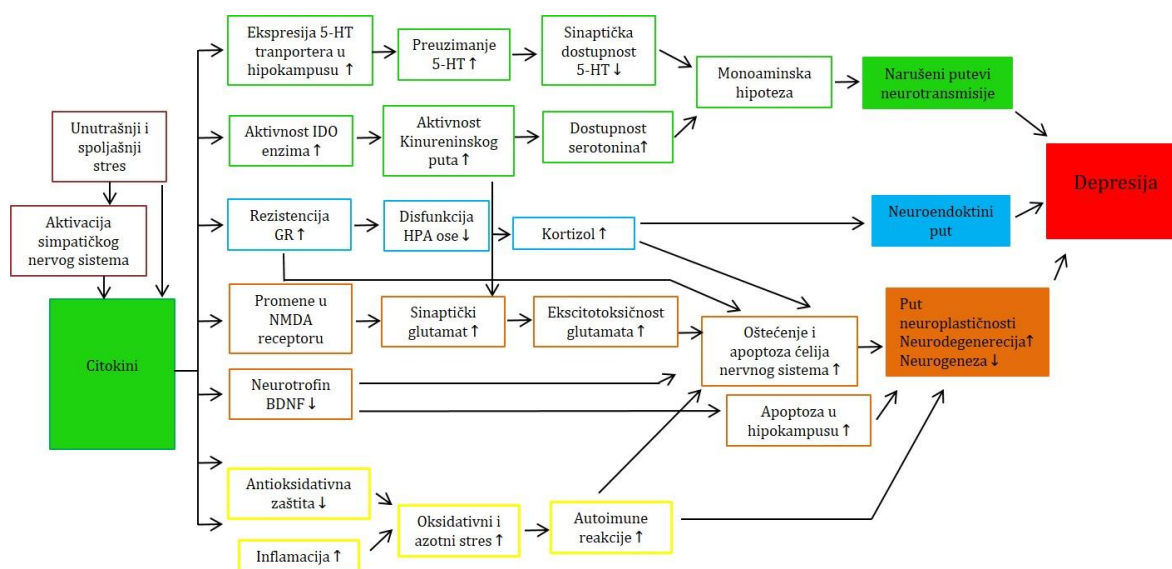
Pored narušenog nivoa glutamata u CNS, studije naglašavaju i umešanost narušene signalizacije glutamatnih receptora u patofiziologiji depresije. Nekoliko postmortem studija je pokazalo izmenjene nivoe kako iRNK tako i nivoe proteina subjedinica NMDA receptora i metabotropnih glutamatnih receptora (eng. *metabotropic glutamate receptor*, mGluR) u određenim moždanim regionima depresivnih pacijenata (Adell, 2020; Deschwanden i sar., 2011)

Sve ove studije podržavaju glutamatnu hipotezu depresije po kojoj nakupljanje glutamata, usled narušenih mehanizama njegovog otpuštanja, preuzimanja i metabolizma, dovodi do ekscitotoksičnosti u mozgu (Musazzi i sar., 2012). Ekscitotoksičnost izazvana viškom glutamata može dovesti do strukturnih i funkcionalnih promena sinapsi u moždanim regionima zaduženih za regulaciju ponašanja i raspoloženja, što za posledicu može imati nastanak depresije.

1.1.4.5. Citokinska hipoteza depresije

S obzirom da je uloga neuroinflamacije u patofiziologiji depresije tema ove doktorske disertacije detaljan osvrt na efekte neuroinflamacije na različite sisteme u mozgu koji za posledicu mogu imati pojavu depresije, biće opisan u poglavlju 1.3. U nastavku ovog odeljka biće izdvojena neka zapažanja na osnovu kojih se mogu dovesti u vezu depresija i sistemska inflamacija.

Studije pokazuju da su kod pacijenata sa depresijom prisutne sve karakteristike povećanog inflamatornog odgovora, uključujući povećanu ekspresiju proinflamatornih citokina - interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), faktor nekroze tumora-alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) i njihovih receptora, Toll-like receptor 3 i 4 (TLR3 i TLR4), kao i hemokina i solubilnih adhezivnih molekula i to kako u krvi tako i u cerebrospinalnoj tečnosti (eng. *cerebrospinal fluid*, CSF) (Maes, 1999; Miller i sar., 2009). Studije meta-analize pokazale su da su povišeni nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α i C- reaktivnog proteina (eng. *C-reactive protein*, CRP) u krvi najpouzdaniji markeri inflamacije koji se povezuju sa pojavom depresije (Miller i sar., 2009). Takođe, studije pokazuju da povećana koncentracija inflamatornih medijatora u krvnoj plazmi korelira sa težinom depresivnih simptoma (Miller i sar., 2002; Thomas i sar., 2005), kao i sa rezistencijom na antidepressivni tretman (Qidwai i Khan, 2011.; Younger i sar., 2003).



Slika 1. Šematski prikaz puteva neuroinflamacije u patogenezi depresije. Citokini čija je produkcija stimulisana različitim vrstama stresora i aktivacijom simpatičkog nervnog sistema mogu da naruše funkcionisanje neurotransmiterskih sistema u mozgu, neuroendokrinog puta i puteva neuroplastičnosti. Legenda: 5-HT, serotonin; BDNF, neurotrofni moždani faktor; GR, glukokortikoidni receptor; HPA, hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna; IDO, indolamin -2.3-dioksigenaza; NMDA, N-metil-D-aspartat. *Slika preuzeta i prilagođena iz Jeon i sar. (2016).*

Unutar mozga, citokini mogu da interaguju sa različitim sistemima i doprinesu ispoljavanju depresije. Citokini mogu da naruše funkcionisanje neurotransmiterskih sistema u mozgu, neuroendokrinog puta u odgovoru na stres i puteve neuroplastičnosti (Jeon i Kim, 2016) (Slika 1). Svi ovi nalazi su doveli do

formiranja citokinske hipoteze depresije, prema kojoj je depresija posledica povišene produkcije proinflamatornih citokina izazvane nekom vrstom stresora.

1.2. Neuroplastičnost mozga i depresija

Neuroplastičnost se može definisati kao sposobnost neurona i ostalih ćelija nervnog sistema da se modifikuju i adaptiraju, strukturno i funkcionalno, tokom života, a u odgovoru na spoljašnje i unutrašnje stimulse. Naša sposobost za obradu informacija, učenje i ponašanje zavise upravo od procesa neuroplastičnosti (Wilbrecht i sar., 2010). Neuroplastičnost obuhvata više mehanizama adaptacije mozga na stimulse poput rađanja novih neurona, migracije neurona, granjanje dendrita, sinaptogeneze i modulacije zrelih sinapsi (Wainwright i Galea, 2013). Svaki ovaj narušen oblik neuroplastičnosti pojedinačno, ili više njih zajedno, mogu da doprinesu razvoju i toku bolesti. O različitim oblicima neuroplastičnosti i njihovom doprinosu etiologiji depresije govorićemo u narednom tekstu.

1.2.1. Neurotrofni faktori

Neurotrofni faktori pripadaju porodici faktora rasta, a okarakterisani su kao molekuli koji regulišu rast neurona i njihovu diferencijaciju tokom razvoja (Huang i Reichardt, 2001). Neurotrofni faktori, sa svojim pozitivnim efektima, uključeni su u kontrolu gotovo svih oblika neuroplastičnosti, kako strukturne tako i funkcionalne (Reichardt, 2006). Neurotrofna hipoteza depresije govori u prilog tome da smanjena neurotrofna podrška u određenim delovima mozga, prvenstveno u hipokampusu, dovodi do atrofije neurona, smanjene neurogeneze i gubitka ćelija glije što dovodi do pojave depresije (Duman i Monteggia, 2006a). Suprotno prethodnom, povećanje produkcije ovih faktora proizvodi antidepresivan odgovor (Duman i sar., 1997).

Istraživanja vezana za ovu hipotezu fokusirana su uglavnom na neurotrofni moždani faktor BDNF (eng. *brain-derived neurotrophic factor*). Prekliničke studije pokazuju da akutni i hronični stres smanjuje nivo BDNF kako u korteksu, tako i u hipokampusu (Duman i Monteggia, 2006b; Molteni i sar., 2009). Humane postmortem studije takođe prijavljuju smanjen nivo BDNF i njegovog receptora tropomiozinske kinaze B (eng. *Tropomyosin Related Kinase B*, TrkB) kod depresivnih

pacijenata (Guilloux i sar., 2012; Thompson, 2012). Ovo smanjenje nivoa BDNF proteina i TrkB receptora korelira sa strukturnim promenama u mozgu i delom može biti odgovorno za smanjen volumena prefrontalnog korteksa (eng. *prefrontal cortex*, PFC) (Castrén, 2004) i hipokampusa (Castré & Rantamä, 2010). Takođe, nekoliko studija je pokazalo smanjen BDNF nivo u serumu depresivnih pacijenata, kao i to da ozbiljnost depresivnih simptoma negativno korelira sa nivoom BDNF u serumu (Aydemir i sar., 2005; Shimizu i sar., 2003).

Sa druge strane studije pokazuju da u životinjskim modelima depresije, hronični tretmani antidepresivima gotovo svih klasa povećavaju ekspresiju BDNF proteina uglavnom u hipokampusu (Nibuya i sar., 1995). Takođe, u postmortem uzorcima mozga depresivnih pacijenata, BDNF nivo je povišen u hipokampusu pacijenata koji su uzimali antidepresive u odnosu na one koji nisu bili pod antidepresivnom terapijom (Chen i sar., 2001).

Međutim, neurotrofna hipoteza ima nekoliko ograničenja. Iako većina studija prijavljuje smanjen BDNF nivo u depresiji, neke studije su pokazale da u modelima depresije akutni i hronični stres povećava iRNK i proteinski nivo BDNF (Marmigè i sar., 2003; Uysal i sar., 2012). Neki autori ovo objašnjavaju tako što povećan nivo BDNF predstavlja protektivni mehanizam koji kompenzuje štetne efekte koje stres ostvaruje na nivou hipokampusa. Bitno je napomenuti i regionalnu specifičnost dejstva BDNF. Naime prekliničke studije pokazuju da dejstvo BDNF u okviru ventralnog tegmentalnog područja/nucleus accumbens (VTA-NAc) dovodi do pojave fenotipa nalik depresivnom (Krishnan i sar., 2007; Nestler i Carlezon, 2006), dok BDNF svoje antidepresivne efekte ostvaruje delujući na nivou PFC i hipokampusa (Duman i Monteggia, 2006a; Shirayama i sar., 2002).

1.2.2. Neuralni adhezivni molekuli

Neuralni adhezivni molekuli (eng. *neural cell adhesion molecules*, NCAM) su tipično eksprimirani na površini ćelija nervnog sistema gde učestvuju u njihovom međusobnom povezivanju ili povezivanju ćelija nervnog sistema sa ekstracelularnim matriksom. Kao molekul sa adhezivnim svojstvima, NCAM je bitan za održavanje stabilne veze između neurona i njihovih sinapsi. U CNS, NCAM se usled

alternativnog splajsovanja, nalazi u tri izoforme od 120, 140 i 180 kDa (Dalva i sar., 2007).

Suprotno adhezivnim svojstvima NCAM, anti-adhezivna svojstva ovog molekula postižu se kada se negativno naelektrisan lanac polisijalinske kiseline (eng. *Poly-alpha2,8-sialic acid*, PSA) veže za NCAM. Povećana polisijalinizacija NCAM pospešuje remodelovanje nervnih puteva, sinaptičko granjanje, migraciju nervnih ćelija, sinaptičku reorganizaciju, sinaptogenezu, rast aksona i njihovo usnopljavanje (Wędzony i sar., 2013). Sa druge strane smanjena polisijalinizacija NCAM proteina dovodi do rigidifikacije neuralne morfologije što onemogućava dinamičke promene u sinaptičkoj strukturi (El Maarouf i Rutishauser, 2010).

Prekliničke studije pokazuju ulogu NCAM/PSA-NCAM u patofiziologiji depresije. Naime, pokazano je da hronični blagi stres smanjuje ekspresiju kako samog NCAM proteina (Bessa i sar., 2009), tako i stepen njegove polisijalinizacije (Pham i sar., 2003; Sandi i sar., 2001) u hipokampusu, pri čemu ovi efekti zavise od vrste stresora (Djordjevic i sar., 2012a). Stresom izazvane promene u nivou PSA-NCAM javljaju se i u drugim regionima mozga bitnim za regulaciju ponašanja poput amigdala (Gilabert-Juan i sar., 2011) i u PFC (Gilabert-Juan i sar., 2013). Takođe, u studijama na postmortem uzorcima depresivnih pacijenata uočeno je smanjenje nivoa PSA-NCAM u amigdalama (Maheu i sar., 2013; Maheu i sar., 2013), dok ove promene nisu primećene u PFC (Gilabert-Juan i sar., 2012).

Studije takođe pokazuju da antidepresivi, u modelima depresije izazvane stresom, sprečavaju povećanje ekspresije NCAM u PFC i hipokampusu (Djordjevic i sar., 2012a, 2012b), kao i smanjenu ekspresiju PSA-NCAM u ventralnom hipokampusu (Pompili i sar., 2013).

1.2.3. Sinaptička plastičnost i sinaptogeneza

Kao glavni nosilac neuroplastičnosti na ćelijskom nivou, sinaptička plastičnost omogućava efikasnu transmisiju signala unutar CNS menjajući jačinu postojećih sinapsi na osnovu iskustva sa nedavno aktiviranih sinapsi (Citri i Malenka, 2008). Ovakva modulacija jačine sinaptičkih veza zavisna od aktivnosti, javlja se u dve osnovne forme, dugotrajna potencijacija (eng. *long-term potentiation*,

LTP) i dugotrajna depresija (eng. *long-term depression*, LTD) i predstavlja jačanje ili slabljenje sinaptičkih veza.

Međutim, adekvatan prenos signala unutar neuronskih mreža ne može se oslanjati isključivo na jačanju ili slabljenju postojećih sinapsi jer njihova plastičnost može dostići zasićenost. Sinaptogeneza kao reverzibilan proces dodatno može da doprinese efikasnosti neurotransmisije.

Različiti mehanizmi su uključeni u kordinaciju signala sa aktivnih sinapsi i usmeravanja sinaptičke plastičnosti i sinaptogeneze. Jedan od ovih mehanizama je mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) signalni put. Ovaj signalni put funkcioniše kao neuralni senzor jer njegova aktivnost zavisi od signala sa aktivnih sinapsi koje on prepoznaje i u skladu sa njima odgovara potrebama ćelije za novim sinaptičkim proteinima i sinaptogenezom (Yang i sar., 2008). Naime, mTOR signalni put je uključen u kontrolu lokalne sinteze proteina (sinteza sinaptičkih proteina na nivou sinapsi) pa aktivnost ovog puta omogućava translaciju novih sinaptičkih proteina čime se pruža brz odgovor za dalju modifikaciju postojećih sinapsi i formiranje i sazrevanje novih (Jiang i Schuman, 2002). O ulozi mTOR signalnog puta u patofiziologiji depresije govorićemo više u poglavljima 1.4.2.2. i 1.5.

Sinaptička plastičnost i sinaptogeneza imaju ključnu ulogu u kratkotrajnom i dugotrajnom pamćenju i kontroli raspoloženja i emocija (Di Cristo i Chattopadhyaya, 2020). Duman i saradnici postavili su sinaptogenu hipotezu depresije po kojoj se depresija dovodi u vezu sa narušenim homeostatskim mehanizmima koji kontrolišu sinaptičku plastičnost, čime dolazi do destabilizacije i gubitka sinapsi u nervnim kolima koje kontrolišu raspoloženje i emocije (Duman i Aghajanian, 2012a).

Zaista, kliničke i prekliničke studije depresije pokazuju sinaptički deficit u različitim moždanim regionima. Kod životinja sa ponašanjem nalik depresivnom primećeno je smanjenje kompleksnosti granjanja dendrita i broja dendritskih trnića u hipokampusu (Magariños i sar., 1996; Watanabe i sar., 1992) i u PFC (Cook i Wellman, 2004; Radley i sar., 2004) usled izlaganja životinja hroničnom stresu. Gubitak dendritskih trnića korelira sa smanjenjem nivoa ključnih sinaptičkih proteina poput PSD-95 (eng. *postsynaptic density protein 95*) proteina, GluA1 subjedinice AMPA (eng. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)

receptora i presinaptičkog proteina sinapsina (eng. *synapsi I*) (Li i sar., 2011). Kliničke studije beleže smanjenje veličine neurona u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu (eng. *dorsolateral prefrontal cortex*, dlPFC) (Cotter i sar., 2002), orbitofrontalnom korteksu (Cotter i sar., 2005; Rajkowska i sar., 2005) i hipokampusu (Stockmeier i sar., 2004) depresivnih pacijenata. A studije elektronske mikroskopije su pokazale smanjen broj sinapsi u dlPFC kod depresivnih pacijenata, čime se direktno potvrđuje izmenjena struktura sinapsi (Kang i sar., 2012).

Terapija antidepresivima može da spreči ili čak preokrene ovaj sinaptički deficit. Tretman ketaminom, antagonistom NMDA receptora, dovodi do brzih antidepresivnih efekata kod životinja u depresivnom modelu hroničnog nepredvidivog stresa, koji koreliraju sa povećanjem broja dendritskih trnića i povećanjem nivoa sinaptičkih proteina (Li i sar., 2011).

1.3. Neuroinflamacija i depresija

Veza između inflamacije i depresije je neosporna. Pacijenti sa depresijom pokazuju povišen nivo proinflamatornih medijatora tipičnih kako za hroničnu inflamaciju (poput citokina TNF- α , IL-1- β i IL-6) tako i za akutnu fazu inflamacije (poput CRP) (Miller i Raison, 2016). Ove promene su uočene kako u krvi tako i CSF pacijenata sa depresijom. Takođe, studije su pokazale povećane nivoe iRNK za TNF- α , IL 1- β i IL-6, kao i povišen nivo interferona α (INF- α) u perifernim monocitima depresivnih pacijenata (Tsao i sar., 2006). Pojačan inflamatorni odgovor primećen je i u postmortem uzorcima mozгова depresivnih pacijenata (Miller i Raison, 2016).

Vežu između inflamacije i depresije podržavaju i podaci koji govore da tretman životinja inflamatornim citokinima kao što je IFN- α (Bonaccorso i sar., 2002) ili stimulatorima inflamatornog odgovora, poput lipopolisaharida (eng. *lipopolisacharide*, LPS) - endotoksina iz zida bakterije *E. Coli*, dovodi do pojave depresivnih simptoma (Grigoleit i sar., 2011). Takođe, humane studije beleže da više od 50% pacijenata sa reumatoidnim artritismom ili sistemskim eritemskim lupusom ima simptome depresije (Capuron i Miller, 2011). Pored toga, nedavna meta-analiza koja je obuhvatila studije anti-citokinskih tretmana imunskih poremećaja je pokazala da ovi lekovi dovode do značajnog poboljšanja simptoma depresije

pogotovo kod pacijenata sa autoimunim i inflamatornim bolestima (Kappelmann i sar., 2018; Raison i sar., 2013).

Iako svi ovi podaci pružaju dokaze o povezanosti inflamacije i depresije, povećan inflamatorni odgovor javlja se kod svega 25-50% depresivnih pacijenata, u zavisnosti od veličine uzorka korišćenog u studijama (Osimo i sar., 2019; Raison i sar., 2013). Uzimajući u obzir heterogenu patofiziologiju depresije, možemo zaključiti da inflamacija ne dovodi nužno do pojave depresije, već može da doprinese pojavi ovog oboljenja određenoj podgrupi pacijenata.

Povećana produkcija citokina povezana je sa stepenom težine depresivnih simptoma (Thomas i sar., 2005), a povećan inflamatorni odgovor je karakterističan i za pacijente sa depresijom koji pokazuju otpornost na tretman klasičnim antidepresivima (Cattaneo i sar., 2013; Stelzhammer i sar., 2014). Naime, pokazano je da 45% pacijenata koji ne odgovaraju na tretman antidepresivima ima CRP>3 mg/l, što ukazuje na povećanu inflamaciju (Pearson i sar., 2003). Pored toga što nepovoljno utiču na monoaminsku neurotransmisiju, citokini imaju veliki uticaj i na glutamatnu neurotransmisiju, endokrini sistem i neuroplastičnost. Većina antidepresiva koji su trenutno u upotrebi deluje tako što povećavaju dostupnost monoamina na nivou sinapse. Ipak, kako ovakvi antidepresivi ne ostvaruju pozitivan efekat na druge sisteme unutar mozga čiju funkciju citokini narušavaju (poput glutamatne neurotransmisije) ne iznenađuje veza između povećane inflamacije i TRD.

1.3.1. Neuroinflamacija - od periferije do mozga

Citokini koji se sintetišu na periferiji su relativno veliki molekuli koji ne prolaze slobodno kroz krvno-moždanu barijeru. Međutim, podaci ukazuju na to da citokini ipak mogu da dopru do mozga, i to na nekoliko načina. Putevi prolaska citokina od periferije do mozga uključuju prolazak kroz propusne regione krvno-moždane barijere na nivou cirkumventrikularnih organa i horoidnog pleksusa, zatim aktivni transport preko krvno-moždane barijere kao i stimulaciju perifernih aferentnih nerava, poput nerva vagusa, za koji je pokazano da stimuliše produkciju citokina u CNS (Capuron i Miller, 2011). Na ovaj način, citokini prenose informacije o perifernom imunološkom statusu tela do mozga. Kada dopru do mozga, citokini i

ostali inflamatorni medijatori vezuju se za svoje receptore, i to prvenstveno na mikrogliji kao imunskim ćelijama mozga, ali i na astrocitima i samim neuronima, čime se aktivira imunski odgovor unutar CNS i promoviše dodatno lučenje citokina iz ovih ćelija (Yirmiya i sar., 2015). Pored citokina, imunski odgovor u mozgu mogu da aktiviraju i drugi inflamatorni medijatori čije je lučenje povećano u različitim patološkim stanjima. Ovde spadaju markeri oksidativnog stresa kao što su reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS), zatim azot oksid (eng. *nitric oxide*, NO), prostaglandini (eng. *prostaglandins*, PGs) i proteini toplotnog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSPs) (Haroon i sar., 2017).

Takođe, izloženost stresoru može direktno biti odgovorna za pojačanu inflamaciju i aktivaciju mikroglije u CNS. Iako su glukokortikoidi u normalnom fiziološkom stanju organizma immunosupresori, oni u posebnim uslovima postaju imunostimulatori, pogotovo unutar mozga (Sorrells i Sapolsky, 2007). Naime, usled izloženosti stresoru, glukokortikoidi promovišu aktivaciju mikroglije u pripremi mozga za kasnije imunske izazove poput trauma ili infekcija koje mogu nastati u „*borba ili beg*“ reakciji (Franki i sar., 2015).

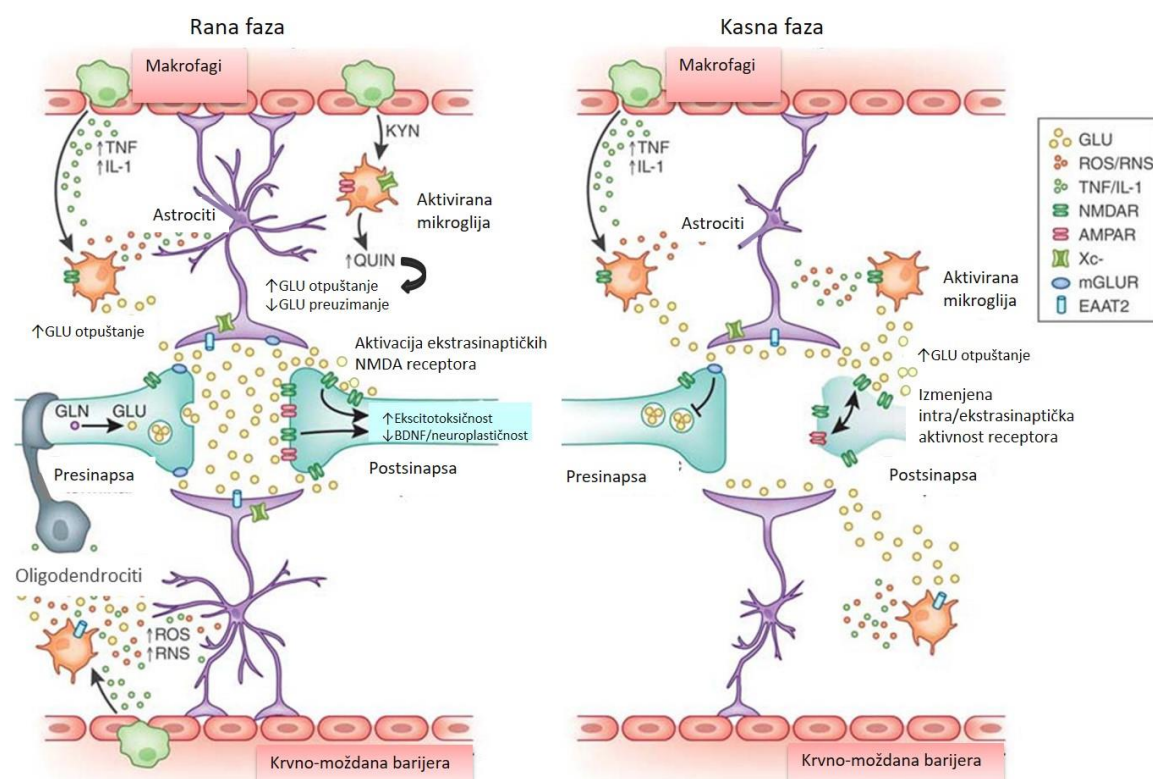
Mikroglija se može aktivirati i usled povećane aktivnosti neurona izazvane stresom. Ova činjenica ne iznenađuje s obzirom da se na ćelijama mikroglije nalaze receptori za neurotransmitere povezane sa stresom, poput glutamata i norepinefrina (Pocock i Kettenmann, 2007).

1.3.2. Komponente neuroinflamatornog odgovora

1.3.2.1. Inflamacija i glutamatna neurotransmisija

Pored uticaja na monoaminsku neurotransmisiju, povećana koncentracija citokina dovodi do promena i u glutamatnoj neurotransmisiji (Haroon i sar., 2017) (Slika 2). Naime, usled povećane koncentracije proinflamatornih citokina, u mikrogliji dolazi do aktivacije enzima indolamin 2,3-dioksigenaze (eng. *indoleamine-2,3-dioxygenase*, IDO) (O'connor i sar., 2009). Ovaj enzim učestvuje u metabolizmu triptofana (aminokiseline koja predstavlja prekursor za sintezu serotonina) u kinurenin (eng. *kynurenine*, KYN), i dalje u neuroaktivne metabolite - kinurensku kiselinu (eng. *kynurenic acid*, KA) i hinolinsku kiselinu (eng. *quinolinic*

acid, QUIN) (Huang i sar., 2020). QUIN je veoma značajna jer kao agonista NMDA receptora predstavlja vezu između neuroinflamacije i promena u glutamatnoj neurotransmisiji (Schwarcz i Pellicciari, 2002; Stone, 2000). Pokazano je i da QUIN podstiče oksidativni stres u ćeliji, pozitivno utičući na lučenje ROS i NOS (eng. *nitric oxide synthases*) (McNally i sar., 2008)



Slika 2. Efekti inflamacije na glutamatnu neurotransmisiju i očuvanost sinapsi unutar mozga u ranoj i kasnoj fazi inflamacije. Objašnjenje pogledati u tekstu. Slika preuzeta i prilagođena na osnovu Haroon (2017).

Pored uticaja inflamacije na triptofan-kinurenin metabolički put i dominantnu proizvodnju QUIN kiseline, citokini utiču i na povećanu dostupnost samog glutamata na nivou sinapse. Studije pokazuju da citokini, pored toga što pozitivno utiču na otpuštanje glutamata iz astrocita, negativno utiču na njegovo ponovno preuzimanje od strane istih (Tavares i sar., 2002). Dakle, citokinima-indukovano povećanje QUIN kiseline kao agoniste NMDA receptora, zatim povećanje koncentracije medijatora oksidativnog stresa i povećana koncentracija samog glutamata na nivou sinapse mogu da dovedu do preterane aktivnosti NMDA receptora. Povećana aktivnost NMDA receptora, a pogotovo ekstrasinaptičkih NMDA receptora može dovesti do ekscitotoksičnosti, smanjenja neurotrofičke

podrške i narušene sinaptičke plastičnosti, što u krajnjem slučaju može dovesti do atrofije neurona (Jhamandas i sar., 2000).

1.3.2.2. Inflamacija i neuroplastičnost

U fiziološkim uslovima inflamatorni medijatori i imunske ćelije imaju značajnu ulogu u regulaciji neuroplastičnosti, uključujući rast i grananje dendrita i aksona, sinaptogenezu i oblikovanje postojećih sinapsi, kao i neurogenezu i apoptozu (Yirmiia i Goshen, 2011). Međutim, u patološkim stanjima, povišen nivo inflamatornih molekula negativno utiče na gotovo sve oblike neuroplastičnosti.

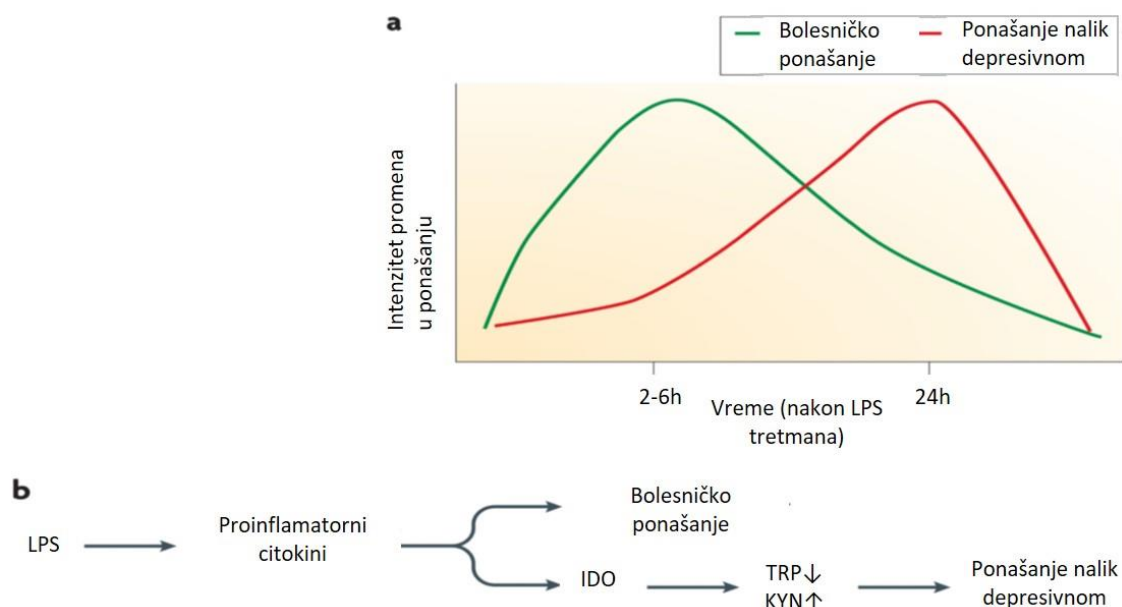
Studije su pokazale da povećan nivo inflamacije negativno utiče na indukciju i održavanje LTP u hipokampusu, jednog od glavnih mehanizama sinaptičke plastičnosti (Goshen i Yirmiia, 2007; Lynch, 2002). U prekliničkim istraživanjima depresije, nakon tretiranja životinja imunostimulatorom, primećeno je smanjenje neurogeneze i sinaptička disfunkcija (Goshen i Yirmiia, 2007; Järlestedt i sar., 2013). Takođe, hronični tretman sa LPS smanjuje ekspresiju sinaptičkih proteina poput PSD-95, sinaptofizina i SNAP-25 proteina (eng. synaptosomal associated protein 25) u hipokampusu miševa (Badshah i sar., 2016; Duman i Li, 2012b.; Xing i sar., 2011), što ukazuje na negativan uticaj inflamacije na proces sinaptogenezu.

Većina studija pokazuje negativan uticaj proinflamatornih citokina ili imunostimulatora na neurotrofične faktore, prvenstveno na BDNF. LPS tretman može značajno da smanji nivo BDNF u hipokampusu i korteksu životinja (Frühauf-Perez i sar., 2018). Takođe, pokazano je i da proinflamatorni citokini utiču na fosforilaciju TrkB receptora, i na taj način remete aktivnost BDNF signalnog puta (Cortese i sar., 2011). Pored izmenjene fosforilacije TrkB receptora, pokazano je i da tretman sa poly I:C (eng. *Polyinosinic:polycytidylic acid*), stimulatorom viralne infekcije, smanjuje ekspresiju TrkB receptora i samog BDNF proteina u hipokampusu i u PFC pacova (Gibney i sar., 2013), što može pozitivno uticati na razvoj ponašanja nalik depresivnom i nalik anksioznom.

