

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**BIOLOŠKI FAKULTET**

Milica Janković

**POLNO-SPECIFIČNI EFEKTI  
ENDOKANABINOIDA NA PONAŠANJE I  
AKTIVNOST KATEHOLAMINSKOG SISTEMA U  
HIPOKAMPUSU I MEDIJALNOM  
PREFRONTALNOM KORTEKSU U ANIMALNOM  
MODELU DEPRESIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF BIOLOGY**

Milica Janković

**SEX-SPECIFIC EFFECTS OF  
ENDOCANNABINOIDS ON BEHAVIOUR AND  
ACTIVITY OF CATECHOLAMINE SYSTEM IN  
HIPPOCAMPUS AND MEDIAL PREFRONTAL  
CORTEX IN ANIMAL MODEL OF DEPRESSION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

## KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

### MENTORI

**dr Slađana Dronjak Čučaković**, naučni savetnik,  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju  
Univerzitet u Beogradu

**prof. dr Nebojša Jasnić**, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

### ČLANOVI KOMISIJE

**dr Nataša Spasojević Popović**, viši naučni saradnik,  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju  
Univerzitet u Beogradu

**dr Iva Lakić**, docent,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**dr Miroslav Adžić**, naučni savetnik,  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju  
Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta OI 173044: „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama CNS-a i perifernog tkiva kod sisara” i u okviru programa “Životna sredina i zdravlje” na temu “Regulacija kateholaminskog sistema u centralnim i perifernim tkivima tokom stresa 0902301” finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije čiji je rukovodilac dr Slađana Dronjak Čučaković.*

*Teško je adekvatno iskazati zahvalnost svim ljudima koji su pomogli i doprineli prilikom izrade ove doktorske disertacije.*

*Najdublju zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Slađani Dronjak Čučaković, na posvećenosti, podršci, i razumevanju koje je iskazala pri svakom koraku mog naučnog rada i izrade disertacije, kao i na ukazanom poverenju. Beskrajno hvala na prenetom znanju i na uvođenju u svet neurofiziologije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Nebojši Jasniću na konstruktivnim savetima i sugestijama prilikom pisanja doktorske disertacije, što je značajno pomoglo u tome da ona dobije kvalitetan konačni oblik.*

*Veliko hvala dr Nataši Spasojević Popović na svom uloženom trudu da mi prenese znanje, korisnim savetima i sugestijama tokom eksperimentalnog rada, pisanja i publikovanja naučnih radova i pisanja same disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Ivi Lakić i dr Miroslavu Adžiću na izuzetnoj efikasnosti i veoma korisnim sugestijama tokom pisanja i finalizovanja ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem i kolegama iz laboratorije, Kristini Virijević, Bojani Stefanović i dr Predragu Jovanoviću, za pomoć prilikom eksperimentalnog dela izrade doktorske disertacije. Ogromnu zahvalnost iskazujem Harisi Ferizović, koleginici i dragom prijatelju, sa kojom sam zajedno prošla sve korake u naučnom radu i koja je uvek bila tu za mene kao stručna i prijateljska podrška.*

*Na kraju, želim da zahvalim svim prijateljima koji su bili uz mene tokom ovih godina. Ivani Milovanović i Milici Ašković na tome što su izdržale da u toku zajedničkog života stalno pričam o svom radu, Nikoli Kokanovu, Kristini Mitrović i Nataši Maćak na tome što su mi ulepšali svaku pauzu na poslu, Milošu Mandiću i Ani Korntner na divnom društvu u toku studiranja, Viktoru Daniloviću na podršci kada mi je bilo najteže. Takođe, hvala i svim divnim ljudima sa kojima sam maćevala, putovala, igrala frp i video igre i pričala o svojim problemima.*

*I najbitnije, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, bez koje ne bih bila tu gde sam danas. Neizmerno zahvaljujem svojim roditeljima, Miri i Draganu Janković, za beskrajnu ljubav, razumevanje i podršku u mom obrazovanju od samog detinjstva. Takođe, zahvaljuem svom bratu, Milanu Jankoviću i sestri od tetke, Jeleni Ristić, zbog toga što su uvek bili tu za mene.*

*Ovu disertaciju želim da posvetim svima koji su se ikada borili ili se još uvek bore protiv depresije.*

## **Polno specifični efekti endokanabinoida na ponašanje i aktivnost kateholaminskog sistema u hipokampusu i medijalnom prefrontalnom korteksu u animalnom modelu depresije**

### **SAŽETAK**

Mnogi aspekti patofiziologije depresije još nisu dovoljno razjašnjeni, poput činjenice da nesrazmerno više pogađa žene od muškaraca. Endokanabinoidni neurotransmitterski sistem mozga ima važnu ulogu u održavanju homeostaze organizma tokom stresa i istraživanja upućuju na njegovu uključenost u razvoj depresije. Korišćenjem URB597, inhibitora hidrolaze masno-kiselinskih amida, koji svojim dejstvom povećava količinu dostupnog anadamida, ispitivano je dejstvo endokanabinoida na ponašanje nalik depresivnom i anksioznom, količinu kateholamina, enzime njihove sinteze (TH, DBH) i razgradnje (COMT i MAO-A) i kateholaminske receptore, inflamatorni status i aktivaciju MAPK i PI3K/Akt signalnih puteva u medijalnom prefrontalnom korteksu (mPFC) i hipokampusu u animalnom modelu depresije. Pacovi oba pola bili su izloženi hroničnom nepredvidivom stresu (CUS) u periodu od 6 nedelja. Poslednje dve nedelje CUS protokola, životinje su primale URB597 (0.3mg/kg) ili rastvarač iste zapremine. Ponašanje životinja je praćeno primenom testova prinudog plivanja, otvorenog plus lavirinta i testa prepoznavanja novog objekta, dok su neurohemijski parametri ispitivani Western blot i ELISA metodom. Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je URB597 snažnije ispoljio antidepresivna i anksiolitička svojstva kod pacova muškog pola, kao i da je pozitivno, polno-specifično uticao na memoriju pacova. URB597 je polno specifično regulisao kateholaminski sistem, MAPK i PI3K/Akt signalni put u mozgu. URB597 je smanjio nivo proinflamatornih citokina u hipokampusu i mPFC životinja oba pola, što doprinosi njegovom pozitivnom dejstvu u ovom modelu depresije. Rezultati ove disertacije omogućavaju bolje razumevanje polnih razlika u patofiziologiji i tretmanu depresije i predstavljaju značajan doprinos u razumevanju modulatornog dejstva endokanabinoida na kateholaminski sistem, MAPK i PI3K signalizaciju u mPFC i hipokampusu.

**Ključne reči:** depresija, ponašanje, hronični nepredvidivi stres, FAAH inhibitor URB597, kateholamini, endokanabinoidi, citokini, MAPK signalni put, PI3K/Akt signalni put

**Naučna oblast:** Biološke nauke

**Uža naučna oblast:** Neuroendokrinologija

# **Sex-specific effects of endocannabinoids on behaviour and activity of catecholamine system in hippocampus and medial prefrontal cortex in animal model of depression**

## **ABSTRACT**

There are many aspects of pathophysiology of depression that remain unclear, such as the disproportionate prevalence of depression among women compared to men. The endocannabinoid neurotransmitter system in the brain plays an important role in maintaining homeostasis during stressful events, and research suggests its significance in the development of depression. URB597, a selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase that increases the availability of anandamide, was used to analyze the effects of endocannabinoids on depressive-like and anxiety-like behavior, catecholamine levels, enzymes responsible for catecholamine synthesis (TH, DBH), degradation (COMT and MAO-A), catecholamine receptors, inflammatory status, and activation of the MAPK and PI3K/Akt signal pathways in the medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus in an animal model of depression. Rats of both sexes were exposed to the chronic unpredictable stress (CUS) for 6 weeks. During the last two weeks of the CUS protocol, animals were injected with URB597 (0.3 mg/kg) or the same volume of vehicle. Animal behavior was examined using the forced swim test, elevated plus maze test, and the novel object recognition test, and neurochemical parameters were examined using Western blot and ELISA methods. The results of this PhD dissertation demonstrated that URB597 had stronger antidepressant and anxiolytic effects in male rats, as well as a positive influence on the memory of rats in a sex-specific manner. URB597 regulated the catecholamine system and MAPK and PI3K/Akt signal pathways in the brain in a sex-specific manner. URB597 reduced the levels of proinflammatory cytokines in the hippocampus and mPFC of animals of both sexes, contributing to its positive effects in this model of depression. The results of this thesis allow for a better understanding of sex differences in the pathophysiology and treatment of depression and provide a valuable contribution to understanding the modulatory effects of endocannabinoids on the catecholamine system, MAPK and PI3K signal pathways in the mPFC and hippocampus.

**Key words:** depression, behavior, chronic unpredictable stress, FAAH inhibitor URB597, catecholamines, endocannabinoids, cytokines, MAPK signal pathway, PI3K/Akt signal pathway

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Neuroendocrinology

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Depresija .....	1
1.1.1. Mehanizmi nastanka depresije .....	2
1.1.1.1. Monoaminska hipoteza depresije .....	3
1.1.1.2. Inflamatorna/citokinska hipoteza depresije.....	3
1.1.1.3. Mitohondrijska hipoteza.....	5
1.1.1.4. Glutamatna hipoteza.....	6
1.1.1.5. Hipoteza neurogeneze, neurotrofna hipoteza i neuroplastičnost .....	6
1.1.1.6. Neuroendokrina hipoteza .....	7
1.1.1.7. Hipoteza o uticaju crevne mikrobiote na razvoj depresije .....	8
1.2. Animalni modeli depresije .....	9
1.2.1. Model hroničnog nepredvidivog stresa .....	11
1.3. Regioni mozga ključni za razvoj / ispoljavanje depresije .....	12
1.3.1. Hipokampus .....	12
1.3.2. Prefrontalni korteks .....	13
1.4. Kateholaminski sistem .....	15
1.4.1. Biosinteza kateholamina .....	15
1.4.2. Oslobađanje kateholamina .....	17
1.4.3. Receptori za kateholamine .....	18
1.4.4. Inaktivacija i razgradnja kateholamina.....	22
1.4.5. Centralni kateholaminski sistem u stresu .....	24
1.5. Mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) i fosfoinozimid-3-kinaza/ alfa serin/treonin-protein kinaza (PI3K/Akt) signalni put.....	25
1.5.1. MAPK signalni put.....	25
1.5.2. PI3K/Akt signalni put.....	28
1.6. Endokanabinoidi .....	31
1.6.1. Istorijska perspektiva.....	31
1.6.2. Endokanabinoidni sistem .....	32

1.6.3. Endokanabionoidni sistem i depresija.....	35
2. Ciljevi.....	37
3. Materijali i metode .....	38
3.1. Eksperimentalne životinje.....	38
3.2. Tretman i priprema rastvora leka .....	38
3.3. Eksperimentalni protokol .....	38
3.4. Hronični nepredvidivi stres (CUS).....	40
3.5. Testovi ponašanja.....	40
3.5.1. Test prinudnog plivanja.....	41
3.5.2. Test otvorenog plus lavirinta.....	42
3.5.3. Test prepoznavanja novog objekta.....	43
3.6. Određivanje koncentracije kateholamina u hipokampusu i medijalnom prefrontalnom korteksu ELISA metodom.....	45
3.7. Određivanje koncentracije interleukina u mozgu ELISA metodom .....	45
3.8. Western blot .....	45
3.8.1. Izolacija ukupnih proteina.....	45
3.8.2. Izolacija proteina citosola.....	46
3.8.3. Merenje koncentracije proteina.....	46
3.8.4. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza .....	47
3.8.4. Transfer proteina sa poliakrilamidnog gela na membranu .....	48
3.8.4. Imunodetekcija proteina.....	49
3.9. Statističke analize rezultata .....	51
4. Rezultati .....	52
4.1. Uticaj URB597 na ponašanje pacova oba pola izlaganih CUS.....	52
4.1.1. Test prinudnog plivanja.....	52
4.1.2. Test otvorenog plus lavirinta.....	53
4.1.3. Test prepoznavanja novog objekta.....	54
4.2. Uticaj URB597 na nivo proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$ i IL-6 i antiinflamatornog citokina IL-10 u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS.....	56
4.3. Uticaj URB597 na nivo kateholamina, ekspresiju enzima njihove sinteze, razgradnje i receptora u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS .....	58
4.3.1. Uticaj URB597 na koncentraciju kateholamina u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS .....	58
4.3.2. Uticaj URB597 na ekspresiju enzima sinteze kateholamina u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS .....	60



4.3.3. Uticaj URB597 na ekspresiju enzima razgradnje kateholamina u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS .....	62
4.3.4. Uticaj URB597 na ekspresiju $\beta_2$ -adrenalinских, D1 i D2-dopaminskih receptora u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS .....	64
4.4. Uticaj URB597 na MAPK signalni put u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS.....	66
4.5. Uticaj URB597 na PI3K/Akt signalni put u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS.....	68
5. Diskusija.....	70
5.1. Uticaj URB597 na ponašanje pacova oba pola izlaganih CUS.....	71
5.2. Uticaj URB597 na nivo kateholamina, ekspresiju enzima njihove sinteze, razgradnje i receptora u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS .....	76
5.3. Uticaj URB597 na nivo proinflammatoryh citokina IL-1 $\beta$ i IL-6 i antiinflammatoryh citokina IL-10 u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS.....	82
5.4. Uticaj URB597 na MAPK i PI3K signalne puteve u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS .....	84
6. Zaključak.....	88
7. Literatura.....	90

## Skraćenice korišćene u tekstu

<b>2-AG</b>	2-arahidonil glicerol
<b>AAAD</b>	dekarboksilaza aromatičnih aminokiselina
<b>AEA</b>	N-arahidoniletanolamid; anandamid
<b>ACTH</b>	adrenokortikotropni hormon
<b>ALDH</b>	aldehid dehidrogenaza
<b>ANOVA</b>	adenozin trifosfat
<b>ATP</b>	analiza varijansi sa tri faktora
<b>BDNF</b>	moždani neurotrofni faktor
<b>BSA</b>	goveđi serum albumin
<b>COMT</b>	katehol O-metiltransferaza
<b>CB</b>	kanabinoidni receptor
<b>CBD</b>	kanabidiol
<b>CNS</b>	centralni nervni sistem
<b>CRF</b>	kortikotropin-oslobađajući faktor
<b>cAMP</b>	ciklični adenzin monofosfat
<b>CUS</b>	hronični nepredvidivi stres
<b>DBH</b>	dopamin- $\beta$ -hidroksilaza
<b>DGL</b>	diacilglicerol lipaza
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DAT</b>	dopaminski transporter
<b>DOPAC</b>	3,4,-dihidrogenilsirćetna kiselina
<b>DOPAL</b>	3,4-dihidrogenifenilaldehid
<b>DMSO</b>	dimetil sulfoksid
<b>EGTA</b>	etilen glikol tetrasirćetna kiselina
<b>ERE</b>	element odgovora na estrogen
<b>ERK</b>	kinaze regulisane vanćelijskim signalima
<b>FAAH</b>	hidrolaza masno kiselinskih amida
<b>FOXO</b>	eng. <i>forkhead box protein O</i>
<b>GIRK</b>	kalcijum kanali okrenuti unutra spregnuti sa G-proteinom

<b>GPCR</b>	receptor spregnut sa proteinom G
<b>GRK2</b>	G-protein kuplovana kinaza 2
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$
<b>HPA</b>	hipotalamusno-hipofizne-adrenalne ose
<b>5-HT1A</b>	5-hidroksitriptaminski receptor 1A
<b>HVA</b>	homovanilična kiselina
<b>IL</b>	interleukin
<b>JNK</b>	kinaza c-Jun N-terminalnog domena
<b>IFN</b>	interferon
<b>L-DOPA</b>	dihidroksifenil-alanin
<b>LTD</b>	dugoročna depresija
<b>LTP</b>	dugoročna potencijacija
<b>3-MT</b>	3-metoksotiramin
<b>MAO</b>	monoamino oksidaza
<b>MAPK</b>	mitogenom aktivirane protein kinaze
<b>MHPA</b>	3-metoksi-4-hidroksifenilacetaldehid
<b>mTOR</b>	mehanistički target rapamicinskog kompleksa
<b>NET</b>	noradrenalinski transporter
<b>PDK1</b>	fosfoinozimid zavisna kinaza 1
<b>PLC</b>	fosfolipaza C
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
<b>PIP<sub>3</sub></b>	fosfatidilinozitol-3,4,6-trifosfat
<b>PKA</b>	protein kinaza A
<b>PH</b>	plechtrin homology
<b>PI3K</b>	fosfatidilinozitol-3-kinaza
<b>PNMT</b>	feniletanolamin N-metiltransferaza
<b>PKC</b>	protein kinaza C
<b>PFC</b>	prefrontalni korteks
<b>PTEN</b>	eng. <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
<b>PVDF</b>	polivinilidenfluorid
<b>ROS</b>	reaktivni oblici kiseonika
<b>RTK</b>	receptor tirozin kinaze

<b>SNRI</b>	inhibitori ponovnog pruzimanja noradrenalina i serotonina
<b>SSRI</b>	inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina
<b>SDS-PAGE</b>	natrijum duodecil sulfat
<b>SEM</b>	SDS – poliakrilamidna gel elektroforeza
<b>STAT</b>	prenosioci signala i aktivatori transkripcije
<b>THC</b>	tetrahidrokanabinol
<b><math>\Delta^9</math> THC</b>	delta 9-tetrahidrokanabinoil
<b>TH</b>	tirozin hidroksilaza
<b>TNF</b>	faktor nekroze tumora
<b>TSC2</b>	eng. <i>tuberous sclerosis protein 2</i>
<b>URB597</b>	cikloheksilkarbaminska kiselina 3'-karbamoilbifenil-3-il-estar
<b>VMAT1</b>	vezikularni monoaminski transporter 1
<b>VEGF</b>	vaskularni endotelni faktor rasta

# 1. Uvod

## 1.1. Depresija

Depresija predstavlja jedan od najučestalijih zdravstvenih problema današnjice. Po podacima Svetske zdravstvene organizacije, u 2019. godini je 280 miliona ljudi patilo od depresije na globalnom nivou, što čini oko 5% populacije odraslih [1]. Globalna pandemija virusa COVID-19 i posledični zdravstveni problemi, socijalno distanciranje, restrikcije u kretanju i ekonomski problemi kao rezultat su imali povećanje incidence mentalnih bolesti. Procenjeno je da je usled pandemije u 2020. godini došlo do pojave dodatnih 53.2 miliona slučajeva depresije na svetskom nivou, što je povećanje prevalencije ove bolesti od 27.6%, čime problem depresije postaje aktuelniji nego ikada ranije [2]. Aktuelnosti ove bolesti ide u prilog i to što se ukupan broj ljudi u svetu koji žive sa depresijom povećao za 49.86% od 1990. do 2017. godine [3]. Depresija se gotovo dvostruko češće dijagnostikuje kod žena nego kod muškaraca. [4]

Problem depresije doprinosi i činjenica da, uprkos dostupnim različitim farmakoterapijskim opcijama lečenja, oko polovina pacijenata sa depresijom ne reaguje na tretman antidepresivima [5]. Takođe, relaps bolesti je čest, i u proseku preko 50% pacijenata doživi još jednu epizodu depresije šest meseci nakon remisije bolesti, a 85% pacijenata može očekivati povratak depresije u periodu od 10 godina od prve epizode depresije [6]. Zbog nedovoljne efikasnosti postojećih farmakoloških tretmana za depresiju i velikog broja nuspojava, kao i činjenice da je za njihovo dejstvo potreban duži vremenski period, nauka je u stalnoj potrazi za alternativnim lekovima koji bi bili efikasni u borbi protiv ove bolesti.

Peto izdanje Dijagnostičko-statističkog priručnika za duševne poremećaje kao kriterijume za dijagnozu epizode depresije navodi istovremeno prisustvo pet ili više od sledećih devet simptoma u periodu od najmanje dve nedelje:

- depresivno raspoloženje
- anhedonija – gubitak interesovanja/zadovoljstva u gotovo svim dnevnim aktivnostima
- promene u apetitu ili značajne promene telesne mase
- problemi sa spavanjem (nesanica ili hipersomnija)
- iscrpljenost ili nedostatak energije
- psihomotorna agitacija ili retardacija
- osećaj bezvrednosti ili iracionalne krivice
- problemi sa koncentracijom
- razmišljanje o smrti ili samoubistvu

Za dijagnozu je neophodno prisustvo depresivnog raspoloženja ili anhedonije, kao i odsustvo istorija maničnih ili hipomaničnih epizoda. Takođe, da bi se dijagnostikovala depresija ovi simptomi ne bi trebalo da budu izazvani drugim medicinskim stanjem ili farmakološkom supstancom i trebalo bi da stvaraju poteškoće u normalnom funkcionisanju osobe u socijalnoj, profesionalnoj ili drugoj bitnoj životnoj oblasti [7].

Lečenje depresije uključuje sledeće vrste terapije [8]:

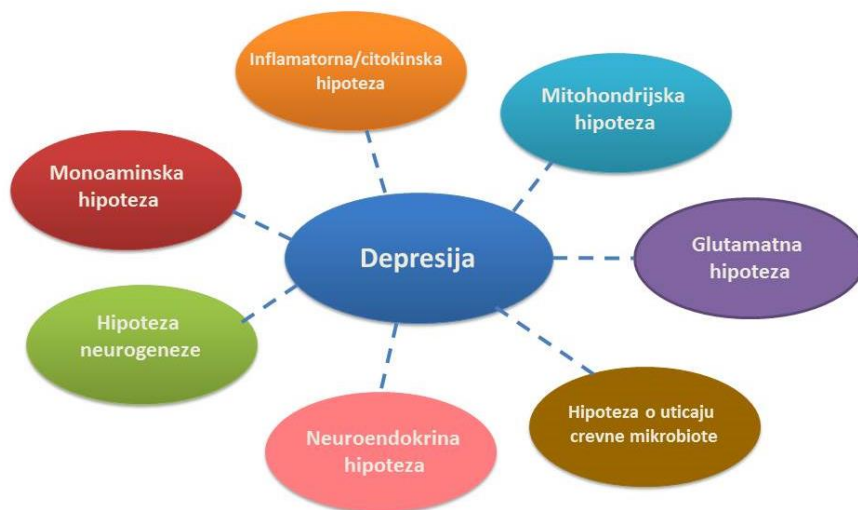
1. antidepresive i druge medikamente koji pojačavaju dejstvo antidepresiva;

2. različite vrste psihoterapije čija je efikasnost potvrđena naučnim istraživanjima – kongitivno-bihejvioralnu psihoterapiju, interpersonalnu psihoterapiju, suportivnu psihoterapiju itd.;
3. somatske nefarmakološke tretmane poput transkranijalne magnetne stimulacije, elektrokonvulzivne terapije i stimulacije vagusnog nerva.

Klinička depresija je povezana sa skraćenjem životnog veka, delimično zbog rizika od suicida, a delom zbog veće podložnosti drugim bolestima poput kardiovaskularnih, autoimunskih, dijabetesa i kancera [9]. S obzirom na učestalost samog oboljenja i psihosocijalnu onesposobljenost koju depresija izaziva, smatra se da je depresija trenutno jedan od najznačajnijih uzroka radne nesposobnosti na svetskom nivou i predstavlja ogroman teret celokupnoj svetskoj ekonomiji [10, 11].

### 1.1.1. Mehanizmi nastanka depresije

Uprkos mnogobrojnim neurofiziološkim i neuropsihijatrijskim istraživanjima, tačni mehanizmi nastanka depresije još nisu poznati. Deo razloga leži u činjenici da je depresija veoma heterogeni poremećaj sa kompleksnom patofiziologijom i mnogobrojnim mogućim uzrocima nastanka. Trenutno prihvaćeni mehanizmi koji objašnjavaju patofiziologiju depresije uključuju poremećaje u monoaminskoj signalizaciji, narušenu regulaciju hipotalamusno-hipofizne-adrenalne osovine (HPA, eng. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*), genetske i sredinske faktore, poremećenu neurogenezu i neuroplastičnost, povećanu sekreciju inflamatornih citokina, povećane nivoe sekrecije kortikotropin-oslobađajućeg hormona i druge abnormalnosti u neurotransmisiji i signalnim putevima u mozgu [12-15]. Veliki izazov u razumevanju patofiziologije depresije leži u tome što nijedna hipoteza nije uspjela da objasni sve aspekte ove bolesti. Najverovatnije nastanak depresije uključuje više međusobno povezanih i kompleksno prepletenih mehanizama [14].



**Slika 1:** Različite hipoteze o nastanku depresije.

### **1.1.1.1. Monoaminska hipoteza depresije**

Začetak moderne farmakoterapije depresije desio se pedesetih godina dvadesetog veka, kada je primećeno da iproniazid, lek koji je razvijen za lečenje tuberkuloze, dovodi do poboljšanja raspoloženja kod tuberkuloznih pacijenata koji su patili i od depresije [16]. Nedugo potom, dolazi do razvoja antipsihotika imipramina, tricikličnog jedinjenja strukturno sličnog hlorpromazinu, koji je takođe pokazao antidepresivne efekte [17]. Ovi događaji, kao i studije koje su pokazale da reserpin, antihipertenzivni lek, dovodi do pojave simptoma depresije koji mogu da se spreče tretmanom imipraminom, doveli su do uobličavanja prve hipoteze koja objašnjava pojavu depresije na hemijskom nivou [18, 19]. Naime, svi ovi lekovi, utiču na biološku dostupnost kateholamina, što je navelo Šildkrauta da postavi hipotezu po kojoj je depresija izazvana smanjenom kateholaminskom transmisijom u mozgu, tačnije nedostatkom dostupnog noradrenalina [20]. Kako je ubrzo pokazana i uloga serotonina u poremećajima depresije [21], dolazi do uobličavanja opštije, monoaminske hipoteze. Monoaminska hipoteza depresije tvrdi da je fiziološki uzrok depresije smanjenje nivoa serotonina, noradrenalina i/ili dopamina u centralnom nervnom sistemu [22].

Međutim, ova hipoteza ima više slabosti i ne uspeva da objasni nekoliko stvari. Na primer, postoje lekovi poput tianeptina, koji povećava ponovno preuzimanje serotonina, a samim tim i smanjuje količinu dostupnog serotonina, ali ima antidepresivno dejstvo [23, 24]. Takođe, neke supstance koje povećavaju monoaminsku signalizaciju u mozgu (npr. kokain i amfetamin) nisu efikasne u lečenju depresije [25]. Osim toga, različiti pacijenti ne reaguju isto na identičan antidepresiv. I najbitnije, iako do promena u monoaminskoj aktivnosti u sinapsama dolazi u roku od par sati od uzimanja antidepresiva, potrebno je nekoliko nedelja da bi došlo do terapijskih efekata [26].

Da bi se objasnio vremenski razmak između dejstva antidepresiva na dostupne monoamine i trenutka postizanja terapijskog efekta, predložena je modifikacija monoaminske hipoteze, koju neki autori nazivaju i hipoteza monoaminskih receptora [27]. U ovom obliku, u monoaminskoj hipotezi se pretpostavlja da je akutno povećanje monoamina u sinapsi samo prvi korak u kompleksnijoj kaskadi koja dovodi do antidepresivne aktivnosti. Povećanje nivoa monoamina utiče na desenzitizaciju autoreceptora u sinapsama mozga. S obzirom na to da 5-hidroksitriptaminski (serotoninski) 1A (5-HT1A) autoreceptori inhibiraju monoaminsku signalizaciju, ovo vodi do veće monoaminske aktivnosti u centralnom nervnom sistemu, koja se poklapa sa vremenskim okvirom terapijskog odgovora na lek [27]. Ipak, i ova hipoteza ima svojih nedostataka, jer 5-HT1A antagonisti nisu ostvarili pouzdanu antidepresivnu aktivnost u kliničkim studijama [28].

### **1.1.1.2. Inflamatorna/citokinska hipoteza depresije**

Iz perspektive psihoneuroimunologije, mozak se više ne smatra imunoprivilegovanim organom koji je u potpunosti odvojen od imunskih ćelija iz cirkulacije krvno-moždanom barijerom, već je postalo jasno da interakcije nervnog, imunskog i neuroendokrinog sistema imaju izuzetno važnu ulogu kako u homeostazi, tako i u patofiziologiji mozga [29]. Mogući uticaj imunskog sistema na pojavu i tok kliničke depresije je proučavan još od ranih devedesetih godina XX veka, kada je prvi put

primećena veza između inflamacije i depresije, i predložena hipoteza koja objašnjava tu povezanost [30, 31]. Od tada, mnogobrojna istraživanja su pokazala poremećenu regulaciju imunskog sistema u depresiji. Veliki broj autora je u različitim meta-studijama potvrdio povećane nivoe proinflammatoryh citokina i proteina u akutnoj fazi imunskog odgovora kod pacijenata koji boluju od kliničke depresije. Uočeno je da u krvi ovih pacijenata postoji povećan nivo IL-6, faktora nekroze tumora (TNF, eng. *tumor necrosis factor*) i C-reaktivnog proteina (CRP) [32-34]. Osim toga, faktori rizika za razvoj depresije uključuju razvojne, psihološke, medicinske i familijarne faktore rizika, kao i molekularne faktore povezane sa nasleđem, epigenetikom i ekspresijom različitih gena [35]. Veliki broj ovih faktora je kroz različite studije korelisan sa promenama u produkciji citokina ili sa izmenjenom citokinskom signalizacijom [36].

Inflamatorna hipoteza depresije postulira da promene u inflamatornom statusu organizma utiču na promene signalne transmisije u mozgu, koje pak utiču na neurogenezu i neuroplastičnost [40]. Neki autori je konkretnije formulišu i kao citokinsku hipotezu, i u ovom obliku hipoteza predlaže da proinflammatory citokini koji funkcionišu kao neuromodulatori, predstavljaju ključni faktor u medijaciji ponašajnih, neuroendokrinih i neurohemijskih karakteristika depresije [35]. Dokazi koji potvrđuju ovu hipotezu su sledeći:

1. Povećani markeri inflamacije u depresiji [37]. Dodatno, veći nivoi IL-6 su se pokazali kao predikatori intenziteta i trajanja depresivnog poremećaja [38].
2. Čest komorbiditet depresije sa bolestima čija je karakteristika pojačana inflamacija, poput dijabetesa [39], reumatoidnog artritisa [40], alergija [13] i kancera [41]. Na primer, rizik od razvoja depresije je skoro dvostruko veći kod osoba koje boluju od dijabetesa u odnosu na zdrave osobe [42]. Takođe, pokazan je i komorbiditet depresije sa Alchajmerovom i Parkinsonovom bolešću, u čijoj patogenezi neuroinflamacija potencijalno ima važnu ulogu [43].
3. Genetska veza depresije i inflamacije – različite studije su pokazale povećanu učestalost polimorfizama u genima za TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , kao i u genima koji su kritični za funkciju T-ćelija kod pacijenata kojima je dijagnostikovana klinička depresija, kao i njihovu povezanost sa odgovorom na tretman antidepresivima [44-46].
4. Pojava simptoma nalik depresiji kod eksperimentalnih životinja kojima su aplikovani inflamatorni citokini [47, 48], kao i kod pacijenata koji su primali interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) kao terapiju za druge bolesti. [49-51]
5. Anti-inflamatorno dejstvo mnogih antidepresiva pokazano na ćelijskim kulturama [52] i kroz snižene nivoe IL1- $\beta$  i IL-6 u krvi pacijenata tretiranih antidepresivima [53].
6. Aktiviranje kinureninskog puta degradacije triptofana posredstvom medijatora inflamacije. Na ovaj način se smanjuje količina slobodnog triptofana, koji je neophodan za sintezu serotonina, a kao krajnji produkti ovog metaboličkog puta nastaju neuroaktivne supstance koje blokiraju glutamatsku signalizaciju [54, 55].

Veza između inflamacije i depresije se nalazi u odgovoru organizma na stresore. Mozak stalno detektuje socijalne i sredinske faktore koji predstavljaju potencijalnu pretnju ili rizik za organizam. Ovi faktori mogu da aktiviraju transkripcioni odgovor na opasnost koji aktivira proinflammatory puteve [56]. U normalnim uslovima, ovaj odgovor je negativnom povratnom spregom regulisan lučenjem kortizola, međutim, u uslovima hroničnog stresa može doći do rezistencije na dejstvo glukokortikoida, što dovodi do prekomerne inflamacije. Kao deo normalne imunske reakcije na infekcije, proinflammatory citokini izazivaju hipotermiju, mučninu, gubitak apetita, poremećeno spavanje, anhedoniju, iscrpljenost i nedostatak interesovanja za socijalne aktivnosti [14]. Socijalna izolacija



jedinke omogućava joj da čuva energiju za borbu sa infekcijom [57]. Međutim, dugotrajna inflamacija može imati štetan efekat i potencijalno dovesti do razvoja depresije [58, 59].

I ova hipoteza ima veći broj nedostataka. Jedan od problema je to što se istraživanja na ovu temu najčešće baziraju na merenju nivoa inflamatornih citokina u serumu ili plazmi pacijenata [60]. Međutim, nije potpuno jasno kako nivoi citokina u plazmi odražavaju situaciju u mozgu. U nekim istraživanjima nije pronađena direktna korelacija između koncentracija citokina u uzorcima krvi i onih u cerberospinalnoj tečnosti [61, 62]. Iako su mnoge studije pokazale da antidepresivi dovode do smanjenja inflamacije, pokazano je da antipsihotici, koji se koriste kod oblika depresije koji imaju i psihotične epizode, dovode do povećanih nivoa proinflamatornih citokina u krvi [63]. Takođe je pokazano da su i stabilizatori raspoloženja, poput litijuma i karbamazepina, kojima se tretira bipolarni poremećaj, povezani sa povišenim nivoima proinflamatornih citokina u perifernoj cirkulaciji [64]. Osim toga, interakcija inflamacije i različitih ćelijskih signalnih puteva i dalje nije dovoljno ispitana niti je u potpunosti poznato da li neki drugi mehanizmi koji ne modifikuju periferni imunski sistem mogu uticati na neuroinflamaciju prisutnu u depresiji [13].

### 1.1.1.3. Mitohondrijska hipoteza

Mozak je metabolički zahtevan organ koji koristi skoro 20 puta više energije od ostatka tela u odnosu na svoju masu [65]. Zbog visokih energetske zahteva i nemogućnosti da čuva veće rezerve energije u formi glikogena, mozak je naročito zavisao od aktivnosti mitohondrija [66]. Aktivnost mitohondrija je od presudne važnosti za modulaciju aktivnosti neurona, nervnu plastičnost, ćelijsku otpornost i adaptaciju ponašanja [67-69]. Mitohondrijska hipoteza predlaže da izmenjena funkcija mitohondrija leži delimično u osnovi patofiziologije depresije i da je povezana sa efikasnošću terapije, progresijom i težinom bolesti [65, 70].

Istraživanja su pokazala da ljudi koji pate od različitih mitohondrijskih poremećaja mnogo češće pate i od psihijatrijskih bolesti, najčešće depresije, u odnosu na generalnu populaciju [71-73]. Fattal i saradnici [71] su pokazali da psihijatrijski simptomi najčešće prethode dijagnozi mitohondrijske bolesti, što sugeriše da depresija nije povezana sa stresom pacijenta zbog saznanja da pati od hronične bolesti. Ograničenje ovog tipa studija je u malom broju uzoraka jer su poremećaji mitohondrija retki. Studija iz 2017. godine je u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu *post mortem* uzoraka mozga pacijenata sa depresijom identifikovala promene u ekspresiji 16 gena povezanih sa mitohondrijama [74]. Među ovim genima su bili i oni koji utiču na oksidativni stres i nivo adenzin trifosfata (ATP) u neuronima [74]. Takođe, pokazano je da je nivo ATP u mozgu niži kod depresivnih pacijenata u odnosu na zdrave osobe koje su bile u kontrolnoj grupi [75, 76].

Da postoji povezanost aktivnosti mitohondrija i depresije sugerišu i različite kliničke i prekliničke studije, koje su pokazale promene u oksidativnom statusu različitih delova mozga u depresiji. Na primer, u animalnom modelu depresije koji se zasniva na hroničnom stresu imobilizacije, životinje su ispoljile smanjene nivoe antioksidansa glutaciona i povećane nivoe lipidne peroksidacije u ćelijama kore velikog mozga [77]. Istraživanja na depresivnim pacijentima su otkrila povećan nivo oksidativnog stresa, promenu u kompleksu I elektron-transportnog lanca i smanjenje nivoa antioksidativnih enzima u mozgu u odnosu na kontrolne grupe ispitanika [78, 79].

Ispitivanja dejstva antidepresiva na aktivnost mitohondrija su dala različite, često suprotstavljene rezultate. Pokazano je da selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina, mogu ispoljiti mitotoksično ili mitoprotektivno dejstvo u zavisnosti od tipa leka [80]. Iako brojni dokazi potvrđuju ulogu mitohondrija u patofiziologiji depresije, potrebno je još istraživanja na tu temu, naročito onih koja se bave potencijalnim tretmanima depresije koji bi uticali na rad mitohondrija.

#### **1.1.1.4. Glutamatna hipoteza**

Iako je opštepoznato da su monoamini esencijalni u modulaciji velikog broja kompleksnih funkcija mozga, uključujući spavanje/budno stanje, fiziološke nagone, emocije i motivaciju, uloga ekscitatorne neurotransmisije posredstvom glutamata i inhibitorne neurotransmisije posredstvom  $\gamma$ -aminobuterne kiseline (GABA) postaje sve evidentnija [81]. Po nekim procenama, glutamatni neuroni i sinapse su brojniji od svih ostalih sinapsi u mozgu, pa određene grupe naučnika smatraju da promene u ekscitatornoj i inhibitornoj neurotransmisiji imaju glavnu ulogu u emocijama i kogniciji [82]. Začetak glutamatne hipoteze ranih devedesetih godina prošlog veka započinje otkrićem da antagonisti N-metil-D-aspartatnog (NMDA) receptora mogu imati antidepresivno dejstvo [83]. Prema ovoj hipotezi do razvoja depresije može doći zbog disbalansa između ekscitatorne glutamatne neurotransmisije i inhibitorne GABA neurotransmisije [82]. Poremećena ravnoteža ova dva tipa neurotransmisije, naročito preterano oslobađanje glutamata, može dovesti do ekscitotoksičnosti i nervnih oštećenja [84]. U prilog ovoj hipotezi idu rezultati prekliničkih i kliničkih studija koji pokazuju centralne i periferne promene u glutamatnoj i GABA signalizaciji kod poremećaja raspoloženja [85, 86]. Veliki broj istraživanja je potvrdio antidepresivno i anksiolitičko dejstvo manjih doza ketamina, koji deluje kao antagonista NMDA receptora [87-89].

#### **1.1.1.5. Hipoteza neurogeneze, neurotrofna hipoteza i neuroplastičnost**

Činjenica da pacijenti koji boluju od depresije imaju smanjen volumen hipokampusa, podstakla je formulaciju dve međusobno slične hipoteze o nastanku depresije [90]. Neurogena hipoteza depresije predlaže da poremećena neurogeneza adultnog hipokampusa predstavlja uzrok depresije, kao i da regulacija adultne neurogeneze dovodi do izlečenja [91]. Slično, neurotrofna hipoteza predlaže da je depresija posledica smanjenja nivoa neurotrofnih faktora u hipokampusu, od kojih je najznačajniji neurotrofni faktor rasta poreklom iz mozga (BDNF, eng. *brain derived neurotrophic factor*), dok antidepresivi utiču na njihovu normalizaciju [92]. S obzirom na to da je u osnovi obe ove hipoteze sličan mehanizam, tj. oštećenje funkcije hipokampusa usled smanjenog obnavljanja njegovih ćelija, u ovom poglavlju će one biti razmotrene zajedno.

Neurotrofni faktor rasta poreklom iz mozga je prvo otkriven kao faktor koji ima ključnu ulogu u preživljavanju i diferencijaciji nervnih ćelija u toku embrionalnog razvića. Kasniji radovi su pokazali da njegova uloga ne prestaje sa završetkom embrionalnog razvića, već se nastavlja u vidu regulacije sinaptičke plastičnosti i formiranja sinapsi [93]. Kroz istraživanja je pokazano da dolazi do smanjenog nivoa BDNF u plazmi depresivnih pacijenata [94], kao i u *post mortem* biopsijama hipokampusa ljudi

koji su patili od depresije [95, 96]. Meta-analize su potvrdile da kod pacijenata dolazi do značajnog povećanja nivoa BDNF u plazmi nakon tretmana antidepresivima, kao i da je nivo BDNF povezan sa jačinom (težinom) ispoljenih simptoma depresije [95]. Takođe, dokazano je da BDNF utiče na oporavak nervnih ćelija hipokampusa nakon oštećenja izazvanih stresom, ali i da utiče na povećavanje neurogeneze i sinaptičke plastičnosti u hipokampusu [15, 97]. Međutim, nasuprot ovim podacima, u eksperimentima u kojima je vršena deaktivacija BDNF receptora u frontalnom režnju mozga miševa, pokazano je da ove životinje nisu ispoljile ponašanje slično depresivnom [15].

Sa druge strane, povišen nivo glukokortikoida, koji je karakterističan za stres, rezultira smanjenom neurogenezom u dentatnom girusu [98]. Pokazano je da je adultna proliferacija nervnih ćelija hipokampusa i/ili njihovo preživljavanje smanjeno u različitim animalnim modelima depresije i anksioznosti [99-101]. Postoji samo nekoliko *post mortem* studija na ljudima koje ispituju nivo adultne neurogeneze u hipokampusu, verovatno zbog komplikovane metodologije koja zahteva određivanje starosti pojedinačnih neurona, najčešće radiokarbonskim metodama, i njihovi rezultati nisu koinzistentni [111-113]. Ono u čemu se ovaj tip studija slaže, je da *post mortem* nalazi konstantno pokazuju smanjenu veličinu dentatnog girusa kod pacijenata koji su bolovali od anksioznosti ili depresije [102, 103]. Tretmani elektrokonvulzivnim šokovima i fluoksetinom su u animalnim studijama pokazali pozitivan efekat na adultnu neurogenezu u hipokampusu [104-106]. Nažalost, potencijalna efikasnost terapije koja se fokusira na pospešivanje neurogeneze u adultnom hipokampusu još nije dovoljno istražena.

Smanjena količina BDNF i smanjena adultna neurogeneza za posledicu imaju smanjenu neuroplastičnost u depresiji [107]. Pod neuroplastičnošću se podrazumeva sposobnost nervnog sistema da se adaptira na interne i eksterne stimulse reorganizacijom svoje strukture, funkcije i konekcija i da adekvatno odgovori na buduće stimulse [108]. Smanjena neuroplastičnost uslovljava probleme u odgovoru na stres i probleme sa učenjem, što rezultira smanjenom adaptacijom organizma na okolinu. Takođe, poremećena plastičnost i funkcija prefrontanog korteksa (PFC) i limbičkog sistema može da dovede do negativnog procesuiranja informacija koje se odnose na različit spekatar fenomena, od zadržavanja pažnje na negativnim stimulusima i njihovog boljeg pamćenja, do negativne procene sebe, okruženja, i potencijalne budućnosti [109, 110]. Usled toga su kognitivna fleksibilnost i fleksibilnost u ponašanju smanjene, i depresivna osoba se nalazi u stanju u kome stalno precenjuje sopstvene nedostatke, opasnosti i moguće nesrećne ishode budućnosti [111]. Međutim, i ovo objašnjenje simptoma depresije ima svojih nedostataka. Istraživanja na eksperimentalnim životinjama su pokazala da povećanje neuroplastičnosti u mezolimbičkim regionima mozga može i da indukuje ponašanja povezana sa depresijom [112-114]. Takođe, teško je utvrditi da li je smanjena neuroplastičnost uzrok ili posledica patofizioloških procesa u depresiji.

#### **1.1.1.6. Neuroendokrina hipoteza**

Hronična izloženost stresu je jedan od najvažnijih faktora rizika za razvoj depresije pa zato nije začuđujuće što je hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina (HPA), koja ima ključnu ulogu u odgovoru na stres, privukla veliku pažnju naučnika koji se bave istraživanjem depresije. U toku devedesetih godina dvadesetog veka veći broj istraživačkih grupa je formulisao hipotezu o poremećenoj regulaciji hormonskog odgovora na stres kao uzročniku depresije, koja je poznata još kao i glukokortikoidna hipoteza ili hipoteza kortikosteroidnih receptora [115].

Aktivnost HPA osovine je regulisana sekrecijom kortikotropin-oslobađajućeg faktora (eng. *corticotropin releasing hormone*, CRH) i vazopresina u hipotalamusu. Oni aktiviraju lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) u hipofizi, koji dalje aktivira sekreciju glukokortikoida u kori nadbubrežne žlezde. Glukokortikoidi imaju širok spektar uloga u organizmu, uključujući regulaciju energetskeg metabolizma i imunosupresiju. Takođe, odgovorni su za inhibiciju sekrecije CRH u hipotalamusu i ACTH u hipofizi negativnom povratnom spregom [116]. Sledeće abnormalnosti u regulaciji HPA osovine su pronađene u velikom procentu slučajeva depresije [117]:

- povećana koncentracija kortizola u plazmi, pljuvački i cerebrospinalnoj tečnosti, bez velike promene u njegovom cirkadijalnom obrascu lučenja;
- smanjena reakcija supresije kortizola u odgovoru na deksametazon, sintetički kortikosteroid;
- povećano lučenje kortizola u odgovoru na ACTH;
- hipertrofija nadbubrežne žlezde i povećan volumen hipofize;
- smanjena ekspresija glukokortikoidnog receptora na periferiji i u *post mortem* uzorcima tkiva mozga.

Poznato je da visoka koncentracija glukokortikoida u toku dugog vremenskog perioda u slučajevima hroničnog trajanja stresora može dovesti do ekscitotoksičnosti piramidalnih neurona hipokampusa koja dovodi do njihove atrofije, smanjenja broja dendritskih trnova i, u težim slučajevima, apoptoze nervnih ćelija [118]. Poremećaji u funkciji hipotalamusa tokom hroničnog stresa i depresije dovode do nedovoljne inhibicije HPA osovine negativnom povratnom spregom i povećane sekrecije kortizola iz nadbubrežne žlezde [15]. Različite studije su pronašle vezu između preterane aktivnosti HPA osovine i promena u ponašanju koje prate depresiju (smanjenje libida, smanjenje apetita, poremećaj sna i psihomotorna usporenost) [116].

Pokazano je da često dolazi do normalizovanja funkcije HPA osovine nakon tretmana antidepresivima, kao i da je vraćanje koncentracije CRF na normalne vrednosti dobar pokazatelj da li će potencijalno doći do relapsa bolesti [115, 119]. Međutim, istraživanja o potencijalnom korišćenju CRH antagonista u lečenju depresije su dolazila do različitih rezultata, zbog čega se ovaj vid farmakoterapije trenutno ne primenjuje u kliničkoj praksi [120].

#### **1.1.1.7. Hipoteza o uticaju crevne mikrobiote na razvoj depresije**

Interakcija mikroorganizama iz creva i centralnog nervnog sistema je poslednje decenije postala predmet mnogobrojnih studija zbog mogućeg uticaja mikrobiote creva na aktivnost mozga. Mnogobrojne studije su pokazale važnu ulogu ose crevni mikroorganizmi-gastrointestinalni trakt-centralni nervni sistem (CNS) u regulaciji raspoloženja, ponašanja i neurotransmisije u mozgu [121, 122]. Depresija predstavlja čest komorbiditet kod bolesti digestivnog trakta. [123] a pokazano je da antidepresivi mogu da umanje simptome sindroma nervoznih creva [124]. Animalne studije su pokazale da neonatalni i stres kod mladih jedinki usled separacije mladunaca od majke kod glodara, dovode do dugoročnih promena u sastavu crevnih mikroorganizama [125, 126]. Tretiranje miševa antibioticima širokog spektra koji remete crevnu floru, vodi do ponašanja sličnog depresivnom i

promena u nervnoj signalizaciji u hipokampusu dok probiotski tretman koji sadrži *Lactobacillus casei* DG neutrališe ove simptome [127]. Više istraživanja je pokazalo da probiotici mogu da smanje simptome ponašanja nalik depresivnom kod eksperimentalnih životinja [128], kao i da ostvare pozitivne psihološke i kognitivne efekte kod pacijenata u kliničkim studijama [129, 130]. Transplantaciona studija Zheng i saradnika [131] je pokazala da je moguće indukovati ponašanje slično depresivnom kod glodara presađivanjem fecesa pacijenata sa simptomima depresije. Osim toga, nekoliko kliničkih studija je pokazalo da uporedno korišćenje probiotika može povećati efikasnost tretmana antidepresivima, naročito kod pacijenata sa depresijom rezistentnom na tretman [132].

Objašnjenje ove teorije se zasniva na činjenici da crevna mikrobiota može uticati na neurotransmitere u digestivnom traktu i mozgu, između ostalog na serotonin, dopamin, noradrenalin i glutamat koji su bitni u etiologiji depresije [133]. Osim toga, veliki broj radova implicira da crevna mikrobiota može uticati na rad HPA osovine i inflamaciju [134]. Promene u crevnoj mikrobioti mogu dovesti do povećanog lučenja kortizola i inflamacije, ali zauzvrat i proinflamatorni stres dalje negativno utiče na sastav mikrobiote creva i gastrointerstinalno zdravlje. Visok nivo kortizola i inflamatornih medijatora u cirkulaciji može narušiti crevnu barijeru i povećati permeabilnost creva, dozvoljavajući tako Gram-negativnim bakterijama da pređu u krvotok, što u nekim slučajevima indukuje hroničnu sistemska inflamaciju koja utiče i na centralni nervni sistem [135].

Samim tim, potencijalni mehanizmi kojima mikroorganizmi creva interaguju sa mozgom uključuju HPA osovinu, neuroendokrini i neuroimunski sistem [136]. Međutim, dosadašnja klinička istraživanja još nisu došla do konsenzusa o tome koji su taksoni crevnih bakterija najrelevantniji za razvoj depresije [137].

## 1.2. Animalni modeli depresije

Kao što je ranije navedeno, kompleksna priroda depresije, heterogenost simptoma i tipova bolesti, kao i česti komorbiditeti, postavljaju niz izazova pred istraživače koji pokušavaju da utvrde tačne neurofiziološke mehanizme ovog poremećaja [138]. Jedan od problema je i dostupnost adekvatnih uzoraka tkiva koja bi omogućila potrebne analize na biohemijskom i molekularno biološkom nivou [139]. Korišćenje prefirenih tkiva pacijenata poput krvi i plazme ima ograničenu korist u istraživanjima jer takve analize često ne oslikavaju pravo stanje biohemijskih parametara u tkivu mozga. *Post mortem* uzorci tkiva mozga su teško dostupni, i često su u pitanju uzorci tkiva osoba koje su izvršile suicid, što je možda povezano sa specifičnim neurobiološkim mehanizmima [138]. Animalni modeli depresije omogućavaju prevazilaženje ovih problema i obezbeđivanje dovoljnog broja uzoraka potrebnih za statističku validnost istraživanja. Takođe, oni pružaju priliku da se detaljno ispituju molekularni mehanizmi i neurobiološki aspekti patogeneze depresije. Ipak, razvoj adekvatnih animalnih modela depresije nije bio lak i nailazi na izvesnu dozu skepse kod naučnika, zbog toga što životinje nemaju emotivni i kognitivni kapacitet koji poseduju ljudi. Životinje ne poseduju istu samosvest i sposobnost preispitivanja sebe poput ljudi, i kod njih nije moguće ispitivati neke od ključnih simptoma depresije poput niskog samopouzdanja, lošeg raspoloženja ili sklonosti suicidalnim mislima [140].

Životinjski modeli bolesti bi morali da zadovolje sledeće osnovne kriterijume [139, 141]:

- fenotip simptomatologije bi morao da bude analogan onome koji se javlja kod ljudi;
- model bi morao da izazove patofiziološke promene nalik onima kod ljudi, koje se mogu objektivno meriti;
- model bi morao da pozitivno reaguje na tretmane koji su efikasni u lečenju bolesti kod ljudi;
- model bi morao da daje ponovljive rezultate, nezavisno od istraživačke grupe.

Neki istraživači smatraju da bi modeli depresije trebalo da zadovolje i dodatne kriterijume, poput validnog izbora životinjske vrste, sličnih kognitivnih i bioloških mehanizama bolesti, analogne etiologije i biomarkera bolesti [142]. Animalni modeli depresije koji se trenutno koriste u istraživanjima se, na osnovu etiologije bolesti, mogu podeliti na one koji se zasnivaju na akutnom ili hroničnom izlaganju odraslih ili juvenilnih jediniki stresu, one koji se baziraju na indukciji lezija mozga, one koji su izazvani egzogenim farmakološkim supstancama ili glukokortikoidima i na modele koji se zasnivaju na manipulaciji genima. Najčešće korišćeni animalni modeli depresije su predstavljeni u Tabeli 1 (prilagođeno na osnovu podataka iz radova Deussinga i Yina i saradnika [140, 143]).

**Tabela 1.** – Animalni modeli depresije koji se često koriste u istraživanjima i karakteristike deperesije koje simuliraju.

