

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Miloš Mitić

**POLNO-SPECIFIČAN EFEKAT
FLUOKSETINA NA SIGNALIZACIJU
POSREDOVANU GLUKOKORTIKOIDNIM
RECEPTOROM U HIPOKAMPUSU
PACOVA IZLAGANIH HRONIČNOM
STRESU IZOLACIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Miloš Mitić

**THE GENDER-SPECIFIC EFFECT OF
FLUOXETINE ON GLUCOCORTICOID
RECEPTOR MEDIATED SIGNALIZATION
IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS
EXPOSED TO CHRONIC ISOLATION
STRESS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentori

dr Miroslav Adžić, viši naučni saradnik,

Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor,

Biološki fakulteta, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije

dr Miroslav Adžić, viši naučni saradnik,

Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor,

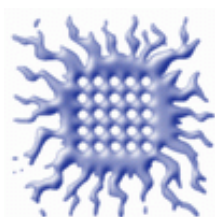
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Nađa Marić-Bojović, docent i naučni savetnik,

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane

Zahvalnica



Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića.

Zahvaljujem mentoru, dr Miroslavu Adžiću, na ukazanom poverenju i razumevanju, na prenešenom znanju i podstreku da se i dalje usavršavam, kao i na dragocenoj pomoći u eksperimentalnom radu i diskusiji rezultata i svim fazama izrade ove disertacije.

Zahvaljujem prof. dr Nadeždi Nedeljković na svim korisnim sugestijama i podršci tokom doktorskih studija i pisanja same disertacije.

Zahvaljujem prof. dr Nađi Marić-Bojović na svim korisnim sugestijama i pomoći u čitanju i pregledu ove doktorske disertacije .

Dragoj prijateljici i koleginci dr Ivi Lukić želim da zahvalim na divnom prijateljstvu, radu i neprocenjivoj pomoći u izradi ove disertacije i pisanju radova.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Mariji Radojčić, što me je uvela u svoju laboratoriju i naučni rad uopšte, na razumevanju, kao i na dragocenoj pomoći u eksperimentalnom radu i u diskusiji rezultata.

Svojim kolegama iz laboratorije dugujem zahvalnost za pomoć i podršku u svakodnevnom radu.

Svojim roditeljima i bratu dugujem neizmernu zahvalnost na ljubavi, strpljenju, razumevanju i podršci koju su mi pružali svih ovih godina i njima posvećujem ovu tezu.

Polno-specifičan efekat fluoksetina na signalizaciju posredovanu glukokortikoidnim receptorom u hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresu izolacije

Rezime

Smatra se da je hronični stres jedan od glavnih etioloških faktora povezanih sa patofiziologijom mnogih psihijatrijskih poremećaja, uključujući depresiju. Iako je odgovor na stres ključan u održavanju homeostaze, maladaptivni odgovor može dovesti do povećanja faktora rizika koji dovode do razvoja bolesti. Tokom proteklih decenija brojne studije izvedene na depresivnim pacijentima kao i istraživanja na životinjskim modelima predložile su nekoliko bioloških teorija koje su pokušale da objasne patogenezu depresivnih poremećaja uzrokovanih stresom. Jedan od najkonzistentnijih nalaza u ovim istraživanjima jeste narušena aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HPA) ose, koja se odlikuje narušenom funkcijom glukokortikoidnog receptora (GR) pogotovu u hipokampusu, moždanoj strukturi koja je najosetljivija na stres. Kao posledica gore pomenutih činjenica sasvim je logično što je GR isplivao kao meta novih antidepresivnih lekova. Osim pitanja molekularne osnove u patogenezi depresije, poslednjih godina sve veću pažnju privlači pitanje polnog dimorfizma u odgovoru na stres i adekvatnu terapiju, s obzirom to da epidemiološke studije ukazuju da su žene podložnije depresiji i da dva puta češće oboljevaju od iste. Takođe, brojne studije pokazuju i da žene slabije odgovaraju na terapiju tricikličnim antidepresivima i da znatno bolji učinak kod ovog pola imaju antidepresivi iz klase selektivnih inhibitora ponovnog unosa serotonina (SSRI). Ipak, pored svih prikupljenih podataka molekularni mehanizmi koji leže u osnovi ovih kliničkih nalaza, kao i molekularne osnove polnog dimorfizma u odgovoru na stres, uključujući glukokortikoide i signalizaciju posredovanu GR-om, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Pored glukokortikoida, važnu ulogu u regulaciji funkcije GR-a ima i njegova fosforilacija na specifičnim aminokiselinskim ostacima koja utiče na stabilnost samog receptora i njegovu translokaciju iz citoplazme u jedro, što dovodi do pojačane ili smanjene transkripcione aktivnosti samog GR-a, što sve zajedno utiče na važne ćelijske procese. Imajući u vidu važnost fosforilacije u regulaciji funkcije GR-a, kao i rezultate prethodno dobijene u našoj laboratoriji, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je polno-specifičan efekat hroničnog tretmana fluoksetina, antidepresiva iz klase SSRI, na ponašanje nalik depresivnom,

na koncentraciju kortikosterona (KORT) u serumu, unutar ćelijsku distribuciju GR-a, kao i na fosfo-forme receptora na serinu 232 (pGR232), serinu 246 (pGR246) i treoninu 171 (pGR171) u hipokampusu ženki i mužjaka pacova Wistar soja prethodno izloženih stresu hronične socijalne izolacije. Dodatno je analizirana i signalizacija kinazama koje fosforilišu GR na ovim epitopima i to ciklin-zavisna kinaza 5 (CDK5), mitogenom aktivirane protein kinaze (c-Jun N-terminalnom kinaze 1/2/3, (JNK1/2/3), ekstracelularnim signalom regulisane kinaze 1/2 (ERK1/2) i p38 kinaza), kao i glikogen sintaza kinaza 3- β (GSK-3 β). Transkripciona aktivnost GR-a analizirana je merenjem ekspresije gena regulisanih GR-om: GR-a, BDNF-a, CRH-a, 5HT1a-a, p11 i β -arestina 2. Izabrani geni, pored toga što su regulisani GR-om, predstavljaju i biomarkere glavnih neuralnih mreža koji su ključni u regulaciji odgovora na stres, kao i u mehanizmu dejstva antidepresiva.

Rezultati dobijeni u ovoj tezi pokazuju da hronični tretman fluoksetinom normalizuje ponašanje prethodno narušeno stresom hronične izolacije i to na polno-specifičan način i nezavisno od KORT-a. Dalje, iako fluoksetin nije uspeo da promeni hipoaktivnost HPA ose izazvanu hroničnim stresom, on je neutralisao promene na nivou ukupnog jedarnog GR-a, kao i na nivou njegovih fosforomi, pGR246 i pGR171, u hipokampusu stresiranih životinja oba pola. Nasuprot njima, fluoksetin je pokazao polno-specifičan efekat na nivou pGR232 izoforme, gde je kod stresiranih ženki povećao nivo te fosforilacije, dok kod mužjaka nije menjao istu. Ovaj porast u nivou pGR232 kod stresiranih ženki praćen je dalje kompletnom aktivacijom svih ispitivanih ushodnih kinaza, CDK5, MAPK i GSK-3 β , predominantno u jedru, dok je kod mužjaka efekat fluoksetina ograničen samo na aktivaciju JNK u citosolu i GSK-3 β u jedru. Ova aktivacija signalne putanje, pGR232/kinaze pod dejstvom fluoksetina u jedru hipokampusa stresiranih ženki praćena je povećanjem transkripcione aktivnosti GR-a preko povećanja ekspresije gena za BDNF i CRH, dok je kod mužjaka ovaj efekat izostao. Efekti fluoksetina kod stresiranih mužjaka ogledali su se u normalizaciji drugih gena poput 5HT1a i p11, kao i normalizaciji CRH, ali na drugačiji način u odnosu na ženke. Sve ove promene na molekulskom nivou, kako u odgovoru na stres tako i pod dejstvom fluoksetina, u potpunosti su odgovarale promenama u ponašanju životinja. Dalje, ovi rezultati sugerišu da su fosforilacije GR-a na S232 i S246 odgovorne za regulaciju transkripcione aktivnosti receptora, dok je fosforilacija na T171 više odgovorna za unutar ćelijsku distribuciju GR-a pod dejstvom fluoksetina.

Sve zajedno, pored toga što naši rezultati potvrđuju ranije navode da antidepresivi ispoljavaju svoj efekat preko modulacije GR funkcije, oni dodatno pokazuju da antidepresivi

menjaju aktivnost receptora delujući na fosforilaciju GR-a i ushodne kinaze, sa posebnim naglaskom na polno-specifican mehanizam dejstva SSRI antidepressiva.

Ključne reči: Fluoksetin, hronični stres socijalne izolacije, pol, fosforilacija glukokortikoidnog receptora, HPA osa, kinaze, hipokampus, ponašanje, ekspresija gena.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

UDK broj: 577.175.6:577.26(043.3)

The gender-specific effect of fluoxetine on glucocorticoid receptor mediated signalization in the hippocampus of rats exposed to chronic social isolation stress

Abstract

Exposure to chronic stress has been associated with the pathophysiology of many psychiatric disorders including depression. Although, the stress response is essential for maintenance of homeostasis, maladaptive response to stress can elevate risk factors that lead to the disease. Several theories have been proposed to explain stress-related pathogenesis of depression, including impaired activity of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis, which is one of the most consistent findings in assessing the depressive state in years of research. Notably, studies carried out in depressed patients, as well as studies on animal models of depression showed consistently dysfunctional limbic LHPA axis activity, leading to altered levels of circulating glucocorticoids. The activity of LHPA axis is controlled through inhibitory feedback mechanisms involving different brain structures with main research focus on hippocampus. At the molecular level, glucocorticoids exert their effects by activating the glucocorticoid receptor (GR), a key regulator of the negative feedback of the LHPA axis activity. Therefore taking into account above mentioned facts it is quite logical that GR emerged as a potential candidate for antidepressant action.

Aside from investigating the molecular mechanisms that lie in the basis of depression, in recent years the question of gender-dimorphism is becoming more appealing and attracts more attention. Epidemiological studies demonstrate that women are more vulnerable to stress related psychopathologies than men, since depression occurs twice as frequently in women. Furthermore, women tend to show poorer response rates and slower clinical improvement with tricyclic antidepressants (TCAs) and appear to respond better to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). However the mechanisms underlying these clinical facts, as well as molecular specificities that underlie possible sex differences, including the GCs and GR signaling are not well defined.

Besides glucocorticoids, the GR activity could be also controlled by specific modification via phosphorylation of GR on specific aminoacide residues that influence the stability of receptor and its translocation from cytoplasm to the nucleus which may lead to

enhanced or diminished transcriptional activity of the GR, all together to affect multiple cellular processes.

Having in mind the importance of GR phosphorylation in the regulation of the GR function, as well as the results obtained in our laboratory, in this PhD thesis we investigated the gender-specific effects of chronic treatment with fluoxetine, SSRI antidepressive, on depressive-like behavior, concentration of serum corticosterone (CORT), subcellular distribution of GR, as well as the analyses of its phosphoisoforms, such as serine 232 (pGR232), serine 246 (pGR246), and threonine 171 (pGR171), in the hippocampus of female and male Wistar rats previously exposed to chronic social isolation stress paradigm. Additionally we analyzed the levels and activation of upstream kinases that target GR on these epitopes, including cyclin-dependent kinase (CDK5) and its activators, p35 and p25; mitogen activated protein kinases (MAPKs: c-jun N-terminal kinase 1/2/3 (JNK1/2/3), extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), and p38 kinase), as well as glycogen synthase kinase 3- β (GSK-3 β). The transcriptional activity of the GR was assessed by measuring the expression of GR-regulated genes such as: GR, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β -arrestin 2. The selected genes in addition to being regulated by GR are also well establish neural markers of important pathways involved in stress related disorders and antidepressant action, such as HPA axis activity, neural plasticity, serotonergic transmission and neurogenesis.

Our results show that chronic treatment with fluoxetine managed to normalize behavior previously disrupted by chronic isolation stress in gender-specific manner, and independently of CORT levels. Moreover, even though fluoxetine did not altered the hypoactivity of HPA axis caused by chronic stress, he succeed to neutralize changes on the levels of total GR in the nucleus, as well as the levels of its nuclear phosphoisoforms, pGR246 and pGR171, in the hippocampus of stressed animals of both genders. As opposed to that, fluoxetine exerted gender-specific effect at the levels of pGR232 isoform; in stressed females fluoxetine increased the levels of nuclear pGR232, while in stressed males it did not altered its levels. This increase in pGR232 levels in stressed females upon fluoxetine was followed with complete activation of all tested upstream kinases, CDK5, MAPK i GSK-3 β (predominantly in nucleus), while in males the effect of fluoxetine was limited only to activation of JNKs in cytosol and GSK-3 β in nucleus. Furthermore, these activation of pGR232/kinase signaling pathway in nucleus of hippocampus in stressed females upon fluoxetine was also followed with increased transcription activity of GR that was reflected

through increase in BDNF and CRH gene expression, while in males this effect was missing. On the other hand, in stressed males fluoxetine managed to normalize expression of some other genes, like 5HT1a and p11, and to normalize the CRH expression but in different way supposed to females. At the end, all these changes on molecular levels, in regards to stress and fluoxetine treatment, completely responded to changes in animals behavior. Our results also suggest that GR phosphorylation on serine 232 and 246 were more responsible for regulation the transcriptional activity of GR, while phosphorylation on T171 was more responsible for subcellular distribution of GR upon fluoxetine treatment.

Altogether, results confirm previous findings that antidepressants exert their effect through modulation of GR function, and additionally alter the activity of GR by modulating its phosphorylation status on specific residues and its upstream kinases, with emphasizing the gender-specific mechanism of SSRI antidepressants.

Keywords: Fluoxetine, chronic stress isolation, gender, phosphorylation of glucocorticoid receptor, HPA axis, kinases, hippocampus, behavior, gene expression.

Research area: Biology

Research field: Neurobiology

UDC number: 577.175.6:577.26(043.3)

SKRAĆENICE:

ACh – acetil-holin (eng. acetylcholine)

ACTH – adrenokortikotropni hormon (eng. adrenocorticotrophic hormone)

AF1 – transaktivirajući domen 1 (eng. activation function 1)

ANS – autonomni nervni sistem

AP-1 – protein aktivator 1 (eng. activator protein-1)

AVP – arginin-vazopresin peptide

BDNF – moždani neurotrofni faktor (eng. brain derived neurotrophic factor)

BSA – albumin iz goveđeg seruma (eng. bovine serum albumin)

CDK – ciklin-zavisna kinaza (eng. cyclin dependent kinase)

ChIP – eng. chromatin Immunoprecipitation assays

CNS – centralni nervni sistem

CREB – eng. cAMP response element-binding

CRH – kortikotropin-oslobađajući hormon (eng. corticotropin-releasing hormone)

CRH-R1 – receptor za kortikotropin-oslobađajući hormon (eng. corticotropin-releasing hormone receptor 1)

CUMS – hronični nepredvidivi stres (engl. chronic unpredictable stress, CUMS)

DBD – DNK vezujući domen (eng. DNA binding domain)

DEPC – dietilpirokarbonat (eng. diethylpyrocarbonate)

DEX – deksametazonon (eng. dexametazone)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DSM-V – dijagnostičko-statistički priručnik za duševne poremećaje V (eng. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-V)

DST – test supresije deksametazonom (eng. dexametazone suppression test)

EKT – elektrokonvulzivna terapija

ERK1/2 – ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1/2 (eng. extracellular signal-regulated kinases)

FKBP4 – FK506-vezujući protein 4 (eng. FK506 binding protein 4)

FKBP5 – FK506-vezujući protein 5 (eng. FK506 binding protein 5)

FST – test forsiranog plivanja (eng. forced swimming test)

GABA – γ -amino buterna kiseselina (eng. γ -Aminobutyric acid)

GAS – generalni adaptacioni sindrom

GR – glukokortikoidni receptor

GRE – sekvence u DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (eng. glucocorticoid responsive elements)

GSK-3 β – glikogen sintaza kinaza 3 β (eng. glycogen synthase kinase 3 β)

GWAS – polimorfizme u čitavom genomu (eng. genome-wide association study)

HPA – hipotalamo-hipofizno-adrenalna (eng. hypothalamic-pituitary-adrenal)

HRP – peroksidaza iz rena (eng. horseradish peroxidase)

Hsp 40/70/90 – proteini toplotnog šoka 70/90 (eng. heat shock proteins Hsp40/70/90)

ICD-11 – Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema 11 (eng. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)

IL-1 – inteleukin 1

Image J – eng. Image processing and analysis in Java

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (eng. c-Jun N-terminal kinases)

KORT – kortikosteron

LDB – ligand vezujući hidrofobni domen (eng. ligand binding domain)

LTP – dugotrajna potencijacija (eng. long-term potentiation)

MAO – inhibitori monoamin oksidaze (eng. monoamine-oxidase inhibitor)

MAPK – proteinske kinaze aktivirane mitogenima (eng. mitogen-activated protein kinases)

MAPKK – kinaza MAPK-a (eng. MAPK kinase)

MAPKKK – kinaza kinaze MAPK-a (eng. MAPK kinase kinase)

MDD – veliki depresivni poremećaj (eng. major depressive disorder)

MDR PGP – membranski steroidni transporter (eng. multiple drug resistance p-glycoprotein)

MR – mineralokortikoidni receptor

NAc – nucleus accumbens

NFκB – jedarni faktor kapa B (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

nGRE – sekvence u DNK koje su negativno regulisane glukokortikoidima (eng. negative glucocorticoid response element)

NLS1/2 – eng. nuclear localization signals 1/2

NR3C1– engl. nuclear receptor subfamily 3 group c member 1

NRI – inhibitori ponovnog unosa noradrenalina (eng. nordrenalin reuptake inhibitors)

NTD – N-terminalni domen (eng. N-terminal domain)

PAGE – poliakrilamid gel elektroforeza (eng. polyacrylamide gel electrophoresis)

PBMC – mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. peripheral blood mononuclear cells)

PBS- eng. phosphate-buffered saline

PFC – prečeaona kora (eng. prefrontal cortex)

PKA – protein kinaze A

PKC – protein kinaze C

POMC – propiomelanokortin (eng. proopiomenalocortine)

Ppid – peptidil-prolil izomeraza D

PVDF – poliviniliden fluorid

PVN – paraventrikularno

Rpl19 – ribozomalni protein 19 (eng. ribosomal protein L19)

RTqPCR – kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. real time quantitative PCR)

SAM – simpato-adrenomedularni

SDS – natrijum dodecil-sulfat (eng. sodium dodecyl-sulphate)

SLASA – srpsko udruženje za korišćenje životinja u nauci i obrazovanju (eng. Serbian Laboratory Animal Science Association)

SNP – polimorfizam u pojedinačnom nukleotidu (eng. single nucleotide polymorphism)

SNRI – inhibitori ponovnog unosa serotonina i noradrenalina (eng. serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors)

SSRI – antidepresivi iz klase selektivnih inhibitora ponovnog unosa serotonina (eng. selective serotonin reuptake inhibitors)

TCA – triciklicni antidepresivi (eng. tricyclic antidepressant)

TMS – transkranijalna magnetna stimulacija

TNF- α – alfa faktor nekroze tumora (eng. tumor necrosis factor alpha)

UPLC – tečna hromatografija visoke performanse (eng. Ultra performance liquid chromatography)

VEGF – vaskularni endotelijalni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor)

VTA – ventralni tegmentum

5 HT – serotonin (eng. 5-hydroxytryptamine)

5-HTTLPR – polimorfizam u genu za serotoninški transporter (eng. serotonin-transporter-linked)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Stres.....	1
1.1.1 Tipovi stresora	3
1.1.2 Odgovor na stres i hipotalamo-hipofizno-adrenalna (HPA) osa.....	4
1.1.3 „Stresirani mozak”	7
1.1.3.1 Hipokampus	8
1.1.4 Alostaza i alostatsko opterećenje	10
1.1.5 Psihopatologije koje su povezane sa stresom	10
1.2 Depresija.....	11
1.2.1 Strukturne promene u mozgu u depresiji	14
1.2.2 Biološka osnova depresije	15
1.2.3 Genetika depresije.....	15
1.2.4 Monoaminska hipoteza	17
1.2.5 Glukokortikoidna (HPA) hipoteza	19
1.2.6 „Neuroplastična” hipoteza“	22
1.2.7 Druge hipoteze o patofiziologiji depresije	25
1.2.8 Bioloska osnova polnih razlika u sklonosti prema depresiji	25
1.3 Glukokortikoidi i signalni put posredovan GR-om	27
1.3.1 Regulacija GR-a post-translacionom modifikacijom - fosforilacija	30
1.3.2 Izmenjena signalizacija posredovana GR-om u depresiji	33
1.3.3 Protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK)–podfamilija JNK1/2/3, ERK1/2 i p38.....	36
1.3.3.1 ERK1/2.....	37
1.3.3.2 p38.....	38
1.3.3.3 JNK1/2/3.....	39
1.3.4 CDK5	40
1.4 Animalni modeli depresije.....	44
1.4.1 Hronična socijalna izolacija – model za proučavanje poremećaja raspoloženja	45
1.5 Antidepresivi.....	46
1.5.1 Selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina (SSRI) - Fluoksetin.....	49

1.5.2	Fluoksetin.....	49
1.5.3	Uticaj antidepresiva (fluoksetina) na GR.....	51
2.	Cilj rada.....	53
3.	Materijal i metode.....	55
3.1	Ekstrakcija fluoksetin hidrohlorida iz kapsula Flunirina.....	55
3.2	Eksperimentalne životinje.....	55
3.2.1	Gajenje eksperimentalnih životinja.....	55
3.2.2	Tretman eksperimentalnih životinja.....	55
3.3	Testovi ponašanja - Test forsiranog plivanja (FST).....	57
3.4	Molekularne analize.....	58
3.4.1	Priprema tkiva i seruma.....	58
3.4.2	Određivanje koncentracije kortikosterona (KORT) u serumu krvi.....	58
3.4.3	Izolovanje proteina i priprema citosolnih i jedarnih frakcija hipokampusa.....	58
3.4.4	Određivanje koncentracije proteina.....	59
3.4.5	Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS poliakrilamidnom gelu.....	60
3.4.6	Analiza proteina metodom „Western blot“.....	62
3.4.7	Izolacija ukupne ćelijske RNK.....	63
3.4.8	Reverzna transkripcija.....	64
3.4.9	Kvantitativni PCR u realnom vremenu (RTqPCR).....	64
3.5	Kvantifikacija signala i statistička obrada rezultata.....	66
4.	Rezultati.....	67
4.1	Efekat fluoksetina na ponašanje životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije u FST-u.....	67
4.2	Efekat hronične socijalne izolacije i tretmana fluoksetinom na koncentraciju KORT-a u serumu.....	68
4.3	Efekat fluoksetina na GR i njegov fosforilacioni status (pGR) u hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.....	69
4.4	Efekat fluoksetina na nivo CDK5 kinaze i njenih aktivatora, p35 i p25, u hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.....	73

4.5	Efekat fluoksetina na MAPK i njihovu fosforilaciju u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije	76
4.5.1	Efekat fluoksetina na JNK1/2/3 i njihovu fosforilaciju, pJNK1/2/3, u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.....	76
4.5.2	Efekat fluoksetina na ERK1/2 i njihovu fosforilaciju, pERK1/2, u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.....	80
4.5.3	Efekat fluoksetina na p38 i njegovu fosforilaciju, pp38, u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.....	83
4.6	Efekat fluoksetina na GSK-3 β i njenu fosforilaciju, pGSK-3 β , u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.....	85
4.7	Efekat fluoksetina na ekspresiju gena za GR, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β -arrestin 2 u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije	87
5.	Diskusija	90
5.1	Efekat fluoksetina na ponašanje nalik depresivnom kod pacova oba pola u modelu hronične socijalne izolacije.....	91
5.2	Efekti stresa i fluoksetina na nivo KORT-a kod životinja oba pola	92
5.3	Efekti stresa i fluoksetina na GR i njegovu fosforilaciju u transdukciji signala u hipokampusu životinja oba pola.....	93
5.3.1	Efekat stresa i fluoksetina na unutarćelijsku distribuciju GR-a u hipokampusu	93
5.3.2	Efekat stresa i fluoksetina na fosforilaciju GR-a i aktivaciju ushodnih kinaza u hipokampusu i ekspresiju GR-regulisanih gena kod životinja oba pola.....	94
5.3.3	Efekat stresa i fluoksetina na ekspresiju GR-regulisanih gena u hipokampusu ženki i mužjaka pacova.....	102
6.	Zaključci	110
7.	Literatura	112
	Biografija autora	146
	Prilozi	147

"Knowledge is the golden ladder over which we climb to heaven; knowledge is the light which illuminates our path through this life and leads to a future life of everlasting glory"

Mihajlo Pupin

"It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change"

Darwin

1. Uvod

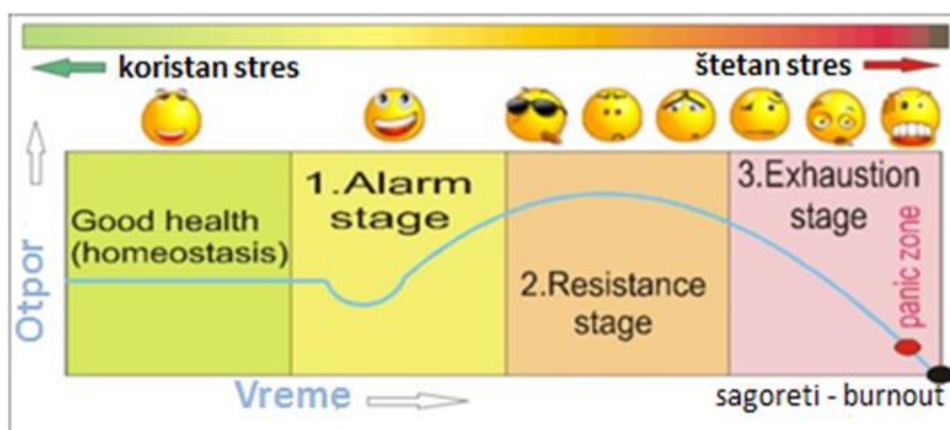
1.1 Stres

Stres je jedna od poštapalica modernog rečnika koja se koristi za opisivanje raznovrsnih situacija, događaja i emocija (Charlton, 1992), a pioninom savremenog koncepta stresa smatra se Hans Sešli (Hans Selye). Sešli je stres definisao kao nespecifični odgovor ili skup nespecifičnih reakcija organizma na štetne faktore iz radnog i životnog okruženja koji nas kao alarmirajući proces upozorava na disbalans homeostaze i pomaže nam da je ponovo uspostavimo, tako što indukuje odgovor „bori se ili beži”, a stimulus koji indukuje stres naziva stresorom (Selye, 1936). Uzimajući navedeno, pod stresom se mogu podrazumevati skoro sva narušavanja životnih rutina, dok se adaptiranje na iste naziva odgovorom ili reakcijom na stres. Reakcija na stres je neuro-endokrino-imunološkog karaktera i manifestuje se kao skup simptoma te se naziva i generalni adaptacioni sindrom (GAS) ili Sešlijev sindrom.

GAS čine tri sukcesivne faze (Slika 1):

1. faza alarma, šoka - kada se organizam suočava sa štetnim faktorom,
2. faza rezistencije - kada organizam pruža otpor štetnom faktoru pokušavajući da uspostavi ravnotežu, i
3. faza iscrpljenosti - kada organizam iscrpljuje svoje snage u odbrani od štetnog faktora i „prepušta“ mu se.

Dok su inicijalne faze GAS-a korisne, dugo i teško izlaganje stresu vodi u treću fazu, odnosno, fazu iscrpljenosti koja vremenom dovodi do gubitka faze adaptacije (Selye, 1955). U današnje vreme termin stres se u biomedicini i kliničkoj praksi uglavnom koristi da opiše ovu kasnu fazu GAS-a, kada stresna reakcija postaje maladaptivna i dalje vodi u patologiju, odnosno, bolest.



Slika 1. Generalni adaptacioni sindrom (GAS) - faze odgovora na stresore po Hansu Sejlju

Stres je neizostavan deo modernog života, ali ne označava isključivo negativno iskustvo. Po modelu koji je objavio Lazarus 1974. godine, stres je podelio na eustres i distres. Eustres je definisao kao „pozitivan stres”, odnosno, stres koji ima pozitivne efekte i koji može poboljšati funkcionalnost pojedinca, a prouzrokovan je stresorima koji se tumače kao mogućnost ili izazov. Distresom je nazvao stres koji je štetan i neprijatan i izazvan stresorima koji se tumače kao pretnja/povreda/gubitak i koji vremenom mogu dovesti do razvoja anksioznosti i depresije. S druge strane, mnogi istraživači smatraju ovakvu podelu neadekvatnom, jer učestalo i prolongirano trajanje svakog stresora može imati štetne

posledice za organizam. Sposobnost organizma da se prilagodi i funkcioniše na novom nivou kako bi odgovorio promenjenim zahtevima spoljašnje ili unutrašnje sredine i omogućio opstanak naziva se alostatski odgovor (alostaza). Kada se uslovi sredine menjaju, povratak u homeostazu može biti problematičan. Simptomi stresa se razlikuju od pojedinca do pojedinca i najučestaliji su poremećaj spavanja, uznemirenost, promene u raspoloženju, napetost mišića, problemi digestivnog trakta, nedostatak energije i umor.

U moderno doba termin „stres” ima mnogo kompleksnije značenje i definiše se kao pokušaj organizma da se prilagodi uslovima života, pri čemu u toku procesa adaptacije dolazi do promena različitih fizioloških funkcija organizma i ponašanja koje se prilagođava uslovima života. Stoga, stres se po najnovijem shvatanju može šire definisati kao skup reakcija od momenta delovanja stresora na organizam, preko pokušaja organizma da savlada delovanje stresora ili da mu se prilagodi do konačnog ishoda.

1.1.1 Tipovi stresora

U principu, postoje četiri glavne kategorije stresora:

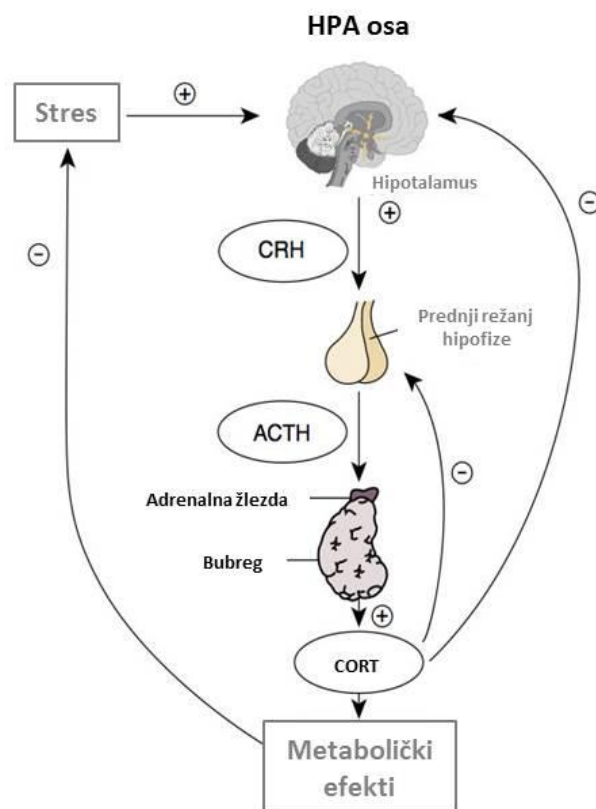
- 1) fizički stresori koji imaju negativnu, ili u nekim situacijama, pozitivnu psihološku komponentu;
- 2) psihološki stresori koji odražavaju naučeni odgovor na prethodno iskustvo u nepovoljnim situacijama;
- 3) socijalni stresori koji odražavaju poremećenu interakciju među jedinkama; i
- 4) stresori koji remete kardiovaskularni sistem i metaboličku homeostazu (Pacak i Palkovits, 2001; Van de Kar i Blair, 1999).

Fizički stresori uključuju hladnoću, toplotu, intenzivnu radijaciju, buku, vibracije, dok su hemijski stresori svi otrovi. Psihološki stresori utiču na emotivne procese i mogu dovesti do promena u ponašanju, kao što su anksioznost, strah ili frustracija. Kada su u pitanju socijalni stresori, kod životinja je to prisustvo dominantne jedinke, dok se kod ljudi gubitak posla i razvod smatraju najjačim socijalnim stresorima. Stresori koji remete kardiovaskularni sistem ili metaboličku homeostazu su vežbanje, izlaganje toploti, hipoglikemija i krvarenja. Mnogi od navedenih stresora se proučavaju na životinjskim modelima, ali većinom se njihovi efekti prepliću, tako da više stresora deluje zajedno kao na primer, pri manipulisanju

životinjama u toku gajenja ili pri njihovoj imobilizaciji, kao i pri očekivanju bolnih stimulusa ili pri hipotenzivnim krvarenjima (Pacak i Palkovits, 2001). U odnosu na vremenski period izloženosti stresoru razlikuju se akutni (2 sata ili manje) i hronični stresori koji mogu biti kontinuirani ili intermitentni (traju i do nekoliko nedelja i duže). Habitucija na hronični stresor je moguća, ali u slučaju da nije uspešna, dolazi do prekomernog oslobađanja hormona stresa, što može dovesti do patofizioloških promena. Takođe, fiziološke reakcije na neki stresor nisu generalne, već variraju zavisno od tipa stresora i razlika među individuama. Svaki stresor može izazvati različite neurološke, endokrine i metaboličke promene, kao i promene u ponašanju. Različiti stresori se razlikuju i po intenzitetu koji se određuje na osnovu nivoa oslobođenih hormona stresa (Baldi i Bucherelli, 2005).

1.1.2 Odgovor na stres i hipotalamo-hipofizno-adrenalna (HPA) osa

Za sprovođenje adekvatnog odgovora na stres neophodno je da postoji adekvatna dvosmerna neuroendokrina komunikacija između centralnog nervnog sistema (CNS) i periferije koja se ostvaruje aktivacijom dva glavna fiziološka puta kao što su: autonomni nervni sistem (ANS), posebno njegov simpato-adrenomedularni (SAM) deo i hipotalamo-hipofizno-adrenalna (eng. hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) osa. Oba ova sistema su uključena u fiziološku regulaciju ponašanja i sposobna su da vrlo brzo odgovore na različite vrste stresora. Najpre dolazi do aktivacije SAM sistema koji aktivira noradrenergičke neurone locus coeruleusa, usled čega dolazi do oslobađanja kateholamina, noradrenalina iz simpatičkih neurona i adrenalina iz srži adrenalnih žlezdi. Ovi hormoni stimulišu aktivaciju α i β -adrenalinskih receptora u zidovima krvnih sudova i u samom srčanom mišiću, što dovodi do povećanja pulsa i krvnog pritiska. Kao posledica ovih promena javlja se povećan protok krvi kroz mozak



Slika 2. Regulacija HPA ose

receptora u zidovima krvnih sudova i u samom srčanom mišiću, što dovodi do povećanja pulsa i krvnog pritiska. Kao posledica ovih promena javlja se povećan protok krvi kroz mozak

i mišiće omogućavajući na taj način bržu reakciju „bori se ili beži”. Ova momentalna reakcija ANS praćena je sekundarnim odgovorom na stres, koji podrazumeva sintezu i oslobađanje kortikosteroida iz kore nadbubrega kao krajni rezultat aktivacije HPA ose (Tsigos i Chrousos, 2002), a koji su potrebni za ponovno uspostavljanje homeostaze. Važno je napomenuti da pored HPA ose, jednako važnu ulogu u regulaciji adaptivnog odgovora na stres imaju i druge moždane strukture u limbičkom sistemu i moždanom stablu, o kojima će kasnije biti reči (Chrousos i Gold, 1992; Habib i sar., 2001). Ove više moždane oblasti zajedno sa HPA osom usklađuju neuro-endokrine, autonomne i emocionalne puteve, što za posledicu ima promene intenziteta i trajanja odgovora na stres.

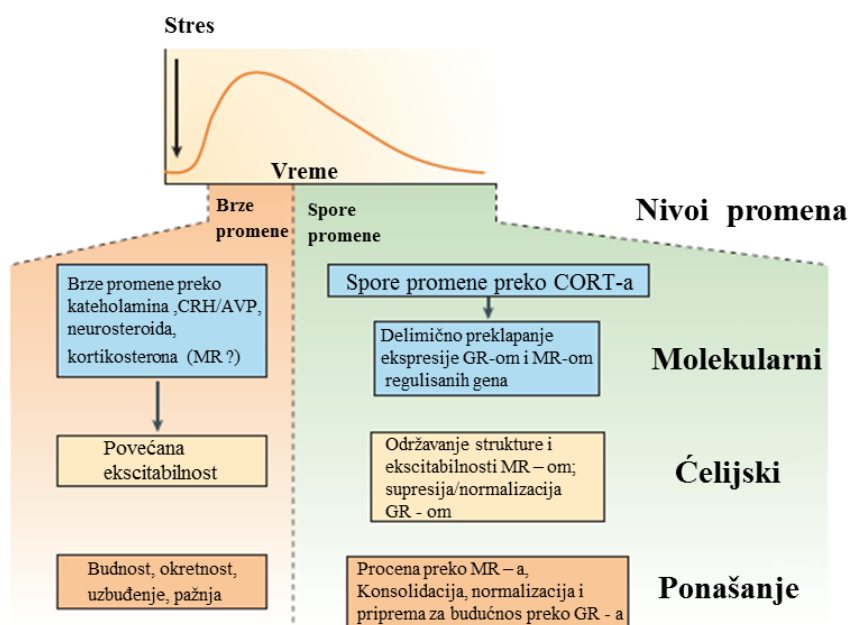
Aktivacija HPA ose u odgovoru na stres podrazumeva sintezu kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) i arginin-vazopresin peptida (AVP) u paraventricularnom (PVN) jedru hipotalamusa i njihovo oslobađanje u portalni krvotok hipofize. Tamo CRH i AVP deluju sinergistički i vezuju se za specifične receptore (CRH-R i V1B) u adenohipofizi, gde izazivaju sintezu i oslobađanje adrenokortotropnog hormona (ACTH) od njegovog prekursora propiomelanokortina (POMC). ACTH, oslobođen u periferni krvotok, stiže do fascikularne zone kore adrenalnih žlezda, gde indukuje sintezu i lučenje glukokortikoida (kortizola kod ljudi i kortikosterona kod glodara, dalje u tekstu KORT). Oslobođeni glukokortikoidi preko unutarćelijskih receptora učestvuju u regulaciji brojnih fizioloških procesa u organizmu (Bamberger i sar., 1996; Munck i sar., 1984). Približno 90% molekula KORT-a u cirkulaciji se nalazi vezano za proteinske nosače, kortikosteroid-vezujuće globuline, a samo nevezani KORT slobodno prolazi krvno-moždanu barijeru i ćelijske membrane. Glukokortikoidi dovode do mnogih adaptivnih procesa tako što stimulišu energetske metabolizam, glukoneogenezu i lipolizu. Sa druge strane, neadekvatna ili prekomerna aktivacija HPA ose može dovesti do razvoja određenih patoloških stanja, poput smanjenog rasta, problema u reprodukciji i raznih inflamatornih stanja, kao i metaboličkih poremećaja kao što su hipertireodizam i dijabetes (McEwen i Stellar, 1993; Munck i sar., 1984).