1.3.3. Neuroinflamatorni model depresije

LPS je endotoksin iz zida bakterije *E. coli*. a jedna i.p. doza ovog endotoksina, koncentracije od 0,83 mg/kg, koristi se za kreiranje neuroinflamatornog modela depresije kod životinja (O'connor i sar., 2009; Walker i sar., 2013). Nekoliko sati nakon LPS administracije, dolazi do povećane ekspresije proinflamatornih citokina, kako na periferiji tako i u mozgu, a životinje razvijaju takozvano „bolesničko ponašanje“ (eng. *sickness behavior*) (Dantzer i sar., 2010) (Slika 3a). Ovo ponašanje se manifestuje kroz smanjenje težine, smanjenje unosa hrane i vode, smanjenje motornih aktivnosti životinja i tipično prestaje oko 24. sata nakon tretmana, u vreme kada se kod životinja razvija ponašanja nalik depresivnom (Dantzer i sar., 2010). Studije su pokazale da 24 h nakon LPS injekcije, kada se motorna aktivnost i apetit životinja vraća u normalu, one pokazuju povećanu imobilnost u FST i TST testu i smanjenu sklonost ka saharozi merenu SPT testom, što ukazuje na fenotip nalik depresivnom (O'connor i sar., 2009; Walker i sar., 2013). Za inflamatorni model depresije bitno je isključiti postojanje bolesničkog ponašanja u vreme kada se različitim testovima ponašanja procenjuje prisustvo ponašanja nalik depresivnom kod životinja. Naime, ako u vreme sprovođenja testova ponašanja, životinje i dalje imaju smanjenu motornu aktivnost (usled akutne infekcije izazvane LPS administracijom) kao odliku bolesničkog ponašanja ovo fizičko ograničenje može maskirati rezultate testova za evaluaciju depresivnog ponašanja životinje.

Ako pogledamo molekularne parametre (Slika 3b), smatra se da se kod životinja ponašanje nalik depresivnom razvija paralelno sa povećanom koncentracijom proinflamatornih citokina i povećanom aktivnošćuIDO enzima. Povećana aktivnost ovog enzima je ono što razdvaja bolesničko od depresivnog ponašanja kod životinja tretiranih sa LPS. Zaista, studije su pokazale da inhibitoriIDO enzimske aktivnosti sprečavaju razvoj simptoma nalik depresivnim bez uticaja na povišene parametre inflamaciju ili parametre bolesničkog ponašanja kod životinja (O'connor i sar., 2009).



Slika 3. Šematski prikaz vremenske linije lipopolisaharidom indukovano modela depresije. Periferna LPS administracija izaziva bolesničko ponašanje koje dostiže vrhunac 2 - 6 h nakon LPS administracije i postepeno nestaje (a). Ponašanje nalik depresivnom se smanjuje sa bolesničkim ponašanjem i svoj vrhunac dostiže 24 h nakon LPS administracije. Ispoljavanje bolesničkog ponašanja zahteva lučenje proinflamatornih citokina kao odgovor na LPS tretman. Citokini takođe podstiču aktivnost IDO enzima koji vrhunac aktivnosti dostiže 24 h nakon LPS tretmana što dovodi do smanjenja nivoa triptofana (TRP) i povećane produkcije kinurenina (KYN) i drugih njegovih metabolita, što se smatra kritičnim mehanizmom za ispoljavanje ponašanja nalik depresivnom. **Slika preuzeta i prilagođena na osnovu Dantzer i sar. (2008).**

1.4. NMDA receptor - jonotropni glutamatni receptor

Jonotropni glutamatni receptori predstavljaju tetramere čije subjedinice grade jonski kanal za prolazak katjona, kalcijuma i natrijuma, iz vanćelijskog prostora u citosol. Postoje tri klase jonotropnih glutamatnih receptora: NMDA receptori, AMPA receptori i kainatni (eng. *kainic acid*, KA) receptori (Traynelis i sar., 2010). Aktivnost AMPA i KA receptora zavisi od vezivanja glutamata za njihove subjedinice koje su slične građe i farmakoloških svojstava. Subjedinice AMPA receptora su GluA1, GluA2, GluA3, GluA4, dok se KA receptori sastoje od subjedinica GluR5, GluR6, GluR7, kao i KA1 i KA2 subjedinica (Traynelis i sar., 2010). Za razliku od ova dva jonotropna glutamatna receptora, NMDA receptor ima nešto složeniju strukturu i funkciju, a u narednom poglavlju posebna pažnja posvećena je upravo ovom tipu receptora.

1.4.1. Strukturna i funkcionalna karakterizacija NMDA receptora

NMDA receptor je heterotetramer koji se sastoji od tri grupe subjedinica: GluN1, GluN2 i GluN3 (Szewczyk i sar., 2012), a koje se dalje mogu podeliti na GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A i GluN3B subjedinice (Baez i sar., 2018). Funkcionalni NMDA receptor se obavezno sastoji od dve GluN1 subjedinice, a pored njih u sastav receptora ulaze i dve GluN2A subjedinice ili kombinacija po jedne GluN2A i GluN2B subjedinice (Traynelis i sar., 2010; Ulbrich i Isacoff, 2008). Bitno je napomenuti da sastav subjedinica NMDA receptora određuje njegova biofizička i farmakološka svojstva, kao i kontrolu određenih signalnih puteva nizvodno od receptora (Zhu i Paoletti, 2015).

U stanju mirovanja jonski kanal NMDA receptora blokiran je vanćelijskim jonima Mg^{2+} (Mayer i sar., 1984). Aktivacija receptora zavisi od dva istovremena signala: postsinaptičke depolarizacije ćelijske membrane i presinaptičkog otpuštanja glutamata u sinaptičku pukotinu. Naime, za aktivaciju NMDA receptora neophodna je prethodna aktivacija AMPA i KA receptora, što će obezbediti influks jona Na^+ u ćeliju i dovesti do inicijalne depolarizacije na postsinaptičkoj membrani. Zahvaljujući ovoj depolarizaciji, joni Mg^{2+} će se ukloniti iz kanala NMDA receptora i otvoriti put potpunoj aktivaciji ovog receptora pošto se za njegove subjedinice vežu ligandi: glutamat, koji će se vezati za GluN2A subjedinice i glicin, koji se vezuje za GluN1 ili GluN3 subjedinicu receptora (Pittenger i sar., 2007).

NMDA receptor ima važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, razvoju sinapsi, učenju i memoriji (Cull-Candy i Leszkiewicz, 2004; Volianskis i sar., 2015). Osim što je sastav subjedinica NMDA receptora različit u okviru različitih moždanih regiona, tokom razvoja se sastav subjedinica ovog receptora može menjati i u okviru istog moždanog regiona, što može predstavljati mehanizam usmeravanja sinaptičke plastičnosti (Adell, 2020). Naime, u embrionalnom periodu razvića GluN2A i GluN2B subjedinice su visoko eksprimirane u korteksu i hipokampusu (Sanz-Clemente i sar., 2013), a kako vreme odmiče, ekspresija GluN2A subjedinice postaje dominantna u odnosu na GluN2B, te tako u postnatalnom dobu dolazi do povećanja GluN2A/GluN2B odnosa (eng. „*developmental GluN2B to GluN2A switch*“) (Sanz-Clemente i sar., 2013). Što se tiče ostalih subjedinica NMDA receptora, GluN2C

subjedinica nalazi se isključivo u malom mozgu, dok je prisustvo GluN2D subjedinice uglavnom ograničeno na srednji mozak (Sanz-Clemente i sar., 2013; S. Zhu i Paoletti, 2015).

Kod ljudi, sinapse hipokampusa i PFC se sastoje uglavnom od NMDA receptora sastavljenih od GluN1/GluN2A subjedinica, pri čemu se smatra se da je GluN2A subjedinica ta koja posreduje u sinaptičkoj plastičnosti (Adell, 2020). NMDA receptori koji se sastoje od GluN1/GluN2A/GluN2B subjedinica locirani su uglavnom u perisinaptičkom i ekstrasinaptičkom prostoru, dok se NMDA receptori sastavljeni isključivo od GluN2B subjedinice nalaze samo u ekstrasinaptičkom prostoru (Zhu i Paoletti, 2015). Smatra se da aktivacija sinaptičkih NMDA receptora promovira sinaptičko i ćelijsko preživljavanje, dok preterana aktivacija ekstrasinaptičkih NMDA receptora, usled viška glutamata, može biti neurotoksična i dovesti do ćelijske smrti (Hardingham i Bading, 2010).

Aktivacija NMDA receptora je ključna za pokretanje LTP i LTD, a studije sugerišu da se ova dva oblika sinaptičke plastičnosti vezuju za aktivaciju različitih subjedinica NMDA receptora. Naime, smatra se da aktivacija NMDA receptora sastavljenih od GluN2A subjedinice pokreće LTP, dok receptori sastavljeni od GluN2B subjedinica pokreću LTD u hipokampusu (Bartlett i sar., 2007; Massey i sar., 2004; Paoletti i sar., 2013).

1.4.2. Uloga NMDA receptora u depresiji

Veliki broj studija svedoči o narušenoj glutamatoj neurotransmisiji, koja je posredovana NMDA receptorima, u neurobiologiji i tretmanu depresije (Adell, 2020). U odnosu na ostale glutamatne jonotropne receptore, smatra se da je upravo NMDA receptor glavni kandidat za razvoj antidepresiva nove generacije. I zaista, povezanost narušene funkcije ovog receptora i depresije pokazana je na nekoliko različitih nivoa.

U postmortem studijama na depresivnim pacijentima primećen je smanjen nivo GluN2A i GluN2B subjedinica u prefrontalnom (Feyissa i sar., 2009) i peririnalnom (Beneyto i sar., 2007) korteksu, kao i povećan nivo GluN2A subjedinice u amigdalama (Karolewicz i sar., 2009). Takođe, primećena je povećana ekspresija *Grin2b* i *2c* gena (geni za GluN2B i 2C subjedinicu) u korpus kalozumu pacijenata sa

depresijom (Chandley i sar., 2014). Kod pacijenata sa depresijom primećena je i povišena metilacija *Grin2a* gena u hipokampusu i prefrontalnom korteksu (Kaut i sar., 2015), što se povezuje sa povećanom ekspresijom GluN2A subjedinice NMDA receptora (Calabrese i sar., 2012).

U životinjskim modelima depresije, pokazano je da izlaganje životinja različitim stresorima stimuliše aktivnost glutamatnog sistema i povećava ekspresiju subjedinica NMDA receptora (Page i sar., 2019; Shepard i sar., 2016). Naime, pokazano je da stres odvajanja mladunaca pacova od majke (maternalna deprivacija) dovodi do toga da u adultoj fazi pacovi imaju povećanu ekspresiju *Grin2a* gena (ali ne i *Grin2b* gena) u hipokampusu (Masrour i sar., 2018), kao i da stres ograničavanjem pokreta životinje (eng, *restraint stress*) uzrokuje povećanu ekspresiju GluN2A i 2B subjedinica kod BALB/c miševa (Sathyanesan i sar., 2017). Takođe, hronična primena kortikosterona, koji oponaša endokrini odgovor na stres, povećava ekspresiju *Grin2a* i *Grin2b* iRNK u hipokampusu životinja (Weiland i sar., 1997).

Sa druge strane, inhibicijom ili delecijom pojedinih subjedinica NMDA receptora se ostvaruje antidepresivan efekat. Jedna takva studija pokazala je da inaktivacija *Grin2a* gena kod miševa ima antidepresivan efekat u odnosu na miševe sa funkcionalnom GluN2A subjedinicom (Boyce-Rustay i Holmes, 2006). Takođe, mnoge prekliničke i kliničke studije prijavljuju poboljšanje simptoma depresije uz primenu različitih antagonista NMDA receptora (Pochwat i sar., 2019).

1.4.2.1. Antagonisti NMDA receptora kao potentni antidepresivi

Kao što je već pominjano, terapija postojećim antidepresivima, koja se zasniva na povećanju dostupnosti monoamina na nivou sinapsi, pokazuje nisku terapijsku efikasnost i zakasneli antidepresivan odgovor. U potrazi za efikasnijom terapijom, trenutna istraživanja su većinom fokusirana na nemonoaminske sisteme u mozgu, pre svega na glutamatnu neurotransmisiju i glutamatne receptore, na prvom mestu NMDA receptor.

Prve indikacije o antagonistima NMDA receptora kao potencijalnim antidepresivima javile su se još 1990. godine kada su prekliničke studije pokazale da kompetitivni, isto kao i nekompetitivni antagonisti NMDA receptora povećavaju

aktivnost eksperimentalnih životinja u FST i TST testu, pokazujući svoje antidepresivne efekte (Trullas i Skolnick, 1990). Jedan od antagonista NMDA receptora koji se danas najčešće proučava a pokazuje antidepresivan efekat jeste ketamin. Ketamin se primarno koristi kao anestetik, međutim klinička istraživanja su pokazala da u subanestetskoj dozi akutna primena ketamina proizvodi brze i dugoročne antidepresivne efekte (Kohtala, 2021). Njegova antidepresivna svojstva pogotovo su uočljiva kod depresivnih pacijenata kod kojih izostaje terapijski efekat klasičnim antidepresivima (Gerhard i sar., 2016; Muller i sar., 2016; Trullas i Skolnick, 1990). Studije su pokazale da olakšavanje simptoma depresije dolazi već nakon dva sata od primene ketamina, dok njegovo antidepresivno dejstvo može trajati i do nedelju dana (Kishimoto i sar., 2016; Park i sar., 2015). Međutim, zbog ozbiljnih psihomimetičkih efekata koje izaziva, primena ketamina u kliničkoj praksi je ograničena (Khorramzadeh i Lotfy, 1973; Wolfson, 2014).

Uzimajući u obzir veliki antidepresivan potencijal ketamina kao neselektivnog antagoniste NMDA receptora, može se spekulirati da bi selektivni antagonisti NMDA receptora specifični za GluN2A ili GluN2B subjedinice, mogli posedovati isto tako efikasna antidepresivna svojstva kao i ketamin, ali bez izazivanja disocijativnih i delirijumskih efekata. Buduća istraživanja trebalo bi da daju odgovore na ova pitanja, a u ovoj doktorskoj disertaciji pokušano je da se odgovori na neke od njih.

1.4.2.2. Mehanizmi delovanja antagonista NMDA receptora

Dosadašnja istraživanja vezana za definisanje mehanizama delovanja ketamina i drugih antagonista NMDA receptora su dovela do postavljanja poprilično složene hipoteze o načinu njihovog delovanja. Predložena hipoteza podrazumeva dezinhibiciju oslobađanja glutamata i naknadnu aktivaciju mTOR signalnog puta koji omogućava brzu sinaptogenezu, što za krajnji rezultat ima ublažavanje simptoma depresije (Sanacora i Schatzberg, 2015) (Slika 4).

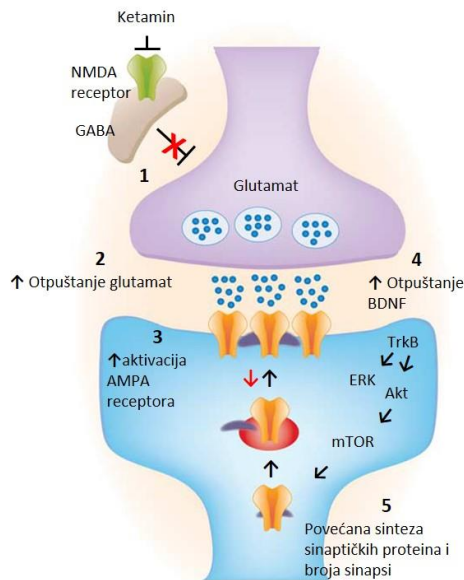
Smatra se da ketamin i drugi brzodelujući antagonisti NMDA receptora (Autry i sar., 2011; Li i sar., 2011) dovode do pojačane glutamatne transmisije u hipokampusu i u PFC tako što specifično blokiraju NMDA receptore na tonično aktivnim GABA interneuronima (Chowdhury i sar., 2017; Widman i McMahon,

2018). Na ovaj način se utišava inhibitorna GABA struja na otpuštanje glutamata iz ekscitatornih piramidnih glutamatnih neurona (Zanos i sar., 2018). Glutamat se vezuje za AMPA receptore, čime ih aktivira, obezbeđujući depolarizaciju postsinaptičke membrane što dovodi do aktivacije voltažno zavisnih kanala za Ca^{2+} (Lepack i sar., 2014; Zanos i sar., 2018). Povećana unutarćelijska koncentracija jona Ca^{2+} ključna je za otpuštanje BDNF proteina iz ćelije (Lepack i sar., 2014, 2016). Bitno je napomenuti da pored pozitivnog uticaja na BDNF ekspresiju, što je jedan od mehanizama delovanja klasičnih antidepresiva, antagonisti NMDA receptora na ovaj način prvenstveno deluju na otpuštanje već sintetisanog BDNF iz postinaptičkim vezikula (Lepack i sar., 2014). Smatra se da ih upravo ova karakteristika čini brzodelujućim antidepresivima u odnosu na ostale lekove koji se koriste u tretmanu depresije.

Na nivou sinapse, BDNF se vezuje za svoj TrkB receptor i aktivira nizvodni mTOR signalni put koji predstavlja jedan od mehanizama regulacije sinaptogeneze (Lepack i sar., 2016). Aktivan mTOR signalni put promoviše procese inicijacije translacije sinaptičkih proteina poput sinapsina, GluA1 subjednice AMPA receptora i PSD-95 proteina (Li i sar., 2010).

Na životinjskim modelima depresije, primena ketamina je dovela do brzog antidepresivnog odgovora koji je bio asociran sa povećanom aktivnošću mTOR signalnog puta i povećanjem nivoa sinaptičkih proteina, kao i povećanom sinaptičkom aktivnošću u V sloju piramidnih neurona u PFC (Liu i sar., 2015). Istraživanja su takođe pokazala da tretman ketaminom oporavlja deficit dendritskih trnića i poboljšava simptome anhedonije i anksioznosti koji se javljaju kao posledica izlaganja životinja hroničnom stresu (Li i sar., 2011).

Otkriće da ketamin svoja antidepresivna svojstva ostvaruje preko sinaptogeneze zavisne od aktivnosti mTOR signalizacije skrenulo je pažnju na ovaj signalni put kao veoma značajan u tretmanu depresije.



Slika 4. Predloženi mehanizam delovanja antagonista NMDA receptora. Antagonisti NMDA receptora blokirajući inhibitornu GABA struju usmerenu na otpuštanje glutamata (1) prouzrokuju intenzivno osobađanje glutamata (2) što dovodi do povećanja glutamatne neurotransmisije preko AMPA receptora (3), povećanog otpuštanja BDNF i aktivacije mTOR signalnog puta (4) i povećane sinaptogeneze (5) što dovodi do brzih i dugoročnih antidepresivnih efekata . **Slika preuzeta i prilagođena na osnovu Sanacora (2015).**

1.5. Signalni put mTOR

Serin/treonin kinaza mTOR učestvuje u usklađivanju signala iz spoljašnje sredine sa signalnim mrežama eukariotskih ćelija koje kontrolišu anaboličke i kataboličke procese i tako regulišu ćelijski rast i proliferaciju (Saxton i Sabatini, 2017). Svojom sposobnošću da odgovori na suptilne promene u nivou mitogena, faktora rasta i nutritijenata u ćeliji, mTOR ima ključnu ulogu u regulisanju sinteze proteina i biogeneze ribozoma i na taj način predstavlja jedan od glavnih signalnih puteva u kontroli ćelijske fiziologije (Hay i Sonenberg, 2004; Laplante i Sabatini, 2012).

Postoje dva mTOR kompleksa koja imaju različite funkcije, mTORC1 i mTORC2. Za razliku od manje izučavanog signalnog puta mTORC2 kompleksa, uzvodni i nizvodni signalni putevi mTORC1 kompleksa, kao i njegova uloga u patofiziologiji depresije su mnogo bolje proučavani (Hay i Sonenberg, 2004). Stoga, u daljem tekstu termin mTOR odnosiće se na mTOR kinazu iz mTORC1 kompleksa.

U mozgu, mTOR signalni put ima ulogu u kontroli migracije i proliferacije astrocita, rastu dendritskih trnja, regeneraciji aksona i njihovoj mijelinizaciji.

Takođe, ima značajnu ulogu u procesima sinaptičke plastičnosti i sinaptogeneze (Jaworski i sar., 2005; Kumar i sar., 2005; Laplante i Sabatini, 2012). Uzimajući u obzir fiziološku značajnost mTOR signalnog puta u mozgu, njegova narušena aktivnost može doprineti različitim patologijama nervnog sistema i psihijatrijskim poremećajima, uključujući i depresiju (Abelaira i sar., 2014; Garelick & Kennedy, 2011; Maiese, 2014).

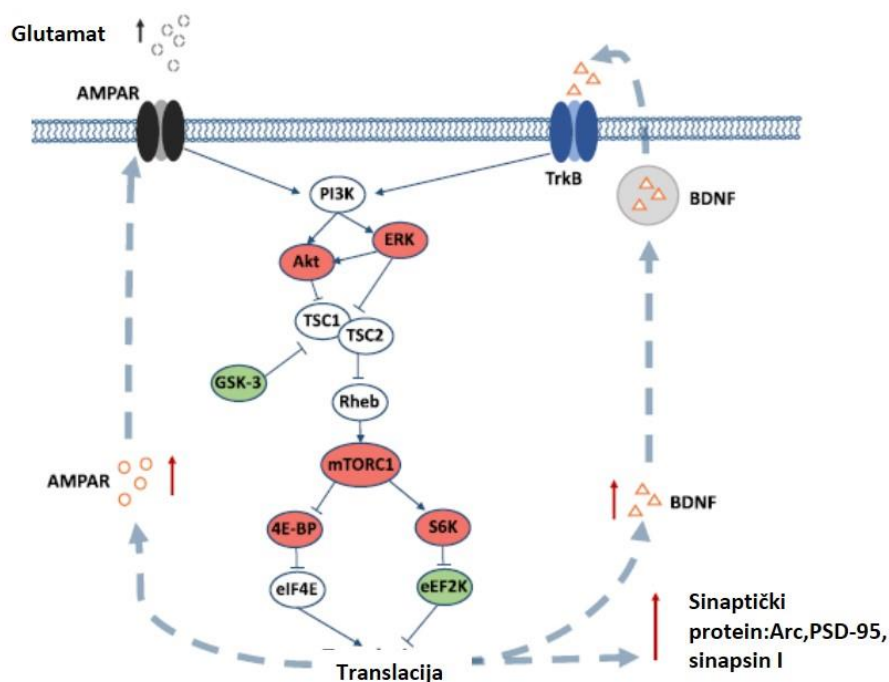
1.5.1. Sinaptogeneza i mTOR

Kao što je već navedeno, mTOR signalni put ima značajnu ulogu u kontroli procesa sinaptogeneze. Aktivnost mTOR signalnog puta zavisi od signala sa aktivnih sinapsi, a jedan od tih signala koji utiče na mTOR aktivnost je i BDNF (Takei i sar., 2004).

BDNF se vezuje za TrkB receptor čime se aktiviraju nizvodne kinaze poput ERK (eng. *extracellular signal-regulated kinases*), Akt (eng. *protein kinase B*) i GSK-3 β (eng. *glycogen synthase kinase-3 β*), koje delujući na TSC1/2 (eng. *tuberous sclerosis complex 1/2*) kompleks indirektno regulišu kinaznu aktivnost samog mTOR (Dwyer i Duman, 2013) (Slika 5). Kada Akt i ERK fosforilišu TSC2, dolazi do disocijacije a kasnije i ubikvitinacije TSC2 od TSC1, čime se TSC1/2 kompleks inhibira. Nakon inhibicije TSC1/2 kompleksa, za mTOR se vezuje aktivna forma G-proteina, GTP-vezujući Rheb protein, koji dalje aktivira mTOR (Dwyer i Duman, 2013).

Za razliku od ERK i Akt kinaza koje se aktiviraju fosforilacijom (ERK kinaza na Thr202/Tyr 204 i Akt kinaza na Ser473) a zatim fosforilišu i aktiviraju mTOR, izoforma GSK-3 β je aktivna kada je nefosforilisana (Doble i Woodgett, 2003) i kao takva glavni je inhibitorni regulator mTOR aktivnosti (Zoncu i sar., 2011). Fosforilacija GSK-3 β na Ser9 dovodi do konformacionih promena ove kinaze što onemogućava njen pristup substratu i na taj način inhibira njenu aktivnost, što ostavlja pozitivan efekat na mTOR aktivaciju. Pokazano je da je upravo ova inhibitorna fosforilacija GSK-3 β na Ser9 neophodna za ostvarivanje brzih antidepressivnih efekata neselektivnog antagoniste NMDA receptora, ketamina (Beurel i sar., 2011)

Aktiviran mTOR stimuliše translaciju tako što aktivira (fosforiliše) dva najbolje izučavana nizvodna mTOR efektor, kinazu p70S6K (eng. *ribosomal protein S6 kinase*) i 4E-BP1 (eng. *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) (Garelick i Kennedy, 2011). Fosforilacija p70S6K ima pozitivan efekat na inicijaciju translacije tako što ova kinaza fosforiliše ribozomalni protein S6 čija je fosforilacija povezana sa translacionom aktivnošću u ćeliji (Ruvinsky i Meyuhas, 2006). Takođe, p70S6K fosforiliše kinazu eukariotskog elongacionog faktora 2 (eng. *eukariotski elongacijski faktor 2 kinase*, eEF2K) i tako je inhibira. Kako je aktivna eEF2K negativan regulator eukariotskog elongacionog faktora eEF2 (eng. *eukariotski elongacijski faktor 2*, eEF2), njena inhibicija omogućava aktivaciju eEF2 faktora i njegovo učešće u elongaciji translacije (Ruvinsky i Meyuhas, 2006). Sa druge strane, fosforilacija 4E-BP1 dovodi do otpuštanja 4E-BP1 od eukariotskog inicijacionog faktora 4E (eng. *eukaryotic initiation factor 4E*, eIF-4E), što omogućava formiranje kompleksa eukariotskog inicijacionog faktora 4F (eng. *eukaryotic initiation factor 4F*, eIF-4F) koji je neophodan za vezivanje ribozoma za iRNK i inicijaciju translacije (Garelick i Kennedy, 2011).



Slika 5. mTOR signalnim putem posredovana sinaptogeneza kao mehanizam dejstva antagonista NMDA receptora. Komponente mTOR signalnog puta, sa svojim uzvodnim regularotornim kinazama (ERK, Akt i GSK-3 β) i nizvodnim efektorima (p70S6K i 4E-BP) čijom aktivacijom se promoviše translacija sinaptičkih proteina (Arc, PSD-95, sinapsin I) i BDNF proteina. Slika preuzeta i prilagođena na osnovu Cui (2018).

1.5.2. Uloga mTOR signalnog puta u depresiji

Smatra se da translaciono utišavanje na nivou sinapsi, koje zavisi od aktivnosti mTOR signalnog puta, doprinosi patologiji depresije, zbog čega mnoge studije ispituju ulogu aktivnosti mTOR signalnog puta u kontroli raspoloženja.

Nekoliko studija na animalnim modelima depresije prijavljuje smanjenu aktivnost mTOR signalnog puta u mozgu. Studije na miševima i pacovima koji su izlagani hroničnom nepredvidivom stresu (eng. *chronic unpredictable stress*, CUS) su pokazale da životinje ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom koje se povezuje sa smanjenom fosforilacijom mTOR i njegovog nizvodnog efektor, p70S6K u PFC (Li i sar., 2010; Zhu i sar., 2013), hipokampusu (Zhong i sar., 2014) i amigdalama (Chandran i sar., 2013). Takođe, pokazano je da hroničan tretman kortikosterona na kulturi kortikalnih neurona, model koji oponaša efekte stresa, dovodi do smanjenja nivoa fosforilacije mTOR (Howell i sar., 2011).

Kliničke studije na pacijentima sa depresijom takođe ističu smanjenu mTOR kinaznu aktivnost u PFC, što za posledicu ima utišanu aktivnost njegovih efektor, p70S6K i 4EBP1, koji kontrolišu translaciju sinaptičkih proteina (Jernigan i sar., 2011). Takođe, ekspresija iRNK za mTOR i Akt kinazu (kao uzvodnog mTOR aktivatora) je smanjena u krvi bipolarnih pacijenata koji su prolazili kroz depresivnu epizodu (Machado-Vieira i sar., 2015).

Sumarno, veliki broj prekliničkih i kliničkih studija ističe bitnu ulogu mTOR signalnog puta u neuropatofiziologiji depresije. Čini se da je depresija povezana sa smanjenom aktivnošću ovog signalnog puta dok upotreba nekih antidepresiva dovodi do aktivacije mTOR signalnog puta i to prvenstveno u hipokampusu i u PFC. Bolje razumevanje mTOR signalnog puta i njegovih uzvodnih regulatora i nizvodnih efektor moglo bi da pruži nove terapijske pristupe u tretmanu depresije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Inflamacija ima veoma važnu ulogu u patogenezi depresije. Neuroinflamacija može da naruši funkcionisanje neuroplastičnosti mozga i glutamatne neurotransmisije tako što dovodi do produkcije neuroaktivnih metabolita koji interferiraju sa aktivnošću glutamatnih NMDA receptora.

Sa druge strane, aktivacija mTOR signalnog puta sa krajnjim sinaptogenetskim efektima smatra se glavnim posrednikom antidepresivnih efekata neselektivnih antagonista NMDA receptora. Međutim, uloga specifičnih subjedinica NMDA receptora u patofiziologiji depresije uzrokovane neuroinflamacijom ostaje nepoznata.

Uzimajući u obzir prethodno navedeno, u ovoj doktorskoj disertaciji glavni cilj je bio ispitati doprinos GluN2A subjedinice razvoju ponašanja nalik depresivnom u neuroinflamatornom modelu depresije.

U skladu sa osnovnim ciljem, postavljeni su specifični ciljevi ovog istraživanja:

- (1)** detaljno okarakterisati promene u ponašanju miševa sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) i miševa divljeg soja (eng. *Wild type*, WT) izazvane akutnim tretmanom sa LPS;
- (2)** ispitati uticaj LPS tretmana na nivoe IL-6 u ukupnom ćelijskom ekstraktu PFC i hipokampusa GluN2A^{-/-} i WT miševa;
- (3)** ispitati uticaj LPS tretmana na nivoe markera neuroplastičnosti - BDNF, PSA-NCAM i NCAM u sinaptozomima PFC i hipokampusa GluN2A^{-/-} i WT miševa;
- (4)** ispitati uticaj LPS tretmana na nivoe subjedinica AMPA receptora (GluA1, GluA3, GluA4) i NMDA receptora (NR1, NR2A, NR2B) u sinaptozomima PFC i hipokampusa GluN2A^{-/-} i WT miševa;
- (5)** ispitati uticaj LPS tretmana na aktivnost mTOR signalnog puta preko nivoa uzvodnih regulatora mTOR aktivnosti (ukupnih i aktivnih (fosforilisanih) formi ERK, Akt i GSK-3 β kinaza), efektoru mTOR aktivnosti (ukupnih i aktivnih formi mTOR i p70S6K kinaza) i sinaptičkih markera (GluA1 i PSD-95 proteina) u sinaptozomima PFC i hipokampusa GluN2A^{-/-} i WT miševa;
- (6)** ispitati efekat antagoniste TrkB receptora i inhibitora aktivnosti ERK kinaze na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta u sinaptozomima PFC i hipokampusa GluN2A^{-/-} miševa u neuroinflamatornom modelu depresije

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Gajenje eksperimentalnih životinja

U ovoj doktorskoj disertaciji, svi eksperimenti izvođeni su na mužjacima C57BL/6J miševa divljeg soja (eng. *wild type*, WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}). Postupak utišavanja ekspresije gena za GluN2A subjedinicu opisan je u studiji Sakimura i saradnika (Sakimura i sar., 1995).

Nekoliko heterozigotnih životinja (GluN2A^{+/-}) iz Džekson laboratorije, SAD, dopremljeno je u vivarijum Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju instituta „Vinča”, a njihovim sparivanjem nastale su životinje GluN2A^{-/-} i WT soja koje su korišćene u istraživanjima.

Jedan GluN2A^{+/-} mužjak sparivan je sa dve GluN2A^{+/-} ženke, a mladunci starosti od 16 do 18 dana su prolazili kroz proces obeležavanja bušenjem ušiju po specifičnom brojčanom sistemu. Uzorci tkiva iz ušiju miševa korišćeni su za izolaciju DNK i određivanje genotipa životinja po postupku prethodno opisanom u studiji Gao i saradnika (Gao i sar., 2011). Ukratko, u PCR reakciju ulazilo je po 20 µg DNK koja je inkubirana sa 5 U/µl DNK polimeraze (*DreamTaq*) sa dva para prajmera (100 µM) (prajmer za alel gena za GluN2A subjedinicu (*Grin2a* gen) i prajmer za alel *Grin2a* gena sa trajno utišanom ekspresijom) (Tabela 1) i 10 mM dNTP.

Kao krajnji rezultat postupka određivanja genotipa, na agaroznom gelu identifikovane su trake koje su predstavljale alel *Grin2a* gena (~230 bp) i alel *Grin2a* gena sa trajno utišanom ekspresijom (~400 bp) dok su kod heterozigotnih životinja bile prisutne obe trake (Slika 6). Nakon odrađene genotipizacije, miševi starosti 21 dan odvajani su od majki u standardne kaveze od pleksiglasa (veličine 340x150x140 mm), u grupama od po 6 životinja po kavezu.

Tabela 1. Sekvence prajmera koji su se koristili za genotipizaciju miševa.