<b>Model</b>	<b>Karakteristike depresije koje model simulira</b>	<b>Napomene</b>
<b>Adultni stres</b>		
Naučena bespomoćnost	Beznadežnost, smanjena motorna aktivnost, gubitak mase, smanjen odgovor na nagradu	Senzitivan na akutni tretman nekim antidepresivima, zahteva jake stresore, etički problemi
Hronični nepredvidivi stres	Anhedonija, smanjen odgovor na nagradu	Senzitivan na hronični tretman antidepresivima, zahteva dosta rada, povremeni problemi sa reprodukcijom rezultata
Socijalni stres	Anksioznost, anhedonija	Senzitivan na hronični tretman antidepresivima, zahteva dosta rada, povremeni problemi sa reprodukcijom rezultata
<b>Stres u ranom životnom dobu</b>		
Odvajanje od majke	Anksioznost, smanjena ekspresija BDNF	Slab efekat antidepresiva
Prenatalni stres	Anksioznost, smanjena ekspresija BDNF	Slab efekat antidepresiva
<b>Lezije</b>		
Lezija olfaktornog bulbosa	Anhedonija, smanjena količina serotonina u mozgu	Senzitivan na hronični tretman antidepresivima, invazivan
<b>Farmakološki</b>		

Glukokortikoidi/kortikosteron	Anksioznost, poremećena regulacija HPA osovine	Korelacija sa patofiziološkim mehanizmima nastanka depresije
Rezerpin	Smanjena količina monoamina u mozgu, anksioznost, smanjena motorna aktivnost	Senzitivan na tretman antidepresivima, neselektivan za sve monoamine, nejasno je da li utiče na raspoloženje
<b>Genetska manipulacija</b>		
Transgene životinje	Zavisno od regiona mozga i ciljanog gena	Omogućavaju proučavanje pojedinačnih gena

### 1.2.1. Model hroničnog nepredvidivog stresa

Hronični nepredvidivi stres (eng. *chronic unpredictable stress*, CUS) je model depresije u kome su pacovi ili miševi hronično izloženi konstantnim slabijim stresorima u periodu od nekoliko nedelja. Ovaj model stresa dovodi do promena u ponašanju, između ostalog i do smanjenog odgovora na nagradu, što odgovara jednom od ključnih simptoma depresije, anhedoniji. Model je nastao ranih osamdesetih godina iz studija Kaca i kolega u kojima su pacovi bili hronično izloženi različitim snažnijim stresorima [144]. Većina tih ranih studija se fokusirala na testiranje promena u ponašanju na testu otvorenog polja. Međutim, nakon što je u jednom istraživanju primećena smanjena konzumacija rastvora saharoze, shvaćeno je da model uvodi životinje u stanje nalik depresiji i tumačenje istraživanja se promenilo. Konzumiranje zaslađenih rastvora se smanjuje nakon nekoliko nedelja izlaganja hroničnom stresu, ali se može vratiti na normalni nivo tretmanom antidepresivima [145]. Druga bitna promena koja se desila tokom godina, jeste smanjenje intenziteta stresora korišćenih u samoj eksperimentalnoj proceduri, i to iz etičkih razloga. Nakon ovih početnih publikacija, došlo je do eksponencijalnog rasta broja istraživanja koja su koristila CUS kao model. Danas se godišnje objavi preko 1000 publikacija koje primenjuju CUS [145].

Dobra strana korišćenja ovog modela je to što životinje ispoljavaju širok spektar fizioloških promena i promena u ponašanju koje imitiraju simptome depresije, što podržava njegovu validnost. Međutim, sama procedura ima dva izražena nedostatka: praktične teškoće prilikom izvođenja eksperimenta, koji zahteva dosta rada, vremena i prostora, kao i pouzdanost procedure – iz nepoznatog razloga, u mnogim laboratorijama je često teško uspostaviti model. Uprkos tome, ovaj model nam pruža dobru osnovu za proučavanje problema koje je često veoma teško istraživati drugim metodama [146].

### 1.3. Regioni mozga ključni za razvoj / ispoljavanje depresije

Trenutna dijagnostika depresije se oslanja na procenu ponašanja pacijenata kao i na evaluaciju simptoma koje pacijenti sami prijavljuju. Iako nažalost još ne postoje pouzdani neurobiološki markeri koji se mogu praktično koristiti u kliničkoj praksi, veliki broj studija je pokušao da identifikuje strukturne promene u mozgu pacijenata sa depresijom. Istraživanja koja su se fokusirala na promene u zapremini bele i sive mase mozga, kao i funkcionalne „imidžing“ studije su pokazale poremećaj u funkciji različitih regiona mozga, kao što su frontalni režanj, hipokampus, temporalni režanj, talamus i bademasta jedra [147]. Pored strukturnih promena u ovim delovima mozga uočena je i izmenjena povezanost između različitih regiona mozga među kojima se ističu PFC i limbički sistem [148]. Najveći broj istraživanja ukazuje da hipokampus i PFC imaju značajnu ulogu u patofiziologiji depresije.

#### 1.3.1. Hipokampus

Hipokampus je region mozga kome je posvećen najveći broj istraživanja u vezi sa depresijom i poremećajima raspoloženja. Iako nije jedini deo mozga koji je odgovoran za veliki broj različitih simptoma koji se javljaju u depresiji, ovaj region mozga poseduje veliku plastičnost i osetljivost na stres, pa stoga ima značajnu ulogu u depresivnim poremećajima.

Hipokampus predstavlja bilaminarnu strukturu sive mase koja formira pod donjeg temporalnog roga lateralne komore i prostire se od anteriorne granice ventrikularnog roga do splenijuma žuljevitog tela (*corpus callosum*). Sastoji se od dentatnog girusa i Amonovog roga (tj. pravog hipokampusa). Amonov rog se na osnovu morfologije piramidalnih neurona i osetljivosti na anoksiju može podeliti na regione koji su označeni kao CA1-CA4 [149]. Hipokampus je deo limbičkog sistema i poseduje konekcije sa regionima mozga koji su uključeni u ispoljavanje emocija, poput prefrontalnog korteksa i bademastih jedara. Glutamatski neuroni čine većinu neurona hipokampusa. Osim toga, hipokampus je bogat glukokortikoidnim receptorima, a sadrži i veliki broj nikotinskih acetilholinskih, noradrenalinskih i serotoninskih receptora [149-152]. Hipokampus je ključni region mozga odgovoran za prostornu memoriju kao i za učenje i konsolidaciju eksplicitnih sećanja iz kratkoročnog u dugoročno pamćenje [153].

Korišćenjem magnetno-rezonantne tomografije, ustanovljena je promenjena zapremina hipokampusa kod depresivnih pacijenata. Meta-studije potvrđuju smanjenje zapremine levog i desnog hipokampusa [154]. Međutim, naučnici se ne slažu uvek oko toga da li je to uzrok ili posledica depresije. Ideju da je smanjen volumen hipokampusa faktor rizika za nastanak depresije podržavaju studije koje su pokazale da je manja zapremina hipokampusa povezana sa lošijim ishodima lečenja [155]. Sa druge strane, istraživanja su otkrila da duže kumulativno trajanje depresivnih epizoda tokom životnog veka koreliše sa izraženijim smanjenjem zapremine hipokampusa, kao i da je promena u



zapremine veća kod pacijenata sa dužim trajanjem bolesti [156-158]. Moguća objašnjenja ovog fenomena leže u hipotezi da pojačano i dugotrajno izlaganje glukokortikoidima utiče na veću oseljivost i eventualna oštećenja i gubitak neurona hipokampusa [159]. Takođe, u hipotezi poremećene neurogeneze u depresiji predlaže se da je jedan od mogućih uzročnika promene zapremine hipokampusa tokom depresije smanjenje adultne neurogeneze i smanjena količina neurotrofnih faktora rasta [160].

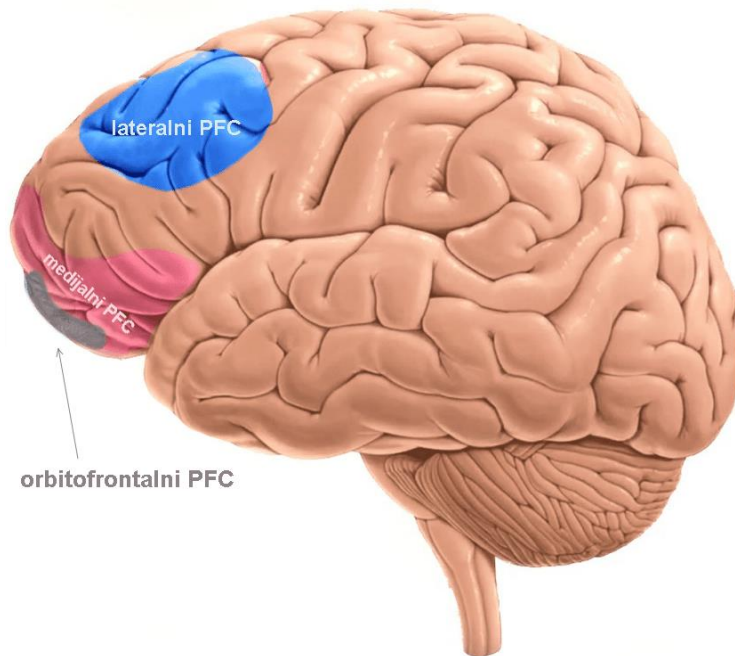
Važno je spomenuti i činjenicu da stres može poremetiti dugoročnu potencijaciju (eng. *long-term potentiation*, LTP), koja je bitna za formiranje memorije u hipokampusu. Smanjenje dugoročne potencijacije je pokazano u dentatnom girusu i u CA3 regionu hipokampusa, dok je povećanje dugoročne depresije (eng. *long term depression*, LTD) otkriveno u CA1 regionu hipokampusa [161-163]. Takođe, animalni modeli su pokazali da depresija može smanjiti ekspresiju sinaptičkih proteina i faktora rasta neophodnih za LTP [161]. Takođe, mnogobrojni eksperimenti su pokazali da izlaganje stresu ili povećanom nivou kortizola dovodi do problema u izvođenju zadataka koji se oslanjaju na tipove memorije koji zavise od hipokampusa [163].

### 1.3.2. Prefrontalni korteks

Prefrontalni korteks (PFC) predstavlja multimodalnu asocijativnu koru prednjeg frontalnog režnja velikog mozga. Granica između PFC i primarne motorne kore je premotorni korteks u 6. Brodmanovom polju. Prefrontalni korteks se po konvencijama deli na četiri regiona: dorzolateralnu zonu koja se nalazi iznad donje frontalne brazde, ventrolateralnu zonu, anteriorni PFC i orbitofrontalnu koru [164].

Prefrontalni korteks je veoma razvijen i visoko specijalizovan deo kore velikog mozga primata. Ovaj region poseduje dobro razvijene kortiko-kortikalne i talamo-frontalne konekcije preko kojih dobija informacije iz različitih čulnih sistema, uključujući vizuelne, auditorne, gustatorne i olfaktorne informacije. Takođe, preko ovih konekcija PFC dobija informacije o emocijama i motivaciji iz limbičkog sistema, kao i podatke koje šalje hipotalamus o unutrašnjem stanju organizma [164].

Prefrontalni korteks prima veliki broj projekcija iz modulatornih neurotransmiterskih sistema. Ovo uključuje holinske projekcije iz bazalnog dela prednjeg mozga (*nucleus basalis telencephali*), noradrenalinske projekcije iz *locus coeruleus*, dopaminske projekcije iz ventralne tegmentalne zone i serotoninske projekcije iz *raphe nucleus*. Balans između dostupnog noradrenalina i dopamina u lateralnom PFC je izuzetno važan za optimalno obavljanje zadataka vezanih za radnu memoriju kod primata [165, 166].



**Sika 2:** Prefrontalni korteks. Preuzeto i prilagođeno iz Salehinejad, Mohammad Ali, et al. "Hot and cold executive functions in the brain: A prefrontal-cingular network." *Brain and Neuroscience Advances* 5 (2021): 23982128211007769.

Smatra se da je PFC, uz hipokampus, jedan od regiona mozga koji je najosetljiviji na štetne efekte izlaganja stresu. Čak i blagi akutni nekontrolisani stres, može izazvati dramatično smanjenje kognitivnih sposobnosti vezanih za ovaj region, dok dugotrajno izlaganje stresu može dovesti do strukturnih promena u dendritima neurona PFC [166]. Nedavne studije su pokazale da kada životinja ima osećaj kontrole, prefrontalni korteks ima ključnu ulogu u suprimiranju štetnih efekata stresa i inhibiranju glukokortikoidnog odgovora [167].

Brojna istraživanja su pokazala da su strukturne i funkcionalne promene u medijalnom prefrontalnom korteksu (mPFC) izazvane stresom, povezane sa poremećajima u emocijama kod životinja i čoveka [168]. Pokazano je da hronični blagi nepredvidivi stres izaziva atrofiju piramidalnih neurona u mPFC, što je povezano sa smanjenim metabolizmom, smanjenom ekspresijom BDNF, nekih sinaptičkih proteina poput sinapsina I i koneksina 43, kao i gubitkom glijskih ćelija [169-173].

Funkcionalne „imidžing“ studije su pokazale da postoje promene u funkcijama različitih regiona PFC kod pacijenata koji pate od kliničke depresije. Primećeno je da kod depresivnih pacijenata postoji abnormalno visoka aktivnost ventro-medijalnog PFC, dok je aktivnost dorzolateralnog PFC smanjena. Nasuprot tome, oporavak od depresije je povezan sa povećanom aktivnošću dorzolateralnog PFC. Osim toga, prilikom obavljanja zadataka koji zahtevaju radnu memoriju i kognitivnu kontrolu, aktivacija dorzolateralnog PFC je veća kod pacijenata koji pate od depresije u odnosu na kontrolne, zdrave osobe. Svi ovi rezultati sugerišu da postoji izvesna disfunkcija ili makar smanjena efikasnost dorzolateralnog PFC u depresiji [173].

## 1.4. Kateholaminski sistem

Kateholamini su hormoni i neurotransmiteri koji sadrže kateholnu grupu, tj. benzenski prsten sa dve susedne hidroksilne grupe i etilaminski bočni lanac koji sadrži jednu amino grupu. Pronađeni su i identifikovani krajem XIX i početkom XX veka. Njihovo dejstvo je prvo otkriveno u autonomnom nervnom sistemu, dok je noradrenalin i adrenalin u mozgu prvi opisao Vogt [174, 175].

Kateholamine čine adrenalin (epinefrin), noradrenalin (norepinefrin) i dopamin. Imaju esencijalnu ulogu u regulaciji mnogih fizioloških procesa i utiču na praktično sva tkiva i organe u organizmu sisara. Iako je njihova koncentracija u mozgu niska u poređenju sa koncentracijama neurotransmitera poput glutamata i GABA, izuzetno su važni za funkcionisanje različitih aspekta nervnog sistema [176]. Poremećena regulacija kateholamina je u osnovni mnogih psihijatrijskih i endokrinih poremećaja i korišćenje lekova koji utiču na različite aspekte kateholaminskog sistema predstavlja bitan terapijski pristup u mnogim bolestima. Po monoaminskoj hipotezi, smanjen nivo noradrenalina, dopamina i serotonina predstavlja fiziološki uzrok depresije [25].

### 1.4.1. Biosinteza kateholamina

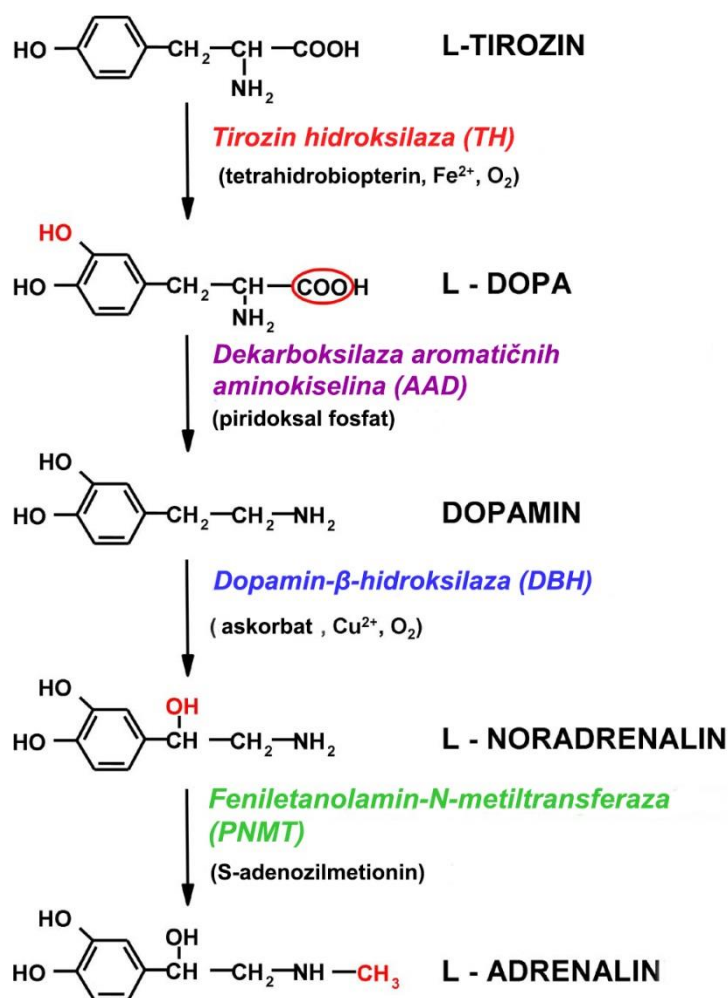
Kateholamini se sintetišu kroz niz enzimskih reakcija iz prekursora L-tirozina u hromafinim ćelijama, simpatičkim ili kateholaminskim nervnim završecima (Slika 2). Izvor tirozina je ishrana ili hidrosilacija aminokiseline fenilalanina u jetri pod dejstvom fenilalanin hidrosilaze. Enzim tirozin hidrosilaza (TH) u prisustvu molekularnog kiseonika katalizuje prevođenje tirozina u dihidrosifenilalanin (DOPA) uz oslobađanje vode [177]. Tirozin hidrosilaza je limitirajući enzim u sintezi kateholamina, jer omogućava odvijanje inicijalnog koraka u sintezi adrenalina, noradrenalina i dopamina. Poremećaj gena za tirozin hidrosilazu rezultira smrću embriona. TH je solubilni, citoplazmatični enzim koji se sastoji od četiri identične subjedinice od 60 kDA, od kojih svaka vezuje gvožđe i tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) koji su neophodni za njegov rad [176]. C-kraj proteina sadrži katalitički domen, dok N-kraj svake subjedinice sadrži nekoliko mesta fosforilacije. S obzirom na to da je limitirajući enzim, aktivnost TH je podložna kompleksnoj regulaciji na više nivoa. Brza regulacija se odvija negativnom povratnom spregom preko kateholamina, koji kompetitivno ograničavaju vezivanje BH<sub>4</sub> kofaktora, ili vezivanjem katehol grupe za Fe<sup>3+</sup> jone na katalitičkom mestu. Obe vrste inhibicije mogu biti ukinute fosforilacijom N-terminalnih serinskih ostataka na pozicijama 8, 19, 31 i 40. Dugoročna regulacija se može odvijati različitim mehanizmima poput regulacije stabilnosti enzima, transkripcione regulacije, regulacije stabilnosti RNK, alternativnog splajsovanja i translacione regulacije [178].

U sledećem koraku sinteze, karboksilna grupa se uklanja sa DOPA uz pomoć enzima dekarboksilaze aromatičnih aminokiselina (eng. *amino acid decarboxylase*, AAAD), poznate i kao DOPA dekarboksilaza, čime nastaje dopamin. Enzimska aktivnost ove dekarboksilaze ograničena je

dostupnošću njegovog kofaktora, piridoksal-5-fosfata (vitamina B6). AAAD je nespecifični enzim koji je prisutan u velikom broju tkiva. Za aktivnost ovog enzima potrebno je prisustvo askorbinske kiseline, jona bakra i kiseonika. Ovaj enzim je regulisan na pre- i post-translacionim nivou većim brojem receptora, farmakoloških agenasa i protein kinaza [179].

U dopaminskim neuronima, dopamin je konačni proizvod sinteze kateholamina, dok se u noradrenalinskim neuronima i hromafinim ćelijama dopamin transportuje iz citosola u sinaptičke vezikule. Tamo na njega deluje dopamin beta-hidroksilaza (DBH) koja uz prisustvo bakra, molekularnog kiseonika i askorbinske kiseline dovodi do stvaranja noradrenalina [177]. DBH je homotetramer od 290 kDa i može biti solubilisan ili vezan za ćelijsku membranu [180].

U srži nadbubrežne žlezde, nekim delovima mozga i srca, finalni korak u ovom sintetskom putu predstavlja konverzija noradrenalina u adrenalin uz pomoć enzima feniletanolamin-N-metiltransferaze (eng. *pheniletanolamin-N-metiltransferase*, PNMT). Ovo je solubilni, monomerni enzim sa kofaktorom S-adenozil-metioninom kao donatorom metil grupe [177].



**Slika 3:** Biosinteza kateholamina. Preuzeto iz *Kvetnansky, Richard, Esther L. Sabban, and Miklos Palkovits. "Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches." Physiological reviews 89.2 (2009): 535-606.*

#### 1.4.2. Oslobađanje kateholamina

Nakon sinteze, kateholamini se zbog zaštite od štetnog dejstva citoplazmatičnih enzima pakuju u vezikule (u simpatičkim nervnim završecima i centralnom nervnom sistemu) ili hromafine granule (u nadbubrežnim žlezdama). Vezikule ili granule takođe služe kao depo koji obezbeđuje zalihu kateholamina i posreduju u procesu njihovog otpuštanja. Kateholamini su upakovani zajedno sa hromograninom, drugim neuropeptidima, DBH i ATP na mestima sinteze noradrenalina [177].

Transport kateholamina u vezikule i granule vrši se posredstvom vezikularnih monoaminskih transportera (VMAT). Ovaj transport se vrši nasuprot gradijentu koncentracije uz razgradnju ATP H<sup>+</sup>-ATPazom. Identifikovane su dve forme VMAT. VMAT1 se eksprimira u hromafinim granulama, a VMAT2 se eksprimira u sinaptičkim vezikulama, postganglijskim simpatičkim vlaknima i u hromafinim granulama [181]. U hromafinim granulama kateholamini su uskladišteni prilično stabilno (poluživot duži od jednog dana), dok sinaptičke vezikule zahtevaju stalno ponovno punjenje kateholaminima, pa je tako aktivnost VMAT2 u centralnom nervnom sistemu veoma visoka.

Oslobađanje kateholamina u odgovoru na stimulus vrši se procesom egzocitoze. Ovaj proces se na sličan način odvija u simpatičkim nervnim završecima i u srži nadbubrežne žlezde. Nakon vezivanja acetilholina oslobođenog iz preganglijskih nervnih završetaka za nikotinske acetilholinske receptore na ćeliji dolazi do depolarizacije ćelijske membrane i povećanja njene permeabilnosti za jone natrijuma. Ovo pokreće kaskadu događaja čiji je ishod ulazak jona Ca<sup>2+</sup> u ćeliju kroz voltažno senzitivne kanale [182]. Posledično, dolazi do fuzije sinaptičkih vezikula sa ćelijskom membranom i oslobađanja njihovog sadržaja: kateholamina, hromogranina i drugih neuropeptida, ATP i DBH (ukoliko su u pitanju hromafine granule) procesom egzocitoze. Nakon egzocitoze, vezikule se vraćaju u ćeliju endocitozom i recikliraju.

Nakon egzocitoze, kateholamini koji ne budu odmah ponovo preuzeti u ćeliju, prelaze u cirkulatorni sistem. Poluživot kateholamina u cirkulaciji je oko 2,5 minuta. Količina kateholamina koja se otpušta iz srži nadbubrežne žlezde i simpatičkih nervnih završetaka je relativno mala u normalnim uslovima. Međutim, u slučaju stresnih događaja, iz srži nadbubrežne žlezde može biti oslobođena veoma velika količina adrenalina (95% od ukupno prisutnog adrenalina u cirkulaciji) i značajna količina noradrenalina (do 30% ukupnog cirkulišućeg noradrenalina) [177].

### 1.4.3. Receptori za kateholamine

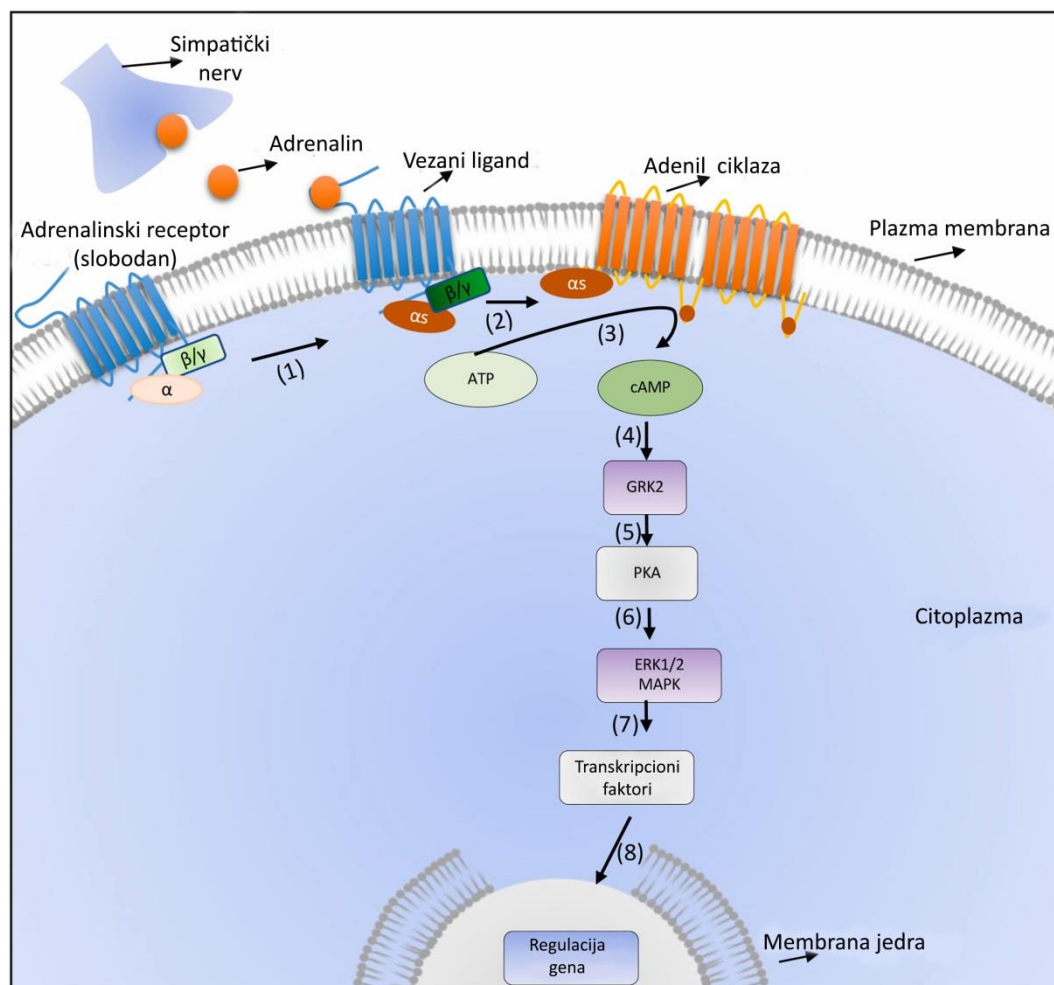
Kateholamini mogu da izazovu veliki broj različitih funkcionalnih odgovora. Ova raznolikost njihovog dejstva je moguća zbog velikog broja različitih tipova receptora za kateholamine, kao i njihove različite lokalizacije.

Svi receptori za kateholamine su spregnuti sa proteinom G. Poseduju N-kraj, C-kraj i sedam hidrofobnih, transmembranskih domena [176].

**Adrenalinski receptori** su široko rasprostranjeni u organizmu i za njih se vezuju noradrenalin i adrenalin. Postoji devet vrsta adrenalinskih receptora koji su na osnovu sličnosti u strukturi i funkciji klasifikovani su u tri tipa:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\beta$ . Na osnovu različitih funkcionalnih studija sa agonistima i antagonistima, kao i studija koje proučavaju vezivanje radioliganda i strukturu receptora, svaki od ovih tipova receptora je podeljen i na tri podtipa receptora ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ;  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) [183].

Signalizacija adrenalinskih receptora može se vršiti preko dva puta: kanonskim, zavisnim od proteina G i nekanonskim, nezavisnim od tog proteina. U kanonskom putu na primeru  $\beta_2$ -receptora (Slika 3), noradrenalin nakon vezivanja za receptor dovodi do razmene GDP za GTP i disocijacije  $G_{\alpha_s}$  subjedinice od  $G_{\beta\gamma}$  subjedinice.  $G_{\alpha_s}$  potom aktivira adenil ciklazu, membranski enzim koji konvertuje ATP u cAMP. U daljem toku ove signalne kaskade, cAMP se vezuje za regulatornu subjedinicu protein kinaze A (PKA), što oslobađa katalitičku subjedinicu ovog enzima koja onda fosforiliše ciljne transkripcione faktore ili citoplazmatičke enzime [184]. Nekanonski put ima potpuno drugačiju signalnu kaskadu koja je zavisna od  $\beta$ -arestina [185]. Sekundarni glasnici  $\alpha_1$ - i  $\alpha_2$ -adrenalinskih receptora se razlikuju. Dok  $\alpha_1$ -receptori aktiviraju fosfolipazu C, koja proizvodi inozitol-trifosfat i diacil-glicerol kao sekundarne glasnike,  $\alpha_2$ -receptori inhibiraju adenil ciklazu, smanjujući nivo cAMP [186].

Različite klase adrenalinskih receptora imaju specifičnu distribuciju u organizmu i učestvuju u različitim funkcijama (Slika 4).  $\alpha_{1A}$ - adrenalinski receptori su eksprimirani u mozgu, srcu, bubrezima, prostati, glatkim mišićima i drugim tkivima. Na periferiji učestvuju u kontrakciji aorte, delova urinarnog trakta, srca, itd. [187]. U centralnom nervnom sistemu su dominantno eksprimirani u kičmenoj moždini, moždanom stablu, jedrima hipokampusu, bademastim jedrima, olfaktornom sistemu, kao i u nervnim progenitorskim i stem ćelijama [188].  $\alpha_{1B}$  adrenalinski receptori se dominantno nalaze u epifizi, jedrima talamusa, bademastim jedrima i jedrima *raphe*, kao i na periferiji, u srcu i slezini, i pokazano je da imaju važnu ulogu u hipertrofiji srca [188-190]. Interesantno je da su  $\alpha_{1A}$  i  $\alpha_{1B}$  receptori često eksprimirani u istim regionima mozga, ali da je njihov nivo ekspresije različit [191]. Noradrenalin ima veći afinitet prema  $\alpha_{1D}$  nego prema  $\alpha_{1A}$  i  $\alpha_{1B}$  receptorima [187].  $\alpha_{1D}$ -receptori su dominantno eksprimirani u arterijama, srcu, bubrezima i slezini. Iako njihova zastupljenost u centralnom nervnom sistemu nije velika, eksprimirani su u retikularnim jedrima talamusa, hipokampusu, korteksu i motornim jedrima produžene moždine [192].



**Slika 4:** Kanonski put signalizacije  $\beta_2$ -adrenalinskog receptora. Noadrenalin otpušten iz simpatičkih nervnih završetaka se vezuje za  $\beta$ -adrenalinski receptor i stimuliše ga. Usled promene konformacije zamenom GDP sa GTP,  $\alpha$ s i  $\beta\gamma$  subjedinice proteina se odvajaju jedna od druge i  $\alpha$ s subjedinica aktivira enzim adenil ciklazu, koja vrši konverziju ATP u cAMP. Ovo vodi do fosforilacije GRK2 (eng. *G-protein-coupled receptor kinase 2*), koja aktivira PKA. Aktivirana PKA zatim vrši aktivaciju ERK1/2 signalnog puta, što vodi do transkripcione regulacije većeg broja gena. Preuzeto i prilagođeno iz *Chhatar, Sushanta, and Girdhari Lal. "Role of adrenergic receptor signalling in neuroimmune communication." Current Research in Immunology 2 (2021): 202-217.*

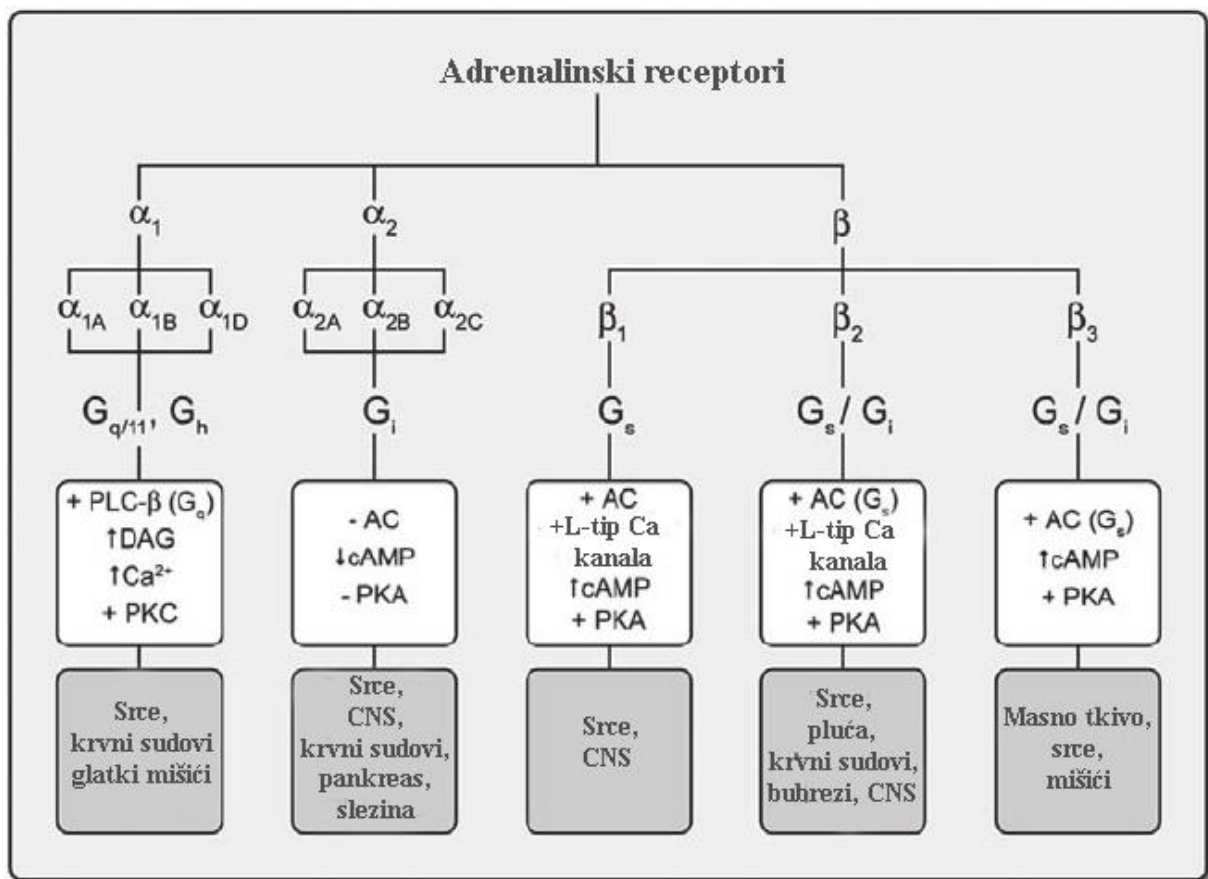
Među  $\alpha_2$  adrenalinskim receptorima,  $\alpha_{2A}$  su najšire distribuirani u centralnom nervnom sistemu, uključujući olfaktorni sistem, cerebralni korteks, bazalne ganglije, mali mozak i mnoge druge regione mozga [193]. Smatra se da ovi receptori utiču na percepciju bola i sedaciju [194]. Na periferiji se mogu naći u pankreasu i slezini [195].  $\alpha_{2B}$  receptori su slabije eksprimirani u centralnom nervnom sistemu, sa ograničenim prisustvom u talamusu [196].  $\alpha_{2C}$  receptori se nalaze u striatumu i hipokampusu, a mnogo manje i u PFC [196], ali ih ima i u perifernom nervnom sistemu u perifernim organima poput srca i bubrega [184].

$\beta$ - adrenalinski receptori su široko rasprostranjeni u nervnom sistemu i na periferiji. Učestvuju u adaptivnim i patološkim odgovorima na stimulse iz spoljašnjeg okruženja, uključujući socijalne stimulse, ali i u aktivnostima glatkog mišićnog sistema poput bronhodilatacije i vazodilatacije [197].  $\beta_1$ - podtip adrenalinskih receptora je predominantno eksprimiran u srcu i ima važnu ulogu u regulaciji



kardiovaskularnog sistema u odgovoru na kateholamine [198, 199]. U centralnom nervnom sistemu su visoko ekspimirani u bademastim jedrima i cerebralnom korteksu, i imaju važnu ulogu u afektivnim poremećajima poput depresije i anksioznosti [200].  $\beta_2$ - podtip receptora je bio predmet mnogobrojnih studija i verovatno je najbolje proučen adrenalinski receptor. Široko je rasprostanjem u mnogim organima, uključujući glatke mišiće, gastrointestinalni trakt, srce, bubrege, pluća, jetru, a reguliše fiziološke odgovore koji su zavisni od relaksacije glatkih mišićnih ćelija, poput bronhodilatacije [197]. U mozgu je pokazano da je prisustvo iRNK za ove receptore najveće u olfaktornom bulbusu, hipokampusu, piriformnom korteksu, intralaminarnim jedrima talamusa i korteksu malog mozga [201].  $\beta_3$ - adrenalinski receptori se nalaze u bešici, žučnoj kesi i skeletnomišićnom i masnom tkivu, gde imaju važnu ulogu u lipolizi i termogenezi, ali ima ih u manjoj meri i u srčanom tkivu i nekim regionima mozga [202, 203].

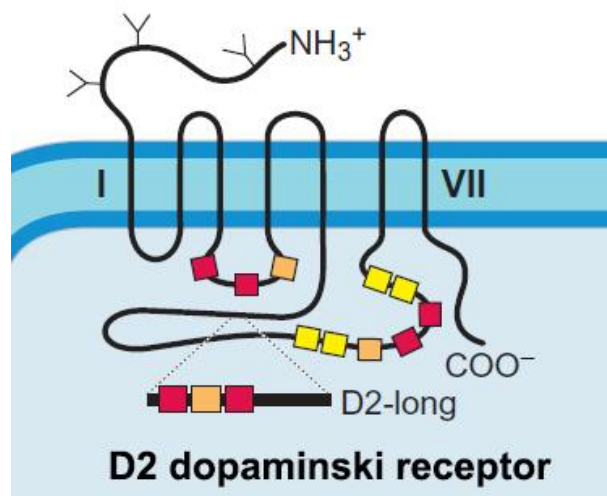
Određeni podtipovi adrenalinskih receptora su naročito bitni za modulatorne aktivnosti kateholamina. Postsinaptički  $\alpha_1$ - i  $\beta$ - adrenalinski receptori posreduju u delovanju noradrenalina. Međutim, kada su prisutni na aksonima neurona koji ne proizvode noradrenalin, ovi receptori mogu uticati i na presinaptičko otpuštanje drugih neurotransmitera [204].  $\alpha_2$ - receptori mogu funkcionisati i kao presinaptički autoreceptori, ali i kao postsinaptički receptori, gde je pokazano da posreduju u dejstvu tricikličnih antidepresiva [205].





**Slika 5:** Adrenalinški receptori, putevi signalizacije i efektori: AC – adenil ciklaza, cAMP – ciklični adenozin monofosfat, DAG – diacilglicerol, PKA – cAMP zavisna protein kinaza A, PKC – protein kinaza C, PLC- $\beta$  – fosfolipaza C  $\beta$ , + aktivacija, - inhibicija,  $\uparrow$  povećanje;  $\downarrow$  smanjenje. Preuzeto i prilagođeno iz *Finch, A. M., Sarramegna, V., & Graham, R. M. (2006). Ligand binding, activation, and agonist trafficking. The Adrenergic Receptors: In the 21st Century, 25-85.*

**Dopaminski receptori** su podeljeni u dve klase, u zavisnosti od toga da li su spregnuti sa  $G_{\alpha s}/olf$  ili  $G_{\alpha i/o}$  proteinima koji stimulišu ili inhibiraju produkciju cAMP. U prvom slučaju radi se o D1 klasi receptora, u koje spadaju D1 i D5, a u drugom slučaju to je D2 klasa receptora, gde spadaju D2, D3 i D4 receptor. Alternativnim splajsovanjem mogu nastati dve varijante D2 receptora, koje se razlikuju u prisustvu 29 aminokiselina (D2Short i D2Long) [206]. D2 klasa receptora ima 10-100 puta veći afinitet za dopamin od D1 klase. Postoji generalni konsenzus da se D1 receptori aktiviraju u slučaju eksplozivne, brze signalizacije u kortikalnim regionima, dok su D2 receptori sposobni da reaguju na toničnu dopaminsku aktivnost [207, 208].



**Slika 6:** Šematski prikaz strukture D2 dopaminskog receptora. Preuzeto i prilagođeno iz *Gnegy, Margaret E. "Catecholamines." Basic neurochemistry. Academic press, 2012. 283-299.*

Dopaminski receptori se primarno nalaze u mozgu, ali se takođe mogu naći u bubrezima i perifernim krvnim sudovima [176]. D1 receptori su izrazito prisutni u hipokampusu, kaudalnom jedru, putamenu, *nucleus accumbens*, olfaktornim tuberkulama, retikularnom delu crne supstancije, frontalnom i temporalnom korteksu [209]. Smatra se da imaju ključne uloge u kognitivnim funkcijama dopamina, poput kontrole pažnje i radne memorije [210]. D2 receptori su najzastupljeniji u bazalnim ganglijama, septumu i ventralnoj tegentalnoj oblasti. Ekspresija D3 i D4 receptora je uglavnom

ograničena na limbičke regione u mozgu pacova i čoveka [210]. D2 klasa receptora u limbičkom sistemu ima važnu ulogu u regulaciji raspoloženja i emotivne stabilnosti, a oni u bazalnim ganglijama učestvuju u kontroli voljnih pokreta [210].

Stimulacijom D1 dopaminskih receptora dolazi do aktivacije adenil ciklaze i sinteze cikličnog adenozin monofosfata (cAMP). Nakon toga sledi kaskada događaja koja uključuje delovanje protein kinaze A i fosforilaciju unutarćelijskih proteina, od kojih je najznačajniji dopaminom i AMPom regulisani fosfoprotein (DARPP-32). Nasuprot tome, D2 klasa receptora inhibira sintezu cAMP [211]. Pokazano je da, osim ovim mehanizmom, dopaminski receptori mogu ostvariti svoje efekte i alternativnim putevima, poput transaktivacije BDNF receptora u neuronima, regulacije kalcijumskih kanala protein-protein interakcijom, i interakcije sa  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPazom [212-215].

Interakcije između različitih podtipova kateholaminskih receptora omogućavaju visoko plastičan i dinamičan sistem regulacije aktivnosti mozga, koji je sposoban za adekvatnu adaptaciju na različite zahteve sredine.

#### 1.4.4. Inaktivacija i razgradnja kateholamina

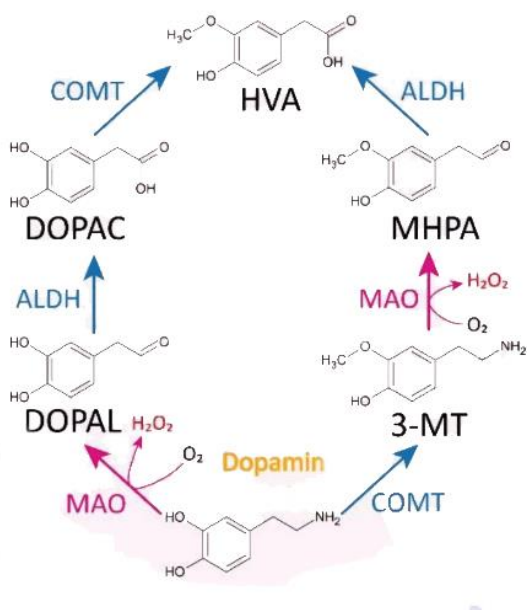
Biološki efekti kateholamina otpuštenih u sinaptičke pukotine se okončavaju vrlo brzo, preuzimanjem u simpatičke nervne završetke i/ili efektorske ćelije, ili njihovom konverzijom u neaktivne metabolite radom enzima. Oba mehanizma inaktivacije kateholamina je otkrio Džulijus Akselrod [216, 217].

Primarni mehanizam inaktivacije predstavlja ponovno preuzimanje kateholamina u neurone uz pomoć membranskih transportera. Ovaj transport se vrši preko **noradrenalinskog transportera (NET)** i **dopaminskog transportera (DAT)**. Transport je zavisen od temperature i prisustva jona natrijuma. Kotransport natrijuma i hlora obezbeđuje energiju da bi se kateholamini transportovali nasuprot gradijentu koncentracije, dok se koncentracija jona natrijuma u ćeliji održava radom  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze [176]. Nakon vezivanja za transporter, molekul kateholamina se ubacuje u nervni završetak i zatim skladišti u sinaptičku vezikulu da bi se zaštitio od razgradnje. Transporteri poseduju visok afinitet za kateholamine, ali mali kapacitet transporta [177]. Ova dva transportera pokazuju veliku homologiju i sastoje se od 12 transmembranskih domena i nekoliko unutarćelijskih i vanćelijskih petlji koje poseduju mesta fosforilacije i glikozilacije [218, 219]. NET ima veći afinitet za endogene kateholamine nego DAT, pri čemu se transport noradrenalina odvija duplo efikasnije od transporta adrenalina. Sa druge strane, DAT ima znatno veću selektivnost za dopamin [219].

Metabolička razgradnja kateholamina je generalno nezavisna od egzocitoze i uglavnom se dešava u istim ćelijama u kojima se kateholamini sintetišu [220]. Kateholamini podležu hemijskoj degradaciji 3-O-metilacijom, oksidativnom deaminacijom i konjugacijom sa sulfatima i glukuronidima.

Oksidativnu deaminaciju kateholamina vrši **monoamin oksidaza (MAO)**. MAO je enzim koji sadrži flavin i katalizuje deaminaciju amina, proizvodeći aldehide koji se dalje razgrađuju do karboksilnih kiselina ili alkohola. Nusprodukti ove reakcije mogu biti potencijalno neurotoksična jedinjenja poput vodonik peroksida. MAO-A ima veći afinitet za noradrenalin i adrenalin, i lokalizovan je u neuronima mozga, dok je MAO-B odgovoran za degradaciju dopamina [221].

Sa druge strane, **katehol-O-metiltransferaza (COMT)** katalizuje transfer metil grupe sa S-adenozilmetionina na hidroksilnu grupu na poziciji 3 na različitim supstratima, uključujući kateholamine, njihove hidroksilovane metabolite, L-DOPA, askorbinsku kiselinu, farmakološke agense i različite molekule poreklom iz hrane [176]. COMT za svoju aktivnost zahteva prisustvo kofaktora S-adenozilmetionina i  $Mg^{2+}$ . Kao produkti 3-O metilacije nastaju metilovani derivati kateholamina, metadrenalin i normetadrenalin. Ovi derivati daljom deaminacijom prelaze u vanilmandeličnu kiselinu i 3-metoksi-4-hidroksi-fenilglikol [177]. Katehol-o-metiltransferaza je eksprimirana u većim količinama u adrenalnim hromafinim ćelijama, ali se može naći i u mozgu. Postoji u formi solubilnog enzima i enzima vezanog za membranu [222].



**Slika 7:** Funkcija MAO i COMT u različitim putevima razgradnje dopamina. MAO konvertuje dopamin do 3,4-dihidoksifenilaldehida (DOPAL), koji se zatim prevodi u 3,4-dihidrofenilsirćetnu kiseline (DOPAC) uz pomoć aldehyd dehidrogenaza (ALDH). DOPAC se zatim konvertuje u homovaniličnu kiselinu (HVA). Alternativno, COMT može da konvertuje dopamin do 3-metoksotiramina (3-MT). MAO vrši konverziju 3-MT do 3-metoksi-4-hidroksifenilacetaldehida (MHPA), koji se na kraju prevodi u homovaniličnu kiselinu uz pomoć ALDH. Prilagođeno iz: *Nam, Min-Ho, MoonSun Sa, Yeon Ha Ju, Mingu Gordon Park, and C. Justin Lee. 2022. "Revisiting the Role of Astrocytic MAOB in Parkinson's Disease" International Journal of Molecular Sciences 23, no. 8: 4453.*

### 1.4.5. Centralni kateholaminski sistem u stresu

Kateholaminski sistem mozga predstavlja anatomske i funkcionalno specifičan sistem koji ima ključnu ulogu u centralnoj organizaciji odgovora na stres. Iako je brz i efikasan odgovor na stresne stimuluse ključan u kriznim situacijama, on može biti maladaptivan u slučaju dugoročnog trajanja stresora.

Adrenalinski, noradrenalinski i dopaminski neuroni koji čine centralni kateholaminski sistem imaju niz specifičnih anatomske karakteristika poput izrazito razgranatih aksona sa hiljadama terminalnih sinapsi, ili velikog broja nervnih završetaka koji se ne završavaju sinapsom iako oslobađaju kateholamine. Takođe, eksprimiraju veliki broj neuropeptida koji služe kao kotransmiteri, ali eksprimiraju i specifične membranske transportere koji omogućavaju intenzivno preuzimanje kateholamina iz sinaptičke pukotine ili vanćelijskog prostora i ispoljavaju jak, brz i selektivan odgovor na stresore. Kateholaminska nervna vlakna su prisutna u svim delovima centralnog nervnog sistema [177].

Centralni kateholaminski sistem se može grubo podeliti na dva velika dela. Jedan deo predstavlja uzlazni centralni kateholaminski sistem, koji čine A1 i A2 noradrenalinski neuroni kaudalnog dela *locus coeruleus*, kao i C1 i C2 adrenalinski neuroni donjeg moždanog stabla. Ovaj sistem inervira prednji mozak i hipotalamus, a prima direktne informacije iz somatskog i visceralnog čulnog sistema. Njegova aktivacija je specifična, u zavisnosti od tipa stresora, i između ostalog inervira HPA osovinu. Drugi deo predstavlja silazni centralni kateholaminski sistem, koji čine noradrenalinski neuroni iz grupe A5 i A7 ventro-kaudalnog dela *locus coeruleus*, kao i adrenalinski C1 neuroni. Ovaj sistem se projektuje na simpatičke preganglijske neurone u torakalnom delu kičmene moždine, dok informacije prima iz paraventricularnih jedara [223].

Stresni stimuli ubrzavaju oslobađanje i promet kateholamina u mozgu. Adrenalinski i noradrenalinski neuroni mozga su direktno uključeni u centralnu obradu odgovora na stres, dok je uloga dopaminskih neurona u stresu još nedovoljno istražena. Efekti kateholamina tokom stresnog odgovora, osim od njihove sinteze i otpuštanja, zavise i od receptora i transportera za kateholamine i njihove ekspresije u određenim regionima mozga. Njihove promene i posledice tih promena zavise od tipa stresora, intenziteta i njegovog trajanja. Stresori se ne razlikuju samo po intenzitetu odgovora koji izazivaju, već i po nervnim putevima koji su uključeni u te odgovore. Takođe, jedan stresor može aktivirati nekoliko struktura mozga [224].

Akutni stres dovodi do prolaznih promena u nivoima kateholamina u mozgu i do kratkotrajne aktivacije hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine. Nakon određenog vremena, koje zavisi od vrste i intenziteta stresnog stimulusa, organizam se vraća u homeostazu i aktivnost kateholaminskih neurona se vraća na normalni nivo. Hronični, dugoročni ili ponovljeni stresori mogu dugotrajno zadržati kateholaminske neurone u veoma aktivnom stanju [225]. Ukoliko izlaganje stresorima traje nekoliko nedelja, zalihe kateholamina mogu biti ispljene, a povećana sinteza i ponovno preuzimanje kateholamina mogu biti nedovoljni da bi se te zalihe nadoknadile [226]. Takođe, aktivnost samih

kateholaminskih neurona može biti smanjena. Ovi procesi mogu dovesti do deficita kateholamina u nervnim završecima.

S obzirom na činjenicu da hronični stres može dovesti do iscrpljivanja zaliha kateholamina, nije iznenađujuća činjenica da je usko vezan sa nastankom depresije. Pokazano je da je stres praktično najbitniji sredinski faktor koji utiče na rizike od razvoja, pogoršanja kao i relapsa epizoda kliničke depresije. Istraživanja su pokazala da veoma stresni životni događaji povećavaju incidencu depresije 2,5 puta [227], dok samo jedan izuzetno stresan životni događaj povećava rizik od depresivne epizode 1,41 puta [228]. Osim toga, u različitim studijama je pronađena i korelacija između stresa i rezistencije na tretman depresije [229], lošije prognoze toka bolesti [230] i veće verovatnoće relapsa bolesti ili depresivnih epizoda [231, 232].

### **1.5. Mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) i fosfoinozimid-3-kinaza/ alfa serin/treonin-protein kinaza (PI3K/Akt) signalni put**

Postoji više od 20 signalnih puteva povezanih sa depresijom. Među tim signalnim putevima MAPK i PI3K/Akt predstavljaju one najznačajnije. Ovi putevi su uključeni u diferencijaciju i proliferaciju neurona, neuroplastičnost i ublažavanje neuroinflamacije. Pokazano je da se ovi putevi aktiviraju kako u patofiziološkim promenama koje nastaju u depresiji tako i u fiziološkim procesima koji deluju protektivno protiv depresije.