Kao što smo naveli, glukokortikoidi igraju bitnu ulogu u regulaciji intenziteta i dužine aktivacije HPA ose, na taj način što se bazalni nivo glukokortikoida održava mehanizmom negativne povratne sprege, koji reguliše sekreciju ACTH, CRH i u manjem stepenu AVP-a (Joels i de Kloet, 1994). Negativna povratna sprega se odigrava preko dva mehanizma: na nivou genoma (odložena povratna sprega - genomski efekti) i na nivou ne-genomskih, brzih mehanizama, koji su osetljivi na nivo glukokortikoida. Regulacija HPA ose na nivou genoma

odigrava se preko sistema od dva receptora, mineralokortikoidnog receptora (MR) i glukokortikoidnog receptora (GR), koji su ko-eksprimirani u značajnim količinama u neuronima limbičkog mozga, poput hipokampusa (de Kloet i sar., 2005; Herman i sar., 2003; Reul i de Kloet, 1986). Upravo i sama činjenica da su ovi receptori veoma zastupljeni ne samo u ovim moždanim regionima nego i u različitim ćelijama organizma objašnjava širok spektar dejstva glukokortikoida na brojne fiziološke procese (Buckingham, 2006).

Ova dva receptora se međusobno razlikuju u afinitetu za glukokortikoide (KORT) i samim tim u funkciji (Reul i de Kloet, 1986). Veći afinitet za KORT ima MR, oko 10 puta, i on biva predominantno aktiviran pri nižim, bazalnim nivoima glukokortikoida i uključen je u procenjivanje senzornih informacija i njihovu organizaciju. Sa druge strane, GR ima niži afinitet za glukokortioide od MR-a i on se aktivira usled značajnog povećanja nivoa KORT-a što se dešava u cirkadijalnom piku i u stresnim situacijama, i ima ključnu ulogu u normalizaciji homeostaze, odnosno, gašenju odgovora na stres i u oporavku, kao i u formiranju memorije vezane za stresne događaje (de Kloet i sar., 2005). Mehanizam gašenja reakcije na stres se odigrava preko mehanizma negativne povratne sprege, vezivanjem GR-a za KORT. Na nivou hipofize glukokortikoidi suprimiraju transkripciju gena za POMC i istovremeno stupaju u interakciju sa CRH-R1 i akutno sprečavaju vezivanje CRH molekula za svoje receptore i dovode do smanjenja broja CRH-R1 receptora. Na nivou hipotalamusa, glukokortikoidi suprimiraju sintezu iRNK za CRH i AVP i njihovu sekreciju. Akutna i relativno brza inhibicija oslobađanja CRH molekula praćena je smanjenom aktivacijom ekspresije CRH i AVP molekula u PVN neuronima hipotalamusa (Keller-Wood i Dallman, 1984; Papadimitriou i Priftis, 2009). Negativna povratna sprega je ispoljena i centralno, na nivou limbičkog mozga, pre svega hipokampusa, bademastih jedara i prečeeone kore (eng. prefrontal cortex - PFC). Iako se smatra da su ovi delovi limbičkog mozga samo indirektno povezani sa PVN jedrom hipotalamusa (Fernandes i sar., 2007; Floyd i sar., 2001; Hurley i sar., 1991), brojne strukturne i funkcionalne studije pružaju čvrste dokaze o njihovoj ulozi u regulacije HPA ose (Dedovic i sar., 2009). Naime, pokazano je da hipokampus deluje inhibitorno na CRH neurone hipotalamusa preko polisinaptičkog kola, dok bademasta jedra pokazuju direktan ekscitatoran efekat na ove neurone. Drugi važni ulazni signali uključeni u regulaciju aktivnosti HPA ose polaze od ushodnih monoaminskih putanja. Dodatno, na regulaciju HPA ose utiču i brojni hormoni, neurotransmiteri, citokini, i faktori rasta. Na taj način, zajedničkom koordinisanom akcijom sistema od dva receptora, MR-a i GR-a, koji imaju različit afinitet za vezivanje KORT-a u ćeliji dolazi do adekvatne reakcije mozga i

celog organizma na stresor a koji se između ostalog karakteriše i promenama u ponašanju jedinke (de Kloet i sar., 2005).



Slika 3. Vremenska skala ćelijskog odgovora na hormone stresa (Adžić, 2010)

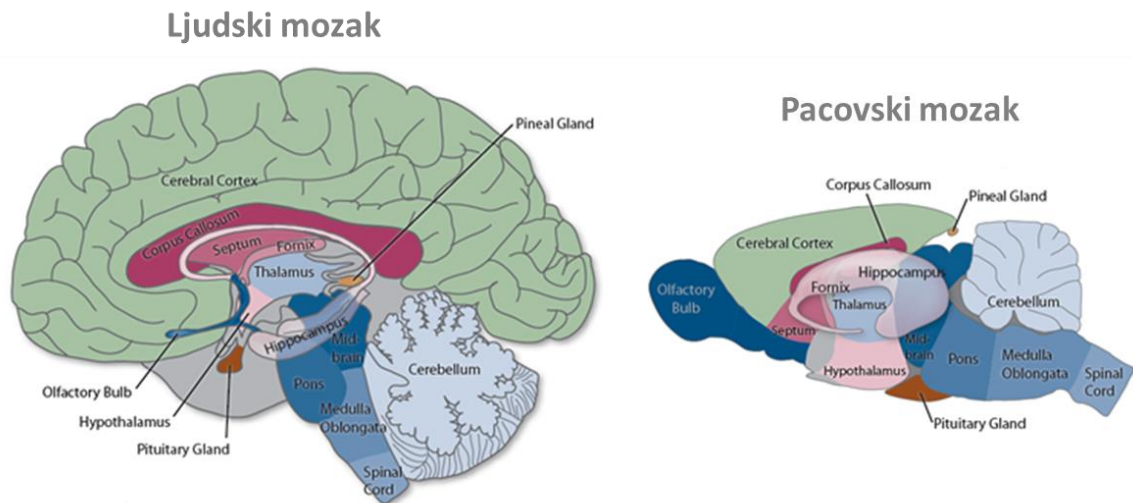
1.1.3 „Stresirani mozak”

S obzirom na to da ova teza proučava molekulske promene u mozgu nastale pod uticajem stresa, a koje mogu biti odgovorne za promene u ponašanju, u ovom delu daćemo kratak pregled moždanih regiona CNS-a koji učestvuju u odgovoru na stres. CNS izuzetno brzo detektuje i obrađuje stresne stimulse menjajući koncentraciju hormona i neurotransmitera.

U mozgu, zastupljenost određenih neuralnih veza i signalizacija određuje šta je preteće i potencijalno stresno za organizam i shodno tome određuje i fiziološki odgovor i ponašanje koje može biti, kao što smo naveli ranije, ili adaptivno ili štetno (McEwen, 2007; McEwen i Gianaros, 2010). Uspešna adaptacija na stres podrazumeva zajedničko delovanje hormona na nekoliko nivoa u CNS-u, koji obuhvataju limbički sistem, između ostalog hipokampus, bademasta jedra i PFC (de Kloet i sar., 2005; Kvetnansky i sar., 1995).

Neke komponentne limbičkog mozga učestvuju u kontroli emocija, motivacije, ponašanja i dugotrajnog pamćenja (Drevets, 2000), a njihova disfunkcija je usko povezana sa brojnim neuropsihijatrijskim oboljenjima. Naime, najnovije studije pokazuju značajne

morfološke promene u strukturama limbičkog sistema, u hipokampusu, medijalnom PFC-u i bademastim jedrima, kod emotivnih poremećaja. Primera radi, kod pacijenata sa depresijom i šizofrenijom detektovano je smanjenje zapremine hipokampusa (Sheline i sar., 1996) i promene protoka krvi u PFC-u i bademastim jedrima, koje se u velikoj meri neutrališu tretmanom antidepresivima (Drevets, 2000). Ovakvi nalazi dodatno pojačavaju vezu između narušenih funkcija limbičkog mozga i razvoja depresije (Heim i Nemeroff, 1999). Kao nishodni deo limbičkog sistema koji reguliše reakciju na stres uključuje se i hipotalamus koji aktivira HPA osu preko koje se prenosi čitav niz spoljašnjih i unutrašnjih stimulusa. Fokus ove teze usmeren je na ulogu hipokampusa i molekulske signalizacije u njemu, jer on predstavlja najosetljiviju moždanu strukturu koja učestvuje u odgovoru na stres.

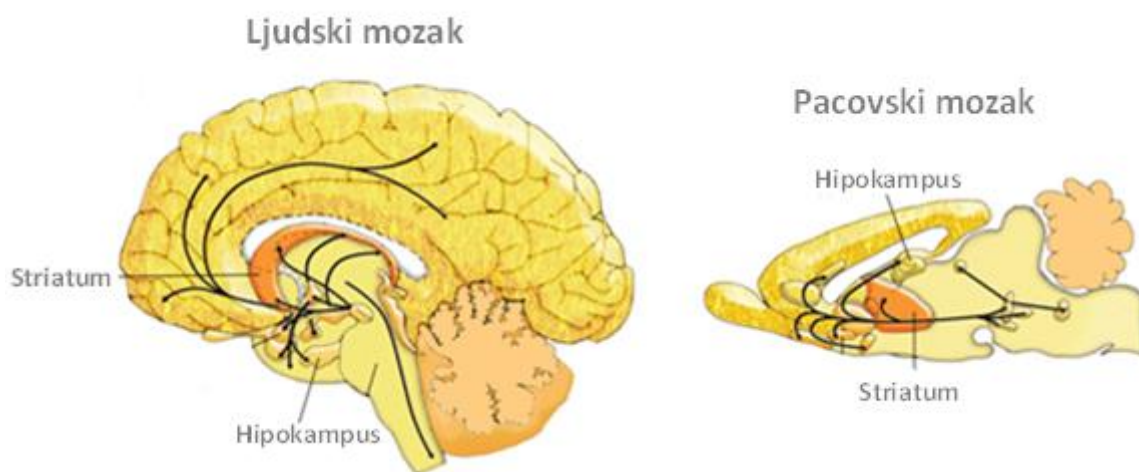


Slika 4. Strukture limbičkog sistema, mozak čoveka i pacova na slici

1.1.3.1 Hipokampus

Hipokampus je prvi moždani region, pored hipotalamusa, koji je identifikovan kao jedna od ključnih struktura uključenih u odgovor na stres i glukokortikoide. To je parna struktura, smeštena u središnjem slepoočnom režnju ispod moždane kore sa kojom je tesno povezan (Slika 5). Hipokampus igra bitnu ulogu u procesima učenja i formiranja memorije, u obradi kontekstualnih aspekata emotivnih događaja i regulaciji visceralnih funkcija, uključujući regulaciju HPA ose. Hipokampus je veoma bogat MR i GR receptorima i drugim posrednicima reakcije na stres, a koji mogu pojačati kognitivne funkcije, raspoloženje i motivaciju i poboljšati neuroprotekciju. S druge strane, ovi isti molekuli mogu imati štetne efekte na hipokampus u uslovima izlaganja organizma dugotrajnom stresu. U prilog tome

svedoče i brojni rezultati iz studija sprovedenih na životinjskim modelima, kao i nalazi kliničkih studija koje jasno pokazuju usku povezanost između stresa i različitih patoloških stanja, koja se karakterišu strukturnim i funkcionalnim promenama u hipokampusu. Brojne studije povezuju hipokampus sa inhibicijom HPA sistema, jer stimulacija ove limbičke strukture dovodi do smanjenja sekrecije glukokortikoidnih hormona kod pacova i ljudi (Dunn i sar., 2005). Hipokampus je povezan sa bademastim jedrima, anatomski i funkcionalno (Petrovich i sar., 2001; Pitkanen i sar., 2000) i ove dve strukture su u tesnoj vezi sa vegetativnim delovima limbičkog sistema, hipotalamusom i moždanim stablom, i višim kortikalnim strukturama, posebno sa PFC-om. Ukratko, senzorni ulazni signali se putem moždinskih i kranijalnih nerava prenose kroz moždano stablo do talamusa, a odatle, kortiko-talamičkim projekcijama indirektno ili paleospinotalamičkim projekcijama direktno do bazolateralnog kompleksa bademastih jedara. Odatle senzorni signali idu do hipotalamusa i natrag do moždanog stabla, koji kontrolišu ANS i omogućavaju adekvatan odgovor na stres. Dalje, projekcije ovih neurona idu do ushodnih monoaminskih i acetilholinskih neurona, uključujući noradrenalinske neurone *locus coeruleus*, dopaminske neurone *substantiae nigrae* i regije ventralnog tegmentuma (VTA), serotoninskih jedara raphe formacije acetilholinskih neurona iz bazalnog jedra (Davis i Whalen, 2001), koji zajedno sa hipokampusom i PFC-om, čine centralni sistem uključen u odgovor na stres.



Slika 5. Položaj hipokampusa u mozgu kod ljudi i pacova

Strukturna oštećenja hipokampusa povećavaju nivo iRNK za CRH i AVP u PVN hipotalamusa i utiču na sekreciju ACTH-a u hipofiznim neuronima (Herman i Cullinan, 1997). Dalje, pokazano je da se inhibitorno dejstvo hipokampusa na porast KORT-a u stresu i smanjenu ekspresije gena za CRH/AVP ostvaruje preko neurona smeštenih u njegovom CA1

regionu (Herman i sar., 1996), što ukazuje na regionalno specifičnu regulaciju HPA ose od strane hipokampusa. Različiti tipovi hroničnog stresora, starenje, kao i visoke doze kortikosteroida dovode do oštećenja neurona u hipokampusu kao i do smanjenja nivoa kortikosteroidnih receptora, što dovodi do produženja reakcije na stres, kao i inhibicije HPA ose (Issa i sar., 1990; Sapolsky i sar., 1986). Sve ukupno, limbički mozak je uključen u regulaciju različitih emocionalnih, kognitivnih i indirektno autonomne funkcije u regulaciji odgovora na stres. Specifično, narušavanje ovih funkcija praćeno je brojnim strukturnim, morfološkim i molekularnim promenama u ovim limbičkim strukturama usled neadekvatnog odgovora na stres. Važno je napomenuti da hipokampus i PFC u većoj meri inhibiraju aktivnost HPA ose i sekreciju glukokortikoida, dok ih bademasta jedra aktiviraju (Feldman i sar., 1995; Jacobson i Sapolsky, 1991).

1.1.4 Alostaza i alostatsko opterećenje

Adaptivni procesi koji leže u osnovi odgovora na stres nazivaju se zajedničkim terminom alostaza (Sterling i Eyer, 1988; McEwen, 2007). Ako je odgovor na stres neadekvatan, preteran i produžen, cena adaptacije može biti previsoka i to vodi do stanja koje se naziva alostaza ili alostatsko opterećenje. Koncept alostatskog opterećenja odnosi se na kumulativne promene koje rezultuju reakcijom tela i mozga „izdrži ili se pokidaj” (eng. *wear or tear*) (McEwen, 2005). Nemogućnost da se izborimo na adekvatan način sa stresnim događajima dovodi do maladaptivnog odgovora i predispozije za razvoj patologija vezanih za stres. S druge strane, treba imati na umu da veliki broj studija pokazuje da odgovor na stres karakteriše visok stepen varijabilnosti i da samo određeni broj subjekata, bilo životinja bilo ljudi, izloženih stresu na kraju razvije neke od patologija. Stoga, individualna podložnost organizma svake individue igra bitnu ulogu u odgovoru na stres i uslovljena je različitim genetičkim i sredinskim uslovima.

1.1.5 Psihopatologije koje su povezane sa stresom

Za mnoge zdravstvene probleme se smatra da su etiološki bar jednom delom posledica izlaganja organizma hroničnom stresu i naše nemogućnosti da se adekvatno izborimo sa istim. Glavna patološka stanja koja se dovode u vezu sa stresom su kardiovaskularne bolesti, različiti endokrinološki i metabolički poremećaji i između ostalog, najviše afektivni poremećaji, odnosno, poremećaji raspoloženja. Među afektivnim bolestima glavni fokus je na depresiji i u ovoj tezi dat je kratak pregled osnovnih karakteristika ovog poremećaja;

etiologija i biološka osnova patogeneze bolesti, polne specifičnosti, kao i pregled prekliničkih i kliničkih istraživanja, koja se bave s jedne strane hroničnim stresom kao uzročnikom i s druge strane, tretmanom antidepresivima koji indukuju promene u mozgu.

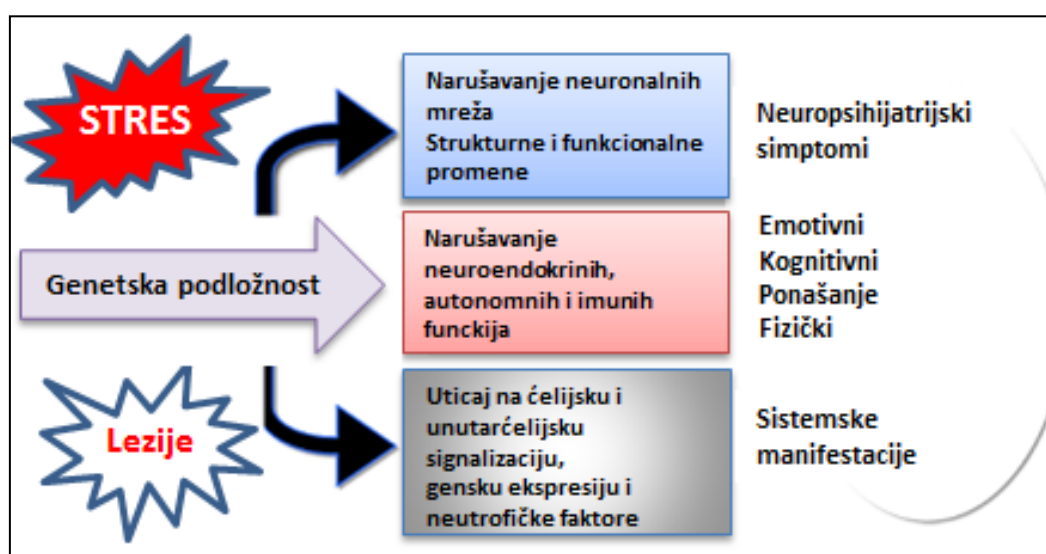
1.2 Depresija

Depresija, depresivni poremećaj ili klinička depresija predstavlja heterogeni poremećaj sa visoko varijabilnim tokom, nekonzistentnim odgovorom na tretman i u potpunosti neutvrđenim mehanizmom odgovornim za nastanak ove bolesti (Belmaker i Agam, 2008). Simptomi depresije mogu biti emocionalni, npr. tuga i nadražljivost, fizički (poremećaji spavanja/buđenja), ili kognitivni (osećaj krivice, pesimizam, suicidalne misli). Često se javljaju brojni motorički, autonomni, endokrini i imuni poremećaji. Ovako raznovrsni simptomi i heretogena klinički slika koja se u bitnoj meri može razlikovati od pacijenta do pacijenta, nerazjašnjena patogeneza, kao i sam tok bolesti i uspešnost lečenja, ukazuje da depresiju možemo predstaviti pre kao skup većeg broja bolesnih stanja različite etiologije, nego kao pojedinačnu bolest (Berton i Nestler, 2006). Osnovna hipoteza nastanka ove bolesti jeste da je depresija posledica kompleksnih interakcija različitih genetičkih i sredinskih faktora (Manji i sar., 2001). Važno je napomenuti da ne postoje specifični i objektivni dijagnostički markeri odnosno pokazatelji na osnovu kojih bi se sa sigurnošću mogao odrediti uzrok nastanka depresije i postaviti specifična dijagnoza depresivnog poremećaja (Jakovljevic i sar. 2013). Dva najpoznatija i najčešće upotrebljavana kriterijuma za dijagnozu depresije su Dijagnostičko statistički priručnik za duševne poremećaje V (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-V*) koji se koristi u Sjedinjenim Američkim Državama i Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema 11 (eng. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-11*) koja je u upotrebi u Evropi.

U DSM-V klasifikaciji, depresivni poremećaj se nalazi u okviru grupe poremećaja raspoloženja u delu *Axis I* u kome su svrstana glavna psihijatrijska oboljenja. DSM-V kriterijum koristi izraz „veliki depresivni poremećaj“ (eng. *major depressive disorder, MDD*) koga karakteriše postojanje jedne ili više epizoda depresije. Kriterijumi za dijagnozu depresivne epizode po DSM-V nalaze se u **Tabeli 1**.

Prema ICD-11 klasifikaciji, depresivni poremećaj je takođe svrstan u grupu poremećaja raspoloženja u okviru „F“ klase oboljenja, tj. psihijatrijskih poremećaja. Ovde se koriste izrazi „depresivna epizoda“ (za prvu epizodu depresije) i „rekurentni depresivni poremećaj“ (koji podrazumeva najmanje dve depresivne epizode). Kriterijumi za dijagnozu depresivne epizode po ICD-11 vrlo su slični onima prema DSM-V klasifikaciji.

Zbog visoke varijabilnosti u kliničkoj slici i simptomima, depresija se obično smatra heterogenim sindromom sastavljenim od velikog broja bolesti različitog uzroka i patofiziologija (Nestler i sar., 2002). Komorbiditet depresije i drugih bolesti više je pravilo nego izuzetak, što zahteva multi i transdisciplinarni pristup u njenom razumevanju i lečenju.



Slika 6. Faktori rizika odgovorni za razvoj depresije

Brojni pokušaji istraživača da razotkriju mehanizme koji leži u osnovi nastanka depresije, kao i adekvatnog tretmana doprineli su prikupljanju velike količine korisnih informacija, ali nažalost, i dalje nedostaju svi delovi izuzetno složene slagalice.

Tokom godina, postavljeno je nekoliko teorija koje se bave etiologijom depresije i u ovoj tezi ukratko će biti opisane najpoznatije hipoteze, sa različitim predisponiranim faktorima, kao što su genetičke i sredinske promene, sa fokusom na glukortikoidnu i monoaminsku teoriju.

Tabela 1: Dijagnostički kriterijumi za uspostavljanje depresije prema DSM-V

<p>Depresija Simptomi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Depresivno ili uznemireno ponašanje <ul style="list-style-type: none"> • Gubitak zadovoljstva (anhedonija) • Problemi sa apetitom/gubitak ili dobijanje na težini • Problemi sa spavanjem/insomnija ili hipersomnija • Narušena psihomotorna aktivnost/agitacija ili retardacija <ul style="list-style-type: none"> • Umor ili gubitak energije • Osećanje manje vrednosti, krivice i bespomoćnosti <ul style="list-style-type: none"> • Problemi sa koncentracijom i razmišljanjem • Učestale misli o smrti ili samoubistvu • Ostali simptomi – anksioznost često prisutna u depresiji, kao i fizički bol poput glavobolja, bolova u leđima i dr. <p>Depresivna epizoda se dijagnostikuje ukoliko je konstatovano prisustvo najmanje 5 simptoma navedenih na listi u vremenskom periodu od najmanje 2 nedelje, koji su i isto vreme doveli do narušavanja normalnog socijalnog i društvenog funkcionisanja. Prisustvo simptoma bilo depresivnog ponašanja bilo anhedonije je neophodno za dijagnostikovanje depresije.</p>
Kriterijumi za procenu težine depresivne epizode
<p>Blaga</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ depresivno raspoloženje ili anhedonija + 4 druga simptoma ➤ manje poteškoće u socijalnom/poslovnom funkcionisanju <p>Umerena</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ depresivno raspoloženje ili anhedonija + 4 druga simptoma ➤ promenljive faze u socijalnom/poslovnom funkcionisanju <p>Teška</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ depresivno raspoloženje ili anhedonija + 4 ili više drugih simptoma ➤ značajna narušenost socijalnog/poslovnog funkcionisanja – ili sa psihotičnim simptomima

1.2.1 Strukturne promene u mozgu u depresiji

Veliki broj podataka ukazuje na to je depresija praćena određenim neurobiološkim promenama na strukturnom i funkcionalnom nivou, koje se mogu zadržati čak i tokom remisije kliničkih simptoma. Studije neuroimidžinga na pacijentima koji pate od rekurentnog depresivnog poremećaja ukazala su na smanjenje zapremine hipokampusu i druge strukturne i morfološke promene (Sheline, 2003; Videbech i Ravnkilde, 2004). Takođe, učestale i dugotrajne i hronične depresivne faze i odsustvo tretmana antidepresivima isto tako dopinose progresivnom smanjenju zapremine hipokampusu kod nekih depresivnih pacijenata (aan het Rot i sar., 2009). Zauzvrat, ove strukturne promene na hipokampusu mogu objasniti kognitivne poremećaje, kao i mnoštvo drugih simptoma koji se javljaju u depresiji. Pored hipokampusu, strukturne promene su pokazane i na nivou drugih moždanih struktura, poput bademastih jedra, ventralnog striatuma, prednje pojasne kore, orbitofrontalnog korteksa i PFC-a (Campbell i MacQueen, 2006; Konarski i sar., 2008; Sheline, 2003). Upravo ove strukture su iste one koje su ključne u odgovoru na stres (ranije opisane u tekstu), što je jedan od glavnih pokazatelja da je stres okidač za razvoj depresije.

Neuropatološke promene koje se detektuju u depresiji najvećim delom potiču iz studija na mozgovima osoba koje su izvršile samoubistvo. Ovakav pristup istraživanja je doveo do otkrića brojnih nepravilnosti, od smanjenja moždanih struktura do procesa ćelijske atrofije i molekularnih promena (Rajkowska, 2003). Specifično analiza moždanog tkiva depresivnih pacijenata je otkrila smanjenje zapremine hipokampusu praćeno povećanom gustinom glijskih i nervnih ćelija (smanjene grananja dendrita i dendritskih trnića) (Stockmeier i sar., 2004). Histopatološke analize, su potvrdile ćelijske promene i u drugim moždanim regionima, poput smanjene kortikalne gustine, promena nervne i glijske gustine u orbitofrontalnom i dorzolateralnom PFC-u, kao i bademastim jedrima (Bowley i sar., 2002; Rajkowska i sar., 1999). Dodatno, analize su dokumentovale nizak nivo moždanog neurotrofnog faktora (eng. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) u hipokampusu i PFC-u depresivnih pacijenata (Duman i Monteggia, 2006; Martinowich i sar., 2007). S druge strane, nađeno je povećanje ekspresije iRNK i proteina BDNF u hipokampusu pacijenata koji su tretirani antidepresivima neposredno pre smrti, u poređenju sa netretiranim pacijentima (Chen i sar., 2006).

Sveukupno, svi ovi rezultati pružaju jedinstven uvid u neurobiološke promene koje se nalaze u osnovi depresivnog poremećaja. Kao dodatak kliničkim nalazima neophodne su i

translacione studije, odnosno, upotreba životinjskih modela koji bi otkrili ćelijske i molekularne mehanizme koje se nalaze u osnovi patoloških promena kod osoba koje pate od depresije, i samim tim, doprinele poboljšanju dizajna novih antidepresiva čija bi efikasnost bila znatno bolja od postojećih. Životinjski modeli su neophodni i zbog lakše dostupnosti tkiva, poput moždanog, do kojeg je nemoguće ili jako teško doći u humanim studijama.

1.2.2 Biološka osnova depresije

Iako precizna etiologija depresivnog poremećaja još uvek nije u potpunosti razjašnjena, veliki broj faktora koji daju identitet ovoj bolesti veoma je dobro definisan. Kao što je navedeno, depresija je heterogeno oboljenje koje nastaje usled složene interakcije bioloških, psiholoških i sociokulturoloških faktora. Poslednjih godina načinjen je značajan napredak u pogledu razumevanja neurobiološke osnove depresije koji se ogleda u važnim rezultatima u pogledu genetike, „imidžinga“ i identifikaciji ključnih neuroloških mehanizama i sistema uključenih u regulaciju kognicije, emocija, i ponašanja. Sve ove biološke promene se dešavaju mahom istovremeno, pri čemu narušavanje različitih neurobioloških procesa može dovesti do istih nepravilnosti. Ova saznanja su istovremeno dovela i do identifikacije određenih molekula koji su poslužili za dizajn novih farmakoloških lekova i uspešnije terapiju.

U ovom delu biće dat kratak pregled postojećih hipoteza o etiologiji depresije, sa ciljem da se pojasne molekularne mehanizme za koje se smatra da učestvuju u etiologiji, patogenezi i tretmanu ovog kompleksnog multifaktorijalnog poremećaja.

1.2.3 Genetika depresije

Iako epidemiološke studije pretpostavljaju da je depresivni poremećaj umereno nasledan, oko 40% u ženskoj populaciji i oko 30% kod muškaraca (Kendler i sar., 2006; Sullivan i sar., 2000), dosadašnje studije nisu sa sigurnošću ustanovile povezanost depresije i neke genetičke komponentne. Glavni nalazi koji su ukazivali da nasleđe igra važnu ulogu u etiologiji depresije potiču od studija na blizancima, u kojima je detektovano da jednojajčani blizanci imaju višu prevalencu za razvoj depresije nego dvojajčani (Uher, 2008). Međutim, tokom godina nije se došlo do nedvosmislenih, konzistentnih podataka koji potvrđuju učešće specifičnih gena, kao ni čitavih klastera gena u etiologiji depresije. Razlog tome leži u činjenici da je depresija poligenetska bolest u kojoj se značajan uticaj odnosi na interakciju

različitih gena, kao i na interakciju različitih genskih varijanti i sredinskih faktora. Takođe, treba naglasiti da nijedan od tih gena kandidata nije specifičan za depresiju iz razloga što je pokazana njihova nepravilnost i u drugim psihijatrijskim oboljenjima, na primer gena za GR, za BDNF, triptofan hidroksilazu 2, ili CRH i drugi.

Pored analize gena, velika pažnja je posvećena i analizi specifičnih genetičkih varijanti, između ostalih analizi polimorfizama. Navešćemo samo neke od primera. Smatralo se da polimorfizam u genu za serotoninški transporter (5-HTTLPR) predstavlja predispoziciju za razvoj depresije, kao i vezu između crta ličnosti i anksioznosti i pesimizma (Belmaker i Agam, 2008; Lesch i sar., 1996). Dodatne analize pokazale su da prisustvo polimorfizma u kratkom alelu 5-HTTLPR gena doprinosi razvoju depresije samo u interakciji sa stresnim životnim događajima (Caspi i sar., 2003). Dalje, pokazano je da postoji značajna interakcija i osetljivost na sredinske faktore u pojavi depresije kod osoba sa pojedinačnom nukleotidnom zamenom, Val66Met u genu za BDNF i kratkim alelom 5-HTTLPR gena (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) (Kaufman i sar., 2006; Uher, 2008). Isto tako, nađeno je da određeni polimorfizmi u genu za GR, kao i genu za receptor za CRH kod dece sa ranim traumatskim iskustvom, doprinose razvoju depresije u kasnijem životnom dobu (Bradley i sar., 2008; El Hage i sar., 2009). Takođe, postoje i pokazatelji da specifični polimorfizmi u genima koji učestvuju u transmisiji dopamina povećavaju podložnost za razvoj depresije (Opmeer i sar., 2010). Iako ove studije prilično govore u prilog postojanja veze između određenih polimorfizama i depresije, još uvek nema konkretnih, replikativnih i pouzdanih podataka koji to potvrđuju. Isto tako studije koje su analizirale polimorfizme u čitavom genomu (eng. *genome-wide association study*, GWAS) nisu dale pouzdane rezultate. Naime, pokazano je da su uticaji pojedinačnih polimorfizama mali (Wray i sar., 2012). Uzimajući u obzir sve navedeno, može se zaključiti da je podložnost i razvoj depresije u određenoj meri pod uticajem interakcije genetičkih i sredinskih faktora.

Pored polimorfizama, važno je napomenuti i uticaj pojedinih epigenetičkih modifikacija na etiologiju depresije. Naime, epigenetičke modifikacije utiču na strukturu i funkciju hromatina i na taj način dovode do promena u ekspresiji gena i funkciji proteina. Novija istraživanja pokazuju da sredinski faktori mogu indukovati epigenetičke promene i taj način dovesti do dugotrajnih promena u nervnim i endokrinim sistemima, što dovodi do povećanog rizika za razvoj psihijatrijskih bolesti, naročito depresije. Poznate su studije na životinjama u kojima je usled zanemarivanja mladunaca od strane majke tokom postnatalnog perioda došlo do povećane osetljivosti i predispozije za razvoj ponašanja nalik depresivnom

(Francis i sar., 1999; Liu i sar., 1997). Ove promene u ponašanju praćene su i molekularnim promenama kao što su smanjena ekspresija GR-a u hipokampusu, a što je rezultat izmenjene metilacije I7 egzona promotorskog regiona GR-a (Waever i sar., 2004). Promene u metilacionom statusu GR-a u hipokampusu nađene su i kod depresivnih pacijenata koji su izvršili suicid a u detinjstvu su bili zlostavljani (McGowan i sar., 2009). Pored gena za GR, izmenjen metilacioni status u depresiji je primećen i kod drugih gena, poput BDNF-a i gena za vazopresin (Murgatroyd i sar., 2009; Roth i sar., 2009). Sve ovo ukazuje da epigenetičke promene mogu imati značajan uticaj na patogenezu depresivnog poremećaja.

1.2.4 Monoaminska hipoteza

Pre pola veka rezultati neurobioloških istraživanja i klasičnih farmakoterapija su doveli su do formulacije „Monoaminske hipoteze nastanka depresije” koja pretpostavlja da glavni uzrok ovog poremećaja leži u niskom nivou monoamina u mozgu, pre svega serotonina i noradrenalina i/ili dopamina (Coppen, 1967). Zaista, biohemijska istraživanja kod depresivnih pacijenata fokusirana su na ove monoaminske neurotransmitere, jer monoaminski putevi igraju važnu ulogu u delovanju antidepresiva. Monoaminski antidepresivi ispoljavaju svoj efekat tako što stimulišu monoaminske signalne puteve i povećavaju sintezu i oslobađanje monoamina (Wong i Licinio, 2001). Drugi razlog za izučavanje monoamina je taj da oni posreduju u razvoju adaptivnih odgovora na stresne događaje, te se, kao što je već napomenuto, depresija može posmatrati kao neuspešan adaptivni odgovor. Monoaminska hipoteza o nastanku depresije zasniva se na promenama u regulaciji ravnoteže neurotransmitera (prenosioca nervnih impulsa).

Neurotransmitere možemo podeliti u tri osnovne grupe:

1. Monoamine ili biogene amine: obuhvataju kateholamine (dopamin, noradrenalin i adrenalin), indolamine (serotonin, histamin i melatonin) i estre (acetilholin);
2. Aminokiseline: ekscitatorne (glumatat, aspartat) i inhibitorne (gama-amino buterna kiselina (γ -GABA) i glicin);
3. Purinske nukleozide i nukleotide (adenozin i ATP).

Monoaminska hipoteza prva je dala objašnjenje hemijskih promena u mozgu koji mogu biti u osnovi depresivnih simptoma. Monoaminski putevi, naročito serotonina (5 HT) i noradrenalina, inervišu kortikalne i subkortikalne moždane regione koji su uključeni u

regulaciju emocija i raspoloženja. Mnogobrojne strukturne i funkcionalne neuroimidžing studije uočile su narušenost monoaminske signalizacije kod pacijenata sa depresijom, mada dobijeni podaci često nisu bili konzistentni (Anisman i sar., 2008). Između ostalog, nađeno je da u depresiji dolazi do različitih promena u sintezi i razgradnji pojedinih amina u različitim moždanim regionima ključnim u odgovoru na stres, te promenama u broju i osetljivosti njihovih receptora i istrošenosti monoaminskih sistema i njihovih nishodnih signalnih puteva (Anisman i sar., 2008; Maes i sar., 2013). Iako monoaminska teorija ima potporu u brojnim kliničkim studijama, ona ipak pokazuje određena ograničenja, odnosno, ima nekoliko bitnih nedostataka. Naime, eksperimentalno je pokazano da smanjena količina monoamina kod zdravih ljudi ne utiče na promenu ponašanja i samo u manjoj meri menja raspoloženje kod zdravih kontrola, odnosno, kod zdravih osoba sa porodičnom istorijom depresije i kod nelečenih pacijenata sa remisijom depresije (Ruhe i sar., 2007). Isto tako, akutno povećanje monoamina nije se pokazalo dovoljnim u poboljšanju raspoloženja i depresivnih simptoma. Naime, monoaminski antidepresivi neposredno nakon aplikacije stimulišu monoaminske sisteme i dovode do povećanja koncentracije monoamina u sinapsi, međutim, njihovo terapijsko dejstvo se ispoljava tek nakon 2 do 3 nedelja (Berton i Nestler, 2006). Shodno tome, iako je nesumnjivo da nedostatak ovih transmitera, pre svega serotonina, noradrenalina i dopamina, u mozgu igra bitnu ulogu u etiologiji i mehanizmu lečenja depresije, jasno je da oni predstavljaju samo deo celokupne priče i da oni sami nisu dovoljni da objasne prirodu depresivnog poremećaja, ali najverovatnije sugerišu vezu između nivoa monoamina i predispozicije za razvoj iste. Naime, primarno povećanje nivoa monoamina u sinapsi pod uticajem antidepresiva dovodi do nastanka sekundarnih neuroplastičnih promena za koje je neophodno određeno vreme i koje uključuju niz transkripcionih i translacionih promena koje posreduju u ćelijskoj plastičnosti (Krishnan i Nestler, 2008; Nestler i sar., 2002; Pittenger i Duman, 2008). Danas se zna da su upravo ovo razlozi zašto antidepresivi imaju odloženo dejstvo. Ovakvi nalazi usloveli su da se nastajanje novih teorija o etiologiji depresije, kao što je neuroplastična hipoteza o kojoj će biti reči dalje u tekstu.

Monoaminske antidepresive možemo podeliti u nekoliko klasa na osnovu monoamina preko kojih ostvaruju svoje dejstvo: antidepresivi iz klase selektivnih inhibitora ponovnog unosa serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI), inhibitori ponovnog unosa noradrenalina (eng. *nordrenalin reuptake inhibitors*, NRI), inhibitori ponovnog unosa serotonina i noradrenalina (SNRI), triciklicni antidepresivi (TCA) i inhibitori monoamin oksidaze (MAO), koji stimulišu moždane monoaminske sisteme i povećavaju nivo

monoamina (Wong i Licino, 2001). Dalje, nedostatak dopamina koji je primećen u depresiji poklapa se sa incidencom depresije kod pacijenta koji boluju od Parkinsonove bolesti. U skladu sa tim, pokazano je i da određeni direktni agonisti dopaminskih receptora, koji su prvobitno razvijeni za tretman Parkinsonove bolesti, pokazuju antidepresivno dejstvo (Gershon i sar., 2007).