Prajmeri	
<i>Alel gena za GluN2A subjedinicu</i>	F: 5'-TCT GGG GCC TGG TCT TCA ACA ATT CTG TGC-3' R: 5'- CCC GTT AGC CCG TTG AGT CAC CCC T -3'
<i>Alel gena za GluN2A subjedinicu sa trajno utišanom ekspresijom</i>	F: 5'-GCC TGC TTG CCG AAT ATC ATG GTG GAA AAT-3' R: 5'-ATT CTT TGA TAA ATA TGC AAT GTA TGG GGG-3'



Slika 6. Vizualizacija genotipa životinja na agaroznom gelu. Na osnovu dobijenih traka odgovarajućih količina baznih parova (bp) identifikovan je genotip; životinje divljeg soja (WT), prisustvo trake od ~320 bp; heterozigotne životinje (GluN2A-/+), prisustvo trake od ~400 i ~320 bp; životinje sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu (GluN2A-/-), prisustvo trake od ~400 bp.

Svi eksperimenti rađeni su na 8 do 10 nedelja starim mužjacima miševa WT i GluN2A-/- soja (težine od 20 do 24g). Miševi su u vivarijumu odgajani u standardizovanim i kontrolisanim uslovima. Svetlo je bilo uključeno od 07:00 do 19:00 h, temperatura u vivarijumu bila je $20 \pm 2^\circ\text{C}$ a vlažnost vazduha od 45 do 55 %. Životinje su imale stalno dostupnu vodu i hranu (komercijalne granule, Veterinarski zavod Subotica). Nedelju dana pre eksperimenata, miševi su raspoređivani pojedinačno po kavezima.

3.2. Tretmani i eksperimentalni dizajn

Sve životinje su intraperitonealno (i.p.) tretirane jednom LPS dozom od 0,83 mg/kg (*Escherichia coli* 005: B5, No. L-2800, Sigma-Aldrich) prethodno rastvorenom u fiziološkom rastvoru. Doza od 0,83 mg/kg odabrana je zbog svog potencijala da u prvim satima nakon tretmana izazove akutno bolesničko ponašanje kod životinja iz kojeg se razvija ponašanje nalik depresivnom, 24h nakon LPS primene (Walker i sar., 2013a). Kontrolna grupa tretirana je samo fiziološkim rastvorom, zapremine od oko 150 μl po životinji.

Intraperitonealni tretman sa ANA-12 (*N2-(2-((2-oxoazepan-3-yl)amino)carbonyl)phenyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide*, No. 219766-25-3, Sigma-Aldrich), antagonistom TrkB receptora, primenjivan je u dozi od 0,5 mg/kg (Cazorla i sar., 2011; Zhang i sar., 2015b). Inhibitor je rastvaran u 1% DMSO u fiziološkom

rastvoru. Kontrolna grupa tretirana je sa rastvaračem u kome je inhibitor rastvaran (1% DMSO i 99 % fiziološki rastvor), oko 150 μ l po životinji.

Za intracerebroventrikularno (eng. *intracerebroventricular*, ICV) injektiranje inhibitora MAPK/ERK kinaza (MEK), UO126 (*1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio)butadiene, No 19-147, Millipore*), inhibitor je rastvoren u 100% DMSO do štoka koncentracije 10 mM (Silingardi i sar., 2011). Pre tretmana, štok inhibitora rastvoren je u aCSF (eng. *artificial cerebrospinal fluid*) u odnosu 1:1, do radne koncentracije inhibitora od 5mM (Silingardi i sar., 2011). aCSF se sastojala od: 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 10 mM glukoze i 2 mM CaCl. Kontrolna grupa tretirana je sa rastvaračem inhibitora (50% DMSO i 50% aCSF). Rastvor 5mM UO126 apliciran je ICV i to 0.5 μ l po ventrikuli.

3.2.1. Eksperimentalni dizajn

U sklopu ove teze urađena su tri eksperimenta.

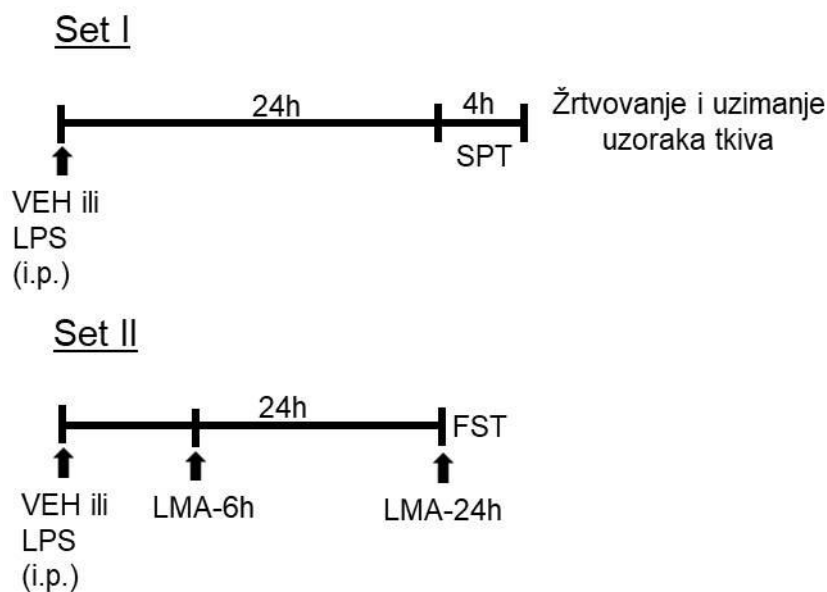
3.2.1.1. Eksperiment I

Za prvi eksperiment upotrebljeno je 72 mužjaka (36 životinja WT soja i 36 životinja GluN2A^{-/-} soja). Eksperiment je rađen na dva seta životinja (18 životinja WT soja i 18 životinja GluN2A^{-/-} soja po setu), koje su podeljene u 4 grupe (8-10 životinja po grupi): WT životinje i.p. tretirane fiziološkim rastvorom (grupa I) ili sa LPS (grupa II) i GluN2A^{-/-} životinje koji su takođe bile tretirane fiziološkim rastvorom (grupa III) ili sa LPS (grupa IV) (Slika 7). Sve životinje tretirane su sa LPS ili fiziološkim rastvorom u 08 h.

Prvi set životinja korišćen je za neinvazivni test ponašanja, SPT, koji je počeo u 24. satu, a završio se u 28. satu nakon LPS tretmana. Odmah nakon testiranja, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom, izolovane moždane strukture od interesa su zamrzavane u tečnom azotu nakon čega su čuvane na -80°C do pripreme uzoraka tkiva za dalje analize.

Drugi set životinja korišćen je za ispitivanje bazalne lokomotorne aktivnosti životinja i za FST test. Bazalna lokomotorna aktivnost merena je 6. i 24. sata nakon LPS tretmana dok je FST test sproveden 26. sata nakon LPS tretmana. Zbog

invazivnosti FST testa, uzorci tkiva se nakon ovog testa nisu uzimali za dalje molekularne analize.



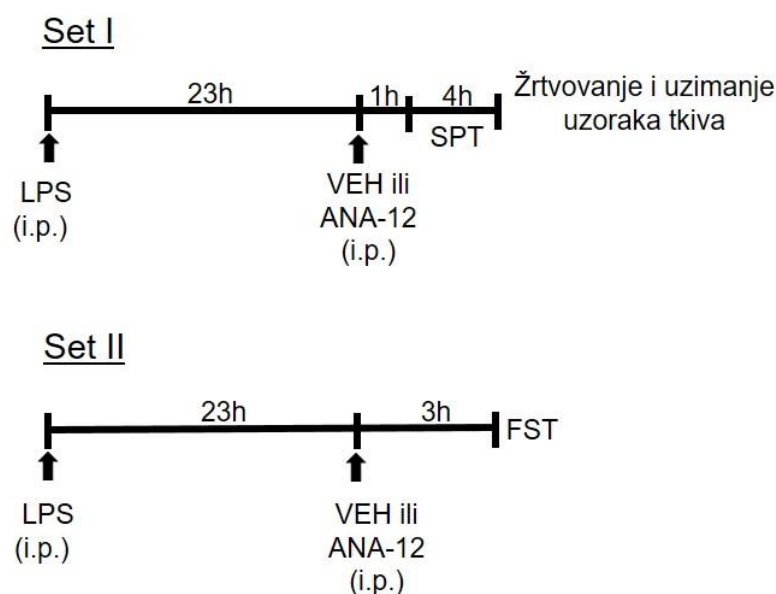
Slika 7. Eksperimentalni dizajn eksperimenta I. VEH, fiziološki rastvor; LPS, lipopolisaharid; SPT, test sklonosti ka saharozi; FST, test prinudnog plivanja; LMA, lokomotorna aktivnost.

3.2.2.2. Eksperiment II

Za drugi eksperiment upotrebljeno je 36 mužjaka GluN2A^{-/-} soja. Eksperiment je rađen u dva seta životinja (18 životinja po setu), a miševi su bili podeljeni u dve grupe (8-10 životinja po grupi) (Slika 8). Obe grupe su tretirane sa LPS kao i u prvom eksperimentu, a 23 h nakon LPS tretmana, prva grupa životinja je i.p. tretirana rastvaračem ANA-12 inhibitora (1% DMSO i 99% fiziološkog rastvora), dok je druga grupa tretirana ANA-12 inhibitorom u koncentraciji 0.5 mg/kg.

Prvi set životinja upotrebljen je za SPT test koji je počeo u 24. satu nakon LPS tretmana, a sat vremena nakon tretmana ANA-12 inhibitorom. Kao i u prethodnom eksperimentu SPT test je trajao 4 sata. Nakon SPT testa životinje su žrtvovane, a moždane strukture od interesa su izolovane i čuvane kao u prethodnom eksperimentu.

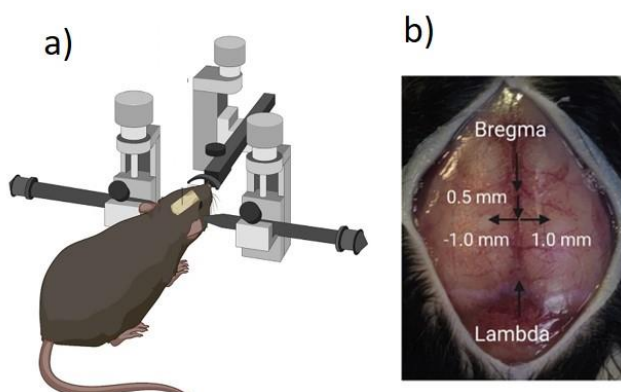
Drugi set životinja upotrebljen je za FST. Ovaj test je počeo u 26. satu nakon LPS tretmana, a 3 sata nakon tretmana sa ANA-12 inhibitorom (Zhang et al., 2015b).



Slika 8. Eksperimentalni dizajn eksperimenta II. VEH, rastvarač ANA-12 inhibitora; ANA-12, inhibitor TrkB receptora; LPS, lipopolisaharid; FST, test prinudnog plivanja.

3.2.2.3. Eksperiment III

Pre početka tretmana, na miševima je urađena stereotaksična operacija ugradnji kanila u cerebroventrikularne prostore.



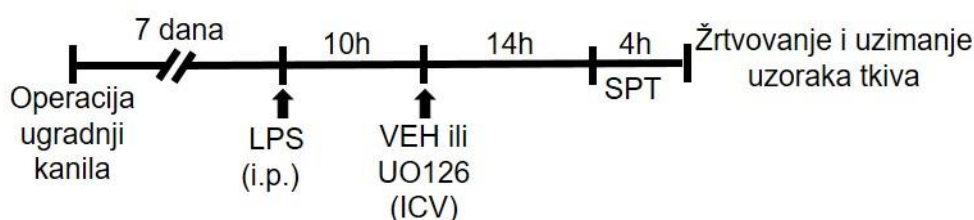
Slika 9. Ugradnja kanila u cerebroventrikularne prostore. Postavljanje miša u stereotaksičnu aparaturu za ugradnju kanila (a). Koordinate ugrađenih iglica kanila u cerebroventrikularne prostore (b). Slika preuzeta i prilagođena na osnovu Taylor i sar. (2021)

Operacija postavljanja kanila. Pre operacije, miševi su anestetizirani sa 1,2 % Avertina (0,4 ml po mišu), a zatim postavljeni u stereotaksičnu aparaturu nakon čega se pristupilo postupku postavljanja kanila u cerebroventrikularne prostore životinja. Koordinate postavljenih kanila su bile 0.5 mm po anteroposteriornjoj osi i ± 1 mm po mediolateralnoj osi mozga životinje, u odnosu na bregmu (Slika 9). Nakon

postavljanja, kanile su za lobanju životinja bile učvršćene zubnim cementom. Nakon operacije miševi su se oporavljali 7 dana.

U ovom eksperimentu upotrebljeno je 18 mužjaka miševa GluN2A^{-/-} soja koji su bili podeljeni u dve grupe (8-10 životinja po grupi) (Slika 10). Obe grupe su tretirane sa LPS kao i u prethodnim eksperimentima, a 10 h nakon LPS tretmana prva grupa je ICV tretirana rastvaračem UO126 inhibitora (50% DMSO i 50% aCSF), dok je druga grupa tretirana sa 5mM UO126 inhibitora.

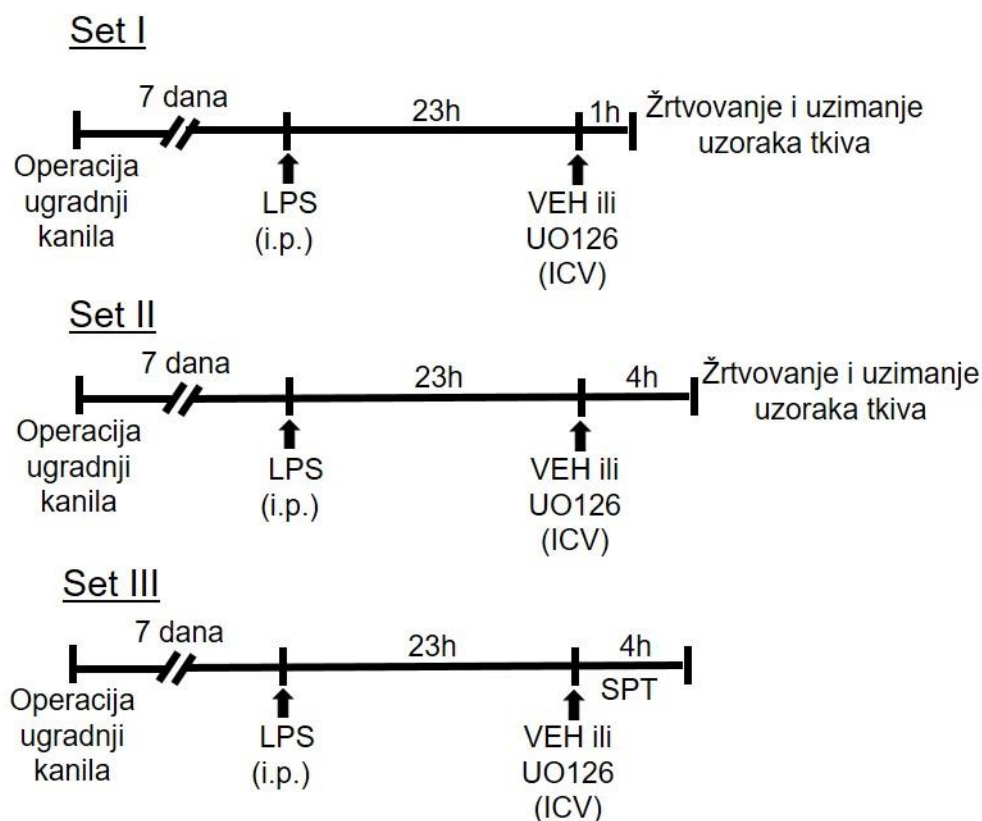
Pre ICV injektiranja, životinje su izlagane blagoj izofluranskoj anesteziji. Inhibitor UO126 je injektiran pomoću pumpe (*Insight Equipment, Bi2000, No .EFF311*) bilateralno, kroz ugrađene kanile u zapremini od 0,5 µl, koncentracije 5mM po ventrikuli. Proces injektiranja je trajao 1 minut, a nakon završene infuzije, kanile su zadržavane u mozgu dodatnih 30 sekundi kako bi se omogućila difuzija injektiranih hemikalija. Nakon ICV tretmana, na životinjama je sproveden SPT test i to 24 h nakon LPS tretmana i 14 h nakon UO126 inhibitora. Nakon testa, životinje su žrtvovane, a moždane strukture su izolovane i čuvane kao u prethodnim eksperimentima.



Slika 10. Eksperimentalni dizajn eksperimenta III. VEH, rastvarač UO126 inhibitora; UO126, inhibitor ERK kinaze; LPS, lipopolisaharid; SPT, test sklonosti ka saharozi.

U sklopu ovog eksperimenta odrađene su i dodatne analize kako bi se bliže odredila vremenska dinamika dejstva UO126 inhibitora na ponašanje životinja i molekularne parametre (Slika 11). U dodatnim studijama, efekat inhibitora ispitivan je u dve vremenske tačke, a za ove eksperimente upotrebljeno je 38 mužjaka miševa GluN2A^{-/-} soja. Dodatne studije rađene su na 3 seta životinja, a u svakom setu, životinje su kao i u glavnom eksperimentu, bile podeljene u dve grupe. Obe grupe su tretirane sa LPS, a 23 sata nakon tretmana životinje su tretirane sa UO126 inhibitorom ili rastvaračem UO126 inhibitora (5 životinja po grupi) (Set I i II). Efekat inhibitora, na molekularne parametre ispitivan je u prvom i četvrtom satu nakon

njegove primene, a efekat UO126 inhibitora na ponašaje životinja meren je 4 h nakon njegove primene i to SPT testom (8-10 životinja po grupi) (Set III).



Slika 11. Eksperimentalni dizajn dodatnih studija eksperimenta III. VEH rastvarač UO126 inhibitora; UO126, inhibitor ERK kinaze; LPS, lipopolisaharid; SPT, test sklonosti ka saharozi.

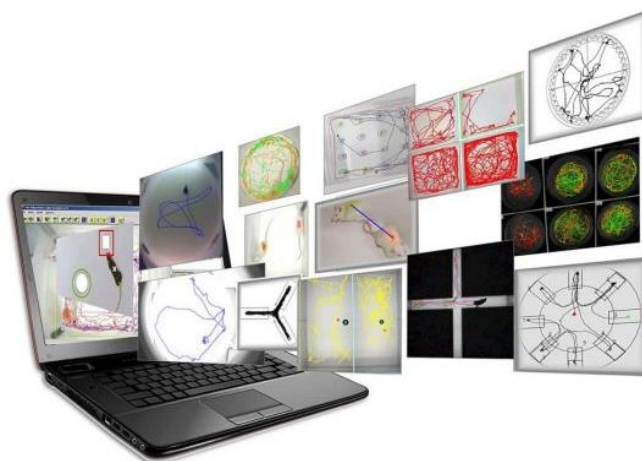
3.3. Lokomotorna aktivnost i testovi ponašanja

Da bi se kod životinja utvrdilo prisustvo ponašanja nalik depresivnom, 24 h nakon LPS tretmana, životinje su prolazile kroz dva dobro validirana testa ponašanja. Testom prinudnog plivanja merena je komponenta bespomoćnog ponašanja, a testom sklonosti ka saharozi meren je nivo anhedonije kod životinja. Pre izvođenja samih testova ponašanja, životinje su podvrgnute testu ispitivanja bazalne lokomotorne aktivnosti. Naime, smanjena lokomotorna aktivnost, je česta karakteristika bolesničkog ponašanja, kao adaptivnog odgovora na stanje bolesti i akutne bakterijske infekcije, što može biti slučaj i u ovom eksperimentu nakon LPS tretmana (Krishna i sar., 2016). Smanjena lokomotorna aktivnost životinja može maskirati rezultate samih testova ponašanja merene FST i SPT testovima ponašanja.

Zbog toga je neophodno da se utvrdi da lokomotorna aktivnost životinja nije narušena u vreme sprovođenja samih testova ponašanja.

3.3.1. Lokomotorna aktivnost

Lokomotorna aktivnost životinja merena je 6 i 24 h nakon LPS tretmana. Za procenu lokomotorne aktivnosti životinja korišćen je softver za praćenje i analizu ponašanja TSE VIDEOMOT 2 (*version 5.75; TSE Systems, Bad Homburg, Germany*) (Slika 12).



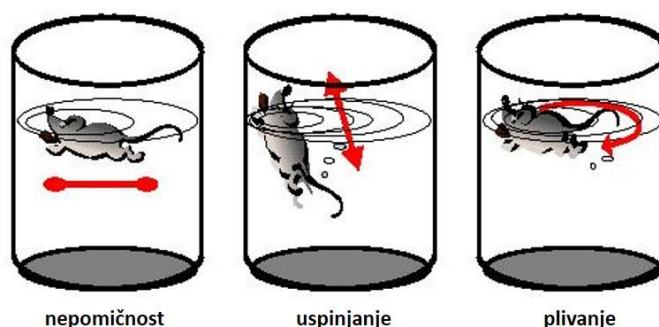
Slika 12. TSE VIDEOMOT 2 softver za automatsko praćenje ponašanja životinja. Preuzeto sa: <https://www.tse-systems.com/service/videmot2/>

Tokom testa, svaki miš stavljan je u novi kavez bez šuške, a u samom programu za praćenje ponašanja dno kaveza je bilo podeljeno na 4 jednaka pravougaona regiona. Na početku testa miševi su stavljeni u centar kaveza, a njihova aktivnost je snimana i analizirana narednih 5 minuta. Lokomotorna aktivnost životinja izražavana je kao broj prelazaka iz jednog regiona u drugi tokom test perioda od 5 minuta (Walker i sar., 2013).

3.3.2. Test prinudnog plivanja

U ovom testu životinje se stavljaju u vodu određen vremenski period a u toj bezizlaznoj situaciji meri se njihova želja za borbom, kroz vreme aktivne borbe da izađu iz nepovoljnog okruženja, ili pak prepuštanje situaciji bez želje za borbom (bespomoćnost).

FST test rađen je po protokolu O'Connor i saradnika (O'Connor i sar., 2009) (Slika 13). Ukratko, miševi su stavljeni u cilindar prečnika 23 cm i visine 31 cm koji je bio napunjen vodom temperature $24 \pm 1^\circ\text{C}$ do visine od 15 cm, kako životinja ne bi mogla da dotakne dno cilindra zadnjim šapama ili repom. Voda u cilindru je menjana nakon svakog testa. Tokom testiranja miševi su kao i u prethodno opisanom testu praćeni TSE VIDEOMOT 2 softverom. Postavljeni u vodeni cilindar, miševi su 6 minuta snimani odozgo, a vreme nepomičnosti je automatski mereno poslednjih 5 minuta testa. Nepomičnost je definisana kao odsustvo pokreta koji ukazuju na želju za begom poput plivanja, uspinjanja o ivice cilindra i aktivnog ronjenja. Blagi pokreti nepходni za održavanje životinja u plutajućem položaju, takođe su definisani kao nepomičnost.



Slika 13. Ponašanje životinja u FST testu. Slika preuzeta i prilagođena na osnovu Nile i sar. (2008).

3.3.3. Test sklonosti ka saharozi

Kako bi se kod životinja utvrdio efekat LPS tretmana na jednu od ključnih komponenti depresivnog ponašanja - anhedoniju, životinje su podvrgnute testu sklonosti ka saharozi. SPT se sastojao od faze privikavanja na saharozu i faze samog testiranja (Walker i sar., 2013). Faza privikavanja predstavljala je sedmodnevno ponavljanje test procedure kako bi se izbegao efekat neofobije na sam dan SPT testa. Naime, na kavez životinja je 7 dana pre samog testa svakodnevno postavljan špric od 2 ml sa sveže pripremljenim 1% rastvorom saharoze i to odmah pored identičnog šprica sa običnom vodom. Špric sa saharozom uvek je postavljan pored hrane. Špricevi su ostavljani 4 h, a faza privikavanja, kao i sam test trajao je od 08 do 12 h. Težina špriceva je merena pre postavljanja i na kraju test procedure (4 sata kasnije)

a razlika u njihovim težinama predstavljala je količinu popijene tečnosti (g). Sklonost ka saharozi računata je kao udeo popijene saharoze u odnosu na ukupnu popijenu tečnosti, izražena u procentima, a po dole navedenoj formuli.

$$\text{Sklonost ka saharozi} = \frac{g (\text{rastvora saharoze})}{g (\text{rastvora saharoze}) + g (\text{vode})} \times 100\%$$

3.4. Analiza proteina

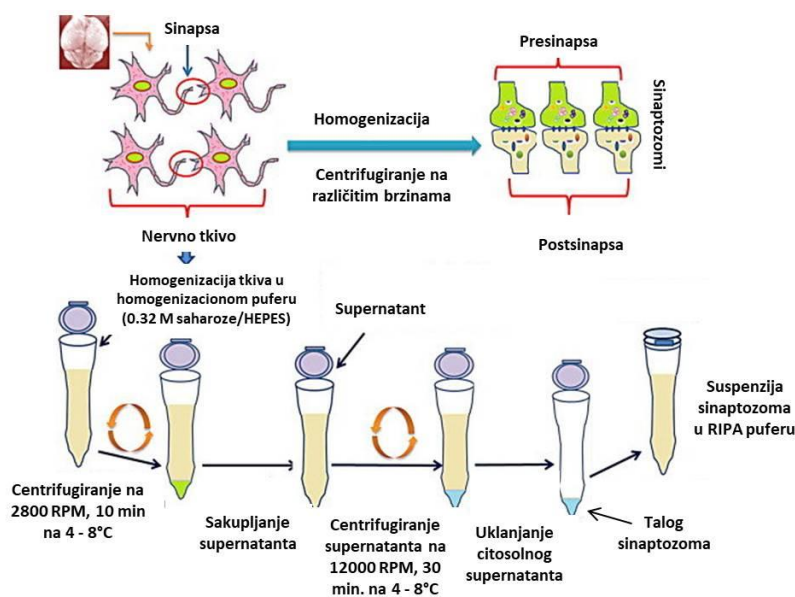
3.4.1. Izolacija ukupnog ćelijskog ekstrakta

Ukupan ćelijski ekstrakt za detekciju citokina dobijen je mehaničkom lizom tkiva PFC i hipokampusa u homogenizacionom puferu po validiranom protokolu (Landis i sar., 2005). Ukratko, tkivo je izmereno i homogenizovano u homogenizacionom puferu sa 30 udaraca *Potter-Elvehjem* teflonsko-staklenog homogenizera. Odnos tkiva i pufera bio je 1:4, a sastav homogenizacionog pufera bio je: 100 mM Tris (pH= 7), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycolate i proteazni i fosfatazni inhibitori. Fosfatazni inhibitori bili su: 20 mM β -glicerofosfat, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ i 2 mM Na_3VO_4 , dok su proteazni inhibitori bili: 20 mM Na_2MoO_4 , 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripsin i 3 mM benzamidina. Rastvori i izolati su sve vreme izolacije držani na ladu na 4°C. Nakon homogenizacije, homogenat je centrifugiran na 2800 RPM (eng. *revolutions per minute*) 20 minuta na 4°C. Nakon ovog koraka supernatant je predstavljao izolat ukupnog ćelijskog ekstrakta tkiva koji je dalje pripreman za imunoblot analizu i detekciju citokina.

3.4.2. Izolacija sinaptosomalne frakcije

Analiza nivoa svih proteina, izuzev citokina, u ovoj doktorskoj disertaciji (pogledati tabelu 3) rađena je na frakciji neprečišćenih sinaptozoma (eng. *crude synaptosomes*). S obzirom da je akcenat istraživanja ove teze na procesima sinaptogeneze, frakcija sinaptozoma koju čine presinaptički i postsinaptički završeci, predstavlja optimalnu ćelijsku frakciju za analizu molekularnih promena na lokalnom nivou, odnosno, na nivou sinapse.

Sinaptozomalna frakcija je izolovana iz PFC i hipokampusa, po protokolu prethodno opisanom u studiji Liu i saradnika (Liu i sar., 2013b) (Slika 14). Ukratko, prethodno zamrznuta tkiva su izmerena a zatim homogenizovana teflonsko-staklenim homogenizerom za izolaciju sinaptozoma sa 10 do 15 udaraca, a odnos tkiva i homogenizacionog pufera bio je 1:10. Homogenizacioni pufer sastojao se od: 0.32 M saharoze, 20 mM HEPES (pH= 7.3), 1 mM EDTA i koktela proteaznih i fosfataznih inhibitora kao i u prethodno opisanom puferu za homogenizaciju ukupnog ćelijskog ekstrakta. Svi rastvori i izolati držani su na 4°C. Dobijeni homogenat tkiva je centrifugiran 10 minuta na 2800 RPM. Nakon toga, supernatant je pažljivo sakupljen i centrifugiran 10 minuta na 12000 RPM. Nakon ovog koraka supernatant je odliven, a na dnu epruveta su ostali zalepljeni sinaptozomi. Sinaptozomi sa dna epruvete su rastvarani u RIPA lizis puferu (100 µl pufera po jednom PFC ili hipokampusu). RIPA pufer se sastojao od: 50 mM Tris-HCl (pH =7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 1 mM NaVO₃, 5 mM NaF i koktela proteaznih i fosfataznih inhibitora kao i u homogenizacionom puferu. Nakon dodavanja RIPA pufera uzorci sinaptozoma su inkubirani na ledu uz snažno ljuljanje i povremeno vorteksovanje, narednih sat vremena. Nakon ovog koraka sinaptozomalna frakcija je bila spremna za određivanje koncentracije proteina i pripremu za imunoblot analizu proteina.



Slika 14. Postupak izolacije sinaptozomalne frakcije. Objašnjenje pogledati u tekstu. **Slika preuzeta i prilagođeno na osnovu Kamat i sar. (2014).**

3.4.3. Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za imunoblot analizu

Koncentracija proteina merena je metodom po Markvelu (Markwell i sar., 1978). Ova metoda omogućava određivanje koncentracije proteina iz izolata sa većim udelom membranskih proteina i saharoze, što je slučaj sa sinaptosomalnom frakcijom.

Kao standard za određivanje koncentracije proteina koristio se goveđi serum albumin (eng. *bovine serum albumin*, BSA) koji je poslužio za pravljenje osnovnog štoka i serije razblaženja za standardnu krivu sledećih koncentracija: 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 i 10 µg/ml. Koncentracije standarda za proteinsku krivu i uzoraka merene su u triplikatu.

Po 10 µl uzorka ili standarda dodavano je u epruvetu sa 890 µl MiliQ vode (dejonizovane vode). Nakon ovog koraka u epruvetu je dodavano po 100 µl 1M NaOH nakon čega je reakciona smeša ostavljena da stoji 10 minuta na sobnoj temperaturi (eng. *room temperature*, RT). Nakon 10 minuta u epruvetu je dodavano 100 µl reagensa C (Tabela 2), nakon čega je rastvor držan na RT, 15 minuta. U poslednjem koraku dodavano je 300 µl *Folin Chicalteau* reagensa nakon čega je rastvor inkubiran još 45 minuta na RT

Tabela 2. Reagensi korišćeni prilikom određivanja koncentracije proteina po Markvelu.

Reagens A - 2% Na₂CO₃ + 0,4% NaOH + 0,16% Na-tartarat + 1% SDS

Reagens B - 4% CuSO₄ x 5H₂O

Reagens C - Reagens A : Reagens B = 100:1

Folin Chicalteau reagens razblažen MiliQ vodom u odnosu 1:1

Intenzitet razvijene boje očitavan je na spektrofotometru na 750 nm. Koncentracija proteina za svaki uzorak određena je sa standardne krive koja je bila konstruisana na osnovu poznatih koncentracija standarda BSA.

Nakon određene koncentracije proteina sledio je postupak njihove denaturacije. Svakom uzorku je dodavan pufer za denaturaciju proteina prema Lemliju (Laemmli, 1970) u odnosu 1:1, nakon čega su uzorci kuvani 5 min na 100°C. Sastav pufera za denaturaciju proteina je bio: 1.25 ml 1M Tris HCl (pH 6.8), 1ml

glicerola, 2ml (10% SDS), 1% Bromfenol Blue i 0.5 ml β -merkaptoetanol. Uzorci su nakon kuvanja zamrzavani na -20°C i čuvani za dalje imunoblot analize.

3.4.4. Imunoblot analiza proteina

Po 40 μg proteina svakog uzorka nanošeno je na 7.5%, 10% ili 12% denaturišuće SDS poliakrilamidne gelove. Proteini su po molekularnoj težini (kDa) razdvajani na gelu u sistemu za elektroforezu i to pomoću pufera za elektroforezu pri konstantnom naponu od 100 V u sistemu. Pufer za elektroforezu sastojao se od: 0.025 M Tris, 1.92 M glicina i 0.1% SDS (pH=8.3).

Na kraju elektroforeze, razdvojeni proteini iz gela su prebačeni na poliviniliden fluorid membranu (*Immobilon-P membrane, Millipore*) koristeći mokri transfer blot sistema (*Transblot, Bio-Rad*). U sistemu se nalazio transfer pufer sastava: 0.025 M Tris, 1.92 M glicin i 20% metanol (pH=8.3), a sam transfer je trajao 4 sata pod konstantnom amperažom od 400 mA.

Nakon proteinskog transfera, membrane su blokirane inkubacijom u 5% nemasnom mleku rastvorenom u fosfatnom puferu (eng. *phosphate-buffered saline, PBS*) na RT u trajanju od 1 h. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane preko noći na 4°C u odgovarajućim razblaženjima primarnih antitela (Table 3).