#### **1.5.1. MAPK signalni put**

Mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. *mitogen activated protein kinase*, MAPK) predstavljaju familiju evolutivno konzerviranih serin/treonin kinaza koje učestvuju u mnogobrojnim ćelijskim procesima i regulišu ćelijski rast, diferencijaciju i preživljavanje ćelija, funkciju neurona i imunski odgovor [233]. MAPK su eksprimirane u postmitotičkim neuronima adultnog mozga sisara, gde u odgovoru na promenu sinaptičke aktivnosti regulišu aktivnost neurona i sinaptičku plastičnost na transkripciono zavisne i nezavisne načine [234]. Implicirano je da poremećena regulacija MAPK signalizacije ima važnu ulogu u kanceru, bolestima imunskog sistema i mozga [235, 236].

MAP kinaze obuhvataju 14 različitih kinaza koje se na osnovu sekvence, načina aktivacije i signalne kaskade mogu podeliti na konvencionalne i atipične MAPK. Konvencionalne MAPK su klasifikovane u nekoliko glavnih podfamilija: kinaze regulisane vanćelijskim signalima (eng. *extracellular-signal-regulated kinases*, ERK), koje obuhvataju ERK1 i ERK2, zatim kinaze c-Jun N-terminalnog domena (eng. *c-Jun amino-terminal kinases*, JNK), koje obuhvataju JNK1, JNK2 i JNK3, i p38 kinaze, koje obuhvataju p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  i p38 $\delta$ . Svaka familija MAP kinaza se sastoji od seta tri evolutivno konzervirane kinaze koje uzastopno deluju: MAPK, MAPK kinaze (MAPKK) i MAPKK kinaze (MAPKKK) (Slika 5). Svaka signalna kaskada započinje specifičnim unutarćelijskim ili

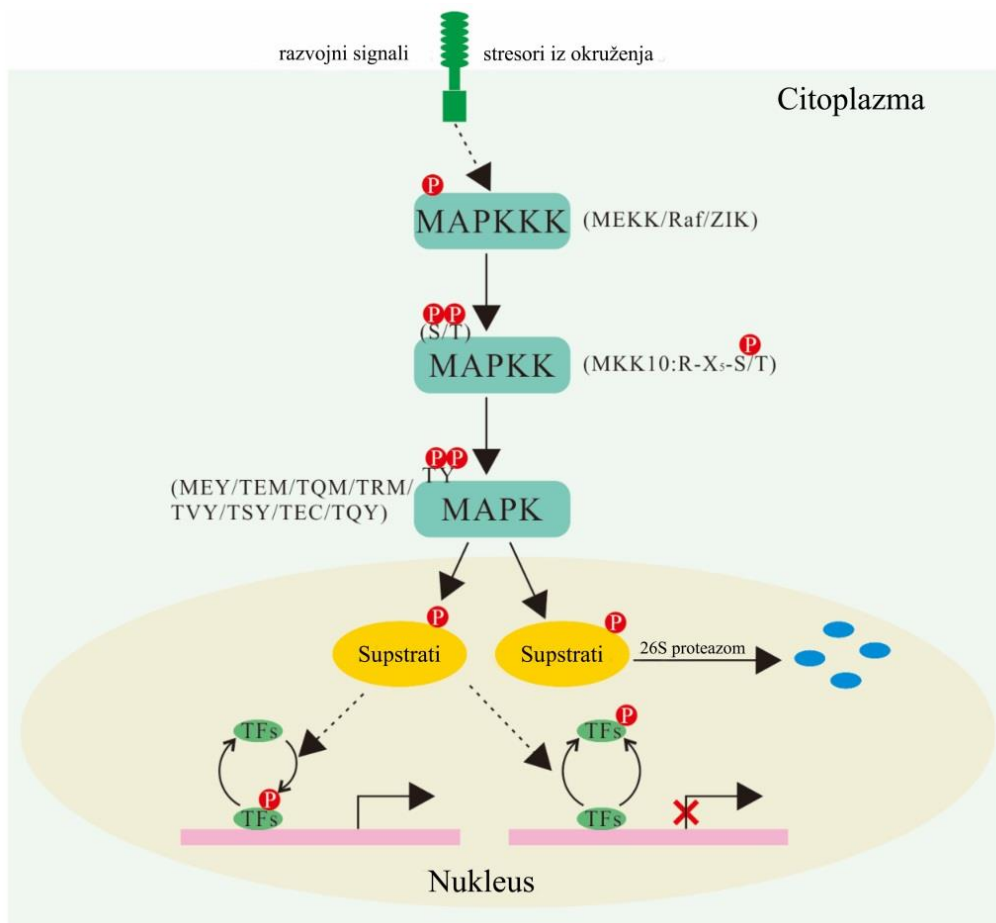
vanćelijskim signalima koji dovode do aktivacije MAPKKK kroz fosforilaciju ili kao rezultat interakcije sa malim GTP vezujućim proteinima Ras/Rho familije. Aktivacija MAPKK dovodi do fosforilacije i aktivacije MAPKK, koje zatim aktiviraju MAPK fosforilacijom treoninskih i tirozinskih ostataka na aktivacionoj petlji ovih kinaza. Nakon aktivacije, MAPK fosforilišu ciljne supstrate koji poseduju serinske ili treoninske ostatke za kojima sledi prolin. Specifičnost za supstrat je često određena specifičnim interakcijskim motivima na supstratu, kao i interakcijom sa proteinskim nosačima koji organizuju signalni put u specifične module, istovremeno vezujući veliki broj različitih komponenti.

Iako MAPK mogu biti aktivirane raznovrsnim stimulusima, ERK1 i ERK 2 kinaze se dominantno aktiviraju u odgovoru na faktore rasta i forbol estere, dok se JNK i p38 kinaze aktiviraju posredstvom raznih stresnih stimulusa poput osmotskog šoka, jonizujućeg zračenja ili citokina.

ERK1 je prva identifikovana MAP kinaza [237]. ERK1 i ERK2 su MAPK koje su najintenzivnije proučavane u procesu razvika. ERK kinaze se mogu podeliti na klasične ERK (ERK1 i ERK2) i veće ERK kinaze koje sadrže dodatnu sekvencu na karboksilnom kraju proteina (poput ERK5) [238]. Iako ERK1 i ERK2 dele 83% aminokiselinske sekvence i veliki broj supstrata, eksperimenti pokazuju da nedostatak egzona 2 u *erk2* genu ili *knockout* ovog gena dovodi do poremećaja u razvoju i smrti embriona miša *in utero*, što upućuje na to da ERK1 ne može da kompenzuje nedostatak ERK2 [239, 240]. Za potpunu aktivaciju ovih kinaza neophodna je fosforilacija i treonina i tirozina u TXY motivu [241]. Aktivaciju klasične ERK1/2 signalne kaskade započinje Ras - GTP-vezujući protein, koji potom aktivira MAPKKK koja pripada Raf (A-Raf, B-Raf, i Raf1) familiji. Raf kinaza fosforiliše MAPKK MEK1/2 koje zatim fosforilišu ERK1 i ERK2. [242]. Iako se klasični ERK1/2 modul primarno aktivira faktorima rasta i mitogenima, ERK put može biti aktiviran i proinflamatornim stimulusima poput citokina, faktora nekroze tumora, lipopolisaharda koje proizvode patogeni kao i endogenim signalima koji ukazuju na opasnost, poput urične kiseline ili lipoproteina male gustine [243].

ERK1 ima ključnu ulogu u dugoročnim adaptivnim promenama mozga koje leže u osnovi modulacije sinaptičke plastičnosti, učenja, pamćenja kao i poremećaja zavisnosti [244]. Sve veći broj dokaza ukazuje na to da pod dejstvom hroničnih stresora dolazi do poremećene regulacije ERK signalnog puta upravo u delovima mozga koji imaju ulogu u nastanku depresije [245]. Između ostalog, pokazana je smanjena ekspresija mRNA i proteina za ERK1/2 u prefrontalnom korteksu i hipokampusu žrtava suicida [246].

Istraživanja su pokazala da tokom depresije može doći do dugoročnih promena u ERK fosforilaciji, ekspresiji i funkciji u PFC i hipokampusu, što ima uticaja na promenu ponašanja tokom ove bolesti [245]. Dwivedi i saradnici [246] su pokazali da postoji smanjena genska ekspresija i aktivnost ERK1/2 u PFC i hipokampusu, ali ne i u cerebelumu *post mortem* uzoraka mozga žrtava suicida u poređenju sa osobama koje ne pate od psihijatrijskih poremećaja. Veći broj studija takođe je pokazao da je u animalnim modelima depresije fosforilacija ERK smanjena u delovima mozga povezanih sa promenama ponašanja u depresiji, kao i da je ova smanjena aktivacija ERK u korelaciji sa ispoljavanjem ponašanja nalik depresiji [247-249]. Pored toga, hronična inhibicija ERK signalnog puta farmakološkim inhibitorima kod eksperimentalnih životinja izaziva anhedoniju i ponašanje nalik anksioznom [250].



**Slika 8:** Šematski prikaz MAPK signalne kaskade. Singalna transdukcija se vrši od MAPKK do MAPK kroz seriju fosforilacija treonin/tirozin i serin/treonin aminokiselinskih ostataka. Naposletku se aktivirana MAPK transportuje u jedro, gde je uključena u fosforilaciju transkripcionih faktora (TFs) i rekonfiguraciju specifičnog odgovora vezanog za transkripciono reprogramiranje. Fosforilisani supstrati mogu biti degradirani ili aktivirani, čime menjaju afinitet vezivanja za promotor ciljanog gena da bi suprimirali ili promovisali njegovu ekspresiju. Preuzeto i prilagođeno iz *Jiang, Min, et al. "Mitogen-activated protein kinase and substrate identification in plant growth and development." International Journal of Molecular Sciences 23.5 (2022): 2744.*

MAP p38 kinazni modul aktiviraju stresori iz okruženja i inflamatorni citokini. Primarne MAPKKK ovog modula su MLK2, MLK3, MEKK 1-4, ASK1, TAK1, TAO1 i TAO2. MAPKK uključuju MEK3 i MEK6 (koje se često u literaturi označavaju i kao MKK2 i MKK6), dok su primarne MAP kinaze ovog modula p38 kinaze [238, 242]. Postoji četiri poznate izoforme p38 kinaze, od kojih je p38 $\alpha$  široko eksprimirana u celom organizmu, sa visokom ekspresijom u leukocitima, jetri, slezini, štitastoj žlezdi, placenti i kostnoj srži [251]. Nasuprot tome, p38 $\beta$  je dominantno eksprimirana u mozgu

i srcu, dok se p38 $\gamma$  primarno nalazi u skeletnim mišićima [252, 253]. Ekspresija izoforme p38 $\delta$  je najizraženija u plućima, bubrezima, digestivnom sistemu i endokrinim organima [251, 254]. Modul p38 MAPK signalizacije učestvuje u inflamaciji, apoptozi, diferencijaciji ćelija i regulaciji ćelijskog ciklusa [238]. Ovaj signalni put ima centralnu ulogu u produkciji inflamatornih molekula poput interleukina 1 (IL-1), faktora nekroze tumora (TNF) i ciklooksigenaze COX-2. Takođe, veliki broj drugih inflamatornih odgovora zavisi od p38 signalizacije [255, 256]. Pored toga, p38 signalizacija se aktivira proinflamatornim citokinima i ima ključnu ulogu u ćelijskom odgovoru na te citokine, kao i regulatornu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji ćelija imunskog sistema [256-258]. Sve veći broj podataka ukazuje da je p38 MAPK signalni put povezan sa promenama u ponašanju tokom depresije. Osim opšte povezanosti inflamacije i afektivnih poremećaja koju opisuje inflamatorna/citokinska hipoteza depresije, interesantno je napomenuti da su TNF i IL-1, čija produkcija zavisi od p38 signalizacije, povezani sa povećanom aktivnošću serotoninskog transportera, pa bi tako mogli uticati na količinu dostupnog serotonina u sinapsama [259]. Inflamacija i aktivacija imunskog sistema može smanjiti i količinu dostupnog triptofana, aminokiseline koja je prekursor za sintezu serotonina [260]. Drugi mehanizam kojim bi p38 MAPK signalni put mogao biti povezan sa depresijom je poremećaj transaktivacije glukokortikoidnog receptora, što bi moglo doprineti glukokortikoidnoj rezistenciji koja se javlja u hroničnom stresu i depresiji [261]. Inhibicija p38 signalizacije može da ublaži simptome depresije izazvane aplikacijom lipopolisaharida kod eksperimentalnih životinja [262].

### 1.5.2. PI3K/Akt signalni put

PI3K/Akt (fosfoinozimid-3-kinaza / alfa serin/treonin-protein kinaza) signalni put ima ključnu ulogu u velikom broju procesa u organizmu koji su od vitalne važnosti za preživljavanje i odbranu od patogena. Ova signalna kaskada učestvuje u regulaciji ćelijskog rasta, proliferacije i preživljavanja, transkripcije i sinteze proteina, u regulaciji metabolizma glukoze, imunskoj regulaciji, vaskularizaciji i mnogim drugim procesima [263, 264]. Identifikacija ovog signalnog puta je započeta osamdesetih godina dvadesetog veka, dok se popularnost istraživanja povećala kada je otkriveno da PI3K/Akt put ima važnu ulogu u tumorogenezi [265]. PI3K/Akt signalni put je visoko konzerviran i aktivacija Akt signalnog molekula je strogo regulisana u zdravim ćelijama.

Fosfoinozimid-3-kinaze (PI3K) predstavljaju veliku familiju lipidnih enzima koji mogu da fosforilišu 3'-OH grupu fosfatidilinozitola ćelijske membrane. Kod sisara je identifikovano tri klase PI3K enzima (klasa I, klasa II i klasa III). Klasa I je podeljena u dve potklase – IA u koju spadaju p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  i p110 $\delta$ , i potklasu IB u koju spada p110 $\gamma$ . Ova klasa PI3K enzima je najbolje ispitana zbog svoje funkcije u malignim bolestima [266]. Enzimi klase I su heterodimeri koji se sastoje od katalitičke (p110) i regulatorne subjedinice. Najčešća regulatorna subjedinica enzima iz grupe IA je označena kao p85, dok je izoformi p110 $\gamma$  pridružena p84/p87 regulatorna subjedinica [266, 267]. Regulatorna subjedinica stabilizuje i štiti p110 subjedinicu od degradacije, ali istovremeno inhibira njenu katalitičku aktivnost [268]. U kanonskom putu signalne kaskade,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\delta$  izoforma PI3K se aktivira vanćelijskim ligandima koji se vezuju za receptor tirozin kinaze (RTK), transmembranske

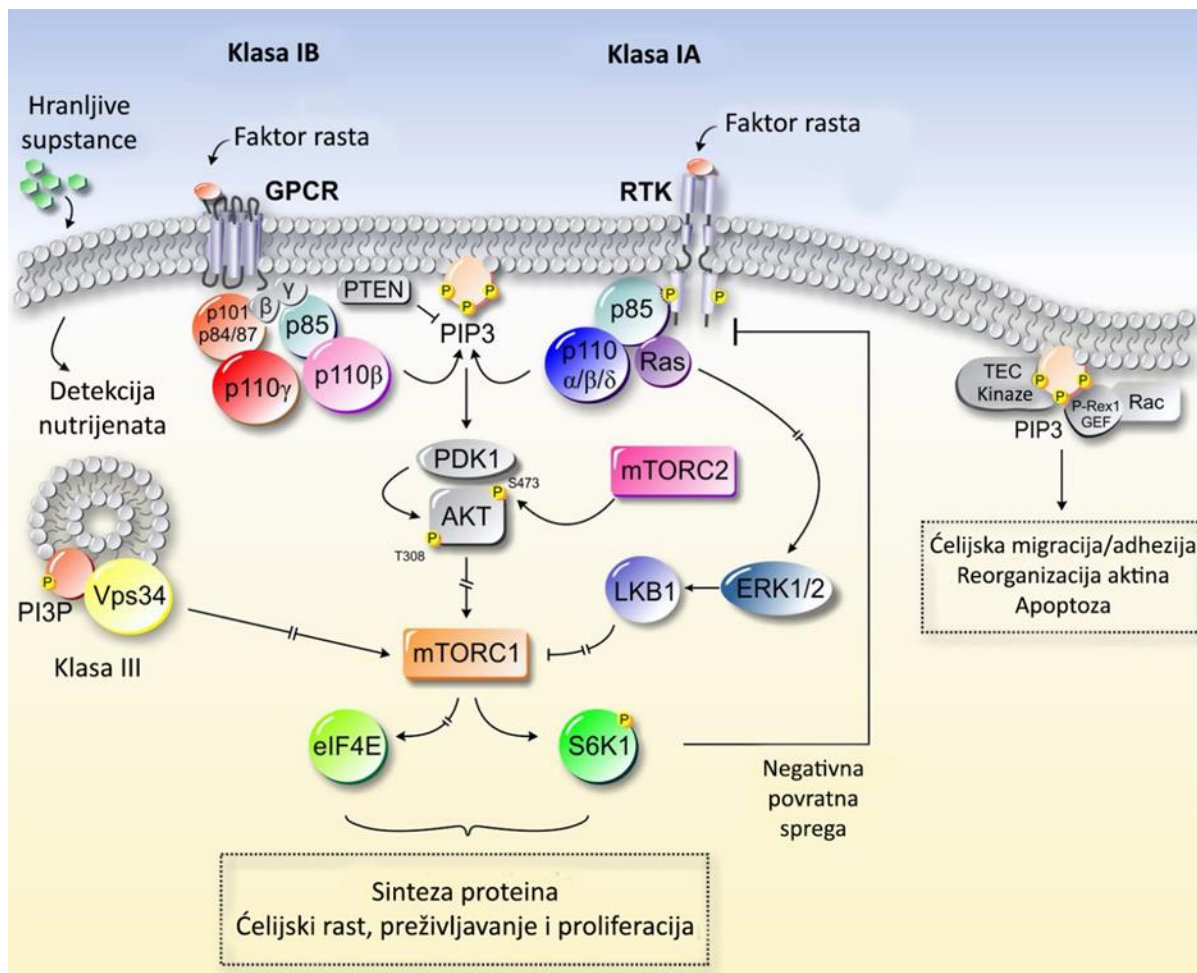


glikoproteine koji poseduju enzimsku aktivnost. Za razliku od njih,  $\gamma$  izoforma se aktivira preko receptora spregnutih sa proteinom G (GPCR) ili aktivnošću RAS familije GTPaza [269-271]. Nakon aktivacije, katalitička subjedinica PI3K fosforiliše fosfatidilinozitol-4,6-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) na 3' poziciji i generiše fosfatidilinozitol-3,4,6-trifosfat (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> nije direktni aktivator Akt, već se PIP<sub>3</sub> vezuje za PH (eng. *pleckstrin homology*) domen Akt proteina i regrutuje ga na unutrašnju stranu plazma membrane. Konformaciona promena Akt omogućava fosfoinozimid zavisnoj kinazi 1 (PDK1) da fosforiliše Akt na mestu Thr308 u aktivacionoj petlji, što dovodi do delimične aktivacije Akt [264]. Potpuna aktivacija Akt proteina zahteva fosforilaciju na regulatornom mestu Ser473, koju može da izvrši mTOR kompleks 2 (eng. *mechanistic target of rapamycin complex 2*, Slika 6) [272]. Akt je poznat i kao protein kinaza B, i predstavlja familiju od tri serin-treonin kinaze koje obuhvataju visoko homologne izoforme Akt1, Akt2 i Akt3. Dok je Akt1 prisutan u praktično svim tkivima, Akt2 je uglavnom eksprimiran u tkivima osetljivim na insulin, poput jetre i skeletnih mišića, a Akt3 se nalazi u mozgu i testisima. Akt se sastoji od tri domena, već pomenutog N-terminalnog PH domena, središnjeg kinaznog domena i regulatornog C-terminalnog domena [273]. Aktivirana Akt kinaza vrši direktnu fosforilaciju supstrata od 40 kDa koji je bogat prolinom (PRAS40) i TSC2 proteina (eng. *tuberous sclerosis protein 2*), čime aktivira mTOR1 kompleks [266]. Efektori mTOR1 obuhvataju ribozomsku kinazu S6 (S6K1) i proteine koji vezuju translacioni faktor eIF4E. Osim toga, veliki broj istraživanja je pokazao da pored mTOR1, Akt reguliše i druge esencijalne nizvodne molekule poput FOXO (eng. *forkhead box protein O*), GSK3 $\beta$  (eng. *glycogen synthase kinase-3 $\beta$* ), kontrolišući tako ćelijski rast, proliferaciju, preživljavanje ćelije i mnoge druge ključne procese u organizmu [274].

Primarni negativni regulator PI3K/Akt signalizacije je fosfataza PTEN (eng. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*). PTEN defosforiliše PIP<sub>3</sub> nazad u PIP<sub>2</sub>. Dokazano je da PTEN direktno vezuje p85 $\alpha$  regulatornu subjedinicu PI3K čime se njena defosfatazna aktivnost pojačava [275]. Poremećaji u PTEN aktivnosti su pokazani u različitim tipovima kancera i često direktno povezani sa njihovim nastankom [274].

Brojne studije su pokazale da PI3K/Akt signalni put ima značajnu ulogu u patogenezi depresije. Pokazano je da dolazi do smanjene aktivnosti ovog signalnog puta u mozgu u animalnim modelima depresije i u *post mortem* uzorcima osoba koje su patile od depresije [276]. Važnost PI3K/Akt signalnog puta za patofiziološke procese u poremećajima depresije se potencijalno ogleda u njegovoj regulaciji neurotoksičnosti i preživljavanja nervnih ćelija. PI3K/Akt posreduje u prenošenju signala koji utiču na preživljavanje širokog spektra nervnih ćelija preko blokade citoplazmatske mašinerije odgovorne za ćelijsku smrt i regulacije gena koji učestvuju u ćelijskoj smrti i preživljavanju, kao i kroz metaboličke puteve koji regulišu preživljavanje ćelija [277]. Akt može kontrolisati i aktivaciju imunskih ćelija kroz regulaciju ključnih infamatornih citokina [278]. Jedan od nizvodnih efektoru PI3K/Akt signalnog puta je GSK3 $\beta$ , koji reguliše brojne transkripcione faktore i posredno može uticati na ekspresiju različitih proinflamatornih citokina [279]. Pored toga, PI3K aktivacija pozitivno reguliše ekspresiju antiinflamatornih citokina [279, 280]. Pokazano je da inflamacija koja se razvija u uslovima hroničnog stresa ili depresije dovodi do poremećaja polarnosti u sistemu mikrotubula nervnih ćelija, što može oštetiti akso-dendritske spojeve između neurona [281]. PI3K/Akt u ovim uslovima povećava sekreciju neurotrofnih faktora, što doprinosi održavanju homeostaze sistema mikrotubula i omogućava neometenu transmisiju signala u nervnom sistemu i na taj način ostvaruje protektivnu ulogu. Pokazano

je takođe da antidepresiv fluoksetin, pored ostalih efekata, povećava i ekspresiju fosforilisanog Akt proteina, što doprinosi njegovom antidepresivnom dejstvu [282].

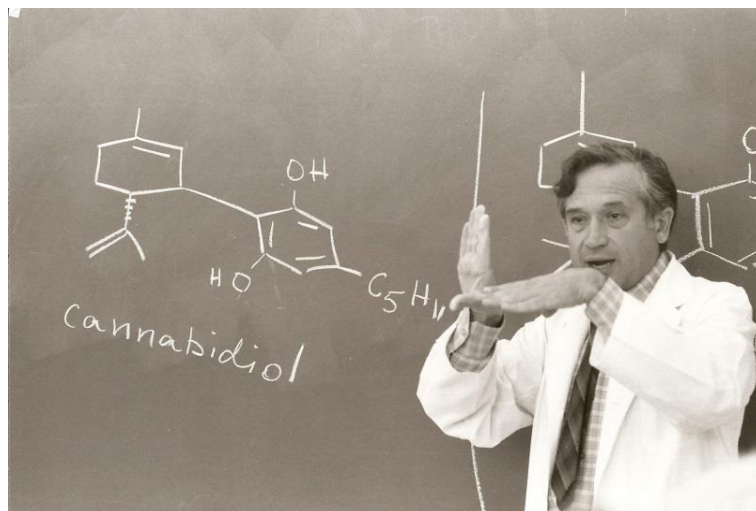


**Slika 9:** PI3K/Akt/mTOR signalni put. Klasa I PI3K se aktivira faktorima rasta preko GPCR ili RTK receptora. PI3K aktivacija dovodi do konverzije PIP<sub>2</sub> u PIP<sub>3</sub>, koja može biti preokrenuta radom fosfataze PTEN. PIP<sub>3</sub> dovodi do regrutacije i aktivacije Akt preko interakcije sa PH domenom. Akt svojom aktivnošću direktno aktivira mTOR1 kompleks. mTOR kompleks može biti aktiviran i drugim putevima, poput Ras-zavisnog LKB1 puta, ili preko Vps35 puta koji je regulisan nutrijentima. Prilagođeno iz Martini, Miriam, et al. "PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review." *Annals of medicine* 46.6 (2014): 372-383.

## 1.6. Endokanabinoidi

### 1.6.1. Istorijska perspektiva

*Canabis sativa* se široko koristi kao droga zbog svojih psihoaktivnih svojstava, i predstavlja jednu od istorijski najduže upotrebljivanih supstanci tog tipa. Svoju popularnost kanabis, odnosno marihuana, verovatno duguje sposobnosti da izazove ushićenje i euforiju, kao i da utiče na čulnu percepciju korisnika. Međutim, potencijalna medicinska svojstva kanabisa bila su poznata još u doba civilizacija stare Asirije i drevne Kine [283]. Kineski tekstovi iz trećeg milenijuma pre nove ere opisuju sposobnost kanabisa da ublaži bol i grčeve [284]. Naučna istraživanja kanabisa su dugo bila zanemarivana, najvećim delom zbog toga što je, za razliku od morfijuma i kokaina, dugo bilo nemoguće izolovati psihoaktivne sastojke kanabisa. Danas se zna da je razlog ovog problema to što kanabis sadrži preko 60 sastojaka slične strukture i fizičkih svojstava. Uprkos velikom broju biološki aktivnih sastojaka, kanabis svoje psihoaktivne efekte duguje skoro isključivo  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabidiolu (THC), koji je izolovan, a nakon toga i veštački sintetisan kasnih šezdesetih godina dvadesetog veka [285, 286]. Treba napomenuti da je kanabidiol (CBD), koji je takođe važan sastojak kanabisa, izolovan tridesetih godina dvadesetog veka i okarakterisan u približno isto vreme kao i THC [287]. Zbog nedostatka psihoaktivnih efekata, inicijalno se mali broj istraživanja fokusirao na CBD, a njegova anti-inflamatorna dejstva i uticaj na pamćenje su postali interesantni naučnicima poslednjih par decenija.



**Slika 10:** Rafael Mešulam, naučnik zaslužan za izolaciju  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabidiola. Preuzeto sa: <https://www.vice.com/en/article/mvxde4/raphael-mechulam-father-cannabis-discover-thc>

Identifikacija THC je dovela do većeg interesovanja za istraživanje njegovih efekata, što je evidentno po značajnom povećanju broja naučnih publikacija iz ove oblasti u poslednjih pola veka. Međutim, istraživači su dugo bili neuspešni u pokušaju da otkriju njegov mehanizam dejstva i

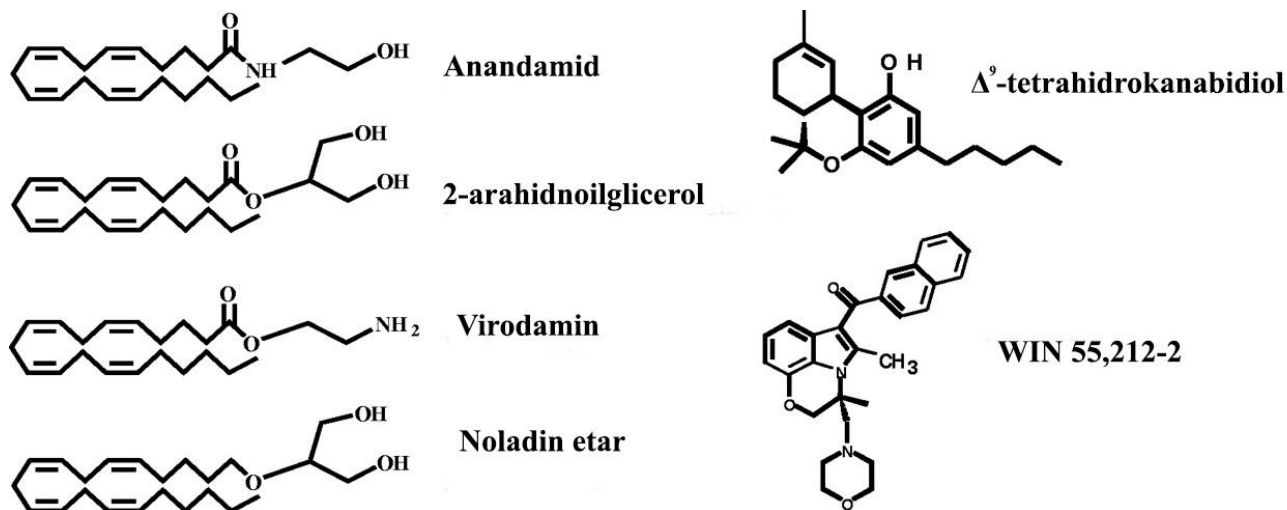
inicijalno su bili predloženi nespecifični mehanizmi poput promene fluidnosti ćelijske membrane [288]. Prošlo je preko dvadeset godina do otkrića i molekularnog kloniranja kanabinoidnog receptora CB1, preko koga THC ostvaruje svoje dejstvo [289-291]. Nekoliko godina kasnije otkriven je i drugi kanabinoidni receptor, CB2, koji je kloniran iz ćelijske linije promijelocita [292].

Prisustvo endogenog receptora za THC sugerisalo je postojanje i neke endogene supstance koja se vezuje za te receptore. Prvi otkriveni endokanabinoid je bio anandamid (AEA), nazvan po sanskritskoj reči za blaženstvo [293]. Nakon njega je otkriven 2-arahidonoilglicerol (2-AG), a zatim i veliki broj drugih endogenih kanabinoida [294]. Kasnije studije su se u velikoj meri fokusirale na biosintezu, ćelijski transport, mehanizam i biološke funkcije anadamida i 2-AG, što je dovelo do toga da je mehanizam delovanja ostalih endokanabinoida do danas ostao manje poznat.

### **1.6.2. Endokanabinoidni sistem**

Endokanabinoidni sistem čine kanabinoidni receptori, njihovi ligandi i enzimi koji su zaduženi za biosintezu i degradaciju, odnosno deaktivaciju endogenih kanabinoida [295]. Za razliku od većine drugih neurotransmitera, endokanabinoidni ligandi su derivati lipida koji se sintetišu po potrebi i otpuštaju u sinapse iz postsinaptičkih ćelija, delujući preko kanabinoidnih receptora na presinaptičkim aksonskim terminalima u cilju inhibiranja otpuštanja drugih neurotransmitera [288].

Endokanabinoidi se definišu kao signalni lipidi koji nastaju u organizmu i koji aktiviraju kanabinoidne receptore. Predstavljaju amide, estre i etre polinezasićenih masnih kiselina dugačkog lanca [296]. Osim anadamida i 2-AG, endokanabinoidi uključuju virodamin (O-arahidonoiletanolamin), noladin etar, N-arahidonoildopamin, homo-linoleniletanolamid, dokosatetraeniletanolamid, N-oleoildopamin kao i konjugate poput palmitoiletanolamida, oleoiletanolamida i druge (Slika 7) [297]. Prekursori endokanabinoida su membranski lipidi koji se oslobađaju uz pomoć lipaza koje aktiviraju specifični signali. Ovakav tip sinteze ukazuje na to da je oslobađanje endokanabinoida prostorno i vremenski veoma precizno. Za razliku od toga, egzogeni ligandi poput THC dovode do neselektivne i produžene aktivacije kanabinoidnih receptora koja se meri u minutima, dok aktivacija endogenim ligandima traje samo nekoliko sekundi.



**Slika 11:** Struktura endokanabinoida i sintetičkih kanabinoidnih agonista. Preuzeto i prilagođeno iz *Rodríguez de Fonseca, Fernando, et al. "The endocannabinoid system: physiology and pharmacology." Alcohol and Alcoholism 40.1 (2005): 2-14.*

Kanabinoidni receptori CB1 i CB2 pripadaju superfamiliji receptora spregnutih sa proteinom G. Aminokiselinske sekvence ova dva receptora su homologne samo 44%, dok njihovi transmembranski domeni dele 68% homologije [298]. Uprkos tome, THC i veliki broj sintetičkih kanabinoida imaju sličan afinitet za oba receptora [284]. Iako su primarno spregnuti sa proteinom  $G\alpha_{i/o}$ , koji inhibira aktivnost adenil ciklaze, sposobni su da heterodimerizuju sa D2 dopaminskim receptorima i opioidnim receptorima, što za rezultat može imati i aktivaciju adenil ciklaze [299]. Kanabinoidni receptori mogu delovati i preko stimulacije MAP kinaza, GIRK kanala za natrijum (eng. *G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels*) ili kroz regrutaciju beta-arestina [300]. Određeni istraživači smatraju da postoji veliki broj farmakoloških dokaza koji ukazuju na postojanje i drugih kanabinoidnih receptora [284]. Osim toga, pronađeno je da je anadamid deluje na TRPV1 (eng. *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) jonske kanale, ali je njegov afinitet za njih niži nego za CB1 receptore.[301]

CB1 receptori su verovatno najbrojniji i najšire rasprostranjeni receptori spregnuti sa proteinom G u mozgu sisara [302]. Zbog toga je terapijska upotreba kanabinoida veoma izazovna, jer deluju na veliki broj struktura mozga. CB1 receptori su najbrojniji u centralnom nervnom sistemu, ali su eksprimirani i u brojnim perifernim organima uključujući jetru, masno tkivo i kožu [300]. Najveća gustina CB1 receptora u mozgu se nalazi u bazalnim ganglijama, crnoj supstanciji, malom mozgu, hipokampusu i bademastim jedrima [283, 303]. CB1 receptori se uglavnom nalaze na sinaptičkim završecima, zbog svoje bitne uloge u modulaciji sinaptičke transmisije, ali ih ima u značajnom nivou i

na telima neurona i dendritima [304]. Najviše CB1 receptora se nalazi na neuronima koji eksprimiraju GABA, ali ih takođe ima i na glutamatskim, serotoninским i holinskim neuronima [305]. Ovi receptori su prisutni još od embrionalnog razvića, što ukazuje na njihovu ulogu u razvoju nervnog sistema [306].

CB2 receptori su primarno eksprimirani na imunskim ćelijama, uključujući mikrogliju [307, 308]. U centralnom nervnom sistemu je prisutno manje CB2 nego CB1 receptora, ali u određenim patološkim procesima može doći do povećanja ekspresije CB2 receptora i narušavanja tog odnosa [309, 310]. Generalno, aktivacija CB2 receptora u mikrogliji ima antiinflamatorno dejstvo [311].

Putevi sinteze anadamida i 2-AG se razlikuju. Postoji više različitih puteva sinteze endokanabinoida, čija zastupljenost varira u različitim tkivima i u različitim fazama razvića, a može se poremetiti u nekim patološkim stanjima [300].

U najbolje proučenom putu sinteze, anamid nastaje iz fosfolipidnog prekursora N-arahidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Ovaj prekursor nastaje transferom grupe arahidonske kiseline sa fosfatidilholina na sn-1 poziciju amino grupe fosfatidiletanolamina uz pomoć enzima N-acetiltransferaze. N-acetiltransferaza zahteva prisustvo jona  $Ca^{2+}$  i pozitivno je regulisana fosforilacijom koju vrši cAMP zavisna protein kinaza A [312, 313]. NAPE se dalje iseca radom NAPE-specifične fosfolipaze C da bi se proizveo anamid [314]. Ovaj enzim ne deli homologiju sa drugim fosfolipazama i njegova regulacija je zavisna od aktivacije jonotropnih glutamatskih NMDA receptora, ili stimulacije metabotropnih receptora koji reaguju na dopamin, glutamat ili acetilholin [313, 315-317]. Alternativno, NAPE može da bude hidrolizovan fosfolipazom C, dajući fosfoanamid, koji nakon defosforilacije fosfatazom daje anamid [318].

Postoje dva poznata puta sinteze 2-AG. Kanonski put sinteze 2-AG podrazumeva generisanje diacilglicerola (DAG) iz fosfoinozitida radom fosfoinozimid-specifične protein kinaze C ili preko fosfohidrolaze fosfatidične kiseline. Nakon toga se 2-AG generiše iz diacilglicerola radom DAG lipaze [319]. Postoje dve izoforme DAG lipaze,  $\alpha$  i  $\beta$ , koje su u adultnom mozgu lokalizovane na postsinaptičkoj membrani [319]. U alternativnom putu sinteze, 2-AG se formira serijom akcija enzima fosfolipaze A1 i lipofosforilaze C [320].

S obzirom na to da se endokanabinoidi sintetišu iz fosfolipida sa unutrašnje strane membrane, i da su enzimi njihove degradacije primarno unutarćelijski, potreban je mehanizam transporta endokanabinoida u ćeliju i iz ćelije. Njihove polarne osobine sprečavaju prolazak kroz ćelijsku membranu prostom difuzijom, a ne postoji mnogo dokaza o transporterima koji zahtevaju ATP ili natrijum, što upućuje na postojanje nosača koji vrši transport olakšanom difuzijom [300]. Postoje dokazi da se anamid i 2-AG transportuju istim membranskim transporterom, koji za sada nije kloniran [321]. Pošto je njihov transport zavisna od koncentracijskog gradijenta, agensi koji inhibiraju njihovu degradaciju bi trebalo da inhibiraju i njihov transport [300].

Nakon transporta u ćeliju, anamid se hidrolizuje uz pomoć hidrolaze masnokiselinskih amida (eng. *fatty acide amide hydrolase*, FAAH) do etanolamina i arahidonske kiseline. FAAH prepoznaje i druge amide masnih kiselina i specifičan je u svojoj klasi enzima po tome što je integralni membranski enzim [319]. Široko je eksprimiran u centralnom nervnom sistemu i često je lokalizovan u blizini

terminala koji sadrže CB1 receptore [322, 323]. Kod čoveka i još nekih sisara, ali ne i kod glodara, pronađen je drugi enzim sličnih karakteristika, nazvan FAAH-2. Iako imaju sličnosti u pogledu tkivne distribucije i selektivnosti za supstrat, ta dva enzima imaju i svojih razlika i dele samo 20% homologije [324].

Iako FAAH može da katalizuje razgradnju 2-AG *in vitro*, pokazano je da nivo 2-AG nije povećan kod FAAH *knockout* miševa, što znači da to nije glavni put inaktivacije 2-AG. 2-arahidonoilglicerol se primarno hidrolizuje monoacilglicerid lipazom (MGL) [320]. Pokazano je da u hipokampusu, malom mozgu i bademastim jedrima FAAH i MGL imaju različitu distribuciju – FAAH je lokalizovan u postsinaptičkim ćelijama dok je MGL lokalizovan na presinaptičkim aksonskim terminalima [325]. 2-AG se može hidrolizovati i uz pomoć monoacilglicerol lipaze ABDH6 (eng. *alpha/beta-hydrolase domain containing 6*) koja je uglavnom prisutna u dendritima, što sugerise da ona ima drugačiju funkciju u odnosu na MGL [326].

Još jedan put terminacije endokanabinoida je njihov direktni metabolizam ciklooksigenazom-2. U tom slučaju se anadamid razlaže do prostamida a 2-AG do prostaglandin glicerol estra, što verovatno ne predstavlja jednostavnu terminaciju kanabinoidne signalizacije već tranziciju u drugi signalni put [327, 328].

### 1.6.3. Endokanabionoidni sistem i depresija

Potencijalna uloga endokanabinoida u depresiji je sugerisana efektima koje kanabis ima na ljudsko raspoloženje. Međutim, zbog prisustva THC, konzumacija kanabisa može imati akutne efekte koji variraju u širokom spektru od euforije, opuštenosti, uzbuđenja i povećane motorne aktivnosti do anksioznosti, sedacije, poremećaja percepcije i koordinacije. Niske doze kanabinoida imaju obično anksiolitičke efekte, dok su visoke doze anksioгене, tj. izazivaju pojačanu anksioznost [284].

Istraživanja su pokazala da je redovno korišćenje kanabisa povezano sa nastankom depresije, kao i da je ova korelacija znatno izraženija kod korisnika koji koriste veće količine ove supstance [329, 330]. Međutim, neki autori nalaze da korišćenje kanabisa ili THC smanjuje simptome depresije [331, 332].

Adekvatna funkcija svih elemenata endokanabinoidnog sistema je esencijalna u različitim kognitivnim, emocionalnim i ponašajnim procesima [283]. Istraživanja su pokazala da neuromodulatorne funkcije endokanabinoidnog sistema imaju uticaj na raspoloženje, kogniciju, ponašanje motivisano nagradom, kao i na odgovor organizma na stresore [288, 333]. Brojni su dokazi da u stresnim stanjima dolazi do promena u endokanabinoidnom sistemu kod ljudi i glodara. Eksperiment koji su sproveli Smaga i saradnici [334] je pokazao da u različitim modelima depresije kod pacova dolazi do promene nivoa 2-AG i anadamida u prefrontalnom korteksu, hipokampusu, *nucleus acumbens* i striatumu i da su te promene specifične za model stresa i region mozga. Klinička studija koju su sproveli Hil i saradnici [335] je pokazala da je slična situacija i kod ljudi. Otkriveno je

da žene sa dijagnostikovanom kliničkom depresijom imaju značajno snižene nivoe 2-AG u serumu, kao i da je nivo 2-AG progresivno niži sa povećanjem trajanja depresivne epizode.

Delovi mozga koji imaju ulogu u odgovoru na stres i nastanku depresije su bogati CB1 receptorima, koji se uglavnom nalaze na GABA i glutamatskim sinapsama. Na primer, njihovo prisustvo je opisano na glutamatskim neuronima paraventricularnog jedra hipotalamusa, koje ima bitnu ulogu u modulaciji odgovora na stresor preko HPA osovine [336]. CB2 receptori se nalaze na ćelijama imunskog sistema, čija se izmenjena regulacija javlja u depresiji [337]. Studija na glodarima je pokazala da delecija CB1 receptora dovodi do ponašanja sličnog depresiji. Takođe, genetska inaktivacija CB1 receptora kao i njegova farmakološka blokada dovode do povećanog nivoa kortikosterona u plazmi miševa, što ukazuje na ulogu kanabinoidnog sistema u regulaciji stresnog odgovora i HPA osovine [338]. Pokazano je da je kod ljudi polimorfizam na genu za CB1 receptor povezan sa rizikom od nastanka depresije kod Parkinsonove bolesti [339]. *Post mortem* studije na žrtvama suicida su otkrile povećane nivoe CB1 receptora u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu [340]. Međutim, prilikom tumačenja ovakvih studija mora se biti oprezan, jer te promene ne moraju direktno biti povezane samo sa depresijom ili suicidom.

Značajan dokaz o ulozi CB1 receptora u depresiji kod ljudi dolazi iz kliničkog testiranja inverznog agoniste za CB1 receptor, rimonabanta, koji je razvijen kao potencijalni lek za gojaznost. Rimonabant utiče na smanjenje apetita i telesne mase, ali je povučen sa tržišta zbog toga što je kod pacijenata izazivao pojačanu anksioznost, depresiju, pa čak i suicidalne tendencije [341]. Što se tiče CB2 receptora, pokazano je da transgeni miševi, kod kojih dolazi do preterane ekspresije ovog receptora, nakon izlaganja stresoru pokazuju smanjenje ponašanja nalik depresivnom, kao i nepromenjenu ekspresiju BDNF [342]. U studiji Onaivi i saradnika [343] primećeno je da je učestalost polimorfizma u genu za CB2 receptor znatno češća kod depresivnih pacijenata nego u generalnoj populaciji u Japanu.

Brojne animalne studije su pokazale da farmakološka inhibicija FAAH ima antidepresivno dejstvo [344-346]. URB597, jedan od FAAH inhibitora, povećava aktivnost serotoninskih neurona u dorzalnom jedru *raphe* i noradrenalinskih neurona u *locus ceruleus* [347]. Takođe, pokazano je da kod pacova WIN 55,212-2, agonista CB1 receptora, dovodi do povećanja nivoa noradrenalina u frontalnom korteksu [348]. Međutim, postoje i istraživanja koja nalaze antidepresivna dejstva antagonista ili inverznih agonista CB1 receptora [349-351].

Dosadašnja istraživanja uglavnom podržavaju pretpostavku da smanjena funkcija endokanabinoidnog sistema doprinosi razvoju i progresiji depresije, kao i da pojačana endokanabinoidna signalizacija ima antidepresivna dejstva. Međutim, postoje i implikacije da preterana funkcija ovog sistema doprinosi ispoljavanju depresije, što se objašnjava različitim promenama u kanabinoidnoj signalizaciji u različitim regionima mozga, kao i bifazičnim dejstvom kanabinoida.



## 2. Ciljevi

Imajući u vidu prethodno opisanu ulogu endokanabinoidne signalizacije u depresiji, kao i vodeće hipoteze o faktorima koji utiču na nastanak ove bolesti, glavni cilj ove doktorske disertacije je da se ispita uticaj endokanabinoida na različite puteve patogeneze depresije u mPFC i hipokampusu hronično stresiranih pacova oba pola. Ova dva regiona mozga predstavljaju strukture koje su veoma podložne stresu, i na kojima su do sada uočene najveće promene u slučajevima kliničke depresije. Uticaj endokanabinoida na depresiju ispitivan je primenom specifičnog inhibitora enzima hidrolaze masnokiselinskih amida, koji predstavlja ključni enzim u razgradnji anadamida.

Specifični ciljevi ove doktorske disertacije predstavljaju ispitivanje dejstva pojačane endokanabinoidne signalizacije posredstvom FAAH inhibitora URB597 na:

1. ponašanje mužjaka i ženki kontrolnih pacova i pacova izloženih hroničnom nepredvidivom stresu;

2. nivo noradrenalina i dopamina u mPFC i hipokampusu kontrolnih pacova i pacova izloženih hroničnom nepredvidivom stresu kod oba pola;

3. količinu enzima koji učestvuju u prometu kateholamina: tirozin hidroksilaze (TH), dopamin beta hidroksilaze (DBH), monoamin-oksidaze A (MAO-A) i katehol-O-metil transferaze (COMT) u mPFC i hipokampusu kontrolnih pacova i pacova izloženih hroničnom nepredvidivom stresu kod oba pola;

4. količinu D1 i D2 dopaminskih, i  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora u mPFC i hipokampusu kontrolnih pacova i pacova izloženih hroničnom nepredvidivom stresu kod oba pola;

5. količinu proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$  i IL-6, kao i antiinflamatornog citokina IL-10 u mPFC i hipokampusu mužjaka i ženki kontrolnih pacova i pacova izloženih hroničnom nepredvidivom stresu;

6. MAPK i PI3K signalne puteve u mPFC i hipokampusu kontrolnih pacova i pacova izloženih hroničnom nepredvidivom stresu kod oba pola

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Eksperimentalne životinje**

U istraživanju su korišćeni mužjaci i ženke pacova (*Rattus norvegicus*) Wistar soja, starosti oko 11 nedelja. Na početku eksperimenta, telesna masa životinja je bila između 200 i 300 grama. Eksperimentalne životinje su tokom eksperimenta odgajane i čuvane u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, pod standardnim laboratorijskim uslovima koji podrazumevaju boravak u polikarbonatnim kavezima dimenzija 21×37×13 cm, u sobi sa konstantnom temperaturom od  $21 \pm 1^\circ \text{C}$ , sa kontrolom vlažnosti vazduha od  $42 \pm 5\%$ , pravilnom smenom svetle i tamne faze na 12h i sa konstantnim pristupom hrani i vodi *ad libitum*. Mužjaci i ženke su bili držani u odvojenim prostorijama bez ikakvog međusobnog kontakta u toku eksperimentalnog rada. Sve eksperimentalne procedure je odobrio Etički komitet za rad sa laboratorijskim životinjama, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine, zasnovano na direktivama Evropske komisije 2010/63/EU, i izvođene su tako da životinje trpe minimum bola i neprijatnosti. Rešenje o odobrenju Etičkog komiteta je navedeno pod brojevima 323-07-00704/2017-05 i 323-07-02772/2019-09.

#### **3.2. Tretman i priprema rastvora leka**

Životinje su bile tretirane intraperitonealno rastvorom URB597, selektivnim inhibitorom hidrolaze masno-kiselinskih amida, koji je nabavljen od proizvođača APExBIO, SAD (kataloški broj A4372). Rastvor dimetil sulfoksida, DMSO (Carlo Erba reagents, Španija), Twin 80 (Acros Organics, SAD) i 0.9% NaCl, u odnosu 1:1:18, korišćeni su za rastvaranje URB597. Način rastvaranja, kao i aplikovana doza od 0.3 mg/kg telesne mase su izabrani na osnovu literaturnih podataka o prethodnim istraživanjima [352-354]. Usled kratkog poluživota URB597 u cirkulaciji, aplikovan je eksperimentalnim životinjama dva puta dnevno.

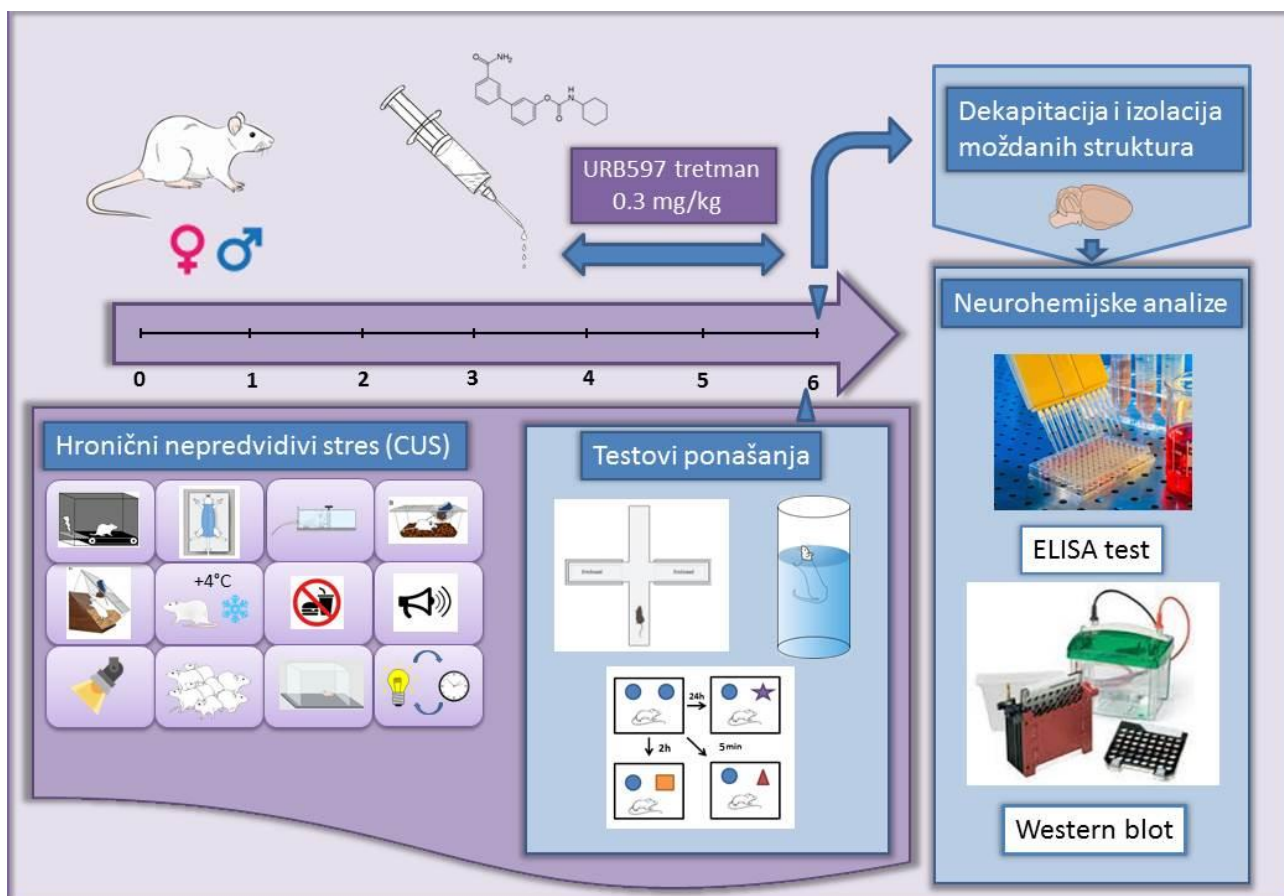
#### **3.3. Eksperimentalni protokol**

Eksperimentalne životinje prvo su podeljene u dve grupe, na osnovu pola, a zatim su obe te grupe podeljene u nove četiri grupe:

1. kontrolna grupa tretirana rastvaračem

2. kontrolna grupa tretirana rastvorom URB597
3. stresirana grupa tretirana rastvaračem
4. stresirana grupa tretirana URB597 rastvorom

Stresirana grupa životinja oba pola je bila izložena hroničnom nepredvidivom stresu u trajanju od 6 nedelja. Tokom poslednje dve nedelje protokola, pacovima je intraperitonealno davan rastvor URB597 (0.3mg/kg/2x dnevno) ili rastvarač (1:1:18 rastvor DMSO, Twin 80 i fiziološkog rastvora). Telesna masa životinja je merena jednom nedeljno i doza URB597 je prilagođavana u skladu sa trenutnom masom životinje. Pred kraj eksperimentalne procedure, životinje su podvrgavane testovima ponašanja – testu prinudnog plivanja, testu izdignutog plus lavirinta i testu prepoznavanja novog objekta. Nakon završetka eksperimentalnog protokola, životinje su žrtvovane dekapitacijom uz pomoć giljotine (Harvard Apparatus, SAD). Hipokampus i mPFC su izolovani disekcijom, i čuvani na -80°C do korišćenja za dalje analize. Da bi se isključio mogući uticaj varijacije polnih hormona ženki u toku različitih faza estrusnog ciklusa, za dalje biohemijske analize su korišćene samo ženke koje su u trenutku dekapitacije bile u diestrusnoj ili metestrusnoj fazi ciklusa, odnosno u fazama za koje je karakteristična niža koncentracija estrogena. Estrusna faza je utvrđivana uzimanjem vaginalnog brisa i njegovim mikroskopskim ispitivanjem.