1.2.5 Glukokortikoidna (HPA) hipoteza

Tokom godina prikupljen je značajan broj podataka koji ukazuju da se narušena glukokortikoidna signalizacija i aktivacija HPA ose nalaze u osnovi depresije, a da se upotrebom antidepresiva ovo stanje može normalizovati (Arborelius i sar., 1999; Holsboer, 2001; Nestler i sar., 2002; Sachar i Baron, 1979); svi oni su doveli do nastanka „glukokortikoidne hipoteze” depresije (Holsboer i Barden, 1996). Kao što je ranije opisano detaljno, HPA osa predstavlja integrativni centar odgovora i adaptacije organizma na stres, koji je pod kontrolom viših moždanih centara, gde kao krajnji rezultat aktivnosti HPA ose dolazi do sekrecije glukokortikoida. Glukokortikoidi utiču na mnogobrojne procese u organizmu: stimulišu glukoneogenezu u jetri, lipolizu u masnom tkivu, suprimiraju imuni odgovor, utiču na procese učenja i formiranja memorije u mozgu, raspoloženje itd. (Charmandari i sar., 2005). Dalje, glukokortikoidi negativno regulišu i samu aktivnost HPA ose putem mehanizma negativne povratne sprege, naročito preko narušene funkcije GR-a („glukokortikoidna rezistencija”) (Holsboer, 2000; Pariante i Miller, 2001). Glukokortikoidna hipoteza postavljena je na osnovu sledećih nalaza. Naime, kod depresivnih pacijenata detektovani su povišeni nivoi ACTH i kortizola u perifernoj krvi, kao i povećan nivo KORT-a u pljuvački, likvoru i urinu usled aktivacije HPA ose (Burke i sar., 2005; Holsboer, 2000; Rubin i sar., 1987). Dalje, pored povišenog nivoa KORT-a, dobar deo depresivnih pacijenata pokazuju i neadekvatni, pojačani odgovor u sklopu neuroendokrinog testa supresije deksametazonom (DEX) i DEX/CRH testa (eng. *dexametazone suppression test*, DST) (Carroll, 1982). Oni se karakterišu smanjenom sposobnošću DEX-a, potentnog sintetičkog glukokortikoida, da smanji nivo KORT-a i ACTH-a u plazmi (Nestler i sar., 2002). S druge strane, pacijenti sa Kušingovim sindromom, koji imaju izuzetno visoke koncentracije KORT-a, često pokazuju i depresivne simptome (Krishnan i Nestler, 2008; McEwen, 2007). Isto tako, postoje direktni i indirektni podaci da kod nekih depresivnih pacijenata dolazi do hipersekrecije CRH-a (Arborelius i sar., 1999; Holsboer, 2001; Kasckow i sar., 2001; Merali i sar., 2004; Nemeroff i sar., 1984), između ostalog, povećanja nivoa u cerebrospinalnoj

tečnosti (Nemeroff i sar., 1984). Dodatno, pokazano je i da nakon intravenske aplikacije CRH-a kod depresivnih osoba izostaje ACTH odgovor odnosno, snižen je, što sugerise da dolazi do smanjenja aktivnosti CRH receptora u hipofizi usled hipersekrecije CRH-a (Gold i sar., 1984). U skladu sa ovim nalazima, *postmortem* analize detektovale su povećan nivo iRNK za CRH i njegov protein u strukturama limbičkog mozga, prvenstveno u PVN jedrima hipotalamusa (Raadsheer i sar., 1994), kao i smanjenje broja CRH receptora, najverovatnije kao odgovor na povećanu sekreciju CRH-a (Merali i sar., 2004). Takođe, nađeno je da je vezivni kapacitet receptora za CRH značajno smanjen u PFC-u (Nemeroff, 1986). Štaviše, mogu se povući paralele između efekata centralno primenjenog CRH-a i nekih aspekata reakcije na stres i težine depresije (Arborelius i sar., 1999; Holsboer, 2001). Isto tako, upotreba odgovarajuće terapije antidepressivima dovodi do poboljšanja kliničke slike pacijenata koje je praćena normalizacijom aktivnosti HPA ose, što se vidi u normalizaciji veličina nadbubrežnih žlezda (Rubin i sar., 1987), normalizaciji bazalnih nivoa CRH-a i AVP-a u cerebrospinalnoj tečnosti (De Bellis i sar., 1999), kao i nivoa ACTH-a i KORT-a u plazmi (Greden, 2001). Stoga, smatra se da hiperaktivirana HPA osa može doprineti razvoju depresije ne samo preko hiperkortizolemije, nego i preko povećanja sekrecije CRH-a u hipotalamusu i drugim moždanim regionima koji su inervisani ovim neuronima (Nestler i sar., 2002). Kod depresivnih pacijenata pronađen je i povećan broj neurona koji luče CRH u hipotalamusu (Raadsheer i sar., 1994). Dalje, kliničke studije vezane za traumatska iskustva su pokazale da, na primer, žene koje su u detinjstvu bile fizički ili seksualno zlostavljane, ispoljavaju veći broj depresivnih simptoma, kao i povećanu anksioznost u odraslom dobu (McCauley i sar., 1997) i da imaju četiri puta veći rizik za oboljevanje od kliničke depresije od osoba koje nisu bile izložene traumatskom iskustvu (Mullen i sar., 1996). Kod tih ispitanica ustanovljena je povećana sekrecija ACTH, čak i u odsustvu depresivnih simptoma, dok je kod ispitanica sa akutnom depresivnom epizodom nivo ACTH i KORT bio značajno povišen (Heim i sar., 2000). I muškaraci u depresiji sa doživljenim traumama u detinjstvu pokazivali su hiperaktivnost HPA ose u DEX/CRH testu u odnosu na kontrole i one muškarce koji nisu bili izloženi traumi u ranom detinjstvu (Heim i sar., 2008). Pored promena CRH-a, ove studije su još detektovale i povećan nivo vazopresina u mozgu depresivnih osoba (Purba i sar., 1996). Dodatno, detekovane su i strukturne promene na nivou hipofize i nadbubrežnih žlezda koje su uvećane u depresiji, ali se njihova veličina normalizuje tokom oporavka (Krishnan i sar., 1991). Svi ovi nalazi su potvrđeni mnogobrojnim longitudinalnim studijama u kojima tokom dužeg perioda više puta ponovljene neuroendokrinološke analize koje su potvrdile dugotrajne promene HPA ose koje su povezane sa slabim terapijskim odgovorom

kod depresivnih pacijenata (Zobel i sar., 2001). Dakle, disfunkcija HPA ose javlja se kod pacijenata sa depresijom - tačnije, kod oko 50% osoba sa umerenom depresijom i kod oko 80% osoba sa teškom depresivnom epizodom sa ili bez psihotičnih crta (Anacker i sar., 2011). Na osnovu svega navedenog, možemo zaključiti da narušena funkcija HPA predstavlja faktor rizika za razvoj depresije i drugih psihopatologija koje su uslovljene neadekvatnim odgovorom na stres. Shodno tome, normalizacija aktivnosti same HPA ose predstavlja neizostavni preduslov u terapiji i celokupnom lečenju depresije (de Kloet i sar., 2005).

Klinični nalazi u velikoj meri podržavaju rezultate iz životinjskih modela u kojima se koriste različiti tipovi akutnih i hroničnih stresora u ispitivanju mehanizama koji doprinose razvoju depresije (Deussing, 2006; Krishnan i Nestler, 2008). Stres dovodi do brojnih neuroendokrinih i strukturnih promena, kao i promena ponašanja koje u velikoj meri podsećaju na simptome koji se javljaju kod depresivnih pacijenata (de Kloet i sar., 2005). Na primer, odvajanje novorođenih mladunaca pacova od majki dovelo je do programiranja reaktivnosti HPA ose koje se održavalo i u odraslom dobu (Heim i sar., 2004). Ovakvi pacovi imali su povećanu sintezu CRH, povećano lučenje ACTH i KORT-a u odgovoru na različite stresore, kao i probleme sa spavanjem, smanjen apetit, anksioznost, kognitivne probleme – simptome koje vidimo i kod depresivnih pacijenata (Heim i sar., 2004; Ladd i sar., 2000; Plotsky i Meaney, 1993). Kao posledica snažne aktivacije HPA ose i povećanog nivoa glukokortikoida pod uticajem stresa, detektovana je atrofija dendrita CA3 hipokampalnih piramidalnih neurona (Magarinos i McEwen, 1995; Sapolsky, 2000), inhibicija neurogeneze u *girus dentatusu* (DG) (Fuchs i Flugge, 1998; Gould i sar., 1998) i smanjenje zapremine hipokampusa (Czeh i sar., 2001; van der Hart i sar., 2002).

Uprkos gore navedenim ubedljivim nalazima, još uvek je nejasno da li je disregulacija HPA ose primarni uzrok depresije ili sekundaran u odnosu na depresivno raspoloženje. Samim tim, glavna odgovornost glukokortikoidne hipoteze depresije jeste precizno i jasno definisanje veze između odgovora na stres i depresije, jer stres *per se* nije dovoljan za razvoj bolesti (Nestler i sar., 2002). Da bi odgovorili na ovo pitanje ključno je i razumeti ulogu i funkciju GR-a, koja je evidentno narušena u deregulisanoj HPA osi, o kojoj će biti detaljnije pisano u posebnom poglavlju (videti poglavlje 1.3: Glukokortikoidi i GR).

Dakle, navedeni rezultati iz različitih životinjskih i kliničkih istraživanja govore u prilog tome da određene nepravilnosti u funkcionisanju HPA ose, kao posledice genetičke predispozicije i/ili rano doživljenog stresa, verovatno postoje i pre razvoja samog depresivnog

poremećaja, a u izazovu na novi stresni događaj, mogu biti pogoršane i dovesti do precipitacije depresivne epizode.

1.2.6 „Neuroplastična” hipoteza

Izraz „neuroplastičnost” ili „plastičnost nervnog sistema” podrazumeva sposobnost mozga odnosno diferenciranih nervnih ćelija da se strukturno i funkcionalno prilagode kako na unutrašnje, tako i na spoljašnje stimulse. Ona se posebno odnosi na jačanje ili slabljenje postojećih veza između neurona, kao i na dodavanje novih neuronskih veza. Sve je veći broj podataka koji ukazuju da je plastičnost nervnog sistema narušena u depresiji. U prilog tome govore i brojne translacione studije kod kojih se može povući paralela između strukturnih i funkcionalnih promena dobijenih imidžing i *postmortem* analizama u mozgu depresivnih pacijenata i molekularnih promena neuronske plastičnosti dobijenih u životinjskim modelima. Plastičnost nervnog sistema najviše je proučavana u moždanim strukturama odgovornim za kontrolu emocija, memorije i kognitivnih funkcija (limbički mozak), sa fokusom na hipokampus (McEwen i Wingfield, 2010; Sheline, 2003).

Pod uticajem hroničnog stresa kod životinja dolazi do povećane sekrecije glukokortikoida koji u dužem vremenskom periodu dovode do strukturnih promena u hipokampusu. One obuhvataju atrofiju i smanjeno grananje apikalnih dendrita piramidalnih neurona, odnosno, inhibiciju sinaptogeneze (Watanabe i sar., 1992; Woolley i sar., 1990), kao i drastično smanjenje neurogeneze u DG hipokampusa (Duman, 2004; Gould i sar., 1992; Sheline i sar., 1996). Ove promene odgovaraju promenama nađenim u hipokampusu i središnjem PFC-u na *postmortem* uzorcima depresivnih pacijenata (Cook i Wellman, 2004; Rajkowska i sar., 1999; Stockmeier i sar., 2004).

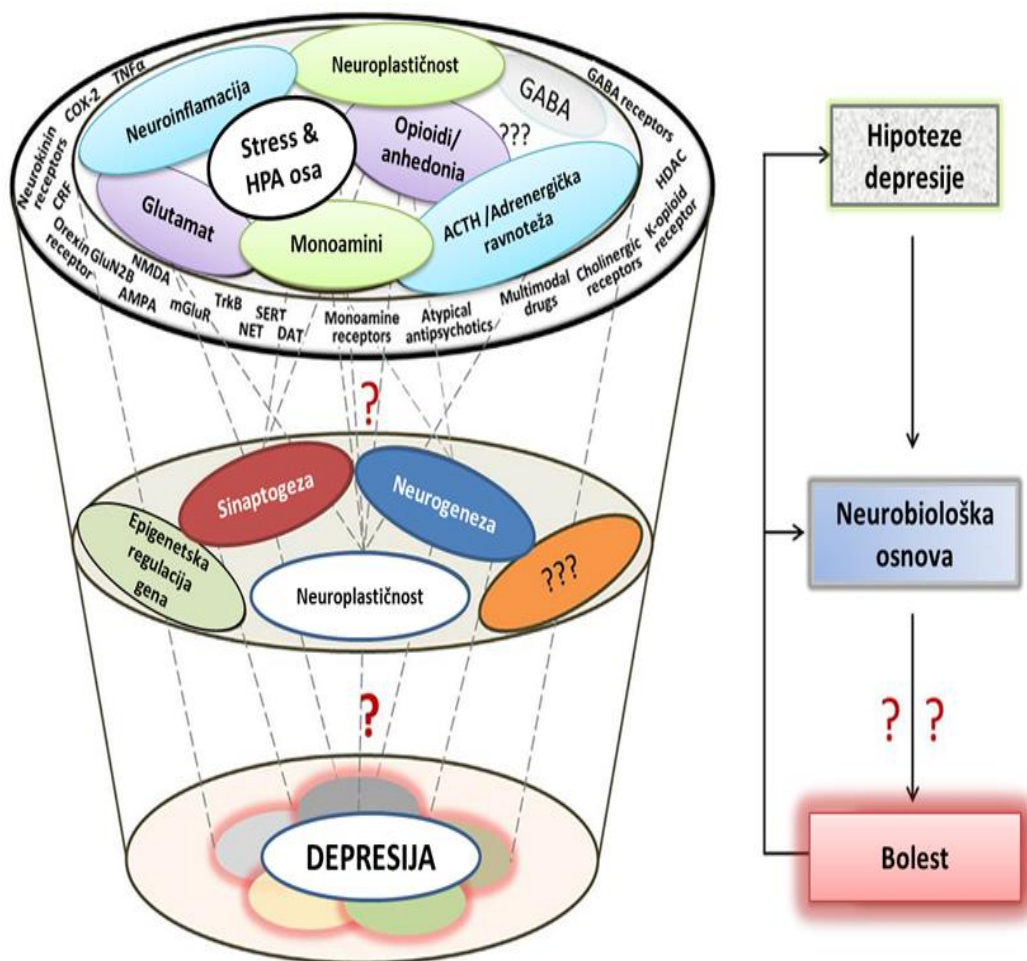
Strukturne promene praćene su promenama na molekularnom nivou. Stres i hronično povećan nivo glukokortikoida dovode do narušene aktivnosti i smanjene ekspresije nekoliko neurotrofičkih faktora, pre svega BDNF-a (Duman i Monteggia, 2006; Franklin i Perrot-Sinal, 2006; Rasmusson i sar., 2002; Schaaf i sar., 2000) i vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Heine i sar., 2005), kao i smanjene ekspresije drugih transkripcionih faktora poput CREB-a (eng. *cAMP response element-binding*) (Lee i sar., 2006; Pardon i sar., 2005) i različitih sinaptičkih molekula (Pittenger i Duman, 2008) koji utiču na mnogobrojne transkripcione i translacione promene. Dodatno u serumu osoba sa depresivnim poremećajem nađena je smanjena koncentracija BDNF-a

(Karege i sar., 2005; Shimizu i sar., 2003). S obzirom na to, da je ova teorija mahom zasnovana na rezultatima vezanim za BDNF i njegov ushodni activator, CREB, često se ona naziva i neurotrofička ili „BDNF” hipoteza depresije.

U prilog ove hipoteze govori i činjenica da terapija antidepresivima pokazuje sposobnost da neutrališe strukturne i funkcionalne promene u mozgu nastale usled nedostatka ili smanjenja neurotrofičkih faktora. Tačnije, hronična terapija antidepresivima u hipokampusu dovodi do povećanja broja sinapsi (Hajszan i sar., 2005), smanjenja gustine dendritske mreže prouzrokovane hroničnim stresom (Magarinos i McEwen, 1995), kao i povećanja neurogeneze (Malberg i sar., 2000; Nakagawa i sar., 2002). Ovi efekti su bar indirektno posredovani uticajem antidepresiva na aktivaciju CREB-a i povećanje ekspresije neurotrofičkih faktora, najvećim delom naravno BDNF-a (Chen i sar., 2001a; Nakagawa i sar., 2002; Nibuya i sar., 1995; Sairanen i sar., 2005). Interesantno je napomenuti da su određene studije pokazale i da se promene u CNS-u mogu reflektovati i na periferiji. Naime, nekoliko studija detektovalo je smanjeni nivo BDNF-a u krvi depresivnih pacijenata, kao i njegovu normalizaciju antidepresivima. Važno je dodati i to da sam BDNF pokazuje antidepresivno dejstvo nakon direktnog injeciranja kod stresiranih životinja koje pokazuju ponašanje nalik depresivnom (Shirayama i sar., 2002). Štaviše, BDNF povećava funkcionalnost hipokampusa tako što pojačava dugotrajnu potencijaciju (eng. *long-term potentiation*, LTP) i druge oblike sinaptičke plastičnosti (Bramham, 2007; Kang i sar., 1997; Korte i sar., 1996).

I pored svih potvrdnih nalaza, poslednji rezultati ukazuju da ova teorija poseduje određena ograničenja i potrebu za izvesnom revizijom (Krishnan i Nestler, 2008). Naime, pojedine studije nisu uspele da ponove rezultate i promene na nivou plastičnosti kako pod uticajem stresa, tako i nakon tretmana antidepresivima (Groves, 2007; Martinowich i sar., 2007). Nedostatak u konzistentosti i jednoznačnosti ovih nalaza, najverovatnije zavisi kako od tipa korišćenih životinjskih stres modela, tako i od vrste i dužine antidepresivnog tretmana (Krishnan i Nestler, 2008; Pittenger i Duman, 2008). Takođe, korak unazad u prihvatanju ove hipoteze predstavlja i podatak da miševi kojima je inaktiviran gen za BDNF ili njegov receptor ne pokazuju nedvosmisleno ponašanje nalik depresivnom (Monteggia i sar., 2007; Zorner i sar., 2003). Isto tako, pokazano je da je ponašanje nalik depresivnom kod stresiranih životinja povezano sa povećanom aktivnošću CREB-a u *nucleus accumbens* (NAc) (Pliakas i sar., 2001), dok njegova inhibicija ima antidepresivan efekat, što sugeriše da su promene na nivou plastičnosti specifične samo za određene moždane strukture (Newton and Duman,

2004). U prilog tome govori i podatak da hronični stres i visok nivo glukokortikoida dovode do povećanja dendritske mreže i broja sinapsi u bademastim jedrima, što pre doprinosi razvoju stanja nalik depresivnom kod životinja, nego što ima antidepresivan efekat (Pittenger i Duman, 2008). I sam BDNF pokazuje slične efekte. Dok u hipokampusu, BDNF ima antidepresivno dejstvo, njegovo povećanje u VTA regionu ima pro-depresivni efekat (Berton i sar., 2006; Eisch i sar., 2003; Krishnan i sar., 2007). Ovu regionalnu specifičnost neuroplastičnih promena treba imati u vidu pri razvoju novih terapijskih supstanci čije delovanje je usmereno na elemente plastičnosti.



Slika 7. Biološka osnova patogeneze depresije

1.2.7 Druge hipoteze o patofiziologiji depresije

Pored navedenih hipoteza vezanih za patogenezu depresivnog poremećaja, važno je spomenuti još neke vrlo atraktivne i argumentovane teorije, koje ipak nisu bile u fokusu ove teze. To su: inflamatorna ili „citokinska” hipoteza, neurotransiterska hipoteza zasnovana na izmenjenoj neurotransmiterskoj ravnoteži (uticaj glutamata, GABA i ACh) i „cirkardijalna” teorija zasnovana na desinhronizaciji intrinzičnih ritmova u organizmu.

1.2.8 Biološka osnova polnih razlika u sklonosti prema depresiji

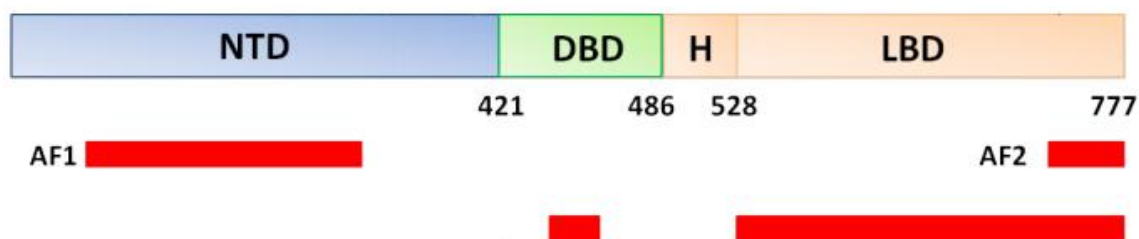
Mnoga dosadašnja istraživanja, kako u animalnim tako i humanim studijama, ukazuju na dvostruko veću incidencu javljanja depresivnog poremećaja kod žena nego kod muškaraca. S obzirom na to da do ove razlike dolazi već u periodu adolescencije, nije začuđujuće što se veliki broj istraživanja bazira upravo na ispitivanju polnih hormona kao glavnih posrednika u razvoju ove bolesti. Veliki uticaj polnih hormona na aktivnost HPA ose, neurotransmisiju i imuni sistem tokom svih faza razvika predstavlja dodatni argument koji ide u prilog gore pomenutoj pretpostavci.

Sredinom XX veka okarakterisane su aktivne supstance gonada: estradiol, progesteron i testosteron. Ipak, njihova uloga u lečenju poremećaja raspoloženja kod ljudi nije bila zanemarena ni sto godina unazad, kada je kontroverzni neurolog Charles Eduard tvrdio da ekstrakti iz jajnika, odnosno, testisa mogu imati veliku primenu u terapiji. U poslednjih 20 godina, zbog ogromnog napretka u samoj metodologiji istraživanja, polje endokrinologije je pridobilo izuzetno važnu ulogu u kliničkoj neuronauci. Polni hormoni imaju višestruki uticaj na aktivnost HPA ose. Naime, pokazano je da estrogen sa jedne strane stimuliše sekreciju CRH-a, dok sa druge smanjuje ekspresiju GR-a u regionima važnim za funkcionisanje HPA ose (Swaab i sar., 2005). Ovi nalazi se mogu objasniti činjenicom da je kod životinja ustanovljeno da je bazalni nivo glukokortikoida, kao i onaj u odgovoru na stres, znatno viši kod ženki nego kod mužjaka (Kudielka i Kirschbaum, 2005). Kada su u pitanju studije na ljudima, rezultati su prilično neujednačeni, nekad čak i kontradiktorni. Ipak, to i nije toliko iznenađujuće, s obzirom na to postojanje mnogi faktori koji utiču na reprezentativnost samih uzoraka, kao što su korišćenje kontraceptivnih sredstava, faza menstrualnog ciklusa, starost i vrsta samog stresora koji se primenjuje, jer je verovatno sam odgovor na stres specifičniji u odnosu na životinje (Kajantie i Phillips, 2006; Kudielka i Kirschbaum, 2005).

Žene i muškarci se u mnogome razlikuju po percepciji događaja kao stresnog ili traumatičnog. Načelno, žene imaju razvijeniju empatiju, odnosno, saosećanje sa ljudima iz bliskog okruženja, dok su muškarci osjetljiviji na razvod i poslovne problem (Kendler i sar., 2001). Takođe, neki radovi pokazuju da žene generalno imaju negativniju sliku o sebi, što može doprineti razvoju ovog poremećaja. Isto tako, treba uzeti u obzir statistiku koja kaže da se znatno veći broj žena obraća za pomoć nego što to rade muškarci, što za posledicu ima značajno veću stopu samoubistava u muškoj populaciji (Nolen-Hoeksema, 2001, Pilar Matud, 2004). Gledano sa molekularnog aspekta, polni hormoni ne samo da utiču na aktivnost GR-a, već i na aktivnost njegovih ko-regulatora. Na primer, pokazano je da estrogen smanjuje aktivnost GR-a, dok je progesteron u kompeticiji sa glukokortikoidima i samim tim smanjuje koncentraciju slobodnog GR-a u ćeliji (Young i sar., 2001). Kada govorimo o potencijalnom uticaju polnih hormona na regulatore samog GR-a, jedan od primera koji bi potkrepio ovu tvrdnju jeste da je prilikom istraživanja kancera dojke pokazano da u izmenjenim ćelijama estrogen značajno utiče na ekspresiju Ppid gena čiji je protein uključen u translokaciju GR-a u jedro (Malviya i sar., 2013). Sve ovo ukazuje na postojanje potencijalnog molekularnog mehanizma koji leži u osnovi regulacije aktivnosti GR-a, a čiji su glavni akteri polni hormoni. Postoje i studije koje idu u prilog ovoj hipotezi. Naime, pokazano je da trudnice koje pokazuju znake depresivnog ponašanja imaju različiti obrazac ekspresije gena za FKBP5, Ppid i NR3C1 u odnosu na kontrole (zdrave trudne žene), kao i smanjenu senzitivnost GR-a (Katz i sar., 2012; Malviya i sar., 2013). Sve zajedno, estrogen narušava negativnu povratnu spregu HPA ose i takvim efektom može doprineti u započinjanju i napredovanju depresije u čijoj etiologiji se nalazi stres. Polni hormoni, između ostalog, imaju i veliki uticaj na razvoj i funkciju imunog sistema. Kako bi i ovaj sistem povezali sa depresijom, treba se osvrnuti na istraživanja koja pokazuju da su žene manje podložne mnogim infekcijama, što ukazuje na veću imunoreaktivnost (Ahmed i sar., 1999). Shodno tome, u odgovoru na neki psihološki stresor, osjetljivost pro-inflamatornih citokina na supresorne efekte glukokortikoida je manja kod žena, što dalje sugerise na produženu sistemsku inflamaciju nakon izlaganja stresu (Rohleder i sar., 2001).

1.3 Glukokortikoidi i signalni put posredovan GR-om

Glukokortikoidni hormoni su niskomolekulski lipofilni molekuli koji olakšanom difuzijom prolaze kroz ćelijsku membranu i reverzibilno se vezuju za GR. GR pripada konzervisanoj superfamiliji jedarnih steroidnih receptora koji, između ostalog, imaju ulogu ligand-zavisnih transkripcionih faktora (Evans, 1988; Robinson-Rechavi i sar., 2001). GR ima modularnu strukturu i se sastoji iz tri domena: N-terminalnog domena (eng. *N-terminal domain*, NTD) koji je zadužen za hormon-nezavisnu aktivaciju transkripcije i sadrži transaktivirajući domen AF-1 (eng. *activation function*, AF-1), centralnog koji je najkonzervisaniji i učestvuje u vezivanju DNK (eng. *DNA binding domain*, DBD) i sadrži dva motiva „cink prstiju“ (eng. *zink fingers*) i C-terminalnog domena koji je ligand-vezujući hidrofobni domen (eng. *ligand binding domain*, LDB) koji poput NTD-a ima transaktivirajuću funkciju (AF-2 region) (Slika 8) (Oakley i Cidlowski, 2013). LBD domen takođe je odgovoran i za dimerizaciju receptora i njegovo pozicioniranje u jedru (Duma i sar., 2006). U okviru AF-1 regiona NTD domena se nalazi nekoliko mesta za modifikaciju receptora, poput mesta za post-translacione modifikacije, fosforilacije, acetilacije, sumoulacije i ubikvitinacije receptora, koji utiču na signalizaciju i funkciju samog GR-a (Duma i sar., 2006).



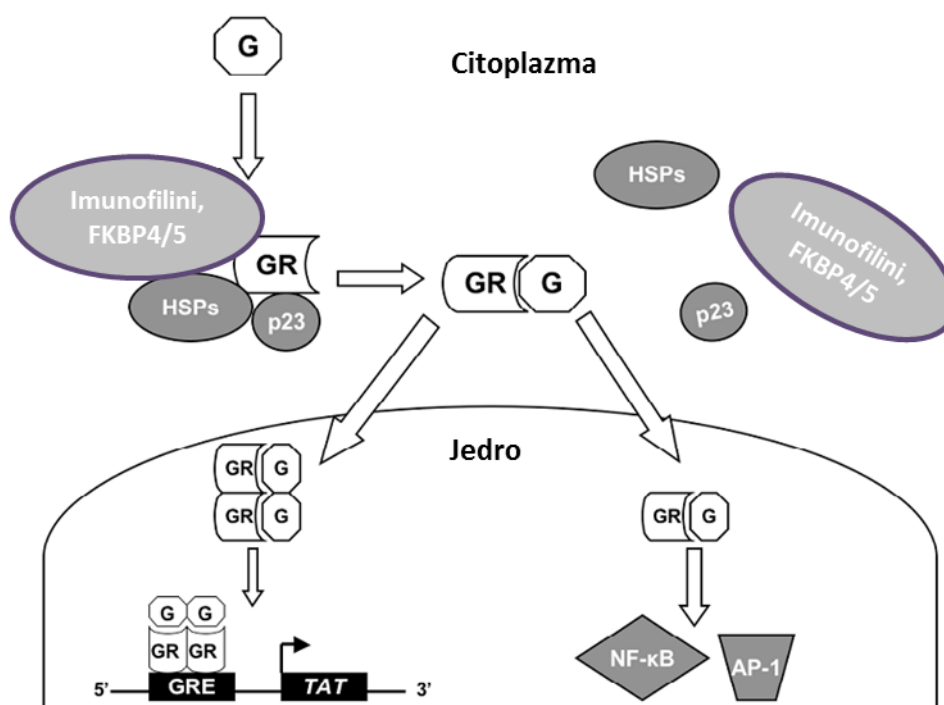
Slika 8. Primarna struktura i funkcionalni domeni GR-a (prilagođeno iz Polman, 2010)

U odsustvu liganda, GR je neaktivan i predominantno se nalazi u citoplazmi u sklopu multiproteinskog kompleksa molekulske mase od oko 300 kDa koji sprečava degradaciju GR-a (Vandevyver i sar., 2012) (Slika 8). Pored GR-a proteina molekulske mase od 94 kDa, u kompleks ulaze i molekulske šaperoni, odnosno, proteini toplotnog šoka (eng. *heat shock proteins*, Hsp) 40, 70 i 90 i košaperoni, kao što su hip (eng. *Hsp70-interacting protein*, hip) i hop (eng. *Hsp70/hsp90-organizing protein*, hop) (Pratt i Toft, 1997). Zreli multiproteinski kompleks GR-a sastoji se iz dva molekula Hsp90, proteina stabilizatora kompleksa p23 i bar jednog od imunofilina (FKBP5, FKBP4 ili ciklofilin 40) (Pratt i Toft, 1997). Osnovna

funkcija Hsp90 jeste da drži receptor u konformaciji visokog afiniteta za glukokortikoide (Holsboer, 2000).

Kada je u cirkulaciji prisutna dovoljno velika količina KORT-a, on ulazi u citoplazmu, gde se vezuje za LBD domen GR-a i dovodi do konformacionih promena samog receptora, što za posledicu ima disocijaciju kompleksa hormon-receptor od ostatka multiproteinskog šaperonskog kompleksa i njegovog prelaska u jedro. Dodatno na GR-u postoje još dve signalne sekvence koje omogućavaju ulazak GR-a u jedro (eng. *nuclear localization signals*, NLS1 i NLS2). One su smeštene u okviru LBD domena blizu DBD domena i bivaju prepoznate od strane specifičnih proteina, importina, koji posreduju u transportu GR-a u jedro. U jedru monomeri GR-a formiraju homodimere i vezuju se za DNK preko specifičnih palindromskih sekvenci, koje se nazivaju sekvence u DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (eng. *glucocorticoid response elements*, GREs), u promotorima ciljnih gena. Nakon toga se regrutuje čitava transkripciona mašinerija i različiti koaktivatori (npr. SRC-1, CBP) i korepresori (npr. NCOR1) koji pozitivno (transaktivacija) ili negativno (transrepresija) regulišu ekspresiju ciljnih gena (Glass i Rosenfeld, 2000; Lu i Cidlowski, 2006). Takođe, treba napomenuti i to da aktivacija GR-a stimuliše njegovu degradaciju, što predstavlja mehanizam obuzdavanja odgovora na glukokortikoide (Avenant i sar., 2010).

Regulacija genske ekspresije GR-om vrlo je složena i ispoljava kako tkivnu, tako i gensku specifičnost. Pored vezivanja dimera GR-a za korepresore, negativna regulacija ekspresije ciljnih gena se može vršiti i vezivanjem GR-a za sekvence u DNK koje su negativno regulisane glukokortikoidima (eng. *negative glucocorticoid response elements*, nGREs) i interakcijom monomera GR-a sa drugim transkripcionim faktorima (tzv. „transrepresija“). Represija putem nGRE uočena je u nekoliko gena, uključujući i gene za POMC, CRH (Drouin i sar., 1993; Malkoski i Dorin, 1999), β -arestin2 (Oakley i sar., 2012), 5HT1a, itd., ukazujući na bitnu ulogu ovog mehanizma u gašenju HPA ose. Mehanizam transrepresije se ogleda u međuproteinskim interakcijama GR-a sa transkripcionim faktorima, poput protein aktivatora 1 (eng. *activator protein-1*, AP-1) ili jedarnog faktora kapa B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF κ B) (McKay i Cidlowski, 1998).



Slika 9: Šema aktivacije GR-a (prilagođeno iz Qi i Rodrigues, 2007).

Treba napomenuti i to da ovakvim protein-protein interakcijama nije smanjena samo transkripciona aktivnost faktora sa kojima GR interaguje, već i samog GR-a (Duma i sar., 2006; McKay i Cidlowski, 1998). Dakle, postoji veliki broj mogućnosti kojim GR može uticati na transkripciju gena, koja zavisi kako od sekvenci u DNK s kojima interaguje, tako i od dostupnih transkripcionih faktora, koaktivatora ili korepresora, koju treba imati u vidu kada se razmišlja o odgovoru ćelije na glukokortikoide. Pored toga, delovanje GR-a sa drugim transkripcionim faktorima, kao što su AP1 ili NFκβ, putem protein-protein interakcije, može dovesti do povećanja ili smanjenja transkripcije gena modifikacijom partnera GR-om (Lu i Cidlowski, 2006).

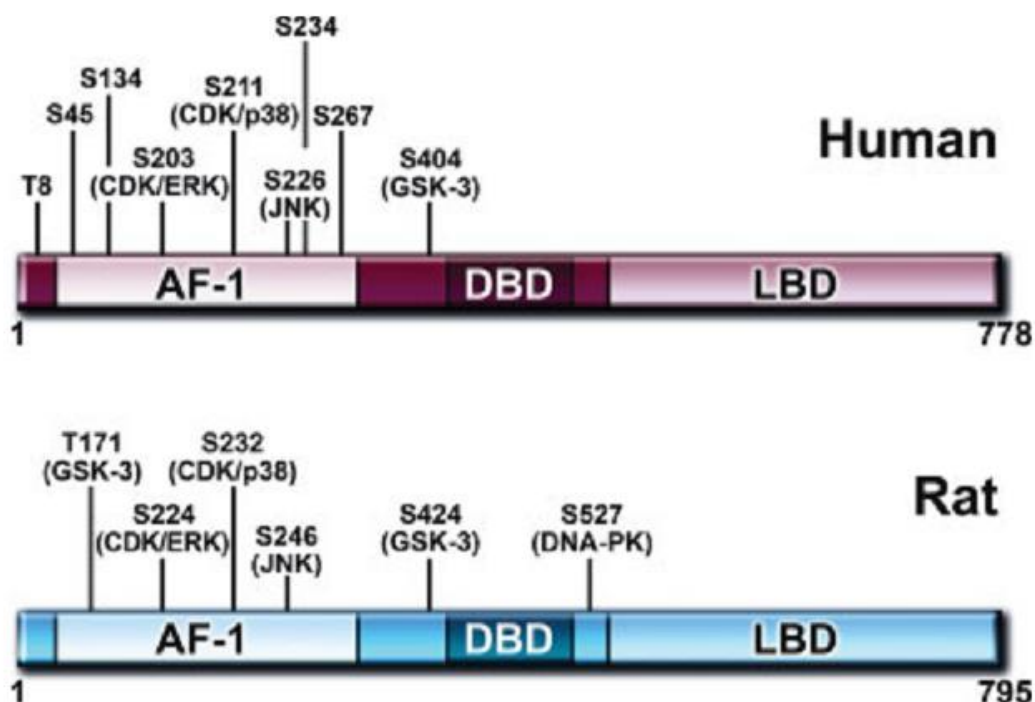
Gen za GR smešten je na dužem kraku hromozoma 5, u okviru lokusa 5q31-32 i sastavljen je od devet egzona. Aktivnost GR-a regulišu najmanje tri promotora čija je aktivnost tkivno specifična. Mada je GR produkt jednog gena, usled alternativne obrade primarnog transkripta (splajsovanja) i mehanizma alternativne inicijacije translacije nastaju različite izoforme GR. Klasična izoforma GR-a koja je označena kao GRα, sastoji se od 777 aminokiselina, ima molekulska masu od 94 kDa i eksprimirana je u gotovo svim tkivima organizma, specifično u mozgu. Alternativnom obradom primarnog transkripta GR-a mogu nastati izoforme: GRβ, GRγ, GR-A i GR-P, koje se eksprimiraju u manjoj meri od GRα i pokazuju tkivnu specifičnost i razlike u transkripcionoj aktivnosti (Beger i sar., 2003; Sousa i

sar., 2000). Pored izoformi GR-a koje nastaju alternativnom obradom, postoji još bar osam izoformi GR-a koje nastaju alternativnom inicijacijom translacije, a koje se razlikuju po dužini svog N-terminalnog regiona, transkripcionoj aktivnosti i genskoj specifičnosti (Lu i Cidlowski, 2006). Imajući u vidu raznolikost izoformi GR-a, njihova različita zastupljenost u ćeliji, takođe može doprinosti tkivno-specifičnoj osetljivosti na glukokortikoide. U ovoj tezi fokus je na GR α izoformi odnosno u daljem tekstu GR.