Antitela su bila razblažena sa rastvorom 2.5% nemasnog mleka u PBST (PBS sa 0.1% deterdžentom Twin-20). Nakon preonoćne inkubacije u primarnim antitelima, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u PBST a po ispiranju iste su inkubirane 2 h na RT sa odgovarajućim sekundarnim antitelima obeleženim peroksidazom iz rena (eng. *horse reddish peroksidaze, HRP*). Sekundarna antitela koja su korišćena su bila: anti-mišje-HRP antitelo (razblaženja 1:5000), anti-zečje-HRP antitelo (razblaženja 1:3000), anti-kozje-HRP antitelo (razblaženja 1:3000). Nakon inkubacije u sekundarnim antitelima membrane su ponovo ispirane 3 puta po 10 minuta u PBST.

Imunoreaktivne trake proteina vizualizovane su pomoću hemiluminiscentnog supstrata (*Luminol, No 97 521-31, Sigma-Aldrich*) koji je prelivan preko membrana nakon čega su membrane izlagane radiografskom filmu (*Fuji Photofilm, Bedfordshire UK or Amersham Hyperfilm ECL*).

Tabela 3. Razblaženja antitela korišćenih u imonoblot analizi proteina.

Protein	Kompanija	Izvor	Mono/Poliklonsko	Razblaženje
IL-6	Abcam	Zec	Poliklonsko	1:250
TNF- α	Abcam	Zec	Poliklonsko	1:250
BDNF	Cell Signaling	Zec	Poliklonsko	1:250
Trk-B	Invitrogen	Zec	Monoklonsko	1:5000
p-Trk-B	Invitrogen	Zec	Poliklonsko	1:2000
PSA-NCAM	Milipore	Miš	Monoklonsko	1:250
NCAM	Milipore	Miš	Monoklonsko	1:1000
t-ERK	Cell Signaling	Zec	Poliklonsko	1:1000
p-ERK(Thr202/Tyr 204)	Cell Signaling	Zec	Poliklonsko	1:1000
t-Akt	Santa Cruz	Zec	Poliklonsko	1:500
p-Akt (Ser 473)	Santa Cruz	Miš	Monoklonsko	1:1000
t-GSK-3 β	Santa Cruz	Zec	Poliklonsko	1:500
p-GSK-3 β (Ser 9)	Santa Cruz	Miš	Monoklonsko	1:250
t-mTOR	Santa Cruz	Miš	Monoklonsko	1:200
p-mTOR(Ser 2448)	Santa Cruz	Zec	Poliklonsko	1:500
t-p70S6K	Santa Cruz	Miš	Monoklonsko	1:500
p-p70S6K	Santa Cruz	Koza	Poliklonsko	1:250
PSD-95	Santa Cruz	Zec	Poliklonsko	1:250
GluA1	Santa Cruz	Miš	Monoklonsko	1:500
GluA3	Santa Cruz	Koza	Poliklonsko	1:500
GluA4	Cell Signaling	Zec	Monoklonsko	1:500
NR1	Milipore	Miš	Monoklonsko	1:250
NR2A	Milipore	Zec	Monoklonsko	1:1000
NR2B	Milipore	Miš	Monoklonsko	1:1000
β -Actin	Abcam	Zec	Poliklonsko	1:10000

Sa membrana su najpre detektovani signali fosforilisanih formi proteina, a da bi se sa istih membrana detektovali signali totalnih formi proteina membrane su stripovane inkubacijom u puferu za stripovanje 30 minuta na 50°C. Pufer za stripovanje sastojao se od: 62.5 mM Tris HCl (pH=6.8), 2% SDS i 100 mM β -merkaptetanola. Nakon stripovanja membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u

PBST. Na ovaj način membrane su bile spremne za ponovni postupak detekcije imunoreaktivnih signala sa antitelima za drugi protein.

3.4.5. Kvantifikacija signala

Hemiluminiscentni signali sa imunoblotova zabeleženi su na radiografskim filmovima i analizirani su pomoću Image J PC softvera (NIH, Bethesda, MD). Ovim softverom za merenje denzitometrije, kvantifikovan je intenzitet proteinskih traka sa radiografskih filmova.

Svi uzorci su u duplikatu nanošeni na gel, a signali za jedan protein detektovani su na bar 3 posebna gela. Za svaki protein sa jednog gela odabrana su po 3 reprezentativna filma (3 ekspozicije). Intenzitet trake detektovanog proteina deljen je sa intenzitetom trake za β -aktin istog uzorka sa iste membrane. Nivoi proteina u svim uzorcima predstavljani su u odnosu na kontrolni uzorak a to je bila grupa WT životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (eksperiment I) ili GluN2A-/- životinje tretirane rastavračima ANA-12 ili UO126 inhibitora (eksperimenti II i III).

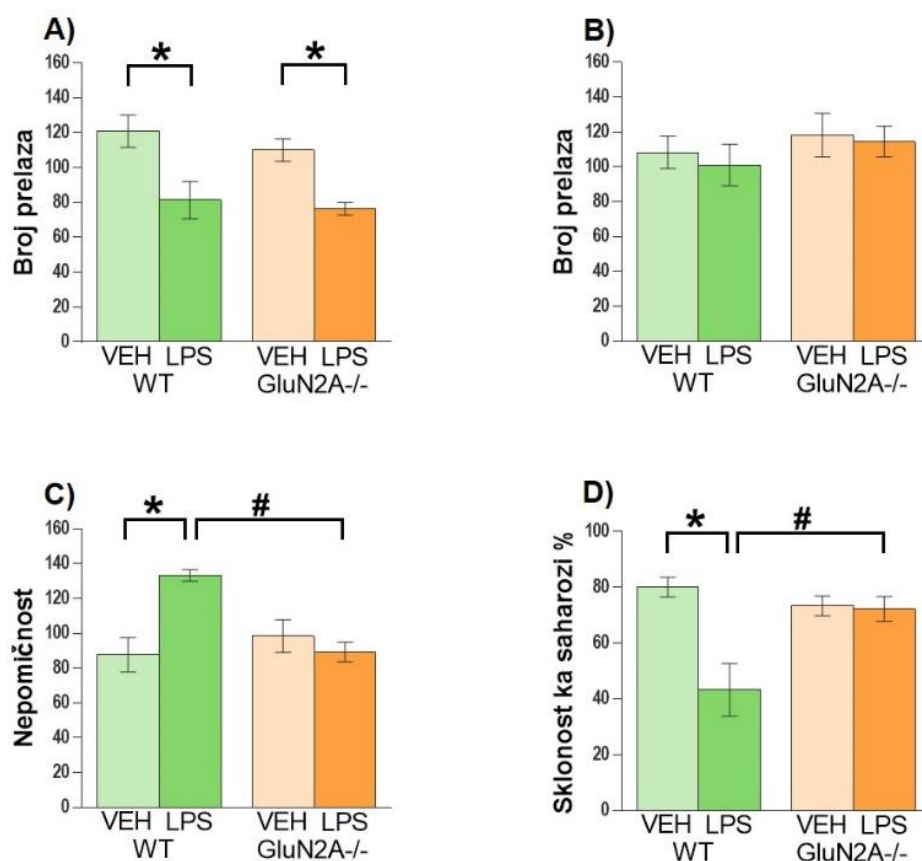
3.5. Statistička analiza podataka

Dobijeni rezultati analizirani su pomoću programa STATISTIKA 7. U zavisnosi od eksperimentalnog dizajna tj. broja eksperimentalnih grupa, parametri ponašanja životinja i biohemijski parametri analizirani su dvofaktorskom analizom varijanse (eng. *two-way analyses of variance*, two-way ANOVA) ili Studentskim t-testom. Dvofaktorskom ANOVA analizom ispitan je uticaj genotipa, tretmana ili njihove interakcije, a *post hoc Tukey testom* analizirane su razlike između eksperimentalnih grupa. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (SEM), a statistička značajnost je prihvatana za $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Analiza lokomotorne aktivnosti i ponašanja WT i GluN2A^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (*Eksperiment I*)

Lokomotorna aktivnost. Lokomotorna aktivnosti životinja, koja može biti narušena akutnom infekcijom usled LPS tretmana, merena je 6. i 24. sata nakon tretmana u skladu sa literaturom (Walker i sar, 2013). Uočen je značajan efekat tretmana na lokomotornu aktivnost životinja merenu 6 h nakon LPS ($F=29.15$, $p<0.05$), koja je bila značajno smanjena kako kod WT tako i kod GluN2A^{-/-} miševa (Slika 15A). Međutim, 24 h nakon LPS tretmana, nije uočen efekat tretmana na lokomotornu aktivnost miševa oba navedena soja (Slika 15B).



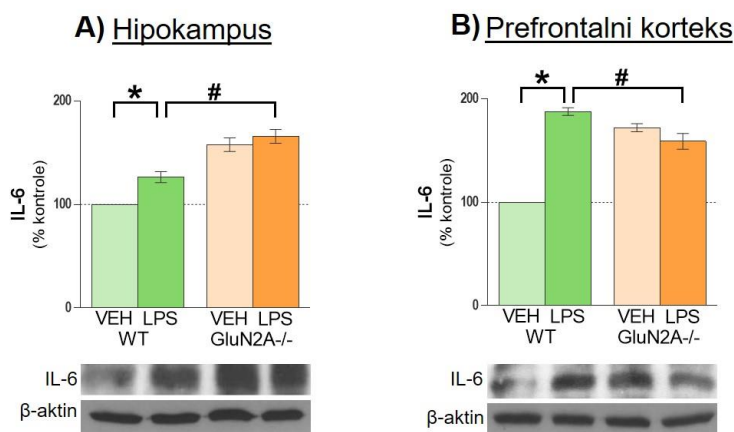
Slika 15. Efekat LPS tretmana na lokomotornu aktivnost i ponašanje životinja. Broj prelaza u testu lokomotorne aktivnosti mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) merena 6 h (A) i 24 h (B) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Vreme nepomičnosti (C) i sklonost ka saharozi (%) (D) miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

Test prinudnog plivanja. U testu prinudnog plivanja je uočen značajan efekat interakcije genotipa i tretmana ($F=5.65$ $p<0.05$) (Slika 15C). Vreme koje su životinje provodile nepomične bilo je značajno duže kod WT životinja tretiranih sa LPS u odnosu na WT životinje tretirane fiziološkim rastvorom. Kod GluN2A^{-/-} životinja nije uočen uticaj tretmana na vreme nepomičnosti tokom FST testa

Test sklonosti ka saharozi. U ovom testu ponašanja, kao i u prethodnom FST testu, uočen je značajan efekat interakcije genotipa i tretmana. Naime, sklonost ka saharozi je bila značajno niža kod WT životinja tretiranih sa LPS u odnosu na WT životinje tretirane fiziološkim rastvorom. Sa druge strane LPS tretman nije uticao na sklonost ka saharozi kod GluN2A^{-/-} miševa ($F=7.20$, $p<0.05$) (Slika 15D).

4.2. Analiza nivoa citokina IL-6 kod WT i GluN2A^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (Eksperiment I)

Imunoblot analizom ukupnog ćelijskog ekstrakta PFC i hipokampusa uočen je značajan efekat interakcije genotipa i tretmana na nivo IL-6 u hipokampusu ($F=4.15$, $p<0.05$) i PFC ($F=182.92$, $p<0.05$) (Slika 16A i B). U oba tkiva, nivo IL-6 bio je značajno viši kod WT miševa tretiranih sa LPS u poređenju sa WT životinjama tretiranih fiziološkim rastvorom. Sa druge strane, kod GluN2A^{-/-} miševa nije uočen efekat LPS tretmana na nivo IL-6.



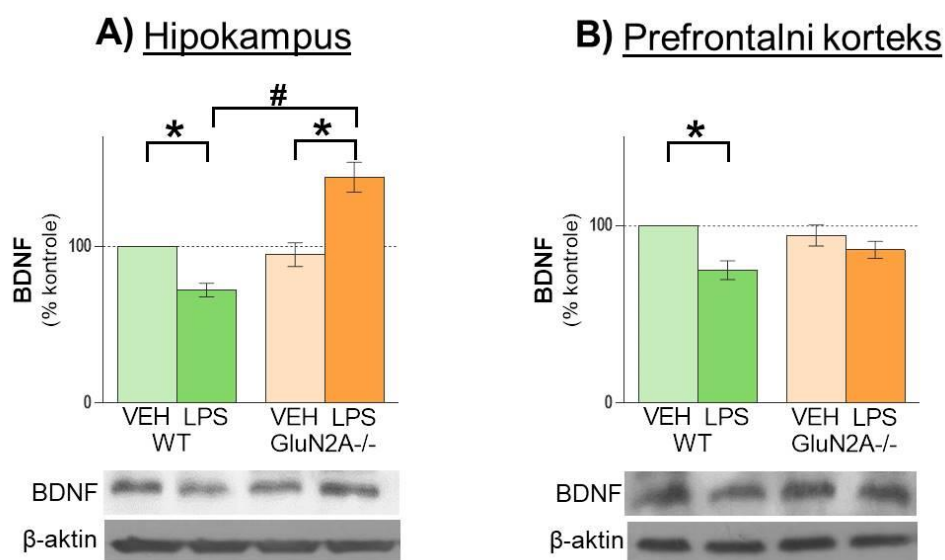
Slika 16. Efekat LPS tretmana na nivo IL-6 u sinaptozomima hipokampusa (A) i prefrontalnog korteksa (B) Nivoi IL-6- u sinaptozomima hipokampusa i PFC mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

4.3. Analiza markera neuroplastičnosti kod WT i GluN2A^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (*Eksperiment I*)

4.3.1. Analiza nivoa BDNF proteina

U sinaptozomima hipokampusa uočen je značajan efekat interakcije genotipa i LPS tretmana na nivo BDNF ($F=35.23$, $p<0.05$). U ovom delu mozga, BDNF nivo je bio značajno snižen kod WT životinja tretiranih sa LPS u odnosu na WT životinje tretirane fiziološkim rastvorom, dok je kod GluN2A^{-/-} životinja uočen suprotan efekat tretmana na BDNF nivo (Slika 17A).

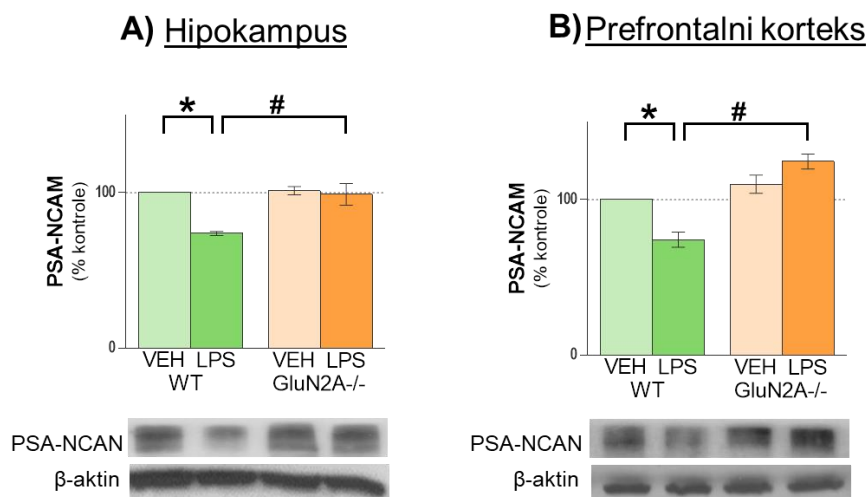
Sa druge strane, u PFC je uočen efekat LPS tretmana na nivo BDNF ($F=45.87$, $p<0.05$) i to samo kod WT životinja. Nivo ovog proteina bio je značajno snižen kod WT miševa tretiranih sa LPS u poređenju sa WT životinjama tretiranim fiziološkim rastvorom (Slika 17B).



Slika 17. Efekat LPS tretmana na BDNF nivo u sinaptozomima hipokampusa (A) i prefrontalnog korteksa (B). BDNF nivo u sinaptozomima hipokampusa i PFC mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

4.3.2. Analiza PSA-NCAM nivoa i nivoa NCAM izoformi

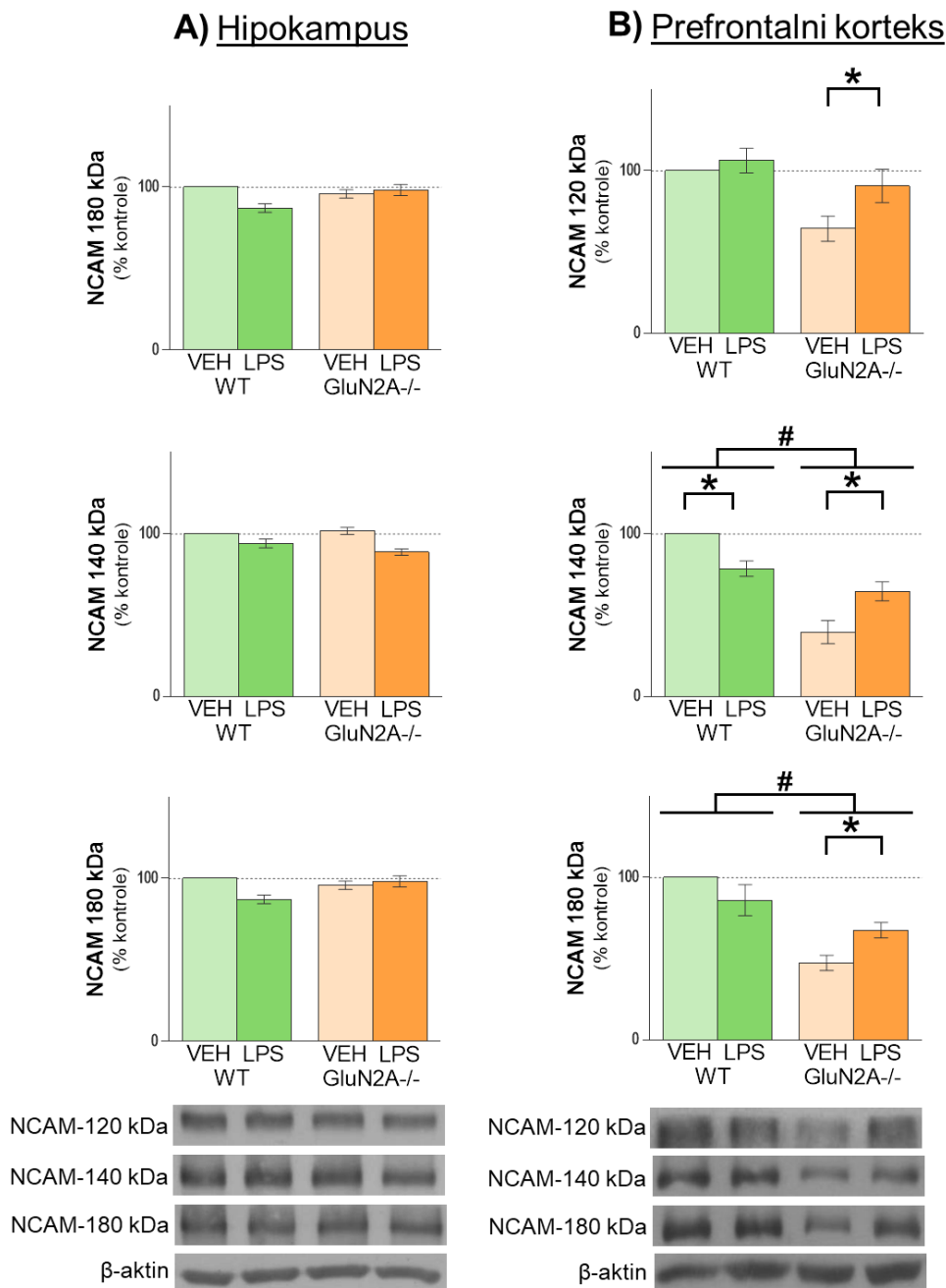
U sinaptozomima PFC i hipokampusa je uočen značajan efekat interakcije genotipa i LPS tretmana na nivo PSA-NCAM ($F=5.46$, $p<0.05$ za hipokampus; $F=68.27$, $p<0.05$ za PFC) koji je bio značajno snižen kod WT životinja tretiranih sa LPS poređenju sa WT životinjama tretiranih fiziološkim rastvorom. Kod GluN2A^{-/-} životinja, tretman nije imao značajan uticaj na nivoe PSA-NCAM u obe strukture (Slike 18A i B).



Slika 18. Efekat LPS tretmana na nivo PSA-NCAM u sinaptozomima hipokampusu (A) i prefrontalnog korteksa (B). Nivo PSA-NCAM u sinaptozomima hipokampusu i PFC mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

Što se tiče NCAM izoformi (120, 140 i 180 kDa), nisu uočeni efekti ni tretmana ni genotipa na nivoe ovih proteina u sinaptozomima hipokampusu (Slika 19A). Sa druge strane u sinaptozomima PFC je uočen značajan efekat interakcije LPS tretmana i genotipa na nivoe sve tri izoforme NCAM proteina ($F=17.38$, $p<0.05$ za NCAM 180 kDa; $F=355.92$, $p<0.05$ za NCAM 140 kDa; $F=22.85$, $p<0.05$ za NCAM 120 kDa) (Slika 19B). *Post hoc* analiza je pokazala da su nivoi sve tri NCAM izoforme bili značajno povišeni kod GluN2A^{-/-} miševa tretiranih sa LPS u poređenju sa GluN2A^{-/-} miševima tretiranih fiziološkim rastvorom. Kod WT životinja, samo nivo NCAM 140 kDa isoforme bio je značajno snižen kod životinja tretiranih sa LPS u poređenju sa životinjama tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe nivoi 180 i 140 kDa NCAM

izoformi bili su značajno povišeni kod WT životinja u poređenju sa GluN2A-/- životinjama, bez obzira na tretman (Slika 19B).

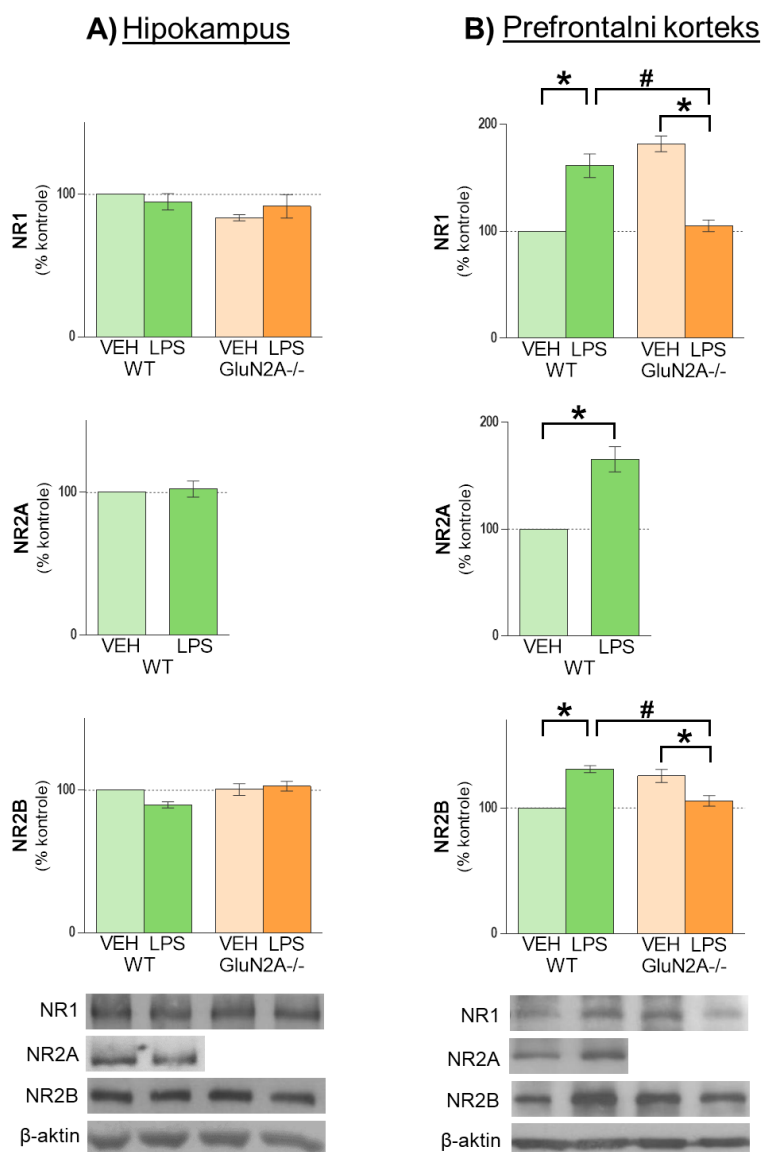


Slika 19. Efekti LPS tretmana na nivo NCAM izoformi od 120, 140 i 180 kDa u sinaptozomima hipokampusa (A) i prefrontalnog korteksa (B). Nivo NCAM izoformi od 120, 140 i 180 kDa u sinaptozomima hipokampusa i PFC mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A-/-) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A-/- miševe.

4.4. Analiza nivoa subjedinica NMDA i AMPA receptora kod WT i GluN2A^{-/-} miševa nakon LPS tretmana (*Eksperiment I*)

4.4.1. Analiza nivoa subjedinica NMDA receptora

U sinaptozomima hipokampusa nije uočen statistički značajan efekat kako tretmana tako i genotipa na nivoe subjedinica NMDA receptora (Slika 20A).



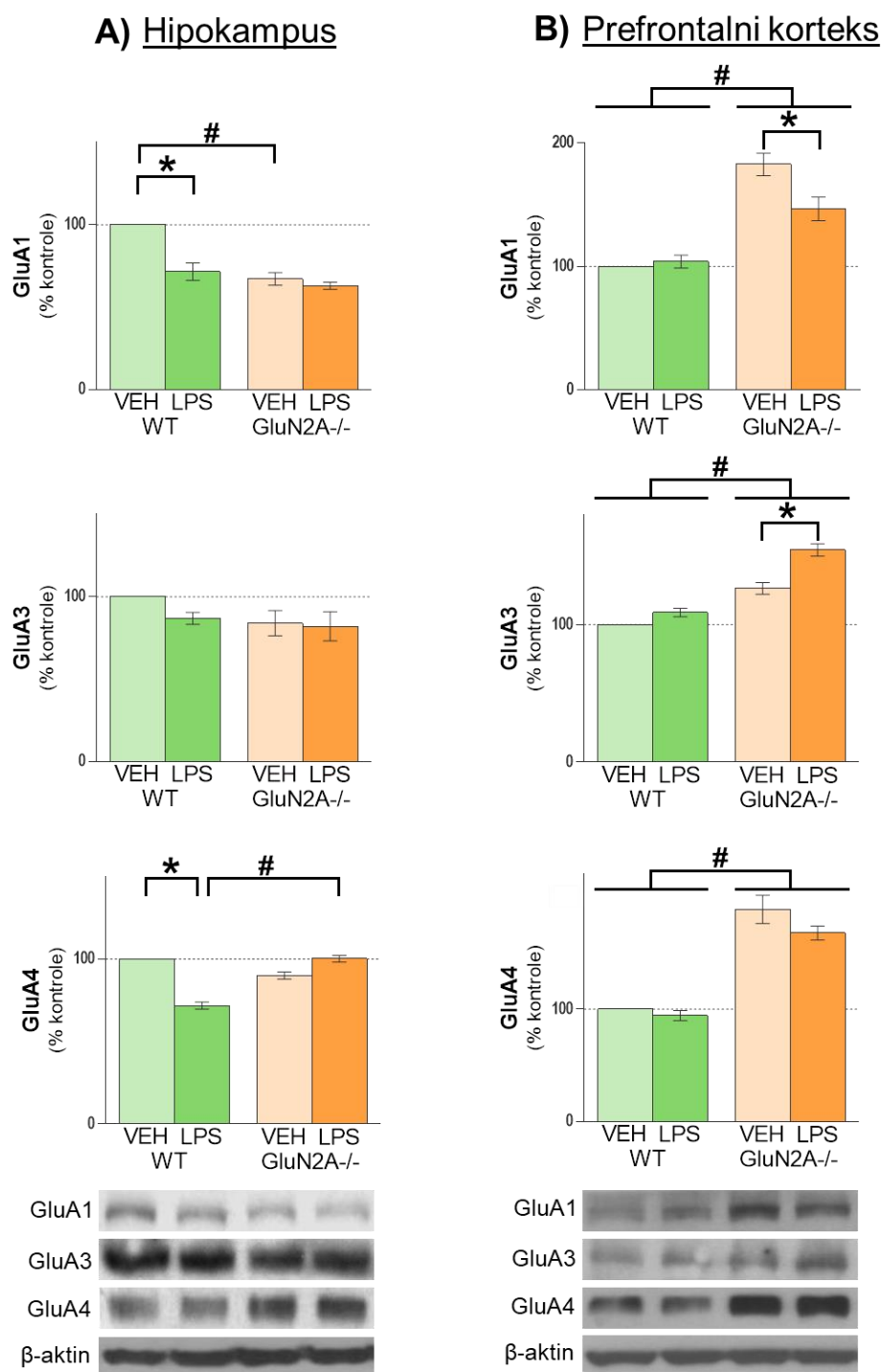
Slika 20. Efekti LPS tretmana na nivoe subjedinica NMDA receptora u sinaptozomima hipokampusa (A) i prefrontalnog korteksa (B). Nivo NR1, NR2A i NR2B subjedinica NMDA receptora u sinaptozomima hipokampusa i PFC mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

Međutim, u PFC WT miševa uočen je značajan efekat tretmana na nivo NR2A subjedinice ($t=7,78$, $p<0.05$), koji je bio značajno povišen kod WT životinja tretiranih sa LPS u poređenju sa WT životinjama tretiranih fiziološkim rastvorom. Što se tiče ostale dve subjedinice NMDA receptora, NR1 i NR2B, uočen je značajan efekat interakcije tretmana i genotipa na njihove nivoe ($F=86.72$, $p<0.05$ za GluN1; $F=58.39$, $p<0.05$ za GluN2B) (Slika 20B). Naime, nivoi NR1 i NR2A proteina bili su značajno povišeni kod WT životinja tretiranih sa LPS u poređenju sa životinjama istog genotipa tretiranih fiziološkim rastvorom. Međutim, kod GluN2A^{-/-} životinja tretman je imao suprotan efekat na nivoe ove dve subjedinice NMDA receptora.

4.4.2. Analiza nivoa subjedinica AMPA receptora

Kada su u pitanju nivoi subjedinica AMPA receptora u sinaptozomima hipokampusa, uočen je značajan efekat interakcije genotipa i LPS tretmana samo na nivoe GluA1 ($F=11.58$, $p<0.05$) i GluA4 subjedinice ($F=112.85$, $p<0.05$), koji su bili značajno sniženi kod WT miševa tretiranih sa LPS u odnosu na WT miševe tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 21A). Kod GluN2A^{-/-} životinja nije uočen efekat tretmana na nivoe ove dve subjedinice AMPA receptora (Slika 21A).

U sinaptozomima PFC je uočen značajan efekat interakcije genotipa i tretmana na nivoe GluA1 ($F=12.55$, $p<0.05$) i GluA3 subjedinice ($F=64.06$, $p<0.05$). Naime, nivo GluA1 proteina je bio značajno snižen kod GluN2A^{-/-} životinja tretiranih sa LPS u odnosu na GluN2A^{-/-} životinja tretirane fiziološkim rastvorom, dok je tretman imao suprotan efekat na nivo GluA3 subjedinice kod GluN2A^{-/-} životinja (Slika 21B). Sa druge strane, tretman nije uticao na nivoe ove dve subjedinice kod WT životinja. Što se tiče GluA4 subjedinice u PFC, uočen je glavni efekat genotipa na nivo ovog proteina ($F=225.65$, $p<0.05$), tako što je nivo ove subjedinice bio značano povišen kod GluN2A^{-/-} miševa u odnosu na WT životinje (Slika 21B).