**Slika 12:** Šematski prikaz eksperimentalnog protokola

### **3.4. Hronični nepredvidivi stres (CUS)**

U toku eksperimentalnog protokola, životinje su svakog dana podvrgavane dejstvu dva različita stresora, u nasumičnom redosledu. Stresori su uključivali:

- boravak u kavezu sa mokrom podlogom tokom 6 sati;
- boravak u kavezu pod nagibom od 45 stepeni u trajanju od 6 sati;
- izlaganje niskoj ambijentalnoj temperaturi (+4°C) tokom 5 sati;
- oduzimanje hrane (uz dostupnu vodu) u trajanju od 18 sati;
- oduzimanje vode (uz dostupnu hranu) u trajanju od 5 sati;
- imobilizacija u trajanju od 60 min;
- izlaganje buci jačine 100 decibela tokom 60 min;
- izlaganje stroboskopskom svetlu frekvencije 10 Hz u trajanju od 12 sati tokom mračne faze;
- stres ograničenog kretanja u trajanju od 60 min;
- agregacija – boravak u kavezu sa još 7 drugih životinja tokom 5 sati;
- socijalna izolacija tokom 48 časova;
- prinudno trčanje na traci pri konstantnoj brzini od 10m/min u trajanju od 15 min;
- promena režima osvetljenja – zamena svetle i tamne faze u toku 48 sati.

Protokol CUS je dizajniran tako da se održi nepredvidiva priroda stresora kako bi se izbegla habituacija životinja na stres.

### **3.5. Testovi ponašanja**

Na kraju CUS eksperimentalnog protokola, pacovi su podvrgavani testovima ponašanja da bi se utvrdilo da li su hroničan nepredvidivi stres i URB597 izazvali promene u ponašanju životinja. Test prinudnog plivanja je korišćen da bi se utvrdilo prisustvo ponašanja sličnog depresivnom. Testom uzdignutog plus lavirinta je ispitivano ponašanje slično anksioznom, dok je test prepoznavanja novog objekta korišćen za praćenje promena u radnoj, kratkoročnoj i dugoročnoj memoriji.

### 3.5.1. Test prinudnog plivanja

Test prinudnog plivanja je test ponašanja koji su razvili Porsolt i saradnici sedamdesetih godina dvadesetog veka za predikciju kliničke efikasnosti lekova sa antidepresivnim dejstvom [355]. Zasniva se na opažanju da pacovi, kada su prinuđeni da plivaju u uslovima u kojima nemaju drugi način da pobegnu iz vode, nakon početne faze intenzivne aktivnosti usmerene na pokušaj bežanja (penjanja i plivanja), posle nekog vremena prestaju sa borbom i pokazuju pasivno, imobilno ponašanje. Imobilnost se u toj situaciji smatra beznadežnim ponašanjem, gde se životinja u potpunosti prepušta eksperimentalnim uslovima i to ponašanje odražava neuspeh u pokušaju bekstva od stresora ili odustajanje životinje od aktivnih načina da se nosi sa stresom. Test prinudnog plivanja je zbog svoje pouzdanosti, specifičnosti i lake primene jedan od najčešće korišćenih modela za ispitivanje antidepresivne aktivnosti lekova kod glodara [356].

Test prinudnog plivanja je izvođen ubacivanjem pacova u cilindrični rezervoar od pleksiglasa prečnika 24 cm i visine 35 cm, napunjen vodom temperature +23-25°C do visine od 20 cm. Pacovi su tako mogli da plivaju u cilindru, ali ne i da dodirnu dno šapama ili da izađu iz cilindra. Test je izvođen dva uzastopna dana. Prvog dana, radi navikavanja životinja, izvođen je preliminarni, odnosno pre-test, u okviru koga su životinje boravile po 15 minuta u vodi. Sledećeg dana, 24h nakon pre-testa, izvođen je test tokom koga su životinje provodile po 5 minuta u vodi i njihovo ponašanje je bilo snimano video kamerom. Sa snimaka je kvantifikovano koliko su vremena životinje ispoljavale jedan od dva oblika ponašanja:

- plivanje/penjanje – podrazumeva aktivno pokretanje prednjih šapa u centru ili duž zida cilindra
- imobilnost (plutanje) – životinja je u uspravnom položaju, sa minimalnim pokretima šapa neophodnim da zadrži glavu iznad vode.

Nekontrolisani refleksni pokreti tokom plutanja poput drhtanja ili trzaja glavom su tretirani kao imobilnost. Rezervoar cilindra je čišćen i voda je menjana nakon testiranja svake pojedinačne životinje.



**Slika 13:** Test prinudnog plivanja

### 3.5.2. Test otvorenog plus lavirinta

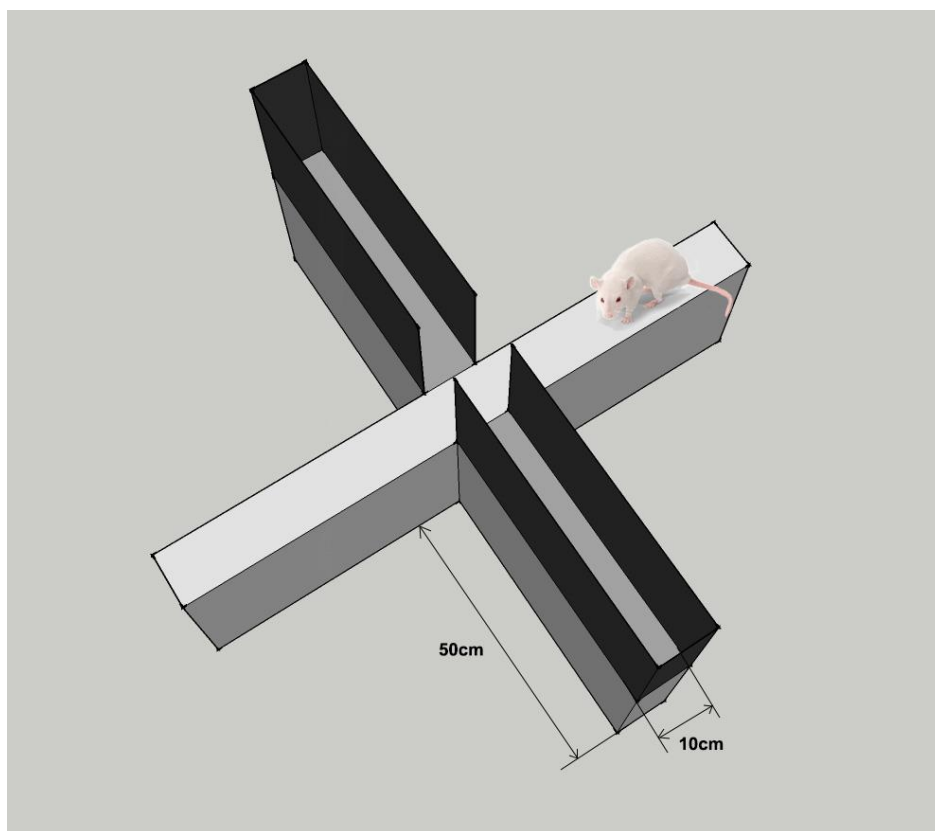
Test otvorenog plus lavirinta se koristi za merenje ponašanja sličnog anksioznom kod glodara. Uzdignuti plus lavirint se sastoji od četiri kraka dužine 50cm i širine 10cm postavljenih u obliku krsta. Dva suprotna kraka su zatvorena zidovima visine 15cm dok su druga dva otvorena. Ceo lavirint je uzdignut 50 cm od poda. Životinja se postavlja na centralnu platformu lavirinta, okrenuta prema zatvorenom kraku i ostavljena da slobodno istražuje lavirint tokom 5 minuta. Ponašanje se meri kamerom i kasnije se sa snimaka kvantifikuju sledeći parametri:

- ukupan broj ulazaka u zatvorene/otvorene krake lavirinta
- učestalost ulaženja u otvorene krake (broj ulazaka u otvorene krake/ukupan broj ulazaka u krake x 100)
- procenat vremena provedenog u otvorenim kracima (vreme provedeno u otvorenim kracima/ukupno vreme u otvorenim i zatvorenim kracima x 100)
- broj izdizanja na zadnje noge

Smatra se da je životinja ušla u novi krak kada je u njega kročila sa sve četiri šape. Aparatura je čišćena 10% etanolom i sušena papirnim ubrusima nakon testiranja svake pojedinačne životinje.

Ovaj test je baziran na prirodnoj sklonosti glodara da izbegavaju otvoreni prostor kao protivteži njihove prirodne znatiželje za istraživanjem novih prostora. U teoriji, životinje koje ispoljavaju manje anksiozno ponašanje će češće ulaziti u otvorene krake lavirinta. Vreme provedeno u zatvorenim delovima naspram vremena provedenog u otvorenim delovima lavirinta smatra se merom straha ili

ponašanja nalik anksioznom. Pod anksioznošću se generalno podrazumeva negativno emocionalno stanje povezano sa percepcijom pretnje, koga karakteriše osećanje brige zbog iščekivanja negativnog ishoda [357].



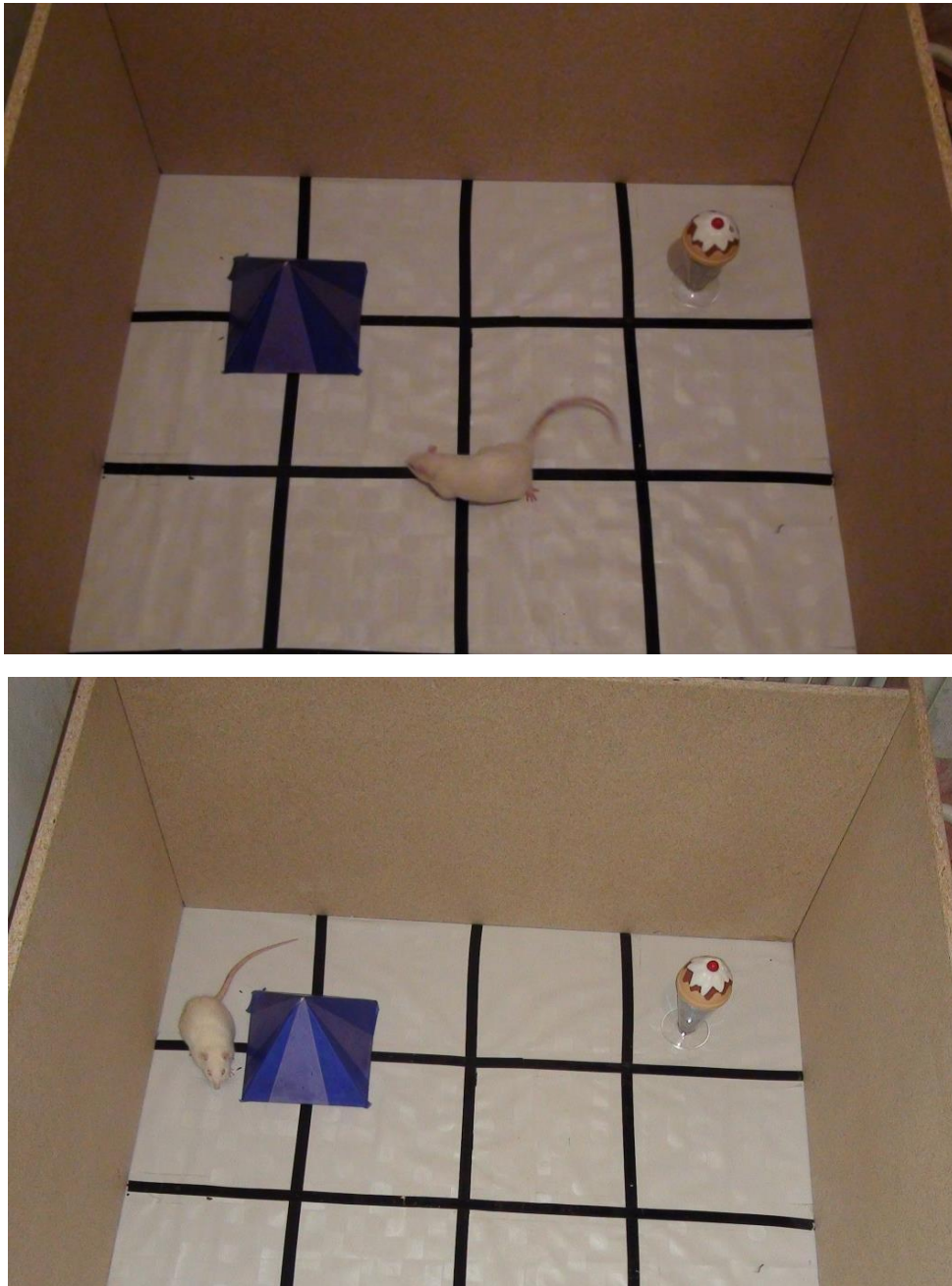
**Slika 14:** Šematski prikaz otvorenog plus lavirinta

### 3.5.3. Test prepoznavanja novog objekta

Test prepoznavanja novog objekta se koristi za ispitivanje različitih aspekata učenja i pamćenja kod pacova i miševa. Aparatura koja je korišćena u testu se sastoji od kvadratne otvorene arene (100 cm × 100 cm × 40 cm) i sistema za snimanje. Prvog dana životinje su ostavljane u praznoj areni tokom 15min, da bi mogle da se naviknu na nju (faza navikavanja). Sledećeg dana, životinjama su u areni prezentovana dva identična objekta koja su životinje mogle da istražuju tokom 10 minuta (faza učenja/treninga). Sam test se izvodio 5 minuta, 2 h ili 24 h nakon faze učenja, da bi se merila radna memorija, kratkoročna memorija i dugoročna memorija. U ovoj fazi, životinji su prezentovana dva objekta na istim pozicijama kao prilikom treninga: jedan objekat koji je korišćen prilikom faze učenja i drugi, nepoznati objekat. Objekti su brisani 10% alkoholom između testiranja na različitim

životinjama. Kvantifikovano je vreme koje su životinje provodile istražujući novi i poznati objekat, i za svaku životinju je izračunavan indeks prepoznavanja novog objekata (*novel object discrimination index*, NDI), kao vreme koje je životinja istraživala, po formuli:

NDI = vreme koje je životinja istraživala novi objekat/ukupno vreme provedeno u istraživanju oba objekta x 100.



**Slika 15:** Test prepoznavanja novog objekata



### **3.6. Određivanje koncentracije kateholamina u hipokampusu i medijalnom prefrontalnom korteksu ELISA metodom**

Koncentracija noradrenalina i dopamina u hipokampusu i mPFC je ispitivana korišćenjem komercijalno dostupnog ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kita LDN - 3 - CAT Research ELISA kit (kataloški broj: BAE -5600, Labor Diagnostic Nord GmbH & Co., Nemačka). Pre same ELISA metode, tkiva su homogenizovana u 0.01N HCL puferu koji sadrži 1mM EDTA i 4 mM natrijum metabisulfita u odnosu 1:10, nakon čega su centrifugirana 15 min na 10000 rpm. Alikvoti supernatanta su korišćeni za analizu. Imunoeseji su sprovedeni po uputstvima proizvođača. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini 450 nm, sa referentnom talasnom dužinom od 650 nm na aparatu Wallac, VICTOR2 1420 Multilabel counter (PerkinElmer, Turku, Finska). Koncentracija kateholamina je izražavana u  $\mu\text{g}$  po g tkivnog homogenata ( $\mu\text{g/g}$ ).

### **3.7. Određivanje koncentracije interleukina u mozgu ELISA metodom**

Koncentracije proinflamatornog interleukina-6 (IL-6) i antiinflamatornog interleukina-10 (IL-10) u medijalnom prefrontalnom korteksu i hipokampusu hronično stresiranih i kontrolnih pacova su određivane korišćenjem komercijalnih ELISA kitova (Rat IL-10 (interleukin10), Catalog no. E-EL-R0016, Elabscience, SAD; rat IL-6 (interleukin 6), Catalog no. E-EL-R0015, Elabscience, SAD). Tkiva su za analizu pripremana rastvaranjem u PBS puferu u odnosu 1:9 (masa tkiva (g) : zapremina pufera (ml)) i nakon toga homogenizovana. Eseji su rađeni u skladu sa uputstvima proizvođača. Apsorbanca je merena na 450 nm (Wallac, Victor2 1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Turku, Finska). Koncentracije interleukina su izražavane kao pg interleukina po ml tkivnog homogenata (pg/ml).

## **3.8. Western blot**

### **3.8.1. Izolacija ukupnih proteina**

Tkiva hipokampusa i medijalnog prefrontalnog korteksa su odmah nakon dekapitacije zamrzavana i čuvana na  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalje obrade. Prilikom izolacije proteina, tkiva su merena i homogenizovana u hladnom, komercijalno dostupnom RIPA puferu uz pomoć ručnog homogenizera (D-160, Cat. No 8014110000, brzina 8000-30000 r/min). Korišćeno je 3 ml pufera po gramu tkiva

(RIPA Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dalas, Teksas, SAD, sc-24948). Komercijalni RIPA pufer sadži:

- pufer za liziranje (pH 7.4 ±0.1)
- 200 mM rastvor fenilmetil sulfonila (PMSF) u dimetil sulfoksidu (DMSO)
- koktel proteaznih inhibitora
- rastvor natrijum ortovanadata

Uzorci su ostavljani da liziraju sat vremena na +4°C, nakon čega su centrifugirani 20 minuta na 12000 rpm. Supernatant je odlivan u nove epruvete i čuvan na -20°C do daljeg korišćenja.

### 3.8.2. Izolacija proteina citosola

Tkiva hipokampusa i mPFC su merena i homogenizovana u hladnom 1M Tris-HCl (pH 7.2) puferu koji je sadržao 87% glicerol, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, proteazne inhibitore (10 mM PMSF, 1 µg/µl leupeptin, 1 µg/µl aprotinin) i fosfatane inhibitore (20 mM natrijum fluorid, 20 mM natrijum ortovanadat). Ručni homogenizer D-160 (Cat. No 8014110000, brzina 8000-30 000 r/min) je korišćen za homogenizaciju uzoraka. Nakon toga, homogenizovani uzorci su centrifugirani 10 min na 2000g (+4°C). Supernatant je odlivan u nove tube i još još jednom centrifugiran 10 min na 15 000g (+4°C), nakon čega je centrifugiran na ultracentrifugi 1h na 105 000g. Finalni supernatant je korišćen kao citosolna frakcija. Čistoća frakcije je proveravana metodom Western blot korišćenjem anti-NBS1 antitela.

### 3.8.3. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija izolovanih proteina određivana je Larijevom metodom [358]. Ova metoda se može koristiti ukoliko su očekivane vrednosti koncentracija u opsegu od 1mg/ml - 10 mg/ml. Goveđi albumin iz seruma (eng. *bovine serum albumin* – BSA) je korišćen za pravljenje standardne krive, raspona koncentracija od 0,2 do 10 mg/ml. Sama metoda se zasniva na biuretskoj reakciji kupri (Cu<sup>2+</sup>) jona sa peptidnim vezama proteina u alkalnoj sredini i redukciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens) u reakciji sa proteinima tretiranim bakrom. Merenje koncentracije svakog uzorka je rađeno u duplikatu. Uzorci su razblaživani 100 puta, tj. rastvarano je 10 µl uzorka u 990 µl destilovane vode. U zavisnosti od očekivanih koncentracija proteina, uzorci su dalje razblaživani destilovanom vodom do 200-400x razblaženja, i 100 µl finalnog razblaženja je korišćeno za određivanje koncentracije. Pravljena su i razblaženja BSA u vodi, u koncentracijama 5, 10, 25, 50,

75, 100, 200, 400 i 800  $\mu\text{g/ml}$  u identičnoj zapremini, kao i radni rastvor koji je pravljen na sledeći način:

- mereno je 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i 0.4 g NaOH, i dopunjeno je destilovanom vodom do 100 ml
- 0,025 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  je rastvoreno u 5 ml destilovane vode
- 0,002 g kalijum natrijum tartarata je rastvoreno u 2 ml prethodnog rastvora (0,5%  $\text{CuSO}_4$ )
- 2 ml prethodnog rastvora je mešano sa 98ml rastvora  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i NaOH

Nakon toga je 100  $\mu\text{l}$  2% natrijum dodecil sulfata (SDS) dodavano u rastvore uzoraka i BSA, kao i u slepu probu, koja se sastojala od 100  $\mu\text{l}$  destilovane vode. Zatim je dodavano po 1ml radnog rastvora, i ta smeša je mešana na vorteksu i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije, u rastvor je dodavano 100  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu reagensa (Sigma-Aldrich, Nemačka) u vodenom rastvoru (1:2) i smeša je ponovo inkubirana 20 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 750nm na spektrofotometru s-30 (Boeco, Nemačka), nakon čega su izračunavane koncentracije.

### 3.8.4. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza

Rastvori proteina uzoraka su najpre razblaživani destilovanom vodom da bi se dobile identične koncentracije (1.5-3 mg/ml). Neposredno pred nalivanje na gel, mešani su sa denaturišućim puferom za pripremu uzoraka proteina za SDS-PAGE (Laemmli Sample Buffer : 200 mM Tris-HCl, pH 6,8; 42,5% glicerol; 25%  $\beta$ -merkaptotanol; 10% SDS; 0,05% bromfenol plavo) u odnosu 1:1. Nakon 5 minuta inkubacije na  $+100^\circ\text{C}$ , uzorci su ostavljani da se ohlade i onda nanošeni na SDS-poliakrilamidni gel. Poliakrilamidni gel čine gel za koncentrovanje i gel za razdvajanje, koji su pravljeni po sledećoj recepturi:

**Tabela 2:** Gel za koncentrovanje

Gel za koncentrovanje (4%):	
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 $\mu\text{l}$
30% akrilamid/N <sup>3</sup> N <sup>3</sup> -bis-metilenakrilamid	4 ml
10% APS	50 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$
destilovana voda	3,35 ml

**Tabela 3:** Gel za razdvajanje

Gel za razdvajanje (12%):	
0,5 M Tris (pH 6,8)	1,25 ml
10% SDS	50 $\mu$ l
30% akrilamid/N'N'-bis-metilenakrilamid	665 $\mu$ l
10% APS	25 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
destilovana voda	3,05 ml

Sama metoda se zasniva na korišćenju anjonskog deterdženta SDS koji denaturiše proteine obmotavajući se oko njihovih polipeptidnih veza. Negativno naelektrisanje SDS dovodi do međusobnog odbijanja i posledičnog razdvajanja proteinskih lanaca. Usled denaturacije, proteini putuju u električnom polju ka pozitivno naelektrisanom polu brzinom koja zavisi isključivo od njihove molekulske mase. Otpor koji pruža poliakrilamidni gel dovodi do toga da se proteini manje molekulske mase kreću kroz gel većom brzinom od proteina veće molekulske mase. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (eng. *SDS-PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis*) je izvođena na sistemu Mini Protean II (Bio Rad, Kalifornija, SAD). Uzorci su nanošeni na gel tako da je u svakom bunariću gela finalno bilo 45  $\mu$ g ukupnih proteina. Na svaki gel je nanošen i standrad poznatih molekulskih masa PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD) koji sadrži 9 obojenih proteina različitih molekulskih masa (10-170 kDA) zbog kasnijeg lokalizovanja ispitivanih proteina. Kao pufer za elektroforezu je korišćen rastvor koji je sadržao 0,25 M TRIS, 0,192 M glicin, 0,1% SDS i destilovanu vodu. Elektroforeza je trajala približno 120 minuta pri konstatnom naponu od 120V na sobnoj temperaturi.

#### **3.8.4. Transfer proteina sa poliakrilamidnog gela na membranu**

Nakon završetka elektroforeze, proteini su prebacivani sa gelova na PVDF (polivinilidenfluorid) membrane korišćenjem Trans-Blott Cell sistema za vlažni transfer (Bio Rad, Kalifornija, SAD). Membrane (Immobilon-P Transfer Membranes, kataloški broj IPVH00010, Merck Millipore Ltd., Irska) su prethodno isečene na adekvatne dimenzije i aktivirane potapanjem u 100% metanol u trajanju od 15 s, nakon čega su potapane 2 minuta u destilovanu vodu radi ispiranja. Pravljen je „sendvič“ koji se sastojao, redom, od sunđera, papira Whatman GB003 (Whatman Inc, Velika Britanija), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane, još jednog papira i još jednog sunđera.

Ovakav sendvič je stavljan u uređaj za transfer punjen puferom za transfer. Prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu vršen je preko noći pri konstantnoj amperaži od 20mA po gelu, na temperaturi od +4°C.

### 3.8.4. Imunodetekcija proteina

Uspešnost transfera je proveravana bojenjem 1% Ponceau S bojom (Ponceau S Solution, Sigma-Aldrich, SAD) koja je sa membrane ispirana vodom nakon potvrde uspešnog transfera (3 puta po 10 minuta). Membrane su blokirane sat vremena na sobnoj temperaturi 5% nemasnim mlekom u TBST puferu (50 mM TRIS HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween-20) ili 5% BSA u TBST puferu (u slučaju detekcije fosforilisanih formi proteina), uz blago mešanje, da bi se onemogućilo nespecifično vezivanje antitela. Membrane su potom, na osnovu standarda, sečene na određenim molekulskim masama u skladu sa proteinima koji se detektuju i inkubirane preko noći na +4°C sa odgovarajućim primarnim antitelima. Spisak korišćenih antitela je dat u Tabeli 4.

**Tabela 4:** Korišćena antitela i njihove specifikacije

Antitelo	Proizvođač	Kataloški broj	Razblaženje
<b>TH</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc374048	1: 1000
<b>DBH</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-47707	1:250
<b>DAT</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-32258	1: 1000
<b>NET</b>	Abcam, Velika Britanija	ab41559	1: 2000
<b>COMT</b>	Abcam, Velika Britanija	ab 126618	1: 5000
<b>MAO-A</b>	Abcam, Velika Britanija	ab126751	1: 2000

<b>β-aktin</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-47778	1:5000
<b>β<sub>2</sub>-receptor</b>	Abcam, Velika Britanija	ab182136	1:1000
<b>D1-receptor</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-33660	1:1000
<b>D2-receptor</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-5303	1:1000
<b>IL-1β</b>	Abcam, Velika Britanija	ab9722	1:1000
<b>Akt1/2/3</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-8143434	1:1000
<b>p-Akt1/2/3</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-514032	1:1000
<b>ERK1 + ERK2</b>	Abcam, Velika Britanija	ab184699	1:10000
<b>p-ERK1 + p-ERK2</b>	Abcam, Velika Britanija	ab201015	1:10000
<b>p38α</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-271120	1:1000
<b>p-p38α</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-166182	1:1000
<b>Sekundarno mišje poliklonsko antitelo</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2005	1:5000
<b>Sekundarno zečje poliklonsko antitelo</b>	Abcam, Velika Britanija	ab6721	1:10 000

Nakon inkubacije sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST puferu, inkubirane sat vremena uz mešanje na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim anti-mišjim ili anti-zečjim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (Goat Anti- Rabbit IgG HRP, Abcam, Velika Britanija, ab 6721, Goat Anti-Mouse IgG HRP, Abcam, Velika Britanija, ab 6789), i potom još jednom ispirane u TBST puferu. Detekcija proteina od interesa je vršena u mračnoj sobi metodom hemiluminiscence uz korišćenje lampe Darkroom Safe Light (Paterson Photographic Ltd, Velika Britanija). Na membrane je nanošen luminol i rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu 1:1 (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate, Fisher Scientific, Masačusets, SAD). U prisustvu peroksidaze rena i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi do oksidacije luminola i oslobađanja svetlosne energije koja je detektovana pomoću filma (Amersham Hyperfilm™ ECL, Cytiva Sweden AB, Upsala, Švedska) u kaseti za detekciju (Amersham Life Science, SAD).

Prilikom određivanja fosforilacionog statusa proteina, membrane su prvo inkubirane preko noći sa antitelima za odgovarajući fosforilisani protein. Signali su detektovani narednog dana i membrane su onda stripovane u striping puferu *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific, SAD). Nakon ispiranja vodom i TBST puferom (3 puta po 15 minuta), blokirane su ponovo i inkubirane sa odgovarajućim antitelom za detekciju ukupne količine proteina istog tipa (fosforilisane i nefosforilisane forme). Stripovanje se koristilo i u drugim slučajevima za detekciju drugog željenog proteina sa iste membrane.

Intenzitet signala je kvantifikovan denzitometrijski korišćenjem programa ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) sa skeniranih filmova. Intenzitet svake trake je određivan relativno u odnosu na intenzitet trake β-aktina (razblaženje 1:5000, kataloški broj sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, SAD) ili β-tubulina (razblaženje 1:1000, kataloški broj sc-5274, Santa Cruz Biotechnology, SAD) identičnog uzorka sa istog gela. Rezultati su izražavani kao procenat odgovarajuće kontrole.

### 3.9. Statističke analize rezultata

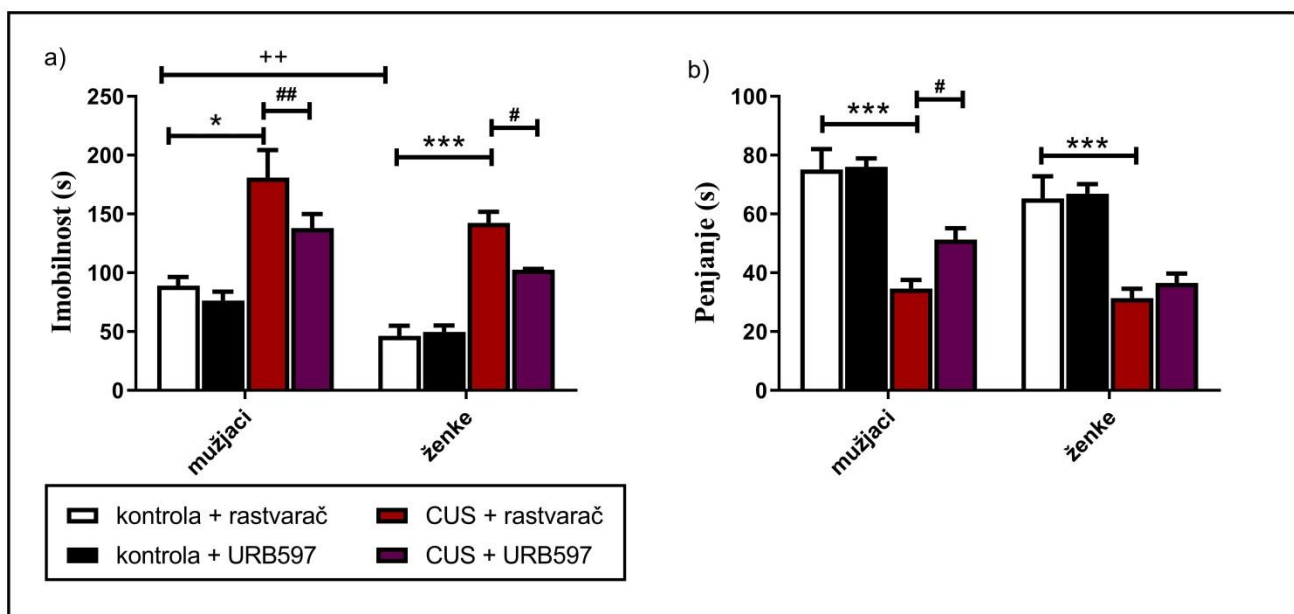
Statističke analize rezultata u ovom istraživanju rađene su korišćenjem programa Origin software, version 9 (Jandel Corporation, SAD) i Statistica, version 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Analiza varijansi sa tri faktora (eng. *three-way ANOVA*) je korišćena da bi se utvrdilo postojanje interakcija između faktora pola, stresa i tretmana URB597. Ukoliko je postojao statistički značajan uticaj tri glavna faktora ili njihove interakcije, analiza varijansi sa dva faktora (eng. *two-way ANOVA*) je rađena nakon podele rezultata po polovima. Razlike između eksperimentalnih grupa analizirane su pomoću Tuckey *post hoc* testa sa graničnom vrednošću statističke značajnosti  $p < 0,05$ . Rezultati u ovom radu su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška srednje vrednosti.

## 4. Rezultati

### 4.1. Uticaj URB597 na ponašanje pacova oba pola izlaganih CUS

#### 4.1.1. Test prinudnog plivanja

Test prinudnog plivanja korišćen je da bi se potvrdilo da životinje izložene hroničnom nepredvidivom stresu pokazuju znake ponašanja sličnog depresivnom, kao i da bi se ispitalo antidepressivno dejstvo tretmana URB597. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 16.



**Slika 16:** Uticaj URB597 na a) vreme provedeno u imobilnosti; b) vreme provedeno u penjanju prilikom testa prinudnog plivanja kod pacova oba pola izloženih CUS. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ .

Analiza dobijenih rezultata trofaktorskim ANOVA statističkim testom je pokazalo da su stres i pol, kao i interakcija između stresa i tretmana faktori koji imaju značajan efekat na imobilnost životinje tokom prinudnog plivanja. Nestresirane životinje muškog pola pokazale su 48% duže vreme imobilnosti od kontrolnih ženki. Izlaganje hroničnom nepredvidivom stresu je dovelo da značajnog povećanja vremena imobilnosti tokom testa kod životinja oba pola (mužjaci 104%,  $p < 0,05$ , ženke 207%,  $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrole. URB597 je imao pozitivan efekat na životinje izložene stresu, smanjivši vreme imobilnosti kod mužjaka (24%,  $p < 0,01$ ) i kod ženki (28%,  $p < 0,05$ ). Osim toga, stres je doveo do skraćenja vremena koje su životinje tokom testa provele u penjanju (mužjaci: 54%,

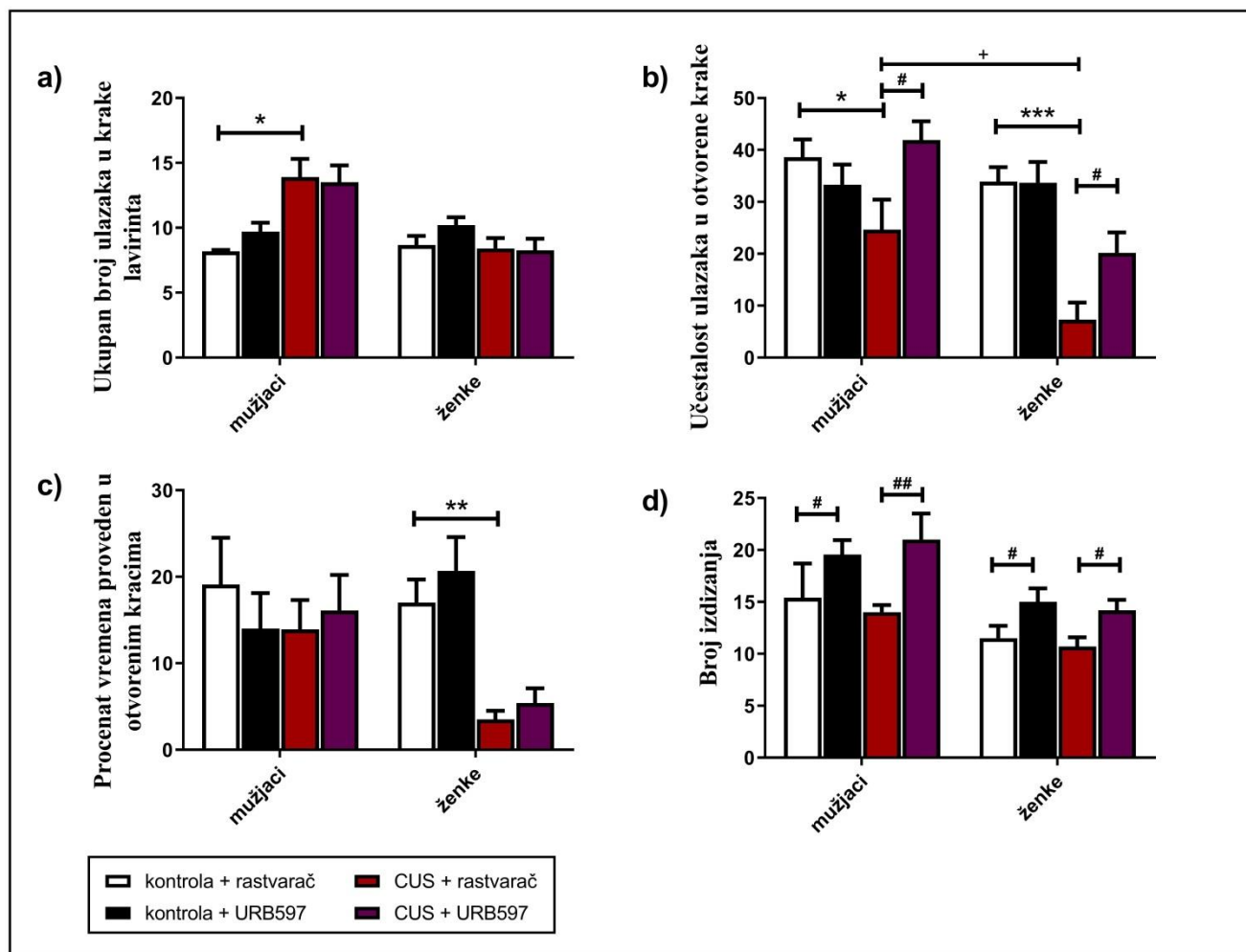


$p < 0,001$ ; ženke 52%,  $p < 0,001$ ). Na kraju, tretman sa URB597 je doveo do produženja vremena provedenog u penjanju samo kod stresiranih mužjaka (48%,  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Test otvorenog plus lavirinta

Test otvorenog plus lavirinta je korišćen da bi se pratio uticaj hroničnog stresa na razvoj ponašanja nalik anksioznom, kao i tretmana URB597 na njegovo ublažavanje. Test prati lokomotornu i istraživačku aktivnost životinja, preko parametara koji mere ukupan broj ulazaka životinje u krak lavirinta, izdizanje životinja na zadnje ekstremitete, učestalost ulazaka životinje u otvorene krake i procenat vremena provedenog u otvorenim kracima lavirinta.

Rezultati testa otvorenog plus lavirinta su prikazani na Slici 17. Ukupni broj ulazaka životinje u otvorene i zatvorene krake lavirinta, koji predstavlja meru spontane lokomotorne aktivnosti, bio je povećan za 46% kod mužjaka izloženih stresu ( $p < 0,05$ ), dok stres nije pokazao statistički značajan efekat na lokomociju ženki.



**Slika 17:** Uticaj URB597 na ponašanje pacova oba pola izloženih CUS na otvorenom plus lavirintu. Praćeni parametri uključuju: a) ukupan broj ulazaka u zatvorene i otvorene krake lavirinta (ukupnu lokomociju), b) učestalost ulazaka u otvorene krake lavirinta, c) procenat vremena provedenog u otvorenim kracima, d) broj izdizanja na zadnje ekstremitete. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

Trofaktorska ANOVA analiza je pokazala da su stres i interakcija između stresa i pola životinje značajno uticali na učestalost kojom životinja ulazi u otvorene krake plus lavirinta (Slika 17, b). Pacovi oba pola izloženi CUS su pokazali značajno manju učestalost ulazaka u otvorene krake lavirinta u poređenju sa nestresiranim životinjama (mušjaci: 36%  $p < 0,05$ , ženke: 78%  $p < 0,001$ ). *Post hoc* analiza je pokazala da je ovo smanjenje značajno veće kod ženki ( $p < 0,05$ ). Tretman FAAH inhibitorom, URB597, je pozitivno uticao na ponašanje nali anksioznom životinja oba pola, s obzirom na to da je povećao učestalost ulazaka stresiranih životinja u otvorene krake lavirinta za 70% ( $p < 0,05$ ) kod mužjaka i za 175% ( $p < 0,05$ ) kod ženki u odnosu na stresirane životinje koje su primale samo rastvarač.

Stres i tretman nisu značajno uticali na vreme koje su mužjaci proveli u otvorenim kracima lavirinta (Slika 13, c). Sa druge strane, stresirane ženke su provele značajno manji procenat vremena u otvorenim kracima plus lavirinta u odnosu na kontrolne ženke (80%,  $p < 0,01$ ), dok URB597 nije imao nikakav statistički relevantan efekat na ovaj parametar.

Inhibicija FAAH je povećala broj izdizanja mužjaka na zadnje ekstremitete (tretirane kontrole 41%,  $p < 0,05$ ; stresirane životinje 51%,  $p < 0,01$ ) i ženki (kontrole 30%,  $p < 0,05$ ; stresirane životinje 33%,  $p < 0,05$ ), nezavisno od toga da li su životinje bile izložene stresu (Slika 17, d).

#### 4.1.3. Test prepoznavanja novog objekta

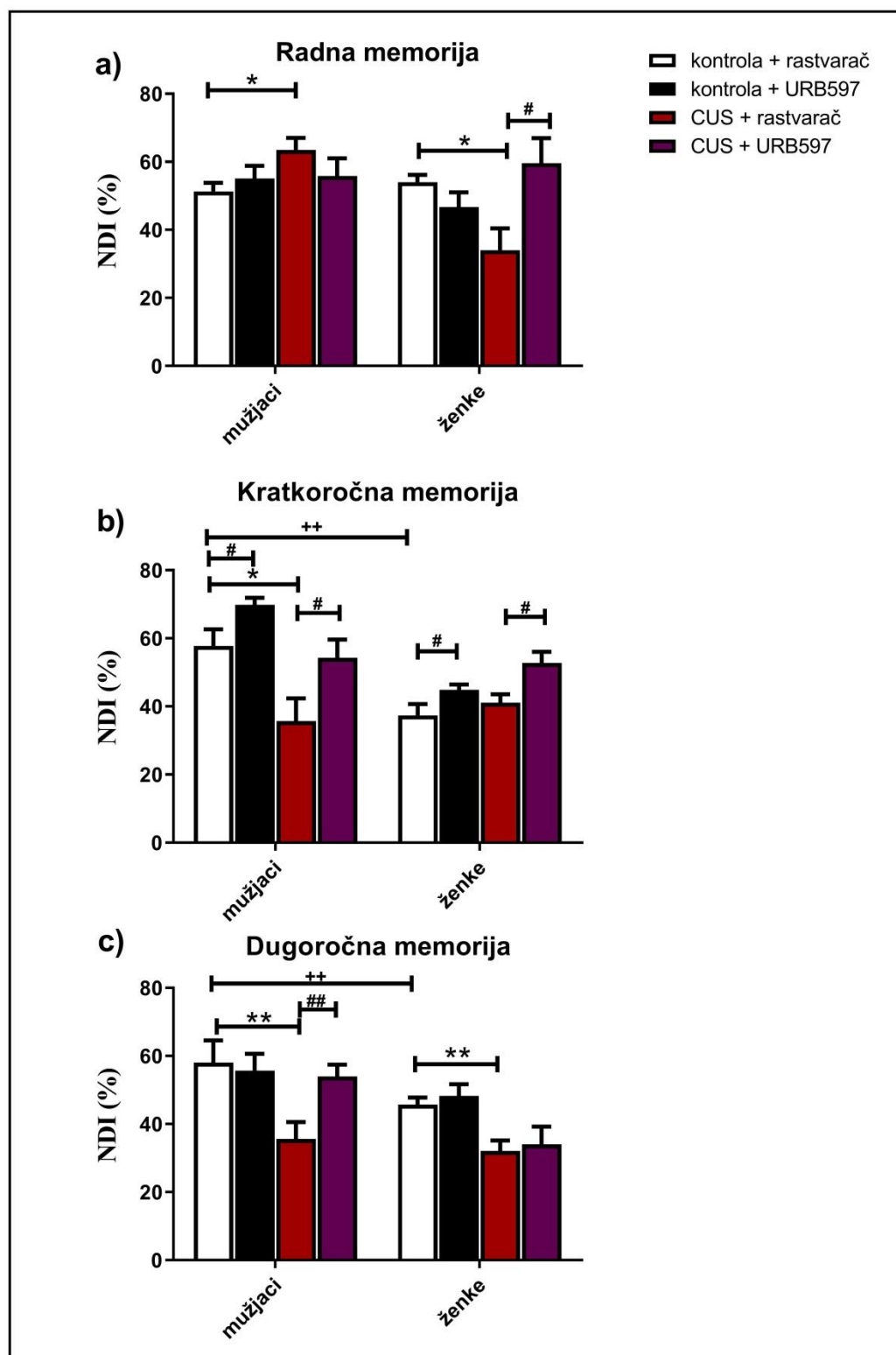
Rezultati testa prepoznavanja novog objekta su prikazani na Slici 18. Radna, kratkoročna i dugoročna memorija pacova testirane su redom 5 minuta, 2h i 24h nakon faze učenja. Nestresirani mužjaci pacova su ispoljili bolje prepoznavanje novog objekta u poređenju sa ženkama kada su testirani 2h i 24h nakon faze učenja (za 35 %,  $p < 0,01$  i za 16 %  $p < 0,01$  viši NDI), dok nije bilo značajne razlike u prepoznavanju novog objekta kada su životinje testirane nakon 5 minuta.

Trofaktorski ANOVA statistički test je pokazao značajne efekte pola na performanse radne memorije, kao i efekat interakcije stresa, pola i tretmana. Kada je test rađen 5 minuta nakon faze učenja, stresirane životinje muškog pola su imale 21% veći NDI ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolne životinje koje nisu bile izložene stresu, dok je NDI kod ženki za iste te eksperimentalne grupe bio smanjen za 37% ( $p < 0,05$ ). Tretman sa URB597 je poboljšao radnu memoriju kod stresiranih životinja ženskog pola (74,94% povećan NDI,  $p < 0,05$ ).

Testiranjem kratkoročne memorije, 2h nakon faze učenja, mužjaci izloženi CUS su pokazali 38,21% niži NDI u poređenju sa kontrolnim mužjacima ( $p < 0,05$ ), dok stres nije uticao na NDI kod

ženki. URB597 je uticao na bolje prepoznavanje novog objekta i kod kontrolnih i kod CUS životinja oba pola (mužjaci: 20,7%,  $p < 0,05$  i 52%,  $p < 0,05$ , ženke 20%,  $p < 0,05$ ; 28%,  $p < 0,05$  za kontrolne i CUS životinje, tim redosledom).

Stres je smanjio prepoznavanje novog objekta kod oba pola 24h nakon faze učenja (mužjaci 35%,  $p < 0,01$ , ženke 25%,  $p < 0,01$ ), dok je tretman URB597 popravio NDI kod stresiranih mužjaka (51%,  $p < 0,01$ ), ali ne i kod ženki.



**Slika 18:** Uticaj URB597 na a) radnu memoriju; b) kratkoročnu memoriju; c) dugoročnu memoriju pacova oba pola izloženih CUS. NDI – *novel object discrimination index*. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

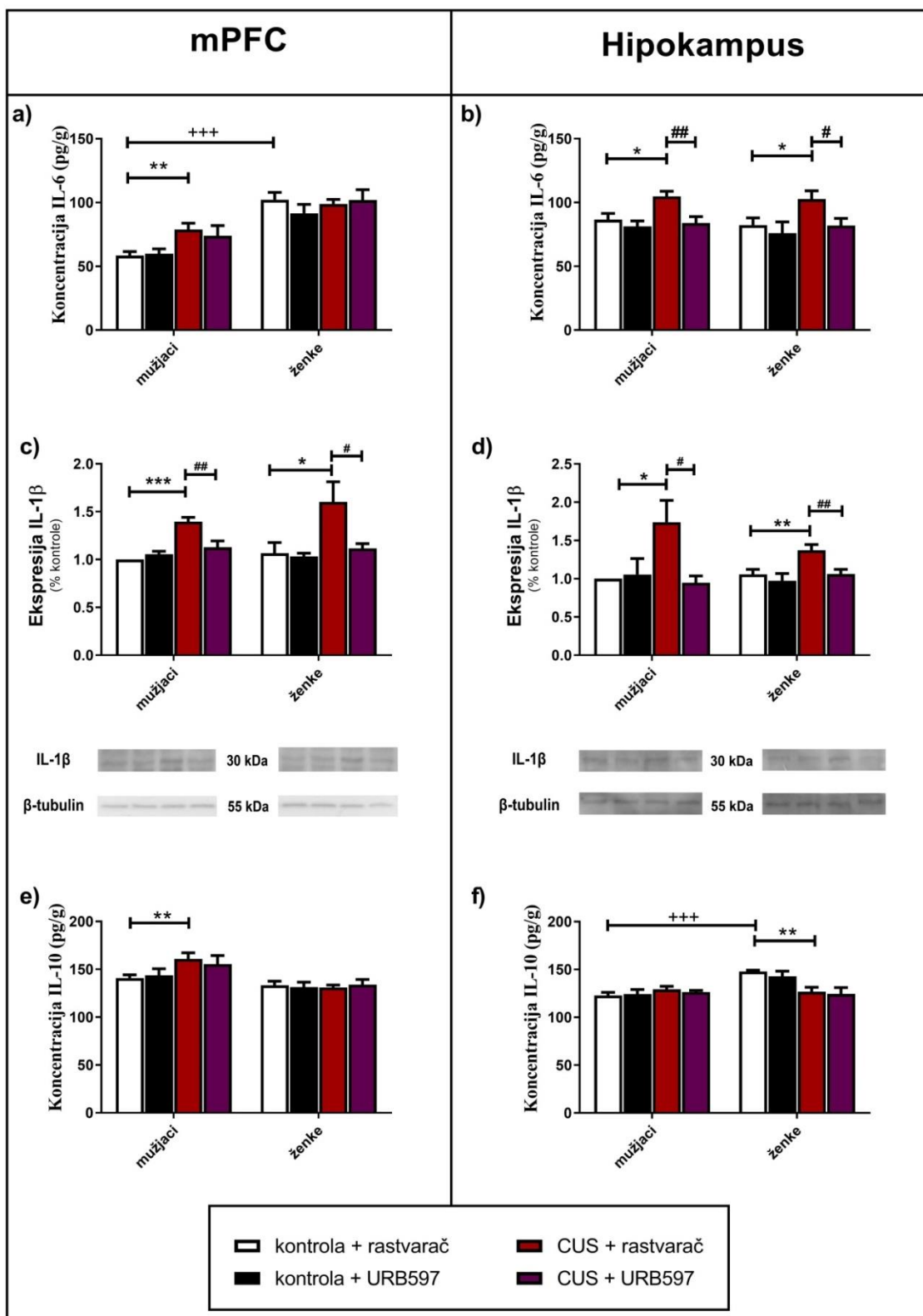
#### **4.2. Uticaj URB597 na nivo proinlamatornih citokina IL-1 $\beta$ i IL-6 i antiinlamatornog citokina IL-10 u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS**

Stres i pol su bili faktori koji su značajno uticali na nivo IL-6 u mPFC, kako je pokazala trofaktorska ANOVA (Slika 19). Nestresirane ženke su imale 75% veći bazalni nivo IL-6 u mPFC u poređenju sa nestresiranim životinjama muškog pola ( $p < 0,001$ ). Nakon izlaganja hroničnom stresu, samo je kod mužjaka došlo do povećanja nivoa IL-6 u prefrontalnom korteksu (35%,  $p < 0,01$ ). Stres i tretman FAAH inhibitrom nije značajno uticao na količinu IL-6 u mPFC ženki.

Hronični nepredvidivi stres je takođe doveo do značajnog povećanja nivoa IL-6 u hipokampusu mužjaka – Slika 19, b (21%,  $p < 0,05$ ) i ženki (25%,  $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrole, dok kod stresiranih životinja oba pola tretiranih sa URB597 nije primećena promena nivoa IL-6 u odnosu na kontrolni nivo, odnosno došlo je do smanjenja koncentracije IL-6 kada ove životinje poredimo sa stresiranim životinjama koje su primale samo rastvara; (mužjaci  $p < 0,01$ , ženke  $p < 0,05$ ).