1.3.1 Regulacija GR-a post-translacionom modifikacijom - fosforilacija

Više od dvadeset godina predmet istraživanja signalizacije posredovane GR-om je analiza post-translacionih modifikacija GR-a. Razlog leži u činjenici da, iako su steroidni receptori transkripcioni faktori koji se aktiviraju hormonom, njihova ekspresija kao i transkripciona aktivnost su regulisane i post-translacionim modifikacijama koje uključuju fosforilaciju, acetilacijom, ubikvitinaciju i sumoilaciju. Najviše proučavana post-translaciona modifikacija GR-a je fosforilacija. Fosforilacija GR-a utiče na njegovu stabilnost, unutar-ćelijsku distribuciju i lokalizaciju, interakciju sa drugim proteinima, vezivanje za DNK i ekspresiju ciljnih gena (Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009; Ismaili i Garabedian, 2004) i sumarno na finalni odgovor ćelije na glukokortikoide. Modifikacija GR-a fosforilacijom je dinamičan proces koji podrazumeva naizmenične procese fosforilacije (posredovane kinazama) i defosforilacije (posredovane fosfatazama). GR može biti fosforilisan i u odsustvu hormona, a nakon vezivanja agonista (molekula strukture slične kao KORT) dolazi do hiperfosforilacije receptora (Orti i sar., 1989).

Uporednom analizom aminokiselinske sekvence GR-a kod čoveka, miša i pacova došlo se do zaključka da je veliki broj mesta fosforilacije konzervisan i da imaju svoje ortologe epitopa u sve tri vrste (Almlof i sar., 1995; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). Humani GR je fosforilisan na osam mesta; na serinu 45 (S45), S134, S203, S211, S226, S234, S267 i S404 i svi su lokalizovani unutar NTD domena (Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009).



Slika 10. Mesta fosforilacija GR-a kod čoveka i pacova (prilagođeno iz Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009)

Ova mesta na humanom GR-u odgovaraju sledećim epitopima kod pacovskog GR-a: pacovski S224 (humani S203), S232 (humani S211), S246 (humani S226) i S434 (humani S404) i većinom su fosforilisani istim kinazama (Krstić, 1995; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). GR pacova može još biti fosforilisan i na T171 i S527 (Slika 10). Bitno je napomenuti da fosforilacija GR-a na jednom aminokiselinskom ostatku može uticati na fosforilaciju drugog i da u isto vreme u jednoj ćeliji mogu postojati GR molekuli sa drugačijim fosforilacionim statusom. U daljem tekstu akcenat će biti na pacovskim fosfo-formama GR-a.

Fosforilacije GR-a kod pacova na T171 i S246 su konstitutivne, dok su S224 i S232 fosforilisane na bazalnom nivou u odsustvu liganda, a hiperfosforilisane u prisustvu KORT-a. S224 fosfo-forma GR-a nalazi se isključivo u citoplazmi i nije transkripciono aktivna (Blind i Garabedian, 2008; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009; Krstic i sar., 1997). Njena fosforilacija je posredovana kompleksom ciklina, A do E, i ciklin-zavisne kinaze 2 (eng. *cyclin dependent kinase 2*, A,E-CDK2), kao i ekstracelularnim signalom regulisanom kinazom (ERK) koja pripada familiji mitogenom-aktiviranih protein kinaza (MAPK). Kao potvrda transkripcione neaktivnosti S224 fosfo-forme GR-a, ChIP eseji (eng. *Chromatin Immunoprecipitation assays*, ChIP) na humanom analogu su pokazali odsustvo vezivanja

S203 za nekoliko GRE sekvenci u okviru različitih promotora. S druge strane, iako transkripciono neaktivna, ova fosfoforma može da utiče na druge fosforilacije, na primer, stimuliše fosforilaciju na jednom epitopu, a inhibira na drugom (Wang i sar., 2007). Ovo se može objasniti nemogućnošću same kinaze da priđe aktivnom mestu i fosforiliše drugi epitop, kao i mogućom aktivacijom fosfataza nakon fosforilacije jednog od epitopa (Ismaili i Garabedian, 2004). Kako se ova fosforilacija nije pokazala transkripciono aktivnom nije uzeta u dalje razmatranje u ovoj tezi.

Poput S224, i GR S232 fosfo-forma je ciljana kompleksom A,E-CDK2 kinaza, kao i CDK5 kinazom (ekspimirana u mozgu) i MAPK kinazama (ERK i p38) (Kino i sar., 2007; Krstic i sar., 1997; Miller i sar., 2005). S232 fosforilacija je zavisna od vezivanja liganda, stimuliše translokaciju GR-a u jedro i njegovu transkripcionu aktivnost (Ismaili i Garabedian, 2004; Wang i sar., 2007). *In vitro* studije na humanom analogu S211 pokazale su da ova fosfo-forma GR-a može biti locirana i u citoplazmi i u jedru ćelije (Wang i sar., 2007) i da transkripciona aktivnost GR-a koreliše sa nivoom ove fosfo-forme. Što je više zastupljena ova fosfo-forma i što je veći odnos S211/S226, to je veća transkripciona aktivnost GR-a (Chen i sar., 2001b; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). Za razliku od S232, *in vitro* eseji na pacovskom S246 su pokazali da je ova fosfo-forma ciljana drugim MAPK kinazama, c-Jun N-terminalnim kinazama (eng. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK), kao i da ova fosforilacija smanjuje transkripcionu aktivnost GR-a (Chen i sar., 2008; Krstic i sar., 1997). Takođe, pokazano je da JNK posredovana fosforilacija GR-a dovodi do povećanog izbacivanja GR-a iz jedra (Itoh i sar., 2002) i samim tim gašenja odgovora na povišen KORT, odnosno, do pojačavanja negativne povratne sprege. Iako većina literaturnih podataka ukazuje na to da fosforilacija na ovom epitopu smanjuje transkripcionu aktivnost GR-a, neki podaci iz humanih studija pokazuju da se ova fosfo-forma GR-a ipak regrutuje na promotore nekih gena sa GRE, ali njena tačna uloga za sada je još uvek nepoznata (Blind i Garabedian, 2008).

Pored navedenih fosforilacija, poslednjih godina otkriveno je još jedno mesto fosforilacije humanog GR-a, S404, i pokazano je da to mesto ciljano glikogen sintazom kinazom 3 β (GSK-3 β) (Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). Ova studija je pokazala da S404 smanjuje poluživot GR-a, narušava njegovu stabilnost i smanjuje transkripcionu aktivnost regrutovanjem kofaktora (p300/CBP, NF-k β) u jedru ćelije. Bitno je napomenuti da kod pacova, pored toga što postoji direktni analog ove fosfo-forme, S424, još jedno mesto na GR-u je fosforilisano GSK-3 β kinazom, a to je T171 (Rogatsky i sar., 1998). Interesantno, pokazano je da povećanje aktivnosti GSK3 β kinaze i samim tim povećanje fosforilacije T171,

dovodi do inhibicije transkripcione aktivnosti GR-a, dok sa druge, blokiranje aktivnosti GSK-3 β dovodi do povećanja ekspresije nekih GR-reguliranih gena.

1.3.2 Izmenjena signalizacija posredovana GR-om u depresiji

Uzimajući u obzir ključnu ulogu GR-a u regulaciji aktivnosti HPA ose, kao i u posredovanju efekata glukokortikoida na plastičnost nervnog sistema, neurogenezu i raspoloženje, nije iznenađujuće da se GR pokazao kao zajednički imenitelj različitih mehanizama koji leže u osnovi promena moždanih funkcija izazvanih stresom i samim tim i kao potencijalna meta antidepresiva. Dokazi o narušenoj funkciji GR-a u patogenezi depresije datiraju još iz osamdesetih godina prošlog veka i oni su potvrđeni i u novije vreme, kada je nađeno smanjenje broja i/ili funkcije GR-a kod depresivnih pacijenata sa disfunkcionalnom HPA osom (Gormley i sar., 1985; Pariante i Lightman, 2008). Kasnije su dokumentovane i promene u mehanizmu vezivanja hormona, translokaciji receptora u jedro i interakciji sa šaperonima, kao i u regulaciji ekspresije gena za GR (Calfa i sar., 2003; Miller i sar., 2005; Neigh i Nemeroff, 2006). U novije vreme, fokus brojnih studija je uticaj antidepresiva na GR, kao i različite analize vezane za polimorfizme i metilacioni status GR-a, kao i promene u ekspresiji gena reguliranih GR-om. Trebalo bi napomenuti da se humane studije mahom oslanjaju na izučavanje lako dostupnih perifernih tkiva, kao što su mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), poput limfocita, fibroblasta, kao i ukupne krvi, dok se malobrojne *postmortem* studije baziraju na tkivima poreklom iz CNS-a. Naime, analiza ekstrakta celih ćelija, kao i ćelijskih kompartmana limfocita (citosolna frakcija) kod depresivnih pacijenata je pokazala da ili nema razlike ili dolazi do smanjenja broja slobodnog GR-a u odnosu na kontrole (Calfa i sar., 2003; Pariante i Miller, 2001). Takođe, studije na ćelijama periferne krvi su pokazale da je kod pacijenata sa depresijom smanjen kapacitet glukokortikoida da inhibiraju proliferaciju limfocita nakon stimulacije poliklonalnim mitogenima (Lowy, 1991; Pariante i Miller, 2001). Pored ovih promena na nivou samog receptora, različite studije su pokazale ili odsustvo promene (Frodl i sar., 2012) ili smanjen nivo iRNK za GR u krvi osoba sa depresivnim poremećajem u odnosu na zdrave ispitanike (Cattaneo i sar., 2013; Matsubara i sar., 2006). Poput promena na periferiji malobrojne *postmortem* studije pronašle su smanjenu ekspresiju GR-a u hipokampusu i PFC-u kod pacijenata sa depresijom, kao i kod pacijenata sa bipolarnim poremećajem i šizofrenijom (Webster i sar., 2002).

Što se tiče uticaja fosforilacije GR-a u depresiji nema puno humanih studija koje su proučavale ovaj fenomen. Bei i sar. 2009 su analizirali nivo fosforilacije GR-a kod osoba sa bipolarnim poremećajem i detektovali su povišen nivo S211 fosfoforme GR-a u jedru limfocita u depresivnoj fazi bolesti. Dodatno, istraživanja naše grupe su pokazala da depresivni pacijenti imaju povišen nivo S226 fosfoforme GR-a i blago povišen nivo S211 u jedru limfocitima pacijenata u odnosu na zdrave kontrole (Simic i sar., 2013). Ipak, treba napomenuti i da postoje određene studije koje su pokazale očuvanu funkciju GR-a u nekim tkivima kod osoba obolelih od depresije, odnosno, postojanje „lokalizovane glukokortikoidne rezistencije“ (Gold i Chrousos, 2002; Pariante i Miller, 2001).

Paralelno sa tim, studije u kojima je ispitivana funkcija GR-a kod pacijenata sa depresijom u odnosu na izmenjen odgovor u neuroendokrinim testovima (DST-u i DEX/CRH testu) pokazale su da narušena funkcija GR-a ne mora uvek biti udružena sa narušenom aktivnošću HPA ose (Gormley i sar., 1985; Juruena i sar., 2004). I zaista, ovi nalazi su potvrđeni na miševima koji se karakterišu nedostatkom GR-a u hipofizi i koji pokazuju narušenu negativnu povratnu spregu posredovanu glukokortikoidima i hiperaktivnost HPA ose, bez promena u ekspresiji GR-a u CNS-u (Schmidt i sar., 2009). Ovi nalazi isto tako sugerišu da narušena funkcija GR-a, posebno na periferiji, može biti odgovorna za rezistenciju na glukokortikoide i samu hiperaktivnost HPA ose. Sa druge strane, miševi koji nemaju ekspimirani GR u hipokampusu, ali imaju u hipofizi i perifernim tkivima, pokazuju narušenu negativnu povratnu spregu, hiperaktivnost HPA ose i ponašanje nalik depresivnom (Boyle i sar., 2005), samim tim ukazujući da je narušena funkcija GR-a, kako na periferiji tako i u CNS-u, od izuzetne važnosti u regulaciji aktivnosti HPA ose i ponašanja u depresiji. Dalje, predloženo je da fizičko blokiranje GR-a antagonistima može smanjiti efekat visokog nivoa glukokortikoida na mozak i na taj način predstavljati novu, potencijalnu strategiju u tretmanu depresije. Naime, primena mifepristona (poznat i pod oznakom RU486), antagonista GR-a, neutralisala je određene kognitivne poteškoće i ispoljila antidepresivno dejstvo kod bipolarno-depresivnih pacijenata (Young i sar., 2004). Za razliku od njih, druge studije su pronašle samo poboljšanje na nivou psihotičnih, ali ne i depresivnih simptoma kod pacijenata obolelih od psihotične depresije (DeBattista i sar., 2006; Flores i sar., 2006). Interesatno, pokazano je da hronično stresirani pacovi, kao i pacovi tretirani glukokortikoidima, imaju smanjenu neurogenezu u hipokampusu i bademastim jedrima, kao i da se ona može poboljšati mifepristanom (Watson i sar., 2012). Samim tim, ovi nalazi sugerišu da se negativan uticaj povišenog nivoa glukokortikoida na neurogenezu može desiti preko blokiranja GR-a, što za

posledicu može imati jačanje kognitivnih sposobnosti. Interesantno je napomenuti i jednu studiju gde je hronična aplikacija RU486 u dentatni girus pacova dovela do naučene bespomoćnosti životinje, koja se uzima kao procena depresivnog statusa kod glodara (Papolos i sar., 1993). Ovi nalazi ukazuju da ne samo povećanje GR signalizacije, već i njeno smanjenje, mogu dovesti do pojave depresivnih simptoma.

Novija istraživanja iz naše laboratorije pokazala su da pod uticajem hroničnog stresa (hronična socijalna izolacija) dolazi do promene nivoa fosforilacije GR-a na S232 i S246 u hipokampusu i PFC-u mužjaka pacova (Adzic i sar., 2009b) koji su pokazali ponašanje nalik depresivnom (Djordjevic i sar., 2009a), kao i do promene ekspresije gena koji su regulisani GR-om kao transkripcionim faktorom (Adzic i sar., 2009b). Naši rezultati sa životinjskog modela su kasnije potvrđeni i u humanim studijama, gde je pokazano da je fosforilacioni status GR značajno izmenjen kod pacijenata sa depresivnim poremećajem u odnosu na zdrave kontrole (Simic i sar., 2013).

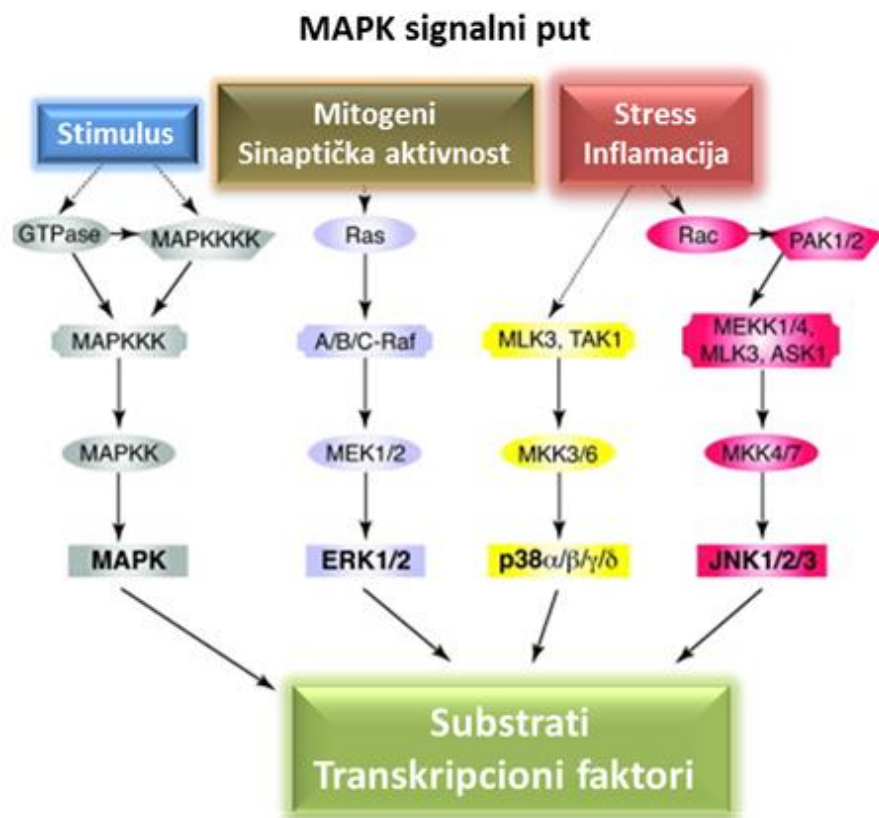
Na kraju, epigenetske promene doprinose izmenjenoj funkciji GR-a u depresiji. Naime, u modelu majčinskog lišavanja mladunaca (eng. *maternal deprivation*) dokumentovana je promena metilacionog statusa promotora za GR kod mladunaca koja je korelirala sa promenama na nivou HPA ose i razvojem ponašanja nalik depresivnom (Weaver i sar., 2004). Isto tako, ljudske *postmortem* studije na samoubicama sa dugom istorijom traume zlostavljanja u detinjstvu pokazale su povišen nivo metilacije promotora za GR i smanjenu mRNA ekspresiju (McGowan i sar., 2009), potvrđujući ideju da epigenetske promene mogu uticati na ekspresiju GR-a i aktivnost HPA ose u ranoj životnoj fazi i doprineti razvoju depresivnih simptoma.

Pored gore spomenutih promena na nivou ekspresije gena za GR, novija istraživanja pokazuju da promene u transkripcionoj aktivnosti GR-a, odnosno, promene ekspresije gena regulisanih GR-om takođe zauzimaju bitnu ulogu u etiopatogenezi depresije. Naime, u ćelijama periferne krvi nakon stimulacije DEX-om pokazano je da dolazi do promene ekspresije različitih GR-regulisanih gena i da to može biti obećavajući biomarker za klasifikaciju pacijenata kao depresivnih ili ne (Menke i sar., 2012). Izvesna nepoklapanja u nalazima o dejstvu GR-a i glukokortikoida na depresivnu simptomatologiju i kogniciju, kao i njihova potencijalna antidepresivna uloga, zahtevaju dodatna preklinička i klinička istraživanja u svrhu boljeg razumevanja mehanizma delovanja GR-a u regulaciji simptoma karakterističnih za poremećaje raspoloženja (Maric i Adzic, 2013).

1.3.3 Protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK)–podfamilija JNK1/2/3, ERK1/2 i p38

MAPK pripadaju familiji serin/treonin proteinskih kinaza koje predstavljaju sastavni deo glavnih signalnih puteva u ćeliji i učestvuju u regulaciji brojnih procesa, kao što je ekspresija gena vezana za procese ćelijske deobe, proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje ćelija, metabolizam, inflamaciju, ćelijsko kretanje i ćelijsku smrt (apoptozu) (Johnson i Lapadat, 2002; Robinson i Cobb, 1997). MAPK su sastavni deo kaskadnih proteinskih sistema koji se sastoje od tri grupe kinaza, od kojih svaka fosforiliše i sekvencijalno aktivira sledeću u nizu, pri čemu se MAPK nalaze na samom kraju niza (Slika 11). Na vrhu ove signalne kaskade, nalaze se kinaza kinaze MAPK-a (eng. *MAPK kinase kinase*, MAPKKK), zatim kinaza MAPK-a (eng. *MAPK kinase*, MAPKK) i na kraju MAPK.

Familiju MAPK kinaza čine tri veoma dobro okarakterisane subfamilije kinaza: kinaze regulisane ekstracelularnim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK1/2, u daljem tekstu označavane kao ERK1/2), p38 kinaze i c-Jun N-terminalne kinaze 1/2/3 (JNK1/2/3).



Slika 11. Signalni put i aktivacija MAPK– ERK1/2, p38 i JNK1/2/3

1.3.3.1 ERK1/2

Prvobitno je pokazano da su ERK1/2 (poznate i kao p44 i p42 MAPK) fosforilisane na tirozinu i treoninu u odgovoru na stimulaciju faktorima rasta (Kazlauskas i Cooper, 1988) i to su prve MAPK koje su uspešno klonirane (Boulton i Cobb, 1991). ERK1/2 izoforme se ko-esprimiraju u svim tkivima, od mozga do skeletnih mišića i srca i aktiviraju se u odgovoru na različite stimulse, uključujući pomenute faktore rasta, citokine, insulin, heterodimerne G spregnute proteinske receptore, osmotski stres, itd (Boulton i sar., 1991; Raman i sar., 2007). U nestimuliranih ćelijama, ERK1/2 se nalaze u citoplazmi i nakon aktivacije vanćelijskim stimulusom značajan deo se transportuje u jedro (Chen i sar., 1992). Aktivacija ERK1/2 započinje aktivacijom Ras-Raf kinaza ili c-Mos (MAPKKK) koje dalje fosforilišu i aktiviraju dvojno-specifične MEK1/2 kinaze (MAPKK), koje na kraju fosforilišu ERK1/2 u okviru konzervisane sekvence/motive Thr-Glu-Tyr (TEY). Fosforilsane ERK1/2 (pERK1/2) su aktivirane i spremne da dalje fosforilišu svoje substrate. Substrati ERK su brojni, između ostalih, transkripcioni faktori kao što su NF-AT, MEF2, STAT3, Elk-1, c-Fos, c-Myc (Cargnello i Roux, 2011; Roskoski, 2012; Yoon i Seger, 2006), kao i GR, kao što je ranije napomenuto (Gallagher-Beckley i Cidlowski, 2009). Iako su sekvence ERK 1 i 2 proteina prilično slične, njihova ekspresija i biološka funkcija se ipak razlikuju, pri čemu ERK2 „*knockout*” miševi umiru u ranoj fazi razvika, što ukazuje da ERK1 ne može kompenzovati nedostatak ERK funkcije (Yao i sar., 2003). S druge strane, ERK2 „*knockout*” miševi preživljavaju i pokazuju samo manje fiziološke nepravilnosti, poput izostanka sazrevanja timocita (Pages i sar., 1999).

Što se tiče uloge ERK1/2 kinaza u etiopatologiji depresije, pored gore spomenute fosforilacije GR-a i promene njegove transkripcione aktivnosti (Irusen i sar., 2002; Rogatsky i sar., 1998), sve je veći broj podataka koji povezuju ERK signalizaciju i modulaciju neuronalne aktivnosti. Glavna ideja zasniva se na smanjenoj aktivnosti ERK1/2 kinaza koje dovode do smanjene ekspresije trofičkih faktora i procesa neuralne plastičnosti i sinaptogeneze, gde se glavna uloga pripisuje smanjenoj aktivnosti ERK/CREB/BDNF signalizaciji (Fumagalli i sar., 2005; Todorovic i sar., 2009). Dalje, *postmortem* analize na mozgovima depresivnih samoubica, kao i analize na hronično stresiranim pacovima koji su razvili ponašanje nalik depresivnom, detektovale su snižene ukupne nivoe ERK1/2 kinaza, kao i njihovih fosfoformi u hipokampusu i PFC-u, kao i smanjenu aktivnost Raf kinaza, ushodnih aktivatora ERK (Duman i sar., 2007; Dwivedi i sar., 2006a; Qi i sar., 2006). Isto tako, podaci *in vitro* studija na animalnim modelima depresije pokazuju da se mehanizam

delovanja antidepresiva dobrim delom ostvaruje preko aktivacije ERK1/2 (Fumagalli i sar., 2005; Hisaoka i sar., 2001; Tiraboschi i sar., 2004). Međutim, i pored velike količine podataka koji govore o inhibiciji ERK1/2 signalizacije u razvoju depresije i njihovoj aktivaciji u antidepresivnom efektu, postoje i drugačiji nalazi. Naime, pokazano je da upotreba dezipramina, TCA antidepresiva povećava nivo pERK1 izoforme popravljajući ponašanje nalik depresivnom (Bravo i sar., 2009). Isto tako, nađeno je da ERK inhibitori smanjuju nivo pERK i dovode do poboljšanja ponašanja i antidepresivnog odgovora (Einat i sar., 2003; Galeotti i Ghelardini, 2012) ili da hronični stres i tretman antidepresivima ne utiču na ERK signalizaciju u mozgu (Budziszewska i sar., 2010). Nekonzistentnost u nalazima ovih studija može se objasniti brojnim razlikama u samim eksperimentalnim uslovima i s tim u vezi, uloga ERK1/2 kinaza u razvoju depresije, kao i mehanizmu delovanja antidepresiva, još uvek nije razjašnjena i čeka nova istraživanja.

1.3.3.2 p38

p38 α kinaza prvi put je detektovana 1994. godine, kada su četiri nezavisne naučne grupe prezentovale svoje rezultate (Freshney i sar., 1994; Han i sar., 1994; Lee i sar., 1994; Rouse i sar., 1994). Tri godine kasnije, otkrivene su tri dodatne izoforme ovog proteina (β , γ i δ). Sve četiri izoforme p38 proteina kodirane su različitim genima i pokazuju visok stepen tkivne specifičnosti, izuzev p38 α izoforme koja je značajno eksprimirana u većini tkiva; na primer, p38 β se predominantno nalazi u mozgu, p38 γ u skeletnim mišićima, a p38 δ u endokrinim žlezdama (Cuadrado i Nebreda, 2010). U ćelijama sisara p38 kinaza se snažno aktivira pod uticajem pro-inflamatornih citokina, na primer IL-1 i alfa faktor nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor alpha*, TNF), kao i različitih stresnih stimulusa poput oksidativnog stresa, UV zračenja, hipoksije, ishemije itd. (Cuadrado i Nebreda, 2010). p38 signalni put igra važnu ulogu u sprovođenju imunog i inflamatornog odgovora u fiziološkim uslovima i samim tim je neophodan u procesima proliferacije ćelija i preživljavanju (Thornton i Rincon, 2009). Aktivacija p38 kinaze podrazumeva fosforilaciju samog proteina u okviru Thr-Gly-Tyr (TGY) motiva kao posledicu uticaja stimulusa koji prethodno aktivira ushodnu MAPKKK (MEKK1-3, MLK2/3, ASK1, Tpl2, TAK1 i TAO1/2), koja aktivira nishodnu MKK3/6 kinazu (MAPKK) i direktno fosforiliše p38, koja dalje fosforiliše svoje substrate kako u citoplazmi, tako i u jedru (Cuadrado i Nebreda, 2010). Među tim substratima nalazi se i GR, za koji smo ranije pokazali da je fosforilisan od strane p38 kinaze na S232 kod pacova (humani S211) i da ova fosforilacija utiče na transkripcionu aktivnost GR-a (Gallagher-Beckley

i Cidlowski, 2009). Iako su prilično limitirani podaci o učestvovanju ove kinaze u patogenezi depresije i mehanizmu delovanja antidepresiva, postoje izvesni nalazi koji potvrđuju učešće ove kinaze u regulaciji ovih procesa, mada i kod njih postoji nekonzistentnost. Naime, grupa Budziszewska i saradnika (2010) pokazala je da kod životinja izlaganih stresu dolazi do smanjenja nivoa fosfo-p38 kinaze (pp38) u hipokampusu i PFC-u odnosu na kontrole, kao i da antidepresivi (imipramin, fluoxetin i mirtazapin) povećavaju nivo pp38 kinaze. S druge strane, pokazano je da inhibicija ove kinaze dovodi do razvoja ponašanja nalik depresivnom kod životinja (Galeotti i Ghelardini, 2012). Dodatno, sposobnost ove kinaze da fosforiliše GR na S232 kod pacova (humani S211) i utiče na transkripcionu aktivnost samog GR-a i signalizaciju posredovanu glukokortikoidima, jasno sugerije da aktivacija ove kinaze može imati bitnu ulogu u etiopatogenezi depresije i njenom tretmanu.

1.3.3.3 JNK1/2/3

JNK1/2/3 se nazivaju još i stresom aktivirane proteinske kinaze (eng. *stress-activated protein kinases*, SAPK), s obzirom na to da igraju važnu ulogu u odgovoru ćelije na različite stresore (Kyriakis i sar., 1994). Svoje ime JNK duguju tome što su prepoznate kao kinaze koje se vezuju i fosforilišu N-kraj c-Jun proteina, čime povećavaju njegovu transkripcionu aktivnost (c-Jun je komponenta AP-1 transkripcionog kompleksa). JNK se aktiviraju u odgovoru na različite stresore: UV radijaciju, supstance koje interferiraju sa sintezom DNK i proteina, oksidativni stres, ali i citokine (npr., TNF i IL-1), faktore rasta, ligande koji se vezuju za receptore kuplovane sa G proteinom (Chen i sar., 2001a; Davis, 2000) (Slika 11). Uključene su u regulaciju inflamacije, i uopšte, funkciju imunog sistema, zatim, u regulaciju apoptoze, a važne su i u procesima diferencijacije neurona (Chen i sar., 2001a; Qi i Elion, 2005).

Regulacija signalnog puta JNK-a je vrlo kompleksna i pod kontrolom velikog broja uzvodnih MKKK-a koje se aktiviraju u odgovoru na različite stimulse, kao što je prethodno nabrojano. Aktivaciju JNK-a vrše MKK4 i MKK7 i to dvojnomo fosforilacijom treonina (Thr183) i tirozina (Tyr185) u okviru tripeptidnog motiva Thr-Pro-Tyr (Chen i sar., 2001a). JNK su kodirane sa tri gena: jnk1, jnk2 i jnk3, pri čemu se jnk1 i jnk2 eksprimiraju u većini tkiva, a jnk3 u mozgu, srcu i testisima (Davis, 2000). Alternativnom obradom ova tri gena nastaje bar 10 izoformi JNK pri čemu svaki od gena daje izoforme od 46 kDa i 54 kDa, dok jnk1 i jnk2 daju još po dve izoforme (Davis, 2000; Gupta i sar., 1996).

Uočena je tkivna specifičnost u ekspresiji različitih izoformi, kao i specifičnost za substrate (Gupta i sar., 1996). U ćeliji, JNK se nalaze kako u citoplazmi tako i u jedru, a nakon aktivacije, stimulisan je njihov prelazak u jedro (Chen i sar., 2001a). Supstrati JNK-a su brojni i uključuju citoplazmatične, citoskeletne, membranske i jedarne proteine. U jedru, JNK fosforilišu mnoštvo transkripcionih faktora uključujući c-Jun, ATF2 (eng. *activating transcription factor 2*, ATF2), HSF-1 (eng. *heat shock factor protein 1*, HSF-1), STAT3, kao i GR, kako je prethodno već napomenuto (Ip i Davis, 1998; Rogatsky i sar., 1998). Takođe, osim što JNK utiče na funkciju GR-a, pokazano je da interakcija JNK-a i GR-a može inhibirati aktivnost JNK-a sprečavajući interakciju JNK-a sa MKK7 (Bruna i sar., 2003).

Podaci o ulozi JNK-a u odgovoru organizma na psihološke stresore, kao i o njihovoj ulozi u patogenezi depresije, nisu veliki. Pokazano je, na primer, da akutni stres forsiranog plivanja dovodi do povećane fosforilacije JNK-a u različitim regionima mozga eksperimentalnih životinja (Shen i sar., 2004). S druge strane, pokazano je da hronični nepredvidivi stres smanjuje fosforilaciju JNK-a u hipokampusu životinja (Li i sar., 2009). Takođe, rezultati iz naše laboratorije pokazuju da stres hronične izolacije dovodi do smanjenja fosforilacije JNK-a u hipokampusu i PFC-u mužjaka pacova, što je praćeno i smanjenjem fosforilacije GR-a na S246 (Adzic i sar., 2009b). Što se tiče istraživanja na ljudima, nađena je smanjena ukupna količina JNK-a u limfocitima pacijenata sa bipolarnim poremećajem u akutnoj depresivnoj epizodi (Spiliotaki i sar., 2006). Dalja ispitivanja vezana za promene u signalizaciji JNK-a verovatno mogu pomoći u boljem razumevanju narušenih ćelijskih procesa u stresu i depresiji, kao i njihovog uticaja na glukokortikoidnu signalizaciju.

1.3.4 CDK5

CDK5 pripada familiji serin/treonin kinaza koje igraju ključnu ulogu u regulaciji brojnih ćelijskih procesa u CNS-u, prvenstveno ćelijskog ciklusa. Tokom embriogeneze CDK5 je nezamenjiva, dok u odraslom mozgu reguliše brojne neurološke procese, uključujući neurotransmisiju, sinaptičku plastičnost kao i više kognitivne funkcije poput učenja i memorije, u čijoj regulaciji učestvuje i GR (Shah i Lahiri, 2014). Samim tim, nepravilnost u regulaciji aktivnosti CDK5 može doprineti nastanku brojnih neuroloških poremećaja, poput neurodegenerativnih bolesti i bolesti poremećaja raspoloženja, između ostalih i depresije. CDK5 iako nije aktivna tokom mitoze, vrlo je bitna za morfogenezu i preživljavanje neurona (Dhavan i Tsai, 2001). Poput drugih članova svoje familije, CDK5 se aktivira formiranjem heretodimera sa svojim partnerskim molekulima, tj. aktivatorima, p35 i p39 (Tsai i sar.,

1994). Zbog njihove velike ekspresije u nervnom sistemu, aktivnost CDK5 je primarno ograničena na ovaj sistem i može se povećati proteolitičkom razgradnjom p35 u p25 protein.

Prvobitni dokazi o ulozi CDK5 u patogenezi depresije potiču mahom od opservacija iz životinjskih modela depresije. Primećeno je da stres dovodi do inhibicije ove kinaze, koja zauzvrat remeti procese neurotransmisije i sinaptičke plastičnosti u višim moždanim centrima, kao i do razvoja ponašanja nalik depresivnom (Anacker i sar., 2011; Zhong i sar., 2014). Dalje, kod p35 „*knockout*” miševa, koji nemaju mogućnost aktivacije CDK5, pokazano je da dolazi do depotencijacije odnosno brisanja LTP-a i indukcije dugotrajne depresije (eng. *long term depression*, LTD) (Ohshima i sar., 2005). Slično tome, kod CDK5 „*knockout*” miševa, kod kojih ne dolazi do ekspresije CDK5 u CA1 piramidalnim neuronima hipokampusa, dolazi do narušene memorije i odsustva procesa sinaptogeneze i isto tako narušenog ponašanja ovih životinja (Guan i sar., 2011).

Dalje, uloga CDK5 se ogleda i u sposobnosti ove kinaze da, poput MAPK kinaza, fosforiliše GR na različitim serinima, između ostalog i na S232 kod pacova (humani S211) i utiče na transkripcionu aktivnost GR-a (Gallagher-Beckley i Cidlowski, 2009; Kino i sar., 2007). Ovi rezultati potvrđeni su i u našoj laboratoriji gde smo pokazali, da u hipokampusu i PFC-u pacova izlaganih hroničnom stresu dolazi do smanjene aktivacije CDK5/p35/p25 signalnog puta koja je praćena smanjenjem nivoa fosforilacije GR-a na S232 i promenom ekspresije GR regulisanih gena (Adzic i sar., 2009b).

S druge strane, najnovija istraživanja su detektovala i povećanje aktivnosti ove kinaze u PFC-u i hipokampusu, kao i povišen nivoa samog proteina u ovim moždanim strukturama hronično stresiranih miševa (Zhu i sar., 2012; Papadopoulou i sar., 2015), dok antidepresivi, venlafaxin i mirtazapin, smanjuju aktivnost ove kinaze preko redistribucije p35 proteina (Zhu i sar., 2012). Isto tako i *postmortem* analize hipokampusa depresivnih pacijenata pokazale su izvesno povećanje aktivnosti i količine CDK5 u odnosu na kontrole (Papadopoulou i sar., 2015).

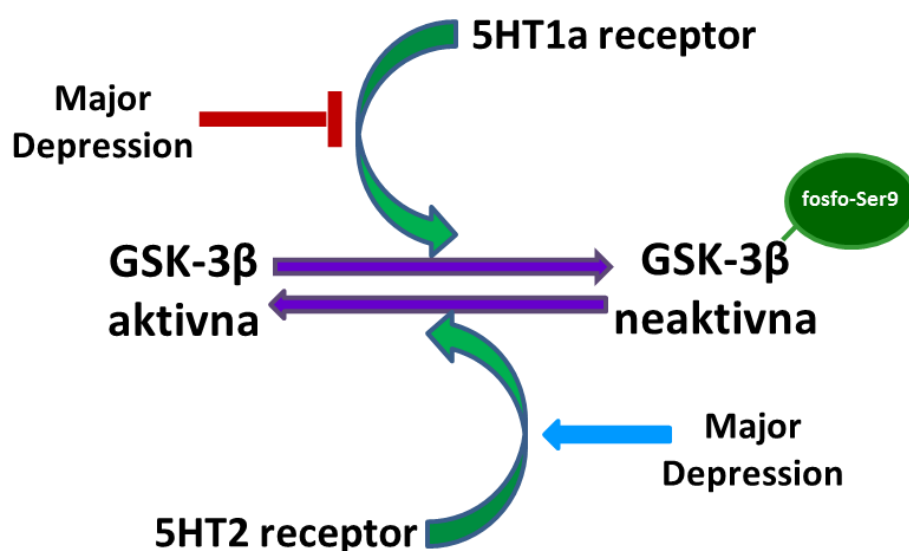
Svi ovi podaci, iako promene nisu istosmerne, jasno upućuju da CDK5 predstavlja veoma bitnu komponentu u odgovoru na stres i depresiju.

1.3.5. GSK-3 β

GSK-3 pripada grupi serin/treonin kinaza koje fosforilšu glikogen sintazu, kao i veliki broj drugih substrata, uključujući i brojne transkripcione faktore, enzime i citoskeletne elemente. Kod ljudi, GSK-3 se eksprimira u dve varijante, kao GSK-3 α i kao GSK-3 β , pri čemu je β izoforma značajno više analizirana zato što je ekspimirana u mozgu. Narušena uloga GSK-3 dokumentovana je u brojnim bolestima poput Alchajmerove bolesti, dijabetesa tipa 2, različitih karcinoma, kao i brojnih psihijatrijskih oboljenja, između ostalog i depresije (Kim i sar., 2009; Mao i sar., 2009; Silva i sar., 2008). Za razliku od drugih kinaza koje se aktiviraju fosforilacijom, obe izoforme GSK-3 su aktivne kada su nefosforilisane (Doble i Woodgett, 2003). Do sada je otkriven veliki broj kinaza koje inaktiviraju GSK-3, među kojima su glavne Akt kinaza (Cross i sar., 1995), protein kinaze C (PKC) (Goode i sar., 1992) i protein kinaza A (PKA) (Fang i sar., 2000), koje fosforilišu GSK-3 na serinu 9 i serinu 21 na N-terminalnom kraju (Stambolic i Woodgett, 1994). Ova post-translaciona modifikacija GSK-3 dovodi do konformacionih promena i onemogućava kinazi da priđe substratu i na taj način inhibira aktivnost kinaze. Fosforilacija na ovim epitopima ujedno predstavlja i mehanizam dejstva brojnih neuromodulatornih substanci, psihotropnih lekova i antidepresiva (Kockeritz i sar., 2006). Treba napomenuti da suprotno od fosforilacije GSK-3 na serinima, aktivnost ove kinaze može biti povećana i fosforilacijom na tirozinu 279 (GSK-3 α) ili na tirozinu 216 (GSK-3 β), što omogućava slobodan pristup kinaze substratima i njihovu fosforilaciju. Do danas, uloga fosforilacija GSK-3 na tirozinskim ostacima još uvek nije razjašnjena. U daljem tekstu fokus će biti na ulozi GSK-3 β , zbog njene predominantne ekspresije u moždanim strukturama i promenama u patofiziološkim stanjima, poput depresije.