Slika 21. Efekti LPS tretmana na nivoe subjedinica AMPA receptora u sinaptozomima hipokampusa (A) i prefrontalnog korteksa (B). Nivoi GluA1, GluA3 i GluA4 subjedinice AMPA receptora u sinaptozomima hipokampusa i PFC mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

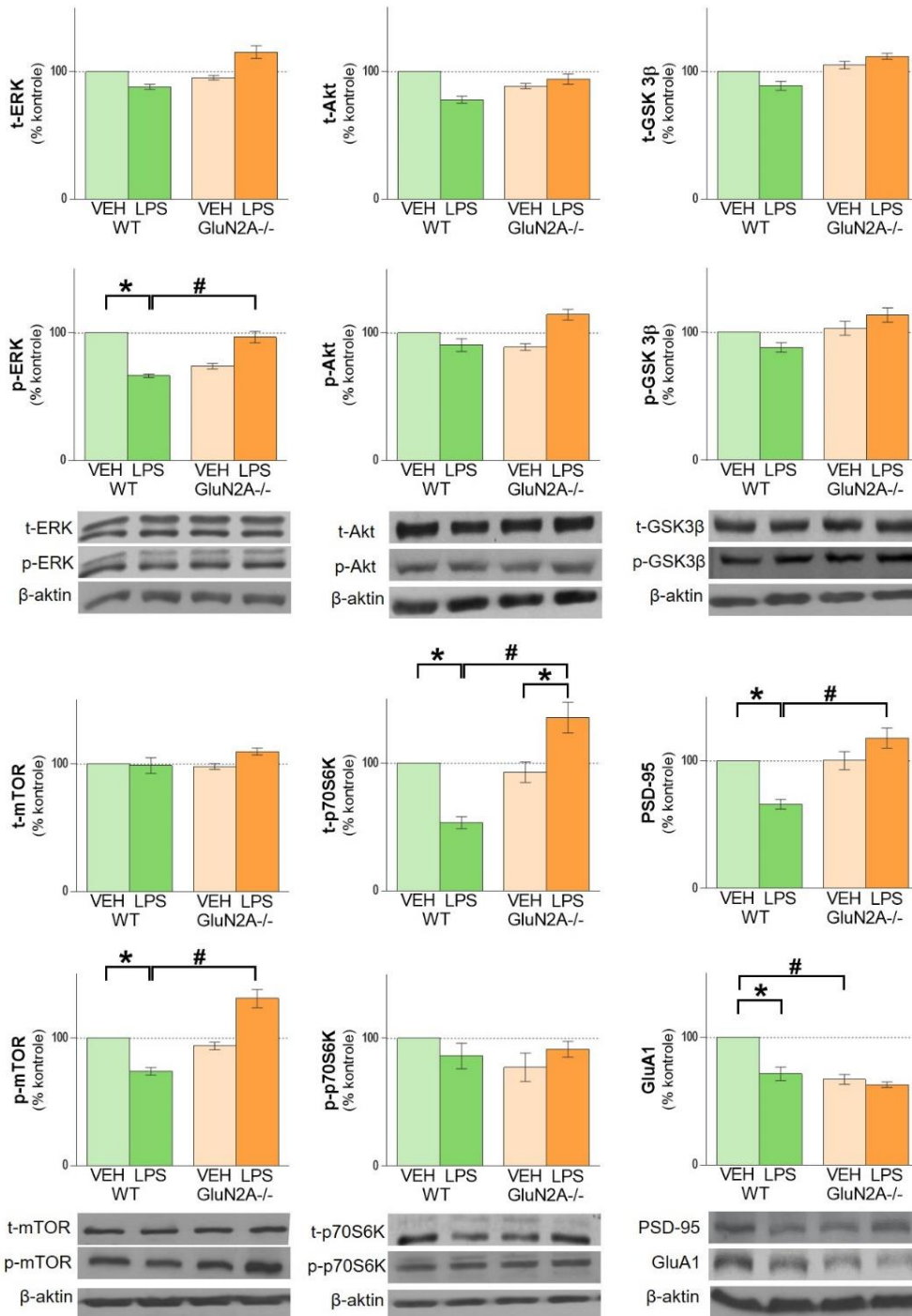
4.5. Analiza aktivnosti mTOR signalnog puta i sinaptogeneze kod WT i GluN2A-/- miševa (*Eksperiment I*)

4.5.1. Analiza uzvodnih regulatora mTOR aktivnosti - Akt, ERK i GSK-3 β

U sinaptozomima hipokampusa je uočen značajan efekat interakcije genotipa i LPS tretmana na nivo fosforilisane forme ERK kinaze (p-ERK) ($F=76.68$; $p<0.05$) (Slika 22). Naime, u ovom moždanom regionu uočen je značajno snižen p-ERK nivo kod WT miševa tretiranih sa LPS u poređenju sa WT miševima tretiranih fiziološkim rastvorom. Kod GluN2A-/- miševa tretman nije imao efekta na p-ERK nivo. Što se tiče ukupnog nivoa ERK kinaze kao i nivoa ukupnih i fosforilisanih formi ostala dva uzvodna mTOR aktivatora, Akt i GSK-3 β kinaze, nije uočen efekat ni tretmana ni genotipa na njihove nivoe (Slika 22).

U sinaptozomima PFC je uočen značajan efekat interakcije tretmana i genotipa na nivoa fosforilisanih formi sva tri uzvodna mTOR aktivatora ($F=5.35$, $p<0.05$ za p-ERK; $F=17.83$, $p<0.05$ za p-Akt, $F=13.19$, $p<0.05$ za p-GSK-3 β) (Slika 23). Nivoi sve tri fosforilisane forme su bili značajno sniženi kod WT životinja tretiranih sa LPS u poređenju sa WT životinjama tretiranih fiziološkim rastvorom. LPS tretman nije imao efekat na nivoe fosforilisanih formi kod GluN2A-/- miševa. Takođe, nije uočen efekat ni genotipa ni tretmana na ukupne nivoe ERK, Akt i GSK-3 β kinaze u PFC (Slika 23).

Hipokampus



Slika 22. Efekti LPS tretmana na aktivnost mTOR signalnog put u hipokampusu. Nivoi ukupnih i fosforilisanih formi ERK, Akt, GSK-3β, mTOR, p70S6K i nivo PSD-95 i GluA1 proteina u sinaptozomima hipokampusa mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

4.5.2. Analiza mTOR aktivnosti i njegovog nizvodnog efektor p70S6K

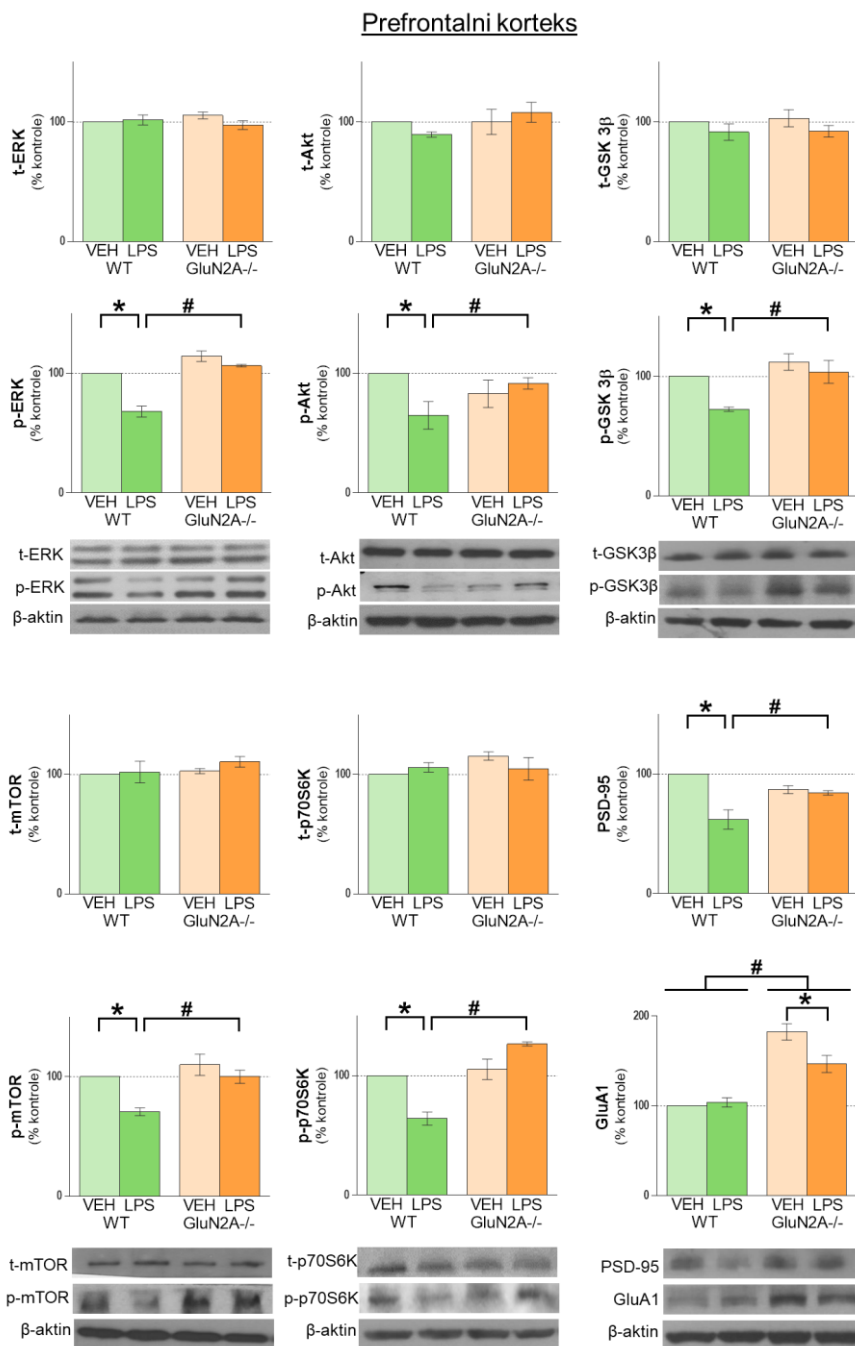
U sinaptozomima hipokampusa je uočen efekat interakcije genotipa i LPS tretmana na nivo fosforilisane forme mTOR kinaze (p-mTOR) ($F=57.20$; $p<0.05$) čiji su nivoi bili značajno sniženi kod WT životinja tretiranih sa LPS u odnosu na WT životinje tretirane fiziološkim rastvorom, dok LPS nije imao efekat na nivo p-mTOR kod GluN2A^{-/-} životinja (Slika 22). Sa druge strane ni tretman, ni genotip nisu imali značajne efekte na ukupan nivo mTOR kinaze u hipokampusu (Slika 22). Što se tiče fosforilisane forme p70S6K (p-p70S6K), kao jednog od efektor mTOR aktivnosti, uočeno je da tretman nije imao uticaj na nivo ovog proteina (Slika 22). Međutim, kod ukupnog nivoa p70S6K uočen je značajan efekat interakcije tretmana i genotipa ($F=21.01$, $p<0.05$). Dalja *post hoc* analiza je pokazala da je nivo ovog proteina značajno snižen kod WT životinja tretiranih sa LPS u odnosu WT životinje tretirane fiziološkim rastvorom, dok je kod GluN2A^{-/-}-miševa LPS imao suprotan efekat na ukupan nivo p70S6K kinaze (Slika 22).

Kada je u pitanju PFC, uočen je efekat interakcije genotipa i tretmana na nivoe fosforilisanih formi mTOR kinaze ($F=12.75$; $p<0.05$) i p70S6K ($F=30.75$; $p<0.05$) u sinaptozomima, koji su bili značajno sniženi kod GluN2A^{-/-} životinja tretiranih sa LPS u odnosu na GluN2A^{-/-} životinje tretirane fiziološkim rastvorom, dok tretman nije imao efekat na nivoe ovih fosforilisanih formi kod WT životinja (Slika 23). Sa druge strane, ni tretman ni genotip nisu imali značajne efekte na ukupan nivo mTOR i p70S6K u PFC (Slika 23).

4.5.3. Analiza nivoa sinaptičkih proteina PSD-95 i GluA1

Što se tiče PSD-95 proteina, uočen je značajan efekat interakcije tretmana i genotipa ne njegov nivo kako u sinaptozomima hipokampusa ($F=26.43$, $p<0.05$) (Slika 22) tako i u PFC ($F=15.46$, $p<0.05$) (Slika 23). Naime u oba ispitivana moždana regiona, nivoi PSD-95 proteina su bili značajno sniženi kod WT životinja tretiranih sa LPS u poređenju sa WT životinjama tretiranih fiziološkim rastvorom, dok kod GluN2A^{-/-}-miševa nije uočen efekat tretmana na nivo PSD-95 proteina (Slika 22 i 23).

Kada je reč o drugom ispitivanom sinaptičkom markeru, GluA1 proteinu, uticaj tretmana na njegov nivo je već opisan u poglavlju 4.4.2.

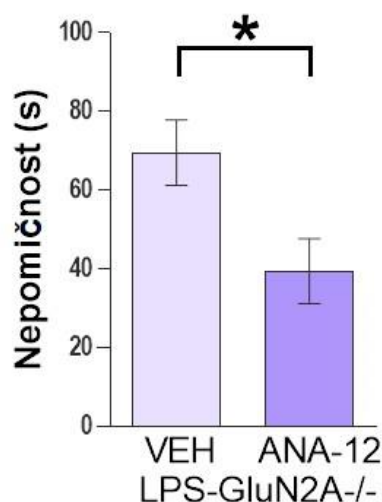


Slika 23. Efekti LPS tretmana na aktivnost mTOR signalnog puta u prefrontalnom korteksu. Nivoi ukupnih i fosforilisanih formi ERK, Akt, GSK-3β, mTOR, p70S6K i novoe PSD-95 i GluA1 proteina u sinaptozomima prefrontalnog korteksa mužjaka miševa divljeg soja (WT) i soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A^{-/-}) nakon LPS tretmana u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane sa LPS u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za WT miševe u odnosu na GluN2A^{-/-} miševe.

4.6. Analiza efekata antagoniste TrkB receptora, ANA-12, na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta GluN2A/- miševa u neuroinflamatornom modelu depresije (*Eksperiment II*)

S obzirom da predložen mehanizam dejstva antagonista NMDA receptora podrazumeva prvenstveno otpuštanje BDNF i aktivaciju TrkB receptora, a zatim i uzvodnih regulatornih kinaza mTOR signalnog puta, cilj ovog eksperimenta bio je da se analiziraju efekti inhibicije TrkB receptora na aktivnost uzvodnih regulatornih kinaza i same mTOR kinaze kao i efekti koje ANA-12 ostavlja na ponašanje GluN2A/- miševa u neuroinflamatornom modelu depresije.

Test prinudnog plivanja. U ovom testu uočen je značajan efekat ANA-12 tretmana ($t=2.57$, $p<0.05$) (Slika 24) na vreme nepomičnosti u FST testu. Naime i.p. tretman ANA-12 antagoniste je doveo do skraćenja vremena nepomičnosti kod GluN2A/- miševa u poređenju sa kontrolnim životinjama.



Slika 24. Efekti antagoniste TrkB receptora, ANA-12, na ponašanje GluN2A/- miševa tretiranih sa LPS. Vreme nepomičnosti (s) lipopolisaharidom tretiranih mužjaka miševa soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A/-), nakon i.p. tretmana sa antagonistom TrkB receptora, ANA-12, u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na grafiku i predstavljene su kao $*p<0.05$ za životinje tretirane sa ANA-12 u odnosu na kontrolnu grupu.

ANA-12 tretman je imao značajan efekat samo na nivo fosforilacije TrkB receptora u hipokampusu ($t=4.33$, $p<0.05$) (Tabela 4). Ovaj tretman je doveo do značajnog smanjenja nivoa p-TrkB u hipokampusu, ali nije imao uticaj na ukupne i fosforilisane nivoe ERK, Akt i mTOR kinaze niti u jednoj ispitivanoj moždanoj strukturi (Tabela 4).

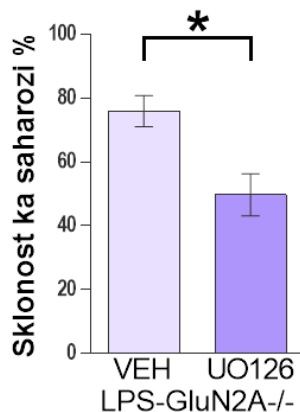
Tabela 4. Efekti antagoniste TrkB receptora, ANA-12, na aktivnost TrkB receptora, nizvodnih kinaza (ERK i Akt) i mTOR kinaze GluN2A-/- miševa tretiranih sa LPS. Nivoi ukupnih i fosforilisanih formi TrkB receptora i ERK, Akt i mTOR kinaze nakon i.p. tretmana sa ANA-12 antagonistom u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*p<0.05$ za životinje tretirane ANA-12 antagonistom u odnosu na kontrolnu grupu.

	Hipokampus		PFC	
	VEH	ANA-12	VEH	ANA-12
t-TrkB	100	86.17 \pm 7.36	100	89.47 \pm 6.72
p-TrkB	100	47.90\pm12.02*	100	92.12 \pm 8.12
t-ERK	100	111.24 \pm 9.52	100	86.65 \pm 4.52
p-ERK	100	106.00 \pm 5.87	100	103.98 \pm 2.88
t-Akt	100	103.15 \pm 5.22	100	87.80 \pm 4.80
p-Akt	100	111.22 \pm 4.41	100	91.65 \pm 3.80
t-mTOR	100	93.95 \pm 5.91	100	81.64 \pm 11.97
p-mTOR	100	85.63 \pm 5.49	100	97.47 \pm 5.79

4.7. Analiza efekata ERK inhibitora, UO126, na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta GluN2A-/- miševa u neuroinflamatornom modelu depresije (Eksperiment III)

U eksperimentu I uočeno je da je kod WT miševa tretiranih sa LPS, koji su ispoljavali ponašanje nalik depresivnom, jedino nivo fosforilisane forme ERK kinaze bio smanjen i to kako u hipokampusu tako i u PFC (za razliku od Akt i GSK-3 β čija je promena detektovana samo u PFC). Sa druge strane kod GluN2A-/- životinja tretiranih sa LPS, koje nisu ispoljavale ponašanje nalik depresivnom, nisu uočene promene u nivoima p-ERK. Uzimajući u obzir ove podatke postavlja se pitanje: da li je aktivnost ERK kinaze odgovorna za nizvodne promene u aktivnosti mTOR signalnog puta i različito ponašanje GluN2A-/- i WT miševa nakon LPS tretmana?

Da bi se dao odgovor na ovo pitanje, GluN2A-/- miševi tretirani sa LPS su dodatno bili ICV tretirani sa ERK inhibitorom (UO126), a 18 h nakon primene inhibitora mereni su efekti inhibitora na ponašanje životinja, samu ERK aktivnost i aktivnost nizvodnog mTOR signalnog puta.

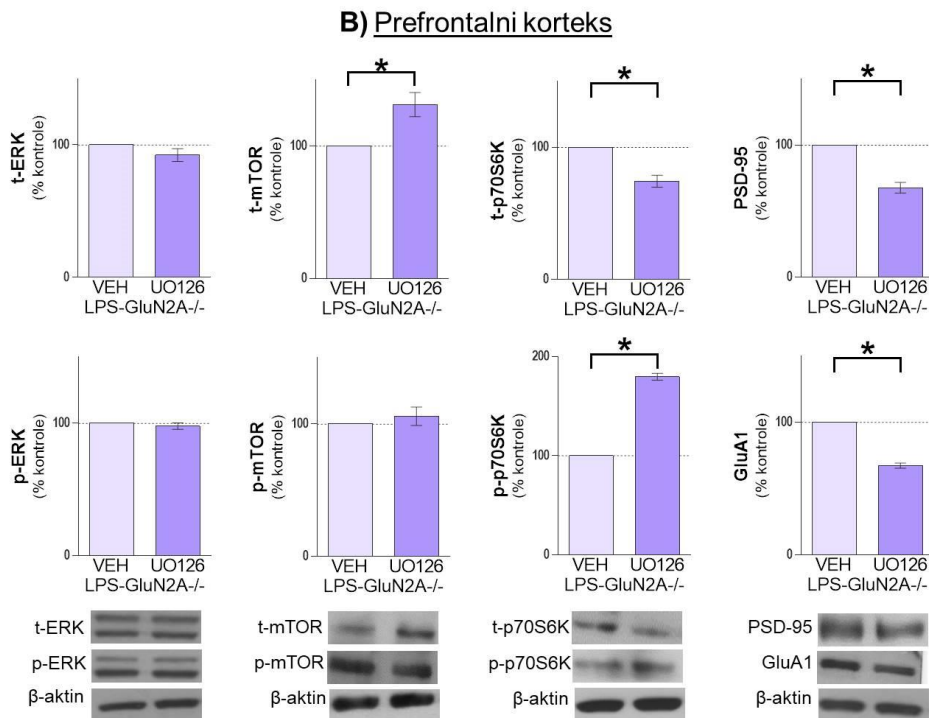
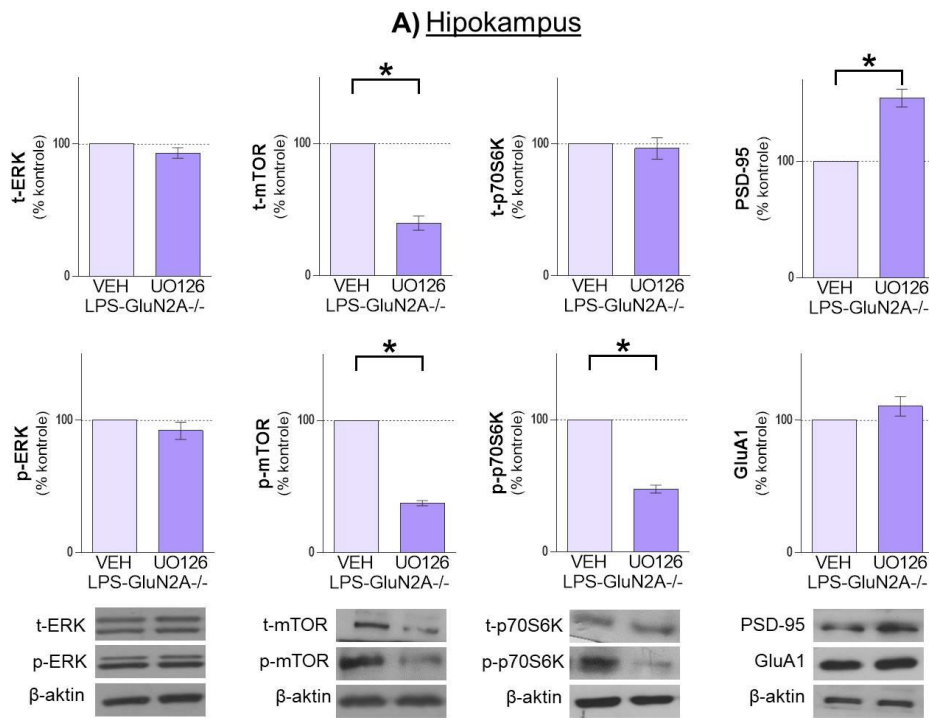


Slika 25. Efekat UO126 inhibitora, 18 h nakon njegove primene, na ponašanje GluN2A-/- miševa tretiranih sa LPS. Sklonost ka saharozi (%) lipopolisaharidom tretiranih mužjaka miševa soja sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinicu NMDA receptora (GluN2A-/-), 18 h nakon ICV tretmana sa UO126 inhibitorom u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao $*p < 0.05$ za životinje tretirane sa UO126 inhibitorom u odnosu na kontrolnu grupu.

Test sklonosti ka saharozi. U ovom testu uočen je značajan efekat UO126 tretmana na sklonost ka saharozi ($t=3.19$, $p < 0.05$) (Slika 25). Naime ICV tretman ERK inhibitorom je doveo do smanjene sklonost ka saharozi kod GluN2A-/- miševa u poređenju sa kontrolnim životinjama.

U sinaptozomima hipokampusa nije uočen efekat UO126 inhibitora kako na fosforilisan, tako ni na ukupan ERK nivo, 18 h nakon ICV primene inhibitora. Sa druge strane tretman je imao značajni efekat na fosforilisanu i ukupnu formu mTOR kinaze ($t(9) = 35.62$; $p = 0.00012$ za p-mTOR; $t(8) = 11.12$; $p = 0.0004$ za t-mTOR $t(6) = 17.46$) (Slika 26A). Nivoi ovih proteina bili su značano sniženi kod UO126 tretiranih životinja u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje. Što se tiče p70S6K, uočen je glavni efekat tretmana i to samo na njegovu fosforilisanu formu p-p70S6K ($t(6) = 17.46$; $p = 0.00002$ za p-p70S6K) (Slika 26A), čiji je nivo bio značajno snižen usled tretmana sa UO126 inhibitorom u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim životinjama. Kada su u pitanju sinaptički markeri, inhibitor nije imao uticaj na nivo GluA1 proteina ali je imao uticaj na nivo PSD-95 ($t(7) = 7.96$; $p = 0.00094$ za PSD-95) (Slika 26A). Naime, uočen je povišen nivo PSD-95 proteina kod LPS-GluN2A-/- životinja tretiranih inhibitorom u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje.

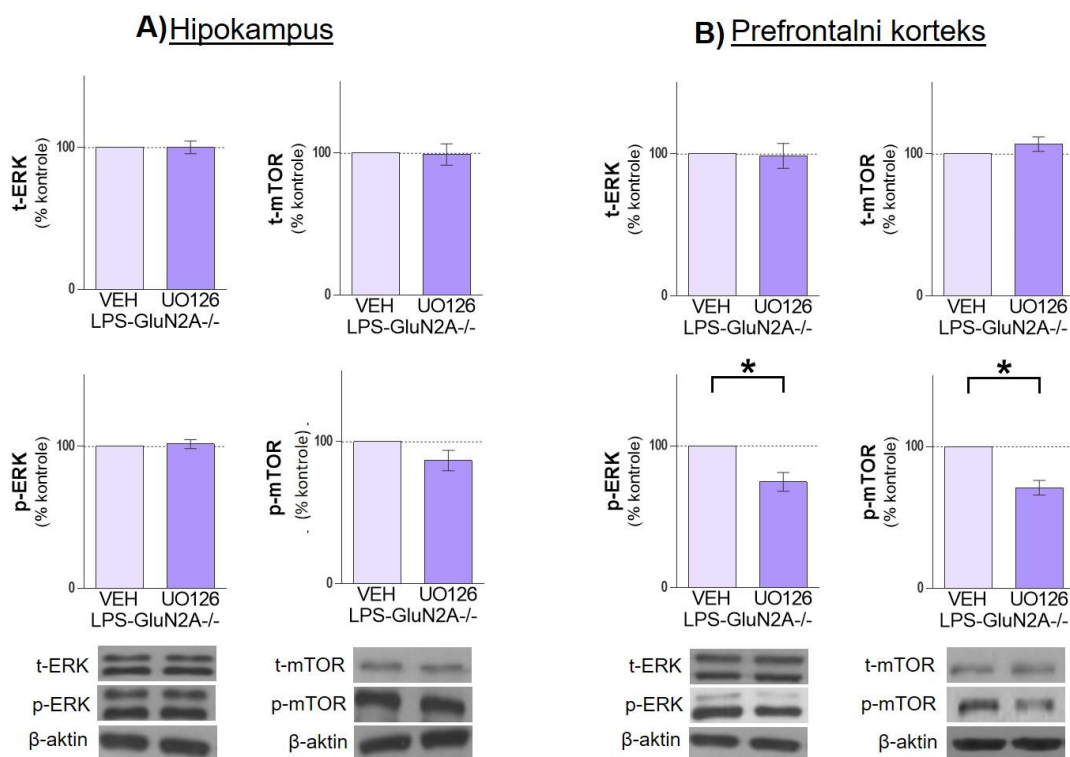
Kao i u hipokampusu, tretman UO126 inhibitorom nije uticao na fosforilisan i ukupan nivo ERK kinaze u PFC, 18 h nakon primene inhibitora (Slika 26B). Međutim, glavni efekti inhibitora su uočeni na nivoima sinaptičkih proteina, PSD-95 i GluA1 ($t(7) = 9.16$; $p = 0.00038$ za PSD-95; $t(6) = 16.96$; $p = 0.003$ za GluA1) (Slika 26B), koji su bili sniženi kod UO126 tretiranih životinja u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje. Što se tiče efekata inhibitora na fosforilisane forme mTOR kinaze i p70S6K, on je uočen samo kada je u pitanju p70S6K (Slika 26B). Naime uočeno je da je nivo p-p70S6K bio povećan kod UO126 tretiranih životinja u odnosu na odgovarajuće kontrole. Tretman je imao efekat na ukupni nivo mTOR kinaze i p70S6K ($t(8) = 3.43$; $p = 0.0089$ za t-mTOR; $t(6) = 5.65$; $p = 0.00013$ for t-p70S6K) (Slika 26B). U sinaptozomima PFC uočen je snižen ukupan nivo p70S6K usled UO126 tretmana, dok je tretman imao suprotan efekat na ukupne nivoe mTOR kinaze.



Slika 26. Efekti UO126 inhibitora, 18 h nakon njegove primene, na aktivnost mTOR signalnog puta GluN2A^{-/-} miševa tretiranih sa LPS. Nivoi ukupnih i fosforilanih formi ERK, mTOR, p70S6K i novoe PSD-95 i GluA1 proteina u sinaptozomima hipokampusa (A) i prefrontalnog korteksa (B), 18 h nakon ICV tretmana sa UO126 inhibitorom u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane UO126 inhibitorom u odnosu na kontrolnu grupu.

U cilju sagledavanja kako inhibicija ERK kinaze u vremenskom periodu pre 18. sata utiče na ponašanje i biokemijske parametre, sprovedeni su dodatni eksperimenti u kojima je ispitan efekat inhibitora 1 h i 4 h nakon njegove primene.

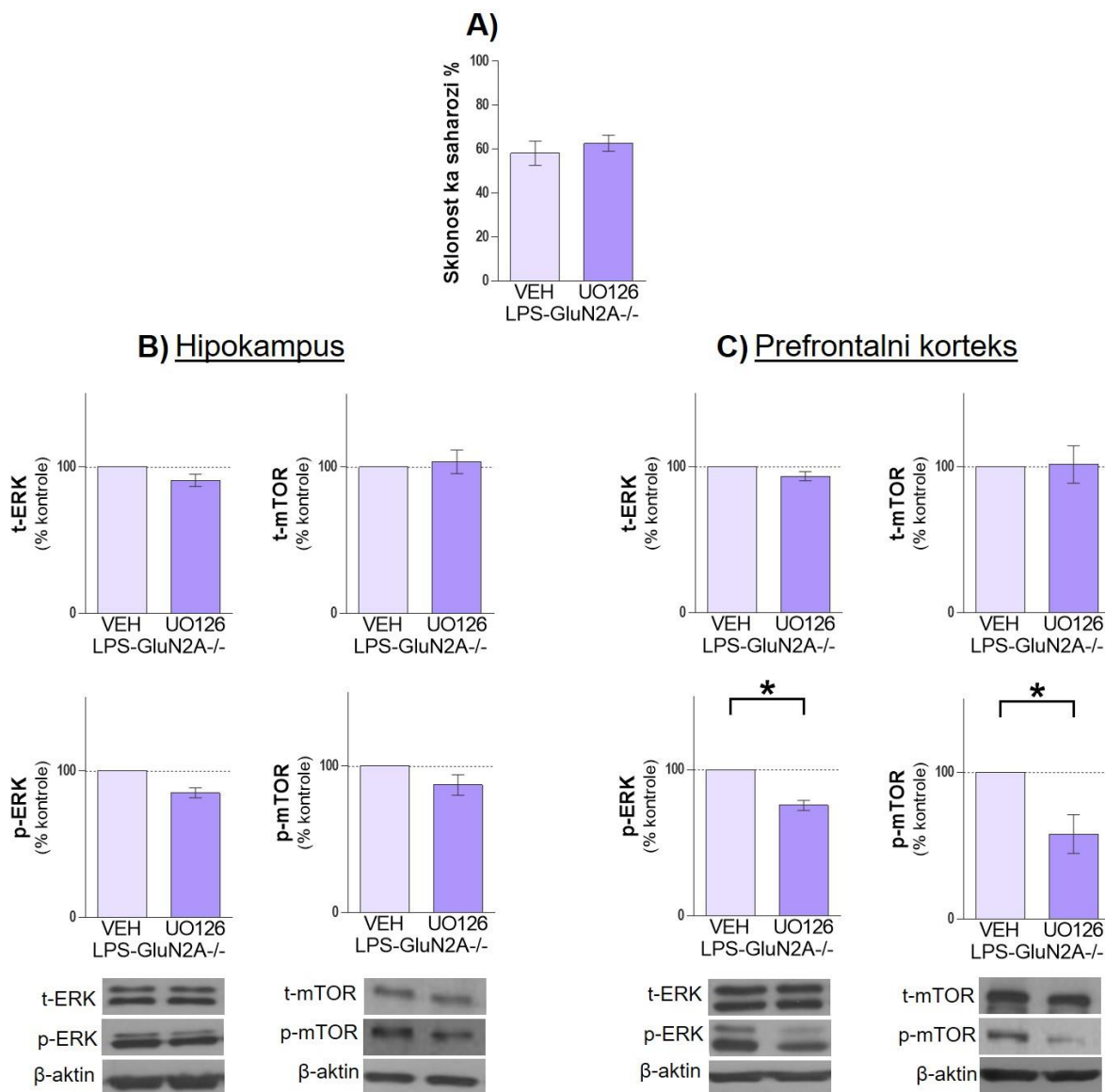
U hipokampusu nije uočen efekat UO126 inhibitora na ukupne i fosforilisane nivoe ERK i mTOR kinaze, kako u prvom satu nakon tretmana inhibitorom tako i u 4. satu nakon tretmana (Slika 27A i 28A).



Slika 27. Efekti UO126 inhibitora, 1 h nakon njegove primene, na aktivnost mTOR signalnog puta GluN2A^{-/-} miševa tretiranih sa LPS. Nivoi ukupnih i fosforilisanih formi ERK i mTOR kinaze, u sinaptozomima hipokampusa (A) i prefrontalnog korteksa (B), 1 h nakon ICV tretmana sa UO126 inhibitorom u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja ± SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane UO126 inhibitorom u odnosu na kontrolnu grupu.

U PFC takođe nije uočen efekat inhibitora na ukupan nivo ERK i mTOR kinaze u prvom i četvrtom satu nakon primene inhibitora (Slika 27B i 28B). Međutim, uočen je efekat inhibitora na nivoe fosforilisanih formi ERK i mTOR kinaze koji su bili sniženi kako u prvom satu nakon primene inhibitora ($t(8) = 4.99$; $p = 0.0016$ za p-ERK; $t(6) = 7.79$; $p = 0.002$ za p-mTOR) (Slika 27B) tako i 4 h nakon njegove primene ($t(8) = 9.13$; $p = 0.0017$ za p-ERK; $t(6) = 4.48$; $p = 0.0041$ za p-mTOR) (Slika 28C).