Trofaktorska ANOVA je pokazala značajne efekte stresa, tretmana, kao i interakcije između stresa i tretmana na nivo ekspresije IL-1 $\beta$  u mPFC i hipokampusu eksperimentalnih životinja (Slika 19, c i d). Izlaganje hroničnom stresu dovelo je do povećanja nivoa IL-1 $\beta$  u obe proučavane strukture mozga (73.95% u mPFC mužjaka,  $p < 0,001$ , 29.7% u mPFC ženki,  $p < 0,05$ ; 39.55% u hipokampusu mužjaka,  $p < 0,05$ , 50.28% u hipokampusu ženki,  $p < 0,05$ ) u poređenju sa kontrolom koja je primila samo rastvarač. Stresirane životinje koje su primale URB597 su imale smanjen nivo IL-1 $\beta$  u obe ispitivane strukture u poređenju sa CUS životinjama koje nisu primale tretman (mPFC: 19.16% mužjaci,  $p < 0,01$ , 30.42% ženke,  $p < 0,05$ , hipokampus: 45.6% mužjaci,  $p < 0,05$ , 22.7% ženke  $p < 0,01$ ).

Trofaktorska analiza varijansi je pokazala statistički značajne efekte stresa i interakcije između stresa i pola na količinu IL-10 u oba proučavana regiona mozga (Slika 19, e i f). Nestresirane životinje ženskog pola su imale 20% veći bazalni nivo IL-10 u hipokampusu u odnosu na mužjake ( $p < 0,001$ ). Životinje muškog pola koje su bile izložene CUS su imale 23% više IL-10 u mPFC u odnosu na nestresirane mužjake ( $p < 0,01$ ), dok stres nije uticao na količinu IL-10 u mPFC ženki. Nivo IL-10 u hipokampusu mužjaka ostao je nepromenjen nakon izlaganja stresu. Nasuprot tome, nivo IL-10 kod ženki je bio za 14% smanjen nakon šest nedelja hroničnog stresa ( $p < 0,01$ ). Tretman FAAH inhibitorom, URB597, nije imao statistički značajan efekat na nivo IL-10 kod pacova oba pola ni u jednom od ova dva regiona mozga.



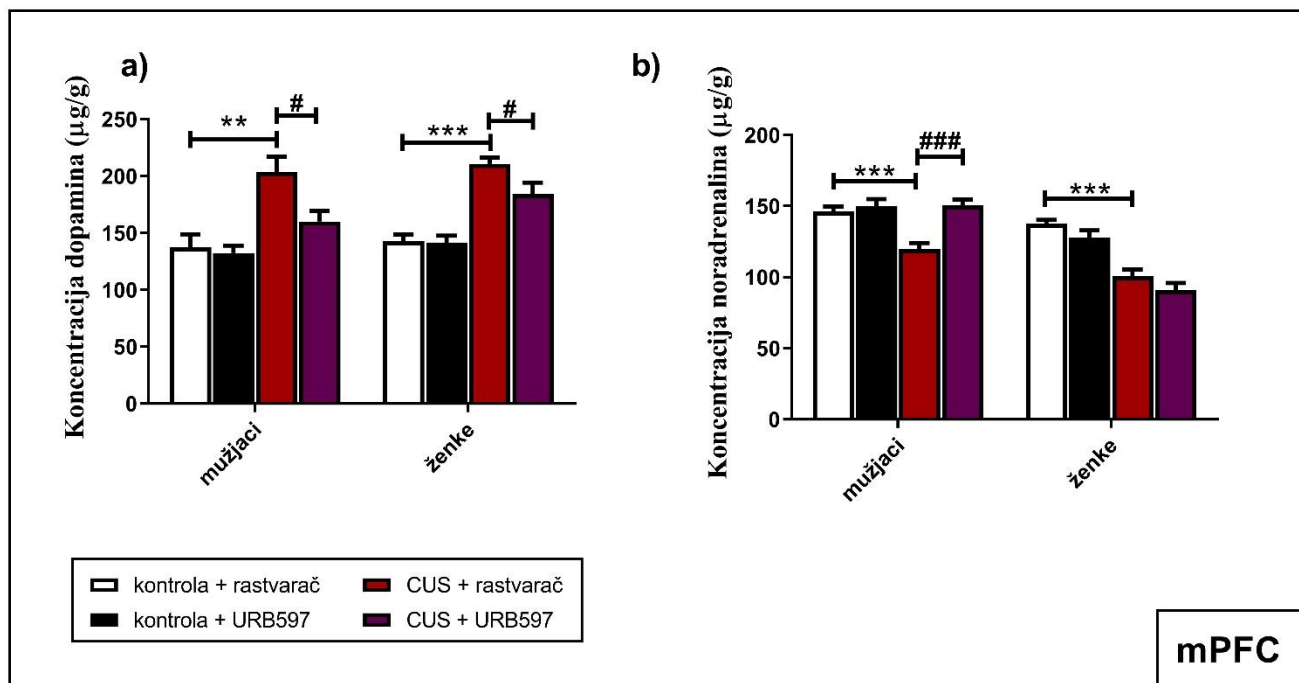
**Slika 19:** Uticaj URB597 na nivo citokina u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS: a) koncentracija IL-6 u mPFC; b) koncentracija IL-6 u hipokampusu; c) ekspresija IL-1β u mPFC; d) ekspresija IL-1β u hipokampusu; e) koncentracija IL-10 u mPFC; f) koncentracija IL-10 u hipokampusu. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod

odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

### 4.3. Uticaj URB597 na nivo kateholamina, ekspresiju enzima njihove sinteze, razgradnje i receptora u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS

#### 4.3.1. Uticaj URB597 na koncentraciju kateholamina u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS

Na Slici 20 su prikazani rezultati hroničnog izlaganja CUS i dvonedelnog tretmana URB597 na nivo dopamina (a) i noradrenalina (b) u mPFC mužjaka i ženki pacova. Trofaktorska ANOVA je pokazala da je nivo dopamina u mPFC bio pod značajnim uticajem stresa i tretmana, kao i interakcije ta dva faktora. Nivo dopamina je u mPFC stresiranih životinja oba pola bio značajno veći u odnosu na nivo kod nestresiranih kontrola (mužjaci: 48%,  $p < 0,01$ ; ženke: 48%,  $p < 0,001$ ). Nivo dopamina kod stresiranih životinja koje su dve nedelje primale URB597, bio je bio niži za 35% kod mužjaka ( $p < 0,05$ ) i za 33% kod ženki ( $p < 0,05$ ) u odnosu na stresirane životinje kojima je davan samo rastvarač.

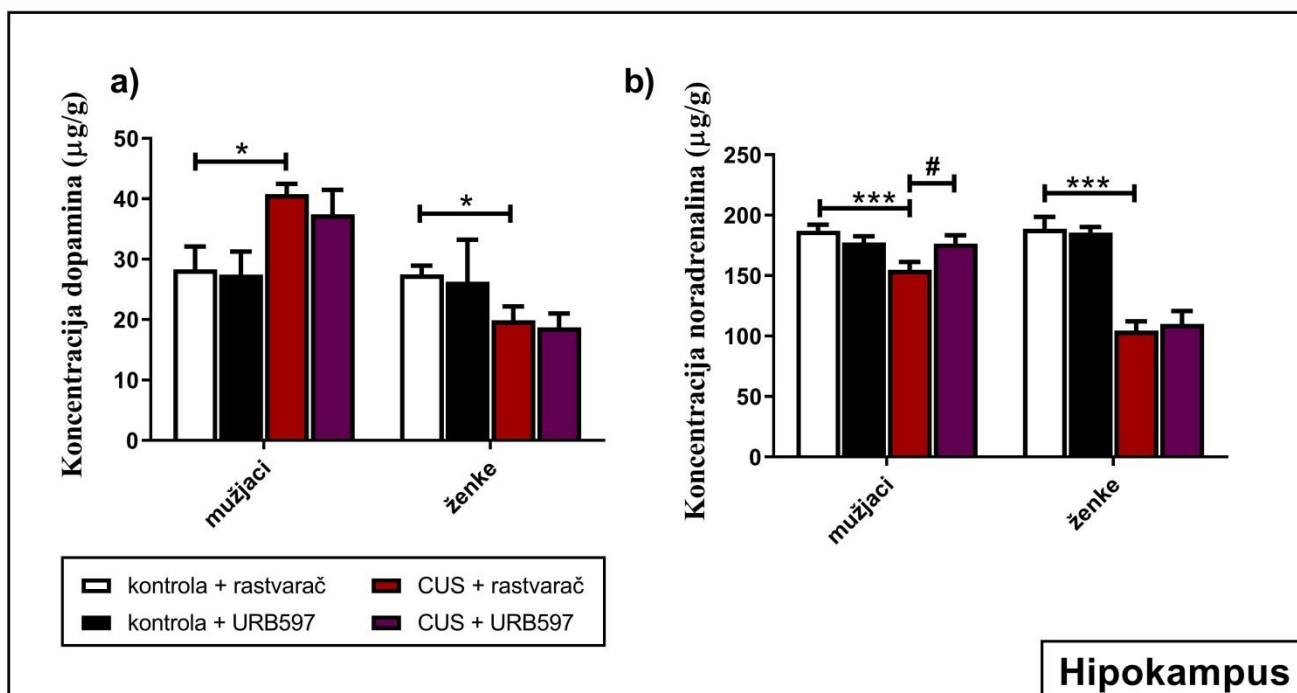


**Slika 20:** Uticaj URB597 na koncentraciju a) dopamina; b) noradrenalina u mPFC pacova oba pola izlaganih CUS. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

Dobijeni rezultati ispitivanja količine noradrenalina u mPFC pokazuju značajan efekat stresa, pola i tretmana u ovom regionu mozga. Pod uticajem hroničnog nepredvidivog stresa došlo je do smanjenja nivoa noradrenalina u mPFC kod mužjaka (18%,  $p < 0,001$ ) i kod ženki (27%,  $p < 0,001$ ) u poređenju sa kontrolom koja je primala samo rastvarač. Statistička analiza je pokazala da je interakcija između tretmana URB597 i stresa značajno uticala na koncentraciju noradrenalina u mPFC. Inhibicija FAAH je imala pozitivan efekat samo na stresirane mužjake povećavši nivo noradrenalina za 25% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na stresirane životinje tretirane rastvaračem.

Na Slici 21 prikazana je promena koncentracije dopamina (a) i noradrenalina (b) u hipokampusu životinja oba pola izloženih CUS i tretiranih URB597. Trofaktorska ANOVA analiza je pokazala značajan efekat pola i interakcije između pola i stresa na količinu dopamina u hipokampusu. Nivo dopamina u hipokampusu stresiranih mužjaka je bio za 44% veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrole, dok je kod stresiranih ženki došlo do značajnog smanjenja nivoa dopamina (28%,  $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrole.

Stres i pol, kao i njihova interakcija su predstavljali značajne faktore koji su uticali na nivo noradrenalina u hipokampusu. Slično kao i u mPFC, hronično stresirane životinje oba pola su imale snižen nivo ovog neurotransmitera u hipokampusu (mužjaci 19%,  $p < 0,001$ , ženke 45%,  $p < 0,001$ ). Tretman stresiranih životinja sa URB597 je kod mužjaka doveo do povećanja nivoa noradrenalina za 25% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na stresirane životinje koje su dobijale rastvarač, dok kod ženki iz odgovarajućih grupa nije uticao na nivo noradrenalina u hipokampusu.

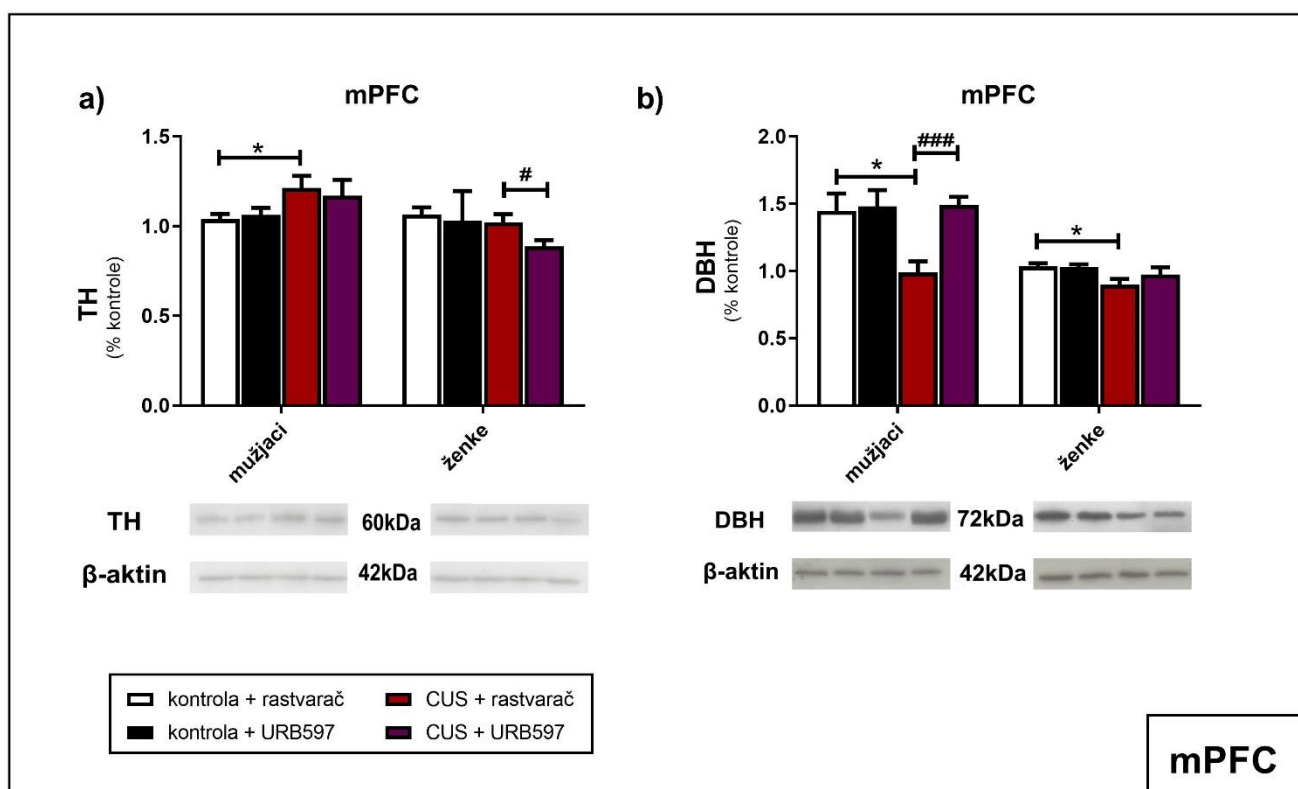


**Slika 21:** Uticaj URB597 na koncentraciju a) dopamina; b) noradrenalina u hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.01$ ; efekat pola: +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$ .

#### 4.3.2. Uticaj URB597 na ekspresiju enzima sinteze kateholamina u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS

Na Slici 22 su prikazane promene u relativnoj količini enzima biosinteze kateholamina u mPFC. Trofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat pola i interakcije između stresa i pola na količinu TH u mPFC. Nivo ekspresije TH je bio za 17% veći ( $p < 0,05$ ) u mPFC mužjaka nakon izlaganja hroničnom stresu, dok stres nije uticao na količinu ovog enzima kod ženki. Tretman URB597 inhibitorom je doveo do smanjenja količine TH u mPFC stresiranih ženki ( $p < 0,05$ ) u odnosu na stresirane ženke koje su primale rastvarač, dok nije imao značajan efekat na njegovu ekspresiju kod stresiranih mužjaka.

Nakon šest nedelja hroničnog stresa, ekspresija DBH u mPFC bila je smanjena za 32% kod mužjaka pacova ( $p < 0,05$ ) i za 13% kod ženki ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu. Tretman sa URB597 je uticao samo na stresirane mužjake, povećavši nivo DBH za 51% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na stresirane životinje koje su primale samo rastvarač.

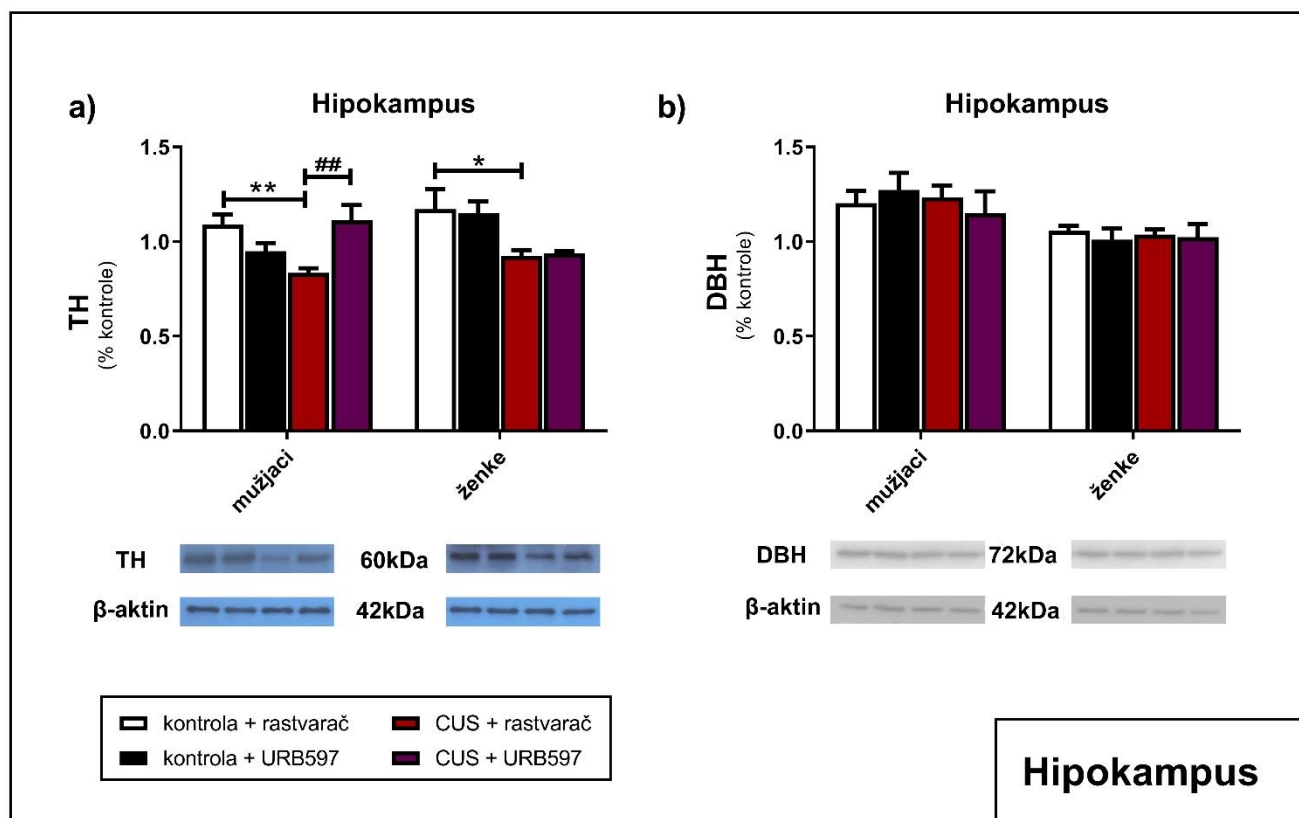




**Slika 22:** Uticaj URB597 na ekspresiju a) tirozin hidroksilaze; b) dopamin-beta hidroksilaze u mPFC pacova oba pola izlaganih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

Na Slici 23 prikazan je efekat izlaganja hroničnom stresu i tretmana URB597 na ekspresiju: TH (a) i DBH (b) u hipokampusu pacova oba pola. Stres je značajno smanjio ekspresiju TH kod mužjaka (23%,  $p < 0,01$ ) i kod ženki (21%,  $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu. Aplikacija URB597 povećala je nivo ekspresije TH kod mužjaka izloženih CUS u odnosu na stresirane životinje kojima je aplikovan rastvarač (33%,  $p < 0,01$ ), ali nije imala efekat na ženke.

Analiza ekspresije DBH enzima nakon izlaganja hroničnom stresu i tretiranja URB597 inhibitorom nije pokazala nikakve značajne razlike u ovoj strukturi mozga.

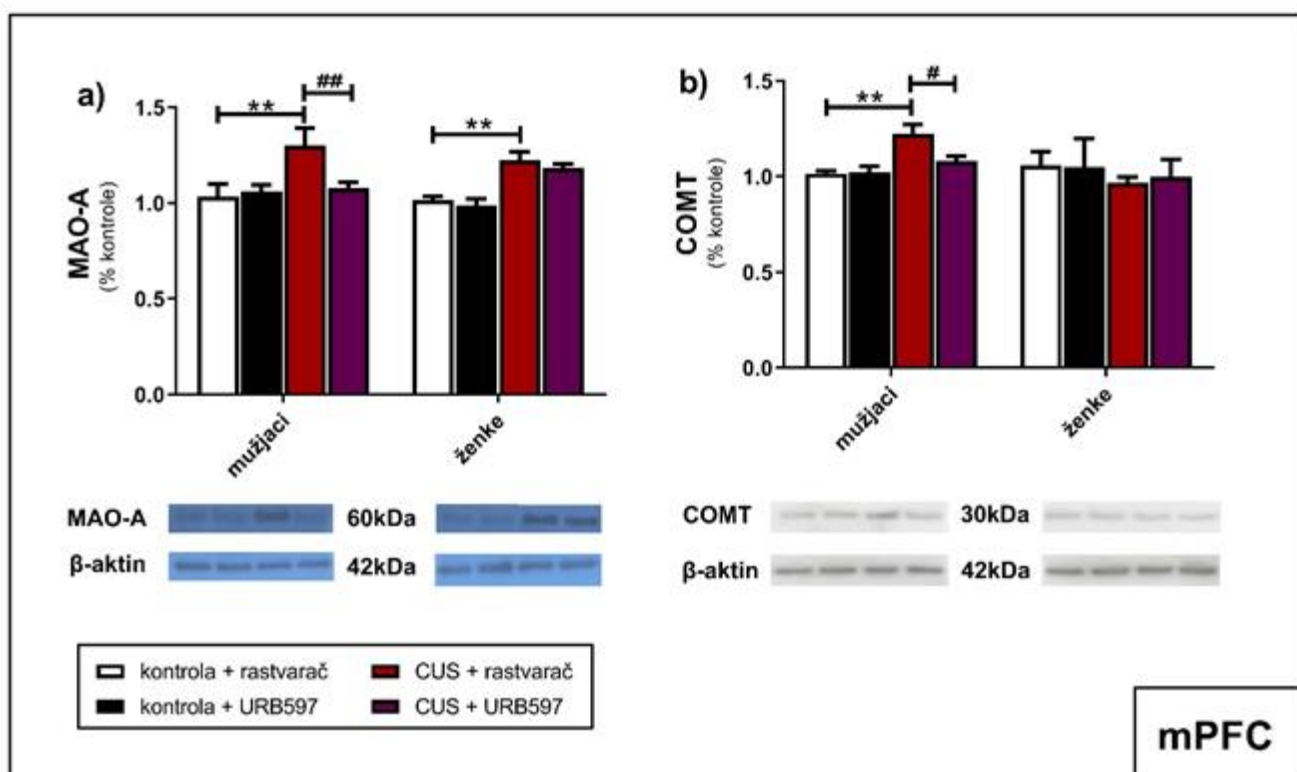


**Slika 23:** Uticaj URB597 na ekspresiju a) tirozin hidroksilaze; b) dopamin-beta hidroksilaze u hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

### 4.3.3. Uticaj URB597 na ekspresiju enzima razgradnje kateholamina u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS

Ekspresija enzima MAO-A (a) i COMT (b) u mPFC pacova oba pola pod uticajem hroničnog stresa i URB597 prikazana je na Slici 24. Statističkom analizom rezultata pokazan je značajan efekat stresa, tretmana i interakcije između stresa, tretmana i pola na ekspresiju enzima MAO-A. Pacovi oba pola izloženi hroničnom stresu imali su veće nivoe ekspresije MAO-A u mPFC u poređenju sa nestresiranim kontrolnim pacovima (mužjaci 26%,  $p < 0,01$ , ženke 21%,  $p < 0,01$ ). Tretman URB597 je snizio nivoe ekspresije MAO-A za 22% ( $p < 0,01$ ) samo kod stresiranih mužjaka.

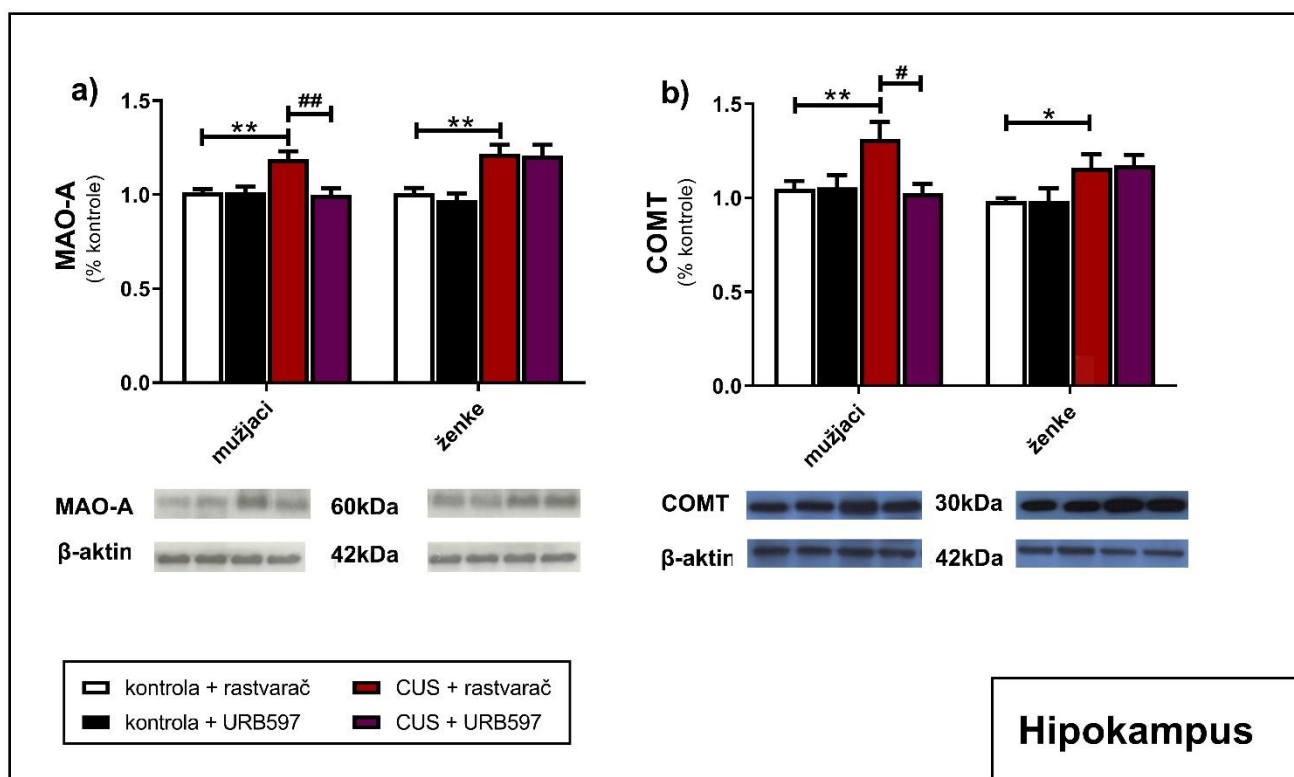
Hronični nepredvidivi stres je povećao nivo ekspresije COMT u prefrontalnom korteksu mužjaka za 20% ( $p < 0,01$ ) u poređenju sa nestresiranim životinjama. Dvonedeljni tretman URB597 doveo je do smanjenja ekspresije ovog enzima degradacije kateholamina (11%,  $p < 0,05$ ) u mPFC, u poređenju sa stresiranim životinjama koje su dobijale rastvarač. Hroničan stres i URB597 nisu imali uticaj na nivo ekspresije COMT u hipokampusu životinja ženskog pola.



**Slika 24:** Uticaj URB597 na ekspresiju a) monoamin oksidaze A; b) katehol-O-metiltransferaze u mPFC pacova oba pola izlaganih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

Rezultati prikazani na Slici 25 pokazuju da su stres, tretman i interakcija između tretmana i stresa bili značajni faktori koji su uticali na nivo ekspresije MAO-A u hipokampusu pacova. Životinje oba pola izložene hroničnom stresu imale su povećan nivo MAO-A enzima u hipokampusu mužjaka za 17%, ( $p < 0,01$ ) i ženke za 21%, ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolne životinje. Tretman URB597 uticao je samo na stresirane mužjake pacova i doveo je do redukcije ekspresije MAO-A za 16% ( $p < 0,01$ ) u odnosu na stresiranu grupu koja je dobijala rastvarač.

Pacovi oba pola koji su bili izloženi CUS protokolu tokom šest nedelja imali su povećan nivo COMT u hipokampusu (mužjaci 25%,  $p < 0,01$  ženke 18%,  $p < 0,05$ ). Tretman URB597 je smanjio nivo COMT za 22% ( $p < 0,05$ ) kod mužjaka izloženih stresu u odnosu na stresiranu grupu koja je dobijala rastvarač, ali nije imao uticaja na stresirane ženke.



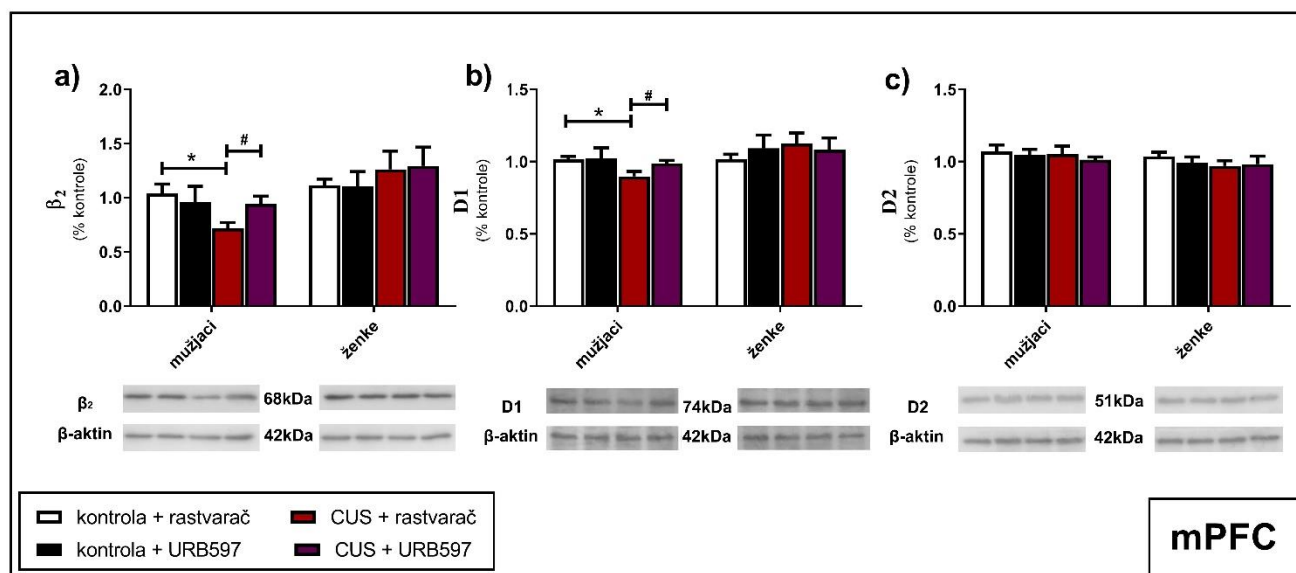
**Slika 25:** Uticaj URB597 na ekspresiju a) monoamin oksidaze A; b) katehol-O-metiltransferaze u hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

#### 4.3.4. Uticaj URB597 na ekspresiju $\beta_2$ -adrenalinskih, D1 i D2-dopaminskih receptora u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS

Rezultati analize nivoa ekspresije  $\beta_2$ -adrenalinskih (a), D1-dopaminskih (b) i D2- dopaminskih receptora (c) u mPFC prikazani su na Slici 26. Izlaganje pacova hroničnom nepredvidivom stresu smanjilo je nivo ekspresije  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora u mPFC mužjaka (31%,  $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolne životinje, dok je tretman FAAH inhibitorom povećao ekspresiju  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora kod stresiranih mužjaka za 19% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na netretirane mužjake izložene CUS.

Hronično izlaganje stresu uticalo je na D1-dopaminske receptore samo kod mužjaka, smanjivši nivo ekspresije D1 receptora za 11% ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa kontrolnim životinjama. Hronična dvonedeljna aplikacija URB597 povećala je nivo ekspresije D1 receptora kod stresiranih mužjaka u poređenju sa netretiranim mužjacima izloženim stresoru ( $p < 0,05$ ).

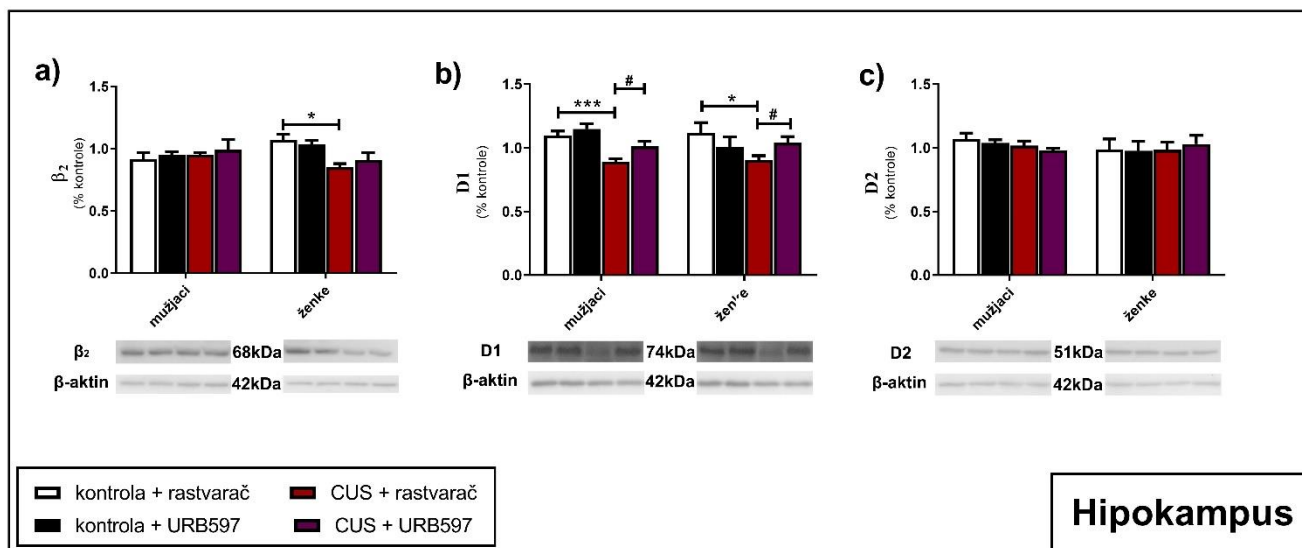
Statistička analiza nivoa ekspresije D2-dopaminskih receptora nije pokazala značajne promene tokom stresa i tretmana URB597 u ovoj strukturi mozga kod pacova oba pola.



**Slika 26:** Uticaj URB597 na ekspresiju a)  $\beta_2$ -adrenalinskih, b) D1-dopaminskih i c) D2-dopaminskih receptora u mPFC pacova oba pola izlaganih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.01$ ; efekat pola: +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$ .

Na Slici 27 su prikazani rezultati ekspresije  $\beta_2$ -adrenalinskih (a), D1-dopaminskih (b) i D2-dopaminskih receptora (c) u hipokampusu životinja oba pola izloženih CUS i tretmanu FAAH

inhibitorom. Za razliku od mPFC, gde je stres uticao samo na mužjake, ovde je CUS smanjio ekspresiju  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora u hipokampusu samo kod ženki (18%,  $p < 0,05$ ), dok URB597 nije uticao na nivo ekspresije  $\beta_2$ -receptora ni kod jedne grupe životinja.



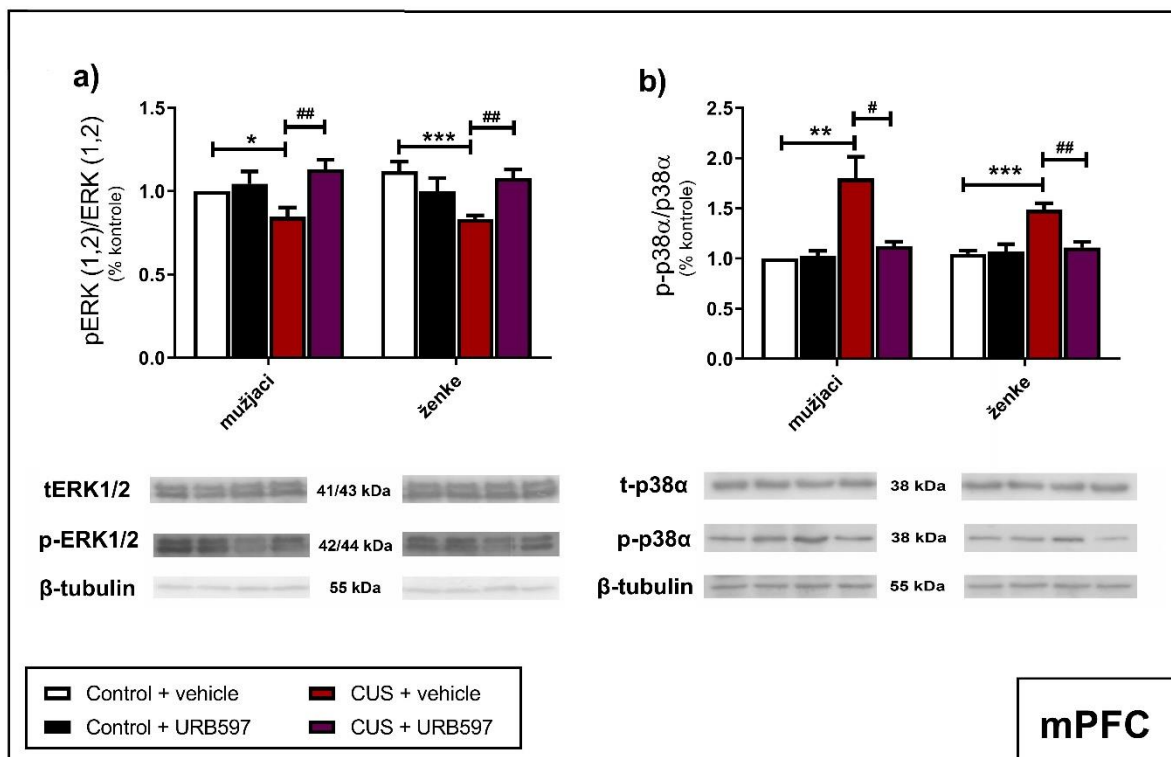
**Slika 27:** Uticaj URB597 na ekspresiju a)  $\beta_2$ -adrenalinskih i b) D1 i c) D2-dopaminskih receptora u hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

Trofaktorska analiza varijansi pokazala je da su stres, kao i interakcija stresa i tretmana značajni faktori za nivo ekspresije D1-dopaminskih receptora. Šestonedeljni nepredvidivi stres smanjio je nivo ekspresije D1-dopaminskih receptora u hipokampusu pacova oba pola (mužjaci 19%,  $p < 0,001$ ; ženke 19%,  $p < 0,05$ ). Inhibicija FAAH dovela je do povećanja količine D1 receptora kod mužjaka za 13% ( $p < 0,05$ ) i kod ženki za 7.5% ( $p < 0,05$ ), u odnosu na stresirane životinje koje su primale rastvarač.

Nivo ekspresije D2-dopaminskih receptora u hipokampusu se nije značajno menjao pod uticijem CUS i aplikovanog tretmana.

#### 4.4. Uticaj URB597 na MAPK signalni put u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS

Efekti izlaganja CUS i tretmana URB597 na aktivaciju pojedinih signalnih molekula MAPK/ERK signalnog puta u mPFC su prikazani na Slici 28. Treba naglasiti da je fosforilacija ERK1/2 neophodna za funkcionisanje ovog proteina, tako da povećanje ili smanjenje odnosa p-ERK(1/2)/ERK(1/2) odražava njegovu povećanu ili smanjenu aktivaciju.

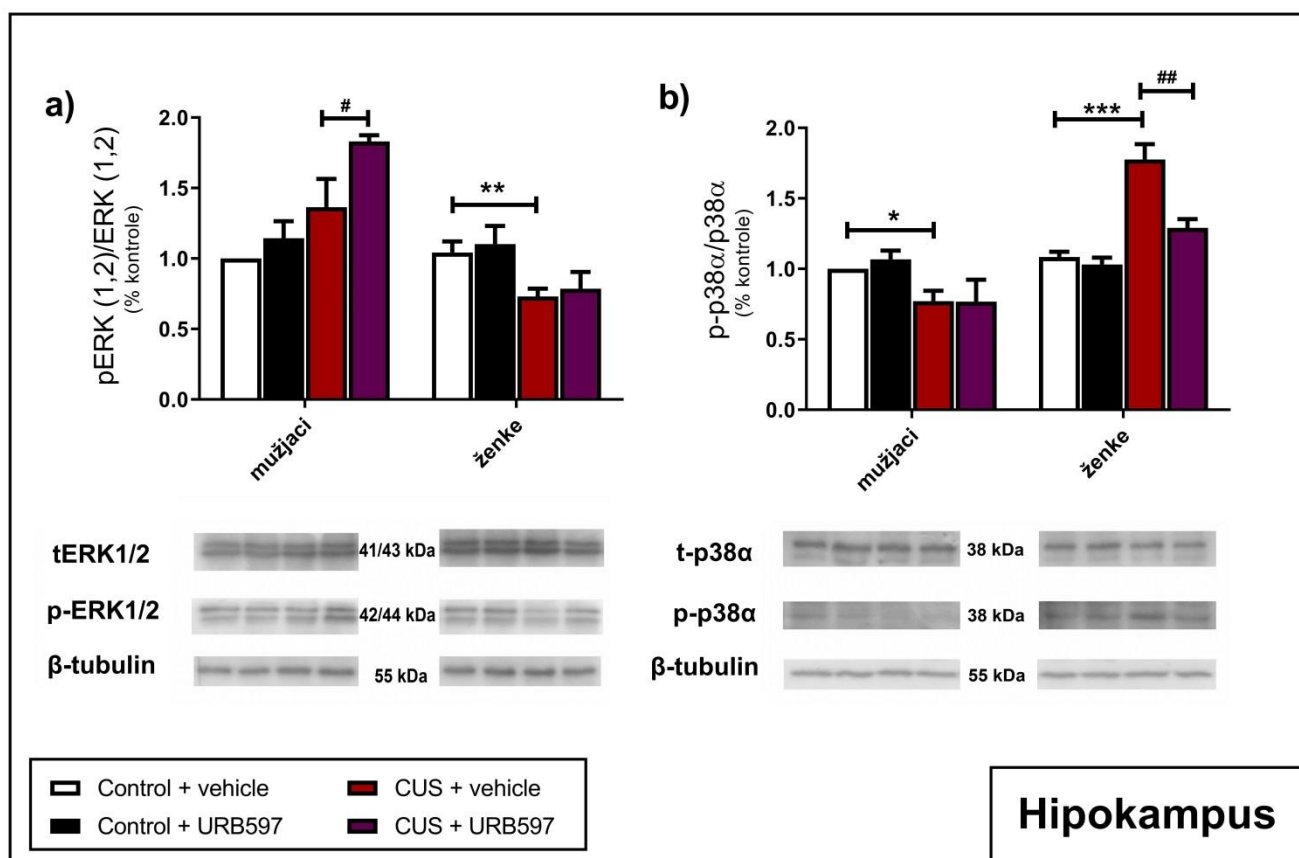


**Slika 28:** Uticaj URB597 na fosforilaciju a) ERK1/2; b) p38 signalnih molekula u mPFC pacova oba pola izloženih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

Trofaktorska ANOVA analiza je pokazala efekat tretmana, kao i interakcije stresa i tretmana na fosforilaciju ERK1/2 u mPFC. Hronično izlaganje stresu smanjilo je fosforilaciju ERK1/2 kod životinja oba pola (15,47% kod mužjaka,  $p < 0,05$ ; 25,62% kod ženki,  $p < 0,001$ ). Tretman FAAH inhibitorom URB597 povećao je procenat fosforilisanog ERK1/2 u odnosu na ukupni nivo ERK1/2 kako kod stresiranih mužjaka (33,75%,  $p < 0,01$ ) tako i kod stresiranih ženki (29,63%,  $p < 0,01$ ), u poređenju sa stresiranim životinjama koje su primale rastvarač.

Stres, tretman i interakcija stresa i tretmana su bili faktori od značajnog uticaja na fosforilaciju p38 proteina MAPK signalnog puta u mPFC. CUS je povećao odnos fosfo-p38/p38 kod pacova oba pola u odnosu na nestresirane životinje (79,97% kod mužjaka,  $p < 0,01$ ; 45% kod ženki,  $p < 0,001$ ). Tretman URB597 u trajanju od dve nedelje, smanjio je fosforilaciju p38 kod stresiranih mužjaka za 37,55% ( $p < 0,05$ ) i ženki za 25,37% ( $p < 0,01$ ), u poređenju sa stresiranim životinjama koje su primale rastvarač.

Odnos fosforilisane forme ERK1/2 i ukupne količine ERK1/2, kao i odnos fosforilisane forme p38 i ukupne količine p38 u hipokampusu prikazan je na Slici 29.



**Slika 29:** Dejstvo URB597 na fosforilaciju a) ERK1/2; b) p38 signalnih molekula u hipokampusu pacova oba pola izloženih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,01$ ; efekat pola: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ .

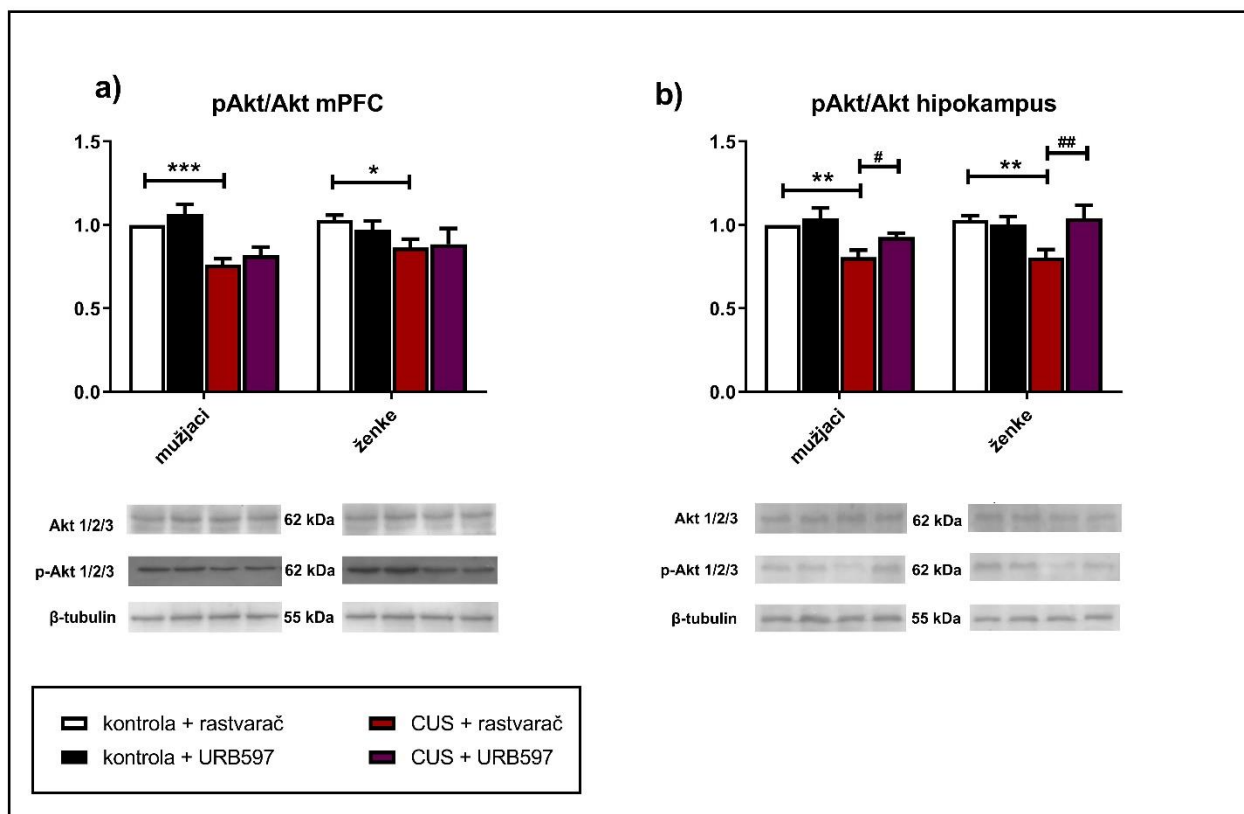
CUS je smanjio fosforilaciju ERK1/2 u hipokampusu stresiranih, u odnosu na nestresirane ženke za 29,98% ( $p < 0,01$ ). Međutim, u hipokampusu mužjaka izloženih CUS nije došlo do statistički značajnih promena u fosforilaciji ERK1/2. Hronična aplikacija URB597 je značajno povećala fosforilaciju ERK 1/2 kod životinja muškog pola izloženih stresu, u odnosu na netretirane ali stresirane



životinja (za 34,1%,  $p < 0,05$ ), dok nije imala značajan efekat na fosforilaciju ERK1/2 u hipokampusu pacova ženskog pola. Odnos nivoa fosfo-p38/p38 proteina u hipokampusu je bio pod uticajem tretmana, pola, kao i interakcija između stresa i tretmana, stresa i pola, i tretmana i pola. Izlaganje hroničnim stresorima smanjilo je fosforilaciju p38 u hipokampusu mužjaka pacova za 22,8% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na nestresirane mužjake. Nasuprot tome, nivo fosforilisanog p38 u hipokampusu stresiranih ženki je bio povećan za 64% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolne životinje. Tretman FAAH inhibitorom nije uticao na nivo p38 kod mužjaka, dok je kod stresiranih ženki smanjio nivo fosforilacije p38 za 27% ( $p < 0,01$ ) u odnosu na stresirane ženke koje su dobijale rastvarač.

#### 4.5. Uticaj URB597 na PI3K/Akt signalni put u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS

Kao što se može videti na Slici 26, šestonedeljno izlaganje CUS dovelo je do smanjenja fosforilacije Akt u mPFC životinja oba pola, u poređenju sa kontrolnim životinjama (mužjaci 24%,  $p < 0,001$ , ženke 16%,  $p < 0,05$ ). Tretman URB597 nije pokazao nikakav značajan efekat na Akt aktivaciju u mPFC.





**Slika 30:** Uticaj URB597 na fosforilaciju Akt1/2/3 signalnog molekula u a) mPFC i b) hipokampusu pacova oba pola izloženih CUS. Slike proteinskih traka dobijene Western blot analizom prikazane su ispod odgovarajućeg dela grafika identičnim redosledom kao i stubići grafika. Statističke značajnosti: efekat stresa: \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; efekat URB597: #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.01$ ; efekat pola: +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$ .

Slika 30 prikazuje nivo Akt signalnog molekula u hipokampusu životinja oba pola izloženih CUS i tretmanu URB597. Izlaganje CUS smanjilo je fosforilaciju Akt kod životinja oba pola (19% kod mužjaka,  $p < 0,01$ ; 22% kod ženki,  $p < 0,01$ ). Tretman inhibitorom FAAH je doveo do povećanja fosforilacije Akt u hipokampusu mužjaka za 15% ( $p < 0,05$ ) i u hipokampusu ženki za 29% ( $p < 0,01$ ), u poređenju sa stresiranim životinjama koje su dobijale rastvarač.

## 5. Diskusija

Hronično izlaganje stresu može dovesti do mnogih patofizioloških promena i uticati na razvoj velikog broja bolesti. Odavno je poznato i potvrđeno velikim brojem istraživanja da je stres jedan od najvažnijih faktora rizika prilikom razvoja depresije. Različite hipoteze o nastanku depresije ističu da promene u funkciji HPA osovine, kao i monoaminskoj signalizaciji u imunskom sistemu imaju ključnu ulogu u patofiziologiji te bolesti. U ovoj disertaciji je korišćen model hroničnog nepredvidivog stresa, koji predstavlja jedan od najpopularnijih i najpriznatijih modela depresije kod glodara. Osnovna ideja ovog modela je dugoročno izlaganje eksperimentalnih životinja stresorima, što izaziva simptome slične onima koji se uočavaju kod pacijenata sa depresijom. Veliki broj studija je pokazao da ponovljeno izlaganje stresu ima štetne efekte na različite delove mozga, među kojima su najosetljiviji hipokampus i prefrontalni korteks. Patofiziološki poremećaji ovih regiona mozga izazvani stresom ili kliničkom depresijom mogu dovesti i do deficita u radnoj ili dugoročnoj memoriji. Iako detalji veze između depresije i kognitivnih deficita još nisu u potpunosti jasni, postoji sve veći broj dokaza o poremećenoj dopaminskoj i adrenalinskoj signalizaciji, naročito tokom formiranja i konsolidacije memorije, što su procesi za koje je ključan hipokampus [359]. Iako prevalenca depresije u populaciji varira u zavisnosti od podneblja i kulture, epidemiološke studije ukazuju da je ova bolest značajno češća kod žena nego kod muškaraca [4].