Uloga GSK-3 β u etiopatogenezi depresije otkrivena je sasvim slučajno, pošto je prvobitno dokumentovana njena uloga u regulaciji metabolizma glikogena (Embi i sar., 1980). Kasnije je pokazano da litijum, antipsihotik koji se koristi u terapiji bipolarnog poremećaja i šizofrenije, ispoljava svoje dejstvo upravo preko inhibicije aktivnosti GSK-3 β odnosno povećanja fosforilacije GSK-3 β . Takođe, pokazano je i da antidepresivi inhibiraju GSK-3 β , što koreliše sa normalizacijom ponašanja nalik depresivnom kod stresiranih životinja, kao i sa poboljšanjem depresivnih simptoma kod depresivnih pacijenata. Osnovna hipoteza jeste da u depresiji dolazi do hiperaktivnosti ove kinaze, koja posledično dovodi do narušavanja brojnih ćelijskih procesa, poput bioenergetike, sinaptičke plastičnosti, neurogeneze, stabilnosti i preživljavanja neurona (Manji i sar., 2001; Mao i sar., 2009), dok je upotreba antidepresiva neutralisala ove promene.

Takođe, bitan segment regulacije funkcije GSK-3 β kinaze koji je povezuje sa etiologijom depresije, činjenica da GSK-3 β pod direktnim uticajem serotoninskih receptora, predominantno 5HT1a i 5HT2B, i uopšte, serotoninske transmisije čija deregulacija predstavlja osnovu depresivnog poremećaja (Slika 12). Takođe, novije genetičke studije pokazale su da „knockout” miševi koji imaju nefunkcionalnu GSK-3 β ili miševi kojima se apliciraju specifični inhibitori ove kinaze, pokazuju smanjenu imobilnost i povećanu eksploratornu aktivnost, što je dovelo do smanjenja ponašanja nalik depresivnom (Kaidanovich-Beilin i sar., 2004; O'Brien i sar., 2004). Dodatno, kod GSK-3 β „knockout” miševa dokumentovano je i povećanje neurogeneze, dok je delecija GSK-3 β dovela do povećanja proliferacije neuralnih progenitorskih ćelija (Eom i Jope, 2009; Kim i sar., 2009). Pored povećanja plastičnosti i neurogeneze, pokazano je da tokom LTP-a dolazi do inhibicije aktivnosti GSK-3 β (Peineau i sar., 2007).



Slika 12: Regulacija GSK-3 β od strane serotoninskih receptora u depresiji

Što se tiče studija na humanim uzorcima, nađeni rezultati za GSK-3 β su delimično potvrđeni. Ograničenje studija na humanim uzorcima jeste nemogućnost *in vivo* analiza na moždanim strukturama pri čemu alternativa, odnosno, rad na *postmortem* uzorcima, nije adekvatna s obzirom da nivo fosforilacije GSK-3 β opada nekoliko minuta nakon smrti, tako da nije moguće sa velikom preciznošću izmeriti nivo aktivne GSK-3 β forme (Li i sar., 2005). Ipak, *postmortem* studija Karegeta i saradnika (2005), rađena na uzorku od 40 ljudskih mozгова, pokazala je povećan nivo aktivnosti GSK-3 β kod osoba koje su bile depresivne u odnosu na zdrave ljude.

Pored svih ovih procesa čija je deregulacija detektovana u depresiji, kako u prekliničkim tako i kliničkim studijama, još jedan važan aspekt u potvrdi važne uloge GSK-3 β u etiologiji depresije jeste njena bliska komunikacija sa glukokortikoidima i GR-om. Kao što je navedeno ranije u tekstu (videti deo o fosforilaciji GR-a) *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale učešće GSK-3 β u fosforilaciji GR-a. Naime, pokazano je da ovo mesto fosforilacije na GR-u dovodi do promene transkripcione aktivnosti GR-a i samim tim i njegove funkcije (Gallagher-Beckley i Cidlowski, 2009; Rogatsky i sar., 1998), što dalje može dovesti do narušavanja aktivnosti HPA ose.

Sumarno, svi ovi nalazi, pored toga što snažno podržavaju ulogu GSK-3 β kinaze u etiopatogenezi poremećaja raspoloženja, takođe, promovišu ovu kinazu kao jakog „kandidata“ u dizajnu novih terapeutika u lečenju depresije.

1.4 Animalni modeli depresije

S obzirom na to da je depresija kompleksna bolest sa heterogenom kliničkom slikom i raznovrsnim simptomima, koja narušava raspoloženje i kognitivne funkcije kod ljudi, njeno modeliranje kod životinja se pokazalo kao izuzetno zahtevan i težak zadatak. Štaviše, heterogenost u etiopatofiziologiji same bolesti ograničava dizajn, primenu i jačinu modelovanja depresije. Najistaknutiji simptomi depresije kod ljudi su subjektivna osećanja koja se ne mogu izmeriti na životinjama. Sa druge strane, eksperimentalni životinjski modeli omogućavaju da se pojedini simptomi depresije (poput anhedonije, bespomoćnosti ili problema sa spavanjem ili apetitom) i specifična ponašanja (tzv. endofenotipovi) relevantna u depresiji, mogu provocirati i kod životinja

Glavne osobine koje eksperimentalni životinjski modeli depresije moraju da zadovolje su pouzdanost i replikativnost, zatim sličnost u uzroku, odnosno, etiologiji same bolesti (konstrukt ili etiološka validnost), kao i njihova sposobnost da kod životinja verno imitiraju depresivne simptome koji su prisutni kod ljudi (eng. *face validity*) i precizno predvide ishod tretmana (prediktivna ili farmakološka validnost) (McKinney, 2001). Pored navedenih kriterijuma, u novije vreme se dodatna pažnja posvećuje i patološkoj validnosti modela, pod kojom se podrazumeva da se fiziološke, molekularne i ćelijske promene kod životinja u ovim modelima poklapaju sa promenama koje se detektuju kod depresivnih ljudi (Krishnan i Nestler, 2010).

Depresija je često opisana kao manifestacija nesposobnosti da se jedinka izbori sa stresom (Keller i sar., 2007; Kessler i Frank, 1997), pa se modelovanje same bolesti kod životinja vrši tako što se one izlažu stresnim situacijama koje dovode do prepoznatljivih simptoma i ponašanja. Najnoviji podaci govore da izlaganje stresorima u interakciji sa genetičkom predispozicijom povećava osetljivost za razvoj depresije (Caspi i sar., 2003; Kaufman i sar., 2006). Eksperimentalno, ishod ovakvog izlaganja stresu određen je sa nekoliko varijabli, kao što su: priroda stresa (fizički ili psihološki), težina stresa, dužina izlaganja i stepen kontrole i predvidljivosti koji životinja ima nad stresnom situacijom. Različiti neuronalni signalni putevi se aktiviraju različitim tipovima stresora (Anisman i Matheson, 2005). Ove promenljive su dovele do razvoja različitih tipova životinjskih modela koji služe za ispitivanje različitih komponenti depresivnog poremećaja poput etiologije, simptoma, genetičke osnove (predispozicije), sredinskih i razvojnih uticaja itd.

1.4.1 Hronična socijalna izolacija – model za proučavanje poremećaja raspoloženja

Hronična socijalna izolacija laboratorijskih životinja je hronični tip stresora definisan kao nedostatak socijalne interakcije između životinja (House, 2001), kada životinja ima normalna auditorna i olfaktorna iskustva, ali nema vizuelne niti taktilne kontakte, odnosno, ne može da dotakne ili da bude dotaknuta od strane druge životinje u koloniji (Sanchez i sar., 1998). Socijalna sredina je značajan faktor regulacije razvoja limbičkog HPA sistema i verovatno je odgovorna za individualne razlike u osetljivosti na stres. Neki autori su pokazali da dugotrajna socijalna izolacija prouzrokuje hipofunkciju HPA sistema kod odraslih pacova (Malkesman i sar., 2006; Sanchez i sar., 1998). Retana-Marquez i sar. (2003) su u jednoj od brojnih studija utvrdili da dugotrajna socijalna izolacija posle kratkog perioda dojenja prouzrokuje hipofunkciju HPA sistema kod odraslih pacova. Ova hipofunkcija je posebno izražena posle izlaganja pacova starih 16 dana akutnom stresu socijalne izolacije. Međutim, kod životinja koje su podvrgnute hroničnom stresu ograničavanja, uočen je povećan bazalni nivo glukokortikoida (Zafir i Banu, 2009). Dakle, aktivacija HPA sistema zavisi od vrste stresora, dužine trajanja i od perioda (dan, veče) kada su životinje izlagane stresoru.

1.5 Antidepresivi

Precizna definicija ishoda antidepresivne terapije i evaluacija njenih efekata, značajne su ne samo sa aspekta istraživanja, nego i svakodnevne kliničke prakse. Danas na raspolaganju imamo brojne antidepresivne lekove, različite po svojoj hemijskoj strukturi, koji se primarno koriste u terapiji depresije. S obzirom da je depresija kao što smo naveli kompleksna heterogena bolest sa složenom kliničkom slikom antidepresivi su se pokazali efikasnim i u lečenju drugih psihijatrijskih poremećaja: anksioznosti, opsesivno-kompulsivnog poremećaja, bulemije, bolnih sindroma itd.

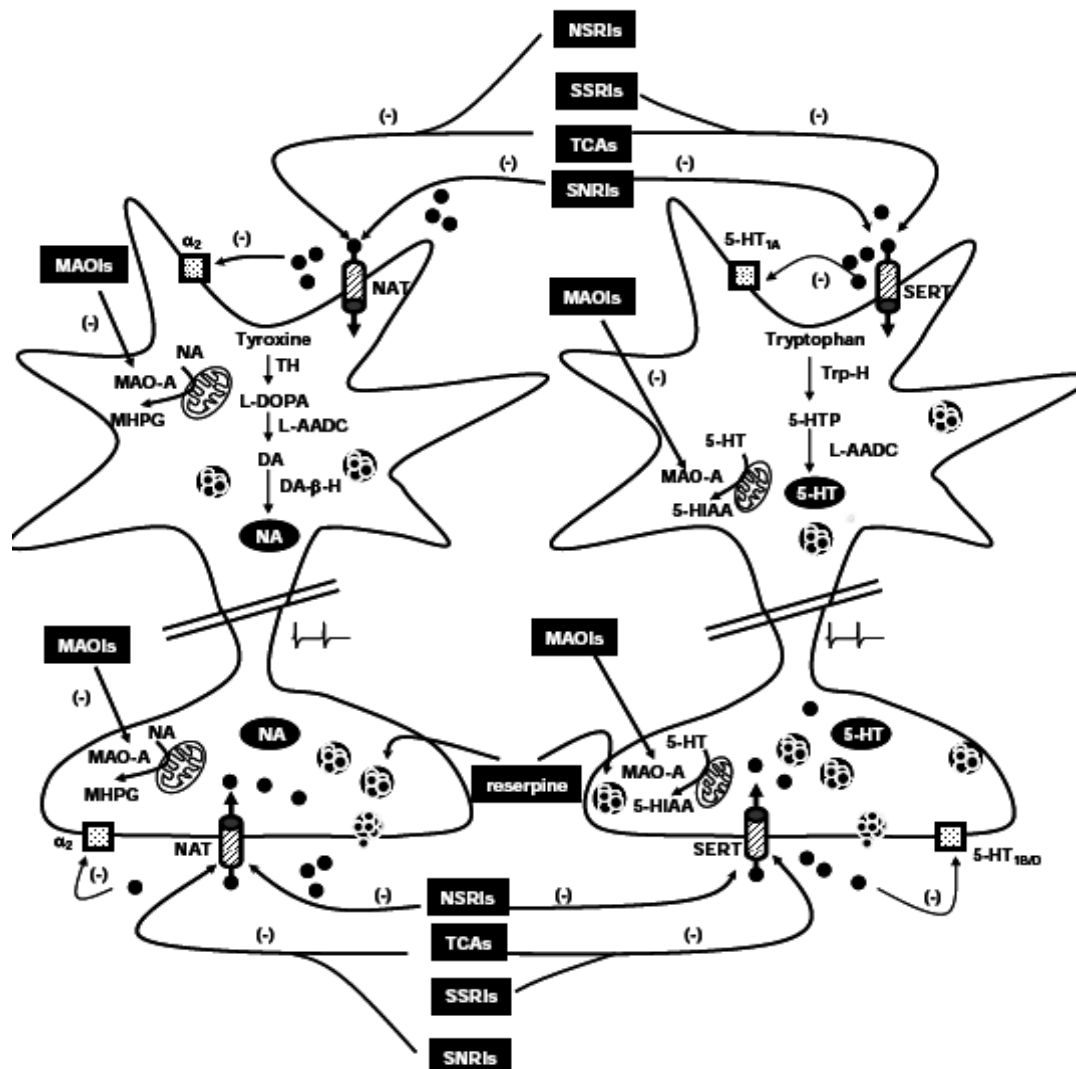
Delovanje svih do sada odobrenih antidepresiva od strane Administracije za hranu i lekove se zasniva na „monoaminskoj hipotezi depresije“. O mehanizmu dejstva antidepresiva i njihovo podeli bilo je reči u prethodnom delu (pogledati deo o monoaminskoj hipotezi, odeljak 1.2.4) i njihova klasifikacija na osnovu mehanizma dejstva i najznačajniji predstavnici prikazani su u **Tabeli 2**.

Iako antidepresivi pokazuju 60-80% uspešnosti, oko 50% tretiranih pacijenata dostiže potpunu remisiju (Mulrow i sar., 2000). Iako antidepresivi dovode do trenutnog povećanja monoamina u sinapsi, do ostvarivanja terapijskog dejstva dolazi nakon najmanje tri nedelje, a puna efikasnost postiže se tek nakon 6 nedelja terapije (aan het Rot i sar., 2009). Istraživanja ukazuju da su akutni efekti antidepresiva su ograničeni negativnom povratnom spregom koja uključuje aktivnost serotoninskih i noradrenalinskih autoreceptora, dok se tek tokom hroničnog tretmana pokreću adaptivni mehanizmi desenzitizacije (smanjenje senzitivnosti ćelije na neurotransmiter) i smanjene regulacije receptora (smanjenje broja receptora na površini ćelije) koji su odgovorni za terapijski efekat antidepresiva. U početku, povećanje monoamina u sinaptičkoj pukotini dovodi do aktiviranja autoreceptora na pre i postsinaptičkom završetku, što dovodi do smanjenja oslobađanja monoamina u sinaptičkom završetku. Tokom 2-3 nedelje dolazi do desenzitizacije i smanjene regulacije receptora, pa se monoaminska transmisija ponovo uspostavlja i oslobađanje neurotransmitera pojačava. Novija istraživanja objašnjavaju dejstvo antidepresiva preko dejstva na regulaciju genske ekspresije.

Tabela 2. Podela antidepresiva na osnovu mehanizma delovanja

Grupa	Mehanizam dejstva (glavni)	Primena
Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina: <i>fluoksetin, fluvoksamin, sertralin, paroksetin, citalopram</i>	Blokiraju serotoninski transporter i na taj način povećavaju raspoloživost serotonina u sinaptičkoj pukotini.	Lekovi prvog izbora
Inhibitori ponovnog preuzimanja noradrenalina i serotonina: <i>venlafaksin, duloksetin, milnacipram</i>	Blokiraju ponovno preuzimanje serotonina i noradrenalina i indirektno na taj način pospešuju transmisiju dopamina.	Lekovi prvog izbora
Inhibitori ponovnog preuzimanja noradrenalina i dopamina: <i>bupropion</i>	Blokira transportere za noradrenalin i dopamin i indirektno pospešuje transmisiju dopamina frontalno.	Lek prvog izbora
Inhibitori ponovnog preuzimanja noradrenalina: <i>reboksetin</i>	Blokira transportere za noradrenalin i indirektno pospešuje transmisiju dopamina frontalno.	
Noradrenergički i specifični serotoninski antidepresivi: <i>mirtazapin</i>	Blokira adrenergičke α -2 i 5-HT _{2A} , 5-HTC, 5-HT ₃ kao i H ₁ histaminske receptore i povećava transmisiju noradrenalina i serotonina	Lek prvog izbora
Antagonisti serotonina i inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina: <i>trazodon i nefazodon</i>	Blokira serotonergičke 5HT _{2C} receptore (potentno) i serotoninski transporter, kao i transporter za noradrenalin.	
Triciklični antidepresivi (TCA): <i>imipramine, amitriptilin, klomipramin, maprotilin</i>	Blokira preuzimanje noradrenalina i serotonina (blokiranje transportera za serotonin/noradrenalin)	Lekovi drugog i trećeg izbora
Tetraciklični antidepresivi: <i>mianserin</i>	Blokira adrenergičke α -2 i histaminske H ₁ receptore i povećava nivo noradrenalina i serotonina	
Inhibitor monoamino-oksidge (MAO): <i>moklobemid</i>	Inhibira MAO koji metaboliše sva tri transmitera i povećava dostupnost serotonina, noradrenalina i dopamina	Lekovi trećeg izbora
Agonist melatonina i specifični antagonist serotonina: <i>agomelatin</i>	Agonist melatonina-1 i 2, antagonist 5HT _{2C} receptora, čime povećava transmisiju adrenalina i noradrenalina prefrontalno.	Lek prvog izbora
<i>Tianeptin</i>	Triciklične je strukture ali drugačiji po mehanizmu dejstva: menja glutamatergičku transmisiju (verovatno preko AMPA receptora), moguće i da povećava preuzimanje serotonina.	Lek prvog izbora

Samim tim, raste potreba za otkrivanjem novih i efikasnijih antidepresiva sa različitim mehanizmima farmakološkog dejstva. Osim poboljšanja farmaceutika, drugi pristupi su takođe, važni u tretmanu depresije. Pre svega, elektrokonvulzivna terapija (EKT), koja je do danas i dalje jedna od najefektivnijih metoda, kao i druge tehnike neurostimulacije, uključujući „*deep-brain stimulation*“, transkranijalnu magnetnu stimulaciju (TMS) i stimulaciju vagusa, koje su u skorije vreme predložene u tretmanu kliničke depresije. Na samom kraju se nalaze i socijalne i bihevioralne intervencije, kao što su kognitivna psihoterapija, društvena podrška i redovna fizička aktivnost, koje smanjuju teret depresije i pri oporavku su korisne za telo i duh.



Slika 13. Mehanizam dejstva glavnih grupa antidepresiva

1.5.1 Selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina (SSRI) - Fluoksetin

Glavni SSRI su fluoksetin, citalopram, sertralin, fluvoksamin i paroksetin. SSRI se dobro apsorbuju oralno administracijom, metabolišu se u jetri i izbacuju urinom. S obzirom na to da veću selektivnost SSRI u odnosu na TCA, kao što je već pomenuto, oni dovode do manjih neželjenih efekata, što ih čini da budu lek prvog izbora u lečenju.

Indikacije za upotrebu SSRI su:

- teške depresivne epizode u depresivnom i bipolarnom poremećaju,
- blage depresivne epizode,
- opsesivno-kompulsivni poremećaj,
- anksioznost,
- bulimija,
- socijalna fobija.

Neželjeni efekti obuhvataju sledeće simptome:

- gastrointestinalni: mučnina, dijareja, smanjenje apetita,
- neuropsihijatrijski: nemir, anksioznost, tremor, iritabilnost, insomnija,
- seksualna disfunkcija,
- mogućnost ulaska u hipomaničnu ili maničnu epizodu, naročito kod bipolarnih pacijenata.

1.5.2 Fluoksetin

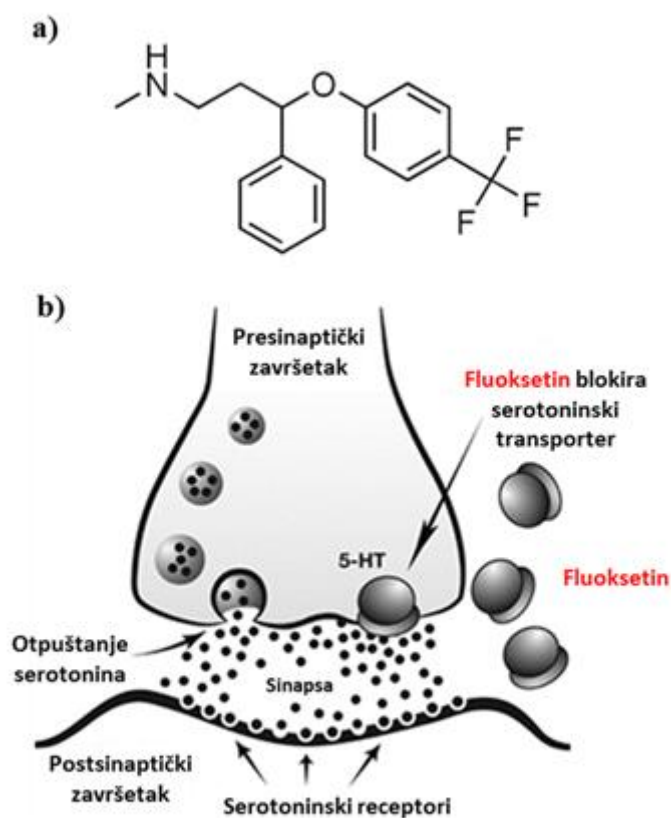
Fluoksetin (Slika 14) je psihotropni lek koji se prepisuje u različitim psihijatrijskim poremećajima, a najefikasniji je u lečenju različitih tipova depresije, od blage do jake (Stokes i Holtz, 1997). Mehanizam dejstva fluoksetina uključuje specifičnu inhibiciju preuzimanja serotonina na nervnim završecima, tj. sinapsama. Serotonin (5-HT) se sintetiše u neuronima hidrosilacijom triptofana do 5-HT, koji se zatim dekarboksiluje (Wong i sar., 1995). Novosintetisani serotonin se pakuje u vezikule u kojima se čuva sve do ekscitacije neurona,

nakon čega se oslobađa u sinaptičku pukotinu. Kada se oslobodi, serotonin može da aktivira jedan od nekoliko podtipova postsinaptičkih serotonininskih receptora. Delovanje serotonina završava se vezivanjem za presinaptički transporter koji ga vraća u presinaptički nervni završetak, nakon čega ga monoamin oksidaza konvertuje u 5-hidroksi-indolsirćetnu kiselinu. Fluoksetin i njegov glavni metabolit, norfluoksetin, oba terapijski aktivna, imaju veoma visok afinitet za transporter, selektivno se vezuju za njega i blokiraju njegovu transportersku

aktivnost, i na taj način, dovode do povećanja koncentracije serotonina u sinaptičkoj pukotini i do četiri puta (Wong i sar., 1995). Nasuprot tome, fluoksetin ima nizak afinitet za mesta preuzimanja noradrenalina, kao i za neurotransmitterske receptore.

Administracija fluoksetina dovodi do inhibicije preuzimanja serotonina za samo nekoliko minuta kod životinja, odnosno nekoliko sati kod ljudi (Stokes i Holtz, 1997; Wong i sar., 1995). Nasuprot tome, potrebno je da protekne nekoliko nedelja da bi fluoksetin ispoljio svoje terapijske efekte. Jedna od pretpostavki je da fluoksetin dovodi do povećanja koncentracije serotonina, usled čega dolazi do autoregulisanog smanjenja

broja serotonininskih receptora u određenim delovima mozga, kako bi se održao normalan nivo serotoninске transmisije. Takođe, treba imati u vidu da sve veći broj animalnih studija govori o stimulatornim efektima fluoksetina na neurogenezu u hipokampusu (Gould i sar., 1998; Malberg i sar., 2000).



Slika 14: (a) Hemijska struktura i (b) mehanizam delovanja fluoksetina

1.5.3 Uticaj antidepresiva (fluoksetina) na GR

Jedan od glavnih nalaza koji daje potporu i validnost „glukokortikoidnoj teoriji” zapravo je uticaj antidepresiva na funkciju GR-a i celokupnu signalizaciju posredovanu GR-om. Zaista, brojni nalazi, uključujući one iz životinjskih modela, kliničkih, kao i *in vitro* studija jasno su pokazale da antidepresivi, posebno SSRI i fluoksetin kao njihov glavni predstavnik, značajno deluju na narušenu funkciju GR-a i HPA osu u depresiji, iako tačan mehanizam njihovog delovanja još uvek nerazjašnjen. Pored identifikacije molekularnih mehanizama preko kojih antidepresivi ispoljavaju svoje dejstvo na GR i uopšte celokupnu ćelijsku dinamiku posredovanu GR-om, izuzetan izazov savremene naučne zajednice predstavlja i pitanje da li se ovi molekularni mehanizmi mogu koristiti i kao biomarkeri za procenu podložnosti za razvoj depresije, procenu depresivnog statusa, kao i predikciju uspešnosti samog odgovora na tretman antidepresivima (Maric i Adzic, 2013).

Preklinička istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da terapija antidepresivima može dovesti do promene u broju GR-a sposobnih da vežu ligand, kao i količine njegove iRNK u hipotalamusu i hipokampusu i dovodi do oporavka regulacije HPA ose (Peiffer i sar., 1991). Brojne studije koje su analizirale efekat SSRI antidepresiva pokazale su različite efekte. Naime, većina studija pokazala je da hronični tretman fluoksetinom (Brady i sar., 1992; Frechilla i sar., 1998; Pariante i Miller, 2001), kao i drugim SSRI antidepresivima, poput citaloprama i zimelidina (Budziszewska i Lason, 1994; Seckl i Fink, 1992), nemaju uticaj na ekspresiju gena za GR. S druge strane, studija Heydendaela i Jacobsona (2010) pokazala je da fluoksetin može imati i suprotan efekat i smanjiti ekspresiju gena za GR u različitim moždanim strukturama eksperimentalnih miševa, poput PFC-a, bademastih jedara, *locus coeruleus* i *raphe* formacije. Za razliku od SSRI antidepresiva, primena TCA antidepresiva kao i SNRI antidepresiva, dovela je do povećanja iRNK za GR u hipokampusu pacova (Budziszewska i Lason, 1994; Peiffer i sar., 1991; Seckl i Fink, 1992).

Pored *in vivo* studija, mnogobrojne *in vitro* studije rađene na kulturi ćelija su pokazale da antidepresivi mogu povećati, ostati bez efekta ili čak smanjiti ekspresiju i/ili funkciju GR-a, sve u zavisnosti od primenjenog antidepresiva, načina i dužine tretmana, od prisustva ili odsustva glukokortikoida, različitih eksperimentalnih paradigmi, kao i analize različitih moždanih struktura (Beger i sar., 2003; Orti i sar., 1989; Pepin i sar., 1992). Što se tiče efekata fluoksetina, studije su pokazale da dugotrajna primena ovog antidepresiva može povećati ekspresiju GR-a u primarnim hipokampalnim ćelijama (Lai i sar., 2003; Yau i sar.,

2002). Poput ekspresije iRNK za GR, ispitivanje efekata antidepresiva na nivo proteina GR-a u mozgu životinja u mnogobrojnim studijama dalo je nekonzistentne rezultate; neke studije su pokazale povećanje nivoa GR proteina (Lai i sar., 2003; Pariente i Miller, 2001; Pepin i sar., 1992), dok su druge pronašle smanjenje (Beger i sar., 2003; Hery i sar., 2000). Što se tiče efekta fluoksetina na proteinski nivo GR-a, pojedine studije su pokazale smanjenje nivoa GR u hipokampusu stresiranih pacova koje je praćeno normalizacijom ponašanja nalik depresivnom (Orti i sar., 1989; Szymanska i sar., 2009). Uopšteno gledano, pretpostavlja se da efekti antidepresiva na funkciju GR-a predstavljaju mesto interakcije različitih molekularnih mehanizama aktiviranih različitim klasama antidepresiva, dok direktan efekat antidepresiva na GR još uvek nije pokazan (Anacker i sar., 2011). Pokazano je nekoliko mehanizama putem kojih antidepresivi, između ostalih i fluoksetin, mogu da ostvare svoj efekat na GR. Oni uključuju aktivaciju različitih kinaznih puteva i fosforilaciju GR-a, zatim translokaciju GR-a u jedro koja obuhvata i regulaciju funkcije membranskog steroidnog transportera (eng. *multiple drug resistance p-glycoprotein*, MDR PGP), kao i interakcije sa drugim šaperonima, npr. FKBP5 itd. (Anacker i sar., 2011). MDR PGP aktivno izbacuje iz ćelije kortizol i DEX, ali ne i KORT, i na taj način učestvuje u regulaciji koncentracije steroida u ćeliji i translokaciji samog GR-a iz citoplazme u jedro (Hery i sar., 2000). Dalje, brojne studije pokazale su da antidepresivi mogu uticati na transkripcionu aktivnost GR-a i na menjati ekspresiju GR-regulisanih gena (Beger i sar., 2003).

2. Cilj rada

Sve je veći broj literaturnih podataka koji nepobitno pokazuju postojanje polnog dimorfizma u faktorima rizika, prevalenci i toku depresije, kao i u uspešnosti lečenja određenim antidepresivnim lekovima. Imajući u vidu važnu ulogu GR-a u regulaciji aktivnosti HPA ose u depresiji i odgovoru na hronični stres, koji se smatra glavnim etiološkim faktorom u nastanku ove bolesti, kao i činjenicu da antidepresivi normalizuju narušeno ponašanje preko normalizacije funkcije GR-a i HPA ose, glavni cilj ove doktorske disertacije je da se ispita postojanje potencijalnih polno-specifičnih razlika u odgovoru na hronični tretman fluoksetinom (SSRI antidepresivom) na nivou ponašanja, aktivnosti HPA ose i signalizacije GR-a u hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresoru socijalne izolacije. S obzirom na to da fosforilacija GR-a igra bitnu ulogu u regulaciji njegove funkcije, primarni cilj ove teze je bio da se ispita da li i kako hronični tretman fluoksetinom utiče na fosforilacioni status GR-a na specifičnim aminokiselinskim ostacima i nivoe ushodnih kinaza, kao i ekspresiju GR-regulisanih gena u hipokampusu Wistar pacova oba pola.

U tom cilju u ovoj tezi analizirani su sledeći parametri:

1. Uticaj hroničnog tretmana fluoksetinom na ponašanje nalik depresivnom kod pacova oba pola izlaganih hroničnom stresoru socijalne izolacije.
2. Uticaj hroničnog tretmana fluoksetinom na koncentraciju KORT-a u serumu pacova oba pola izlaganih hroničnom stresoru socijalne izolacije.
3. Uticaj hroničnog tretmana fluoksetinom na nivo ukupnog GR-a i njegovu distribuciju u citosolu i jedru hipokampusa mozga pacova oba pola izlaganih hroničnom stresoru socijalne izolacije.
4. Uticaj hroničnog tretmana fluoksetinom na nivo fosforilacije GR-a na S232, S246 i T171, s obzirom na to da fosforilacije na ovim epitopima značajno utiču na transkripcionu aktivnost GR-a.
5. Uticaj hroničnog tretmana fluoksetinom na nivo i aktivnost ushodnih kinaza koje fosforilišu GR: CDK5, MAPK (JNK, ERK i p38) i GSK3 β u hipokampusu pacova oba pola izlaganih hroničnom stresoru socijalne izolacije.

6. Uticaj hroničnog tretmana fluoksetinom na nivo ekspresije gena za GR i GR-reguliranih gena, kao što su BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β -arestina 2, u hipokampusu pacova oba pola izlaganih hroničnom stresoru socijalne izolacije.

3. Materijal i metode

3.1 Ekstrakcija fluoksetin hidrohlorida iz kapsula Flunirina

Kapsule Flunirina ispražnjene su i rastvorene u sterilnoj destilovanoj vodi mešanjem na magnetnoj mešalici i ultrasonikacijom u trajanju od 20 minuta nakon čega je rastvor profiltriran kroz filter papir Whatman No. 42. Koncentracija fluoksetin-hidrohlorida u rastvoru je određena metodom tečne hromatografije visoke performanse (eng. *ultra performance liquid Chromatography, UPLC*) (Djordjevic i sar., 2005) u odnosu na standard poznate koncentracije.

3.2 Eksperimentalne životinje

3.2.1 Gajenje eksperimentalnih životinja

U eksperimentima korišćene su ženke i mužjaci pacova Wistar soja, starosti 2.5 meseca na početku tretmana. Telesna masa životinja se kretala od 250 do 300 gr za ženke i 330 do 400 gr za mužjake. Sve životinje su odgajane u *vivarijumu* Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju u standardnim laboratorijskim uslovima (konstantna temperatura od $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, vlažnost od 55 % i svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak) i *ad libitum* režimu ishrane. Rad sa eksperimentalnim životinjama izveden je u skladu sa propisima Etičke komisije za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, koji prati smernice registrovanog „Srpskog udruženja za upotrebu životinja u istraživanju i obrazovanja“ (SLASA).

3.2.2 Tretman eksperimentalnih životinja

Nakon što su životinje oba pola navršile 2.5 meseca starosti, podeljene su u četiri eksperimentalne grupe, dve nestresirane (K i F) i dve stresirane grupe (I i IF) (Tabela 1) i podvrgnute tretmanu koji se sastojao iz dve faze. Obe faze trajale su po tri nedelje (21 dan), pri čemu je ukupno vreme trajanja eksperimentalnog tretmana iznosilo 6 nedelja (42 dana). U prvoj eksperimentalnoj fazi kontrolne nestresirane životinje su držane po četiri u kavezu (grupe K i F), dok su stresirane životinje (grupe I i IF) držane pojedinačno. Solitarno gajenje,

po jedna životinja u kavezu, korišćeno je kao model stresa izazvanog hroničnom socijalnom izolacijom tokom koje ove životinje nisu bile u mogućnosti da ostvare bilo kakav vizuelni, kao ni taktilni kontakt sa drugim životinjama, ali su imale normalne olfaktorne i auditorne senzacije (Slika 15). U drugoj eksperimentalnoj fazi životinje iz grupa K i I su injecirane rastvaračem u kojem je rastvoren fluoksetin-hidrohlorid (destilovana voda), dok su životinje iz grupa F i IF injecirane fluoksetin-hidrohloridom rastvorenim u destilovanoj vodi (doza 5 mg/kg t.t./dan). Sve životinje su injecirane intraperitonealno u 09:00 časova pod istim uslovima. Tokom injeciranja (21 dan) životinje iz grupa I i IF su držane i dalje u izolaciji. Masa životinja merena je jednom nedeljno, a estrusni ciklus ženki utvrđivan je mikroskopskom analizom vaginalnog brisa nedelju dana pre eksperimenta i odmah nakon žrtvovanja. Samo životinje sa normalnim 4-5 dnevnim fiziološkim ciklusima su uključene dalje u eksperiment. Nijedan od tretmana (ni injeciranje ni fluoksetin) nije značajnije uticao na faze estrusnog ciklusa.



Slika 15. Model hronične socijalne izolacije

Sve četiri eksperimentalne grupe životinja su 1 sat pre žrtvovanja prebačene u prostoriju gde je dalje rađen eksperiment. Životinje su žrtvovane dekapitacijom na giljotini (Harvard-Apparatus, USA) 24 sata nakon poslednjeg injeciranja, u isto vreme, da bi se izbegle varijacije u nivou KORT-a koje potiču od cirkadijalnog ritma glukokortikoida. Važno je napomenuti da su za analizu ponašanja i ispitivanje molekularnih parametara korišćeni različiti setovi životinja i da su eksperimenti ponovljeni tri puta.

3.3 Testovi ponašanja - Test forsiranog plivanja (FST)

FST se smatra standardnim testom za praćenje ponašanja nalik depresivnom (eng. *depressive-like behavior*) i najčešće se koristi da se odredi efikasnost antidepresiva u korekciji ponašanja laboratorijskih životinja (uglavnom pacova i miševa). U tu svrhu korišćen je test forsiranog plivanja (eng. *forced swimming test*, FST) da bi se utvrdilo da li hronična socijalna izolacija izaziva ponašanje nalik depresivnom i da li fluoksetin može neutralisati takvo ponašanje.

FST po metodi Porsolta i saradnika (1977) rađen je 24 sata nakon poslednjeg injeciranja. Životinje su unete u sobu za testiranje 30 min pre početka testa. Sva testiranja



Slika 16. Test forsiranog plivanja

rađena su u periodu između 9:00-12:00 časova u zatamnjenoj prostoriji. Improvizovana aparatura koja je korišćena za FST predstavlja cilindar od pleksiglasa (visine 50 cm i prečnika 20 cm), koji je napunjen vodom temperature 24.0 ± 0.5 °C, do visine od 30 ± 1.5 cm. Životinje su spuštane u cilindar sa vodom gde joj je dozvoljeno da pliva u uslovima u kojima izlazak iz cilindra nije moguć (Slika 16) u trajanju od 5 min. Posle svakog testiranja, životinje su vraćane u njihove kaveze i zatim u sobu gde su odgajane. Takođe, nakon svakog testiranja, cilindar je čišćen i punjen svežom vodom, jer je pokazano da korišćenje vode u kojoj je prethodno plivala druga životinja menja njihovo ponašanje.

Svako pojedinačno testiranje snimano je u zamračenoj sobi video kamerom (marka Sony, Japan) iz dva položaja (iznad cilindra i sa strane), a snimci naknadno analizirani. Vremenski interval od 5 min je podeljen u 60 mini intervala od 5 sekundi i sa snimka je za svaki mini interval određivano da li je životinja nepokretna, odnosno, imobilna (Slika 16). Imobilnost je definisana kao izostanak pokreta celog tela, osim malih pokreta, neophodnih da životinja održi glavu iznad vode.

3.4 Molekularne analize

3.4.1 Priprema tkiva i seruma

Za potrebe analiza moždanog tkiva hipokampusa životinje su žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus). Mozak je izolovan i brzo prebačen na led, a zatim je odvojen hipokampus. Tkiva smo trenutno zamrzavana u tečnom azotu i čuvana na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje obrade. Krv je sakupljana u epruvetama i ostavljena da koaguliše na sobnoj temperaturi, 30 min nakon čega je centrifugirana 15 min na 3000 rpm (Heraus centrifuga). Dobijeni serumi su čuvana na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do ELISA eseja.

3.4.2 Određivanje koncentracije kortikosterona (KORT) u serumu krvi

Koncentraciju KORT-a u serumu merena je esejem specifičnim za pacovski serum (OCTEIA kit, American Laboratory Products Co). U pitanju je kompetitivni ELISA esej u kome je poliklonsko antitelo na KORT vezano za unutrašnju površinu mikrotitar ploče. Kalibratori (standardi), kontrolni i razblaženi uzorci nepoznate koncentracije KORT-a nanošeni su na ploču u duplikatu i inkubirani preko noći na $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa antitelom koje je konjugovano sa HRP. Ploču su zatim tri puta sukcesivno isprane i dodavan je hromogeni supstrat tetrametilbenzidin (TMB) koji dovodi do razvijanja boje. Enzimaska reakcija je prekinuta dodavanjem STOP rastvora (0.5 M HCl), nakon čega je očitavana apsorbancija na 450 nm i 650 nm (650 nm je korekciona OD) na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, LKB). Intenzitet razvijene boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji KORT-a u uzorku. Vrednosti koje su očitavane sa semilogaritamske standardne krive su izražene u ng/ml.