Zanimljivo je da, iako je UO126 tretman inhibirao ERK i mTOR aktivnost u PFC, 4 h nakon primene, to nije uticalo na ponašanje životinja ispitivano u istoj vremenskoj tački (Slika 28A).



Slika 28. Efekti UO126 inhibitora, 4 h nakon njegove primene, na ponašanje i aktivnost ERK i mTOR konaze GluN2A^{-/-} miševa tretiranih sa LPS. Sklonost ka saharozi (%) (A), nivoi ukupnih i fosforilisanih formi ERK i mTOR kinaze, u sinaptosomima hipokampusa (B) i prefrontalnog korteksa (C), 4 h nakon ICV tretmana sa UO126 inhibitorom u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su naznačene na graficima i predstavljene kao $*p < 0.05$ za životinje tretirane sa UO126 inhibitorom u odnosu na kontrolnu grupu.

5. DISKUSIJA

Istraživanja sve više ističu značajnu ulogu glutamatnog neurotransmiterskog sistema u patofiziologiji depresije. U neuroinflamatornom modelu depresije preterana aktivnost glutamatnog NMDA receptora doprinosi nastanku ponašanja nalik depresivnom kod životinja. Takođe, jedni od glavnih kandidata za razvoj antidepresiva nove generacije jesu neosektivni antagonisti NMDA receptora koji pokazuju veliki antidepresivan potencijal ali je zbog neželjenih efekata njihova upotreba u kliničkoj praksi ograničena. Za razliku od neselektivnih antagonista NMDA receptora, uloga specifičnih subjedinica NMDA receptora u patofiziologiji depresije uzrokovane neuroinflamacijom nije dovoljno istražena, a definisanje njihovih uloge u nastanku depresije moglo bi da dovede do boljeg razumevanja ove bolesti i doprinese efikasnijoj terapiji.

U ovoj doktorskoj disertaciji, po prvi put je pokazana značajna uloga GluN2A subjedinice NMDA receptora u posredovanju efekata inflamacije na mehanizme koji dovode do nastanka ponašanja nalik depresivnom kod miševa.

5.1. Efekat LPS tretmana na ponašanje WT i GluN2A^{-/-} miševa

Veliki broj kliničkih i prekliničkih studija svedoči o antidepresivnim svojstvima neselektivnih antagonista NMDA receptora poput lanicemina (AZD 6765) (Agbo i sar., 2017), memantina (Moryl i sar., 1993) i ketamina (Yang i sar., 2019). Sa druge strane, postoji svega par farmakoloških studija, koje su pokušale da definišu doprinos pojedinačnih subjedinica NMDA receptora stanju depresije. Primeri su, upotreba supstance NVP-AAM077 koja je selektivni antagonist GluN2A subjedinice, ili supstanca Ro 25-6981 koja je selektivni antagonist GluN2B subjedinice (Gordillo-Salas i sar., 2018; Pochwat i sar., 2017). Međutim, kod ovakvih farmakoloških studija problem predstavlja nedovoljna selektivnost sintetisanih antagonista, pogotovo antagoniste za GluN2A subjedinicu. Naime za razliku od Ro 25-6981 antagoniste čija je selektivnost za GluN2B subjedinicu u odnosu na GluN2A subjedinicu 500 puta jača (Gill i sar., 2002), selektivnost NVP-AAM077 antagoniste za GluN2A subjedinicu u odnosu na GluN2B subjedinicu je svega 5 do 10 puta jača (Frizelle i sar., 2006). Ovakva niska selektivnost antagoniste za GluN2A subjedinicu može da bude odgovorna za varijabilnost rezultata studija sa NVP-AAM077

antagonistom i sugeriše da je njegova upotreba u definisanju specifične uloge GluN2A subjedinice NMDA receptora u fiziološkim i patofiziološkim stanjima ograničena.

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su miševi sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinice NMDA receptora, što je omogućilo apsolutno specifično definisanje uloge GluN2A subjedinice NMDA receptora u posredovanju efekata inflamacije na biohemijske parametre i ponašanje nalik depresivnom kod životinja.

Rezultati testova ponašanja dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da LPS tretman u dozi od 0,83 mg/kg, 24h nakon primene, dovodi do ponašanje nalik depresivnom kod WT miševa, tako što povećava anhedoniju, merenu SPT testom i bespomoćnost, merenu FST testom. Ovi rezultati su u skladu sa studijama koje pokazuju da jedna LPS doza u koncentraciji 0,5 ili 0,83 mg/kg izaziva ponašanje nalik depresivnom što je potvrđeno FST, TST i SPT testovima ponašanja i to 24h nakon LPS primene (Zhao i sar., 2019; i sar., 2009; Walker i sar., 2013; Juruena i sar., 2019).

Suprotno WT životinjama, kod GluN2A^{-/-} miševa LPS tretman nije doveo do pojave ponašanja nalik depresivnom, što je pokazano kroz veću sklonosti ka saharozi u SPT testu i kraćim vremenom nepomičnosti GluN2A^{-/-} životinja u FST testu u poređenju sa WT životinjama nakon LPS tretmana.

Takođe rezultati studija ponašanja u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da se u vreme testova ponašanja, 24h nakon LPS primene, lokomotorna aktivnost kako WT tako i GluN2A^{-/-} miševa ne razlikuje od lokomotorne aktivnosti kontrolnih životinja. Ovaj rezultat je bitan za ocenu relevantnosti ovog eksperimentalnog modela za izučavanje ponašanja životinja jer se rezultati testova ponašanja mogu pripisati isključivo depresivnom fenotipu životinja i nisu posledica smanjene lokomotorne aktivnosti koja se može pojaviti kao posledica akutne infekcije nakon LPS tretmana. Ovi podaci su u skladu sa prethodnim studijama (O'connor i sar., 2009; Walker i sar., 2013) koje su pokazale da se 24 h nakon LPS tretmana lokomotorna aktivnost životinja vraćena na nivo kontrola.

5.2. Efekat LPS tretmana na nivo IL-6 u mozgu WT i GluN2A-/- miševa

Kao što je već pomenuto IL-6 je jedan od glavnih proinflamatornih markera koji se povezuje sa depresijom, gde mnoge kliničke i prekliničke studije pokazuju da je porast nivoa IL-6 kako na periferiji tako i u mozgu povezan sa izloženošću organizma različitim vrstama stresora. U odnosu na ostale proinflamatorne citokine mnoge studije ističu da bi IL-6 mogao da ima posebnu ulogu u patogenezi i somatskim posledicama depresije kao i u prognozi uspešnosti lečenja depresije i odgovora na antidepresivnu terapiju. Takođe IL-6 je jedan od najčešće proučavanih proinflamatornih citokina u animalnim modelima depresije (Ting i sar., 2020). Uzimajući u obzir navedeno, u ovoj doktorskoj disertaciji nivo IL-6 u mozgu miševa je ispitivan kao marker neuroinflamacije.

U ovoj studiji detektovan je povećan nivo IL-6 u ukupnom ćelijskom ekstraktu kako u PFC tako i u hipokampusu WT miševa nakon LPS tretmana (Tabela 5), što je u skladu sa prethodnim istraživanjima koja pokazuju da LPS tretman dovodi do aktivacije mikroglije i produkcije inflamatornih medijatora u različitim moždanim strukturama. Na primer, pokazano je da LPS tretman povećava nivoe IL-1 β , TNF- α i IL-6 u hipotalamusu, hipokampusu i moždanom stablu miševa (Datta i Opp, 2008). Takođe, tretman životinja jednom i.p. LPS dozom od 0.83 mg/kg, doza koja je korišćena u ovoj tezi, dovodi do povećanja ekspresije iRNK za IL-1 β , TNF- α i IFN- γ u mozgu (O'connor i sar., 2009) i nivoa IL-6 u plazmi miševa (Walker i sar., 2013) čak 28 h nakon tretmana. Dobro je poznato i da povišen nivo proinflamatornih citokina IL-6, TNF- α i IFN- γ indukuje aktivnostIDO enzima u mozgu (Müller i sar., 2011; Schwieler i sar., 2015) što za posledicu ima pojavu ponašanja nalik depresivnom koje je delom posredovano aktivacijom NMDA receptora hinolinskom kiselinom a što može biti slučaj i u našem modelu kod WT miševa tretiranih sa LPS koji su pokazali ponašanje nalik depresivnom.

Sa druge strane, LPS tretman kod GluN2A-/- miševa nije imao uticaj na nivo IL-6 u posmatranim moždanim strukturama. Ovakav rezultat bi mogao biti posledica NMDA receptorom regulisane aktivacije mikroglije i otpuštanje citokina. Naime, *in vitro* studije na primarnoj kulturi ćelija mikroglije pokazale su da stimulacija aktivnosti NMDA receptora dovodi do proliferacije i aktivacije mikroglije

i otpuštanja proinflammatoryh medijatora (Raghunatha i sar., 2020). Takođe, *in vivo* studije pokazale su da stres ograničavanjem pokreta životinje dovodi do povećane aktivnosti NMDA receptora i proliferacije mikroglije koja može biti zaustavljena primenom antagonista NMDA receptora. (Nair i Bonneau, 2006).

5.3. Efekti LPS tretmana na markere neuroplastičnosti kod WT i GluN2A^{-/-} miševa

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da bi ponašanje nalik depresivnom koje je prisutno kod WT miševa, moglo biti povezano sa smanjenim nivoima markera neuroplastičnosti, BDNF i PSA-NCAM proteina kako u PFC tako i u hipokampusu (Tabela 5). Ovi rezultati su u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da je tretman sa LPS povezan sa sniženim BDNF nivoom, u PFC i hipokampusu miševa i pacova (Zhang i sar., 2015a; Guan i Fang, 2006), što se smatra važnim mehanizmom u nastanku ponašanja nalik depresivnom. (Bai i sar., 2012; Zhang i sar., 2015b; Zhang i sar., 2017). Smanjenje nivoa BDNF proteina kod WT životinja tretiranih sa LPS može biti posledica povećanog nivoa IL-6 koji je prisutan kod ovih životinja. Naime, prekliničke studije su pokazale da proinflammatory citokini mogu direktno dovesti do smanjenja transkripcije gena za BDNF preko smanjene fosforilacije CREB proteina (engl. *cyclic AMP-response element-binding protein*) ili preko NF- κ B (eng. *nuclear factor kappa B*) puta. (Lahiri i sar., 2002; Murphy i sar., 2000; Sarkar i sar., 2008). Takođe, smanjen PSA-NCAM nivo koji je detektovan kod WT miševa koji ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom je u saglasnosti sa ranijim studijama koji ukazuju na povezanost smanjenog PSA-NCAM nivoa i stresom izazvanog kognitivnog deficita (Pham i sar., 2003) i promena u ponašanju u eksperimentalnim modelima depresije (Dityatev i sar., 2004; Wainwright i Galea, 2013). Takođe, studije ukazuju da se smanjen nivo polisijalinizacije NCAM proteina može povećati BDNF administracijom tj. stimulacijom aktivnosti BDNF signalnog puta (Muller i sar., 2000). Na ovu vezu ukazuju i rezultati dobijeni u okviru ove disertaciji, s obzirom da je smanjen nivo PSA-NCAM proteina povezan sa smanjenim BDNF nivoom kod WT životinja tretiranih sa LPS u obe analizirane moždane strukture.

Zajedno, dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu interakciju BDNF i PSA-NCAM signalnog puta u pojavi ponašanja nalik depresivnom kod WT miševa u uslovima neuroinflamacije.

Suprotno WT životinjama, kod GluN2A^{-/-} miševa, LPS tretman nije doveo do pojave ponašanja nalik depresivnom, a takođe nije uticao na nivo PSA-NCAM proteina niti u jednoj analiziranoj strukturi, međutim tretman je doveo do povećanja nivoa BDNF proteina u hipokampusu. Porast nivoa BDNF proteina u hipokampusu GluN2A^{-/-} životinja tretiranih sa LPS, koje nisu ispoljavale ponašanje nalik depresivnom, je u skladu sa studijama koje pokazuju da se povećana ekspresija BDNF proteina u mozgu nalazi u osnovi dejstva mnogih antidepresiva (Björkholm i Monteggia, 2016). Povećanje BDNF nivoa u hipokampusu može biti posledica povećane aktivnosti PI3/Akt/mTOR signalnog puta koji smo u ovoj studiji i detektovali u hipokampusu GluN2A^{-/-} miševa, a pokazano je da upravo aktivacija PI3/Akt/mTOR signalnog puta promoviše translaciju BDNF proteina (Dijkhuizen i Ghosh, 2005). O aktivnosti mTOR signalnog puta ćemo više govoriti u narednim poglavljima.

Različiti efekat tretmana na nivo PSA-NCAM proteina kod WT i GluN2A^{-/-} miševa može biti posledica NMDA receptorom regulisane polisijalinizacije NCAM proteina. Prethodna *in vivo* i *in vitro* istraživanja su pokazala da aktivnost NMDA receptora utiče na ekspresiju kako NCAM (Bouzioukh i sar., 2001; Schuster i sar., 1998) tako i PSA-NCAM proteina (Bouzioukh i sar., 2001; Singh i Kaur, 2009; Nacher i sar., 2002). Međutim, u navedenim studijama u ispitivanju uloge NMDA receptora u polisijalinizaciji NCAM proteina korišćeni su neselektivni antagonisti NMDA receptora poput MK-801 ili tretman N-Metil-D-aspartinskom kiselinom (eng. *N-metil-D-aspartat*, NMDA) kao agoniste NMDA receptora, dok uloga specifičnih subjedinica NMDA receptora u polisijalinizaciju NCAM proteina još uvek nije definisana. Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put ukazuju na specifičnu ulogu GluN2A subjedinice NMDA receptora u polisijalinizaciji NCAM proteina u uslovima neuroinflamacije. Naime, naši rezultati sugerišu da je smanjenje nivoa PSA-NCAM proteina u PFC i hipokampusu usled LPS tretmana posredovan GluN2A subjedinicom. Održiv PSA-NCAM nivo usled LPS tretmana kod GluN2A^{-/-} miševa svakako može doprineti rezistenciji ovih životinja na razvoj depresivnog fenotipa.

Zaista, studije su pokazale pozitivan efekat PSA-NCAM u tretmanu depresije gde hroničan tretman antidepressivima, fluoksetinom (selektivnim inhibitor preuzimanja serotonina) ili imipraminom (triciklični antidepressiv), povećava ekspresiju PSA-NCAM proteina u PFC i hipokampusu glodara (Encinas i sar., 2006; Sairanen i sar., 2007; Varea i sar., 2007).

Što se tiče izoformi NCAM proteina, uočen je region-specifičan efekat LPS tretmana na njihov nivo. Naime, promene u nivoima NCAM izoformi (120, 140 i 180 kDa) uočene su samo u PFC. LPS tretman je u PFC WT miševa doveo do smanjenja nivoa samo NCAM izoforme od 140 kDa (Tabela 5), što je u skladu sa publikovanim rezultatima dobijenim u sličnim eksperimentalnim modelima depresije (Touyarot i sar., 2002). Ovakav parcijalan efekat LPS tretmana na NCAM izoforme može biti posledica efekta neuroinflamacije (ili stresora druge vrste) na proces alternativnog splajsovanja NCAM proteina. Naime, pokazano je da neuroinflamacija izaziva promene u alternativnom splajsovanju neuroadhezivnog proteina neureksina (eng. *neurexins*) u PFC (Marchese i sar., 2021). Svakako, smanjenje nivoa izoforme od 140 kDa moglo bi doprineti razvoju depresivnog fenotipa kod WT miševa s obzirom da je u prekliničkim modelima depresije izazvane hroničnim stresom pokazano smanjenje ekspresije NCAM iRNK i nivo samog proteina u PFC i hipokampusu (Nacher i sar., 2004; Sandi i Loscertales, 1999; Touyarot i sar., 2002; Venero i sar., 2002). Takođe, studije na miševima sa trajno utišanom NCAM ekspresijom (NCAM^{-/-} soj miševa) pokazuju naglašene simptome ponašanja nalik depresivnom poput dužeg vremena nepomičnosti u TST testu i smanjene sklonosti ka saharozi u SPT testu (Aonurm-Helm i sar., 2008).

S druge strane, u hipokampusu GluN2A^{-/-} miševa, uočen je porast sve tri NCAM izoforme nakon LPS tretmana što svakako može doprineti rezistenciji na razvoj depresivnog fenotipa. Povišeni nivoi navedenih NCAM izoformi u PFC mogu biti posledica izmenjene ekspresije subjedinica NMDA receptora, o čemu će biti reči u narednom poglavlju.

Sumirano, rezultati ove doktorske teze sugerišu da odsustvo depresivnog fenotipa kod GluN2A^{-/-} miševa tretiranih sa LPS, može biti posledica povišenog BDNF nivoa u hipokampusu, povišenog nivoa svih NCAM izoformi u PFC i očuvanog nivoa PSA-NCAM proteina u obe analizirane moždane structure.

5.4. Efekti LPS tretmana na nivoe subjedinic AMPA i NMDA receptora kod WT i GluN2A-/- miševa

Uzimajući u obzir značajnu ulogu glutamatne signalizacije ne samo u patofiziologiji depresije povezanoj sa inflamacijom već i u regulaciji neuroplastičnosti, analizirali smo efekte LPS tretmana na nivoe subjedinic glutamatnih AMPA i NMDA receptora u PFC i hipokampusu (Tabela 5).

Ako posmatramo oba soja miševa, LPS tretman je imao značajniji efekat na promenu nivoa subjedinic glutamatnih receptora u PFC u odnosu na hipokampus. Tačnije, jedine promene u hipokampusu, uzimajući u obzir subjedince AMPA i NMDA receptora bile su pad nivoa GluA1 i GluA4 subjedinic kod WT životinja tretiranih sa LPS. Ovo smanjenje nivoa subjedinic AMPA receptora može dodatno doprineti smanjenju nivoa BDNF proteina koji je detektovan kod ovih životinja s obzirom da je BDNF ekspresija zavisna od aktivnosti AMPA receptora (Jourdi i sar., 2009; Mackowiak i sar., 2002).

Što se tiče subjedinic AMPA receptora u PFC, rezultati ove studije su pokazali da je kod GluN2A-/- miševa prisutan značajno viši nivo svih izmerenih subjedinic AMPA receptora (GluA1, GluA3 i GluA4) u odnosu na WT životinje, bez obzira na tretman. Sličan rezultat je zapažen u još jednoj studiji koja govori o povećanom prisustvu AMPA receptora u granuloza ćelijama C1 regiona hipokampusa GluN2A-/- miševa u poređenju sa WT životinjama (Kannagara i sar., 2014). Iako je u ovoj disertaciji ovaj rezultat po prvi put uočen u PFC, uticaj genotipa na nivo subjedinic AMPA receptora u hipokampusu nije uočen. Jedno od mogućih objašnjenja za navedenu nekonzistentnost rezultata može biti izbor analiziranog regiona hipokampusa. Naime, analiza subjedinic AMPA receptora u ovoj disertaciji rađena je na sinaptosomalnoj frakciji homogenata tkiva celog hipokampusa a takvi rezultati ne moraju biti saglasni sa rezultatima dobijenih analizom specifičnog regiona hipokampusa, odnosno specifičnog tipa ćelija ovog moždanog regiona. Kao što smo već pominjali, sastav NMDA receptora diktira njegova biofizička svojstva, intenzitet i vremensku dinamiku influksa kalcijuma u ćeliju (Zhu i Paoletti, 2015). Uočeno povećanje nivoa subjedinic AMPA receptora u PFC kod GluN2A-/- životinja može biti posledica izmenjene dinamike influksa Ca^{2+} jona u ćeliju ovih životinja, što se smatra bitnim faktorom u distribuciji AMPA receptora. Naime, jedna studija je

pokazala drastičnu promenu vremenske dinamike i količine influksa kalcijuma u ćeliju kod GluN2A^{-/-} miševa u poređenju sa WT miševima (Kannangara i sar., 2014) što može uzrokovati izmenjenu aktivnost nekoliko kalcijum-zavisnih kinaza u citosolu, poput CaMKII (eng. *calcium-calmodulin-dependent kinase II*) i protein fosfataza, a čija aktivnost, između ostalog, reguliše distribuciju subjedinica AMPA receptora (Lu i sar., 2014).

Tabela 5. Sažeti prikaz promena nivoa IL-6, markera neuroplastičnosti i subjedinica AMPA i NMDA receptora u hipokampusu i prefrontalnom korteksu WT i GluN2A^{-/-} životinja tretiranih sa LPS. Strelice označavaju povećanje ili smanjenje nivoa proteina usled LPS tretmana a u poređenju sa kontrolama, dok znak jednakosti predstavlja nepromenjen nivo proteina.

	Hipokampus		PFC	
	WT	GluN2A ^{-/-}	WT	GluN2A ^{-/-}
<i>Efekte LPS tretmana u poređenju sa kontrolama</i>				
IL-6	↑	=	↑	=
BDNF	↓	↑	↓	=
PSA-NCAM	↓	=	↓	=
NCAM 120 kDa	=	=	=	↑
NCAM 140 kDa	=	=	↓	↑
NCAM 180 kDa	=	=	=	↑
NR1	=	=	↑	↓
NR2A	=	=	↑	
NR2B	=	=	↑	↓
GluA1	↓	=	↓	=
GluA3	=	=	=	↑
GluA4	↓	=	=	=

Povećanje nivoa subjedinica AMPA receptora kod GluN2A^{-/-} miševa svakako može doprineti njihovoj rezistenciji na tretman sa LPS i razvoj ponašanja nalik depresivnom. Studije su pokazale da primena konvencionalnih antidepresiva ili elektrokonvulzivne atidepresivne terapije povećava ekspresiju subjedinica AMPA receptora (Gould i sar., 2008; Reti & Baraban, 2000; Svenningsson i sar., 2001). Međutim, etiologiju pojave povećane ekspresije subjedinica AMPA receptora kod GluN2A^{-/-} miševa tek treba jasno definisati s obzirom da je nepoznato da li i u kojoj meri ova pojava predstavlja kompenzatorni i adaptacioni mehanizam na izmenjenu glutamatnu neurotransmisiju kod miševa bez funkcionalne GluN2A subjedinice NMDA receptora.

Sa druge strane u PFC efekat LPS tretmana na nivoe subjedinica NMDA receptora je bio suprotan kod WT i GluN2A^{-/-} miševa. Naime, LPS je doveo do povećanja nivoa svih subjedinica NMDA receptora kod WT životinja a do sniženja njihovih nivoa kod GluN2A^{-/-} miševa. Interesantno je da su promene nivoa NCAM izoformi u PFC kako WT tako i GluN2A^{-/-} miševa bile suprotne promenama nivoa subjedinica NMDA receptora. S obzirom na već pominjanu povezanost aktivnosti NMDA receptora i NCAM ekspresije, rezultati ove disertacije sugerišu da je ekspresija NCAM izoformi negativno regulisana NMDA receptorom.

5.5. Efekti LPS tretmana na aktivnost mTOR signalnog puta kod WT i GluN2A^{-/-} miševa

Antidepresivna svojstva neselektivnih antagonista NMDA receptora su posredovana aktivnošću mTOR signalnog puta koji indukuje translaciju sinaptičkih proteina i promoviše sinaptogenezu. Iako se preklinička istraživanja fokusiraju na otkrivanje molekularnih mehanizama koje stoje iza antidepresivnih efekata neselektivnih antagonista NMDA receptora, doprinos različitih subjedinica ovog receptora ostaje u velikoj meri nepoznata. U ovoj disertaciji je ispitivana uloga GluN2A subjedinice NMDA receptora na aktivnost mTOR signalnog puta preko promena u nivou i fosforilaciji njegovih uzvodnih regulatornih kinaza (ERK, Akt i GSK-3 β) i nizvodnih efekatora (mTOR i p70S6K), kao i nivou dva važna sinaptička markera GluA1 i PSD-95 u uslovima neuroinflamacije (Tabela 6).

Molekularne analize su pokazale da je ponašanje nalik depresivnom kod WT životinja nakon LPS tretmana asocirano sa smanjenom aktivnošću mTOR signalnog puta. Naime, smanjena fosforilacija mTOR kinaze u hipokampusu i PFC korelira sa smanjenom aktivnošću njegovih uzvodnih regulatornih kinaza tačnije, smanjenim nivoom p-ERK kinaze u hipokampusu i p-ERK, p-Akt i p-GSK-3 β u PFC što je u skladu sa studijama koje govore da nivo fosforilacije ERK, Akt i GSK-3 β (na Ser9) korelira sa aktivnošću mTOR (Doble i Woodgett, 2003; Zoncu i sar., 2011). Smanjena mTOR aktivnost je asocirana sa smanjenom aktivnošću nizvodnog mTOR efekatora, p70S6K i smanjenim nivoima sinaptičkih markera GluA1 i PSD-95 u PFC i hipokampusu.

Tabela 6. Sažeti prikaz promena aktivnosti mTOR signalnog puta i nivoa sinaptičkih markera u hipokampusu i prefrontalnom korteksu kod WT i GluN2A^{-/-} životinja tretiranih sa LPS. Strelice označavaju povećanje ili smanjenje nivoa proteina usled LPS tretmana a u poređenju sa kontrolama, dok znak jednakosti predstavlja nepromenjen nivo proteina.

	Hipokampus		PFC	
	WT	GluN2A ^{-/-}	WT	GluN2A ^{-/-}
<i>Efekti LPS tretmana u poređenju sa kontrolama</i>				
t-ERK	=	=	=	=
p-ERK	↓	=	↓	=
t-Akt	↓	=	=	=
p-Akt	=	↑	↓	=
t-GSK-3β	=	=	=	=
p-GSK-3β	=	=	↓	=
t-mTOR	=	=	=	=
p-mTOR	↓	↑	↓	=
t-p70S6K	↓	↑	=	=
p-p70S6K	=	=	↓	=
GluA1	↓	=	=	=
PSD-95	↓	=	↓	=

Smanjena aktivnost mTOR signalnog puta kod WT životinja je praćena smanjenim nivoom BDNF proteina u obe strukture. BDNF otpuštanje i aktiviranje TrkB receptora i nizvodnog mTOR signalnog puta smatra se ključnim mehanizmom za brza i dugoročna antidepresivna dejstva antagonista NMDA receptora (Fukumoto i sar., 2019; Akinfiresoye i Tizabi, 2013). Rezultati dobijeni u ovoj tezi podržavaju datu hipotezu s obzirom da smanjenje nivoa BDNF proteina korelira sa smanjenom aktivnošću mTOR signalnog puta što ima za posledicu prodepresivan efekat na ponašanje životinja.

Sumarno, navedeni rezultati ističu značajnu ulogu mTOR signalnog puta u depresiji povezanoj sa inflamacijom, s obzirom da je kod WT životinja nakon LPS tretmana došlo do narušene sinaptogeneze što je u vezi sa uočenim smanjenjem aktivnosti mTOR signalnog puta (Dwyer i Duman, 2012; Athira i sar., 2020; Liu i sar., 2013).

Suprotno WT miševima, životinje sa trajno utišanom ekspresijom gena za GluN2A subjedinice NMDA receptora nakon LPS tretmana ne razvijaju ponašanje nalik depresivnom što je asocirano sa nepromenjenom ili čak i povećanom

aktivnošću mTOR kinaze u analiziranim moždanim strukturama. Naime, dok u PFC kod GluN2A-/- miševa nije došlo do promene u aktivnosti mTOR signalnog puta nakon LPS tretmana u hipokampusu je tretman doveo do povećanja aktivnosti same mTOR kinaze i ukupnog nivoa njegove efektorne kinaze, t-p70S6K, što je bilo asocirano sa nepromenjenom ekspresijom sinaptičkih markera u obe ispitivane strukture. Takođe, primećeno je da kao i kod WT životinja, kod GluN2A-/- životinja aktivnost mTOR signalnog puta nakon LPS tretmana prati nivo promene BDNF proteina koji je detektovan kod ovih životinja.

Sumarno, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je očuvana aktivnost mTOR signalnog puta i sinaptička stabilnosti u uslovima neuroinflamacije GluN2A-zavisna i štiti od nastanka depresije.

5.6. Efekat inhibicije komponenti mTOR signalnog puta na ponašanje GluN2A-/- miševa

S obzirom da miševi bez funkcionalne GluN2A subjedinice NMDA receptora, u uslovima neuroinflamacije, nisu pokazivali ponašanje nalik depresivnom a koje je bilo asocirano sa održivom i povećanom aktivnošću mTOR signalnog puta u poređenju sa WT životinjama, u daljim istraživanjima korišćenjem inhibitora i antagonista određenih komponenti mTOR signalnog puta cilj je bio izolovati molekularni mehanizam koji bi mogao biti odgovoran za rezistenciju GluN2A-/- miševa na razvoj depresivnog fenotipa.

5.6.1. Efekti antagoniste TrkB receptora na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta kod GluN2A-/- miševa tretiranih sa LPS

U prvoj studiji korišćen je antagonist TrkB receptora, ANA-12, s obzirom da je aktivacija TrkB receptora, usled vezivanja BDNF proteina, i nizvodnih regulatornih kinaza mTOR signalnog puta kao i same mTOR kinaze predloženi mehanizam antidepresivnog delovanja neselektivnih antagonista NMDA receptora (Sanacora i Schatzberg, 2015).

Kao što je već pominjano, BDNF-TrkB signalni put ima značajnu ulogu u patofiziologiji depresije i u molekularnim mehanizmima delovanja antidepresiva

(Castré i Rantamä, 2010; Duman i Monteggia, 2006a). Međutim, iako se pozitivni modulatori BDNF-TrkB signalnog puta pokazuju kao važni u mehanizmu antidepresivnog delovanja, inhibicija ovog signalnog puta ne dovodi nužno do nastanka depresije (MacQueen i sar., 2001; Saarelainen i sar., 2003; Zörner i sar., 2003). Podaci o efektima agonista i antagonista TrkB receptora na ponašanje životinja na prvi pogled deluju poprilično kontradiktorno. Na primer, u neuroinflamatornom modelu depresije, antidepresivan efekat agoniste TrkB receptora, 7,8-DHF (eng. *7,8-dihydroxyflavone*), može biti sprečen pretretmanom sa antagonistom TrkB receptora, ANA-12, dok samostalna i.p administracija kako agonista tako i antagonista TrkB receptora proizvodi antidepresivne efekte kod životinja (Zhang i sar., 2015b). Pojedini autori pokazali su da inhibicija kao i stimulacija TrkB signalnog puta u različitim moždanim regionima može izazvati antidepresivne efekte kod životinja. U skladu sa time, pokazano je da direkta infuzija 7,8-DHF (ali ne i ANA-12) u hipokampusu (regionima CA3 i DG) i u PFC, kao i direktna infuzija ANA-12 (ali ne i 7,8-DHF) u nukleus akumbensu (NAc) izaziva antidepresivan efekat u modelu naučene bespomoćnosti (eng. *learned helplessness model*) i neuroinflamatornom modelu depresije (Zhang i sar., 2015; Shirayama i sar., 2015). Međutim, fiziološki mehanizmi koji leže u osnovi antidepresivnih efekata liganada TrkB receptora nisu poznati. Štaviše, studije koje se bave ispitivanjem efekata aktivnosti TrkB receptora na ponašanje životinja se zadržavaju samo na fenotipskim posledicama koje inhibitori ili aktivatori TrkB signalnog puta ostavljaju na ponašanje životinja. O mehanizmima i promenama u signalnim putevima nizvodno od TrkB receptora, a koje mogu biti odgovorne za fenotipske efekte TrkB liganada se slabo zna.

Rezultati ove disertacije su pokazali da je smanjena fosforilacija TrkB receptora bila prisutna samo u hipokampusu nakon ANA-12 i.p. tretmana ali da nivoi fosforilisane i totalne forme sve tri uzvodne regulatorne mTOR kinaze (Akt, ERK, GSK-3 β), kao i aktivnost same mTOR kinaze nakon ANA-12 tretmana nije bila promenjena kako u hipokampusu tako i u PFC GluN2A-/- miševa (Tabela 7).

Tabela 7. Sažeti prikaz efekata ANA-12 antagoniste na aktivnost TrkB receptora i aktivnost mTOR signalnog puta u hipokampusu i prefrontalnom korteksu GluN2A/- životinja tretiranih sa LPS. Strelice označavaju povećanje ili smanjenje nivoa proteina usled ANA-12 tretmana u poređenju sa kontrolama, dok znak jednakosti predstavlja nepromenjen nivo proteina.

	Hipokampus		PFC	
	<i>Efekat ANA-12 antagoniste u poređenju sa kontrolama</i>			
t-TrkB	=	=	=	=
p-TrkB	=	↓	=	=
t-ERK	=	=	=	=
p-ERK	=	=	=	=
t-Akt	=	=	=	=
p-Akt	=	=	=	=
t-mTOR	=	=	=	=
p-mTOR	=	=	=	=

Što se tiče ponašanja životinja, i.p. administracija ANA-12 je indukovala antidepresivan efekat (merene FST testom) u poređenju sa kontrolama kod GluN2A/- miševa tretiranih sa LPS. Naime ovi rezultati su u saglasnosti sa studijama koje ističu antidepresivne efekte sistemske primene ANA-12 antagoniste na ponašanje životinja, (Zhang i sar., 2015a; Zhang i sar., 2015b; Cazorla i sar., 2011). Sa druge strane, promene u ponašanju životinja indukovane ANA-12 nisu bile povezane sa aktivnošću mTOR signalnog puta u PFC i hipokampusu. Ovaj zaključak zapažen je u još jednoj studiji koja sugeriše da antidepresivna svojstva ANA-12 nisu posredovana aktivnošću mTOR signalnog puta. Naime, ICV tretman rapamicinom (mTOR inhibitorom), neposredno pre i.p. administracije 7,8-DHF i ANA-12, je blokirao antidepresivne efekte 7,8-DHF agoniste ali ne i antagoniste, ANA-12 (Zhang i sar., 2015b).