S obzirom na to da je veliki procenat pacijenata rezistentan na postojeće tretmane antidepresivima koji imaju veliki broj neželjenih efekata, kao i na čest relaps bolesti, naučnici su u stalnoj potrazi za efikasnijim načinima lečenja. Modulacija endokanabinoidne signalizacije se izdvaja kao jedan od obećavajućih pravaca istraživanja. Dugo je poznato da individue različitih polova reaguju različito na egzogene ligande kanabinoidnog sistema, kao i na pojačanu endokanabinoidnu signalizaciju tokom stresa [353]. Uprkos tome što literaturni podaci ukazuju na polni dimorfizam u komponentama endokanabinoidnog sistema, do sada nije detaljno ispitano na koji način te razlike utiču na potencijalno terapeutsko dejstvo pojačane endokanabinoidne signalizacije. U skladu sa iznetim podacima da endokanabinoidi imaju antidepresivni efekat i da njihova efikasnost može zavisiti od pola, ispitivano je dejstvo FAAH inhibitora, URB597, na ponašanje životinja, količinu kateholamina i kateholaminskih receptora, ekspresiju enzima sinteze i razgradnje kateholamina, kao i elemente PI3K i MAPK signalnih puteva u prefrontalnom korteksu i hipokampusu životinja oba pola u animalnom modelu depresije.

## 5.1. Uticaj URB597 na ponašanje pacova oba pola izlaganih CUS

Iako je već poznato da URB597, inhibirajući razgradnju anadamida, može ostvariti anksiolitički i antidepresivni efekat, uticaj pola na delovanje endokanabinoida još nije dovoljno ispitan. Primenjivana su tri testa ponašanja da bi se potvrdila efikasnost korišćenog modela depresije i tretmana, kao i da bi se utvrdile specifičnosti u ponašanju mužjaka i ženki pacova izloženih CUS i tretmanu URB597.

**Test prinudnog plivanja** trenutno predstavlja jedan od najpopularnijih testova u istraživanjima depresije na modelu glodara. Test se zasniva na opservaciji da glodari, kada su stavljeni u cilindar napunjen vodom, nakon bezuspešnih pokušaja da pobjegnu iz ove situacije brzo postaju imobilni [360]. U toku testiranja meri se vreme koje su životinje provele u stanju imobilnosti, koje se smatra odrazom očajanja prilikom susreta životinje sa stresorom, ili odrazom pasivnog suočavanja životinje sa stresom [361, 362]. Različiti antidepresivni lekovi utiču na smanjeno trajanje imobilnosti, tj. utiču na povećano ispoljavanje aktivnog ponašanja (plivanja, penjanja i ronjenja) u toku testa, pa se povećana imobilnost izjednačava sa ponašanjem nalik depresivnim [363].

Naša studija je pokazala da su nestresirane ženke imale značajno kraće ukupno trajanje imobilnosti od nestresiranih mužjaka pacova. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje su pokazale da postoji razlika u trajanju imobilnosti između mužjaka i ženki u diestrusu [364-366]. Interesantno je da je jedna od navedenih studija pokazala da se ova razlika gubi tokom starenja ili kada su ženke bile podvrgnute ovariektomiji, što ukazuje na značaj polnih hormona za ovu vrstu ponašanja [364]. Ipak, postoje i podaci da kod određenih sojeva pacova ne postoje polne razlike u imobilnosti prilikom testa prinudnog plivanja [367]. Nakon šest nedelja izlaganja hroničnom nepredvidivom stresu, životinje oba pola su tokom testa prinudnog plivanja ispoljile progresivno povećanje učestalosti i trajanja epizoda imobilnosti. Ženke pacova izložene CUS su pokazale skoro dvostruko povećanje trajanja imobilnosti u poređenju sa mužjacima. Osim povećanog trajanja imobilnosti u ovom eksperimentu, uočeno je i smanjeno trajanje vremena provedenog u penjanju kod oba pola. Dobijeni rezultati pokazuju da je CUS doveo do promena u ponašanju koje ukazuje na razvoj stanja nalik depresiji kod oba pola, ali da je imao veći efekat kod ženki. Poznato je da žene znatno češće pate od psihijatrijskih poremećaja koji su povezani sa stresom, poput anksioznosti, posttraumatskog stresnog poremećaja, depresije i drugih afektivnih poremećaja [368]. Moguće je da usled brojnih polnih razlika u HPA osovini, ćelijskoj signalizaciji, rasprostranjenosti receptora u regionima mozga, sinaptogenezi i drugim ćelijskim i molekularnim mehanizmima, stres kod ženki dovodi do izraženijih posledica u centralnom nervnom sistemu koje se ispoljavaju uočljivijim promenama u ponašanju.

Naši rezultati su potvrdili antidepresivnu aktivnost URB597. Hronični tretman ovom supstancom smanjio je trajanje imobilnosti kod stresiranih pacova oba pola. Nekoliko prethodnih studija je utvrdilo pozitivan efekat URB597 tretmana na ponašanje nalik depresivnom kod pacova i miševa. Različiti eksperimenti su pokazali da URB597 smanjuje ispoljavanje ponašanja "očajanja" u testu prinudnog plivanja [345, 347, 369, 370], kao i da utiče na smanjenu anhedoniju u testu zainteresovanosti za zaslađeni rastvor [354, 371].

Tretman inhibitorom URB597 je statistički značajno povećao vreme provedeno u penjanju samo kod stresiranih pacova muškog pola. Važnost uticaja pola na rezultate u testovima ponašanja je dugo zanemarivana zbog komplikovanije eksperimentalne procedure, pa samim tim postoji i manje literaturnih podataka koji objašnjavaju takve polne razlike. Treba uzeti u obzir činjenicu da su u ovoj studiji korišćene samo ženke koje su u trenutku testiranja bile u diestrusu. Baros i Ferigolo [372] su pokazali da su efekti tricikličnog antidepresiva imipramina manje očigledni u testu prinudnog plivanja, kada su testirane ženke bile u diestrusu, u odnosu na estrus i proestrus, što ukazuje na važnost hormonskog stanja životinja ženskog pola u toku testiranja, što može biti jedan od potencijalnih faktora koji su uticali na tu razliku u ponašanju. Osim toga, literaturni podaci pokazuju da supstance koje pojačavaju noradrenalinsku ili dopaminsku signalizaciju povećavaju vreme provedeno u penjanju, dok supstance koje povećavaju serotoninsku neurotransmisiju povećavaju vreme koje životinje provode plivajući [373, 374]. Naši rezultati pokazuju da inhibicija FAAH utiče na pojačanu noradrenalinsku signalizaciju u mozgu samo kod mužjaka. Ti rezultati su u skladu sa studijom Silve i Fernandez-Guastija [375] koji su pokazali da antidepresivi sa dvostrukim dejstvom na noradrenalinski i serotoninski sistem utiču na povećano penjanje samo kod mužjaka [375]. Ovi rezultati mogu bolje objasniti pojavu da žene u depresiji bolje odgovaraju na terapiju selektivnim inhibitorima ponovnog preuzimanja serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRIs) nego na terapiju inhibitorima ponovnog preuzimanja noradrenalina i serotonina (eng. *serotonine-noradrenaline reuptake inhibitors*, SNRIs) [376].

Na osnovu dobijenih rezultata testa prinudnog plivanja može se zaključiti da URB597 ispoljava antidepresivno dejstvo kod pacova oba pola izloženih CUS, sa određenim polno specifičnim razlikama.

Anksioznost se definiše kao negativno emocionalno stanje povezano sa percepcijom pretnje. Komorbiditet depresije i anksioznosti je izuzetno čest pa su tako epidemiološke studije pokazale da je preko 40% pacijenata koji pate od teške depresije duže od godinu dana u tom periodu imalo jedan ili više anksioznih poremećaja [377]. Na osnovu navedenog postavljeni cilj bio je da se potvrdi uspešnost razvijanja ponašanja nalik anksioznosti kod stresiranih životinja, kao i rasvetljavanje potencijalnog korisnog uticaja endokanabinoida na ispoljavanje anksioznosti.

**Test uzdignutog plus lavirinta** predstavlja ponašajni test za procenu anksioznosti kod glodara. Test se zasniva na premisi da novo okruženje kod životinje istovremeno izaziva i radoznalost i strah, i da glodari imaju prirodnu averziju ka otvorenom i svetlom prostoru [378]. Prilikom testiranja u ovom eksperimentu, praćen je ukupan broj ulazaka u zatvorene i otvorene krake lavirinta, učestalost tih ulazaka i vreme koje je životinja provela u zatvorenim i otvorenim kracima, kao i broj izdizanja na zadnje ekstremitete.

Nakon šest nedelja delovanja nepredvidivog stresa, životinje oba pola pokazale su znake anksioznosti, što je u skladu sa literaturnim podacima [379-381]. Međutim, smanjena učestalost ulazaka, kao i kraće vreme provedeno u otvorenim kracima lavirinta je bilo izraženije kod ženki. U modelu depresije koji se zasniva na socijalnoj izolaciji životinja tokom adolescencije, Leusis i Andersen [382] su pokazali da dolazi do sličnih promena u ponašanju koje odražava stanje nalik anksioznosti samo kod ženki. Takođe, pokazano je da ženke miševa, ispoljavaju izraženije anksiozno ponašanje na testu uzdignutog plus lavirinta nakon izlaganja stresu predatora u odnosu na mužjake

[383]. U našem eksperimentu, mužjaci izloženi CUS su ispoljili povećan ukupan broj ulazaka u otvorene i zatvorene krake lavirinta, što ukazuje na povećanu lokomotornu aktivnost. U novom stresnom okruženju, smatra se da pacovi sa povećanom lokomotornom aktivnošću ispoljavaju manje izraženo ponašanje nalik anksioznosti [384, 385]. Međutim, postoje i istraživači koji smatraju da bi prilikom testa uzdignutog lavirinta ukupnu lokomociju trebalo posmatrati kao odvojeni parametar u odnosu na ulaske u otvorene krake lavirinta. Oni smatraju da su ulasci u otvorene krake prava mera anksioznosti životinje, zbog toga što je povećana lokomotorna aktivnost davala i lažno pozitivne rezultate prilikom testiranja određenih psihostimulativnih lekova [386]. Dvonedeljna aplikacija URB597 nije uticala na ukupnu lokomociju, ali je povećala broj ulazaka u otvorene krake kod oba pola u odnosu na životinje podvrgnute CUS. Iako su stresirane ženke tretirane FAAH inhibitorom češće ulazile u otvorene krake, one su i dalje u njima provodile kraće vreme. Smanjeno vreme provedeno u otvorenim kracima može implicirati da je anksioznost i dalje prisutna, iako je lokomocija povećana. Nekoliko autora je pokazalo da URB597 ostvaruje anksiolitičku aktivnost u testu uzdignutog plus lavirinta i utiče na vreme koje životinja provede u otvorenim kracima kod različitih glodara, iako bi trebalo imati u vidu da su svi eksperimenti u ovim studijama rađeni isključivo na mužjacima [387-390]. Komaki i saradnici [388] su takođe primetili da URB597 ne utiče na ukupnu lokomociju tokom testa, što je u saglasnosti i sa našim rezultatima. Nasuprot našim rezultatima koji ukazuju na anksiolitičko dejstvo URB597, Roohbakhsh i saradnici [391] su pokazali anksiozni efekat akutnih doza URB597 od 0.1 $\mu$ g i 1 $\mu$ g po pacovu. Takođe suprotno našim rezultatima, Micale i kolege [392] nisu pokazali anksiolitičko dejstvo akutne ili ponovljene aplikacije URB597 u dozi od 0.3mg/kg tokom 7 dana, ali je anksiolitički efekat ostvaren u znatno višoj dozi od one koju smo mi primenili (1mg/kg). Ovo se može pripisati razlici između korišćenih životinja ili dužini trajanja tretmana, jer je naš hronični tretman URB597 trajao duplo duže. Prethodne studije su pokazale da anksiolitički efekat URB597 može biti pretvoren u anksiozni ukoliko se uz URB597 životinjama zajedno daje i anadamid [393], što se objašnjava poznatim bifazičnim dejstvom kanabinoidnih liganda, gde niže doze imaju anksiolitički efekat dok visoke izazivaju anksioznost [394], kao i činjenicom da inhibicija FAAH selektivno utiče na različite regione mozga.

Na osnovu sprovedenog testa može se zaključiti da URB597 ostvaruje anksiolitičke efekte kod stresiranih pacova oba pola, ali da su oni izraženiji kod mužjaka. Gen za hidrolazu masnokiselinskih amida sadrži element koji odgovara na estrogen (eng. *estrogen response element*), DNK sekvencu koja ostvaruje interakciju sa estrogenima. Pokazano je i da estrogenski receptori ER $\alpha$  i ER $\beta$  mogu uticati na aktivnost FAAH promotora [395], što sugerise da estrogen i njegovi receptori mogu regulisati aktivnost FAAH u centralnom nervnom sistemu, utičući tako na ponašanje. Pokazano je da URB597 ostvaruje anksiolitičko dejstvo preko CB1 receptora [390], pri čemu su Zer-Aviv i kolege [353] pokazali da URB597 normalizuje promene u koncentraciji ovog receptora u hipokampusu tokom izlaganja životinja modelu posttraumatskog stresnog poremećaja samo kod mužjaka. Iako naša studija nije pratila ekspresiju kanabinoidnih receptora, moguće je pretpostaviti da je selektivan uticaj URB597 na CB1 receptore, samo kod životinja muškog pola, jedan od potencijalnih mehanizama u nastanku polnih razlika u anksiolitičkom dejstvu ove supstance.

Interesantno je da je inhibicija FAAH u ovom istraživanju dovela do povećanja broja izdizanja na zadnje ekstremitete kod životinja oba pola, nezavisno od toga da li su bile izložene stresu ili ne.

Različiti autori smatraju da bi izdizanje moglo biti povezano sa impulsivnošću i željom za preuzimanjem rizika i da je određeno emocionalnim stanjem životinje [396, 397]. Pored toga, verovatno je povezano sa reakcijom na nepoznato i željom za istraživanjem, jer pacovi koji se češće izdižu pokazuju i izraženije istraživačko ponašanje prilikom testa prepoznavanja novog objekta [398]. Transgeni miševi kojima nedostaje gen za FAAH (*Faah*-/-) znatno se više izdižu na zadnje ekstremitete u testu otvorenog polja [399].

Sumirajući gore navedeno, rezultati ove studije su pokazali da stresirane ženke izraženije iskazuju ponašanje nalik anksioznom, kao i da URB597 ostvaruje anksiolitičke efekte kod životinja oba pola koje su izlagane hroničnom stresu, pri čemu su ti efekti izraženiji kod mužjaka. Imajući to u vidu, kao i ranije istaknutu povezanost ovakvog ponašanja sa procesima učenja i pamćenja, odlučili smo da testiramo efekte stresa, kao i blokade razgradnje endokanabinoida, na pomenute procese.

**Test prepoznavanja novog objekta** je jednostavan i efikasan test kojim se evaluira kapacitet životinje da prepozna objekat u različitim vremenskim intervalima. Test je baziran na spontanij težnji glodara da provode više vremena istražujući novi u odnosu na već poznat objekat. Uspešnost zadatka prepoznavanja novog objekta može biti smanjena usled lezija u hipokampusu i u prefrontalnim oblastima oko rinalne brazde [400], što čini ovaj test pogodnim za ispitivanje uloge pomenutih regiona mozga u ispoljavanju određenih ponašajnih manifestacija depresije, što je bio jedan od ciljeva ove doktorske disertacije. Životinje su testirane 5 minuta, 2 h i 24 h nakon faze učenja, da bi se ispitala radna, kratkoročna i dugoročna memorija. U ovom eksperimentu nije uočena značajna polna razlika u uspešnosti prepoznavanja novog objekta kod kontrolnih životinja 5 minuta nakon faze učenja, ali su mužjaci pokazali bolje rezultate od ženki nakon 2h i 24h. Iako je uočeno da ženke često pokazuju bolju memoriju prilikom vizuelnog prepoznavanja, moguće je da je uzrok neslaganja naših sa tim rezultatima činjenica da smo testirali ženke u diestrusnoj fazi ciklusa [401]. Faza estrusnog ciklusa utiče na učinak u testu prepoznavanja novog objekta. Eksperimenti su pokazali da ženke u metaestrusu i diestrusu imaju slabiju sposobnost prepoznavanja objekta od ženki u proestrusu i estrusu [402]. Slično našim rezultatima, Cost i saradnici [403] nisu primetili razlike između sposobnosti mužjaka i ženki da prepoznaju promenu lokacije objekata 5 minuta nakon faze učenja. Međutim, pri dužem razmaku od 30 minuta, mužjaci su bili znatno uspešniji u ovom zadatku od ženki pacova u diestrusnoj fazi ciklusa.

Hronično stresirane životinje muškog pola su pokazale bolju radnu memoriju u odnosu na nestresirane kontrole. Sa druge strane, stresirane ženke su 5 minuta nakon faze učenja pokazale veoma nisku sposobnost prepoznavanja novog objekta. Problemi u funkcionisanju radne memorije ženki nisu iznenađujući, s obzirom da stresirane ženke pokazuju veću anksioznost u odnosu na mužjake na testu uzdignutog plus lavirinta. Pažnja je ključna komponenta radne memorije, a dugoročni stres i napetost imaju negativan uticaj na pažnju [404]. Veća uspešnost prepoznavanja novog objekta kod mužjaka izloženih stresu u odnosu na kontrolne životinje pomalo je neočekivan rezultat. Ipak, poznato je da akutni stres može čak i pozitivno uticati na radnu memoriju glodara, dok se većina istraživanja slaže da hronični stres dovodi do poremećaja u radnoj memoriji [405, 406]. Schoofs i saradnici [407] su pokazali da stres može poboljšati radnu memoriju muškaraca, ali je narušava kod žena. Jedno od potencijalnih objašnjenja naših rezultata je činjenica da su mužjaci pacova pokazivali povećanu

lokomotornu aktivnost nakon hroničnog stresa, što je moglo da dovede do boljeg prepoznavanja objekta.

Prilikom testiranja životinja 2h nakon faze učenja, memorija mužjaka je bila pod mnogo većim negativnim uticajem hroničnog stresa. Mužjaci su pokazali smanjeno prepoznavanje novog objekta dok su stresirane ženke, nasuprot narušenoj radnoj memoriji, imale očuvanu kratkoročnu memoriju. Dobijeni podaci su u skladu sa eksperimentalnim rezultatima koji su pokazali da su glodari ženskog pola uspevali da prepoznaju prethodno identifikovani objekat i 90 minuta nakon intervala učenja, u poređenju sa mužjacima koji su to uspevali samo do 60. minuta [401]. Smatra se da je radna memorija odgovorna za pamćenje trenutnih informacija najvećim delom lokalizovana u PFC, dok se konsolidacija deklarativne memorije odgovorne za svesno prisećanje životnih događaja uglavnom odvija uz učešće hipokampusa [408]. Prethodna istraživanja su pokazala da hroničan stres može imati polno specifične efekte na oblike memorije zavisne od hipokampusa i dovesti do oštećenja ovih tipova memorije kod mužjaka, bez efekta ili sa čak pozitivnim efektom na ženke [409]. Kod žena veći nivo estrogena može uticati na bolje zadržavanje sećanja koje zavisi od hipokampusa [410].

Hronično stresirane životinje oba pola pokazale su smanjenu sposobnost prepoznavanja novog objekta 24h nakon faze učenja. Slični rezultati su dobijeni u eksperimentima sa inaktivacijom ili lezijama na hipokampusu, što ukazuje na veći značaj hipokampusa prilikom dugoročnog zadržavanja sećanja [411]. Pokazano je da i kod ljudi nedavni životni stres može dovesti do problema sa dugoročnom memorijom [412].

Ukratko, rezultati testa prepoznavanja novog objekta su potvrdili ne samo potencijalno različit doprinos mPFC i hipokampusa u konsolidaciji memorije, već i različit uticaj hroničnog stresa u ovim regionima kod mužjaka i ženki.

Tretman URB597 je popravio stresom oštećenu radnu memoriju kod ženki, ali nije imao efekta na stresirane mužjake. Panlilio i saradnici [413] su pokazali da URB597 i nekoliko drugih inhibitora FAAH nisu uticali na radnu memoriju mužjaka pacova. Poznato je da anksioznost može dovesti do smanjenja radne memorije kod ljudi [414], tako da je moguće da je pozitivan efekat URB597 na radnu memoriju stresiranih ženki posledica njegovog već uočenog anksiolitičkog dejstva. Hronični tretman inhibitorom FAAH je imao pozitivan efekat na kratkoročnu memoriju stresiranih životinja oba pola, ali je popravio dugoročnu memoriju samo stresiranih mužjaka. Prethodno istraživanje Hlavacove i saradnika [415] je pokazalo da jedna doza URB597 može da popravi kratkoročnu memoriju na testu prepoznavanja novog objekta kod mužjaka, ali ne i kod ženki. Odsustvo polno specifičnog dejstva URB597 na kratkoročnu memoriju u našem eksperimentu može se pripisati činjenici da su životinje bile hronično tretirane URB597. Prethodni testovi ponašanja su pokazali da je hronična aplikacija URB597 efikasnija u ublažavanju simptoma anksioznosti i depresije kod životinja muškog pola nego kod ženki. Zer-Aviv i Akirav [353] su utvrdili da je, nakon dugoročnog stresa, URB597 normalizovao nivo ekspresije CB1 receptora u mPFC kod oba pola i samo u hipokampusu mužjaka.

Na osnovu rezultata analize ponašanja pacova, možemo zaključiti da endokanabinoidna signalizacija ima veći efekat na memoriju i ponašanje nalik anksioznom i depresivnom kod mužjaka pacova. Takođe, rezultati ukazuju na značaj hipokampusa i mPFC u ispoljavanju ponašanja

karakterističnog za depresiju. S obzirom na to, kao i na ranije opisane moguće mehanizme nastanka depresije, odlučili smo da ispitamo dejstvo endokanabinoida na metabolizam kateholamina u hipokampusu i mPFC.

## **5.2. Uticaj URB597 na nivo kateholamina, ekspresiju enzima njihove sinteze, razgradnje i receptora u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS**

Prefrontalni korteks učestvuje u velikom broju viših kognitivnih funkcija, obradi emocija i regulaciji odgovora jedinke na stresor [416]. Medijalni PFC pacova učestvuje u složenim moždanim funkcijama poput učenja, memorije, povezivanja događaja, specifičnih aspekata lokomocije, prostorne navigacije i odlučivanja [417, 418]. PFC ima ključnu ulogu u koordinaciji ponašanja koje se oslanja na učešće radne memorije i inhibiciji stimulusa koji bi ometali pažnju [419]. U fiziološkim uslovima, PFC dominantno reguliše procese koji usmeravaju jedinku ka datom cilju. Istraživanja su pokazala da može doći do poremećaja ovih funkcija usled izlaganja stresorima poput hipoksije, povrede glave, inflamacije, ili pak psihološkim stresorima u kojima jedinka oseća da nema dovoljno kontrole nad stresnim iskustvom [420]. Adekvatan balans u noradrenalinskoj i dopaminskoj stimulaciji je neophodan za normalno funkcionisanje PFC. Na primer, studije na životinjama su pokazale da nedovoljna stimulacija postsinaptičkih  $\alpha_2$ -noradrenalinskih receptora ili preterana stimulacija  $\alpha_1$ -noradrenalinskih receptora može dovesti do poremećene funkcije ove strukture mozga, koja leži u osnovi nekih simptoma karakterističnih za afektivne poremećaje poput smanjene sposobnosti koncentracije, smanjenog usmeravanja ponašanja jedinke ka cilju i impulsivnog ponašanja [166].

Hipokampus je struktura mozga koja je možda i najviše proučavana u istraživanjima stresa i depresije. Hipokampusna formacija mozga ima ključnu ulogu u epizodičnoj, deklarativnoj i prostornoj memoriji, ali i u regulaciji neuroendokrinog odgovora na stres, gde učestvuje u terminaciji odgovora HPA osovine [421]. Hipokampus je struktura mozga koja je naročito osetljiva na stres zbog toga što pokazuje izuzetno visoku koncentraciju kortikosteroidnih receptora [422]. Pored štetnog uticaja na sinaptičku plastičnost hipokampusu i memoriju, produženi stres i depresija mogu dovesti do izmenjene morfologije dendrita i dendritskih trnova u hipokampusu i inhibicije neurogeneze [163]. Kateholamini predstavljaju ključne modulatore kognitivnih i afektivnih funkcija u prefrontalnom korteksu i hipokampusu i poremećena regulacija ovog sistema ima važnu ulogu u patogenezi depresije [423]. S obzirom da je prethodna analiza ponašanja životinja u našem eksperimentu ukazala na promene povezane sa funkcijom hipokampusu i PFC, i uzevši u obzir značaj kateholamina za njihovo normalno funkcionisanje, jedan od ciljeva našeg istraživanja je bio ispitivanje kateholaminskog sistema u ovim strukturama mozga u odgovoru na stres i u uslovima pojačane endokanabinoidne signalizacije.

Rezultati naše studije pokazali su da je šestonedeljno izlaganje CUS dovelo do pražnjenja depoa noradrenalina u mPFC kod pacova oba pola. Literaturni podaci pokazuju smanjenu dopaminsku i noradrenalinsku transmisiju kod pacijenata koji boluju od depresije [22, 424]. Monoaminska hipoteza



ove promene smatra glavnim uzrokom nastanka ove bolesti. Naši rezultati su u skladu sa više studija koje su pokazale da hronični nepredvidivi stres smanjuje nivo noradrenalina u mPFC glodara [425-430]. Međutim, postoje i neke studije koje pokazuju povećane ili nepromenjene nivoe noradrenalina nakon izloženosti hroničnom stresu [431-433]. Iako prekliničke studije konzistentno pokazuju povećanu aktivaciju noradrenalinskog sistema u odgovoru na akutne stresore, rezultati studija koje su ispitivale uticaj hroničnog stresa na životinjama razlikuju se u zavisnosti od prirode i dužine stresora, vrste, soja i pola životinja. Generalno, psihosocijalni stresori izazivaju izraženiju reakciju noradrenalinskog sistema i HPA osovine u odnosu na fizičke stresore, poput imobilizacije ili niske temperature [224, 434]. Smanjena količina noradrenalina usled uticaja hroničnog stresa može biti posledica iscrpljivanja zaliha tog neurotransmitera. Poremećen balans noradrenalina u mozgu može se negativno odražavati na veliki broj fizioloških funkcija.

Naš eksperiment je pokazao da izloženost CUS povećava nivoe dopamina u mPFC pacova oba pola. Studije na ovu temu dale su različite rezultate, pokazavši povećane [432] i smanjene nivoe dopamina [428] u PFC nakon hroničnog izlaganja stresorima. Istraživanja su pokazala da kod primata čak i blagi stresori mogu aktivirati dopaminske neurone u PFC. Ova dopaminska signalizacija u PFC ima ulogu u podsticanju motivacije prilikom iskustava koja donose neku vrstu nagrade, u pažnji u slučaju važnih, uzbujujućih stimulusa, ali i prilikom izbegavanja štetnih stimulusa [435].

Šestonedeljno izlaganje nepredvidivim stresorima, koje je primenjeno u ovoj studiji, slično kao i u mPFC, dovodi do smanjenja nivoa noradrenalina i u hipokampusu pacova oba pola, što se slaže sa većim brojem literaturnih podataka [426, 436, 437]. Za razliku od noradrenalina, nivo dopamina je bio povećan u hipokampusu mužjaka, a smanjen kod ženki pacova nakon hroničnog stresa. Dalla i saradnici [438] su takođe pronašli da hronični stres dovodi do smanjene dopaminske aktivnosti samo kod pacova ženskog pola. Ovi rezultati mogu potencijalno implicirati veću osetljivost ženki na izloženost CUS. Interesantno je da je u studiji Lamberta i saradnika [439] uočen smanjen nivo noradrenalina i dopamina pacijenata koji boluju od depresije, ali je samo nivo dopamina bio parametar koji je imao značajnu korelaciju sa kliničkom slikom pacijenata.

Naši rezultati potvrđuju da je došlo do promena u količini kateholamina u ispitivnim strukturama mozga, što korišćeni animalni model čini adekvatnim za ispitivanje biohemijskih osnova depresije. Dalja istraživanja bila su usmerana na ispitivanje dejstva endokanabinoida na nivo kateholamina u ovim strukturama mozga.

Postoje brojne implikacije da poremećaji u endokanabinoidnoj signalizaciji doprinose razvoju depresije, iako tačna uloga i mehanizmi dejstva endokanabinoida u depresiji još nisu u potpunosti jasni. Hronični stres smanjuje koncentraciju anadamida, gustinu CB1 receptora i signalnu transdukciju u neuroanatomskim strukturama uključenim u nastanak depresije, poput prefrontalnog korteksa, hipokampusa, hipotalamusa i ventralnog striatuma [440]. Vinod i saradnici [346] su pronašli snižene nivoe anadamida kod *Wistar Kyoto* pacova koji predstavljaju genetski model depresije. U kliničkim studijama je pronađena povezanost određenih genetskih polimorfizama u genima za CB1 i CB2 receptor sa depresijom i bipolarnim poremećajem, kao i sa rezistentnošću pacijenata na kliničke tretmane [441-443].

Rezultati naše studije su pokazali da je dvonedeljna aplikacija inhibitora FAAH značajno ublažila negativne efekte hroničnog stresa na nivo noradrenalina u mPFC i hipokampusu pacova muškog pola, ali da nije imala efekta na ženke izložene CUS. Ovo je u skladu sa prethodnim otkrićem da primena sintetičkog kanabinoidnog agoniste CB1 receptora, WIN 55,212-2, utiče na povećanje noradrenalinske signalizacije u frontalnom korteksu pacova muškog pola [444]. Istraživanja su prethodno pokazala da inhibicija FAAH hidrolize anadamida povećava noaradrenalinsku transmisiju u neuronima PFC i bazolateralnim bademastim jedarima stresiranih pacova [445]. Međutim, endokanabinoidna regulacija noaradrenalinske signalizacije je kompleksna, jer ima dokaza da CB1 receptori locirani na aksonima i terminalima GABA, serotoniniskih i glutamatnih neurona stimulišu aktivnost noradrenalinskih neurona, dok oni locirani na samim noradrenalinskim neuronima mogu inhibirati otpuštanje noradrenalina [446].

Podaci dobijeni u našoj studiji pokazuju da je tretman URB597 smanjio nivo dopamina koji je bio povećan usled hroničnog stresa u mPFC, ali da nije uticao na njegovu količinu u hipokampusu pacova oba pola. Premala ili prevelika količina ovih neurotransmitera remeti normalnu funkciju PFC [166]. Poremećena funkcija se ogleda u nemogućnosti jedinke da se fokusira na cilj i adaptira na nove uslove, već reaguje u skladu sa već naučenim oblicima ponašanja [447]. Smanjenje nivoa dopamina nakon hroničnog URB597 tretmana može predstavljati mehanizam kompenzacije koji zaustavlja štetne efekte prevelike dopaminske neurotransmisije. Nasuprot našim rezultatima, neke studije su pokazale da aplikacija anadamida povećava nivo dopamina u mPFC, hipotalamusu i hipokampusu i smanjuje ga u nigrostriatnom putu [448]. Ti različiti podaci verovatno odražavaju kompleksne mehanizme regulacije dopaminskog sistema. Prethodno objavljena literatura sugeriše da endokanabinoidni sistem može modulisati dopaminsku neurotransmisiju kroz mehanizme koji uključuju GABA ili glutamatske sinapse, kao i kroz konvergenciju signalnih kaskada dopaminskih i kanabinoidnih receptora, ali da je malo verovatno da endokanabinoidi direktno utiču na otpuštanje kateholamina [449]. Takođe, smatra se da endokanabinoidi mogu uticati na sinaptičku plastičnost, delujući na dugoročnu potencijaciju mehanizmom koji zahteva aktivaciju D2 receptora [450].

Do sada opisane promene u funkcionisanju kateholaminskog sistema su verovatno povezane sa promenama u sintezi odnosno u ekspresiji enzima koji su odgovorni za biosintezu kateholamina. Tu se pre svih izdvajaju TH kao limitirajući enzim sinteze kateholamina i DBH koji pretvara dopamin u noradrenalin. Veliki broj studija je potvrdio da promene u aktivnosti i ekspresiji enzima biosinteze kateholamina prate i promene nivoa samih kateholamina u mozgu [451, 452]. Naši rezultati su pokazali da izlaganje pacova CUS u trajanju od šest nedelja dovodi do povećanja ekspresije TH u mPFC mužjaka, dok se nivo ekspresije TH nije promenio kod ženki. Miner i saradnici [453] su prethodno pokazali da hronično izlaganje pacova muškog pola niskoj temperaturi dovodi do povećane ekspresije TH u noradrenalinskim aksonima neurona PFC, što je skladu i sa našim rezultatima. Pored toga, još davno je pokazano da može doći do pojačane aktivnosti TH kod glodara usled adaptacije na ponovljene stresore [454]. Naše istraživanje je pokazalo da je nivo ekspresije DBH enzima bio smanjen u mPFC pacova oba pola nakon izlaganja CUS. Za razliku od naših rezultata, Popović i saradnici [455] su pokazali da hronični stres ograničenog kretanja dovodi do povećanja ekspresije DBH u PFC pacova. Naša studija pokazuje da je hronični stres delovao na ekspresiju TH u hipokampusu na polno nespecifičan način, smanjivši količinu TH u hipokampusu životinja oba pola.

Poremećena regulacija aktivnosti TH pronađena je *post mortem* u mozgu žrtava suicida [456]. Nekoliko animalnih studija takođe pokazuju smanjenu količinu TH u hipokampusu pacova u različitim modelima hroničnog stresa [457, 458]. Nasuprot tome, Watanabe i kolege [459] pokazuju da su količina iRNK i nivo ekspresije TH povećani kod pacova izloženih hroničnom socijalnom stresu. Za razliku od TH, CUS nije uticao na nivo ekspresije DBH enzima u hipokampusu pacova oba pola.

Daljim eksperimentalnim istraživanjem želeli smo da utvrdimo da li povećan nivo endokanabinoida menja koncentracije kateholamina u stresu utičući na njihovu sintezu i/ili razgradnju, ili je u pitanju neki drugačiji mehanizam. Dvonedeljni tretman URB597 povećao je nivo ekspresije TH u hipokampusu stresiranih mužjaka, ali ga je smanjio u mPFC stresiranih ženki. URB597 tretman je takođe povećao količinu DBH u mPFC mužjaka izloženih stresu, ali nije uticao na njegov nivo kod ženki. Prethodne studije su pokazale da CB1 agonisti selektivno povećavaju ili smanjuju nivo TH i sintezu kateholamina, sugerišući da endokanabinoide mogu kontrolisati moždane funkcije i kroz količinu dostupnih kateholamina [460-462]. Page i saradnici [463] su pronašli da ponovljena aplikacija kanabinoidnog agoniste WIN 55,212-2 kod pacova povećava nivo ekspresije TH u *locus coeruleus*. Nasuprot tome,  $\Delta^9$ -THC i HU 210 kanabinoidni agonisti dovode do povećane ekspresije TH u striatumu koju prati povećanje nivoa dopamina u ovoj strukturi [460]. Studija koju su sprovedli Bosier i saradnici [464] implicira da URB597 utiče na ekspresiju TH u *in vitro* uslovima, mehanizmima koji nisu zavisni od inhibicije FAAH i CB1 receptora, već se oslanjaju na druge vrste receptora osetljivih na kanabinoide. Ovaj mehanizam, međutim još nije potvrđen *in vivo* eksperimentima. Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da URB597 ima polno specifičan efekat na enzime sinteze kateholamina. Smatra se da estrogen može regulisati transkripciju gena za DBH [465] preko dva elementa koji odgovaraju na estrogen (ERE - engl. *estrogen response element*) u promotorskom regionu. Istraživanja su implicirala da estrogen, osim ovog mehanizma, reguliše ekspresiju DBH i signalnim putevima iniciranim na samoj membrani [466]. Dobijeni rezultati ukazuju na razlike u efektu URB597 na enzime biosinteze kateholamina u različitim regionima mozga, kao i na polne razlike.

Dejstvo kateholamina u sinapsama se najčešće završava tako što se ovi neurotransmiteri ponovno preuzimaju u vezikule presinaptičkih nervnih završetaka, ili se metabolišu pomoću enzima MAO-A. Kateholamine mogu preuzeti i glijske ćelije, u kojima se noradrenalin metaboliše enzimom COMT. Aktivnost oba ta enzima se značajno odražava na količinu dostupnih kateholamina [177]. Rezultati ove studije pokazuju da je nivo ekspresije enzima MAO-A povećan u mPFC kod stresiranih pacova oba pola. Međutim, hronični stres je doveo do povećanja ekspresije COMT u mPFC pacova muškog pola, dok je kod ženki ekspresija ovog enzima ostala nepromenjena. Veća aktivnost COMT enzima kod muškaraca nego kod žena je primećena i na *post mortem* uzorcima tkiva PFC kod ljudi. [467]. Ovu tvrdnju podržavaju i istraživanja koja pokazuju da je aktivnost COMT veća u mozgu muškaraca, uprkos sličnoj ili čak većoj ekspresiji gena za COMT u mozgu žena [468]. Polno zavisne razlike u efektima COMT se često pripisuju dejstvu estrogena, ali mogući su i drugi mehanizmi [468]. U *in vitro* uslovima, 17- $\beta$ -estradiol inhibira ekspresiju COMT vezivanjem za element koji odgovara na estrogen (ERE) u promotorskom regionu gena [469]. Međutim, Jiang i saradnici [470] su potvrdili postojanje estrogenske regulacije ekspresije ovog enzima u ćelijskim linijama kancera dojke, ali ne i u ćelijskim linijama glioblastoma, sugerišući da je ova vrsta regulacije manje bitna u moždanom tkivu. Iako tačni mehanizmi ispoljavanja polnih razlika u aktivnosti i ekspresiji COMT nisu još rasvetljeni,

evidentno je da polne razlike u regulaciji ovog enzima postoje. Na kraju, pokazano je da polimorfizmi gena za COMT mogu biti povezani sa različitim psihijatrijskim bolestima kod muškaraca i žena [468].

Smatra se da promene u ekspresiji MAO-A mogu imati značajnu ulogu u patofiziologiji psihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti [471]. Naši rezultati pokazuju da je izlaganje pacova oba pola CUS, povećalo ekspresiju MAO-A u hipokampusu. Za razliku od mPFC, gde je stres delovao na povećanje ekspresije COMT samo kod mužjaka, u hipokampusu je CUS povećao ekspresiju ovog enzima kod oba pola. Inoue i saradnici [472] su uočili kod pacijenata sa dijagnozom depresije vezu između polimorfizma gena za COMT, pojačane aktivnosti hipokampusa i sklonosti paničnim napadima. Pojačana aktivnost enzima razgradnje kateholamina dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika [473]. Reaktivne vrste kiseonika i iscrpljivanje mehanizama antioksidativne odbrane oštećuju makromolekule, aktiviraju proinflamatornu signalizaciju i dovode do ćelijske apoptoze, što izaziva neurodegeneraciju koja je povezana sa patofiziologijom depresije [474]. Na osnovu prikazanih rezultata u ovoj studiji može se pretpostaviti da je smanjena količina noradrenalina u mPFC i hipokampusu nakon hroničnog nepredvidivog stresa verovatno posledica njihove smanjene sinteze i povećane razgradnje.

Rezultati naše studije pokazuju da je tretman URB597 smanjio nivo ekspresije MAO-A i COMT u mPFC i u hipokampusu stresiranih mužjaka. URB597 nije doveo do značajnih promena u nivou ekspresije ispitivanih enzima kod stresiranih ženki ni u jednoj od ove dve proučavane strukture. Dobijeni rezultati sugerišu da je URB597 kod stresiranih mužjaka smanjio ekspresiju ovih enzima, što je uticalo na smanjenu enzimsku degradaciju noradrenalina, i na taj način doprinelo povećanju količine ovog neurotransmitera.

Na osnovu prethodnih rezultata možemo zaključiti da je smanjeni nivo noradrenalina u mPFC u uslovima hroničnog stresa najverovatnije posledica smanjene sinteze, odnosno smanjene ekspresije DBH, kao i povećane razgradnje posredstvom MAO-A kod životinja oba pola i putem COMT kod mužjaka. U hipokampusu se takođe primećuje veza između smanjene količine NA i smanjene ekspresije TH, kao i povećane ekspresije MAO i COMT kod oba pola. S obzirom da je URB597 kod stresiranih mužjaka povećao ekspresiju DBH u mPFC i TH u hipokampusu i da je smanjio ekspresiju MAO-A i COMT u mPFC i MAO-A u hipokampusu, što je uticalo na povećanje nivoa NA, a budući da kod stresiranih ženki nije delovao ni na jedan od ovih parametara, može se pretpostaviti da endokanabinoidi deluju polno-specifično na promet noradrenalina.

Kateholamini ispoljavaju svoje dejstvo preko adrenalinskih i dopaminskih receptora. Naši rezultati su pokazali da šestonedeljno izlaganje životinja CUS dovodi do smanjenja ekspresije  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora u mPFC pacova muškog pola, dok ne utiče na njihovu ekspresiju kod ženki. Sa druge strane, CUS je samo kod ženki smanjio ekspresiju  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora u hipokampusu. Seo i saradnici [475] su pokazali da ponovljeno svakodnevno izlaganje pacova elektrokonvulzivnim šokovima u periodu od 12 dana dovodi do smanjenja ekspresije  $\beta$ -adrenalinskih receptora u frontalnom korteksu, hipokampusu i limbičkom sistemu. Porterfield i kolege [476] su takođe, pokazali da hronični blagi nepredvidivi stres dovodi do smanjenja ekspresije  $\beta$ -receptora u PFC, hipotalamusu, hipokampusu i bademastim jedrima glodara. Ovi autori su istovremeno pokazali da taj tip stresa povećava i nivo IL-1 $\beta$  u bademastim jedrima, što je posredovano aktivacijom  $\beta$ -receptora u mozgu.

Veliki broj naučnika smatra da je inflamacija jedan od ključnih faktora odgovornih za nastanak depresije. Kod beskućnika, čiji je životni stil takav da su izloženi velikoj količini stresnih situacija u životu, uočena je smanjena gustina  $\beta$ -adrenalinskih receptora na limfocitima [477].

Promene u ekspresiji kateholaminskih receptora povezane su sa promenama u memoriji. Veruje se da je neuronska osnova formiranja memorije ojačavanje ili slabljenje njihovih sinapsi. Pokazano je da su dugoročna potencijacija (eng. *long-term potentiation*, LTP), i dugoročna depresija (eng. *long-term depression*, LTD) u hipokampusu uključene u sticanje novih informacija [478]. Aktivacija adrenalinskih ili dopaminskih receptora može dovesti do pojačane LTP, koja pozitivno utiče na radnu memoriju, kao i na konsolidaciju memorije [479, 480]. Postoje dokazi da su  $\beta_2$ -adrenalinski receptori od ključnog značaja za obradu sećanja koja su povezana sa jakim emocijama. Akutna inhibicija  $\beta$ -receptora njihovim antagonistom propranololom, značajno smanjuje sposobnost ljudi da se sete emotivnih dešavanja [481]. *Knockout* miševi koji imaju nedostatak noradrenalina, pokazuju oštećenu memoriju koja je vezana za kontekstualni strah. Ovaj deficit u memoriji se može preduprediti akutnom aplikacijom noradrenalina pre testiranja memorije. Poboljšanje memorije je u ovoj situaciji zahtevalo aktivaciju  $\beta$ -adrenalinskih receptora, ali ne i  $\alpha$ -adrenalinskih receptora [482].

Rezultati naše studije su pokazali da je CUS smanjio ekspresiju D1-dopaminskih receptora u mPFC samo kod mužjaka, kao i u hipokampusu kod oba pola, dok nije uticao na ekspresiju D2-dopaminskih receptora. Nekoliko studija je ukazalo na značajnu ulogu dopaminskih D1 receptora u poremećajima raspoloženja. Aleekshenko i saradnici [483] su primenom D1/D2 antagonista utvrdili da D1 receptori posreduju u nastanku i razvoju depresije u modelu stresa socijalnog poraza, kao i da je nakon 20 dana izlaganja glodara ovom tipu stresa, smanjena gustina D1 receptora u *nucleus accumbens*. Uloga D1 receptora u stresu i depresiji je dalje potvrđena činjenicom da miševi sa nefunkcionalnim D1 receptorom značajno više izbegavaju socijalne kontakte od *wild type* miševa u stresu socijalnog poraza [484].

Dopaminska neurotransmisija je od ključne važnosti za prostorno učenje i sinaptičku plastičnost. Dopamin utiče na radnu memoriju preko svojih D1 receptora na način koji bi se najbolje mogao opisati grafikonom koji ima oblik obrnutog slova „U“ – i blokada i preterana stimulacija D1 receptora dovode do deficita u prostornoj radnoj memoriji [166]. Kod pacova koji su lišeni majčinske nege u juvenilnom periodu i imaju smanjenu gustinu D1 receptora u mPFC i oštećenu memoriju, aplikacija agoniste D1 receptora poboljšava njihovu memoriju [485].

Na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da su promene ekspresije  $\beta_2$ -adrenalinskih i D1-dopaminskih receptora tokom CUS polno specifične. Smanjena količina ovih receptora u mPFC i hipokampusu ukazuje na promenjenu neurotransmisiju tokom hroničnog stresa i depresije koja može uticati na memoriju.

Rezultati naše studije pokazuju da je URB597 povećao ekspresiju  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora u mPFC i D1-dopaminskih receptora u mPFC i hipokampusu stresiranih pacova muškog pola. Nasuprot tome, u hipokampusu stresiranih ženki, URB597 nije povećao ekspresiju  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora ali je povećao ekspresiju D1-dopaminskih receptora. Povećanje količine kateholaminskih receptora nakon tretmana URB597 kod mužjaka može imati nekoliko pozitivnih efekata. Pokazano je da noradrenalin u

ćelijskoj kulturi, preko  $\beta_2$ -receptora, povećava proliferaciju neuronskih prekursorskih ćelija poreklom iz dentatnog girusa pacova ali to još nije potvrđeno *in vivo* [486]. Maity i saradnici [487] su pokazali da noradrenalinska aktivacija  $\beta$ -adrenalinskih receptora utiče na duže trajanje indukovane LTP. Stimulacija  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora aktivira ERK/MAPK signalni put koji ima važnu ulogu u modulaciji transkripcije proteina i pojačanju sinaptičke plastičnosti, što doprinosi formiranju dugoročne memorije [488-490]. Ova istraživanja impliciraju da bi povećana ekspresija  $\beta_2$ -receptora mogla pozitivno uticati na povećanje neurogeneze i sinaptičke plastičnosti u mozgu, kao i na formiranje dugoročne memorije.

Prethodna istraživanja sugerišu da stimulacija D1 dopaminskih receptora ima ključnu ulogu u mehanizmu dejstva nekih antidepresiva [491, 492]. Određeni agonisti dopaminskih receptora pokazuju antidepresivno dejstvo u kliničkim studijama [493]. Nedavna studija je pokazala da noradrenalin, u mikromolarnoj koncentraciji, može pored aktivacije  $\beta$ -adrenalinskih receptora aktivirati i D1 receptore, i na taj način indukovati plastičnost hipokampusa [494]. S obzirom da D1 dopaminski i  $\beta_2$ -adrenalinski receptori imaju značajnu ulogu u kogniciji i formiranju memorije indukcijom LTP, možemo pretpostaviti da povećana ekspresija tih receptora, indukovana URB597 u ispitivanim moždanim regionima pacova, može poboljšati učenje i memoriju.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti postojanje polno specifičnih razlika u reagovanju različitih regiona mozga na hronično izlaganje stresu kao i postojanje kompleksne regulacije kateholaminskog sistema. Naši rezultati sugerišu da se mužjaci i ženke različito adaptiraju na stres, kao i da su ženke mnogo osjetljivije na hronični nepredvidivi stres od mužjaka. Uočavamo i polno specifične razlike u dejstvu URB597 na ekspresiju enzima sinteze, razgradnje i  $\beta_2$ -adrenalinskih i D1-dopaminskih receptora. Za razliku od mužjaka, URB597 nije u potpunosti otklonio anksioznost, niti povratio redukovani nivo noradrenalina, te nije uticao na enzime degradacije i receptore u mPFC i hipokampusu pacova ženskog pola.

### **5.3. Uticaj URB597 na nivo proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$ i IL-6 i antiinflamatornog citokina IL-10 u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS**

Uočene promene u kateholaminskoj signalizaciji i njihovom metabolizmu delimično se mogu objasniti direktnim efektima endokanabinoida na ispitivane komponente kateholaminskog sistema. Međutim, s obzirom na to da uticaj URB597 na istraživane parametre ne objašnjava u potpunosti sve detalje promena u kateholaminskoj signalizaciji, kao ni sve aspekte promena u ponašanju eksperimentalnih životinja, u daljem istraživanju ispitivan je uticaj URB597 na pro- i antiinflamatorne citokine u hipokampusu i mPFC.

Istraživanja su pokazala da između citokina i kateholaminskog neurotransmiterskog sistema postoji dvosmerna veza. Proinflamatorni citokini mogu uticati na mnogobrojne aspekte kateholaminskog metabolizma, poput smanjenja njihove sinteze, pakovanja u granule i oslobađanja, ili

pak povećanja ponovnog preuzimanja, što može dovesti do redukovane kateholaminske neurotransmisije [22, 424]. Sa druge strane, simpatička neurotransmisija može da moduliše balans citokina u CNS i na periferiji. Čelije imunskog sistema eksprimiraju različite monoaminske receptore, i aktivacijom ovih receptora reguliše se proizvodnja citokina i drugih inflamatornih medijatora [495].

Pored toga, citokini mogu imati značajnu ulogu u modulaciji ponašanja. Proinflamatorni citokini mogu narušiti neurotransmisiju i nervnu plastičnost unutar regulatornih moždanih puteva koji su odgovorni za emocije. Brojne studije na životinjama su pokazale povezanost između koncentracije proinflamatornih citokina i depresije [56].

Naša studija je pokazala da postoje polne razlike u nivou citokina u mozgu, kako u bazalnim uslovima tako i tokom stresnog odgovora. Koncentracija IL-6 u mPFC i IL-10 u hipokampusu bila je veća kod kontrolnih nestresiranih ženki. Poznato je da polni hormoni mogu uticati na produkciju citokina [496]. Koncentracija IL-6 u serumu može varirati tokom menstrualnog ciklusa žena, a pokazano je da *in vitro*, u kulturi ćelija celokupne krvi tretirane lipopolisaharidima, dodavanje  $\beta$ -estradiola dodatno povećava lučenje IL-6. [497].

Nakon izlaganja životinja CUS, koncentracija IL-6 i ekspresija IL-1 $\beta$  bile su značajno povećane u mPFC i hipokampusu životinja muškog pola. Stresirane ženke su pokazivale povećanu ekspresiju IL-1 $\beta$  u hipokampusu i mPFC, dok je koncentracija IL-6 bila povećana samo u hipokampusu. Postoji veliki broj dokaza o značajnoj ulozi IL-6 u patogenezi depresije. Koncentracija ovog citokina je najčešće povećana u uzorcima krvi pacijenata koji boluju od depresije [37, 498]. Mnogi naučnici smatraju da inflamacija i povećan nivo proinflamatornih citokina prethode pojavi simptoma depresije [56]. Još jedan dokaz o ulozi IL-6 u depresiji je činjenica da su nivoi IL-6 u perifernoj cirkulaciji u pozitivnoj korelaciji sa težinom simptoma kod pacijenata koji ne reaguju na terapiju antidepresivima [499]. Animalne studije su takođe uglavnom koinzistentne sa ovim podacima – pacovi koji su bili izloženi hroničnom blagom stresu pokazuju anhedoniju i povećane nivoe proinflamatornih citokina, uključujući IL-6 i IL-1 $\beta$  [500-502]. Aplikacija IL-1 $\beta$  u mozak pacova izaziva ponašanje nalik depresivnom, groznicu i stimulaciju HPA osovine [503]. Voorhees i saradnici [504] su pronašli da je ponovljeni stres ograničenog kretanja kod glodara povećao ekspresiju IL-6 u cirkulaciji i smanjio ekspresiju IL-10 u korteksu i hipokampusu. Rezultati ove disertacije su pokazali da je CUS povećao nivo IL-10 u mPFC mužjaka pacova i smanjio nivo ovog citokina u hipokampusu ženki. Sniženi nivo IL-10 u hipokampusu stresiranih ženki u našem istraživanju je u saglasnosti sa rezultatima Labake i saradnika [505]. Ovi autori su u hipokampusu pronašli smanjenu ekspresiju IL-10 i povećano otpuštanje monoamina kod ženki miševa izloženih hroničnom stresu socijalne nestabilnosti (eng. *social instability stress*). Literaturni podaci ukazuju na istovremeno povećanje nivoa IL-6 i smanjenje nivoa IL-10 kod osoba koje pate od depresije, što sugeriše da bi ovaj disbalans između pro- i antiinflamatornih citokina mogao biti odgovoran za dugotrajne promene u mozgu [506, 507]. Poremećaji u nivou antiinflamatornog IL-10 mogu da utiču na simptome depresije usled nemogućnosti uspostavljanja antiinflamatornog balansa koji predstavlja protivtežu povećanom prisustvu proinflamatornih medijatora [508]. Osim toga, IL-10 je važan za regulaciju HPA osovine jer suprimira produkciju steroidnih hormona, indukovanu adrenokortikotropnim hormonom. Nedostatak IL-10 može potencijalno doprineti hiperaktivnosti HPA osovine i glukokortikoidnoj rezistenciji koja je primećena

kod depresivnih pacijenata [509, 510]. Naši podaci ukazuju na polno specifične razlike u količini citokina u odgovoru na hroničan stres. Na osnovu prikazanih rezultata može se pretpostaviti da bi povećan nivo antiinflamatornog IL-10 kod mužjaka mogao biti zaštitni faktor od preterane inflamacije i jedan od mehanizama kojim se objašnjava njihova manja podložnost ponašanju nalik depresivnom u odnosu na ženke u istom animalnom modelu depresije.