3.4.3 Izolovanje proteina i priprema citosolnih i jedarnih frakcija hipokampusa

Za određivanje nivoa proteina korišćene su specifične subćelijske frakcije, citosolna i jedarna frakcija, moždane strukture hipokampusa. Subćelijske frakcije su dobijane iz skupine od 8 hipokampusa. Pulovano, smrznuto tkivo je homogenizovano u homogenizeru staklo-teflon (Potter-Elvehjem) sa 20 zaveslaja tučkom, u 2 zapremine hladnog (4°C) 20 mM Tris-HCl pufera ($\text{pH } 7.4$) koji je sadržao 10% glicerol, 50 mM NaCl , $1\text{ mM Na}_2\text{EDTA}$, $1\text{ mM Na}_2\text{EGTA}$, 2 mM DTT i proteazne ($20\text{ mM Na}_2\text{MoO}_4$, 0.15 mM spermin , 0.15 mM spermidin , 0.1 mM PMSF , $5\text{ }\mu\text{g/ml antipain}$, $5\text{ }\mu\text{g/ml leupeptin}$, $5\text{ }\mu\text{g/ml aprotinin}$, $10\text{ }\mu\text{g/ml}$

tripsin inhibitor i 3 mM benzamidin) i fosfatazne inhibitore (20 mM β -glicerofosfat, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 2 mM Na_3VO_4 , 25 mM NaF), dodate neposredno pred rad. Dobijeni homogenat je centrifugiran na 10 min/2000 g /4 °C (Eppendorf 5417), nakon čega su u talogu ostala jedra, a supernatant (S1) je dalje korišćen za dobijanje citosola. Talog jedara je opran u 0.5 ml homogenizacionog pufera i ponovo centrifugiran na 2000 g 10 min na 4 °C. Oprana jedra su potom resuspendovana u 0.5 ml homogenizacionog pufera koji sadrži 0.5M KCl. Ovakva smeša je potom inkubirana 1 sat na ledu uz povremeno mešanje na vorteksu. Posle inkubacije, jedarna suspenzija je centrifugirana na 8000 g 10 min na 4 °C a dobijeni supernatant se koristio kao jedarni ekstrakt.

Za dobijanje citosola prethodno dobijeni supernatant (S1) je centrifugiran 30 min na 20000 g na 4 °C da bi se odvojila mitohondrijalna frakcija koja je ostala u talogu, a u supernatanu (S2) je ostala citosolna frakcija. Da bi se dobila finalna prečišćena citosolna frakcija dobijeni supernatant (S2) je dalje centrifugiran 60 min na 105000 g na 4 °C (Beckman L8-M). Citosolna frakcija je alikvotirana i čuvana na -70 °C.

3.4.4 Određivanje koncentracije proteina

U ćelijskim ekstraktima određivana je koncentraciju proteina po Lowry – ju (1951). Mikro-Lowry metoda se koristi kada je očekivana koncentracija proteina u uzorku u opsegu od 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kao standard za određivanje koncentracije proteina koristi se goveđi serum albumin (eng. *bovine serum albumin* - BSA), od koga je pripreman osnovni (štok), rastvor koncentracije 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Od štoka je dalje pravljena seriju razblaženja za standardnu krivu prikazanu u **Tabeli 3**.

Od svakog uzorka uzet je po 1 ml svakog standarda BSA ili 1 ml uzorka i njemu dodat 2.5 ml reagensa A (reagens A=1 ml 1% CuSO_4 + 1 mL 2% K, Na-tartarata + 98 ml 2% Na_2CO_3 u 0.1 M NaOH), zatim promešan na vorteksu i inkubiran 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je uzorcima dodato po 160 μl Folin-Ciocalteu reagensa (originalnog, nerazblaženog), i inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi i očitana je OD750 nm svakog uzorka. Merenja su rađena u duplikatu. Od očitanih vrednosti standarda konstruisana je prava prema funkciji $\text{OD750 nm} = a \times C_p (\mu\text{g}/\text{ml}) + b$ i sa nje određivana koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane OD750 nm za uzorak (korigovana vrednost za razblaženje i izražene kao mg/ml originalnog uzorka).

Tabela 3: Serija razblaženja BSA za standardnu krivu

Za 5 mL BSA standarda	Finalna koncentracija $\mu\text{g/ml}$	Zapremina stoka BSA u ml	Zapremina dd H ₂ O u ml
1	50 $\mu\text{g/ml}$	5 ml	0 ml
2	40 $\mu\text{g/ml}$	4 ml	1 ml
3	30 $\mu\text{g/ml}$	3 ml	2 ml
4	20 $\mu\text{g/ml}$	2 ml	3 ml
5	10 $\mu\text{g/ml}$	1 ml	4 ml
6	5 $\mu\text{g/ml}$	0.5 ml	4.5 ml

Nakon što je određena koncentracija proteina u ćelijskim lizatima, alikvoti uzoraka su pomešani sa denaturišućim puferom prema Laemmli–ju (1970) (**Tabela 4**) i kuvani 5 min na 100 °C.

Tabela 4: Pufer za denaturaciju uzoraka prema Lemliju.

Pufer za denaturaciju uzoraka (finalne koncentracije)
62.5 mM Tris HCl pH 6.8
10 % Glicerol
2 % SDS
0.005 % BFB (<i>Bromfenol Blue</i>)
2 % β -merkaptoetanol

3.4.5 Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS poliakrilamidnom gelu

Posle faze kuvanja uzoraka, svi uzorci su ohlađeni do sobne temperature i nanešeni na SDS poliakrilamidne gelove. Proteini su amfoterična jedinjenja, tj. njihovo ukupno naelektrisanje određeno je pH vrednošću medijuma u kome su suspendovani. U rastvoru čija

je pH vrednost iznad izoelektrične tačke proteina, proteini imaju ukupno negativno naelektrisanje i u električnom polju se kreću ka anodi.

SDS je anjonski deterdžent koji denaturiše proteine, narušavajući njihovu trodimenzionalnu strukturu. SDS se vezuje za proteine specifično u masenom odnosu 1.4:1. SDS daje negativno naelektrisanje polipeptidu u proporciji njegove dužine i denaturisani polipeptidi postaju negativno naelektrisani sa jednakim naelektrisanjem po jedinici dužine. Izduženi i redukovani kompleks protein SDS ima štapičastu strukturu. Neophodno je redukovati disulfidne mostove u proteinima pre nego što oni zauzmu konformaciju svoje primarne strukture, što se postiže β -merkaptanolom. U denaturišućoj SDS poliakrilamidnoj gel elektroforezi (PAGE), migracija nije određena naelektrisanjem polipeptida, već njegovom molekulskom masom. Svi proteini prekriveni SDS-om su jako negativno naelektrisani i zato se kreću ka pozitivnoj elektrodi. U proteinskom ekstraktu manji molekuli se kreću brže kroz gel (zbog manjeg otpora sredine) i za isto vreme, putuju dalje od većih molekula. Na kraju elektroforeze proteini su razdvojeni u diskretne trake po opadajućoj masi (veličini molekula), od mesta nanošenja do kraja gela. Uzorci (60 μ g proteina) su razdvajani po modifikovanoj metodi Laemmli-ja (1970) na aparatu Mini Protein Electrophoresis Cell (Bio-Rad), na 10 % PAGE gelovima (**Tabela 5**) u puferu za elektroforezu koji je sadržao 0.25 M Tris bazu, 0.192 M glicin i 0.1% SDS, pH=8.3, pri konstantnom naponu od 100 V (Laemmli et al 1970). Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za „Western blot“ analizu. Kao molekulski marker korišćen je Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

Tabela 5. Sastav gelova za koncentrovanje i razdvajanje

Gel za razdvajanje	Gel za koncentrovanje
10% Akrilamid/bisakrilamid (30:1)	5% Akrilamid/bisakrilamid (30:1)
375 mM Tris pH 8.95	125 mM Tris pH 6.95
2mM EDTA	2mM EDTA
0.1 % SDS	0.1 % SDS
0.06 % APS	0.1 % APS
0.06 % TEMED	0.1 % TEMED

3.4.6 Analiza proteina metodom „Western blot“

Western blot je tehnika koja se koristi za kvantifikaciju proteina. Zasniva se na prenošenju proteina sa gela na PVDF (poliviniliden fluorid) membranu (Immobilon-P, veličine pora 0.45 μm , Millipore Corporation, USA), njihovoj detekciji pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitela vezanih sa enzimom, čija se aktivnost detektuje prisustvom obojenog produkta.

Nakon završene elektroforeze, gelovi su stavljeni u transfer pufer (20 % metanol, 0.025 M Tris-baza, 0.192 M glicin, pH~8.3), maksimalno 10 min. PVDF membrane odgovarajuće veličine su prvo aktivirane držanjem 60 sekundi u 100 % metanolu, zatim isprane u vodi i potopljene u hladan transfer pufer. Nakon toga je formiran sendvič koji se sastojao od Mini Trans-Blot® filter papira (Bio Rad), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i sledećeg filter papira (svi natopljeni transfer puferom), dok su eventualno nastali mehurove udaljeni prostim prevlačenjem horizontalno položenog staklenog štapića preko sendviča, sa jednog kraja na drugi. Ovako napravljen sendvič je postavljen u aparat za transfer u rastvoru (Trans-Blot Cell, Bio Rad) i dodatno potopljen u pufer za transfer. Ceo aparat je priključen na električni ispravljač i najčešće je korišćen transfer pri konstantnoj struji od 400 mA na 4 °C u trajanju od 2 sata. Membrane su potom inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje, PBS-u (eng. *phosphate-buffered saline*) koji je sadržao 5 % nemasno mleko ili BSA (PBS sa 5 % BSA korišćen je za blokiranje membrana kada bi se detektovao fosforilisani GR, a u ostalim slučajevima korišćen je PBS sa 5 % nemasnim mlekom).

Nakon blokiranja, membrane su inkubirane u primarnom antitelu preko noći na 4°C. Za detekciju proteina korišćena su sledeća primarna antitela: za detekciju ukupnog GR-a M-20 antitelo (Santa Cruz Biotechnology) (razblaženje 1:1000); phospho-GR (Ser211) (Cell Signaling) antitelo za detekciju GR-a fosforilisanog na S211 (razblaženje 1:500); phospho-GR (Ser226) (Abcam) antitelo za detekciju GR-a fosforilisanog na S226 (razblaženje 1:500); phospho-GR (Tyr171) (Abcam) antitelo za detekciju GR-a fosforilisanog na T171 (razblaženje 1:500) antitela SAPK/JNK i phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling) za detekciju ukupne i fosforilisane JNK (razblaženja 1:1000); antitela p38 i pp38 (Cell Signaling) za detekciju ukupne i fosforilisane forme p38 kinaze (razblaženja 1:500); antitela ERK1/2 i phospho-ERK1/2 (razblaženja 1:1000) (Cell Signaling) za detekciju ukupne i fosforilisane ERK1/2 (razblaženja 1:1000); antitela CDK5 i p35/p25 (Santa Cruz Biotechnology) za detekciju CDK5 kinaze (razblaženje 1:1000) i njenih aktivatora p35/25

proteina (Santa Cruz Biotechnology) (razblaženje 1:1000); antitela GSK3 β i phospho-GSK3 β (Cell Signaling) za detekciju ukupne i fosforilisane GSK3 β kinaze (razblaženja 1:500). β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka na gel i detektovan je specifičnim antitelom (Abcam) (razblaženje 1:5000). Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane smo ispirali 3 puta po 10 min PBST puferom na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje na mešalici. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 2 sata, uz stalno mućkanje, sa sekundarnim anti-mišjim (odnosno zečijim) antitelom konjugovanim sa peroksidazom iz rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) (razblaženja 1:5000). Nakon inkubacije, membrane su opet ispirane 3 puta po 10 min u PBST puferu, nakon čega je na membrane nanošen pufer za hemiluminescenciju (eng. *enhanced chemiluminescence*, ECL).

Supstrat za ECL se dobija mešanjem istih zapremina luminola i rastvora vodonik-peroksida, koji u prisustvu HRP enzima na sekundarnom antitelu dovodi do hemijske reakcije (oksidacije luminola) i do oslobađanja svetlosne energije (fotona određene energije dovoljne da osvetli rendgen film). Membrane su inkubirane u ECL supstratu 5 min nakon čega su sušene, pokrivane tankom providnom folijom i stavljane u kasete za razvijanje filmova. Na pokrivene membrane je postavljan rendgen film (Agfa, Belgium), pri čemu je dužina ekspozicija varirala. Intenzitet signala na filmu odgovara intenzitetu emitovane svetlosti, a ona količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Kvantifikacija signala je rađena denzitometrijski u PC programu za analizu slike *Image J*.

Nakon detekcije signala za željeni protein, membrane su stripovane u cilju detektovanja drugog željenog proteina sa iste membrane. Stripovanje membrana rađeno je 20 min na 50 °C u puferu za stripovanje koji je sadržao: 62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2 % SDS i 100 mM β -merkaptoetanol.

3.4.7 Izolacija ukupne ćelijske RNK

Ukupnu RNK iz hipokampusa je izolovana Trizol® reagensom (Invitrogen, USA). Smrznuto tkivo je homogenizovano u Potter-Elvehjem staklo-teflon homogenizeru u odnosu 1 ml Trizol®-a na 100 mg tkiva hipokampusa ili PFC-a. Dobijeni homogenati su zatim inkubirani 5 min na 30 °C da bi jedarni proteinski kompleksi potpuno disosovali. Zatim je u svaki homogenat dodavano 0.2 ml hloroforma i epruvete sa uzorkom (ependorfice) su snažno mućkane po 15 sekundi, i opet inkubirane na temperaturi od 30 °C, 3 min. Uzorci su zatim centrifugirani 15 min na 12000 g u prethodno ohlađenoj centrifugi na 4 °C. Nakon ovog

centrifugiranja u ependorficama su se razdvojile tri faze: donja (organska) faza, interfaza i gornja (vodena) faza. RNK koja se nalazi u vodenoj fazi, je prebacivana u nove ependorfice u koje je dodavano 0.5 ml izopropanola. Smeša je inkubirana 10 min na 30 °C i centrifugirana 10 min na 12000 x g. Nakon centrifugiranja talog je resuspendovan u 75 % etanolu i centrifugiran 5 min na 7500 g na 4 °C. Dobijeni talog je osušen na vazduhu i rastvoren u 100 µl 0.1 % DEPC vode (voda sa dietil-pirokarbonatom).

Koncentracija RNK je određivana spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (Thermo Scientific) merenjem apsorpcije uzorka na 260 nm. Da bi proverili integritet dobijene RNK rađena je elektroforeza ukupne RNK na 2 % agaroznom gelu, u trajanju od 30 min i pri konstantnoj voltaži od 100 V.

3.4.8 Reverzna transkripcija

U sledećem koraku, za sintezu cDNK iz RNK korišćen je *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Naime, 2 µg ukupne RNK je inkubirano sa reverznom transkriptazom MultiScribe™ (50 U/µl) u prisustvu 2 µl Random „prajmera“, 0.8 µl 100 mM dNTP-a, 1 µl ribonukleaznog inhibitora i 10x RT pufera u ukupnoj zapremini od 20 µl. Sintetisane cDNK su čuvane na -20 °C do upotrebe.

3.4.9 Kvantitativni PCR u realnom vremenu (RTqPCR)

U cilju određivanja ekspresije gena za GR, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β-arestina 2, korišćen je „SYBR green“ (Power SYBR Green PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster City, CA) postupak i kvantitativni RTqPCR (7500 Real-time PCR System Applied Biosystems). Kao endogenu kontrolu korišćen je ribozomalni protein L19 (Rpl19). U RTqPCR reakciji korišćeni su specifični prajmeri (**Tabela 6**) za amplifikaciju gena od interesa, kao i za gen za ribozomalni protein L19 (eng. *ribosomal protein L19*, Rpl19). Apsolutne vrednosti ekspresije iRNA svih uzoraka su normalizovane na signal Rpl19 uključen u svaki RTqPCR. U cilju procene efikasnosti amplifikacije (E) za svaki par prajmera korišćene su standardne krive. Efikasnost amplifikacije je dobijena iz nagiba krive (Ct-početak detektibilne amplifikacije u funkciji logaritma koncentracije cDNK) (Rutledge i Cote, 2003). Efikasnost PCR reakcije je bila slična za sve parove prajmera i kretala se u opsegu 0.96–0.99 (maksimalna moguća efikasnost je 1). Kvantifikacija relativne količine transkripata je rađena korišćenjem $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak i Schmittgen, 2001).

Tabela 6: Sekvence prajmera za analizu ekspresije gena

cDNA produkt	Sekvenca „prajmera”
GR	5'- TCACAGTAGGGGGCCTAACA - 3' 5'- GGCTTTTGCTCATGTGTCATT - 3'
BDNF	5' – GACTGCAGTGGACATGTC - 3' 5' – CAGCCTTCCTTCGTGTAACC - 3'
CRH	5'- GACTGCAGTGGACATGTC - 3' 5'- CAGCCTTCCTTCGTGTAACC - 3'
5HT1a	5'- CAAGGACCACGGCTACAG - 3' 5'- CGTTCAGGCTCTTCTTGGG - 3'
p11	5'- TGCTCATGGAAAGGGAGTTC - 3' 5'- CCCCGCCACTAGTGATAGAA - 3'
β-arestin 2	5'- AAGACACCAACCTGGCTTCC - 3' 5'- TAGGACGAAAGGTAGCTCCAC - 3'
Rpl 19	5' - CAATGCCAACTCCCGTCA - 3' 5' - GCTGTACCCTTCCGCTTACCTAT - 3'

3.5 Kvantifikacija signala i statistička obrada rezultata

Kvantifikaciju rezultata dobijenih u „Western blot“ rađena je denzitometrijskom analizom signala u programu za analizu slike *Image J* (eng. *Image processing and analysis in Java*), dok je kvantifikacija ekspresije gena rađena automatski u RTqPCR softveru (Applied BioSystem). Svi eksperimenti su ponovljeni na tri serije životinja po tri puta. Tkiva koja su izolovana iz životinja iz iste grupe su spajana. Vrednosti za optičku gustinu signala izmerene *Image J* softverom su korigovane u odnosu na OD pozadine i izražene u arbitrarnim jedinicama (*count*). Dobijene vrednosti za svaki protein su izražavane u odnosu na apsorbancu β -aktina istog uzorka sa istog gela i predstavljene kao % od kontrole. Kao kontrola korišćena je kontrolna grupa ženki, odnosno, nestresirane ženke tretirane rastvaračem - destilovanom vodom (ženke grupa K).

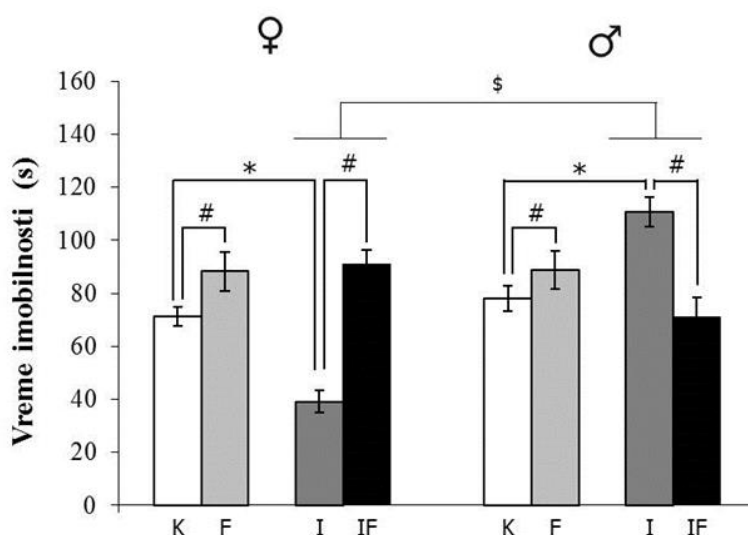
Statističku obradu rezultata rađena je u softverskim programima Microsoft Excell (Microsoft) i Statistica 8 (Stat Soft, USA). Svi rezultati predstavljeni su kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Za procenu statističke značajnosti korišćena je multifaktorijalna analiza varijanse (eng. *Two-way i Three-way ANOVA*), praćena odgovarajućim testom („multiple range“ *Tukey post-hoc test*). Međupolne razlike testirane su trofaktorijalnom ANOVOM, dok su međugrupne razlike unutar svakog pola testirane dvofaktorijalnom ANOVOM, pri čemu su socijalna izolacija i tretman fluoksetinom korišćene kao nezavisne varijable. Za sve testove pretpostavljena statistička značajnost je $p < 0.05$.

Kvantifikacija rezultata dobijenih u ELISA eseju za KORT vršena je na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, LKB), pri čemu su istovremeno očitavane vrednosti standarda i na osnovu njih izračunavana standardna kriva. Vrednosti KORT-a izražene su u ng/ml. Svi uzorci mereni su u duplikatu u 8 životinja iz svake grupe. Statističke razlike između eksperimentalnih grupa određivane su korišćenjem jednofaktorijalne analize varijanse (eng. *One-way ANOVA*), praćene *Tukey post-hoc* testom. Za sva merenja pretpostavljena statistička značajnost je $p < 0.05$. Cela grupa testova ponašanja je ponovljena 3 puta, sa 8 životinja u svakoj eksperimentalnoj grupi. Statističku razliku između grupa određivana je Studentovim t-testom, pri čemu je $p < 0.05$ smatrana statistički značajnom razlikom.

4. Rezultati

4.1 Efekat fluoksetina na ponašanje životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije u FST-u

Kod kontrolnih nestresiranih životinja hronični tretman fluoksetinom značajno je povećao vreme imobilnosti u odnosu na tretman rastvaračem kod oba pola u odnosu na odgovarajuće grupe (grupe F vs K) (za ženke $F=53.76$, $p<0.05$; za mužjake $F=2.19$, $p<0.05$) (Slika 17). Dalje, kod stresiranih ženki hronični tretman fluoksetinom normalizovao je ponašanje, odnosno, vratio vreme imobilnosti na kontrolni nivo koje je prethodno značajno smanjeno pod uticajem hronične socijalne izolacije ($F=12.52$, $p<0.05$). Kod mužjaka tretman fluoksetinom je takođe, normalizovao ponašanje, ali na drugačiji način u odnosu na ženke.

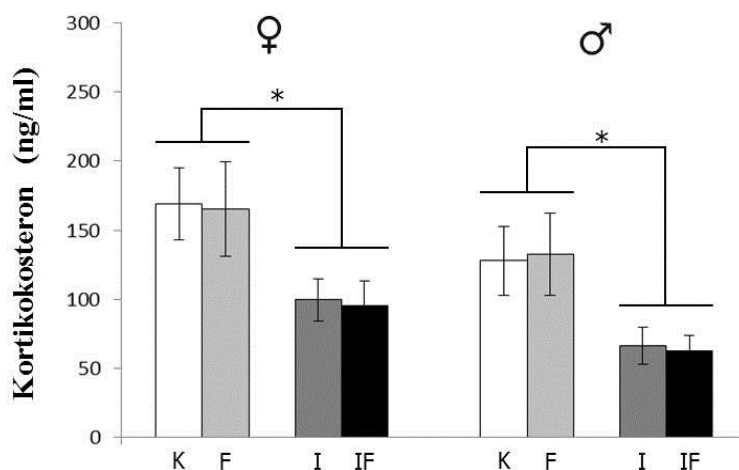


Slika 17. Promene u dužini trajanja imobilnosti (izražene u broju intervala od po 5 sek u roku od 5 min) u FST-u u kontrolnim i stresiranim ženkama (♀) i mužjacima (♂) Wistar pacova tretiranih rastvaračem ili fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p<0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

Naime, fluoksetin je značajno smanjio vreme imobilnosti kod stresiranih mužjaka ($F=26.54$, $p<0.05$), koje je prethodno hronična socijalna izolacija značajno smanjila. Sve ukupno, ovi rezultati ukazuju da, iako je hronična socijalna izolacija izazvala suprotne, polno-specifične promene u imobilnosti (interakcija pol x stres: $F=13.93$, $p<0.05$), naknadni tretman fluoksetinom normalizovao je ponašanje nalik depresivnom kod oba pola, ali na suprotan način (interakcija pol x stres x fluoksetin: $F=28.45$, $p<0.05$).

4.2 Efekat hronične socijalne izolacije i tretmana fluoksetinom na koncentraciju KORT-a u serumu

Da bi proverili kako hronična socijalna izolacija utiče na nivo KORT-a i da li ga tretman fluoksetinom menja, merena je njegova koncentracija u serumu životinja (Slika 18). U kontrolnim grupama životinja koncentracija KORT-a je iznosila za ženke 136.8 ± 44.5 ng/ml i za mužjake 136.8 ± 44.5 ng/ml (Slika 18). Međutim, u serumu životinja izlaganih hroničnoj socijalnoj izolaciji izmerena koncentracija iznosila je za ženke 64.7 ± 28.3 ng/ml, a za mužjake 64.7 ± 28.3 ng/ml i statistički je bila značajno smanjena u odnosu na koncentraciju izmerenu u kontrolama oba pola ($*p<0.05$).



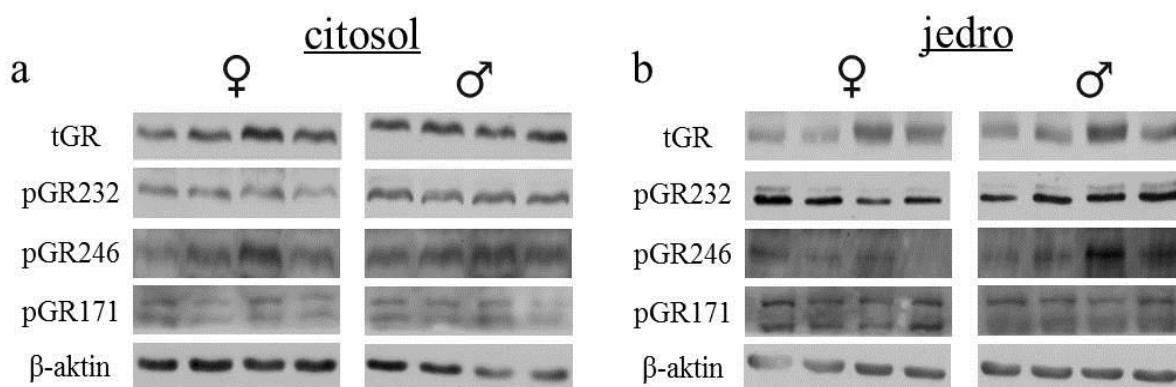
Slika 18. Koncentracija kortikosterona (ng/ml) u serumu kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) Wistar pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p<0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

Hronična socijalna izolacija je značajno smanjila nivo KORT-a u odnosu na kontrolne grupe u oba pola (ženke $F=17.90$, $p<0.05$; mužjaci $F=8.58$, $p<0.05$), dok tretman fluoksetinom nije menjao nivo KORT-a, kako u kontrolnim tako i u stresiranim životinjama oba pola. Štaviše, fiziološki odgovor organizma na hronični stres ili tretman fluoksetinom je bio sličan i nije pokazao nikakve polne razlike u smislu promene nivoa KORT-a.

4.3 Efekat fluoksetina na GR i njegov fosforilacioni status (pGR) u hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

Uzimajući u obzir činjenicu da određeni antidepresivi mogu menjati nivo glukokortikoida kao i uticati, na signalizaciju posredovanoj GR-om, a koji su prethodno izmenjeni pod uticajem hroničnog stresora, analizirano je da li hronični tretman fluoksetinom utiče na signalizaciju posredovanu GR-om u hipokampusu hronično stresiranih ženki i mužjaka pacova (Slika 20).

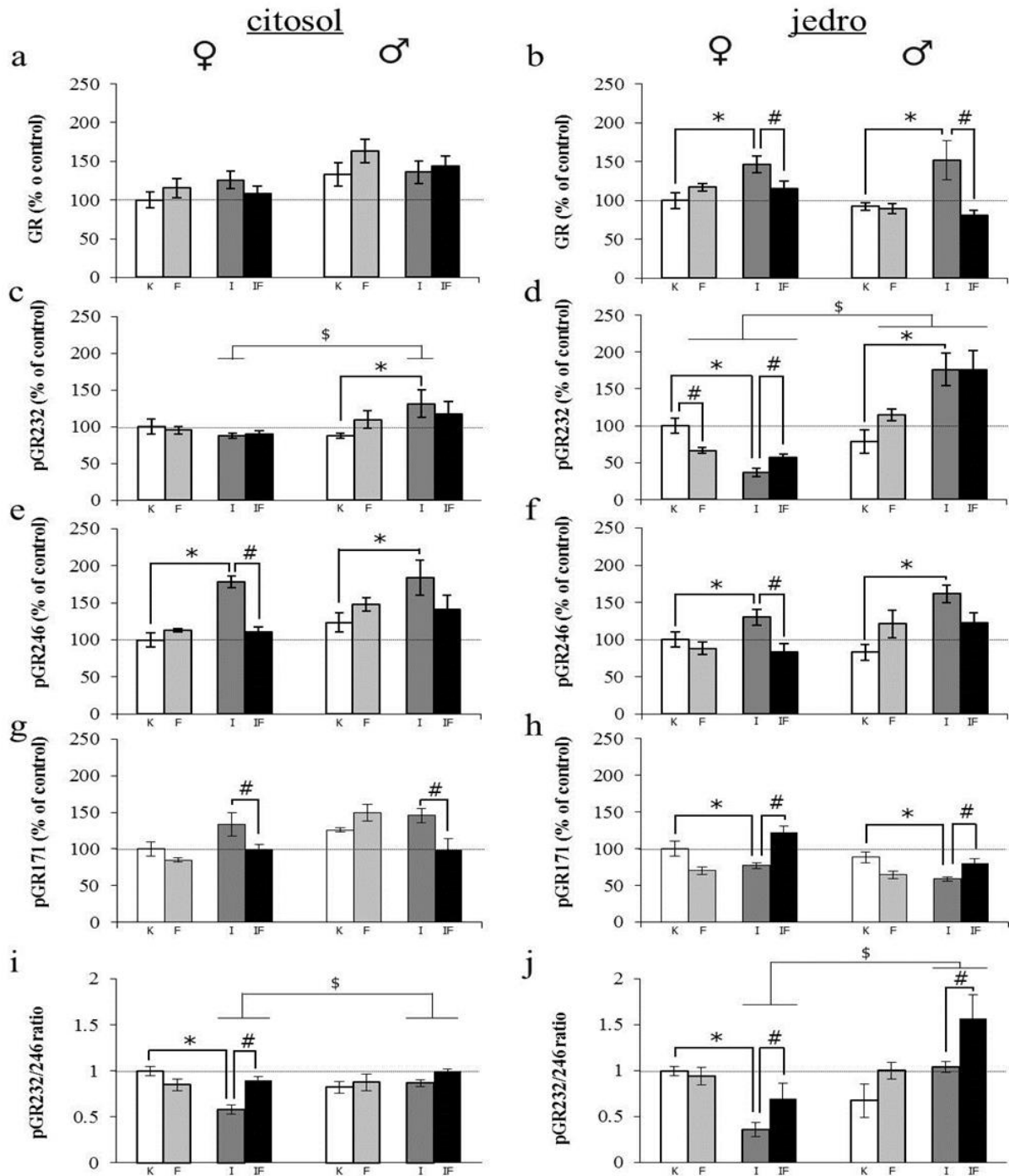
Hronični stres nije doveo do bilo kakvih promena na nivou totalnog GR-a u citosolu hipokampusa bilo kod ženki bilo kod mužjaka (Slika 20 a). Za razliku od citosola, u jedru je hronična izolacija značajno povećala nivo totalnog GR-a kod oba pola (ženke $F=8.70$, $p<0.05$; mužjaci $F=6.40$, $p<0.05$) (Slika 20 b). Statistička analiza trofaktorijalnom ANOVOM nije pokazala polno-specifične razlike ni u citosolu ni u jedru životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije (Slika 20 a i b). Dalje, hroničan tretman fluoksetinom nije značajno uticao na nivo GR-a u citosolu hipokampusa, kako kod kontrolnih, tako i kod hronično stresiranih životinja oba pola. Statistička analiza trofaktorijalnom ANOVOM nije pokazala polno-specifičan efekat fluoksetina na nivo GR-a u citosolu kako kod kontrolnih, tako i kod životinja izloženih hroničnom stresu (Slika 20 a). Poput citosola, i u jedarnom ekstraktu pojedinačni tretman fluoksetinom nije menjao nivo GR-a kod kontrolnih životinja oba pola (Slika 20 b). Međutim, kod hronično stresiranih ženki i mužjaka tretman fluoksetinom je značajno smanjio nivo GR-a u jedarnoj frakciji (ženke $F=9.99$, $p<0.05$; mužjaci $F=9.61$, $p<0.05$), koji je prethodno pod uticajem hronične izolacije značajno povećan kod oba pola u odnosu na kontrolne životinje (ženke $F=8.70$, $p<0.05$; mužjaci $F=6.40$, $p<0.05$) (Slika 20 b). Tačnije, fluoksetin je vratio nivo GR u jedru kod stresiranih životinja na nivo kao kod odgovarajućih kontrola.



Slika 19. Reprezentativni Western blotovi koji pokazuju nivoe ukupnog GR-a (tGR) i njegovih fosfo-izoforni (pGR232, pGR246 i pGR171) u citosolu (a) i jedru (b) hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) Wistar pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine uzorka na gel. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin.

S obzirom na to da fosforilacija GR-a značajno učestvuje u regulaciji translokacije GR-a iz citoplazme u jedro, kao i u regulaciji transkripcione aktivnosti samog GR-a, analiziran je fosforilacioni status GR-a na različitim aminokiselinskim ostacima u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa kod ženki i mužjaka pacova u odgovoru na stres hronične izolacije i tretman fluoksetinom. Analizirane su fosforilacije GR-a na treoninu 171 (pGR171), serinu 232 (pGR232) i serinu 246 (pGR246) (Slika 2 c, d, e, f, g i h). Sama kvantifikacija pGR izoforni rađena je tako što su prvo računati ukupni nivoui pojedinačnih fosfo-izoforni (relativno u odnosu na β -aktin), što je označeno kao pGR171, pGR232 i pGR246. Takođe, računat je i odnos fosfo-GR232/fosfo-GR246 izoforni (pGR232/246) u cilju poređenja promena u fosforilaciji GR-a na ovim epitopima i dominantnosti određene fosfo-forme u oba ćelijska kompartmana (Slika 20 i i j).

U citosolu jedina statistički značajna promena na nivou pGR232 izoforme uočena je kod stresiranih mužjaka, gde je uočeno povećanje u odnosu na kontrolne nestresirane mužjake ($F=4.61$, $p<0.05$) (Slika 20 c). Trofaktorijska ANOVA je pokazala prisustvo polno-specifičnih razlika na nivou pGR232 izoforme pod uticajem stresa (interakcija pol x stres: $F=9.62$, $p<0.05$) (Slika 21 c).



Slika 20. Relativna kvantifikacija nivoa ukupnog GR-a i njegovih fosfo-izoforni (pGR232, pGR246 i pGR171), kao i njihovog odnosa (pGR232/246) u citosolu (a, c, e, g i i) i jedru (b, d, f, h i j) hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja ± SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

U jedru hronični stres je značajno smanjio nivo pGR232 izoforme kod ženki ($F=85.40$, $p<0.05$), dok je kod mužjaka imao suprotan efekat i značajno je povećao nivo ovog proteina ($F=24.27$, $p<0.05$) (Slika 20 d). Tretman fluoksetinom je povećao nivo jedarne pGR232 izoforme kod stresiranih ženki ($F=47.40$, $p<0.05$), dok kod stresiranih mužjaka nije imao uticaja (Slika 21 d). Takođe, i kod kontrolnih životinja fluoksetin je pokazao značajne razlike kod ženki i mužjaka. Naime, kod kontrolnih ženki fluoksetin je smanjio nivo jedarne pGR232 izoforme ($F=2.88$, $p<0.05$), dok je kod kontrolnih mužjaka pokazao trend povećanja, koji ipak nije bio statistički značajan (Slika 20 d). Trofaktorijalna ANOVA je pokazala prisustvo polno-specifičnog efekta stresa i fluoksetina, kao i njihove interakcije na nivo pGR232 izoforme (pol: $F=83.55$, $p <0.05$; interakcija: pol x stres: $F=54.30$, $p <0.05$; interakcija: pol x stres x fluoksetin: $F=20.93$, $p<0.05$) (Slika 20 d).