Sumarno, rezultati su pokazali da efekti ANA-12 antagonistice na ponašanje GluN2A/- miševa nisu zavisni od aktivnosti mTOR signalnog puta u PFC i hipokampusu a ispitivanje efekata ANA-12 antagonistice u drugim moždanim strukturama, prvenstveno u NAc, a koji bi eventualno pružili objašnjenje za uočen fenotip kod GluN2A/- miševa, prevazilaze okvire ove studije.

5.6.2. Efekti ERK inhibitora na ponašanje i aktivnost mTOR signalnog puta kod GluN2A^{-/-} miševa tretiranih sa LPS

U narednom eksperimentu korišćen je ERK inhibitor, UO126, sa ciljem da se preciznije definiše uloga ERK kinaze u aktivaciji mTOR signalnog puta i njen doprinos rezistenciji GluN2A^{-/-} miševa na ponašanje nalik depresivnom nakon LPS tretmana. ERK kinaza je odabrana jer su promene njene aktivnosti (u poređenju sa ostala dva uzvodna regulatora mTOR aktivnosti, Akt i GSK-3 β) bile najizraženije kod WT miševa sa ponašanjem nalik depresivnom u poređenju sa GluN2A^{-/-} miševa.

Rezultati dobijeni u okviru eksperimenta sa UO126 inhibitorom su pokazali da tretman izaziva ponašanje nalik depresivnom kod GluN2A^{-/-} životinja koje su inače pokazivale rezistentnost na pojavu depresivnog fenotipa u uslovima neuroinflamacije. Naime, 18 h nakon administracije inhibitora kod GluN2A^{-/-} životinja je detektovana anhedonija, kao ključna komponenta depresivnog fenotipa. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima koja ukazuju na inhibiciju ERK signalnog puta u PFC i hipokampusu depresivnih pacijenata i životinja koje pokazuju ponašanje nalik depresivnom (Liu i sar., 2017; Qi i sar., 2006). Studije takođe beleže da pored toga što tretman ERK inhibitorima može izazvati depresivni fenotip, njihova primena može da spreči pozitivne terapijske efekte antidepressiva (Domin i sar., 2017; Pochwat i sar., 2017).

Iako je 18 h nakon primene UO126 kod GluN2A^{-/-} miševa detektovana komponenta ponašanja nalik depresivnom, to nije koreliralo sa smanjenom ERK aktivnošću (Tabela 8). Međutim, dalja istraživanja su pokazala da kod GluN2A^{-/-} miševa do smanjenja nivoa p-ERK u PFC dolazi u prvom i četvrtom satu nakon administracije ERK inhibitora, dok se u 18. satu ERK aktivnost vraća na kontrolni nivo. Ipak, smanjena aktivnost ERK kinaze, detektovana u 4. satu nakon primene inhibitora nije dovelo do pojave anhedoničnog ponašanja kod životinja u istoj vremenskoj tački. Na osnovu navedenih rezultata možemo pretpostaviti da inhibicija ERK aktivnosti ima odložen efekat na ponašanje životinja, s obzirom da životinje počinju da ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom tek u 18. satu nakon UO126 tretmana u vreme kada se aktivnost ERK kinaze vraća na kontrolni nivo. Drugi autori u svojim studijama takođe prijavljuju odložen efekat smanjene aktivnosti ERK

kinaze na ponašanje životinja, pa tako životinje pokazuju ponašanje nalik depresivnom 7 dana nakon inicijalnog smanjenja ERK aktivnosti (Qi i sar., 2006, 2008).

Tabela 8. Sažeti prikaz efekata UO126 inhibitora na ERK aktivnost i aktivnost mTOR signalnog puta i nivo sinaptičkih markera u hipokampusu i prefrontalnom korteksu GluN2A-/- životinja tretiranih sa LPS. Strelice označavaju povećanje ili smanjenje nivoa proteina usled UO126 tretmana u poređenju sa kontrolama, dok znak jednakosti predstavlja nepromenjen nivo proteina .

	1h nakon primene UO126 inhibitora		4h nakon primene UO126 inhibitora		18h nakon primene UO126 inhibitora	
	Hipokampus	PFC	Hipokampus	PFC	Hipokampus	PFC
<i>Efekat UO126 inhibitora u poređenju sa kontrolama</i>						
t-ERK	=	=	=	=	=	=
p-ERK	=	↓	=	↓	=	=
t-mTOR	=	=	=	=	↓	↑
p-mTOR	=	↓	=	↓	↓	=
t-p70S6K					=	↓
p-p70S6K					↓	↑
GluA1					=	↓
PSD-95					↑	↓

U PFC GluN2A-/- miševa je, 18h nakon UO126 administracije, uočen smanjen nivo sinaptičkih markera GluA1 i PSD-95 što bi mogao biti indikator za smanjenu sinaptogenezu i izazvati ponašanja nailik depresivnom kod ovih životinja. Naime, smanjena aktivnost ERK kinaze i nizvodne mTOR kinaze koja je detektovana u PFC u prva četiri sata nakon UO126 tretmana može uticati na smanjenje nivoa sinaptičkih markera 18 h nakon UO126 primene, s obzirom da je određeno vreme potrebno da se ostvari efekat njihove inhibicije na translaciju sinaptičkih proteina.

Što se tiče hipokampusa, rezultati nisu pokazali smanjenu ERK aktivnost kod GluN2A-/- miševa, 18 h nakon primene inhibitora, iako je u toj vremenskoj tački detektovana smanjena aktivnost nizvodne mTOR-p70S6K kaskade. Međutim, smanjena aktivnost signalnog puta nizvodno od ERK kinaze nije bila u korelaciji sa nivoom sinaptičkih markera. Štaviše, nivo PSD-95 je bio povećan dok je nivo GluA1 subjedinice AMPA receptora bio nepromenjen nakon UO126 tretmana 18 h nakon njegove primene. Iako je ovo povećanje nivoa PSD-95 proteina suprotno studijama koje pokazuju da smanjena aktivnost mTOR-p70S6K kaskade korelira sa smanjenim nivoom PSD-95 proteina, povećan nivo PSD-95 proteina u hipokampusu se može

objasniti povećanim nivoom BDNF proteina u hipokampusu GluN2A-/- životinja nakon LPS tretmana o kojem smo govorili u poglavlju 4.3.1. Naime, studije su pokazale da je ekspresija PSD-95 proteina regulisana aktivnošću BDNF signalnog puta i da BDNF aplikacija dovodi do snažnog povećanja nivoa PSD-95 proteina (Hui sar., 2011).

Sve zajedno, rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da izostanak GluN2A subjedinice NMDA receptora sprečava pojavu ponašanja nalik depresivnom kod miševa nakon LPS administracije i to preko održive aktivnosti mTOR signalnog puta i sinaptičke stabilnosti u PFC i hipokampusu, a da je ovaj mehanizam zavistan od aktivnosti ERK kinaze. Ovi rezultati bi mogli da doprinesu boljem razumevanju specifične uloge subjedinica NMDA receptora u patofiziološkim mehanizmima koji povezuju inflamaciju i depresiju, što bi na kraju moglo da doprinese razvoju efektivnije terapije depresije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- I** GluN2A^{-/-} miševi ne ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom u neuroinflamatornom modelu depresije, suprotno WT životinjama;
- II** Efekat LPS tretmana na nivoe subjedinica NMDA receptora bio je tkivno specifičan – doveo je do promena njihovih nivoa samo u PFC, dok je promena nivoa subjedinica AMPA receptora u PFC bila genotip specifična, sa povećanjem nivoa svih izmerenih subjedinica kod GluN2A^{-/-} životinja.
- III** Kod WT životinja, ponašanje nalik depresivnom izazvano LPS tretmanom bilo je praćeno promenama koje ukazuju na povećanu neuroinflamaciju, smanjenu neuroplastičnost i destabilizaciju sinapsi usled smanjene aktivnosti mTOR signalnog puta i smanjenog nivoa sinaptičkih markera i to kako u PFC tako i u hipokampusu;
- III** Kod GluN2A^{-/-} životinja rezistencija na razvoj ponašanja nalik depresivnom usled LPS tretmana, bila je asocirano sa nepromenjenim nivoom IL-6, nepromenjenim ili čak povećanim nivoima markera neuroplastičnosti i aktivnosti mTOR signalnog puta kao i održivom sinaptičkom stabilnošću u PFC i hipokampusu.
- IV** Efekti antagoniste TrkB receptora na ponašanje GluN2A^{-/-} životinja u neuroinflamatornom modelu depresije nisu bili zavisni od aktivnosti mTOR signalnog puta u PFC i hipokampusu;
- V** Aktivnost GluN2A-ERK-mTOR signalnog puta utiče na razvoj ponašanja nalik depresivnom kod životinja u neuroinflamatornom modelu depresije.

Sumarno, rezultati ove doktorske disertacije su po prvi put pokazali da bi značajnu ulogu u posredovanju efekata inflamacije na mehanizme koji dovode do nastanka depresije mogla da ima GluN2A subjedinica NMDA receptora. Dobijeni rezultati upućuju na dalja istraživanja koja bi mogla da definišu da li se neželjeni efekti antagonista NMDA receptora, čija su antidepresivna svojstva povezana sa mTOR-zavisnom sintezom sinaptičkih proteina, mogu izbeći uz pomoć supstanci koje direktnije interferiraju sa mTOR signalnim putem ili specifičnim subjedinicama NMDA receptora. Rezultati ove disertacije doprinose boljem razumevanju

neurobioloških mehanizama depresije i svakako daju doprinos otkrivanju efikasnijih farmakoloških tretmana usmerenih ka formiranju i stabilizaciji sinaptičkih veza.

7. LITERATURA

- A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder*
Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium 1.
(2013). *Molecular Psychiatry* 18, 479-511.
- Abelaira, H. M., Réus, G. Z., Neotti, M. V., & Quevedo, J. (2014). The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life Sciences*, 101(1–2), 10–14.
- Adell, A. (2020). Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression. *Biomolecules*, 10(6), 947.
- Agbo, F., Bui, K. H., & Zhou, D. (2017). Population pharmacokinetic analysis of lanicemine (AZD6765), an NMDA channel blocker, in healthy subjects and patients with major depressive disorder. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 42(5), 539–546.
- Akinfiresoye, L., & Tizabi, Y. (2013). *Antidepressant effects of AMPA and ketamine combination: role of hippocampal BDNF, synapsin, and mTOR*. *Psychopharmacology*, 230, 291–298.
- Al-Harbi, K. S. (2012). Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Preference and Adherence*, 6, 369–388.
- Aonurm-Helm, A., Jurgenson, M., Zharkovsky, T., Sonn, K., Berezin, V., Bock, E., & Zharkovsky, A. (2008). Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. *European Journal of Neuroscience*, 28(8), 1618–1628.
- Autry, A. E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E. S., Los, M. F., Cheng, P.-F., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2011). NMDA Receptor Blockade at Rest Triggers Rapid Behavioural Antidepressant Responses HHS Public Access. *Nature*, 475(7354), 91–95.
- 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. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29(2), 261–265.
- Ayuso-Mateos, J. L., Vázquez-Barquero, J. L., Dowrick, C., Lehtinen, V., Dalgard, O. S., Casey, P., Wilkinson, C., Lasa, L., Page, H., Dunn, G., Wilkinson, G., & Group, the O. (2001). Depressive disorders in Europe: prevalence figures from the ODIN study. *British Journal of Psychiatry*, 179(4), 308–316.

- Bachmann, S. (2018). Epidemiology of Suicide and the Psychiatric Perspective. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, *15*(7), 1425.
- Badshah, H., Ali, T., & Kim, M. O. (2016). Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NFκB signaling pathway. *Scientific Reports*, *6*, 24493.
- Baez, V. M., Cercato, C., & Jerusalinsky, D. A. (2018). NMDA Receptor Subunits Change after Synaptic Plasticity Induction and Learning and Memory Acquisition. *Neural Plasticity*, *2018*.
- Bai, M., Zhu, X., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, L., Xue, L., Yi, J., Yao, S., Zhang, X., & Homberg, J. (2012). Abnormal Hippocampal BDNF and miR-16 Expression Is Associated with Depression-Like Behaviors Induced by Stress during Early Life. *PLoS One*, *7*(10).
- Bartlett, T. E., Bannister, N. J., Collett, V. J., Dargan, S. L., Massey, P. V, Bortolotto, Z. A., Fitzjohn, S. M., Bashir, Z. I., Collingridge, G. L., & Lodge, D. (2007). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology*, *52*(1), 60–70.
- Beneyto, M., Kristiansen, L. V, Oni-Orisan, A., McCullumsmith, R. E., & Meador-Woodruff, J. H. (2007). Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *32*(9), 1888–1902.
- Bessa, J. M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J. J., Palha, J. A., Almeida, O., & Sousa, N. (2009). The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular Psychiatry*, *14*, 764–773.
- Beurel, E., Song, L., & Jope, R. S. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. *Molecular psychiatry*, *16*(11), 1068–1070.
- Björkholm, C., & Monteggia, L. M. (2016). BDNF—a key transducer of antidepressant effects HHS Public Access. *Neuropharmacology*, *102*, 72–79.
- Bonaccorso, S., Marino, V., Puzella, A., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., Almerighi, C., Verkerk, R., Meltzer, H., & Maes, M. (2002). Increased depressive ratings in

- patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 22(1), 86–90.
- Bostwick, J. M., & Pankratz, V. S. (2000). Affective Disorders and Suicide Risk: A Reexamination. *The American Journal of Psychiatry*, 157.
- Bouzioukh, F., Tell, F., Jean, A., & Ve Rougon, G. (2001). NMDA Receptor and Nitric Oxide Synthase Activation Regulate Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Expression in Adult Brainstem Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 21(13), 4721-4730.
- Boyce-Rustay, J. M., & Holmes, A. (2006). Genetic Inactivation of the NMDA Receptor NR2A Subunit has Anxiolytic and Antidepressant-Like Effects in Mice. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2405–2414.
- Burcusa, S. L., & Iacono, W. G. (2007). Risk for recurrence in depression. *Clinical Psychology Review*, 27(8), 959–985.
- Calabrese, F., Guidotti, G., Molteni, R., Racagni, G., Mancini, M., & Riva, M. A. (2012). Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment. *PloS One*, 7(5), e37916.
- Capuron, L., & Miller, A. H. (2011). Immune System to Brain Signaling: Neuropsychopharmacological Implications. *Pharmacol Ther*, 130(2), 226–238.
- Carroll, B. J. (1982). The dexamethasone suppression test for melancholia. *British Journal of Psychiatry*, 140(3), 292–304.
- Castré, E., & Rantamä, T. (2010). The Role of BDNF and Its Receptors in Depression and Antidepressant Drug Action: Reactivation of Developmental Plasticity. *Inc. Develop Neurobiol*, 70, 289–297
- Castrén, E. (2004). Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(1), 58–64.
- Cattaneo, A., Gennarelli, M., Uher, R., Breen, G., Farmer, A., Aitchison, K. J., Craig, I. W., Anacker, C., Zunsztain, P. A., McGuffin, P., & Pariante, C. M. (2013). Candidate Genes Expression Profile Associated with Antidepressants Response in the GENDEP Study: Differentiating between Baseline Predictors and Longitudinal Targets. *Neuropsychopharmacology* 38(3), 377-385.
- Cazorla, M., Prémont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C., & Rognan, D. (2011).

- Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121.
- Chandley, M. J., Szebeni, A., Szebeni, K., Crawford, J. D., Stockmeier, C. A., Turecki, G., Kostrzewa, R. M., & Ordway, G. A. (2014). Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(10), 1569–1578.
- Chandran, A., Iyo, A. H., Jernigan, C. S., Legutko, B., Austin, M. C., & Karolewicz, B. (2013). Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 40, 240–245.
- Chen, B., Dowlathshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., & Young, L. T. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological Psychiatry*, 50(4), 260–265.
- Chowdhury, G. M. I., Zhang, J., Thomas, M., Banasr, M., Ma, X., Pittman, B., Bristow, L., Schaeffer, E., Duman, R. S., Rothman, D. L., Behar, K. L., & Sanacora, G. (2017). Transiently increased glutamate cycling in rat PFC is associated with rapid onset of antidepressant-like effects. *Molecular Psychiatry*, 22(1), 120–126.
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 33, 18–41.
- Conwell, Y., Duberstein, P. R., Cox, C., Herrmann, J. H., Forbes, N. T., & Caine, E. D. (1996). Relationships of age and axis I diagnoses in victims of completed suicide: A psychological autopsy study. *American Journal of Psychiatry*, 153(8), 1001–1008.
- Cook, S. C., & Wellman, C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurobiology*, 60(2), 236–248.
- Cortese, G. P., Barrientos, R. M., Maier, S. F., & Patterson, S. L. (2011). Aging and a Peripheral Immune Challenge Interact to Reduce Mature Brain-Derived Neurotrophic Factor and Activation of TrkB, PLC γ 1, and ERK in Hippocampal Synaptoneuroosomes. *Journal of Neuroscience* 31 (11) 4274-4279.
- Cotter, D., Hudson, L., & Landau, S. (2005). Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. *Bipolar*

Disorders, 7(4), 358–

- Cotter, D., Mackay, D., Chana, G., Beasley, C., Landau, S., & Everall, I. P. (2002). Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cerebral Cortex*, 12(4), 386–394.
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2004(255).
- Dalva, M. B., McClelland, A. C., & Kayser, M. S. (2007). Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3), 206–220.
- Dantzer, R., O'connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2010). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 46–56
- Datta, S. C., & Opp, M. R. (2008). Lipopolysaccharide-induced increases in cytokines in discrete mouse brain regions are detectable using Luminex xMAP ® technology. *Journal of Neuroscience Methods*, 175(1), 119-124.
- Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry*, 27, 101–111.
- Deschwanden, A., Karolewicz, B., Feyissa, A. M., Treyer, V., Ametamey, S. M., Johayem, A., Burger, C., Auberson, Y. P., Sovago, J., Stockmeier, C. A., Buck, A., & Hasler, G. (2011). Reduced metabotropic glutamate receptor 5 density in major depression determined by [(11)C]ABP688 PET and postmortem study. *The American Journal of Psychiatry*, 168(7), 727–734.
- Di Cristo, G., & Chattopadhyaya, B. (2020). Chapter 5 - Development of neuronal circuits: From synaptogenesis to synapse plasticity. In A. Gallagher, C. Bulteau, D. Cohen, & J. L. B. T.-H. of C. N. Michaud (Eds.), *Neurocognitive Development: Normative Development*, 173, 43–53.
- Dijkhuizen, P. A., & Ghosh, A. (2005). BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *Journal of Neurobiology*, 62(2), 278–288.
- Dityatev, A., Dityateva, G., Sytnyk, V., Dellling, M., Toni, N., Nikonenko, I., Muller, D., &

- Schachner, M. (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9372–9382.
- Djordjevic, A., Djordjevic, J., Elaković, I., Adzic, M., Matić, G., & Radojic, M. B. (2012a). Fluoxetine affects hippocampal plasticity, apoptosis and depressive-like behavior of chronically isolated rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 36(1), 92–100.
- Djordjevic, A., Djordjevic, J., Elaković, I., Adzic, M., Matić, G., & Radojic, M. B. (2012b). Effects of fluoxetine on plasticity and apoptosis evoked by chronic stress in rat prefrontal cortex. *European Journal of Pharmacology*, 693(1–3), 37–44.
- Doble, B. W., & Woodgett, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*, 116(7), 1175–1186.
- Domin, H., Szewczyk, B., Pochwat, B., Woźniak, M., & Śmiałowska, M. (2017). Antidepressant-like activity of the neuropeptide Y Y5 receptor antagonist Lu AA33810: behavioral, molecular, and immunohistochemical evidence. *Psychopharmacology*, 234(4), 631–645.
- Dorfman, W. (1974). Depression and Psychosomatic Illness. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 23, 87–92.
- Duman, R. S., & Aghajanian, G. K. (2012a). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*, 338(6103), 68–72.
- Duman, R. S., Heninger, G. R., & Nestler, E. J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Archives of General Psychiatry*, 54(7), 597–606.
- Duman, R. S., & Li, N. (2012b). A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol*, 367(1601), 2475–2484.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006a). A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1116–1127.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006b). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1116–1127.
- Dwyer, J. M., & Duman, R. S. (2012). Activation of mTOR and Synaptogenesis: Role in the Actions of Rapid-Acting Antidepressants. *Biol Psychiatry*, 73(12), 1189–1198.

- Dwyer, J. M., & Duman, R. S. (2013). Activation of Mammalian Target of Rapamycin and Synaptogenesis: Role in the Actions of Rapid-Acting Antidepressants. *Biological Psychiatry*, *73*(12), 1189–1198.
- El Maarouf, A., & Rutishauser, U. (2010). Use of PSA-NCAM in repair of the central nervous system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *663*, 137–147.
- Encinas, J. M., Vaahtokari, A., & Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *PNAS* *103*(21), 8233-8238.
- Feyissa, A. M., Chandran, A., Stockmeier, C. A., & Karolewicz, B. (2009). Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *33*(1), 70–75.
- Francis, P. T., Poynton, A., Lowe, S. L., Najlerahim, A., Bridges, P. K., Bartlett, J. R., Procter, A. W., Bruton, C. J., & Bowen, D. M. (1989). Brain amino acid concentrations and Ca²⁺-dependent release in intractable depression assessed antemortem. *Brain Research*, *494*(2), 315–324.
- Frank, M. G., Weber, M. D., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Stress sounds the alarmin: the role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun*, *48*, 1-7.
- Frizelle, P. A., Chen, P. E., & Wyllie, D. J. A. (2006). Equilibrium constants for NVP-AAM077 acting at recombinant NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA receptors: implications for studies of synaptic transmission. *Molecular Pharmacology*, *70*(3), 1022-1032.
- Frühauf-Perez, P. K., Temp, F. R., Pillat, M. M., Signor, C., Wendel, A. L., Ulrich, H., Mello, C. F., & Rubin, M. A. (2018). Spermine protects from LPS-induced memory deficit via BDNF and TrkB activation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *149*, 135–143.
- Fukumoto, K., Fogaca, M. V., Liu, R. J., Duman, C., Kato, T., Li, X. Y., & Duman, R. S. (2019). Activity-dependent brain-derived neurotrophic factor signaling is required for the antidepressant actions of (2R,6R)-hydroxynorketamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(1), 297–302.

- Gao, C., Frausto, S. F., Guedea, A. L., Tronson, N. C., Jovasevic, V., Leaderbrand, K., Corcoran, K. A., Guzman, Y. F., Swanson, G. T., & Radulovic, J. (2011). IQGAP1 regulates NR2A signaling, spine density, and cognitive processes. *Journal of Neuroscience*, *31*(23), 8533–8542.
- Garelick, M. G., & Kennedy, B. K. (2011). TOR on the brain. *Experimental Gerontology*, *46*(2–3), 155–163.
- Gerhard, D. M., Wohleb, E. S., & Duman, R. S. (2016). Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discovery Today*, *21*(3), 454–464.
- Gibney, S. M., McGuinness, B., Prendergast, C., Harkin, A., & Connor, T. J. (2013). Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. *Brain, Behavior, and Immunity*, *28*, 170–181.
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Guirado, R., Maria, •, Moltó, D., & Nacher, J. (2013). Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Structure and Function*, *218*, 1591–1605.
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Pérez-Rando, M., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2011). Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Experimental Neurology*, *232*(1), 33–40.
- Gilabert-Juan, J., Varea, E., Guirado, R., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., & Nacher, J. (2012). Alterations in the expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the dorsolateral prefrontal cortex of psychiatric disorder patients. *Neuroscience Letters*, *530*(1), 97–102.
- Gill, R., Alanine, A., Bourson, A., Buttelmann, B., Fischer, G., Heitz, M., & Kew, J. N. C. (2002). Pharmacological Characterization of Ro 63-1908 (1- [2- (4- Novel Subtype-Selective N -Methyl- D -Aspartate Antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, *302*(3), 940–948.
- Gordillo-Salas, M., Pilar-Cuéllar, F., Auberson, Y. P., & Adell, A. (2018). Signaling pathways responsible for the rapid antidepressant-like effects of a GluN2A-preferring NMDA receptor antagonist. *Translational Psychiatry*, *8*, 84.

- Goshen, I., & Yirmiya, R. (2007). The Role of Pro-inflammatory Cytokines in Memory enhancer. 337–378.
- Gould, T. D., O'donnell, K. C., Dow, E. R., Du, J., Chen, G., & Manji, H. K. (2008). Involvement of AMPA Receptors in the Antidepressant-Like Effects of Lithium in the Mouse Tail Suspension Test and Forced Swim Test. *Neuropharmacology*, 54(3), 577–587.
- Greenberg, P.E., Kessler, R.C., Birnbaum, H.G., Leong, S.A., Lowe, S.W., Berglund, P. A., & Corey-Lisle, P. K. (2003). The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? *J. Clin. Psychiatry*, 64(12), 1465– 1475.
- Grigoleit, J.-S., Kullmann, J. S., Wolf, O. T., Hammes, F., & Wegner, A. (2011). Dose-Dependent Effects of Endotoxin on Neurobehavioral Functions in Humans. *PLoS ONE*, 6(12), 28330.
- Guan, Z., & Fang, J. (2006). Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20(1), 64–71.
- Guilloux, J.-P., Douillard-Guilloux, G., Kota, R., Wang, X., Martinowich, K., Tseng, G. C., Lewis, D. A., & Sibille, E. (2012). Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Molecular Psychiatry*, 17, 1130–1142.
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(10), 682–696.
- Haroon, E., Miller, A. H., & Sanacora, G. (2017). Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 42, 193–215.
- Harwood, D., Hawton, K., Hope, T., & Jacoby, R. (2001). Psychiatric disorder and personality factors associated with suicide in older people: a descriptive and case-control study. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 16(2), 155–165.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18(16), 1926-45.

- Holemans, S., De Paermentier, F., Horton, R. W., Crompton, M. R., Katona, C. L. E., & Maloteaux, J. M. (1993). NMDA glutamatergic receptors, labelled with [3H]MK-801, in brain samples from drug-free depressed suicides. *Brain Research*, 616(1-2), 138-143.
- Horwath, E., Cohen, R. S., & Weissman, M. M. (2003). Epidemiology of Depressive and Anxiety Disorders. In *Textbook in Psychiatric Epidemiology*, 389-426.
- Howard, D. M., Adams, M. J., Shirali, M., Clarke, T.-K., Marioni, R. E., Davies, G., Coleman, J. R. I., Alloza, C., Shen, X., Barbu, M. C., Wigmore, E. M., Gibson, J., Lewis, C. M., Ward, J., Smith, D. J., Sullivan, P. F., Haley, C. S., Breen, G., Deary, I. J., & McIntosh, A. M. (2018). Genome-wide association study of depression phenotypes in UK Biobank identifies variants in excitatory synaptic pathways. *Nature Communications*, 9, 1470.
- Howell, K. R., Kutiyawalla, A., & Pillai, A. (2011). Long-Term Continuous Corticosterone Treatment Decreases VEGF Receptor-2 Expression in Frontal Cortex. *PLoS One*, 6(5).
- Hu, X., Ballo, L., Pietila, L., Viesselmann, C., Ballweg, J., Lumbard, D., Stevenson, M., Merriam, E., & Dent, E. W. (2011). BDNF-Induced Increase of PSD-95 in Dendritic Spines Requires Dynamic Microtubule Invasions. *J Neurosci*, 31(43), 15597-15603.
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 677-736.
- Huang, Y. S., Ogbechi, J., Clanchy, F. I., Williams, R. O., & Stone, T. W. (2020). IDO and Kynurenine Metabolites in Peripheral and CNS Disorders. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange. [Http://Ghdx.Healthdata.Org/Gbd-Results-Tool?Params=gbd-API-2019-Permalink/D780dffbe8a381b25e1416884959e88b](http://Ghdx.Healthdata.Org/Gbd-Results-Tool?Params=gbd-API-2019-Permalink/D780dffbe8a381b25e1416884959e88b) (Accessed 1 May 2021).
- Ishak, W. W., Collison, K., Danovitch, I., Shek, L., Kharazi, P., Kim, T., Jaffer, K. Y., Naghdechi, L., Lopez, E., & Nuckols, T. (2017). Screening for Depression in Hospitalized Medical Patients. *Journal of Hospital Medicine*, 12(2), 118-125.
- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe,

- Z., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Accrombessi, M. M. K., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, *392*(10159),
- Jankovic, S., Jankovic, J., Vlajinac, H., Bjegovic, V., & Bjegovic, B. (2006). The burden of disease and injury in Serbia. *European Journal of Public Health*, *17*(1), 80–85.
- Järlestedt, K., Naylor, A. S., Dean, J., Hagberg, H., & Mallard, C. (2013). Decreased survival of newborn neurons in the dorsal hippocampus after neonatal LPS exposure in mice. *Neuroscience*, *253*, 21–28.
- Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D. P., Hoogenraad, C. C., & Sheng, M. (2005). Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Journal of Neuroscience*, *25* (49), 11300-11312.
- Jeon, S. W., & Kim, Y. K. (2016). Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World Journal of Psychiatry*, *6*(3), 283.
- Jernigan, C. S., Goswami, D. B., Austin, M. C., Iyo, A. H., Chandran, A., Stockmeier, C. A., & Karolewicz, B. (2011). The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *35*(7), 1774–1779.
- Jhamandas, K. H., Boegman, R. J., Beninger, R. J., Miranda, A. F., & Lipic, K. A. (2000). Excitotoxicity of quinolinic acid: modulation by endogenous antagonists. *Neurotoxicity Research*, *2*(2–3), 139–155.
- Jiang, C., & Schuman, E. M. (2002). Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(10), 506–513.
- Jourdi, H., Hsu, Y.-T., Zhou, M., Qin, Q., Bi, X., & Baudry, M. (2009). Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic mRNA Translation. *J Neurosci*, *29*(27), 8688–8697.
- Juruena, M. F., Maria Padovan, C., Rajasaheb Bagalkot, T., Carvalho, A. F., Carneiro Cordeiro, R., José Maia Chaves Filho, A., Soares Gomes, N., de Sousa Tomaz, V., Dantas Medeiros, C., Isabelle de Góis Queiroz, A., Maes, M., & Macedo, D. S. (2019). Leptin Prevents Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like

- Behaviors in Mice: Involvement of Dopamine Receptors Antidepressant Effects of Leptin. *Frontiers in Psychiatry | Www.Frontiersin.Org*, 1, 125.
- K V, A., Mohan, A. S., & Chakravarty, S. (2020). Rapid acting antidepressants in the mTOR pathway: Current evidence. *Brain Research Bulletin*, 163, 170–177.
- Kang, H. J., Voleti, B., Hajszan, T., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Licznanski, P., Lepack, A., Majik, M. S., Jeong, L. S., Banasr, M., Son, H., & Duman, R. S. (2012). Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nature Medicine*, 18(9), 1413–1417.
- Kannagara, T. S., Eadie, B. D., Bostrom, C. A., Morch, K., Brocardo, P. S., & Christie, B. R. (2014a). GluN2A $-/-$ Mice Lack Bidirectional Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus and Perform Poorly on Spatial Pattern Separation Tasks. *Cerebral Cortex*, 25(8), 2102–2113.
- Kappelmann, N., Lewis, G., Dantzer, R., Jones, P. B., & Khandaker, G. M. (2018). Antidepressant activity of anti-cytokine treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials of chronic inflammatory conditions. *Molecular Psychiatry*, 23, 335–343.
- Karolewicz, B., Szebeni, K., Gilmore, T., Maciag, D., Stockmeier, C. A., & Ordway, G. A. (2009). Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(2), 143–153.
- Kaut, O., Schmitt, I., Hofmann, A., Hoffmann, P., Schlaepfer, T. E., Wüllner, U., & Hurlmann, R. (2015). Aberrant NMDA receptor DNA methylation detected by epigenome-wide analysis of hippocampus and prefrontal cortex in major depression. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 265(4), 331–341.
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Ma, R., Jin, M. A., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62(7), 768.
- Khorramzadeh, E., & Lotfy, A. O. (1973). The use of ketamine in psychiatry. *Psychosomatics*, 14(6), 344–346.
- Kim, J. S., Schmid-Burgk, W., Claus, D., & Kornhuber, H. H. (1982). Increased serum