Endokanabinoidi imaju važnu ulogu u zaštiti neurona od inflamacije [511, 512]. Naši eksperimentalni rezultati su pokazali da tretman URB597 smanjuje nivo IL-6 u hipokampusu, kao i nivo IL-1 $\beta$  u mPFC i hipokampusu stresiranih životinja oba pola. Slično našim rezultatima, Rivera i kolege [513] su pokazali da URB597 može smanjiti nivo iRNK za IL-6 u mikroglijskim ćelijama hipokampusa. Lisboa i saradnici [514] su takođe pokazali da kanabinoidni agonist, WIN55,212-2, smanjuje neuroinflamaciju i simptome nalik anksioznim kod miševa izloženih ponovljenom stresu socijalnog poraza. Takođe, pokazano je da anadamid *in vitro* može smanjiti neurotoksičnost tako što preko CB2 receptora smanjuje nivo IL-1 $\beta$  i IL-6 u aktiviranoj mikrogliji [515]. URB597 nije imao efekta na ekspresiju IL-10 u mPFC i hipokampusu stresiranih pacova oba pola. Uprkos tome što smo pronašli da inhibicija FAAH nema uticaja na IL-10, literaturni podaci pokazuju da anadamid može povećati produkciju IL-10 u ćelijama mikroglije preko aktivacije CB2 receptora [516, 517]. Pronađeno je da se enzim razgradnje endokanabinoida, FAAH, preterano eksprimira u astrocitima i mikrogliji tokom određenih neuroinflamatornih procesa, što smanjuje količinu endokanabinoida i potencijalno doprinosi oštećenju nervnog sistema [518]. Naši rezultati pokazuju da URB597 nije uticao na količinu IL-10 ali je redukovao povećanu količinu IL-6 i IL-1 $\beta$  kod stresiranih životinja oba pola, te je na taj način ostvario protektivnu ulogu od štetnog dejstva inflamacije.

#### **5.4. Uticaj URB597 na MAPK i PI3K signalne puteve u mPFC i hipokampusu pacova oba pola izlaganih CUS**

Kliničke i eksperimentalne studije ukazuju da su izmenjeni i poremećeni signalni putevi u moždanim regionima povezani sa nastankom i progresijom depresije. MAPK signalni putevi regulišu širok spektar ćelijskih funkcija, pa tako između ostalog utiču i na razvoj inflamacije tokom stresa [243]. Pored toga, MAP kinaze se ekspimiraju na postmitotskim neuronima u mozgu adultnih sisara, gde reaguju na promene u sinaptičkoj aktivnosti i regulišu aktivnost neurona i sinaptičku plastičnost [234]. Najpoznatija subfamilija MAPK predstavlja ERK1/2, koja primarno reguliše kontrolu ćelijske proliferacije, diferencijacije i preživljavanja [245]. Uloga p38 MAPK signalnog molekula je izraženija u svojstvu posrednika prilikom ćelijskog stresa, poput inflamacije i apoptoze [519]. Naša studija ukazuje na polno specifične promene u aktivaciji ERK1/2 i p38 signalnih puteva u mozgu pacova tokom hroničnog nepredvidivog stresa. CUS je značajno smanjio fosforilaciju ERK1/2 u mPFC pacova oba pola, kao i u hipokampusu stresiranih ženki. ERK1/2 signalni put je usko povezan sa preživljavanjem nervnih i glijskih ćelija u uslovima ćelijskog stresa. Publikovani radovi ukazuju na smanjenu aktivaciju i ekspresiju ERK1/2 MAP kinaze u različitim regionima mozga u animalnim



modelima depresije i u humanoj populaciji pacijenata koji boluju od te bolesti. Dwivedi i saradnici [520] su otkrili da je nivo iRNK za ERK1/2, kao i ekspresija ERK1/2 značajno smanjen u *post mortem* uzorcima PFC i hipokampusa žrtava suicida koje su patile od depresije. Ovi autori su pokazali i povećanu ekspresiju MAP kinazne fosfataze MKP2 u istim regionima mozga. MKP2 negativno reguliše ERK signalnu kaskadu, dualnom defosforilacijom na treoninskim i tirozinskim aminokiselinskim ostacima na aktivacionom mestu ERK. Smanjena fosforilacija ERK1/2 u mPFC oba pola i hipokampusu stresiranih ženki u našoj studiji je u skladu sa više prekliničkih istraživanja koja su pokazala da hronično izlaganje različitim modelima stresa dovodi do smanjenja nivoa fosforilisanog ERK1/2 u PFC, hipokampusu i frontalnom korteksu [247, 249, 521]. Smatra se da ERK signalni put posreduje u izmeni ponašanja tokom depresije. Naime, hronična farmakološka inhibicija ERK signalnog puta, aplikacijom MEK inhibitora U0126 u dorzalni hipokampus dovodi do anhedonije i ponašanja nalik anksioznom [250]. Takođe, potpuna inhibicija ERK signalizacije inhibitorom PD184161, dovodi do ponašanja nalik depresivnom u testu prinudnog plivanja i testu suspenzije repa [522]. Rezultati ove doktorske studije su pokazali da izlaganje mužjaka CUS nije dovelo do promene u aktivaciji ovog signalnog puta u hipokampusu. Možemo pretpostaviti da razlike u nivou fosforilacije ERK1/2 u hipokampusu stresiranih mužjaka i ženki mogu nastati usled polno specifične modulacije transkripcionih faktora i transkripcionih supresora. Tana i kolege [523] smatraju da razlike u aktivaciji ERK1/2 kod mužjaka i ženki pacova mogu biti odgovorne za polne razlike u indukciji plastičnosti hipokampusa, čime bi se potencijalno mogao objasniti polno specifičan uticaj CUS na memoriju pacova u našem eksperimentu. Postoji i mogućnost da su polno specifične promene fosforilisanog ERK1/2 u hipokampusu tokom CUS posledica izmenjenog nivoa dopamina. Dopamin, pored svojih drugih fizioloških funkcija, ima ulogu i u regulaciji ERK signalizacije u hipokampusu, budući da je pokazano da agonista D2-dopaminskih receptora, kvinpirol, može da izazove povećanje fosforilacije ERK [524]. Naše istraživanje je pokazalo da CUS dovodi do povećanja nivoa dopamina u hipokampusu mužjaka, dok je kod stresiranih ženki nivo dopamina smanjen. Stoga bi jedno od mogućih objašnjenja moglo da bude to da smanjenje koncentracije dopamina u hipokampusu ženki tokom CUS utiče na smanjenje fosforilacije ERK1/2.

MAPK p38 signalni molekul utiče na veliki broj ćelijskih funkcija poput ćelijskog rasta, smrti, proliferacije, diferencijacije i regulacije citokina [525, 526]. Postoji sve veći broj dokaza da je taj signalni put povezan sa promenama u ponašanju tokom depresije, kako zbog svojih svojih proinflamatornih svojstava, tako i zbog uticaja na funkciju serotoninskog transportera [527]. Pokazano je da se ponašanje nalik depresivnom izazvano izlaganjem endotoksinu kao i povećana aktivnost serotoninskog transportera, može preduprediti p38 antagonistom, SB203580 [528]. Prethodno smo pokazali da CUS dovodi do povećanja nivoa IL-1 $\beta$  u ispitivanim strukturama mozga pacova oba pola. Maturacija i sekrecija IL-1 $\beta$  zavisi od aktivacije NLRP3 inflamazoma. Su i saradnici [502, 529] su pokazali da NLRP3 inflamazom može da utiče na aktivaciju p38 MAP kinaza u hipokampusu, implicirajući da je taj signalni put odgovoran za inflamatorne efekte IL-1 $\beta$  i NLRP3 inflamazoma u ponašanju nalik depresivnom. Rezultati ove studije pokazuju povećanu aktivnost p38 u mPFC pacova oba pola izloženih CUS, kao i u hipokampusu CUS ženki. Naši rezultati su u skladu sa nedavnim studijama koje su pokazale povećanje ekspresije fosforilisanog p38 u *post mortem* uzorcima dorzolateralnog PFC ljudi sa kliničkom depresijom [530]. Povećana fosforilacija p38 takođe je

detektovana u hipokampusu adolescentnih miševa izloženih stresu hladnoće [531]. Grassme i saradnici [532] su pokazali da produženo tretiranje miševa kortikosteronom dovodi do povećanja aktivacije p38 u hipokampusu, kao i do smanjenja neurogeneze i ponašanja nalik depresivnom. Oba ta efekta mogu da se spreče farmakološkom inhibicijom p38 kinaze. Pored toga što p38 može da stimuliše ekspresiju serotoniniskog transportera, p38 može da poremeti transaktivaciju glukokortikoidnog receptora, što može doprineti glukokortikoidnoj rezistenciji koja je česta u depresiji [261]. Pokazano je takođe da p38 može smanjiti ekspresiju BDNF, koji je ključan za plastičnost neurona i čija je poremećena regulacija u depresiji odavno poznata [262, 533].

PI3K signalni put reguliše ćelijski metabolizam, angiogenezu, ćelijski rast i preživljavanje, kao i sinaptičku potencijaciju [534]. Sve veći broj studija pokazuje da je PI3K/Akt signalni put uključen u patogenezu depresije. Šta više, ranije opisana hipoteza neurogeneze i neuroplastičnosti stavlja ovaj signalni put u fokus, s obzirom na to da PI3K/Akt ima značajnu ulogu u sinaptogenezi i plastičnosti nervnog sistema, koja se ogleda u direktnom uticaju na kompleksnost dendritske mreže, broj i oblik dendritskih trnova [120]. S tim u vezi, smanjena enzimska aktivnost PI3K i Akt je pronađena u hipokampusu miševa izloženih hroničnom blagom nepredvidivom stresu i u PFC žrtava suicida koje su patile od depresije [535, 536]. Indukcija LTP u hipokampusu, koja se inicira preko N-metil-d-aspartatnih (NMDA) receptora, kao i pokretanje LTD, koje se inicira preko metabotropnih glutamatnih receptora, posredovani su PI3K signalnim putem [537, 538]. Aktivirana PI3K kinaza fosforiliše i aktivira Akt, koji je jedan od najvažnijih nishodnih molekula u toj signalnoj kaskadi [539]. Naša studija je pokazala da hronično izlaganje pacova nepredvidivim stresorima dovodi do smanjenja fosforilacije Akt u mPFC i hipokampusu pacova oba pola. Ovo je u skladu sa prethodnim studijama koje su u CUS modelu depresije takođe pokazale smanjenu fosforilaciju Akt u PFC, hipokampusu i bademastim jedrima [540-542]. Prethodna istraživanja na Akt2 *knockout* miševima su pokazala da i homozigotne i heterozigotne životinje pokazuju ponašanje nalik anksioznom i deficite u učenju koje zavisi od aktivnosti hipokampusa [543]. Na osnovu iznetih rezultata može se pretpostaviti da bi smanjena aktivacija Akt signalnog puta u ovom modelu depresije mogla doprineti poremećenoj funkciji hipokampusa, što potencijalno, pored narušenog balansa u nivou i prometu kateholamina, može predstavljati faktor koji je pospešio ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom i narušio memoriju hronično stresiranih pacova u našem eksperimentu.

Efikasnost antidepresiva zavisi od njihovog kapaciteta da stimulišu ERK signalni put u mozgu [544]. Naši rezultati pokazuju polno specifične efekte URB597 na ERK i p38 signalizaciju u mPFC i hipokampusu. Dvonedeljni tretman URB597 povećao je fosforilaciju ERK1/2 u mPFC pacova oba pola i u hipokampusu hronično stresiranih mužjaka. URB597 nije uticao na fosforilaciju ERK1/2 u hipokampusu stresiranih ženki. URB597 je takođe smanjio fosforilaciju p38 u mPFC hronično stresiranih životinja oba pola i u hipokampusu pacova ženskog pola, dok nije uticao na aktivaciju p38 u hipokampusu mužjaka. Pokazano je da 2-AG utiče na ekspresiju glutamin sintetaze u astrocitima nakon tretmana lipopolisaharidom, preko p38 i ERK1/2 signalnih puteva, održavajući je na stabilnom nivou i ostvarujući protektivnu ulogu [545]. Treba napomenuti da, iako nema literaturnih podataka o dejstvu URB597 na MAPK signalni put u depresiji, postoji veći broj istraživanja o interakciji klasičnih antidepresiva sa njim. Tretman fluoksetinom smanjuje nivo fosforilisanog p38 u habenularnom jedru međumozga i ublažava simptome nalik depresiji koje izaziva neuroinflamacija kod pacova. Sličan

efekat je moguće postići direktnom farmakološkom blokadom p38 puta [262]. Takođe, tretman antidepresivima smanjuje fosforilaciju p38 u hipokampusu eksperimentalnih životinja koje ispoljavaju ponašanje karakteristično za depresiju koja je izazvana hroničnom infuzijom glukokortikoida [532]. Interesantno je da alternativna metoda lečenja depresije, elektroakupunktura, takođe deluje preko normalizacije ERK1/2 i p38 signalnih puteva u hipokampusu [546]. Supstance izolovane iz biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini ispoljavaju antidepresivne efekte preko povećanja aktivacije ERK1/2 signalnog puta [547, 548]. Međutim, ovo je prvo istraživanje koje direktno pokazuje da URB597 deaktivira p38 signalni put i verovatno na taj način ostvaruje pozitivne efekte na ponašanje karakteristično za depresiju.

Na kraju, tretman URB597 je povećao fosforilaciju Akt, odnosno aktivaciju Akt signalnog puta u hipokampusu pacova oba pola izloženih CUS. Prekliničke studije su pokazale da PI3K/Akt signalni put može biti jedan od mehanizama kojima supstance poput ferulične kiseline i kreatina ostvaruju antidepresivne efekte [549, 550]. Iako nema literaturnih podataka o dejstvu URB597 na ovaj signalni put u depresiji, nekoliko istraživanja je pokazalo da URB597 može ostvariti protektivno dejstvo kod hronične cerebralne hipoperfuzije glodara, aktivacijom komponenata PI3K/Akt kaskade [551, 552]. Smatra se da u tim uslovima aktivacija PI3K/Akt sprečava apoptozu nervnih ćelija, promoviše energetske metabolizam i neurogenezu, te na taj način smanjuje kognitivni deficit izazvan ovim patološkim stanjem. Poznato je da aktivacija CB1 receptora stimuliše PI3K/Akt put u hipokampusu, striatumu i cerebellumu miša *in vivo*, što doprinosi neuroprotektivnim efektima kanabinoida [553]. Ipak, trebalo bi napomenuti da u našem eksperimentu tretman URB597 nije uticao na fosforilaciju Akt u mPFC kod stresiranih pacova oba pola.

Na osnovu takvih rezultata možemo zaključiti da tretman URB597 na polno specifičan način reguliše MAPK signalni put u mozgu hronično stresiranih pacova. Ovi rezultati pružaju uvid u mehanizme dejstva endokanabinoida i omogućuju bolje razumevanje potencijalnih uzroka polnih razlika i regionalne specifičnosti u endokanabinoidnoj signalizaciji. Dobijeni rezultati doprinose boljem razumevanju uloge endokanabinoidnog sistema u depresiji i otvaraju put ka novim terapijskim pristupima u lečenju afektivnih poremećaja.

## 6. Zaključak

Izlaganje pacova hroničnom nepredvidivom stresu dovelo je do:

- ispoljavanja ponašanja nalik depresivnom i anksioznom koje je bilo izraženije kod ženki;
- deficita u radnoj, kratkoročnoj i dugoročnoj memoriji koji su bili polno specifični;
- polno i regionalno specifičnih razlika u promenama koncentracije kateholamina u mozgu, i to: povećanja koncentracije dopamina u mPFC životinja oba pola i hipokampusu mužjaka, i njegovog smanjenja u hipokampusu ženki, te smanjenja koncentracije noradrenalina u obe moždane strukture pacova oba pola;
- povećanja ekspresije TH u mPFC mužjaka, smanjenja ekspresije TH u hipokampusu pacova oba pola, kao i smanjenja ekspresije DBH u mPFC pacova oba pola;
- povećanja ekspresije enzima degradacije kateholamina: povećanja ekspresije MAO-A u mPFC i hipokampusu pacova oba pola, povećanja ekspresije COMT u mPFC mužjaka i u hipokampusu životinja oba pola;
- smanjenja ekspresije  $\beta_2$ -adrenalinskih receptora u mPFC mužjaka i hipokampusu ženki, kao i smanjenja ekspresije D1-receptora u mPFC mužjaka i hipokampusu životinja oba pola;
- povećanja koncentracije proinflamatornog citokina IL-6 u mPFC mužjaka i hipokampusu životinja oba pola, kao i povećanja ekspresije IL-1 $\beta$  u hipokampusu i mPFC životinja oba pola;
- povećanja koncentracije antiinflamatornog IL-10 u mPFC mužjaka i njegovog smanjenja u hipokampusu ženki;
- smanjenja aktivacije ERK1/2 signalnog puta u mPFC pacova oba pola i u hipokampusu ženki
- povećanja aktivacije p38 MAPK signalnog puta u hipokampusu ženki i mPFC pacova oba pola
- smanjenja aktivacije PI3K/Akt signalnog puta u ispitivanim moždanim strukturama životinja oba pola

Dvonedeljni tretman stresiranih pacova inhibitorom hidrolaze masnokiselinskih amida je:

- pokazao antidepresivno i anksiolitičko dejstvo koje je bilo izraženije kod mužjaka
- ispoljio pozitivne, polno specifične efekte na radnu, kratkoročnu i dugoročnu memoriju pacova
- ublažio povećanje koncentracije dopamina u mPFC životinja oba pola
- normalizovao koncentraciju noradrenalina u obe ispitivane strukture samo kod mužjaka
- polno specifično delovao na ekspresiju enzima biosinteze kateholamina, sprečivši promenu količine TH u hipokampusu i DBH u mPFC samo kod mužjaka
- normalizovao ekspresiju enzima razgradnje kateholamina, MAO-A i COMT u obe strukture mozga samo kod životinja muškog pola

- povećao ekspresiju  $\beta$ 2-adrenalinskog receptora u mPFC i D1-dopaminskog receptora u mPFC i hipokampusu mužjaka, kao i D1-receptora u hipokampusu ženki
- ispoljio antiinflamatorno dejstvo, smanjivši koncentraciju IL-6 u hipokampusu stresiranih pacova oba pola i ekspresiju IL-1 $\beta$  u obe ispitivane strukture životinja oba pola;
- normalizovao MAPK aktivaciju u mozgu pacova izloženih CUS, povećavši fosforilaciju ERK1/2 u mPFC pacova oba pola i hipokampusu mužjaka, i smanjivši fosforilaciju p38 u mPFC pacova oba pola i hipokampusu ženki
- delovao specifično za region mozga na PI3K/Akt signalni put tako što je povećao aktivaciju Akt1/2/3 samo u hipokampusu stresiranih pacova oba pola

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju može se izvesti generalni zaključak da endokanabinoidi ispoljavaju antidepresivna i anksiolitička svojstva kod oba pola, iako je efekat izraženiji kod mužjaka. Neurohemijski parametri sugerišu da je mogući mehanizam njihovog antidepresivnog dejstva regulacija proinflamatornih citokina u hipokampusu i mPFC kod životinja oba pola, kao i modulacija kateholaminske signalizacije i MAPK i PI3K/Akt signalnih puteva u mozgu na regionalno i polno-specifičan način.

## 7. Literatura

1. *World mental health report: transforming mental health for all*. 2022, Geneva: World Health Organization.
2. Santomauro, D.F., et al., *Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic*. The Lancet, 2021. **398**(10312): p. 1700-1712.
3. Liu, Q., et al., *Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study*. Journal of psychiatric research, 2020. **126**: p. 134-140.
4. Eid, R.S., A.R. Gobinath, and L.A. Galea, *Sex differences in depression: Insights from clinical and preclinical studies*. Progress in neurobiology, 2019. **176**: p. 86-102.
5. Cuijpers, P., A. Stringaris, and M. Wolpert, *Treatment outcomes for depression: challenges and opportunities*. The Lancet Psychiatry, 2020. **7**(11): p. 925-927.
6. Sim, K., et al., *Prevention of relapse and recurrence in adults with major depressive disorder: systematic review and meta-analyses of controlled trials*. International Journal of Neuropsychopharmacology, 2016. **19**(2): p. pyv076.
7. Association, A.P., *Depressive disorders: DSM-5® selections*. 2015: American Psychiatric Pub.
8. Gartlehner, G., et al., *Pharmacological and non-pharmacological treatments for major depressive disorder: review of systematic reviews*. BMJ open, 2017. **7**(6): p. e014912.
9. Beurel, E., M. Toups, and C.B. Nemeroff, *The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble*. Neuron, 2020. **107**(2): p. 234-256.
10. Greenberg, P.E., et al., *The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2010 and 2018)*. Pharmacoeconomics, 2021. **39**(6): p. 653-665.
11. Keshavarz, K., et al., *Economic burden of major depressive disorder: a case study in Southern Iran*. BMC psychiatry, 2022. **22**(1): p. 577.
12. Nemeroff, C.B., *Recent findings in the pathophysiology of depression*. Focus, 2008. **6**(1): p. 3-14.
13. Kim, I.-B., J.-H. Lee, and S.-C. Park, *The relationship between stress, inflammation, and depression*. Biomedicines, 2022. **10**(8): p. 1929.
14. Jesulola, E., P. Micalos, and I.J. Baguley, *Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model-are we there yet?* Behavioural brain research, 2018. **341**: p. 79-90.
15. Jeon, S.W. and Y.-K. Kim, *Molecular neurobiology and promising new treatment in depression*. International journal of molecular sciences, 2016. **17**(3): p. 381.
16. Loomer, H.P., J.C. Saunders, and N.S. Kline, *A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer*. Psychiatric research reports, 1957.
17. Kuhn, R., *The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride)*. American Journal of Psychiatry, 1958. **115**(5): p. 459-464.
18. Lemieux, G., A. Davignon, and J. Genest, *Depressive states during Rauwolfia therapy for arterial hypertension: A report of 30 cases*. Canadian Medical Association Journal, 1956. **74**(7): p. 522.
19. Perez-Caballero, L., et al., *Monoaminergic system and depression*. Cell and tissue research, 2019. **377**: p. 107-113.
20. Schildkraut, J.J., *The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence*. American journal of Psychiatry, 1965. **122**(5): p. 509-522.
21. Coppen, A., et al., *Tryptophan in the treatment of depression*. The Lancet, 1967. **290**(7527): p. 1178-1180.
22. Delgado, P.L., *Depression: the case for a monoamine deficiency*. Journal of clinical Psychiatry, 2000. **61**(6): p. 7-11.

23. Loo, H., et al., *Efficacy and safety of tianeptine in the treatment of depressive disorders in comparison with fluoxetine*. Journal of affective disorders, 1999. **56**(2-3): p. 109-118.
24. Hindmarch, I., *Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods*. European Psychiatry, 2002. **17**(S3): p. 294s-299s.
25. Elhwuegi, A.S., *Central monoamines and their role in major depression*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2004. **28**(3): p. 435-451.
26. Baldessarini, R.J., *Current status of antidepressants: clinical pharmacology and therapy*. The Journal of clinical psychiatry, 1989.
27. Piñeyro, G. and P. Blier, *Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action*. Pharmacological reviews, 1999. **51**(3): p. 533-591.
28. Liu, B., et al., *From serotonin to neuroplasticity: evolution of theories for major depressive disorder*. Frontiers in cellular neuroscience, 2017. **11**: p. 305.
29. Schiepers, O.J., M.C. Wichers, and M. Maes, *Cytokines and major depression*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2005. **29**(2): p. 201-217.
30. Maes, M., et al., *Leukocytosis, monocytosis and neutrophilia: hallmarks of severe depression*. Journal of psychiatric research, 1992. **26**(2): p. 125-134.
31. Smith, R.S., *The macrophage theory of depression*. Medical hypotheses, 1991. **35**(4): p. 298-306.
32. Howren, M.B., D.M. Lamkin, and J. Suls, *Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis*. Psychosomatic medicine, 2009. **71**(2): p. 171-186.
33. Liu, Y., R.C.-M. Ho, and A. Mak, *Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression*. Journal of affective disorders, 2012. **139**(3): p. 230-239.
34. Köhler, C.A., et al., *Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies*. Acta Psychiatrica Scandinavica, 2017. **135**(5): p. 373-387.
35. Munoz, R.F., et al., *Prevention of major depression*. Annual review of clinical psychology, 2010. **6**: p. 181-212.
36. Himmerich, H., et al., *Cytokine research in depression: principles, challenges, and open questions*. Frontiers in psychiatry, 2019. **10**: p. 30.
37. Dowlati, Y., et al., *A meta-analysis of cytokines in major depression*. Biological psychiatry, 2010. **67**(5): p. 446-457.
38. Lamers, F., et al., *Longitudinal association between depression and inflammatory markers: results from the Netherlands study of depression and anxiety*. Biological psychiatry, 2019. **85**(10): p. 829-837.
39. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(5): p. 1111-1119.
40. Bruce, T.O., *Comorbid depression in rheumatoid arthritis: pathophysiology and clinical implications*. Current psychiatry reports, 2008. **10**(3): p. 258-264.
41. Massie, M.J., *Prevalence of depression in patients with cancer*. JNCI Monographs, 2004. **2004**(32): p. 57-71.
42. Anderson, R.J., et al., *The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis*. Diabetes care, 2001. **24**(6): p. 1069-1078.
43. Anisman, H., Z. Merali, and S. Hayley, *Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders*. Progress in neurobiology, 2008. **85**(1): p. 1-74.
44. Jun, T.-Y., et al., *Possible association between G308A tumour necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population*. Psychiatric genetics, 2003. **13**(3): p. 179-181.
45. Wong, M., et al., *Polymorphisms in inflammation-related genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant response*. Molecular psychiatry, 2008. **13**(8): p. 800-812.
46. Yu, Y.W., et al., *Association study of the interleukin-1beta (C-511T) genetic polymorphism with major depressive disorder, associated symptomatology, and antidepressant response*. Neuropsychopharmacology, 2003. **28**(6): p. 1182-1185.

47. Kaster, M.P., et al., *Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice*. *Neuropharmacology*, 2012. **62**(1): p. 419-426.
48. Felger, J.C., et al., *Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression*. *Biological psychiatry*, 2007. **62**(11): p. 1324-1333.
49. Hauser, P., et al., *A prospective study of the incidence and open-label treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C*. *Molecular psychiatry*, 2002. **7**(9): p. 942-947.
50. Kraus, M.R., et al., *Psychiatric symptoms in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b therapy*. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2003. **64**(6): p. 708-714.
51. Pavlović, Z., et al., *Depressive symptoms in patients with hepatitis C treated with pegylated interferon alpha therapy: a 24-week prospective study*. *Psychiatria Danubina*, 2011. **23**(4.): p. 370-377.
52. Hwang, J., et al., *Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants*. *Neuropharmacology*, 2008. **55**(5): p. 826-834.
53. Hannestad, J., N. DellaGioia, and M. Bloch, *The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis*. *Neuropsychopharmacology*, 2011. **36**(12): p. 2452-2459.
54. Mándi, Y., et al., *Multiple Implications of the Kynurenine Pathway in Inflammatory Diseases: Diagnostic and Therapeutic Applications*. 2022, Frontiers Media SA. p. 860867.
55. Schwarcz, R. and T.W. Stone, *The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises*. *Neuropharmacology*, 2017. **112**: p. 237-247.
56. Roohi, E., N. Jaafari, and F. Hashemian, *On inflammatory hypothesis of depression: what is the role of IL-6 in the middle of the chaos?* *Journal of neuroinflammation*, 2021. **18**(1): p. 1-15.
57. Dantzer, R., et al., *From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain*. *Nature reviews neuroscience*, 2008. **9**(1): p. 46-56.
58. Slavich, G.M. and M.R. Irwin, *From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression*. *Psychological bulletin*, 2014. **140**(3): p. 774.
59. Slavich, G.M. and J. Sacher, *Stress, sex hormones, inflammation, and major depressive disorder: Extending Social Signal Transduction Theory of Depression to account for sex differences in mood disorders*. *Psychopharmacology*, 2019. **236**(10): p. 3063-3079.
60. Capuron, L. and A.H. Miller, *Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications*. *Pharmacology & therapeutics*, 2011. **130**(2): p. 226-238.
61. Boufidou, F., et al., *CSF and plasma cytokines at delivery and postpartum mood disturbances*. *Journal of affective disorders*, 2009. **115**(1-2): p. 287-292.
62. Sasayama, D., et al., *Increased cerebrospinal fluid interleukin-6 levels in patients with schizophrenia and those with major depressive disorder*. *Journal of psychiatric research*, 2013. **47**(3): p. 401-406.
63. Himmerich, H., J. Minkwitz, and K. C Kirkby, *Weight gain and metabolic changes during treatment with antipsychotics and antidepressants*. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 2015. **15**(4): p. 252-260.
64. Himmerich, H., et al., *Plasma levels of leptin and endogenous immune modulators during treatment with carbamazepine or lithium*. *Psychopharmacology*, 2005. **179**: p. 447-451.
65. Allen, J., et al., *Mitochondria and mood: mitochondrial dysfunction as a key player in the manifestation of depression*. *Frontiers in neuroscience*, 2018. **12**: p. 386.
66. Giménez-Palomo, A., et al., *The role of mitochondria in mood disorders: from physiology to pathophysiology and to treatment*. *Frontiers in psychiatry*, 2021. **12**: p. 546801.
67. Budd, S.L. and D. Nicholls, *Mitochondria in the life and death of neurons*. *Essays in Biochemistry*, 2017. **33**: p. 43-52.
68. Todorova, V. and A. Blokland, *Mitochondria and synaptic plasticity in the mature and aging nervous system*. *Current neuropharmacology*, 2017. **15**(1): p. 166-173.
69. Harris, J.J., R. Jolivet, and D. Attwell, *Synaptic energy use and supply*. *Neuron*, 2012. **75**(5): p. 762-777.
70. Kato, T., *Neurobiological basis of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction hypothesis and beyond*. *Schizophrenia research*, 2017. **187**: p. 62-66.



71. Fattal, O., et al., *Psychiatric comorbidity in 36 adults with mitochondrial cytopathies*. CNS spectrums, 2007. **12**(6): p. 429-438.
72. Koene, S., et al., *Major depression in adolescent children consecutively diagnosed with mitochondrial disorder*. Journal of affective disorders, 2009. **114**(1-3): p. 327-332.
73. Morava, E., et al., *Depressive behaviour in children diagnosed with a mitochondrial disorder*. Mitochondrion, 2010. **10**(5): p. 528-533.
74. Wang, Q. and Y. Dwivedi, *Transcriptional profiling of mitochondria associated genes in prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder*. The World Journal of Biological Psychiatry, 2017. **18**(8): p. 592-603.
75. Moretti, A., A. Gorini, and R. Villa, *Affective disorders, antidepressant drugs and brain metabolism*. Molecular psychiatry, 2003. **8**(9): p. 773-785.
76. Martins-de-Souza, D., et al., *Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in post-mortem brains from major depression patients*. Translational psychiatry, 2012. **2**(3): p. e87-e87.
77. Madrigal, J.L., et al., *Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain*. Neuropsychopharmacology, 2001. **24**(4): p. 420-429.
78. Ben-Shachar, D. and R. Karry, *Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression*. PloS one, 2008. **3**(11): p. e3676.
79. Anderson, G., *Linking the biological underpinnings of depression: role of mitochondria interactions with melatonin, inflammation, sirtuins, tryptophan catabolites, DNA repair and oxidative and nitrosative stress, with consequences for classification and cognition*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2018. **80**: p. 255-266.
80. Klinedinst, N.J. and W.T. Regenold, *A mitochondrial bioenergetic basis of depression*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2015. **47**: p. 155-171.
81. Pralong, E., P. Magistretti, and R. Stoop, *Cellular perspectives on the glutamate–monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders*. Progress in neurobiology, 2002. **67**(3): p. 173-202.
82. Sanacora, G., G. Treccani, and M. Popoli, *Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders*. Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 63-77.
83. Trullas, R. and P. Skolnick, *Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions*. European journal of pharmacology, 1990. **185**(1): p. 1-10.
84. Meldrum, B.S., *Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology*. The Journal of nutrition, 2000. **130**(4): p. 1007S-1015S.
85. Hashimoto, K., A. Sawa, and M. Iyo, *Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders*. Biological psychiatry, 2007. **62**(11): p. 1310-1316.
86. Machado-Vieira, R., et al., *Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders*. Current pharmaceutical design, 2009. **15**(14): p. 1595-1611.
87. Harraz, M.M., et al., *Antidepressant action of ketamine via mTOR is mediated by inhibition of nitrenergic Rheb degradation*. Molecular psychiatry, 2016. **21**(3): p. 313-319.
88. Fond, G., et al., *Ketamine administration in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis*. Psychopharmacology, 2014. **231**: p. 3663-3676.
89. Newport, D.J., et al., *Ketamine and other NMDA antagonists: early clinical trials and possible mechanisms in depression*. American Journal of Psychiatry, 2015. **172**(10): p. 950-966.
90. Bremner, J.D., et al., *Hippocampal volume reduction in major depression*. American Journal of Psychiatry, 2000. **157**(1): p. 115-118.
91. Jacobs, B.L., H. Van Praag, and F. Gage, *Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression*. Molecular psychiatry, 2000. **5**(3): p. 262-269.
92. Lee, B.-H. and Y.-K. Kim, *The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment*. Psychiatry investigation, 2010. **7**(4): p. 231.

93. Bramham, C.R. and E. Messaoudi, *BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis*. Progress in neurobiology, 2005. **76**(2): p. 99-125.
94. Lee, B.-H., et al., *Decreased plasma BDNF level in depressive patients*. Journal of affective disorders, 2007. **101**(1-3): p. 239-244.
95. Brunoni, A.R., M. Lopes, and F. Fregni, *A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression*. The International Journal of Neuropsychopharmacology, 2008. **11**(8): p. 1169-1180.
96. Nunes, P.V., et al., *Low brain-derived neurotrophic factor levels in post-mortem brains of older adults with depression and dementia in a large clinicopathological sample*. Journal of affective disorders, 2018. **241**: p. 176-181.
97. Castrén, E. and T. Rantamäki, *The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity*. Developmental neurobiology, 2010. **70**(5): p. 289-297.
98. Cameron, H. and E. Gould, *Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus*. Neuroscience, 1994. **61**(2): p. 203-209.
99. Lee, K.-J., et al., *Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation, of new-born cells in adult rat hippocampus*. Experimental & molecular medicine, 2006. **38**(1): p. 44-54.
100. Van Bokhoven, P., et al., *Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment*. European Journal of Neuroscience, 2011. **33**(10): p. 1833-1840.
101. Pham, K., et al., *Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus*. European Journal of Neuroscience, 2003. **17**(4): p. 879-886.
102. Boldrini, M., et al., *Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(6): p. 1068-1077.
103. Huang, Y., et al., *Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study*. Biological psychiatry, 2013. **74**(1): p. 62-68.
104. Madsen, T.M., et al., *Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy*. Biological psychiatry, 2000. **47**(12): p. 1043-1049.
105. Scott, B.W., J.M. Wojtowicz, and W.M. Burnham, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures*. Experimental neurology, 2000. **165**(2): p. 231-236.
106. Malberg, J.E., et al., *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*. Journal of Neuroscience, 2000. **20**(24): p. 9104-9110.
107. Serafini, G., *Neuroplasticity and major depression, the role of modern antidepressant drugs*. World journal of psychiatry, 2012. **2**(3): p. 49.
108. Cramer, S.C., et al., *Harnessing neuroplasticity for clinical applications*. Brain, 2011. **134**(6): p. 1591-1609.
109. Gotlib, I.H. and J. Joormann, *Cognition and depression: current status and future directions*. Annual review of clinical psychology, 2010. **6**: p. 285-312.
110. De Raedt, R. and E.H. Koster, *Understanding vulnerability for depression from a cognitive neuroscience perspective: A reappraisal of attentional factors and a new conceptual framework*. Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience, 2010. **10**(1): p. 50-70.
111. Beck, A.T. and K. Bredemeier, *A unified model of depression: Integrating clinical, cognitive, biological, and evolutionary perspectives*. Clinical Psychological Science, 2016. **4**(4): p. 596-619.
112. Newton, S.S., et al., *Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(24): p. 10883-10890.
113. Pliakas, A.M., et al., *Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens*. Journal of Neuroscience, 2001. **21**(18): p. 7397-7403.
114. Berton, O., et al., *Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress*. Science, 2006. **311**(5762): p. 864-868.

115. Holsboer, F., *The corticosteroid receptor hypothesis of depression*. *Neuropsychopharmacology*, 2000. **23**(5): p. 477-501.
116. Juruena, M.F., A.J. Cleare, and C.M. Pariante, *The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression*. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 2004. **26**: p. 189-201.
117. Cowen, P.J., *Neuroendocrine and neurochemical processes in depression*. *Psychopathology Review*, 2016. **3**(1): p. 3-15.
118. Anacker, C., et al., *Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis*. *Neuropsychopharmacology*, 2013. **38**(5): p. 872-883.
119. Zobel, A., et al., *Cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test predicts medium-term outcome in patients with remitted depression*. *Am J Psychiatry*, 1999. **156**: p. 949-951.
120. Chávez-Castillo, M., et al., *Depression as a neuroendocrine disorder: emerging neuropsychopharmacological approaches beyond monoamines*. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2019. **2019**.
121. Sandhu, K.V., et al., *Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry*. *Translational Research*, 2017. **179**: p. 223-244.
122. González-Arancibia, C., et al., *Do your gut microbes affect your brain dopamine?* *Psychopharmacology*, 2019. **236**: p. 1611-1622.
123. Whitehead, W.E., O. Palsson, and K.R. Jones, *Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: what are the causes and implications?* *Gastroenterology*, 2002. **122**(4): p. 1140-1156.
124. Ruedert, L., et al., *Bulking agents, antispasmodics and antidepressants for the treatment of irritable bowel syndrome*. *Cochrane database of systematic reviews*, 2011(8).
125. O'Mahony, S.M., et al., *Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses*. *Biological psychiatry*, 2009. **65**(3): p. 263-267.
126. García-Ródenas, C.L., et al., *Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats*. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2006. **43**(1): p. 16-24.
127. Guida, F., et al., *Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice*. *Brain, behavior, and immunity*, 2018. **67**: p. 230-245.
128. Hao, Z., et al., *Faecalibacterium prausnitzii (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats*. *Psychoneuroendocrinology*, 2019. **104**: p. 132-142.
129. Messaoudi, M., et al., *Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers*. *Gut microbes*, 2011. **2**(4): p. 256-261.
130. Rudzki, L., et al., *Probiotic Lactobacillus Plantarum 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study*. *Psychoneuroendocrinology*, 2019. **100**: p. 213-222.
131. Zheng, P., et al., *Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism*. *Molecular psychiatry*, 2016. **21**(6): p. 786-796.
132. Yang, Z., et al., *Updated review of research on the gut microbiota and their relation to depression in animals and human beings*. *Molecular psychiatry*, 2020. **25**(11): p. 2759-2772.
133. Foster, J.A. and K.-A.M. Neufeld, *Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression*. *Trends in neurosciences*, 2013. **36**(5): p. 305-312.
134. Foster, J.A., L. Rinaman, and J.F. Cryan, *Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome*. *Neurobiology of stress*, 2017. **7**: p. 124-136.
135. Simpson, C.A., et al., *The gut microbiota in anxiety and depression—A systematic review*. *Clinical psychology review*, 2021. **83**: p. 101943.

136. Li, Z., et al., *Major depressive disorder: advances in neuroscience research and translational applications*. Neuroscience bulletin, 2021. **37**: p. 863-880.
137. Cheung, S.G., et al., *Systematic review of gut microbiota and major depression*. Frontiers in psychiatry, 2019. **10**: p. 34.
138. Krishnan, V. and E.J. Nestler, *The molecular neurobiology of depression*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 894-902.
139. Wang, Q., et al., *The recent progress in animal models of depression*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2017. **77**: p. 99-109.
140. Deussing, J.M., *Animal models of depression*. Drug discovery today: disease models, 2006. **3**(4): p. 375-383.
141. McArthur, R. and F. Borsini, *Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2006. **84**(3): p. 436-452.
142. Belzung, C. and M. Lemoine, *Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression*. Biology of mood & anxiety disorders, 2011. **1**(1): p. 1-14.
143. Yin, X., N. Guven, and N. Dietis, *Stress-based animal models of depression: Do we actually know what we are doing?* Brain research, 2016. **1652**: p. 30-42.
144. Katz, R.J. and S. Hersh, *Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1981. **5**(2): p. 265-271.
145. Willner, P., *The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage*. Neurobiology of stress, 2017. **6**: p. 78-93.
146. Willner, P., *Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation*. Psychopharmacology, 1997. **134**: p. 319-329.
147. Zhang, F.F., et al., *Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence*. CNS neuroscience & therapeutics, 2018. **24**(11): p. 994-1003.
148. Pandya, M., et al., *Where in the brain is depression?* Current psychiatry reports, 2012. **14**: p. 634-642.
149. Campbell, S. and G. MacQueen, *The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression*. Journal of Psychiatry and Neuroscience, 2004. **29**(6): p. 417-426.
150. Liu, W., et al., *The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex*. Neural plasticity, 2017. **2017**.
151. Sudweeks, S.N. and J.L. Yakel, *Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons*. The Journal of physiology, 2000. **527**(3): p. 515-528.
152. Sudweeks, S.N., J.A. van Hoof, and J.L. Yakel, *Serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors in rat CA1 hippocampal interneurons: functional and molecular characterization*. The Journal of Physiology, 2002. **544**(3): p. 715-726.
153. Burgess, N., E.A. Maguire, and J. O'Keefe, *The human hippocampus and spatial and episodic memory*. Neuron, 2002. **35**(4): p. 625-641.
154. Campbell, S., et al., *Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis*. American Journal of Psychiatry, 2004. **161**(4): p. 598-607.
155. Kronmüller, K.-T., et al., *Hippocampal volume and 2-year outcome in depression*. The British Journal of Psychiatry, 2008. **192**(6): p. 472-473.
156. Shah, P.J., et al., *Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression: controlled magnetic resonance imaging study*. The British journal of psychiatry, 1998. **172**(6): p. 527-532.
157. Sheline, Y.I., et al., *Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(12): p. 5034-5043.
158. MacQueen, G. and T. Frodl, *The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research?* Molecular psychiatry, 2011. **16**(3): p. 252-264.
159. Sheline, Y.I., *Depression and the hippocampus: cause or effect?* Biological psychiatry, 2011. **70**(4): p. 308-309.

160. Miller, B.R. and R. Hen, *The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety*. Current opinion in neurobiology, 2015. **30**: p. 51-58.
161. Marsden, W., *Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2013. **43**: p. 168-184.
162. Pavlides, C., L.G. Nivón, and B.S. McEwen, *Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation*. Hippocampus, 2002. **12**(2): p. 245-257.
163. Kim, J.J. and D.M. Diamond, *The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories*. Nature Reviews Neuroscience, 2002. **3**(6): p. 453-462.
164. Paik, E., *Functions of the prefrontal cortex in the human brain*. Journal of Korean Medical Science, 1998. **13**(6): p. 569-581.
165. Bear, M.F., B.W. Connors, and M.A. Paradiso, *Neuroscience (Vol. 2)*. 2007, Lippincott Williams & Wilkins.
166. Arnsten, A.F., *Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function*. Nature reviews neuroscience, 2009. **10**(6): p. 410-422.
167. Minor, T.R., R.L. Jackson, and S.F. Maier, *Effects of task-irrelevant cues and reinforcement delay on choice-escape learning following inescapable shock: evidence for a deficit in selective attention*. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 1984. **10**(4): p. 543.
168. Seo, J.-S., et al., *Cellular and molecular basis for stress-induced depression*. Molecular psychiatry, 2017. **22**(10): p. 1440-1447.
169. Caldecott-Hazard, S., J. Mazziotta, and M. Phelps, *Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using 14C-2-deoxyglucose autoradiography*. Journal of Neuroscience, 1988. **8**(6): p. 1951-1961.
170. Banasr, M. and R.S. Duman, *Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors*. Biological psychiatry, 2008. **64**(10): p. 863-870.
171. Li, N., et al., *mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists*. Science, 2010. **329**(5994): p. 959-964.
172. Guo, F., et al., *Burst-firing patterns in the prefrontal cortex underlying the neuronal mechanisms of depression probed by antidepressants*. European Journal of Neuroscience, 2014. **40**(10): p. 3538-3547.
173. Koenigs, M. and J. Grafman, *The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex*. Behavioural brain research, 2009. **201**(2): p. 239-243.
174. Vogt, M., *Norepinephrine and epinephrine in the central nervous system*. Pharmacological Reviews, 1954. **6**(1): p. 31-32.
175. Oliver, G. and E.A. Schäfer, *The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules*. The Journal of physiology, 1895. **18**(3): p. 230.
176. Gnegy, M.E., *Catecholamines*, in *Basic neurochemistry*. 2012, Elsevier. p. 283-299.
177. Kvetnansky, R., E.L. Sabban, and M. Palkovits, *Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches*. Physiological reviews, 2009. **89**(2): p. 535-606.
178. Dunkley, P.R., et al., *Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences*. Journal of neurochemistry, 2004. **91**(5): p. 1025-1043.
179. Berry, M., et al., *Aromatic L-amino acid decarboxylase: a neglected and misunderstood enzyme*. Neurochemical research, 1996. **21**: p. 1075-1087.
180. Flatmark, T., *Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells*. Acta Physiologica Scandinavica, 2000. **168**(1): p. 1-18.
181. Eiden, L., et al., *The vesicular monoamine transporters (VMATs): role in the chemical coding of neuronal transmission and monoamine storage in amine-handling immune and inflammatory cells*. Catecholamine research: From molecular insights to clinical medicine, 2002: p. 23-33.
182. Schulz, C., G. Eisenhofer, and H. Lehnert, *Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release*. Frontiers of hormone research, 2004. **31**: p. 1-25.
183. Wu, Y., L. Zeng, and S. Zhao, *Ligands of adrenergic receptors: A structural point of view*. Biomolecules, 2021. **11**(7): p. 936.

184. Chhatar, S. and G. Lal, *Role of adrenergic receptor signalling in neuroimmune communication*. Current Research in Immunology, 2021. **2**: p. 202-217.
185. Watari, K., M. Nakaya, and H. Kurose, *Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases*. Journal of molecular signaling, 2014. **9**(1): p. 1-9.
186. Langer, S.Z.,  *$\alpha$ 2-Adrenoceptors in the treatment of major neuropsychiatric disorders*. Trends in pharmacological sciences, 2015. **36**(4): p. 196-202.
187. Docherty, J.R., *The pharmacology of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes*. European journal of pharmacology, 2019. **855**: p. 305-320.
188. Day, H.E., et al., *Expression of  $\alpha$ 1b adrenoceptor mRNA in corticotropin-releasing hormone-containing cells of the rat hypothalamus and its regulation by corticosterone*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(22): p. 10098-10106.
189. Cotecchia, S., *The  $\alpha$ 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation*. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2010. **30**(6): p. 410-419.
190. Cotecchia, S., et al., *The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: signaling mechanisms and functional implications*. Cellular signalling, 2015. **27**(10): p. 1984-1993.
191. Papay, R., et al., *Localization of the mouse  $\alpha$ 1A-adrenergic receptor (AR) in the brain:  $\alpha$ 1AAR is expressed in neurons, GABAergic interneurons, and NG2 oligodendrocyte progenitors*. Journal of Comparative Neurology, 2006. **497**(2): p. 209-222.
192. Pytka, K., et al., *The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect*. Pharmacological Reports, 2016. **68**(2): p. 263-274.
193. Wang, R., et al., *Expression of  $\alpha$ 2-adrenergic receptor subtypes in the mouse brain: evaluation of spatial and temporal information imparted by 3 kb of 5' regulatory sequence for the  $\alpha$ 2A AR-receptor gene in transgenic animals*. Neuroscience, 1996. **74**(1): p. 199-218.
194. Ruffolo Jr, R.R., et al., *Pharmacologic and therapeutic applications of alpha2-adrenoceptor subtypes*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1993. **33**(1): p. 243-279.
195. Adefurin, A., et al., *Alpha2A adrenergic receptor genetic variation contributes to hyperglycemia after myocardial infarction*. International journal of cardiology, 2016. **215**: p. 482-486.
196. Brosda, J., F. Jantschak, and H.H. Pertz,  *$\alpha$  2-Adrenoceptors are targets for antipsychotic drugs*. Psychopharmacology, 2014. **231**: p. 801-812.
197. Zhang, H., et al., *The Role of Beta-Adrenergic Receptors in Depression and Resilience*. Biomedicines, 2022. **10**(10): p. 2378.
198. Wearing, O.H., et al., *Adrenergic control of the cardiovascular system in deer mice native to high altitude*. Current Research in Physiology, 2022. **5**: p. 83-92.
199. Wang, Y., et al., *Monoamine oxidases desensitize intracellular  $\beta$ 1AR signaling in heart failure*. Circulation research, 2021. **129**(10): p. 965-967.
200. Fu, A., X. Li, and B. Zhao, *Role of  $\beta$ 1-adrenoceptor in the basolateral amygdala of rats with anxiety-like behavior*. Brain research, 2008. **1211**: p. 85-92.
201. Nicholas, A., V. Pieribone, and T. Hökfelt, *Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study*. Neuroscience, 1993. **56**(4): p. 1023-1039.
202. Collins, S.,  *$\beta$ -Adrenergic receptors and adipose tissue metabolism: evolution of an old story*. Annual review of physiology, 2022. **84**: p. 1-16.
203. Babol, K. and J. Błasiak, *Beta3-adrenergic receptor*. Postępy Biochemii, 2005. **51**(1): p. 80-87.
204. Goddard, A.W., et al., *Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression*. Depression and anxiety, 2010. **27**(4): p. 339-350.
205. Zhang, H.-T., et al., *Postsynaptic  $\alpha$ -2 adrenergic receptors are critical for the antidepressant-like effects of desipramine on behavior*. Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(4): p. 1067-1077.
206. Beaulieu, J.M., S. Espinoza, and R.R. Gainetdinov, *Dopamine receptors—IUPHAR R review 13*. British journal of pharmacology, 2015. **172**(1): p. 1-23.

207. Nair, A.G., et al., *Modeling intracellular signaling underlying striatal function in health and disease*. Progress in molecular biology and translational science, 2014. **123**: p. 277-304.
208. Caravaggio, F., et al., *What proportion of striatal D2 receptors are occupied by endogenous dopamine at baseline? A meta-analysis with implications for understanding antipsychotic occupancy*. Neuropharmacology, 2020. **163**: p. 107591.
209. Norman Sartorius, M., *Kaplan & Sadock's Comprehensive textbook of psychiatry—ninth edition,(2009)* Sadock, BJ, Sadock, VA & Ruiz, P.(Eds) Wolters Kulzwer, Lippincott Williams 8. Wilkins, pp 1139-1151.
210. Ayano, G., *Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: review of literatures*. J Ment Disord Treat, 2016. **2**(120): p. 2.
211. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. 2003: Churchill Livingstone.
212. Swift, J.L., et al., *Quantification of receptor tyrosine kinase transactivation through direct dimerization and surface density measurements in single cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(17): p. 7016-7021.
213. Hasbi, A., et al., *Calcium signaling cascade links dopamine D1–D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(50): p. 21377-21382.
214. Blom, H., et al., *Nearest neighbor analysis of dopamine D1 receptors and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases in dendritic spines dissected by STED microscopy*. Microscopy research and technique, 2012. **75**(2): p. 220-228.
215. Kisilevsky, A.E., et al., *D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry*. Neuron, 2008. **58**(4): p. 557-570.
216. Axelrod, J., *O-methylation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo*. Science, 1957. **126**(3270): p. 400-401.
217. Axelrod, J., H. Weil-Malherbe, and R. Tomchick, *The physiological disposition of H3-epinephrine and its metabolite metanephrine*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1959. **127**(4): p. 251-256.
218. August, J.T., et al., *Catecholamines: Bridging Basic Science with Clinical Medicine*. 1997: Academic Press.
219. Eisenhofer, G., *The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines*. Pharmacology & therapeutics, 2001. **91**(1): p. 35-62.
220. Eisenhofer, G., I.J. Kopin, and D.S. Goldstein, *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine*. Pharmacological reviews, 2004. **56**(3): p. 331-349.
221. Shih, J.C., *Cloning, after cloning, knock-out mice, and physiological functions of MAO A and B*. Neurotoxicology, 2004. **25**(1-2): p. 21-30.
222. Tunbridge, E.M., P.J. Harrison, and D.R. Weinberger, *Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond*. Biological psychiatry, 2006. **60**(2): p. 141-151.
223. Palkovits, M., *Catecholamines and stress*. IDEGGYÓGYÁSZATI SZEMLE/CLINICAL NEUROSCIENCE, 2014. **67**(3-4): p. 89-93.
224. Pacak, K. and M. Palkovits, *Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders*. Endocrine reviews, 2001. **22**(4): p. 502-548.
225. Mamalaki, E., et al., *Repeated immobilization stress alters tyrosine hydroxylase, corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor messenger ribonucleic acid levels in rat brain*. Journal of neuroendocrinology, 1992. **4**(6): p. 689-699.
226. Vallès, A., O. Martí, and A. Armario, *Long-term effects of a single exposure to immobilization: AC-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain*. Journal of neurobiology, 2006. **66**(6): p. 591-602.
227. Hammen, C., *Stress and depression*. Annu. Rev. Clin. Psychol., 2005. **1**: p. 293-319.
228. Risch, N., et al., *Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis*. Jama, 2009. **301**(23): p. 2462-2471.
229. Amital, D., et al., *Serious life events among resistant and non-resistant MDD patients*. Journal of affective disorders, 2008. **110**(3): p. 260-264.