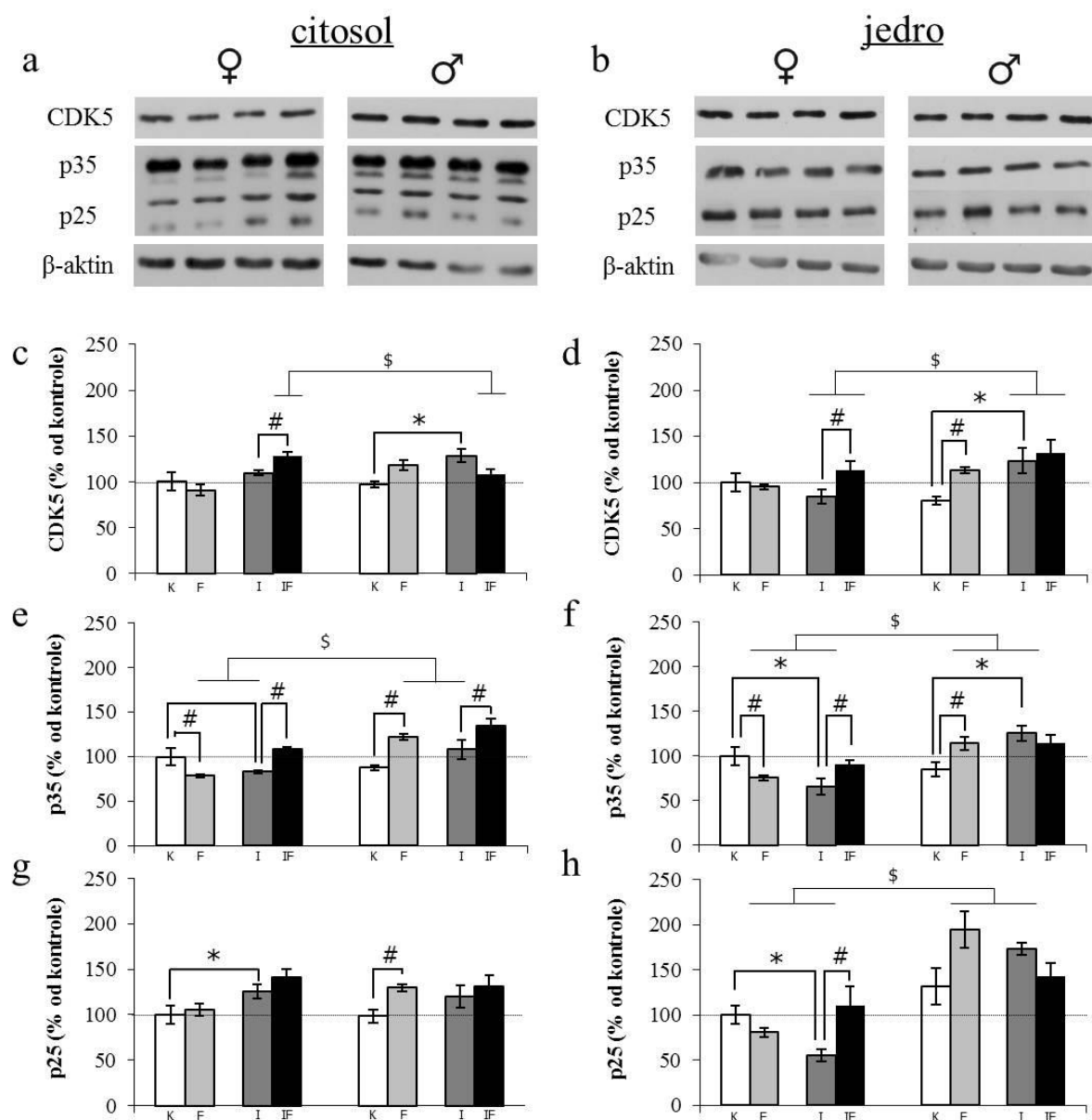
Za razliku od polno-specifičnih promena na nivou pGR232 izoforme, ni stres ni fluoksetin nisu pokazali polni-dimorfizam na nivou pGR246 izoforme ni u citosolu ni u jedru (Slika 20 e i f). Naime, stres je u obe ćelijske frakcije značajno povećao nivo pGR246 izoforme kod oba pola (citosol: ženke $F=65.809$, $p<0.05$, mužjaci $F=3.126$, $p<0.05$; jedro: ženke $F=24.60$, $p<0.05$, mužjaci $F=10.86$, $p<0.05$), dok je naknadni tretman fluoksetinom uspeo da neutrališe efekat stresa i smanji nivo pGR246 kod oba pola u oba ćelijska kompartmana na nivo kontrolnih vrednosti (Slika 20 e i f). Treba napomenuti da je ovo smanjenje kod mužjaka bilo u vidu trenda (ženke citosol: $F=16.33$, $p<0.05$; jedro: $F=13.33$, $p<0.05$) (Slika 20 e i f).

Dalje, analizirali smo uticaj stresa i fluoksetina na nivo još jedne fosfo-GR izoforme, pGR171 (Slika 20 g i h). Naime, ni stres ni fluoksetin nisu pokazali polno-specifičan efekat na nivou pGR171 izoforme ni u citosolu ni u jedru. Stres je povećao nivo pGR171 izoforme u citosolu hipokampusa kod oba pola, s tim što je to povećanje imalo odlike trenda, dok je u jedru imao suprotan efekat i statistički značajno smanjio nivo pGR171 kod oba pola (ženke: $F=9.538$, $p<0.05$, mužjaci $F=7.564$, $p<0.05$) (Slika 20 g i h). Hronični tretman fluoksetinom je uspeo da normalizuje promene izazvane stresom u oba ćelijska kompartmana koja smo ispitali. Naime, u citosolu fluoksetin je smanjio nivo pGR171 kod stresiranih životinja oba pola (ženke $F=30.732$, $p<0.05$; mužjaci $F=15.836$, $p<0.05$), dok je u jedru imao suprotan efekat i povećao nivo pGR171 na nivo kontrola kod oba pola (ženke $F=64.073$, $p<0.05$; mužjaci $F=23.845$, $p<0.05$) (Slika 20 g i h).

Na kraju je računat i odnos pGR232/246 u cilju poređenja promena u fosforilaciji GR-a na ova dva epitopa (Slika 20 i i j). Vrednosti ovog odnosa više od 1 ukazuju na dominantnost nivoa pGR232 izoforme nad pGR246, dok niža od 1 ukazuje na dominantnost pGR246 izoforme. U citosolu i jedru stres je smanjio odnos pGR232/246 kod ženki (citosol: $F=14.3$, $p<0.05$; jedro: $F=3.2$, $p<0.05$), dok kod mužjaka nismo uočili promene ovog odnosa ni u jednom ćelijskom kompartmanu (Slika 20 i i j). Dodatno, hronični tretman fluoksetinom kod stresiranih ženki normalizovao je ovaj odnos tj. povećao je vrednost pGR232/246 odnosa i u citosolu i u jedru (citosol: $F=4.5$, $p<0.05$; jedro: $F=32.46$, $p<0.05$), dok je kod stresiranih mužjaka fluoksetin povećao ovaj odnos samo u jedru ($F=6.15$, $p<0.05$) (Slika 20 i i j). Trofaktorijalna ANOVA je pokazala prisustvo polno-specifičnog efekta stresa, kao i interakcije stresa i tretmana fluoksetina na nivou pGR232/246 odnosa u oba ćelijska kompartmana (citosol interakcija pol x stres: $F=21.05$, $p<0.05$; interakcija pol x stres x fluoksetin: $F=12.04$, $p<0.05$; jedro interakcija pol x stres: $F=13.32$, $p<0.05$; interakcija pol x stres x fluoksetin: $F=23.04$, $p<0.05$) (Slika 20 i i j).

4.4 Efekat fluoksetina na nivo CDK5 kinaze i njenih aktivatora, p35 i p25, u hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

Kako fosforilacija utiče na njegovu ćelijsku distribuciju i menja transkripcionu aktivnost samog receptora, analizirali smo promene u nivou CDK5 i njenih aktivatora, p35 i p25 proteina, koji fosforilišu GR na S232. U oba ispitivana ćelijska kompartmana hipokampusa uočili smo polno-specifične razlike pod uticajem stresa na nivou CDK5 (Slika 21). Naime, stres kod ženki nije menjao nivo ni citosolnog ni jedarnog nivoa CDK5 proteina, dok je kod mužjaka stres značajno povećao nivo CDK5 i u citosolu i u jedru (citosol: $F=5.75$, $p<0.05$; jedro: $F=15.5$, $p<0.05$) (Slika 21 c i d). Kao i stres, i fluoksetin je menjao nivo CDK5 proteina u oba ćelijska kompartmana na polno-specifičan način. Fluoksetin kod kontrolnih, nestresiranih ženki nije menjao nivo CDK5 proteina, dok je kod mužjaka povećao isti samo u jedru ($F=10.8$, $p<0.05$) (Slika 21 c i d). Kod stresiranih životinja, fluoksetin je kod ženki značajno povećao nivo CDK5 i u citosolu i u jedru (citosol: $F=4.36$, $p<0.05$; jedro: $F=13.5$, $p<0.05$), dok kod mužjaka nije menjao nivo iste (Slika 21 c i d). Trofaktorijalna ANOVA je pokazala da fluoksetin ostvaruje polno-specifičan efekat na nivo CDK5 u citosolu i jedru hipokampusa stresiranih životinja (citosol interakcija pol x stres x fluoksetin: $F=25.13$, $p<0.05$) (Slika 21 c i d).



Slika 21. Reprezentativni Western blotovi (a, b) i relativna kvantifikacija nivoa CDK5 kinaze i njenih aktivatora, p35 i p25, u citosolu (c, e, i g) i jedru (d, f, i h) hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) Wistar pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

Na nivou p35 proteina u oba ispitivana ćelijska kompartmana hipokampusa uočili smo polno-specifične promene pod uticajem stresa i fluoksetina kod kontrola (Slika 21 e i f). Kod kontrolnih nestresiranih ženki sam fluoksetin je snizio nivo p35 proteina i u citosolu i u jedru (citosol: $F=6.42$; $p<0.05$; jedro: $F=7.42$; $p<0.05$), dok je kod kontrolnih mužjaka imao suprotan efekat i povećao iste (citosol: $F=10.9$; $p<0.05$; jedro: $F=5.9$; $p<0.05$) (Slika 21 e i f). Dalje, stres je kod ženki značajno smanjio nivo p35 proteina u oba ćelijska kompartmana (citosol: $F=3.18$, $p<0.05$; jedro: $F=4.7$, $p<0.05$), dok je kod mužjaka imao suprotan efekat i povećao nivo p35, iako je ovo povećanje bilo značajno samo u jedru; u citosolu je bilo na nivou trenda ($F=14.92$, $p<0.05$) (Slika 21 e i f). Tretman fluoksetinom kod stresiranih životinja nije pokazao polno-specifičan efekat, iako postoje određene razlike. Naime, kod stresiranih ženki fluoksetin je povećao nivo p35 proteina u oba kompartmana u odnosu na stresirane kontrolne ženke (citosol: $F=88.54$, $p<0.05$; jedro: $F=29.97$, $p<0.05$). Kod stresiranih mužjaka fluoksetin je povećao nivo p35 proteina samo u citosolu ($F=2.13$, $p<0.05$) (Slika 21 e i f).

Na nivou p25 proteina, stres i fluoksetin su doveli do sličnih promena kao na nivou p35 proteina u oba ćelijska kompartmana (Slika 21 g i h). Tretman fluoksetinom kod kontrolnih nestresiranih životinja nije imao polno-specifičan efekat, ali je pokazao određene razlike. Naime, dok kod kontrolnih ženki fluoksetin nije imao efekta ni u citosolu ni u jedru, kod mužjaka je povećao nivo p25 proteina u oba kompartmana, s tim da je statistički značajno povećanje bilo samo u citosolu ($F=6.15$, $p<0.05$) (Slika 21 g i h). Dalje, stres je pokazao polno-specifičan efekat samo u jedru (interakcija pol x stres: $F=20.1$, $p<0.05$). Naime, kod ženki u citosolu stres je povećao nivo p25 proteina ($F=23.72$, $p<0.05$), dok je u jedru značajno smanjio nivo ovog proteina ($F=16.67$, $p<0.05$) (Slika 21 g i h). Za razliku od ženki, kod mužjaka stres nije imao efekta na nivou p25 proteina. Što se tiče efekta fluoksetina, kod stresiranih životinja nisu uočene polno-specifične razlike. Kod stresiranih ženki fluoksetin je značajno povećao nivo p25 proteina u jedru ($F=43.25$, $p<0.05$), dok u citosolu nije bilo efekta. Kod stresiranih mužjaka iako je uočen pad u nivou p25, on nije bio statistički značajan (Slika 21 g i h).

4.5 Efekat fluoksetina na MAPK i njihovu fosforilaciju u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

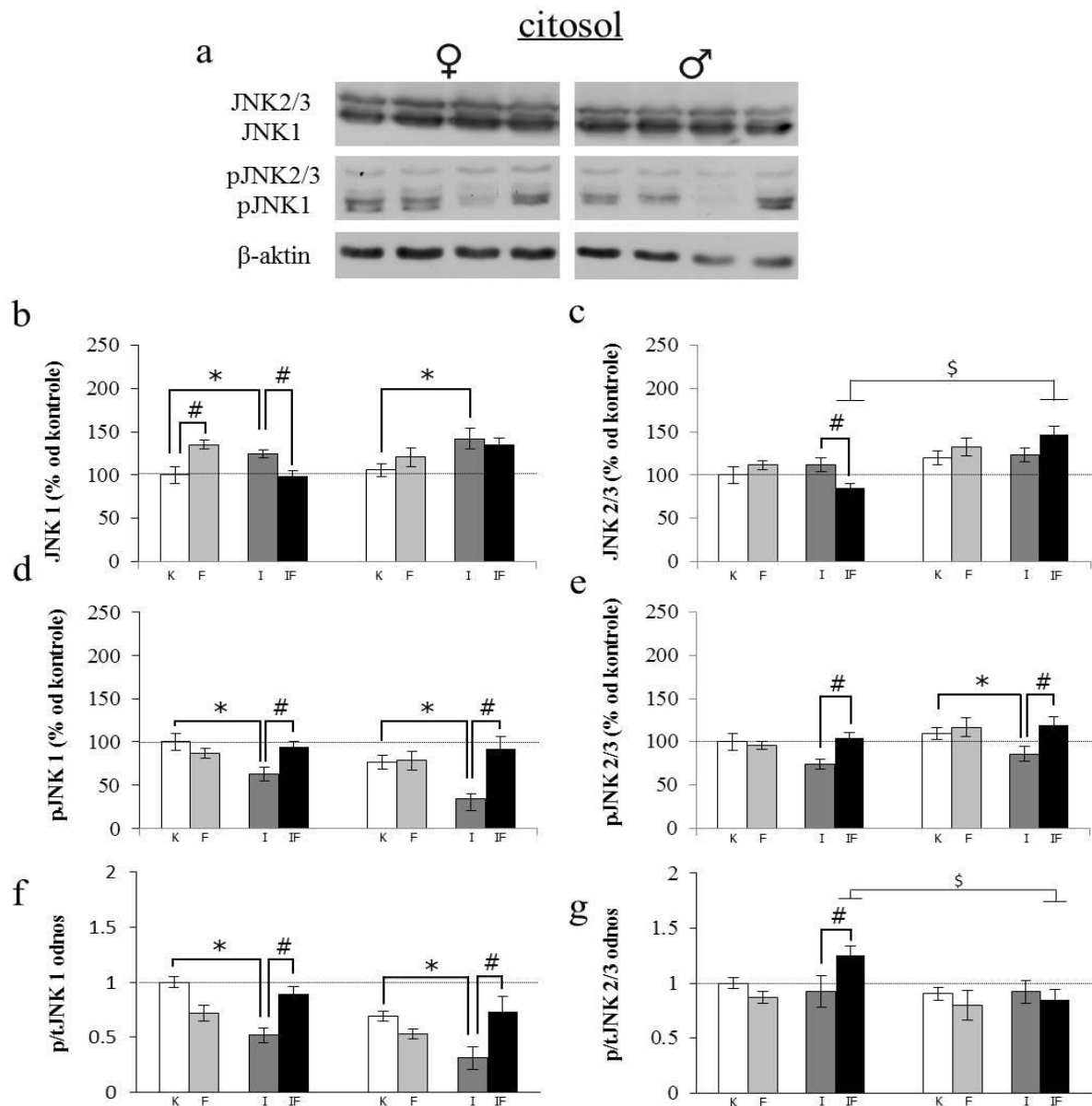
S obzirom da je poznato da su za fosforilaciju GR-a odgovorne i MAPK, u daljim eksperimentima analiziran je ukupan nivo i nivo fosfo-formi ovih kinaza u citosolu i jedru hipokampusa ženki i mužjaka izlaganih hroničnom stresu izolacije i tretiranih fluoksetinom.

4.5.1 Efekat fluoksetina na JNK1/2/3 i njihovu fosforilaciju, pJNK1/2/3, u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

S obzirom na to da je pokazano da JNK1/2/3 fosforilišu GR na S246 (Adzic i sar., 2009, Krstic i sar., 1997; Rogatsky i sar., 1998) u daljim eksperimentima analiziran je ukupni nivo i nivo fosforilisane JNK1/2/3 kinaze (na Thr183 i Tyr185) u citosolu i jedru hipokampusa kontrolnih i stresiranih životinja oba pola tretiranih fluoksetinom.

Stres je u citosolu povećao nivo ukupne JNK1 kinaze kod oba pola (ženke: $F=5.563$, mužjaci: $F=6.982$, $p<0.05$) (Slika 22 b), dok na nivou JNK2/3 izoformi nisu uočene promene ni kod jednog pola (Slika 22 c). Dalje, u citosolu stres je i kod ženki i kod mužjaka značajno smanjio nivoe sve tri pJNK1/2/3 izoforme (ženke: $F=12.691$, $p<0.05$; mužjaci: $F=12.690$, $F=6.593$, $p<0.05$); ovo smanjenje za pJNK2/3 kod ženki je bilo u vidu trenda (Slika 22 d i e). Relativni odnos p/tJNK1 (p/tJNK koji ilustruje aktivnost JNK1 kinaze) značajno je smanjen i kod ženki i kod mužjaka pod uticajem stresa (ženke: $F=17.642$, $p<0.05$; mužjaci: $F=14.374$, $p<0.05$), što ukazuje na smanjenje aktivnosti JNK 1 izoforme u citosolu hipokampusa životinja oba pola u odgovoru na hroničan stress (Slika 22 f i g).

Tretman fluoksetinom kod kontrolnih životinja nije imao značajan efekat na nivou citosolnih JNK kinaza, osim kod ženki na nivou JNK1 izoforme koju je povećao ($F=11.794$, $p<0,05$) (Slika 22 b). Kod stresiranih ženki fluoksetin je smanjio nivoe sve tri citosolne JNK1/2/3 izoforme ($F=53.816$, $F=16.292$, $p<0.05$), dok kod mužjaka nije imao efekta (Slika 22 b i c). Na nivou pJNK izoformi, fluoksetin je kod stresiranih životinja oba pola povećao nivo sve tri citosolne pJNK1/2/3 izoforme (ženke: $F=16.046$, $F=4.449$, $p<0.05$; mužjaci: $F=7.904$, $F=4.449$, $p<0.05$) (Slika 22 d i e). Na kraju, fluoksetin je normalizovao p/tJNK1 odnos u citosolu kod stresiranih životinja oba pola i tako neutrališe efekat stresa na aktivnost JNK1 kinaze, kao i da povećá aktivnost JNK2/3 kinaze kod stresiranih ženki (Slika 22 f i g).

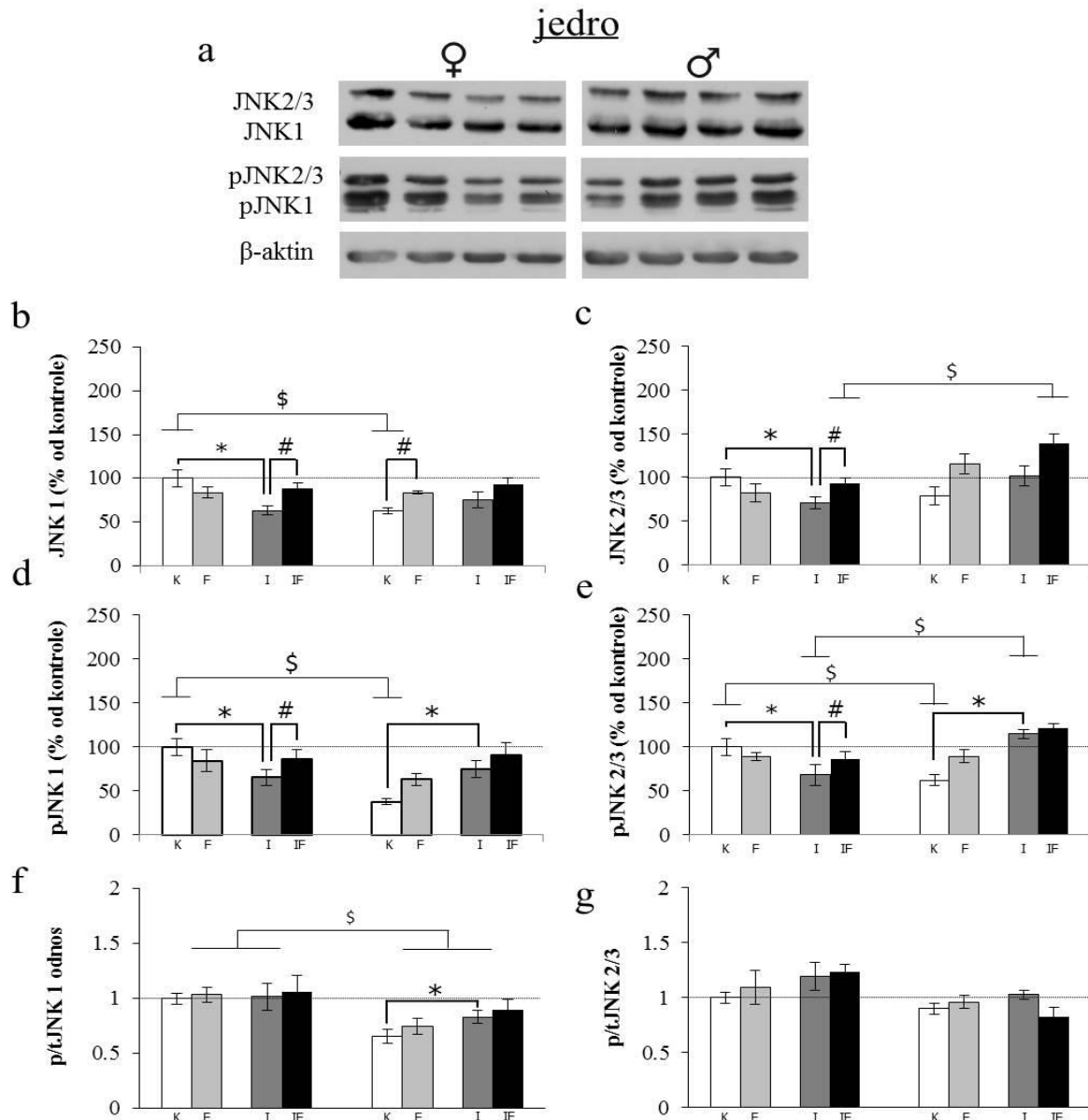


Slika 22. Reprezentativni Western blotovi (a) i relativna kvantifikacija nivoa JNK1/2/3 kinaza i njenih fosfo-formi, pJNK1/2/3 (b, c, d, i e), kao i njihovog odnosa (f i g) u citosolu hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

Trofaktorijalna ANOVA je pokazala polno-specifične razlike na nivou JNK2/3 kinaza kod stresiranih životinja nakon tretmana fluoksetinom koje se vide i na p/tJNK2/3 odnosu (interakcija pol x stres x fluoksetin: $F=18.632$, $F=23.577$, $p<0.05$) (Slika 22 c i g).

U jedru, stres je značajno smanjio ukupne nivoe sve tri JNK1/2/3 izoforme kod ženki ($F=13.5$, $F=11.8$, $p<0.05$), dok kod mužjaka nije imao efekta (Slike 23 b i c). Na nivou fosfo-formi, stres je kod ženki isto smanjio nivo sve tri pJNK1/2/3 izoforme u jedru ($F=8.726$, $F=7.557$, $p<0.05$), dok je kod mužjaka imao suprotan efekat i povećao ih ($F=16.068$, $F=14.568$, $p<0.05$) (Slika 23 d i e). Što se tiče aktivnosti kinaza, jedina značajna promena u odgovoru na stres je uočena u aktivnosti JNK1 kinaze kod mužjaka, koju je stres povećao ($F=6.987$, $p<0.05$) (Slika 23 f). Trofaktorijalna ANOVA je pokazala polno-specifičan efekat stresa na nivou jedarnih pJNK 2/3 formi, kao i p/tJNK1 odnosa (interakcija pol x stres: $F=22.647$, $F=20.457$, $p<0.05$) (Slika 23 e i f).

Tretman fluoksetinom kod kontrolnih životinja je imao značajan efekat samo kod mužjaka na nivou JNK1 kinaze u jedru koju je povećao ($F=12.765$, $p<0.05$) (Slika 23 b). Kod stresiranih životinja fluoksetin je pokazao značajno veće efekte na nivou ovih kinaza. Naime, kod stresiranih ženki fluoksetin je povećao nivo sve tri JNK1/2/3 kinaze u jedru ($F=12.6$, $F=6.6$, $p<0.05$), dok kod mužjaka nije imao efekta (Slika 23 b i c). Na nivou fosfo-formi fluoksetin je povećao i normalizovao nivo sve tri pJNK2/3 izoforme kod stresiranih ženki ($F=12.6$, $F=6.6$, $p<0.05$), dok kod mužjaka nije imao efekta (Slika 23 d i e). U jedru fluoksetin nije imao značajne efekte na p/tJNK odnose kod stresiranih životinja. Trofaktorijalna ANOVA je pokazala polno-specifične razlike u tretmanu fluoksetinom kod stresiranih životinja samo na nivou JNK2/3 u jedru (interakcija pol x stres x fluoksetin: $F=24.678$, $p<0.05$) (Slika 23 c). Interesantno je napomenuti da su početni nivoi svih jedarnih JNK1/2/3 kinaza, kao i njihovih pJNK1/2/3 izoformi, bili značajno viši kod ženki nego kod mužjaka.



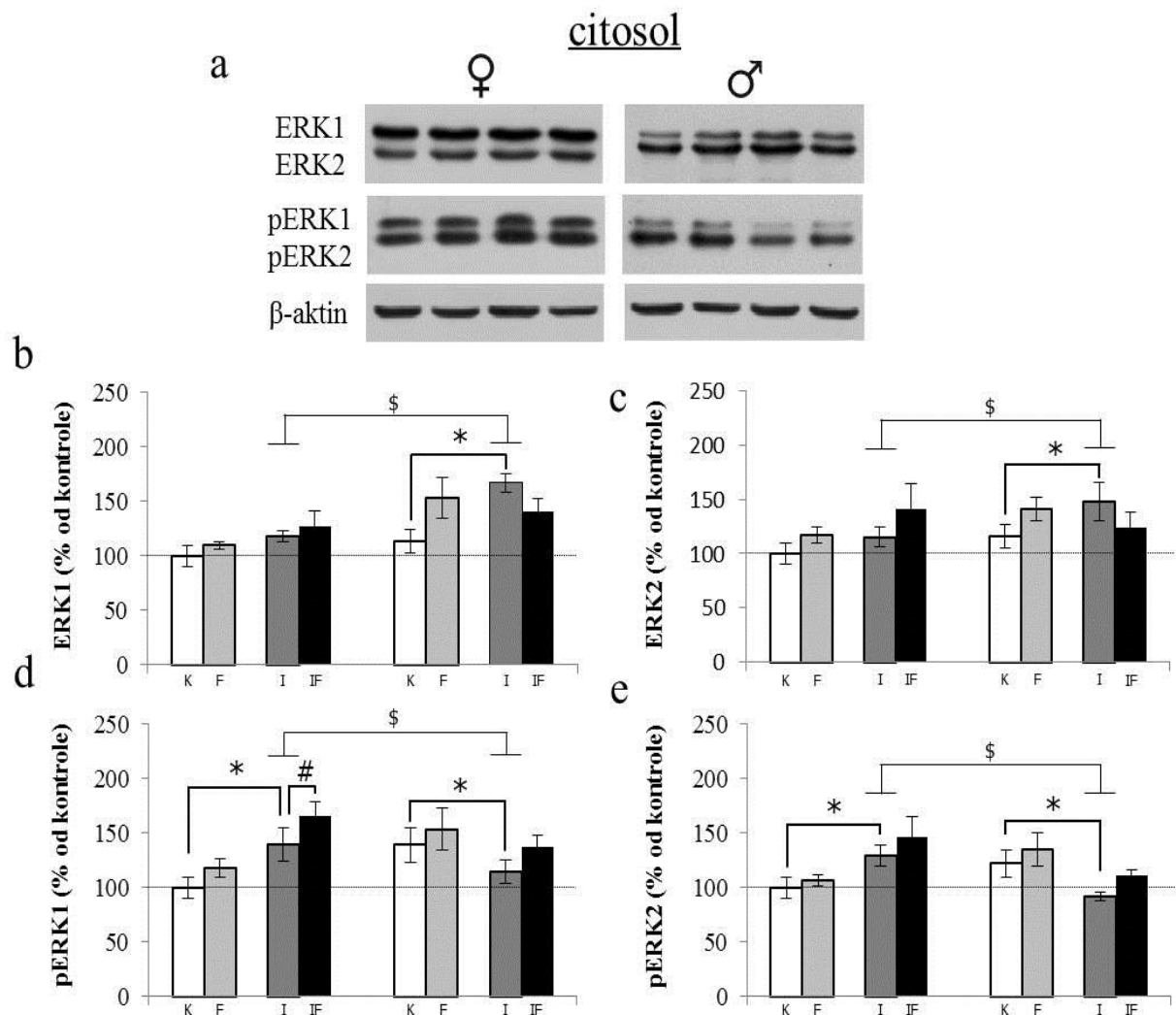
Slika 23. Reprezentativni Western blotovi (a) i relativna kvantifikacija nivoa JNK1/2/3 kinaza i njenih fosfo-formi, pJNK1/2/3 (b, c, d, i e), kao i njihovog odnosa (f i g) u jedru hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

4.5.2 Efekat fluoksetina na ERK1/2 i njihovu fosforilaciju, pERK1/2, u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

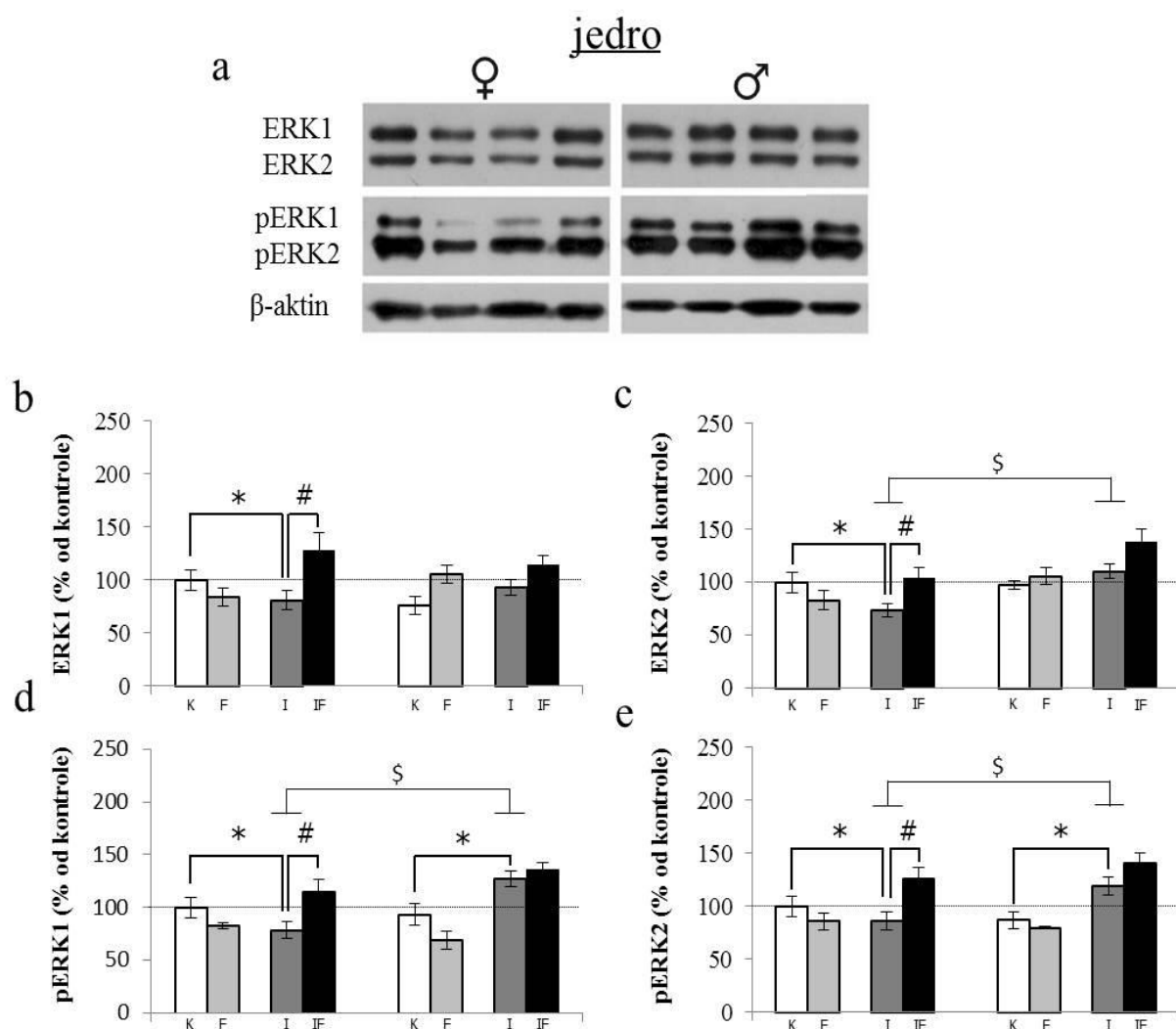
Kod ženki stres u citosolu nije imao nikakav efekat, dok je kod mužjaka značajno povećao nivo obe ERK ($F=8.250$, $F=13.800$, $p<0.05$) (Slika 24 b i c). Dalje, stres je kod ženki povećao nivo obe citosolne pERK1/2 forme ($F=11.67$, $F=22.31$, $p<0.05$), dok je kod mužjaka imao suprotan efekat i smanjio ih ($F=13.720$, $F=14.130$, $p<0.05$) (Slika 24 d i e). Tretman fluoksetinom nije imao značajan efekat na nivou ukupnih ERK1/2 formi u citosolu ni kod kontrolnih, ni kod stresiranih životinja oba pola (Slika 24 b i c). Na nivou pERK jedina značajnost uočena je kod stresiranih ženki gde je fluoksetin povećao nivo pERK1 izoforme ($F=21.233$, $p<0.05$) (Slika 24 d). Trofaktorijalna ANOVA pokazala je polno-specifične razlike u citosolu u odgovoru na stres, na nivo obe ERK1/2 i obe pERK1/2 izoforme (interakcija pol x stres: $F=3.621$, $F=3.542$; $p<0.05$) (Slika 24 b, c, d i e).

U jedru, stres je smanjio nivo ukupne ERK1/2 kinaze kod ženki ($F=6.151$, $F=8.120$, $p<0.05$), dok kod mužjaka nije imao efekta (Slika 25 b i c). Na nivou fosfo-formi, stres je smanjio nivo jedarnih pERK1/2 formi kod ženki ($F=4.171$, $F=4.852$, $p<0.05$), dok je kod mužjaka imao suprotan efekat i povećao iste ($F=13.720$, $F=14.130$, $p<0.05$) (Slika 25 d i e). Što se tiče fluoksetina, on nije imao efekta na nivo ERK1/2 kinaza, kao ni njihovih fosfo-formi, pERK1/2, u jedru kod kontrolnih životinja oba pola (Slika 25). Kod stresiranih životinja fluoksetin je pokazao značajne efekte u jedru samo kod ženki i uspeo da poveća nivo obe ERK1/2 kinaze ($F=17.681$, $F=12.676$, $p<0.05$), kao i njihovih fosfo-formi, pERK1/2 ($F=16.722$, $F=13.071$, $p<0.05$) (Slika 25). Trofaktorijalna ANOVA pokazala je polno-specifične razlike u jedru u odgovoru na stres na nivou ERK2 kao i obe pERK1/2 izoforme (interakcija pol x stres: $F=2.121$, $F=3.923$, $p<0.05$) (Slika 24 b, c, d i e).

Sve ukupno, promene u odgovoru na stres kod ženki ukazuju na smanjenu translokaciju pERK1/2 izoformi u jedro odnosno zadržavanje istih u citosolu, dok smo kod mužjaka primetili suprotan efekat i povećanu translokaciju pERK1/2 u jedro. Dalje promene na nivo ERK1/2 kao i njenih fosfo-formi, pERK1/2, u obe ćelijske frakcije ukazuju da hronični tretman fluoksetinom naglašava i pojačava ERK signalizaciju u jedru u hipokampusu stresiranih ženki.



Slika 24. Reprezentativni Western blotovi (a) i relativna kvantifikacija nivoa ERK1/2 kinaza i njenih fosfo-formi, pERK1/2, u citosolu (b, c, d, e) hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).



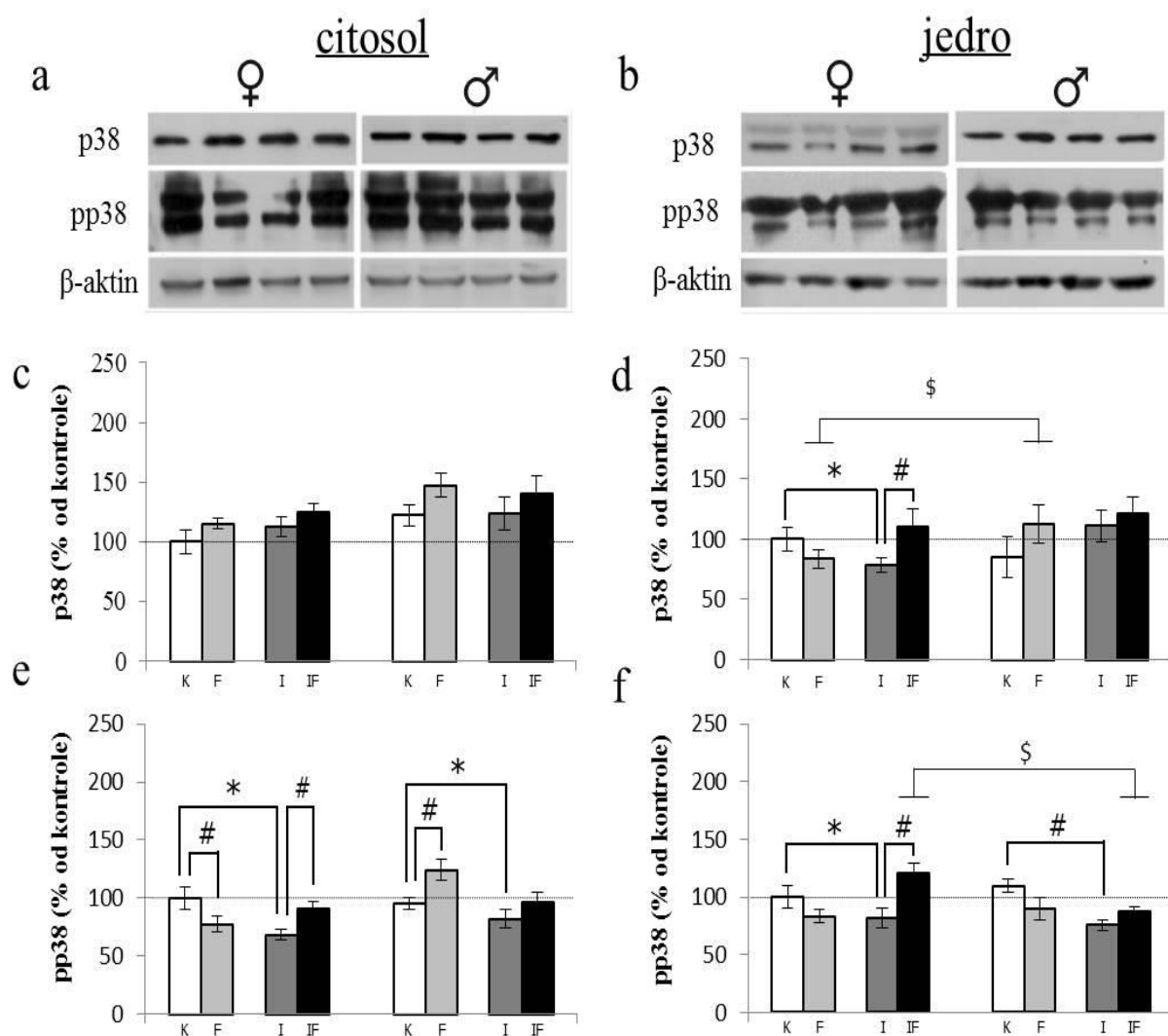
Slika 25. Reprezentativni Western blotovi (a) i relativna kvantifikacija nivoa ERK1/2 kinaza i njenih fosfo-formi, pERK1/2, u jedru (b, c, d, e) hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja ± SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, § ženke vs mužjaci).