- glutamate in depressed patients. *Archiv Für Psychiatrie Und Nervenkrankheiten*, 232(4), 299–304.
- Kishimoto, T., Chawla, J. M., Hagi, K., Zarate, C. A., Kane, J. M., Bauer, M., & Correll, C. U. (2016). Single-dose infusion ketamine and non-ketamine N-methyl-d-aspartate receptor antagonists for unipolar and bipolar depression: a meta-analysis of efficacy, safety and time trajectories. *Psychological Medicine*, 46(7), 1459–1472.
- Kohtala, S. (2021). Ketamine-50 years in use: from anesthesia to rapid antidepressant effects and neurobiological mechanisms. *Pharmacological Reports : PR*, 73(2), 323–345.
- Krishna, S., Dodd, C. A., & Filipov, N. M. (2016). Behavioral and monoamine perturbations in adult male mice with chronic inflammation induced by repeated peripheral lipopolysaccharide administration. *Behav Brain Res*, 302, 279–290.
- Krishnan, V., Han, M.-H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., ... Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131(2), 391–404.
- Kumar, V., Zhang, M.-X., Swank, M. W., Kunz, J., & Wu, G.-Y. (2005). Regulation of Dendritic Morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK Signaling Pathways. *The Journal of Neuroscience*, 25(49), 11288 LP - 11299. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lahiri, T., Moore, P. E., Baraldo, S., Whitehead, T. R., McKenna, M. D., Panettieri, R. A., Shore, S. A., & McKenna, M. D. (2002). Effect of IL-1 on CRE-dependent gene expression in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, 1239–1246.
- Landis, M. D., Seachrist, D. D., Montañez-Wiscovich, M. E., Danielpour, D., & Keri, R. A. (2005). Gene expression profiling of cancer progression reveals intrinsic regulation of transforming growth factor- β signaling in ErbB2/ Neu-induced

- tumors from transgenic mice. *Oncogene*, 24(33), 5173-5190.
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293.
- Leonard, B. E. (2001). Stress, norepinephrine and depression. *J Psychiatry Neurosci*, 26, 11–16.
- Lepack, A. E., Bang, E., Lee, B., Dwyer, J. M., & Duman, R. S. (2016). Fast-acting antidepressants rapidly stimulate ERK signaling and BDNF release in primary neuronal cultures. *Neuropharmacology*, 111, 242–252.
- Lepack, A. E., Fuchikami, M., Dwyer, J. M., Banasr, M., & Duman, R. S. (2014). BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(1).
- Lépine, J. P., Lecrubier, Davidson, Nutt, Kirmayer, & Ono. (2001). Epidemiology, burden, and disability in depression and anxiety. *Journal of Clinical Psychiatry*, 62, 4–12.
- Levine, J., Panchalingam, K., Rapoport, A., Gershon, S., McClure, R. J., & Pettegrew, J. W. (2000). Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biological Psychiatry*, 47(7), 586–593.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., Li, X.-Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 329(5994), 959–964.
- Li, N., Liu, R.-J., Dwyer, J. M., Banasr, M., Lee, B., Son, H., Li, X.-Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2011). Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biological Psychiatry*, 69(8), 754–761.
- Lisman, J. (1994). The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends in Neurosciences*, 17(10), 406–412.
- Liu, R.-J., Fuchikami, M., Dwyer, J. M., Lepack, A. E., Duman, R. S., & Aghajanian, G. K. (2013a). GSK-3 Inhibition Potentiates the Synaptogenic and Antidepressant-Like Effects of Subthreshold Doses of Ketamine. *Neuropsychopharmacology*, 38, 2268–2277.
- Liu, R.-J., Fuchikami, M., Dwyer, J. M., Lepack, A. E., Duman, R. S., & Aghajanian, G. K. (2013b). GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-

- like effects of subthreshold doses of ketamine. *Neuropsychopharmacology*, 38(11), 2268–2277.
- Liu, R.-J., Ota, K. T., Dutheil, S., Duman, R. S., & Aghajanian, G. K. (2015). Ketamine Strengthens CRF-Activated Amygdala Inputs to Basal Dendrites in mPFC Layer V Pyramidal Cells in the Prelimbic but not Infralimbic Subregion, A Key Suppressor of Stress Responses. *Neuropsychopharmacology*, 40, 2066–2075.
- Liu, W., Ge, T., Leng, Y., Pan, Z., Fan, J., Yang, W., & Cui, R. (2017). The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast*, 2017.
- Lu, W., Khatri, L., & Ziff, E. B. (2014). Trafficking of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) receptor subunit GluA2 from the endoplasmic reticulum is stimulated by a complex containing Ca²⁺/calmodulin-activated kinase II (CaMKII) and PICK1 protein and by release o. *Journal of Biological Chemistry*, 289(27).
- Lynch, M. A. (2002). Interleukin-1 beta exerts a myriad of effects in the brain and in particular in the hippocampus: analysis of some of these actions. *Vitamins and Hormones*, 64, 185–219.
- Machado-Vieira, R., Zanetti, M. V, Teixeira, A. L., Uno, M., Valiengo, L. L., Soeiro-de-Souza, M. G., Oba-Shinjo, S. M., de Sousa, R. T., Zarate, C. A. J., Gattaz, W. F., & Marie, S. K. N. (2015). Decreased AKT1/mTOR pathway mRNA expression in short-term bipolar disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 25(4), 468–473.
- Mackowiak, M., O'Neill, M. J., Hicks, C. A., Bleakman, D., & Skolnick, P. (2002). An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study. *Neuropharmacology*, 43(1), 1–10.
- MacQueen, G. M., Ramakrishnan, K., Croll, S. D., Siuciak, J. A., Yu, G., Young, L. T., & Fahnstock, M. (2001). Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behavioral Neuroscience*, 115(5), 1145–1153.
- Maes, M. (1999). Major depression and activation of the inflammatory response system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 461, 25–46.
- Magariños, A. M., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1996). Chronic psychosocial

- stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *The Journal of Neuroscience*, 16(10), 3534–3540.
- Maheu, M. E., Davoli, M. A., Turecki, G., & Mechawar, N. (2013). Amygdalar expression of proteins associated with neuroplasticity in major depression and suicide. *Journal of Psychiatric Research*, 47(3), 384–390.
- Maiese, K. (2014). Driving neural regeneration through the mammalian target of rapamycin. *Neural Regeneration Research*, 9(15), 1413–1417.
- Marchese, E., Valentini, M., Di Sante, G., Cesari, E., Adinolfi, A., Corvino, V., Ria, F., Sette, C., & Geloso, M. C. (2021). Alternative splicing of neurexins 1–3 is modulated by neuroinflammation in the prefrontal cortex of a murine model of multiple sclerosis. *Experimental Neurology*, 335, 113497.
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206–210.
- Marmigè, 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, 646–655.
- Marshall, R. D., Blanco, C., Printz, D., Liebowitz, M. R., Klein, D. F., & Coplan, J. (2002). A pilot study of noradrenergic and HPA axis functioning in PTSD vs. panic disorder. *Psychiatry Research*, 110(3), 219–230.
- Masrour, F. F., Peeri, M., Azarbayjani, M. A., & Hosseini, M.-J. (2018). Voluntary Exercise During Adolescence Mitigated Negative the Effects of Maternal Separation Stress on the Depressive-Like Behaviors of Adult Male Rats: Role of NMDA Receptors. *Neurochemical Research*, 43(5), 1067–1074.
- Massey, P. V., Johnson, B. E., Moulton, P. R., Auberson, Y. P., Brown, M. W., Molnar, E., Collingridge, G. L., & Bashir, Z. I. (2004). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of Neuroscience*, 24(36), 7821–7828.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), 261–263.
- McNally, L., Bhagwagar, Z., & Hannestad, J. (2008). Inflammation, glutamate, and glia

- in depression: a literature review. *CNS Spectrums*, 13(6), 501–510.
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological Psychiatry*, 65(9), 732–741.
- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*, 16(1), 22–34.
- Miller, G. E., Stetler, C. A., Carney, R. M., Freedland, K. E., & Banks, W. A. (2002). Clinical depression and inflammatory risk markers for coronary heart disease. *The American Journal of Cardiology*, 90(12), 1279–1283.
- Mitani, H., Shirayama, Y., Yamada, T., Maeda, K., Ashby, C. R., & Kawahara, R. (2006). Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(6), 1155–1158.
- Moffitt, T. E., Caspi, A., Taylor, A., Kokaua, J., Milne, B. J., Polanczyk, G., & Poulton, R. (2009). How common are common mental disorders? Evidence that lifetime prevalence rates are doubled by prospective versus retrospective ascertainment. *Psychol Med*, 40(6), 899–909.
- Molteni, R., Calabrese, F., Cattaneo, A., Mancini, M., Gennarelli, M., Racagni, G., & Riva, M. A. (2009). Acute Stress Responsiveness of the Neurotrophin BDNF in the Rat Hippocampus is Modulated by Chronic Treatment with the Antidepressant Duloxetine. *Neuropsychopharmacology*, 34, 1523–1532.
- Moryl, E., Danysz, W., & Quack, G. (1993). Potential Antidepressive Properties of Amantadine, Memantine and Bifemelane. *Pharmacology & Toxicology*, 72(6), 394–397.
- Muller, N., Aye-Mu Myint, & Schwarz, M. J. (2010). Inflammatory Biomarkers and Depression. *Neurotoxicity Research*, 19, 308–318.
- Muller, D., Djebbara-Hannas, Z., Jourdain, P., Vutskits, L., Durbec, P., Rougon, G., & Kiss, J. Z. (2000). Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *PNAS*, 97(8), 4315–4320
- Muller, J., Pentylala, S., Dilger, J., & Pentylala, S. (2016). Ketamine enantiomers in the

- rapid and sustained antidepressant effects. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 6(3), 185–192.
- Murphy, P. G., Borthwick, L. A., Altares, M., Gauldie, J., Kaplan, D., & Richardson, P. M. (2000). Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12(6), 1891–1899.
- Murray, C. J. L., Lopez, A. D., Mathers, C. D., & Stein, C. (2001). *The Global Burden of Disease 2000 project: aims, methods and data sources. 2001*(No.~36).
- Musazzi, L., Treccani, G., & Popoli, M. (2012). Glutamate hypothesis of depression and its consequences for antidepressant treatments. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(10), 1169–1172.
- Nacher, J., Alonso-Llosa, G., Rosell, D., & McEwen, B. (2002). PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist administration. *Brain Research*, 927(2), 111–121.
- Nacher, J., Pham, K., Gil-Fernandez, V., & McEwen, B. S. (2004). Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex. *Neuroscience*, 126(2), 503–509.
- Nair, A., & Bonneau, R. H. (2006). Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *Journal of Neuroimmunology*, 171(1–2), 72–85.
- Nestler, E. J. (2014). Epigenetic mechanisms of depression. *JAMA Psychiatry*, 71(4), 454–456.
- Nestler, E. J., & Carlezon, W. A. J. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1151–1159.
- Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1161–1169.
- Nibuya, M., Morinobu, S., & Duman, R. S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. *The Journal of Neuroscience*, 15(11), 7087–7097.
- Nowak, G., Ordway, G. A., & Paul, I. A. (1995). Alterations in the N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor complex in the frontal cortex of suicide victims.

- Brain Research*, 675(1–2), 157–164.
- O’connor, J. C., Lawson, M. A., André, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2009). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Molecular Psychiatry*, 14, 511–522.
- Osimo, E. F., Baxter, L. J., Lewis, G., Jones, P. B., & Khandaker, G. M. (2019). Prevalence of low-grade inflammation in depression: a systematic review and meta-analysis of CRP levels. *Psychological Medicine*, 49(12)
- Page, C. E., Shepard, R., Heslin, K., & Coutellier, L. (2019). Prefrontal parvalbumin cells are sensitive to stress and mediate anxiety-related behaviors in female mice. *Scientific Reports*, 9(1), 19772.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6),
- Park, M., Niciu, M. J., & Zarate, C. A. J. (2015). Novel Glutamatergic Treatments for Severe Mood Disorders. *Current Behavioral Neuroscience Reports*, 2(4), 198–208.
- Paykel, E. S. (2006). Depression: major problem for public health. *Epidemiologia e psichiatria sociale*, 15(1), 4–10.
- Pearson, T. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon Iii, R. O., Criqui, M., Fadl, Y. Y., Fortmann, S. P., Hong, Y., Myers, G. L., Rifai, N., Smith, S. C., Taubert, K., Tracy, R. P., & Vinicor, F. (2003). Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circulation*, 107(3).
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R., & McEwen, B. S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 17(4), 879–886.
- Pittenger, C., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2007). The NMDA receptor as a therapeutic target in major depressive disorder. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 6(2), 101–115.
- Pochwat, B., Nowak, G., & Szewczyk, B. (2019). An update on NMDA antagonists in depression. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 19(11), 1055–1067.
- Pochwat, B., Rafało-Ulińska, A., Domin, H., Misztak, P., Nowak, G., & Szewczyk, B.

- (2017). Involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the short and long-lasting antidepressant-like activity of NMDA receptor antagonists (zinc and Ro 25-6981) in the forced swim test in rats. *Neuropharmacology*, *125*, 333–342.
- Pocock, J. M., & Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, *30*(10), 527–535.
- Polansky, N. A. (1979). Social Origins of Depression: A Study of Psychiatric Disorders in Women. *Social Forces*, *58*(1), 386–387.
- Pompili, M., Serafini, G., Innamorati, M., Venturini, P., Fusar-Poli, P., Sher, L., Amore, M., & Girardi, P. (2013). Agomelatine, a novel intriguing antidepressant option enhancing neuroplasticity: a critical review. *The World Journal of Biological Psychiatry*, *14*(6), 412–431.
- Pruessner, M., Hellhammer, D. H., Pruessner, J. C., & Lupien, S. J. (2003). Self-reported depressive symptoms and stress levels in healthy young men: Associations with the cortisol response to awakening. *Psychosomatic Medicine*, *65*(1), 92–99.
- Putignano, P., Dubini, A., Toja, P., Invitti, C., Bonfanti, S., Redaelli, G., Zappulli, D., & Cavagnini, F. (2001). Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. In *European Journal of Endocrinology*, 145.
- Qi, X., Lin, W., Li, J., Li, H., Wang, W., Wang, D., & Sun, M. (2008). Fluoxetine increases the activity of the ERK-CREB signal system and alleviates the depressive-like behavior in rats exposed to chronic forced swim stress. *Neurobiology of Disease*, *31*(2), 278–285.
- Qi, X., Lin, W., Li, J., Pan, Y., & Wang, W. (2006). The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress. *Behavioural Brain Research*, *175*(2), 233–240.
- Qidwai, T., & Khan, F. (2011). Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. *Immunology*, *74*(6).
- Radley, J. J., Sisti, H. M., Hao, J., Rocher, A. B., McCall, T., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex.

- Neuroscience*, 125(1), 1–6.
- Raghunatha, P., Vosoughi, A., Kauppinen, T. M., & Jackson, M. F. (2020). Microglial NMDA receptors drive pro-inflammatory responses via PARP-1/TRMP2 signaling. *Glia*, 68(7), 1421–1434.
- Raison, C. L., Rutherford, R. E., Woolwine, B. J., Shuo, C., Schettler, P., Drake, D. F., Haroon, E., & Miller, A. H. (2013). A Randomized Controlled Trial of the Tumor Necrosis Factor Antagonist Infliximab for Treatment-Resistant Depression The Role of Baseline Inflammatory Biomarkers. *JAMA Psychiatry*, 70(1), 31–41.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Dubey, P., Stockmeier, C. A., Ranga, K., & Krishnan, R. (2005). Prominent Reduction in Pyramidal Neurons Density in the Orbitofrontal Cortex of Elderly Depressed Patients. *Biol Psychiatry*, 58(4), 297–306.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473), 1545–1564.
- Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. (2011). <https://www.azus.gov.rs/wp-content/uploads/2011/04/Vodic-zadijagnostikovanje-i-licenje-poremecaja-rada-stitaste-zlezde1.pdf>.
- Reti, I. M., & Baraban, J. M. (2000). Sustained Increase in Narp Protein Expression Following Repeated Electroconvulsive Seizure. *Neuropsychopharmacology*, 23(4).
- Richelson, E. (2001). Pharmacology of antidepressants. *Mayo Clinic Proceedings*, 76(5), 511–527.
- Ruvinsky, I., & Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(6), 342–348.
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., Agerman, K., Haapasalo, A., Nawa, H., Aloyz, R., Ernfors, P., & Castrén, E. (2003). Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *Journal of Neuroscience*, 23(1), 349–357.
- Sairanen, M., O'Leary, O. F., Knuuttila, J. E., & Castrén, E. (2007). Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat.

- Neuroscience*, 144(1), 368–374.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., & Sugiyama, H. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*, 373(6510), 151–155.
- Sanacora, G., & Schatzberg, A. F. (2015). Ketamine: Promising Path or False Prophecy in the Development of Novel Therapeutics for Mood Disorders? *Neuropsychopharmacology*, 40(2), 259–267.
- Sanacora, G., Treccani, G., & Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*, 62(1), 63–77.
- Sandi, C., & Loscertales, M. (1999). Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs. chronic corticosterone treatments. *Brain Research*, 828(1–2), 127–134.
- Sandi, C., Merino, J. J., Cordero, M. I., Touyarot, K., & Venero, C. (2001). Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience*, 102(2), 329–339.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist*, 19(1), 62–75.
- Sarkar, D., Park, E. S., Emdad, L., Lee, S.-G., Su, Z.-Z., & Fisher, P. B. (2008). Molecular Basis of Nuclear Factor- κ B Activation by Astrocyte Elevated Gene-1. *Cancer Res*, 68(5):1478-84.
- Sathyanesan, M., Haiar, J. M., Watt, M. J., & Newton, S. S. (2017). Restraint stress differentially regulates inflammation and glutamate receptor gene expression in the hippocampus of C57BL/6 and BALB/c mice. *Stress*, 20(2), 197–204.
- Saveanu, R. V., & Nemeroff, C. B. (2012). Etiology of Depression: Genetic and Environmental Factors. *Psychiatric Clinics of North America*, 35(1), 51–71.
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976.
- Schoepp, D. D. (2001). Unveiling the Functions of Presynaptic Metabotropic

- Glutamate Receptors in the Central Nervous System. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(1), 12 LP – 20.
- Schüle, C., Baghai, T. C., Eser, D., Häfner, S., Born, C., Herrmann, S., & Rupprecht, R. (2009). The Combined Dexamethasone/CRH Test (DEX/CRH Test) and Prediction of Acute Treatment Response in Major Depression. *PLoS One*, 4(1).
- Schuster, T., Krug, M., Hassan, H., & Schachner, M. (1998). Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *Journal of Neurobiology*, 37(3), 359–372.
- Schwarcz, R., & Pellicciari, R. (2002). Manipulation of brain kynurenes: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(1), 1–10.
- Schwieler, L., Larsson, M. K., Skogh, E., Kegel, M. E., Orhan, F., Abdelmoaty, S., Finn, A., Bhat, M., Samuelsson, M., Lundberg, K., Dahl, M.-L., Sellgren, C., Schuppe-Koistinen, I., Svensson, C. I., Erhardt, S., & Engberg, G. (2015). Increased levels of IL-6 in the cerebrospinal fluid of patients with chronic schizophrenia—significance for activation of the kynurenine pathway. *J Psychiatry Neurosci*, 40(2), 126–159.
- Shadrina, M., Bondarenko, E. A., & Slominsky, P. A. (2018). Genetics Factors in Major Depression Disease. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 334.
- Shepard, R., Page, C. E., & Coutellier, L. (2016). Sensitivity of the prefrontal GABAergic system to chronic stress in male and female mice: Relevance for sex differences in stress-related disorders. *Neuroscience*, 332, 1–12.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., & Iyo, M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 54(1), 70–75.
- Shirayama, Y., Chen, C.-H., Nakagawa, S., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2002). Brain-Derived Neurotrophic Factor Produces Antidepressant Effects in Behavioral Models of Depression. *J Neurosci*, 22(8), 3251–3261.
- Shirayama, Y., Yang, C., Zhang, J., Chun, Ren, Q., Yao, W., & Hashimoto, K. (2015). Alterations in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor

- proBDNF in the brain regions of a learned helplessness rat model and the antidepressant effects of a TrkB agonist and antagonist. *European Neuropsychopharmacology*, 25(12), 2449–2458.
- Silingardi, D., Angelucci, A., De Pasquale, R., Borsotti, M., Squitieri, G., Brambilla, R., Putignano, E., Pizzorusso, T., & Berardi, N. (2011). ERK pathway activation bidirectionally affects visual recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 84. 4
- Singh, J., & Kaur, G. (2009). Transcriptional regulation of PSA-NCAM expression by NMDA receptor activation in RA-differentiated C6 glioma cultures. *Brain Research Bulletin*, 79(3–4), 157–168.
- Sorrells, S. F., & Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(3), 259–272.
- Stelzhammer, V., Haenisch, F., Chan, M. K., Cooper, J. D., Steiner, J., Steeb, H., Martins-De-Souza, D., Rahmoune, H., Guest, P. C., & Bahn, S. (2014). Proteomic changes in serum of first onset, antidepressant drug-naïve major depression patients. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17(10), 1599–1608.
- Stockmeier, C. A., Mahajan, G. J., Konick, L. C., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Meltzer, H. Y., Uylings, H. B. M., Friedman, L., & Rajkowska, G. (2004). Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biological Psychiatry*, 56(9), 640–650.
- Stone, T. W. (2000). Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(4), 149–154.
- Sullivan, P. F., Michael Neale, F. C., & Kendler, K. S. (2000). Reviews and Overviews Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. *Am J Psychiatry*, 157.
- Svenningsson, P., Tzavara, E. T., Witkin, J. M., Fienberg, A. A., Nomikos, G. G., & Greengard, P. (2001). Involvement of striatal and extrastriatal DARPP-32 in biochemical and behavioral effects of fluoxetine (Prozac). *PNAS*, 99(5), 3182–3187
- Szewczyk, B., Pałucha-Poniewiera, A., Poleszak, E., Pilc, A., & Nowak, G. (2012). Investigational NMDA receptor modulators for depression. *Expert Opinion on*

Investigational Drugs, 21(1), 91–102.

- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Mammalian Target of Rapamycin-Dependent Local Activation of Translation Machinery and Protein Synthesis in Neuronal Dendrites. *J Neurosci*, 24(44), 9760-9769.
- Tavares, R. G., Tasca, C. I., Santos, C. E. S., Alves, L. B., Porciúncula, L. O., Emanuelli, T., & Souza, D. O. (2002). Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochemistry International*, 40(7), 621–627.
- Thomas, A. J., Sue Davis, Mrcp., Morris, C., Jackson, E., Richard Harrison, Mrcp., & John O, Mrcp. T. (2005). Brief Report Increase in Interleukin-1 β in Late-Life Depression. *Am J Psychiatry*, 162.
- Thompson, D. R. (2012). Motivational interviewing improves patients' mood and reduces mortality 12 months poststroke. *Evidence-Based Nursing*, 15(2), 35.
- Thomson, F., & Craighead, A. M. (2008). Innovative Approaches for the Treatment of Depression: Targeting the HPA Axis. *Neurochem Res*, 33(4), 691-707.
- Ting, E. Y. C., Yang, A. C., & Tsai, S. J. (2020). Role of interleukin-6 in depressive disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6).
- Touyarot, K., Sandi, C., & Sandi, C. (2002). Chronic Restraint Stress Induces an Isoform-Specific Regulation on the Neural Cell Adhesion Molecule in the Hippocampus. *Neural Plasticity*, 9(3).
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496.
- Trullas, R., & Skolnick, P. (1990). Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European Journal of Pharmacology*, 185(1), 1–10.
- Tsao, C.-W., Lin, Y.-S., Chen, C.-C., Bai, C.-H., & Wu, S.-R. (2006). Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 30(5), 899–905.
- Tsuang, M. T., Tohen, M., & Jones, P. B. (2011). *Textbook of Psychiatric Epidemiology*,

- 3rd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Ulbrich, M. H., & Isacoff, E. Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Neuroscience*, *16*.
- Uysal, N., Sisman, A. R., Dayi, A., Ozbal, S., Cetin, F., Baykara, B., Aksu, I., Tas, A., Cavus, S. A., Gonenc-Arda, S., & Buyuk, E. (2012). Acute footshock-stress increases spatial learning–memory and correlates to increased hippocampal BDNF and VEGF and cell numbers in adolescent male and female rats. *Neuroscience Letters*, *514*(2), 141–146.
- Varea, E., Blasco-Ibáñez, J. M., Ngeles Gó Mez-Climent, M. A. ´, Castillo-Gó Mez, E., Crespo, C., José Martínez-Guijarro, F., & Nácher, J. (2007). Chronic Fluoxetine Treatment Increases the Expression of PSA-NCAM in the Medial Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, *32*, 803–812.
- Venero, C., Tilling, T., Hermans-Borgmeyer, I., Schmidt, R., Schachner, M., & Sandi, C. (2002). Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience*, *115*(4), 1211–1219.
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., & Collingridge, G. L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research*, *1621*, 5–16.
- W-Y Yu, Y., Chen, T.-J., Hong, C.-J., Chen, H.-M., & Tsai, S.-J. (2003). Association Study of the Interleukin-1beta (C-511T) Genetic Polymorphism with Major Depressive Disorder, Associated Symptomatology, and Antidepressant Response. *Neuropsychopharmacology*, *28*, 1182–1185.
- Wainwright, S. R., & Galea, L. A. M. (2013). The Neural Plasticity Theory of Depression: Assessing the Roles of Adult Neurogenesis and PSA-NCAM within the Hippocampus. *Neural Plasticity*, *2013*, 14.
- Walker, A. K., Budac, D. P., Bisulco, S., Lee, A. W., Smith, R. A., Beenders, B., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2013a). NMDA Receptor Blockade by Ketamine Abrogates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in C57BL/6J Mice. *Neuropsychopharmacology*, *38*, 1609–1616.
- Watanabe, Y., Gould, E., & McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, *588*(2), 341–345.

- Watt, D. F., & Panksepp, J. (2009). Depression: An Evolutionarily Conserved Mechanism to Terminate Separation Distress? A Review of Aminergic, Peptidergic, and Neural Network Perspectives. *Neuropsychoanalysis*, *11*(1), 7–51.
- Wędzony, K., Chocyk, A., & Maćkowiak, M. (2013). Potential roles of NCAM/PSA-NCAM proteins in depression and the mechanism of action of antidepressant drugs. *Pharmacological Reports*, *65*(6), 1471–1478.
- Weiland, N. G., Orchinik, M., & Tanapat, P. (1997). Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus. *Neuroscience*, *78*(3), 653–662.
- Widman, A. J., & McMahon, L. L. (2018). Disinhibition of CA1 pyramidal cells by low-dose ketamine and other antagonists with rapid antidepressant efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(13), 3007–3016.
- Wilbrecht, L., Holtmaat, A., Wright, N., Fox, K., & Svoboda, K. (2010). Structural Plasticity Underlies Experience-Dependent Functional Plasticity of Cortical Circuits. *Journal of Neuroscience*, *30*(14), 4927–4932.
- Willner, P. (1990). Animal models of depression: An overview. *Pharmacology & Therapeutics*, *45*(3), 425–455.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, *52*(2), 90–110.
- Winder, D. G., & Sweatt, J. D. (2001). Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(7), 461–474.
- Wolfson, P. E. (2014). Psychedelic Experiential Pharmacology: Pioneering Clinical Explorations with Salvador Roquet (How I Came to All of This: Ketamine, Admixtures and Adjuvants, Don Juan and Carlos Castaneda Too): An Interview with Richard Yensen. *International Journal of Transpersonal Studies*, *33*(2), 160–174.
- World Health Organization, 2003. Investing In Mental Health. (2003). Accessed 30 March 2016) [Http://Www.Who.Int/Mental_health/Media/Investing_mnh.Pdf](http://www.who.int/Mental_health/Media/Investing_mnh.Pdf).

- World Health Organization, 2017. *Depression and other common mental disorders: global health estimates*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610>.
- Xing, B., Bachstetter, A. D., & Van Eldik, L. J. (2011). Microglial p38a MAPK is critical for LPS-induced neuron degeneration, through a mechanism involving TNFa. *Mol Neurodegener*, 6(84).
- Yang, C., Yang, J., Luo, A., & Hashimoto, K. (2019). Molecular and cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine enantiomers and its metabolites. *Translational Psychiatry*, 9(1).
- Yang, X., Yang, C., Farberman, A., Rideout, T. C., de Lange, C. F., France, J., & Fan, M. Z. (2008). The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *Journal of Animal Science*, 86(14), 36–50.
- Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(2), 181–213.
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., & Reshef, R. (2015). Depression as a microglial disease. *Trends in Neurosciences*, 38(10), 637–658.
- Yu, H., & Chen, Z. (2011). The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin*, 32(1), 3-11.
- Zanos, P., Thompson, S. M., Duman, R. S., Zarate, C. A. J., & Gould, T. D. (2018). Convergent Mechanisms Underlying Rapid Antidepressant Action. *CNS Drugs*, 32(3), 197–227.
- Zhang, J.-C., Yao, W., Dong, C., Yang, C., Ren, Q., Ma, M., Han, M., & Hashimoto, K. (2015a). Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology*, 232, 4325–4335.
- Zhang, J. chun, Yao, W., Dong, C., Yang, C., Ren, Q., Ma, M., Han, M., Wu, J., Ushida, Y., Suganuma, H., & Hashimoto, K. (2017). Prophylactic effects of sulforaphane on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 39, 134–144.
- Zhang, J., Wu, J., Fujita, Y., Yao, W., Ren, Q., Yang, C., Li, S., Shirayama, Y., & Hashimoto, K. (2015b). Antidepressant Effects of TrkB Ligands on Depression-Like Behavior and Dendritic Changes in Mice After Inflammation. *International*

Journal of Neuropsychopharmacology, 1–12.

- Zhao, X., Cao, F., Liu, Q., Li, X., Xu, G., Liu, G., Zhang, Y., Yang, X., Yi, S., Xu, F., Fan, K., & Ma, J. (2019). Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. *Behavioural Brain Research*, *364*, 494–502.
- Zhong, P., Wang, W., Pan, B., Liu, X., Zhang, Z., Long, J. Z., Zhang, H., Cravatt, B. F., & Liu, Q. (2014). Monoacylglycerol lipase inhibition blocks chronic stress-induced depressive-like behaviors via activation of mTOR signaling. *Neuropsychopharmacology*, *39*(7), 1763–1776.
- Zhu, S., & Paoletti, P. (2015). Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Current Opinion in Pharmacology*, *20*, 14–23.
- Zhu, W.-L., Wang, S.-J., Liu, M.-M., Shi, H.-S., Zhang, R.-X., Liu, J.-F., Ding, Z.-B., & Lu, L. (2013). Glycine site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist 7-CTKA produces rapid antidepressant-like effects in male rats. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, *38*(5), 306–316.
- Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P. J., & Henn, F. A. (2010). Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology*, *58*(2), 465–473.
- Zobel, A. W., Yassouridis, A., Frieboes, R.-M., & Holsboer, F. (1999). Prediction of Medium-Term Outcome by Cortisol Response to the Combined Dexamethasone-CRH Test in Patients With Remitted Depression. *Am J Psychiatry*, *156*(6).
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(1), 21–35.
- Zörner, B., Wolfer, D. P., Brandis, D., Kretz, O., Zacher, C., Madani, R., Grunwald, I., Lipp, H. P., Klein, R., Henn, F. A., & Gass, P. (2003). Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: Behaviorally more hyperactive than “depressive.” *Biological Psychiatry*, *54*(10), 972–982.

8. PRILOZI

Биографија аутора

Естер Франција Жерајић је рођена 15.03.1989. године у Зрењанину. Зрењанинску гимназију (општи смер) уписује 2004. године а, као носилац *Вукове дипломе*, завршава је 2008. године. Исте године уписује и основне академске студије Биологије на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду, које завршава 2012. године са просечном оценом 9.08. По завршетку основних студија уписује мастер студије Молекуларне биологије, које 2014. године и завршава са просечном оценом 9.4. Паралелно са мастер студијама Молекуларне биологије, 2012. године уписује и мастер студије Репродуктивне биологије - Ембриологије које завршава 2016. године са просечном оценом 9.5. Докторске студије Биологије, модул Експериментална неуробиологија на Катерди за општу физиологију и биофизику, на Биолошком факултету Универзитета у Београду уписује 2015. године.

Од фебруара 2015. године запослена је у лабораторији за Молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке "Винча" где је, у оквиру ангажовања на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја III41029 „Дефинисање кластера молекуларних биомаркера за побољшање и терапију поремећаја расположења“ под руководством др Мирослава Аџића, израђивала експериментални део своје докторске тезе. Од 01. јануара 2020. године ангажована је у оквиру Програма „Животна средина и здравље“ Института за нуклеарне науке „Винча“ на теми „Преклиничка и клиничка испитивања психијатријских и неуродегенеративних болести“ под руководством др Мирослава Аџића.

Истраживачка активност Естер Франције Жерајић је фокусирана на изучавању улоге GluN2A субјединице NMDA рецептора у посредовању ефеката инфламације на механизме који доводе до настанка понашања налик депресивном код мишева, са посебним интересовањем за синаптогенетске процесе. До сада је аутор 2 и коаутор 6 радова публикованих у међународним часописима као и аутор и коаутор 12 саопштења у зборницима са научних скупова.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Естер Франција Жерајић
Број индекса: Б3033/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом „Улога GluN2A субјединице NMDA рецептора у процесима синаптогенезе у неуроинфламацији и понашању налик депресивном“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација ни у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Естер Франција Жерајић

Број индекса: Б3033/2015

Студијски програм: Експериментална неуробиологија

Наслов рада „Улога **GluN2A** субјединице **NMDA** рецептора у процесима синаптогенезе у неуроинфламацији и понашању налик депресивном“

Ментори: др Мирослав Аџић и проф. др Надежда Недељковић

Потписана: Естер Франција Жерајић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: „Улога **GluN2A** субјединице **NMDA** рецептора у процесима синаптогенезе у неуроинфламацији и понашању налик депресивном“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.