230. Gilman, S.E., et al., *Psychosocial stressors and the prognosis of major depression: a test of Axis IV*. Psychological medicine, 2013. **43**(2): p. 303-316.
231. Monroe, S.M. and K.L. Harkness, *Life stress, the "kindling" hypothesis, and the recurrence of depression: considerations from a life stress perspective*. Psychological review, 2005. **112**(2): p. 417.
232. Harkness, K.L., et al., *Acute and chronic stress exposure predicts 1-year recurrence in adult outpatients with residual depression symptoms following response to treatment*. Depression and anxiety, 2014. **31**(1): p. 1-8.
233. Krishna, M. and H. Narang, *The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**: p. 3525-3544.
234. Mao, L.-M. and J.Q. Wang, *Synaptically localized mitogen-activated protein kinases: local substrates and regulation*. Molecular neurobiology, 2016. **53**: p. 6309-6315.
235. Gerits, N., S. Kostenko, and U. Moens, *In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice*. Transgenic research, 2007. **16**: p. 281-314.
236. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-549.
237. Boulton, T.G., et al., *An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control*. Science, 1990. **249**(4964): p. 64-67.
238. Morrison, D.K., *MAP kinase pathways*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(11): p. a011254.
239. Saba-El-Leil, M.K., et al., *An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development*. EMBO reports, 2003. **4**(10): p. 964-968.
240. Yao, Y., et al., *Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(22): p. 12759-12764.
241. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. The FASEB journal, 1995. **9**(9): p. 726-735.
242. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiology and molecular biology reviews, 2004. **68**(2): p. 320-344.
243. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update*. Physiological reviews, 2012. **92**(2): p. 689-737.
244. Mazzucchelli, C., et al., *Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory*. Neuron, 2002. **34**(5): p. 807-820.
245. Wang, J.Q. and L. Mao, *The ERK pathway: molecular mechanisms and treatment of depression*. Molecular neurobiology, 2019. **56**: p. 6197-6205.
246. Dwivedi, Y., et al., *Aberrant extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 signalling in suicide brain: role of ERK kinase 1 (MEK1)*. The The International Journal of Neuropsychopharmacology, 2009. **12**(10): p. 1337-1354.
247. Qi, X., et al., *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, 2006. **175**(2): p. 233-240.
248. Qi, X., et al., *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, 2008. **31**(2): p. 278-285.
249. Feng, P., et al., *Impairments of ERK signal transduction in the brain in a rat model of depression induced by neonatal exposure of clomipramine*. Brain research, 2003. **991**(1-2): p. 195-205.
250. Qi, X., et al., *A role for the extracellular signal-regulated kinase signal pathway in depressive-like behavior*. Behavioural brain research, 2009. **199**(2): p. 203-209.
251. Obata, T., G.E. Brown, and M.B. Yaffe, *MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway*. Critical care medicine, 2000. **28**(4): p. N67-N77.
252. Wang, X.S., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(38): p. 23668-23674.



253. Hale, K.K., et al., *Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  in inflammatory cell lineages*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(7): p. 4246-4252.
254. Hu, M.C.-T., et al., *Murine p38- $\delta$  mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(11): p. 7095-7102.
255. Schieven, G.L., *The biology of p38 kinase: a central role in inflammation*. Current topics in medicinal chemistry, 2005. **5**(10): p. 921-928.
256. Zhang, J., B. Shen, and A. Lin, *Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway*. Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(6): p. 286-295.
257. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. Annual review of immunology, 2002. **20**(1): p. 55-72.
258. Allen, M., et al., *Deficiency of the stress kinase p38 $\alpha$  results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells*. The Journal of experimental medicine, 2000. **191**(5): p. 859-870.
259. Miller, A.H. and C.L. Raison, *Cytokines, p38 MAP kinase and the pathophysiology of depression*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(10): p. 2089-2090.
260. Capuron, L. and A.H. Miller, *Cytokines and psychopathology: lessons from interferon- $\alpha$* . Biological psychiatry, 2004. **56**(11): p. 819-824.
261. Wang, X., H. Wu, and A.H. Miller, *Interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(1): p. 65-75.
262. Zhao, Y.-w., et al., *Blocking p38 signaling reduces the activation of pro-inflammatory cytokines and the phosphorylation of p38 in the habenula and reverses depressive-like behaviors induced by neuroinflammation*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**: p. 511.
263. Mahajan, K. and N.P. Mahajan, *PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics*. Journal of cellular physiology, 2012. **227**(9): p. 3178-3184.
264. Nitulescu, G.M., et al., *The Akt pathway in oncology therapy and beyond*. International journal of oncology, 2018. **53**(6): p. 2319-2331.
265. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *Pi3k-pkb/akt pathway*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(9): p. a011189.
266. Martini, M., et al., *PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review*. Annals of medicine, 2014. **46**(6): p. 372-383.
267. Kaplan, D.R., et al., *Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity*. Cell, 1987. **50**(7): p. 1021-1029.
268. Aksamitiene, E., A. Kiyatkin, and B.N. Kholodenko, *Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance*. Biochemical Society Transactions, 2012. **40**(1): p. 139-146.
269. Dobbin, Z.C. and C.N. Landen, *The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(4): p. 8213-8227.
270. Ahmad, A., et al., *Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2013. **13**(7): p. 1002-1013.
271. Montañó, A., et al., *New challenges in targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia by NGS approaches: an update*. Cancers, 2018. **10**(4): p. 110.
272. Faes, S. and O. Dormond, *PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(9): p. 21138-21152.
273. Acosta-Martinez, M. and M.Z. Cabail, *The PI3K/Akt pathway in meta-inflammation*. International journal of molecular sciences, 2022. **23**(23): p. 15330.
274. Jiang, N., et al., *Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior*. Molecular biology reports, 2020. **47**(6): p. 4587-4629.

275. Chagpar, R.B., et al., *Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(12): p. 5471-5476.
276. Zhang, S., et al., *Network pharmacology and experimental evidence: PI3K/AKT signaling pathway is involved in the antidepressive roles of Chaihu Shugan San*. Drug Design, Development and Therapy, 2021: p. 3425-3441.
277. Brunet, A., S.R. Datta, and M.E. Greenberg, *Transcription-dependent and-independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway*. Current opinion in neurobiology, 2001. **11**(3): p. 297-305.
278. Weichhart, T. and M. Säemann, *The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications*. Annals of the rheumatic diseases, 2008. **67**(Suppl 3): p. iii70-iii74.
279. Kitagishi, Y., et al., *Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR pathway in cell signaling of mental illnesses*. Depression research and treatment, 2012. **2012**.
280. Haidinger, M., et al., *A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(7): p. 3919-3931.
281. Wu, Z., et al., *PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ /CRMP-2-mediated neuroplasticity in depression induced by stress*. Neuroreport, 2018. **29**(15): p. 1256-1263.
282. David, D.J., et al., *Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders*. The Neuroscientist, 2010. **16**(5): p. 578-591.
283. Mechoulam, R. and L.A. Parker, *The endocannabinoid system and the brain*. Annual review of psychology, 2013. **64**: p. 21-47.
284. Pacher, P., S. Bátkai, and G. Kunos, *The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy*. Pharmacological reviews, 2006. **58**(3): p. 389-462.
285. Gaoni, Y. and R. Mechoulam, *Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish*. Journal of the American chemical society, 1964. **86**(8): p. 1646-1647.
286. Mechoulam, R., P. Braun, and Y. Gaoni, *Stereospecific synthesis of (-)- DELTA. 1-and (-)- DELTA. 1 (6)-tetrahydrocannabinols*. Journal of the American Chemical Society, 1967. **89**(17): p. 4552-4554.
287. Mechoulam, R. and Y. Shvo, *Hashish—I: the structure of cannabidiol*. Tetrahedron, 1963. **19**(12): p. 2073-2078.
288. Gorzalka, B.B., M.N. Hill, and S.C. Chang, *Male–female differences in the effects of cannabinoids on sexual behavior and gonadal hormone function*. Hormones and behavior, 2010. **58**(1): p. 91-99.
289. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Molecular pharmacology, 1988. **34**(5): p. 605-613.
290. Herkenham, M., et al., *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. Journal of Neuroscience, 1991. **11**(2): p. 563-583.
291. Matsuda, L.A., et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-564.
292. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-65.
293. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-1949.
294. Sugiura, T., et al., *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. Biochemical and biophysical research communications, 1995. **215**(1): p. 89-97.
295. Lowe, H., et al., *The endocannabinoid system: A potential target for the treatment of various diseases*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(17): p. 9472.
296. Rodríguez de Fonseca, F., et al., *The endocannabinoid system: physiology and pharmacology*. Alcohol and Alcoholism, 2005. **40**(1): p. 2-14.
297. Battista, N., et al., *The endocannabinoid system: an overview*. Frontiers in behavioral neuroscience, 2012: p. 9.
298. Lutz, B., *Molecular biology of cannabinoid receptors*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2002. **66**(2-3): p. 123-142.

299. Wootten, D., et al., *Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors*. Nature reviews Molecular cell biology, 2018. **19**(10): p. 638-653.
300. Lu, H.-C. and K. Mackie, *Review of the endocannabinoid system*. Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging, 2021. **6**(6): p. 607-615.
301. Van Der Stelt, M. and V. Di Marzo, *Endovanilloids: putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels*. European Journal of Biochemistry, 2004. **271**(10): p. 1827-1834.
302. Di Marzo, V., *New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system*. Nature Reviews Drug Discovery, 2018. **17**(9): p. 623-639.
303. Tsou, K., et al., *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1998. **83**(2): p. 393-411.
304. Nyiri, G., et al., *CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons*. Neuroscience, 2005. **136**(3): p. 811-822.
305. Hu, S.S.-J. and K. Mackie, *Distribution of the endocannabinoid system in the central nervous system*. Endocannabinoids, 2015: p. 59-93.
306. Fride, E., et al., *The endocannabinoid system during development: emphasis on perinatal events and delayed effects*. Vitamins & hormones, 2009. **81**: p. 139-158.
307. Stella, N., *Cannabinoid signaling in glial cells*. Glia, 2004. **48**(4): p. 267-277.
308. Galiègue, S., et al., *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. European journal of biochemistry, 1995. **232**(1): p. 54-61.
309. Ashton, J.C., et al., *Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study*. Neuroscience letters, 2006. **396**(2): p. 113-116.
310. Onaivi, E.S., et al., *Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression*. Annals of the new York Academy of Sciences, 2008. **1139**(1): p. 434-449.
311. Tanaka, M., S. Sackett, and Y. Zhang, *Endocannabinoid modulation of microglial phenotypes in neuropathology*. Frontiers in Neurology, 2020. **11**: p. 87.
312. Cadas, H., et al., *Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP*. Journal of Neuroscience, 1996. **16**(12): p. 3934-3942.
313. Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. Nature Reviews Neuroscience, 2003. **4**(11): p. 873-884.
314. Okamoto, Y., et al., *Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(7): p. 5298-5305.
315. Kim, J., et al., *Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(23): p. 10182-10191.
316. Giuffrida, A., et al., *Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum*. Nature neuroscience, 1999. **2**(4): p. 358-363.
317. Varma, N., et al., *Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus*. The Journal of neuroscience, 2001. **21**(24): p. RC188.
318. Liu, J., et al., *A biosynthetic pathway for anandamide*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(36): p. 13345-13350.
319. Bisogno, T., et al., *Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain*. The Journal of cell biology, 2003. **163**(3): p. 463-468.
320. Mangieri, R.A. and D. Piomelli, *Enhancement of endocannabinoid signaling and the pharmacotherapy of depression*. Pharmacological research, 2007. **56**(5): p. 360-366.
321. Chicca, A., et al., *Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes*. Journal of biological chemistry, 2012. **287**(41): p. 34660-34682.
322. McKinney, M.K. and B.F. Cravatt, *Structure and function of fatty acid amide hydrolase*. Annu. Rev. Biochem., 2005. **74**: p. 411-432.
323. Labar, G. and C. Michaux, *Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics*. Chemistry & biodiversity, 2007. **4**(8): p. 1882-1902.

324. Wei, B.Q., et al., *A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(48): p. 36569-36578.
325. Gulyas, A., et al., *Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre-and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala*. European journal of neuroscience, 2004. **20**(2): p. 441-458.
326. Marrs, W.R., et al., *The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors*. Nature neuroscience, 2010. **13**(8): p. 951-957.
327. Urquhart, P., A. Nicolaou, and D. Woodward, *Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015. **1851**(4): p. 366-376.
328. Kudalkar, S.N., P.J. Kingsley, and L.J. Marnett, *Assay of endocannabinoid oxidation by cyclooxygenase-2*. Endocannabinoid Signaling: Methods and Protocols, 2016: p. 205-215.
329. Degenhardt, L., W. Hall, and M. Lynskey, *Exploring the association between cannabis use and depression*. Addiction, 2003. **98**(11): p. 1493-1504.
330. Lev-Ran, S., et al., *The association between cannabis use and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies*. Psychological medicine, 2014. **44**(4): p. 797-810.
331. Denson, T.F. and M. Earleywine, *Decreased depression in marijuana users*. Addictive behaviors, 2006. **31**(4): p. 738-742.
332. Gruber, A.J., H.G. Pope Jr, and M.E. Brown, *Do patients use marijuana as an antidepressant?* Depression, 1996. **4**(2): p. 77-80.
333. Hill, M.N. and J.G. Tasker, *Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Neuroscience, 2012. **204**: p. 5-16.
334. Smaga, I., et al., *Changes in the brain endocannabinoid system in rat models of depression*. Neurotoxicity research, 2017. **31**: p. 421-435.
335. Hill, M.N., et al., *Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report*. Pharmacopsychiatry, 2008. **41**(02): p. 48-53.
336. Evanson, N.K., et al., *Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling*. Endocrinology, 2010. **151**(10): p. 4811-4819.
337. Micale, V., et al., *Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies*. Pharmacology & therapeutics, 2013. **138**(1): p. 18-37.
338. Steiner, M.A., et al., *Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice*. Psychoneuroendocrinology, 2008. **33**(1): p. 54-67.
339. Barrero, F., et al., *Depression in Parkinson's disease is related to a genetic polymorphism of the cannabinoid receptor gene (CNR1)*. The pharmacogenomics journal, 2005. **5**(2): p. 135-141.
340. Hungund, B., et al., *Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S] GTPγS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims*. Molecular psychiatry, 2004. **9**(2): p. 184-190.
341. Christensen, R., et al., *Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials*. The Lancet, 2007. **370**(9600): p. 1706-1713.
342. García-Gutiérrez, M.S., et al., *Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors*. British journal of pharmacology, 2010. **160**(7): p. 1773-1784.
343. Onaivi, E.S., et al., *Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects*. PLoS one, 2008. **3**(2): p. e1640.
344. Petrosino, S. and V. Di Marzo, *FAAH and MAGL inhibitors: therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels*. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000), 2010. **11**(1): p. 51-62.
345. Adamczyk, P., et al., *Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats*. Acta physiologica Polonica, 2008. **59**(2): p. 217.
346. Vinod, K.Y., et al., *Dysfunction in fatty acid amide hydrolase is associated with depressive-like behavior in Wistar Kyoto rats*. PloS one, 2012. **7**(5): p. e36743.

347. Gobbi, G., et al., *Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(51): p. 18620-18625.
348. Oropeza, V., M. Page, and E. Van Bockstaele, *Systemic administration of WIN 55,212-2 increases norepinephrine release in the rat frontal cortex*. Brain research, 2005. **1046**(1-2): p. 45-54.
349. Shearman, L., et al., *Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice*. Behavioural pharmacology, 2003. **14**(8): p. 573-582.
350. Tzavara, E.T., et al., *The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions*. British journal of pharmacology, 2003. **138**(4): p. 544-553.
351. Witkin, J.M., et al., *A therapeutic role for cannabinoid CB1 receptor antagonists in major depressive disorders*. Trends in pharmacological sciences, 2005. **26**(12): p. 609-617.
352. Realini, N., et al., *Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats*. Neuropharmacology, 2011. **60**(2-3): p. 235-243.
353. Zer-Aviv, T.M. and I. Akirav, *Sex differences in hippocampal response to endocannabinoids after exposure to severe stress*. Hippocampus, 2016. **26**(7): p. 947-957.
354. Bortolato, M., et al., *Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress*. Biological psychiatry, 2007. **62**(10): p. 1103-1110.
355. Porsolt, R.D., M. Le Pichon, and M. Jalfre, *Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments*. Nature, 1977. **266**(5604): p. 730-732.
356. Slattery, D.A. and J.F. Cryan, *Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents*. Nature protocols, 2012. **7**(6): p. 1009-1014.
357. Kraeuter, A.-K., P.C. Guest, and Z. Sarnyai, *The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents*. Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols, 2019: p. 69-74.
358. Lowry, O., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of biological chemistry, 1951. **193**(1): p. 265-275.
359. Lisman, J.E. and A.A. Grace, *The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory*. Neuron, 2005. **46**(5): p. 703-713.
360. Castagné, V., R.D. Porsolt, and P. Moser, *Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse*. European journal of pharmacology, 2009. **616**(1-3): p. 128-133.
361. Porsolt, R.D., et al., *Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments*. European journal of pharmacology, 1978. **47**(4): p. 379-391.
362. M Pitychoutis, P., et al., *Pharmacogenetic insights into depression and antidepressant response: does sex matter?* Current pharmaceutical design, 2010. **16**(20): p. 2214-2223.
363. Cryan, J.F., R.J. Valentino, and I. Lucki, *Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2005. **29**(4-5): p. 547-569.
364. Fernández-Guasti, A., et al., *Sex and age differences in the antidepressant-like effect of fluoxetine in the forced swim test*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2017. **152**: p. 81-89.
365. Gómez, M., et al., *Influence of the brain sexual differentiation process on despair and antidepressant-like effect of fluoxetine in the rat forced swim test*. Neuroscience, 2014. **261**: p. 11-22.
366. Gouveia Jr, A., et al., *Influence of gender and estrous cycle in the forced swim test in rats*. Psychology & Neuroscience, 2008. **1**: p. 191-197.
367. Armario, A., A. Gavaldà, and J. Martí, *Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats*. Psychoneuroendocrinology, 1995. **20**(8): p. 879-890.
368. Bangasser, D.A. and R.J. Valentino, *Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives*. Frontiers in neuroendocrinology, 2014. **35**(3): p. 303-319.

369. Bambico, F.R., et al., *The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 modulates serotonin-dependent emotional behaviour, and serotonin1A and serotonin2A/C activity in the hippocampus*. *European Neuropsychopharmacology*, 2016. **26**(3): p. 578-590.
370. Culmer, T. and L. Dykstra, *Anandamide (AEA) modifiers indirectly modulate CB1 receptor activity in the forced swim test*. 2011, Wiley Online Library.
371. Rademacher, D.J. and C.J. Hillard, *Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2007. **31**(3): p. 633-641.
372. Barros, H.M. and M. Ferigolo, *Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1998. **23**(2): p. 279-286.
373. Detke, M.J., M. Rickels, and I. Lucki, *Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants*. *Psychopharmacology*, 1995. **121**: p. 66-72.
374. Bogdanova, O.V., et al., *Factors influencing behavior in the forced swim test*. *Physiology & behavior*, 2013. **118**: p. 227-239.
375. Álvarez Silva, A. and A. Fernández-Guasti, *Does the antidepressant-like effect of mirtazapine and venlafaxine differ between male and female rats?* *Salud mental*, 2020. **43**(1): p. 3-9.
376. Sramek, J.J., M.F. Murphy, and N.R. Cutler, *Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression*. *Dialogues in clinical neuroscience*, 2022.
377. Kalin, N.H., *The critical relationship between anxiety and depression*. 2020, Am Psychiatric Assoc. p. 365-367.
378. Rodgers, R. and A. Dalvi, *Anxiety, defence and the elevated plus-maze*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1997. **21**(6): p. 801-810.
379. Bondi, C.O., et al., *Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment*. *Neuropsychopharmacology*, 2008. **33**(2): p. 320-331.
380. Zhu, S., et al., *Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice*. *Neuroreport*, 2014. **25**(14): p. 1151-1155.
381. Koprdoва, R., et al., *Chronic unpredictable mild stress paradigm in male Wistar rats: effect on anxiety and depressive-like behavior*. *Neuro Endocrinol Lett*, 2016. **37**(Suppl 1): p. 103-110.
382. Leussis, M.P. and S.L. Andersen, *Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model*. *Synapse*, 2008. **62**(1): p. 22-30.
383. Adamec, R., et al., *Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience*. *Physiology & behavior*, 2006. **88**(1-2): p. 12-29.
384. Stead, J.D., et al., *Selective breeding for divergence in novelty-seeking traits: heritability and enrichment in spontaneous anxiety-related behaviors*. *Behavior genetics*, 2006. **36**: p. 697-712.
385. Clinton, S.M., et al., *Individual differences in novelty-seeking and emotional reactivity correlate with variation in maternal behavior*. *Hormones and behavior*, 2007. **51**(5): p. 655-664.
386. Weiss, S., et al., *Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1998. **23**(2): p. 265-271.
387. Zaitone, S.A., A.F. El-Wakeil, and S.H. Abou-El-Ela, *Inhibition of fatty acid amide hydrolase by URB597 attenuates the anxiolytic-like effect of acetaminophen in the mouse elevated plus-maze test*. *Behavioural pharmacology*, 2012. **23**(4): p. 417-425.
388. Komaki, A., et al., *Study the effect of endocannabinoid system on rat behavior in elevated plus-maze*. *Basic and Clinical Neuroscience*, 2015. **6**(3): p. 147.
389. Moise, A.M., et al., *An endocannabinoid signaling system modulates anxiety-like behavior in male Syrian hamsters*. *Psychopharmacology*, 2008. **200**: p. 333-346.

390. Moreira, F.A., et al., *Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors*. *Neuropharmacology*, 2008. **54**(1): p. 141-150.
391. Roohbakhsh, A., et al., *Role of Endocannabinoid System in the Ventral Hippocampus of Rats in the Modulation of Anxiety-Like Behaviours*. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2009. **105**(5): p. 333-338.
392. Micale, V., et al., *Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels*. *Neuropsychopharmacology*, 2009. **34**(3): p. 593-606.
393. Scherma, M., et al., *The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition*. *Neuropharmacology*, 2008. **54**(1): p. 129-140.
394. Ribeiro, A., et al., *Dose-response effects of systemic anandamide administration in mice sequentially submitted to the open field and elevated plus-maze tests*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2009. **42**: p. 556-560.
395. Waleh, N., et al., *Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene*. *Gene*, 2002. **291**(1-2): p. 203-210.
396. Espejo, E.F., *Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety*. *Behavioural brain research*, 1997. **86**(1): p. 105-112.
397. Gray, J.A. and N. McNaughton, *The neuropsychology of anxiety: reprise*. 1996.
398. Pawlak, C.R. and R.K. Schwarting, *Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002. **73**(3): p. 679-687.
399. Bambico, F.R., et al., *Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(10): p. 2083-2100.
400. Aubele, T., et al., *Effects of gonadectomy and hormone replacement on a spontaneous novel object recognition task in adult male rats*. *Hormones and behavior*, 2008. **54**(2): p. 244-252.
401. Ghi, P., et al., *Sex differences in memory performance in the object recognition test. Possible role of histamine receptors*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1999. **64**(4): p. 761-766.
402. van Goethem, N.P., et al., *Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle*. *Behavioural brain research*, 2012. **232**(2): p. 323-334.
403. Cost, K.T., et al., *Sex differences in object-in-place memory of adult rats*. *Behavioral neuroscience*, 2012. **126**(3): p. 457.
404. Yuan, Y., et al., *The effects of long-term stress on neural dynamics of working memory processing: An investigation using ERP*. *Scientific reports*, 2016. **6**(1): p. 23217.
405. Hoffman, A., et al., *Recovery after chronic stress within spatial reference and working memory domains: correspondence with hippocampal morphology*. *European Journal of Neuroscience*, 2011. **34**(6): p. 1023-1030.
406. Yuen, E.Y., et al., *Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory*. *Molecular psychiatry*, 2011. **16**(2): p. 156-170.
407. Schoofs, D., et al., *Working memory is differentially affected by stress in men and women*. *Behavioural brain research*, 2013. **241**: p. 144-153.
408. Fiebig, F. and A. Lansner, *Memory consolidation from seconds to weeks: a three-stage neural network model with autonomous reinstatement dynamics*. *Frontiers in computational neuroscience*, 2014. **8**: p. 64.
409. McEwen, B.S. and T.A. Milner, *Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain*. *Journal of neuroscience research*, 2017. **95**(1-2): p. 24-39.
410. Sherwin, B.B., *Estrogen and/or androgen replacement therapy and cognitive functioning in surgically menopausal women*. *Psychoneuroendocrinology*, 1988. **13**(4): p. 345-357.

411. Hammond, R.S., L.E. Tull, and R.W. Stackman, *On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory*. *Neurobiology of learning and memory*, 2004. **82**(1): p. 26-34.
412. Shields, G.S., et al., *Recent life stress exposure is associated with poorer long-term memory, working memory, and self-reported memory*. *Stress*, 2017. **20**(6): p. 598-607.
413. Panlilio, L.V., et al., *Effects of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors on working memory in rats*. *Psychopharmacology*, 2016. **233**: p. 1879-1888.
414. Moran, T.P., *Anxiety and working memory capacity: A meta-analysis and narrative review*. *Psychological bulletin*, 2016. **142**(8): p. 831.
415. Hlavacova, N., et al., *Inhibition of fatty-acid amide hydrolyse (FAAH) exerts cognitive improvements in male but not female rats*. *Endocrine regulations*, 2015. **49**(3): p. 131-136.
416. Czéh, B., et al., *Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter?* *Behavioural brain research*, 2008. **190**(1): p. 1-13.
417. Glowinski, J. and P. Christen, *Motor and cognitive functions of the prefrontal cortex*. 1994: Springer.
418. Vertes, R.P., *Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat*. *Neuroscience*, 2006. **142**(1): p. 1-20.
419. Ramos, B.P. and A.F. Arnsten, *Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex*. *Pharmacology & therapeutics*, 2007. **113**(3): p. 523-536.
420. Woo, E., et al., *Chronic stress weakens connectivity in the prefrontal cortex: Architectural and molecular changes*. *Chronic Stress*, 2021. **5**: p. 24705470211029254.
421. McEwen, B.S., *Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001. **933**(1): p. 265-277.
422. De Kloet, E.R., et al., *Brain corticosteroid receptor balance in health and disease*. *Endocrine reviews*, 1998. **19**(3): p. 269-301.
423. Nutt, D., et al., *The other face of depression, reduced positive affect: the role of catecholamines in causation and cure*. *Journal of psychopharmacology*, 2007. **21**(5): p. 461-471.
424. Dunlop, B.W. and C.B. Nemeroff, *The role of dopamine in the pathophysiology of depression*. *Archives of general psychiatry*, 2007. **64**(3): p. 327-337.
425. Sheikh, N., et al., *Effect of Bacopa monniera on stress induced changes in plasma corticosterone and brain monoamines in rats*. *Journal of ethnopharmacology*, 2007. **111**(3): p. 671-676.
426. Shen, M., et al., *l-theanine ameliorate depressive-like behavior in a chronic unpredictable mild stress rat model via modulating the monoamine levels in limbic-cortical-striatal-pallidal-thalamic-circuit related brain regions*. *Phytotherapy Research*, 2019. **33**(2): p. 412-421.
427. Liu, Y., et al., *Antidepressant-like effects of tea polyphenols on mouse model of chronic unpredictable mild stress*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2013. **104**: p. 27-32.
428. Ahmed, Z., et al., *Fraxetin attenuates disrupted behavioral and central neurochemical activity in a model of chronic unpredictable stress*. *Frontiers in Pharmacology*, 2023. **14**: p. 1135497.
429. Li, X., et al., *Nuclear receptor subfamily 3 group c member 2 (NR3C2) is downregulated due to hypermethylation and plays a tumor-suppressive role in colon cancer*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2022: p. 1-11.
430. Peng, Z.-w., et al., *Repetitive transcranial magnetic stimulation inhibits Sirt1/MAO-A signaling in the prefrontal cortex in a rat model of depression and cortex-derived astrocytes*. *Molecular and cellular biochemistry*, 2018. **442**: p. 59-72.
431. Bondi, C.O., J.D. Jett, and D.A. Morilak, *Beneficial effects of desipramine on cognitive function of chronically stressed rats are mediated by  $\alpha$ 1-adrenergic receptors in medial prefrontal cortex*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2010. **34**(6): p. 913-923.
432. Finlay, J., M. Zigmond, and E. Abercrombie, *Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam*. *Neuroscience*, 1995. **64**(3): p. 619-628.



433. Gavrilovic, L., et al., *Effects of mood stabilizer lithium on noradrenergic turnover in the prefrontal cortex of chronically stressed rats*. Neuroendocrinology Letters, 2021. **42**(3): p. 171-176.
434. Flügge, G., M. Van Kampen, and M.J. Mijster, *Perturbations in brain monoamine systems during stress*. Cell and Tissue Research, 2004. **315**(1): p. 1-14.
435. Bromberg-Martin, E.S., M. Matsumoto, and O. Hikosaka, *Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting*. Neuron, 2010. **68**(5): p. 815-834.
436. Stefanovic, B., et al., *Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: Regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels*. European neuropsychopharmacology, 2016. **26**(10): p. 1629-1637.
437. Yu, Y., et al., *Antidepressant-like effect of trans-resveratrol in chronic stress model: behavioral and neurochemical evidences*. Journal of psychiatric research, 2013. **47**(3): p. 315-322.
438. Dalla, C., et al., *Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission*. Physiology & behavior, 2008. **93**(3): p. 595-605.
439. Lambert, G., et al., *Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders*. Archives of general psychiatry, 2000. **57**(8): p. 787-793.
440. Hill, M.N., et al., *Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment*. Journal of neurochemistry, 2008. **106**(6): p. 2322-2336.
441. Monteleone, P., et al., *Investigation of CNR1 and FAAH endocannabinoid gene polymorphisms in bipolar disorder and major depression*. Pharmacological research, 2010. **61**(5): p. 400-404.
442. Minocci, D., et al., *Genetic association between bipolar disorder and 524A> C (Leu133Ile) polymorphism of CNR2 gene, encoding for CB2 cannabinoid receptor*. Journal of Affective Disorders, 2011. **134**(1-3): p. 427-430.
443. Domschke, K., et al., *Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression*. European Neuropsychopharmacology, 2008. **18**(10): p. 751-759.
444. Page, M., V. Oropeza, and E. Van Bockstaele, *Local administration of a cannabinoid agonist alters norepinephrine efflux in the rat frontal cortex*. Neuroscience letters, 2008. **431**(1): p. 1-5.
445. Bedse, G., et al., *Inhibition of anandamide hydrolysis enhances noradrenergic and GABAergic transmission in the prefrontal cortex and basolateral amygdala of rats subjected to acute swim stress*. Journal of neuroscience research, 2015. **93**(5): p. 777-787.
446. Kirilly, E., L. Hunyady, and G. Bagdy, *Opposing local effects of endocannabinoids on the activity of noradrenergic neurons and release of noradrenaline: relevance for their role in depression and in the actions of CB 1 receptor antagonists*. Journal of Neural Transmission, 2013. **120**: p. 177-186.
447. Fournier, M., F. d'Arripe-Longueville, and R. Radel, *Effects of psychosocial stress on the goal-directed and habit memory systems during learning and later execution*. Psychoneuroendocrinology, 2017. **77**: p. 275-283.
448. de Lago, E., et al., *Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence*. Brain research, 2004. **1007**(1-2): p. 152-159.
449. Van Der Stelt, M. and V. Di Marzo, *The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders*. European journal of pharmacology, 2003. **480**(1-3): p. 133-150.
450. Kreitzer, A.C. and R.C. Malenka, *Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 643-647.
451. Mravec, B., et al., *Effect of a single and repeated stress exposure on gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes in brainstem catecholaminergic cell groups in rats*. European Journal of Neuroscience, 2015. **42**(2): p. 1872-1886.
452. Briggs, G.D., G.M. Nagy, and P.W. Dickson, *Mechanism of action of salsolinol on tyrosine hydroxylase*. Neurochemistry international, 2013. **63**(8): p. 726-731.

453. Miner, L.H., et al., *Chronic stress increases the plasmalemmal distribution of the norepinephrine transporter and the coexpression of tyrosine hydroxylase in norepinephrine axons in the prefrontal cortex*. *Journal of Neuroscience*, 2006. **26**(5): p. 1571-1578.
454. Stone, E.A. and R. McCarty, *Adaptation to stress: Tyrosine hydroxylase activity and catecholamine release*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1983. **7**(1): p. 29-34.
455. Popović, N., et al., *Prefrontal catecholaminergic turnover and antioxidant defense system of chronically stressed rats*. *Folia Biologica (Krakow)*, 2017. **65**(1): p. 43-54.
456. Gos, T., et al., *Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the locus coeruleus is elevated in violent suicidal depressive patients*. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 2008. **258**: p. 513-520.
457. Qiao, M., et al., *Antidepressant mechanisms of venlafaxine involving increasing histone acetylation and modulating tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase expression in hippocampus of depressive rats*. *Neuroreport*, 2019. **30**(4): p. 255-261.
458. Fatima, M., et al., *A selective D2 dopamine receptor agonist alleviates depression through up-regulation of tyrosine hydroxylase and increased neurogenesis in hippocampus of the prenatally stressed rats*. *Neurochemistry international*, 2020. **136**: p. 104730.
459. Watanabe, Y., et al., *Effects of chronic social stress on tyrosine hydroxylase mRNA and protein levels*. *Molecular Brain Research*, 1995. **32**(1): p. 176-180.
460. Bosier, B., et al., *Differential modulations of striatal tyrosine hydroxylase and dopamine metabolism by cannabinoid agonists as evidence for functional selectivity in vivo*. *Neuropharmacology*, 2012. **62**(7): p. 2328-2336.
461. Bloomfield, M.A., et al., *Dopaminergic function in cannabis users and its relationship to cannabis-induced psychotic symptoms*. *Biological psychiatry*, 2014. **75**(6): p. 470-478.
462. Bosier, B., et al., *Agonist selective modulation of tyrosine hydroxylase expression by cannabinoid ligands in a murine neuroblastoma cell line*. *Journal of neurochemistry*, 2007. **102**(6): p. 1996-2007.
463. Page, M., et al., *Repeated cannabinoid administration increases indices of noradrenergic activity in rats*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2007. **86**(1): p. 162-168.
464. Bosier, B., G.G. Muccioli, and D.M. Lambert, *The FAAH inhibitor URB597 efficiently reduces tyrosine hydroxylase expression through CB1- and FAAH-independent mechanisms*. *British Journal of Pharmacology*, 2013. **169**(4): p. 794-807.
465. Serova, L.I., et al., *Varied mechanisms of oestradiol-mediated regulation of dopamine β-hydroxylase transcription*. *Journal of neuroendocrinology*, 2011. **23**(2): p. 168-176.
466. Serova, L., et al., *Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus*. *Neuroendocrinology*, 2002. **75**(3): p. 193-200.
467. Chen, J., et al., *Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain*. *The American Journal of Human Genetics*, 2004. **75**(5): p. 807-821.
468. Harrison, P.J. and E.M. Tunbridge, *Catechol-O-methyltransferase (COMT): a gene contributing to sex differences in brain function, and to sexual dimorphism in the predisposition to psychiatric disorders*. *Neuropsychopharmacology*, 2008. **33**(13): p. 3037-3045.
469. Xie, T., S.-L. Ho, and D. Ramsden, *Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription*. *Molecular pharmacology*, 1999. **56**(1): p. 31-38.
470. Jiang, H., et al., *Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol*. *Neuropharmacology*, 2003. **45**(7): p. 1011-1018.
471. Duncan, J., S. Johnson, and X.-M. Ou, *Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism*. *Drug discoveries & therapeutics*, 2012. **6**(3): p. 112-122.
472. Inoue, A., et al., *Association of TMEM132D, COMT, and GABRA6 genotypes with cingulate, frontal cortex and hippocampal emotional processing in panic and major depressive disorder*. *International journal of psychiatry in clinical practice*, 2015. **19**(3): p. 192-200.

473. Tseilikman, V., et al., *Role of glucocorticoid-and monoamine-metabolizing enzymes in stress-related psychopathological processes*. *Stress*, 2020. **23**(1): p. 1-12.
474. Bhatt, S., A.N. Nagappa, and C.R. Patil, *Role of oxidative stress in depression*. *Drug discovery today*, 2020. **25**(7): p. 1270-1276.
475. Seo, D.O., et al., *Effects of chronic electroconvulsive shock on the expression of  $\beta$ -adrenergic receptors in rat brain: Immunological study*. *IUBMB Life*, 1999. **47**(2): p. 195-203.
476. Porterfield, V.M., et al., *Repeated stressor exposure regionally enhances beta-adrenergic receptor-mediated brain IL-1 $\beta$  production*. *Brain, behavior, and immunity*, 2012. **26**(8): p. 1249-1255.
477. Dimsdale, J.E., et al., *Effects of chronic stress on beta-adrenergic receptors in the homeless*. *Psychosomatic Medicine*, 1994. **56**(4): p. 290-295.
478. Lemon, N. and D. Manahan-Vaughan, *Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression*. *Journal of Neuroscience*, 2006. **26**(29): p. 7723-7729.
479. Sara, S.J., *The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition*. *Nature reviews neuroscience*, 2009. **10**(3): p. 211-223.
480. Shohamy, D. and R.A. Adcock, *Dopamine and adaptive memory*. *Trends in cognitive sciences*, 2010. **14**(10): p. 464-472.
481. Chamberlain, S.R. and T.W. Robbins, *Noradrenergic modulation of cognition: therapeutic implications*. *Journal of psychopharmacology*, 2013. **27**(8): p. 694-718.
482. Murchison, C.F., et al., *Norepinephrine and  $\beta$ 1-adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval*. *Neuroscience*, 2011. **181**: p. 109-116.
483. Alekseenko, O., D. Avgustinovich, and T. Lipina, *The participation of the brain dopamine D1 and D2 receptors in the process of the development of depression induced by social confrontations in mice*. *Zhurnal Vyshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni IP Pavlova*, 1998. **48**(6): p. 1090-1098.
484. Shinohara, R., et al., *Dopamine D1 receptor subtype mediates acute stress-induced dendritic growth in excitatory neurons of the medial prefrontal cortex and contributes to suppression of stress susceptibility in mice*. *Molecular psychiatry*, 2018. **23**(8): p. 1717-1730.
485. Lejeune, S., et al., *The dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 improves temporal order memory performance in maternally deprived rats*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2013. **106**: p. 268-273.
486. Masuda, T., et al., *Noradrenaline increases neural precursor cells derived from adult rat dentate gyrus through beta2 receptor*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2012. **36**(1): p. 44-51.
487. Maity, S., et al., *Norepinephrine triggers metaplasticity of LTP by increasing translation of specific mRNAs*. *Learning & Memory*, 2015. **22**(10): p. 499.
488. Kandel, E.R., *The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB*. *Molecular brain*, 2012. **5**(1): p. 1-12.
489. Ahmed, T. and J.U. Frey, *Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro*. *Neuropharmacology*, 2005. **49**(4): p. 477-492.
490. Hagen, H., N. Hansen, and D. Manahan-Vaughan,  *$\beta$ -adrenergic control of hippocampal function: subserving the choreography of synaptic information storage and memory*. *Cerebral cortex*, 2016. **26**(4): p. 1349-1364.
491. Paolo, S., et al., *Antidepressant-like effect of selective dopamine D1 receptor agonists in the behavioural despair animal model of depression*. *European journal of pharmacology*, 1994. **262**(1-2): p. 107-111.
492. Amiri, S., et al., *Involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the antidepressant-like effects of selegiline in maternal separation model of mouse*. *Physiology & behavior*, 2016. **163**: p. 107-114.
493. Cusin, C., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole augmentation in treatment-resistant major depressive disorder*. *The Journal of clinical psychiatry*, 2013. **74**(7): p. 16792.

494. Kobayashi, K., et al., *Noradrenaline activation of hippocampal dopamine D1 receptors promotes antidepressant effects*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022. **119**(33): p. e2117903119.
495. Szelenyi, J. and E. Vizi, *The catecholamine–cytokine balance: interaction between the brain and the immune system*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007. **1113**(1): p. 311-324.
496. Czlonkowska, A., et al., *Estrogen and cytokines production—the possible cause of gender differences in neurological diseases*. Current pharmaceutical design, 2005. **11**(8): p. 1017-1030.
497. Konecna, L., et al., *Modulation of IL-6 production during the menstrual cycle in vivo and in vitro*. Brain, Behavior, and Immunity, 2000. **14**(1): p. 49-61.
498. Haapakoski, R., et al., *Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 16, tumour necrosis factor  $\alpha$  and C-reactive protein in patients with major depressive disorder*. Brain, behavior, and immunity, 2015. **49**: p. 206-215.
499. Lanquillon, S., et al., *Cytokine production and treatment response in major depressive disorder*. Neuropsychopharmacology, 2000. **22**(4): p. 370-379.
500. Mutlu, O., et al., *Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice*. Life sciences, 2012. **91**(25-26): p. 1252-1262.
501. Pan, Y., et al., *Effects of icariin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis action and cytokine levels in stressed Sprague-Dawley rats*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006. **29**(12): p. 2399-2403.
502. Su, W.-J., et al., *NLRP3 gene knockout blocks NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model*. Behavioural brain research, 2017. **322**: p. 1-8.
503. Anforth, H.R., et al., *Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$* . European cytokine network, 1998. **9**(3): p. 279-88.
504. Voorhees, J.L., et al., *Prolonged restraint stress increases IL-6, reduces IL-10, and causes persistent depressive-like behavior that is reversed by recombinant IL-10*. PloS one, 2013. **8**(3): p. e58488.
505. Labaka, A., et al., *Reduced hippocampal IL-10 expression, altered monoaminergic activity and anxiety and depressive-like behavior in female mice subjected to chronic social instability stress*. Behavioural brain research, 2017. **335**: p. 8-18.
506. Blume, J., S.D. Douglas, and D.L. Evans, *Immune suppression and immune activation in depression*. Brain, behavior, and immunity, 2011. **25**(2): p. 221-229.
507. Dhabhar, F.S., et al., *Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression*. Journal of psychiatric research, 2009. **43**(11): p. 962-969.
508. Kiecolt-Glaser, J.K. and R. Glaser, *Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality*. Journal of psychosomatic research, 2002. **53**(4): p. 873-876.
509. Koldzic-Zivanovic, N., et al., *Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: a preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zona fasciculata*. Brain, Behavior, and Immunity, 2006. **20**(5): p. 460-468.
510. Smith, E.M., et al., *IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain*. Journal of neuroimmunology, 1999. **100**(1-2): p. 140-148.
511. Li, B., et al., *Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects inflammatory insults from sulfur dioxide inhalation via cannabinoid receptors in the brain*. Journal of Environmental Sciences, 2017. **51**: p. 265-274.
512. Witkamp, R. and J. Meijerink, *The endocannabinoid system: an emerging key player in inflammation*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2014. **17**(2): p. 130-138.
513. Rivera, P., et al., *Pharmacological blockade of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by URB597 improves memory and changes the phenotype of hippocampal microglia despite ethanol exposure*. Biochemical Pharmacology, 2018. **157**: p. 244-257.
514. Lisboa, S.F., et al., *Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2*. Neuropsychopharmacology, 2018. **43**(9): p. 1924-1933.

515. Malek, N., et al., *Anandamide, acting via CB2 receptors, alleviates LPS-induced neuroinflammation in rat primary microglial cultures*. *Neural plasticity*, 2015. **2015**.
516. Jackson, A.R., P. Nagarkatti, and M. Nagarkatti, *Anandamide attenuates Th-17 cell-mediated delayed-type hypersensitivity response by triggering IL-10 production and consequent microRNA induction*. *PLoS one*, 2014. **9**(4): p. e93954.
517. Correa, F., et al., *Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB2 receptors: Roles of ERK1/2, JNK, and NF- $\kappa$ B*. *Glia*, 2010. **58**(2): p. 135-147.
518. Benito, C., et al., *Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains*. *Journal of Neuroscience*, 2003. **23**(35): p. 11136-11141.
519. Kim, E.K. and E.-J. Choi, *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010. **1802**(4): p. 396-405.
520. Dwivedi, Y., et al., *Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects*. *Journal of neurochemistry*, 2001. **77**(3): p. 916-928.
521. Iio, W., et al., *Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade*. *Neuroscience letters*, 2011. **504**(3): p. 281-284.
522. Duman, C.H., et al., *A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment*. *Biological psychiatry*, 2007. **61**(5): p. 661-670.
523. Tan, B., et al., *Sex-related differences in somatic plasticity and possible role of ERK1/2: An in-vivo study of young-adult rats*. *Physiology & Behavior*, 2022. **255**: p. 113939.
524. Yoon, D.-H., et al., *Regulation of dopamine D2 receptor-mediated extracellular signal-regulated kinase signaling and spine formation by GABAA receptors in hippocampal neurons*. *Neuroscience Letters*, 2015. **586**: p. 24-30.
525. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. *Biochemical journal*, 2010. **429**(3): p. 403-417.
526. Li, W.-H., et al., *p38 MAP kinase inhibition reduces Propionibacterium acnes-induced inflammation in vitro*. *Dermatology and Therapy*, 2015. **5**: p. 53-66.
527. Baganz, N., et al., *A requirement of serotonergic p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase for peripheral immune system activation of CNS serotonin uptake and serotonin-linked behaviors*. *Translational Psychiatry*, 2015. **5**(11): p. e671-e671.
528. Zhu, C.-B., R.D. Blakely, and W.A. Hewlett, *The proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  activate serotonin transporters*. *Neuropsychopharmacology*, 2006. **31**(10): p. 2121-2131.
529. Zhu, C.-B., et al., *Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(13): p. 2510-2520.
530. Martín-Hernández, D., et al., *Intracellular inflammatory and antioxidant pathways in postmortem frontal cortex of subjects with major depression: effect of antidepressants*. *Journal of neuroinflammation*, 2018. **15**: p. 1-12.
531. Xu, B., et al., *Activation of the MAPK signaling pathway induces upregulation of pro-apoptotic proteins in the hippocampi of cold stressed adolescent mice*. *Neuroscience Letters*, 2019. **699**: p. 97-102.
532. Grassmé, H., et al., *Inhibition of acid sphingomyelinase by antidepressants counteracts stress-induced activation of p38-kinase in major depression*. *Neurosignals*, 2015. **23**(1): p. 84-92.
533. Criscuolo, C., et al., *BDNF prevents amyloid-dependent impairment of LTP in the entorhinal cortex by attenuating p38 MAPK phosphorylation*. *Neurobiology of aging*, 2015. **36**(3): p. 1303-1309.
534. Yu, J.S. and W. Cui, *Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination*. *Development*, 2016. **143**(17): p. 3050-3060.
535. Karege, F., et al., *Alterations in phosphatidylinositol 3-kinase activity and PTEN phosphatase in the prefrontal cortex of depressed suicide victims*. *Neuropsychobiology*, 2011. **63**(4): p. 224-231.

536. Xian, Y.F., et al., *Isorhynchophylline exerts antidepressant-like effects in mice via modulating neuroinflammation and neurotrophins: involvement of the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway*. The FASEB Journal, 2019. **33**(9): p. 10393-10408.
537. Opazo, P., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms*. Journal of Neuroscience, 2003. **23**(9): p. 3679-3688.
538. Hou, L. and E. Klann, *Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(28): p. 6352-6361.
539. Peltier, J., A. O'Neill, and D.V. Schaffer, *PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation*. Developmental neurobiology, 2007. **67**(10): p. 1348-1361.
540. Li, T., et al., *Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex*. Behavioural brain research, 2016. **302**: p. 191-199.
541. Zhang, J., et al., *Low-intensity pulsed ultrasound ameliorates depression-like behaviors in a rat model of chronic unpredictable stress*. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2021. **27**(2): p. 233-243.
542. Chandran, A., et al., *Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2013. **40**: p. 240-245.
543. Palumbo, S., et al., *PKB $\beta$ /AKT2 deficiency impacts brain mTOR signaling, prefrontal cortical physiology, hippocampal plasticity and select murine behaviors*. Molecular psychiatry, 2021. **26**(2): p. 411-428.
544. García-Fuster, M., et al., *FADD adaptor and PEA-15/ERK1/2 partners in major depression and schizophrenia postmortem brains: basal contents and effects of psychotropic treatments*. Neuroscience, 2014. **277**: p. 541-551.
545. Wang, S., et al., *2-arachidonyl glycerol modulates astrocytic glutamine synthetase via p38 and ERK1/2 pathways*. Journal of Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 1-10.
546. Xu, J., et al., *Effects of electroacupuncture on chronic unpredictable mild stress rats depression-like behavior and expression of p-ERK/ERK and p-P38/P38*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. **2015**.
547. Jia, Z., et al., *Baicalin ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depression through the BDNF/ERK/CREB signaling pathway*. Behavioural Brain Research, 2021. **414**: p. 113463.
548. Lin, S., et al., *Crocetin ameliorates chronic restraint stress-induced depression-like behaviors in mice by regulating MEK/ERK pathways and gut microbiota*. Journal of Ethnopharmacology, 2021. **268**: p. 113608.
549. Zeni, A.L.B., et al., *Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2012. **103**(2): p. 181-186.
550. Cunha, M.P., et al., *Involvement of PI3K/Akt signaling pathway and its downstream intracellular targets in the antidepressant-like effect of creatine*. Molecular neurobiology, 2016. **53**: p. 2954-2968.
551. Su, S.-H., et al., *Cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 may protect against cognitive impairment in rats of chronic cerebral hypoperfusion via PI3K/AKT signaling*. Behavioural brain research, 2016. **313**: p. 334-344.
552. Wang, D., et al., *URB597 improves cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion by inhibiting mTOR-dependent autophagy*. Neuroscience, 2017. **344**: p. 293-304.
553. Ozaita, A., E. Puighermanal, and R. Maldonado, *Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain*. Journal of neurochemistry, 2007. **102**(4): p. 1105-1114.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Milica Janković je rođena 15.11.1990. godine u Nišu. Srednju školu, Gimnaziju “Bora Stanković” je završila u Nišu, a osnovne studije je upisala 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul molekularna biologija i fiziologija, koje je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,42. Master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer eksperimentalna biomedicina, je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Animalna i humana fiziologija upisala je 2015. godine. Paralelno sa doktorskim studijama 2015. godine upisuje i specijalističke studije na Medicinskom fakultetu Vojnomedicinske akademije, Univerziteta odbrane u Beogradu, na smeru bioinženjstvo i medicinska informatika, koje završava 2019. godine. sa prosečnom ocenom 9,73.

Od 2016. godine je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a od 2018. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, prvo kao istraživač pripravnik u okviru projekta “Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara” (173044), a potom, od 2020. godine, kao istraživač saradnik u okviru programa “Životna sredina i zdravlje” na temu “Regulacija kateholaminskog sistema u centralnim i perifernim tkivima tokom stresa 0902301” finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, čiji je rukovodilac dr Slađana Dronjak Čučaković.

Istraživačka aktivnost Milice Janković je fokusirana na izučavanje uloge endokanabinoida u različitim mehanizmima patofiziologije depresije u mozgu pacova. Član je Društva za neuronauke Srbije. Samostalno ili kao koautor objavila je četiri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M21), jedan rad u časopisu od međunarodnog značaja (M22), četiri rada u međunarodnim časopisima (M23), jedan rad u nacionalnom časopisu od međunarodnog značaja (M24) i dva rada u časopisima nacionalnog značaja, kao i jedanaest saopštenja sa međunarodnih skupova.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Милица Д. Јанковић

број индекса Б3031/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност  
катехоламинског система у хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у  
анималном моделу депресије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација 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 кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 29. 3. 2024.

Милица Јанковић



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Д. Јанковић

Број индекса Б3031/2015

Студијски програм Биологија, модул Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност катехоламинског система у хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у анималном моделу депресије

Ментори: др Слађана Дроњак Чучаковић, научни саветник

Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча”-  
Институт од националног значаја за Републику Србију – Универзитет у Београду

проф. др Небојша Јаснић, ванредни професор

Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Потписани/а Милица Јанковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла 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, 29. 3. 2024.

Милица Јанковић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Полно-специфични ефекти ендоканабиноида на понашање и активност катехоламинског система у хипокампусу и медијалном префронталном кортексу у анималном моделу депресије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла 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 одлучио/ла.

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, 29. 3. 2015.

Милица Јанковић



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.