4.5.3 Efekat fluoksetina na p38 i njegovu fosforilaciju, pp38, u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

Na nivou p38 proteina u citosolu stres nije imao efekta ni kod ženki ni kod mužjaka (Slika 26 c), dok je u jedru kod ženki značajno smanjio nivo p38 kinaze ($F=4.654$, $p<0.05$) (Slika 26 d). Na nivou pp38, stres smanjio nivo ove fosfo-forme u u obe ćelijske frakcije kod oba pola (ženke: citosol $F=6.751$, $p<0.05$, jedro $F=4.142$, $p<0.05$; mužjaci: citosol $F=11.817$, $p<0.05$, jedro $F=8.900$, $p<0.05$) (Fig 26 e i f). Sve zajedno, naši rezultati ukazuju da je stres smanjio p38 signalizaciju i u citosolu i u jedru kod oba pola. Trofaktorijalna ANOVA nije pokazala prisustvo polno-specifičnih razlika na nivou p38 i pp38 proteina kod stresiranih životinja.

Tretman fluoksetinom kod kontrolnih životinja nije imao efekta na nivou p38 kinaze u oba ćelijska kompartmana kod oba pola (Slika 26 c i d). Na nivou pp38 fluoksetin je smanjio samo nivo pp38 u citosolu kod kontrolnih ženki ($F=3.810$, $p<0.05$), dok je kod mužjaka povećao isti ($F=9.102$, $p<0.05$) (Slika 26 e). Kod stresiranih ženki fluoksetin je povećao nivo jedarne p38 kinaze ($F=17.455$, $p<0.05$) (Slika 26 d), kao i nivo pp38 u obe ćelijske frakcije (citosol $F=46.500$, $p<0.05$; jedro $F=25.522$, $p<0.05$) (Slika 26 e i f). Kod stresiranih mužjaka fluoksetin nije imao značajne efekte ni na nivo p38 proteina ni na nivo pp38 izoforme u oba ćelijska kompartmana (Slika 26).

Naši rezultati ukazuju da tretman fluoksetinom povećava aktivaciju p38 kinaze kod stresiranih ženki, dok kod mužjaka nema efekta. Trofaktorijalna ANOVA pokazala je prisustvo polno-specifičnog efekta jedino na nivou p38 proteina u tretmanu fluoksetinom u jedru hipokampusa stresiranih životinja (interakcija pol x stres x fluoksetin: $F=25.273$, $p<0.05$) (Slika 26).



Slika 26. Reprezentativni Western blotovi (a) i relativna kvantifikacija nivoa p38 kinaze i njene fosfo-forme, pp38, u citosolu (c i e) i jedru (d i f) hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

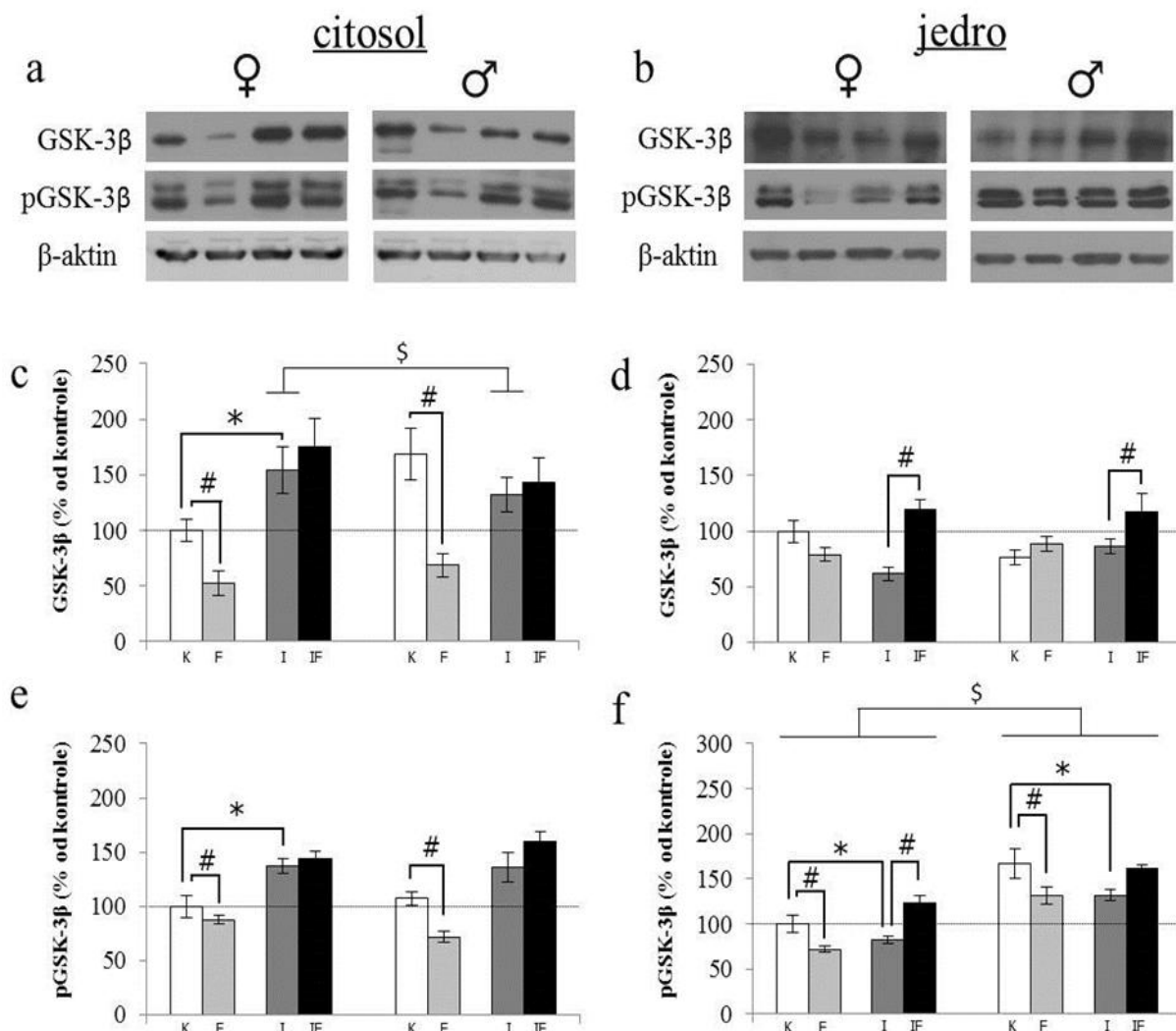
4.6 Efekat fluoksetina na GSK-3 β i njenu fosforilaciju, pGSK-3 β , u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

S obzirom na to da je ranije pokazano da GSK-3 β kinaza fosforiliše GR na T171 kod pacova (pGR171) i da ova fosforilacija takođe utiče na transkripcionu aktivnost GR-a, analizirali smo nivoe ukupne GSK-3 β kinaze - kao i njegove fosfo-forme, pGSK-3 β , na S9 aminokiselinskom ostatku koja predstavlja njegovu inhibitornu fosforilaciju, u citosolu i jedru u hipokampusu kontrolnih i stresiranih životinja oba pola tretiranih fluoksetinom (Slika 28 c, d, e i f).

Kod ženki, u citosolu stres je značajno povećao nivoe GSK-3 β i pGSK-3 β , dok je u jedru imao suprotan efekat i smanjio njihove nivoe (Slika 28 c i e). Za razliku od ženki, kod mužjaka stres u citosolu hipokampusa nije doveo do značajnih promena ni na nivou GSK-3 β ni na nivou pGSK-3 β (Slika 28 c i e), dok je u jedru jedina značajna promena uočena na nivou pGSK3 β kinaze koja je bila smanjena (Slika 28 f). Trofaktorijalna ANOVA pokazala je prisustvo polno-specifičnih razlika u citosolu stresiranih životinja na nivou GSK-3 β proteina pod uticajem stresa (interakcija pol x stres: $F=23.147$, $p<0.05$) (Slika 28 c).

Fluoksetin je kod kontrolnih životinja oba pola imao isti efekat u oba ćelijska kompartmana, gde je značajno smanjio nivoe i GSK-3 β i pGSK-3 β (ženke citosol: GSK-3 β , $F=11.212$, $p<0.05$, pGSK-3 β , $F=5.234$, $p<0.05$; jedro GSK-3 β , $F=11.46$, $p<0.05$, pGSK-3 β , $F=4.353$, $p<0.05$) (mužjaci citosol: GSK-3 β , $F=32.212$, $p<0.05$, pGSK-3 β , $F=6.352$, $p<0.05$; jedro pGSK-3 β , $F=5.683$, $p<0.05$) (Slika 28 c, d, e i f). Jedino nije bilo promena na nivou GSK-3 β proteina u jedru kod kontrolnih mužjaka (Slika 28 d i f). Dalje, kod stresiranih životinja, fluoksetin je doveo do značajnih promena na nivou ovih kinaza isključivo u jedru (Slika 28 d i f), dok u citosolu nije bilo nikakvog efekta kod oba pola (Slika 28 c i e). U jedarnoj frakciji hipokampusa kod stresiranih životinja oba pola fluoksetin je povećao nivoe GSK-3 β i pGSK-3 β (ženke GSK-3 β , $F=26.489$, $p<0.05$, pGSK-3 β , $F=62.910$, $p<0.05$; mužjaci GSK-3 β , $F=15.674$, $p<0.05$, pGSK-3 β trend) (Slika 28 d i f). Iako su promene pod uticajem fluoksetina i kod kontrolnih i stresiranih životinja u citosolu u velikoj meri bile istosmerne kod oba pola, trofaktorijalna ANOVA ipak je pokazala prisustvo polno-specifičnih razlika na nivou pGSK-3 β u jedru (interakcija pol x stres: $F=25.853$, $p<0.05$; pol x fluoksetin: $F=21.479$, $p<0.05$; pol x stress x fluoksetin: $F=17.048$, $p<0.05$) (Slika 28 f). Naime,

hipokampalni nivoi pGSK-3 β kinaze u jedrnoj frakciji kod ženki u svim eksperimentalnim grupama su bili značajno niži u odnosu na pripadajuće grupe kod mužjaka (Slika 28 f).

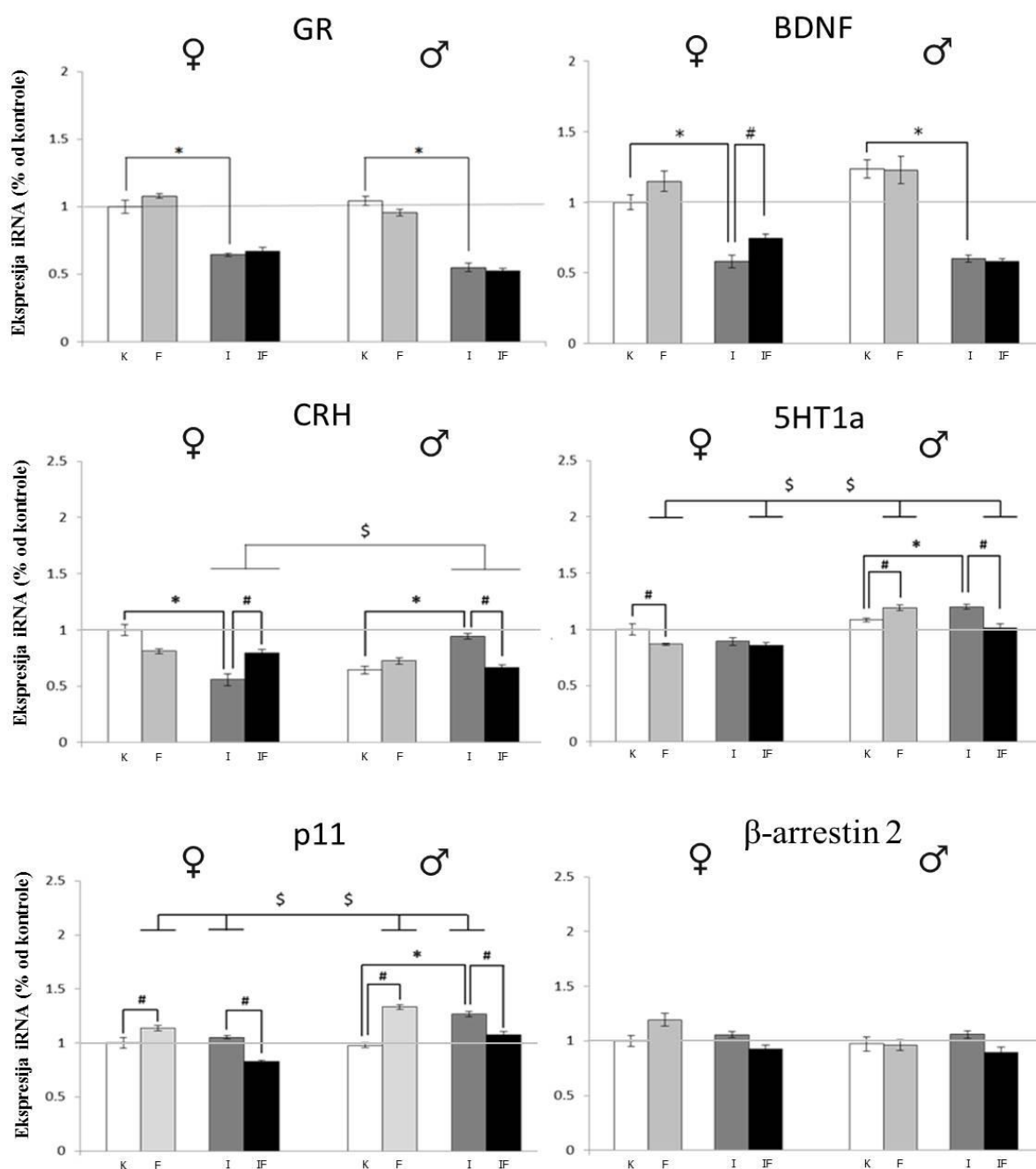


Slika 27. Relativni nivoi GSK-3 β kinaze i njene fosfo-forme, pGSK-3 β , u citosolu i jedru hipokampusa kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) Wistar pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem. Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, § ženke vs mužjaci).

4.7 Efekat fluoksetina na ekspresiju gena za GR, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β -arrestin 2 u hipokampusu ženki i mužjaka pacova izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije

Uloga fosforilisanog GR-a u regulaciji genske ekspresije praćena je merenjem nivoa iRNK-a gena koji su regulisani GR-om: gen za sam GR i geni za CRH, BDNF, 5HT1a, p11 i β -arrestin 2. Izabrani geni su uključeni u regulaciju stresom indukovanih aktivnosti CNS-a i predstavljaju potencijalne mete antidepressiva. Poznato je da GR-a reguliše aktivnost HPA ose, a CRH i BDNF su uključeni u proces učenja, kao i u procese formiranja memorije i regulaciju sinaptičke plastičnosti u hipokampusu (Givalois i sar., 2000, Marmigere i sar., 2003). 5HT1a i p11 geni uključeni u regulaciju serotoninske transmisije i HPA ose, dok β -arrestin 2 pored regulacije hipokampalne neurogeneze učestvuje i u regulaciji HPA ose.

Kod ženki izloženih hroničnoj izolaciji nađena je smanjena ekspresija gena za GR, BDNF i CRH (GR: $F=1423.800$; $p<0.05$; BDNF: $F=116.451$, $p<0.05$; CRH: $F=59.273$, $p<0.05$), dok kod gena za 5HT1a, p11 i β -arrestin 2 nisu uočene značajne promene u odnosu na kontrolne nestresirane životinje. Kod mužjaka stres je isto kao i kod ženki doveo do smanjenja ekspresije gena za GR i BDNF u odnosu na kontrole (GR: $F=367.723$; $p<0.05$; BDNF: $F=155.800$, $p<0.05$), dok je sa druge strane doveo do povećanja ekspresija gena za CRH, 5HT1a i p11 (CRH: $F=24.085$; $p<0.05$; 5HT1a: $F=15.537$, $p<0.05$; p11: $F=12.578$, $p<0.05$). Isto kao i kod ženki nisu uočene promene na nivou ekspresije gena za β -arrestin 2 kod stresiranih mužjaka. Trofaktorijalna ANOVA je pokazala prisustvo polno-specifičnih razlika na nivou CRH i p11 iRNA pod uticajem hroničnog stresa (interakcija pol x stres: CRH $F=32.579$, $p<0.05$; p11: $F=12.265$, $p<0.05$). Kod kontrolnih životinja fluoksetin je pokazao polno-specifičan efekat na nivou ekspresije gena za 5HT1a i p11. Naime kod kontrolnih ženki fluoksetin je smanjio nivo iRNA za 5HT1a gen ($F=15.708$, $p<0.05$), dok je kod mužjaka imao suprotan efekat i povećao njegovu ekspresiju ($F=13.635$, $p<0.05$). Sa druge strane iako je fluoksetin povećao nivoe iRNA za p11 gen kod oba pola (ženke: $F=8.820$; mužjaci $F=4.029$; $p<0.05$), ovaj porast je znatno bio viši kod mužjaka. Trofaktorijalna ANOVA je dala sledeće vrednosti na nivou iRNA za 5HT1a i p11 gene (interakcija pol x fluoksetin: 5HT1a: $F=4.34$, $p<0.05$; p11: $F=9.562$, $p<0.05$).



Slika 28. Analiza ekspresije gena za GR i GR-regulisane gene, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β -arrestin 2 u hipokampusu kontrolnih i stresiranih ženki (♀) i mužjaka (♂) pacova tretiranih rastvaračem i fluoksetinom. Grupe: K – kontrolne nestresirane životinje + rastvarač; F – nestresirane životinje + fluoksetin; I – stresirane životinje + rastvarač; IF – stresirane životinje + fluoksetin. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na kontrolne nestresirane ženke tretirane rastvaračem predstavljene kao vrednost 1 (100%). Podaci na grafiku su prikazani kao srednja vrednost merenja \pm SEM. Sve statistički značajne razlike su predstavljene kao $p < 0.05$ (*vs stres, # vs fluoksetin, \$ ženke vs mužjaci).

Kod stresiranih životinja fluoksetin je pokazao polno-specifičan efekat na nivou iRNA za BDNF, CRH i 5HT1a gene. Kod ženki izloženih hroničnoj izolaciji fluoksetin je povećao ekspresiju BDNF i CRH gena (BDNF: $F=16.100$, $p<0.05$; CRH: $F=60.031$, $p<0.05$), smanjio ekspresiju p11 gena ($F=72.84$, $p<0.05$) i nije imao efekta na nivou iRNA za GR, 5HT1a i β -arrestin 2 gen. Kod stresiranih mužjaka fluoksetin je smanjio ekspresiju gena za CRH, 5 HT1a i p11 (CRH: $F=52.133$, $p<0.05$; 5HT1a: $F=28.613$, $p<0.05$; p11: $F=45.896$, $p<0.05$), dok nije imao efekta na nivou iRNA za GR, BDNF i β -arrestin 2 gena. Trofaktorijalna ANOVA je dala sledeće vrednosti na nivou iRNA za BDNF, CRH i 5HT1a gene (interakcija pol x stres x fluoksetin: BDNF: $F=24.963$, $p<0.05$; CRH: $F=25.364$, $p<0.05$; 5HT1a: $F=18.260$, $p<0.05$).

5. Diskusija

Gotovo neverovatno zvuči činjenica da je najveći broj glavnih simptoma depresije opisan još u drevnim vremenima, a da je tek sredinom XIX veka mozak postao centralna tačka istraživanja i razumevanja patofiziologije ove bolesti. Tokom proteklih nekoliko decenija načinjen je značajan napredak u razumevanju biološke osnove depresije, ali još uvek postoji veliki broj pitanja koja se odnose na relativne uloge specifičnih bioloških sistema koji mogu biti uključeni u patogenezu ove bolesti. Do sada je jasno pokazano da hronični stres igra važnu ulogu u etiologiji depresije i drugim afektivnim poremećajima uzrokovanih stresom (Goel i Bale, 2009; Oitzl i sar., 2010), dok pitanje polnog dimorfizma u odgovoru na stres i polno-specifične terapije antidepresivima privlače sve veću pažnju poslednjih godina, s obzirom na to da su žene podložnije razvoju depresije (Alonso i sar., 2004; Kessler, 2003; Young i Korszun, 2010).

Uspešna adaptacija na stres podrazumeva zajedničku akciju hormona SAM sistema i HPA ose na nekoliko nivoa u CNS-u, između ostalog i hipokampusa, dela limbičkog mozga koji je najosetljiviji na stres (McEwen, 2005). Upravo kao jedan od najkonzistentnijih nalaza kod depresivnih pacijenata javlja se narušena funkcija HPA ose koja je, bar delimično, posredovana narušenom signalizacijom preko GR-a. Imajući u vidu gore navedeno, kao i važnost fosforilacije za funkciju GR, sasvim je logično da se GR pokazao kao jedna od glavnih meta novih antidepresivnih lekova (Anacker i sar., 2011; Calfa i sar., 2003; Miller i sar., 2005; Orti i sar., 1989).

Imajući u vidu gore navedeno, kao i važnost fosforilacije za funkciju GR-a i rezultate prethodno dobijene u našoj laboratoriji koji pokazuju da izmenjena fosforilacija GR-a u hipokampusu doprinosi narušenoj regulaciji HPA ose tokom hronične socijalne izolacije kod pacova (Adzic i sar., 2009b), u ovoj doktorskoj disertaciji istraživan je potencijalni polno-specifični efekat hroničnog tretmana fluoksetina, SSRI antidepresiva, na promene u ponašanju životinja, nivo KORT-a, signalizaciju GR-a i njegove fosforilacije posredovane ushodnim kinazama u hipokampusu pacova izlaganih hroničnom stresoru socijalne izolacije. Takođe, analizirana je i transkripciona aktivnost GR merenjem ekspresije GR-regulisanih gena u hipokampusu: GR, BDNF, CRH, 5HT1a, p11 i β -arestin 2 u datim eksperimentalnim uslovima.

5.1 Efekat fluoksetina na ponašanje nalik depresivnom kod pacova oba pola u modelu hronične socijalne izolacije

Biheviorizam je pristup u psihologiji koji se temelji na činjenici da je ponašanje vredno naučnog istraživanja i pretpostavlja da se naučne metode mogu primenjivati na ponašanja koja se mogu opažati i meriti. Bihevioristi smatraju da je posmatranje ponašanja najpouzdaniji oblik istraživanja psiholoških i mentalnih procesa i da ponašanje odslikava stanje nervnog sistema. Upotreba životinjskih modela u eksperimentalne svrhe predstavlja značajan korak u razvoju nauke. Cilj analize ponašanja laboratorijskih životinja je da doprinese razumevanju molekularne signalizacije koja se nalazi u osnovi ponašanja i kako promene u signalizaciji utiču na promene u ponašanju.

Rezultati dobijeni u FST-u u ovoj studiji potvrdili su prethodno dobijene rezultate u našoj laboratoriji, ukazujući da tronedeljna hronična socijalna izolacija povećava ponašanje nalik depresivnom kod mužjaka (Djordjevic i sar., 2009b) (Slika 17). Dalje, tretman fluoksetinom je normalizivao vreme imobilnosti kod stresiranih mužjaka, što je, takođe, u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima (Becker i sar., 2008; Rygula i sar., 2008). Nasuprot mužjacima, kod ženki je stres imao suprotan efekat i značajno smanjio vreme imobilnosti. Moguće objašnjenje za smanjenu imobilnost, odnosno povećanu aktivnost, kod stresiranih ženki se može naći u činjenici da ženke u stresu imaju značajno povećan nivo prolaktina koji može smanjiti, odnosno, poboljšati odgovor na stres koji smo uočili u FST-u (Herzog i sar., 2009). Zanimljivo, tretman fluoksetinom je uspeo da normalizuje ponašanje i kod stresiranih ženki, iako na suprotan način u odnosu na mužjake. Polne-specifične razlike uočene na nivou ponašanja u odgovoru na hronični stres i tretman fluoksetinom su u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima (Dalla i sar., 2005; Kokras i sar., 2011) i smatra se da su posledica različite hormonske osnove među polovima i različite strategije kada su izložene istom bihevioralnom stimulusu (FST) (Palanza, 2001; Rogatsky i sar., 1998). Uopšteno, kada ispituje efekat hronične socijalne izolacije u FST-u, ženke izgleda da bolje reaguju u odgovoru na novi dodatni stresor (FST) kao posledica pojačane hipotalamo-serotonergičke aktivnosti u odnosu na mužjake (Dalla i sar., 2005). S druge strane, mužjaci koji su izloženi hroničnoj izolaciji u kontaktu sa dodatnim stresorom pokazuju ponašanje nalik depresivnom, što se vidi kao povećana imobilnost. Sve ukupno, naši rezultati pokazuju da, iako je hronična socijalna izolacija izazvala polno-specifične razlike u ponašanju analizirane u FST-u, tretman fluoksetinom je uspeo da poništi ove promene i normalizuje

ponašanje na polno-specifičan način. Takođe, interesatno je napomenuti da je tretman fluoksetinom kod kontrolnih životinja, za razliku od stresiranih, pokazao polno-nespecifičan efekat i povećao vreme imobilnosti kod oba pola. Iako su nađeni rezultati kod kontrola mahom u suprotnosti sa većinom prethodnih rezultata koji pokazuju smanjenje imobilnosti kod naivnih, nestresiranih pacova, postoje određeni literaturni podaci koji potvrđuju da fluoksetin može povećati vreme imobilnosti (Lifschytz i sar., 2006; Pitychoutis i sar., 2011). Naši rezultati se mogu objasniti činjenicom da se u većini studija FST test izvodi u dve odvojene sesije (Porsolt i sar., 1977), kao pretest i kao test (24 sata nakon pretesta). U našem slučaju mi smo primenili jednu sesiju u trajanju od 5 min. Razlozi za ovakvu modifikaciju testa su sledeći: kada se FST koristi sa ciljem da ispita da li hronični stres može uticati na ponašanje glodara, odnosno, da li stres izaziva ponašanje nalik depresivnom, jedna sesija FST se pokazala znatno efikasnijom i osetljivijom u dokumentovanju promena u ponašanju stresiranih životinja (Lutter i sar., 2008; Sandi i sar., 2008). Takođe, poznato je i da se sam FST koristi depresivni stimulus odnosno kao model akutnog stresa (Porsolt i sar., 1978; Qi i sar., 2006), s obzirom na to da utiče na serotoninску transmisiju (Young i sar., 2004). Stoga, upotreba FST-a u dve sesije, pretesta i testa, u našem model sistemu bi najverovatnije reflektovala odgovor pacova na kombinovani stres, odnosno, efekat hroničnog stresa (socijalne izolacije) + akutnog stresora (FST) i na taj način zamaskirala efekat samog hroničnog stresa na ponašanje.

5.2 Efekti stresa i fluoksetina na nivo KORT-a kod životinja oba pola

Rezultati dobijeni merenjem KORT-a ukazuju da promene u ponašanju koje se javljaju kod pacova oba pola u uslovima hronične socijalne izolacije i dodatnog tretmana fluoksetinom ne zavise od promena KORT-a u datim tretmanima (Slika 18). Smanjen nivo KORT-a u hroničnoj izolaciji u saglasnosti je sa prethodnim rezultatima naše i drugih grupa (Adzic i sar., 2009a; Djordjevic i sar., 2009a; Malkesman i sar., 2006) koje su pokazale hipoaktivnost HPA ose u hroničnom stresu. Takođe, i odsustvo efekta fluoksetina na nivo KORT-a kod stresiranih životinja oba pola u skladu je sa prethodnim rezultatima (Brady i sar., 1992; Carrasco i Van de Kar, 2003), koji sugerišu da efekat antidepressiva podrazumeva uključivanje nekih drugih, dodatnih neurobioloških mehanizama koji su odgovorni za normalizaciju ponašanja nalik depresivnom nezavisnih od hormona. Takođe, interesatno je naglasiti da je nivo KORT-a u serumu ženki svih eksperimentalnih grupa bio nešto viši nego

kod mužjaka odgovarajućih grupa. Nađeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da ženke pokazuju povećane bazalne nivoe hormona i da je u stresu sinteza i oslobađanje KORT-a kod ženki značajno viša nego kod mužjaka (Critchlow i sar., 1963; Galea i sar., 1997; Kitay, 1961).

5.3 Efekti stresa i fluoksetina na GR i njegovu fosforilaciju u transdukciji signala u hipokampusu životinja oba pola

Da bi utvrdili da li postoje izvesne polne specifičnosti u funkciji GR-a u hipokampusu u odgovoru na stres i tretman fluoksetinom, analiziran je ukupan nivo GR-a u citosolu i jedru, njihova fosforilacija i transkripciona aktivnost kod ženki i mužjaka pacova.

5.3.1 Efekat stresa i fluoksetina na unutarćelijsku distribuciju GR-a u hipokampusu

Iako je nivo KORT-a u serumu stresiranih životinja bio značajno smanjen kod oba pola, u jedrima hipokampusa ovih životinja uočeno je povećanje ukupnog nivoa GR-a (Slika 20). Nađeni rezultati ukazuju da ovo nagomilavanje GR-a u jedru izgleda da nije posledica jednoznačne regulacije samim hormonom, već najverovatnije specifičnih promena na nivou proteina koji interaguju sa samim GR-om, poput šaperona i Hsps70 i/ili 90 (Adzic i sar., 2009b, Djordjevic i sar., 2009b; Murphy i sar., 2002). Takođe, pored Hsps proteina, na lokalizaciju GR-a i njegovu ćelijsku distribuciju između citoplazme i jedra i uopšte na stabilnost GR-a u odgovoru na stres, važnu ulogu imaju i promene koje se javljaju u klirensu, odnosno, mehanizmu izbacivanja GR-a iz jedra (Conway-Campbell i sar., 2007; Noguchi i sar., 2010). S druge strane, povišeni nivoi jedarnog GR-a nađeni u hipokampusu odgovaraju hipoaktivnoj HPA osi, ukazujući na pojačanu negativnu povratnu spregu koja gasi aktivnost HPA ose kod oba pola. Uprkos očiglednom povećanju nivoa jedarnog GR-a u odgovoru na hroničnu socijalnu izolaciju, nismo našli značajne promene na nivou GR-a u citosolu, bilo stresiranih ženki bilo mužjaka. Objašnjenje za ovakav rezultat može se naći u smanjenoj senzitivnosti u detekciji nivoa GR proteina u citosolnoj frakciji, zbog manje veličine samog citosolnog kompartmana u odnosu na jedro, što su prethodno pokazali drugi autori (Kitchener i sar., 2004; Noguchi i sar., 2010). Dodatno, kod stresiranih životinja oba pola tretman fluoksetinom je normalizovao nivo GR-a na nivo kontrola, odnosno, uspeo je neutrališe efekat hronične izolacije. U skladu sa našim dosadašnjim saznanjima, ne postoji trenutno dostupna literatura koja govori o efektu hroničnog tretmana fluoksetinom na unutarćelijsku distribuciju

GR-a i njegove nivoe u jedru hipokampusa pacova izloženih uticaju hronične socijalne izolacije. Sa druge strane, postoje određene studije koje su pokazale uspešnu translokaciju GR-a u jedru pod uticajem tricikličnih antidepresiva (TCA), kao što su imipramin, klomipramin i dezipramin, ali u drugačijim eksperimentalnim uslovima (Funato i sar., 2006; Pariante i sar., 1999). Sve ukupno na osnovu prikupljenih rezultata možemo zaključiti da je tretman fluoksetinom doveo do translokacije GR-a iz citoplazme u jedro u hipokampusu hronično stresiranih životinja oba pola, odnosno da se ovaj efekat fluoksetina pokazao polno-nespecifičnim.

5.3.2 Efekat stresa i fluoksetina na fosforilaciju GR-a i aktivaciju ushodnih kinaza u hipokampusu i ekspresiju GR-regulisanih gena kod životinja oba pola

U cilju razumevanja regulacije transkripcije preko GR-a u uslovima hronične socijalne izolacije i tretmana fluoksetinom, analizirana je i fosforilaciju GR-a, budući da je pokazano da ova post-translaciona modifikacija ima veliki značaj u regulaciji njegove transkripcione funkcije (Davies i sar., 2008; Ismaili i Garabedian, 2004; Krstic i sar., 1997; Rogatsky i sar., 1998). S obzirom da je poznato da različita mesta fosforilacije GR-a mogu pozitivno (stimulatorno) ili negativno (inhibitorno) da regulišu transkripcionu aktivnost GR-a (Ismaili i Garabedian, 2004), u ovoj tezi analizirana je fosforilacija GR-a na serinu 232 (pGR232) koja se smatra pozitivnom i fosforilacije na serinu 246 (pGR246) i treoninu 171 (pGR171), za koje se smatra da su inhibitorne. Takođe, analizirane su i ushodne kinaze koje fosforilišu GR na datim aminokiselinskim ostacima, CDK5, MAPK (JNK1/2/3, p38 i ERK1/2) i GSK-3 β kinazu (Gallagher-Beckley i Cidlowski, 2009; Ismaili i Garabedian, 2004; Krstic i sar., 1997; Orti i sar., 1989; Rogatsky i sar., 1998; Webster i sar., 2002). Polazna hipoteza bila je da se pod delovanjem hroničnog stresora fosforilacija GR-a u hipokampusu, posebno fosforilacija na ovim epitopima, u jedru menja i kako se te promene mogu povezati sa povećanom ili smanjenom transkripcionom aktivnošću GR-a koja je zapažena u tim uslovima, kao i da tretman fluoksetinom može neutralisati ove promene izazvane stresom.

U uslovima hroničnog stresa uočili smo polno-specifične razlike na nivou čitave pGR232 signalne kaskade u jedru (p25/p35/CDK5/pGR232). Naime, dok je kod ženki stres smanjio aktivaciju čitave pGR232 signalizacije, kod mužjaka je uspeo da poveća aktivaciju. Rezultati nađeni kod mužjaka su u saglasnosti sa našim prethodnim rezultatima i potvrđuju da u uslovima hronične socijalne izolacije dolazi do povećanja nivoa pGR232 izoforme i u jedru i u citosolu hipokampusa koje je praćeno porastom nivoa CDK5 kinaze i njenih aktivatora,

p35 i p25 (Adzic i sar., 2009b). Za razliku od mužjaka, kod ženki smo uočili suprotan efekat hroničnog stresora i pad nivoa jedarne pGR232 izoforme praćene smanjenjem nivoa p35 i p25 proteina i trendom smanjenja CDK5 kinaze. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je pokazala povezanost pGR232 fosforilacije i aktivnosti CDK5 kinaze kod stresiranih ženki u hipokampusu i uopšte prva studija koja se bavi merenjem nivoa pGR232 izoforme i njenih ushodnih aktivatora kod ženki izloženih hroničnom stresu izolacije. Naše dalje istraživanje je pokazalo da pored stresa i naknadni tretman fluoksetinom dovodi do polno-specifičnih promena na nivou pGR232 signalizacije u hipokampusu stresiranih životinja. Naime, fluoksetin je uspeo da neutrališe efekat stresa kod ženki na nivou čitavog signalnog puta pGR232, dok kod mužjaka nije imao efekta. Ovi rezultati ukazuju na postojanje polno-specifičnog mehanizma u hipokampusu, predominantno u jedru, preko koga fluoksetin utiče na regulaciju pGR232 signalizacije kod stresiranih pacova. Pored fosforilacije GR-a na S232 od strane CDK5 kinaze pokazano je da S232 može biti fosforilisan i od strane jedne MAPK kinaze, p38 kinaze. Kao i u slučaju CDK5 kinaze, stres je smanjio aktivaciju p38 kinaze kod ženki, što se opet poklopilo sa promenama na nivou jedarne pGR232 izoforme. Kod mužjaka stres je takođe smanjio aktivaciju p38 kinaze, ali ovo smanjenje nije praćeno promenama na nivou pGR232 izoforme. Iako su istraživanja uloge p38 kinaze u odgovoru na hronični stres malobrojna, smanjena aktivacije p38 proteina koju smo uočili kao rezultat hroničnog stresa kod oba pola odgovara nalazima Budziszewske i saradnika (2010). Ovi rezultati zajedno sa dokazima o uticaju p38 na GR signalizaciju (Holsboer 2000; Pariante i Miller 2001; Wang i sar., 2004; Miller i sar., 2005) ukazuju da disbalans u nivou i aktivaciji p38 kinaze može da bude od značaja u patofiziologiji poremećaja uzrokovanih stresom, naročito kod ženki. Štaviše, činjenica da je fluoksetin neutralisao efekat stresa na nivou p38/pGR232 signalizacije kod ženki zajedno sa normalizacijom njihovog ponašanja (Mitic i sar., 2013) dodatno pojačava značaj date kinaze u odgovoru na stres. S druge strane, izostanak dejstva fluoksetina na p38 kinazu kod stresiranih mužjaka kao korekcija ponašanja nalik depresivnom na polno-specifičan način, dovodi nas do zaključka da je terapijski efekat fluoksetina povezan sa njegovim dejstvom na p38 signalizaciju samo kod ženki.

Za razliku od pGR232 izoforme, na nivou pGR246 fosforilacije nismo uočili polno-specifične promene ni pod uticajem stresa ni pod dejstvom fluoksetina. Naime, kod oba pola stres je povećao nivo pGR246 izoforme kod stresiranih životinja, dok je tretman fluoksetinom uspeo da neutrališe uticaj stresa, odnosno, normalizuje nivo pGR246 izoforme i u citosolu i u jedru hipokampusa kod oba pola. Analiza ushodnih JNK kinaza koje fosforilišu GR na S246

pokazala je da ova fosforilacija nije ciljana JNK kinazama kod ženki u bilo kom tretmanu. Za razliku od toga, kod mužjaka povećan nivo pGR246 izoforme praćen povećanjem nivoa pJNK kinaza samo u odgovoru na stres. Naši rezultati pokazuju da pGR246 izoforma u jedru hipokampusa ženki nije jednoznačno ciljana samo JNK kinazama i sugerišu na dodatnu aktivaciju drugih kinaza za koje se zna da fosforilišu GR na S246 (Rogatsky i sar., 1998). Dalje, smanjenje nivoa pGR246 izoforme pod uticajem fluoksetina kod stresiranih životinja može biti i posledica povećane aktivnosti različitih fosfataza, poput protein fosfataze 2-A (PP2A), koja može uticati na fosforilacioni status GR preko defosforilacije receptora (Budziszewska i sar., 2010). Pored promena na nivou pGR246/JNK signala, interesantno je prodiskutovati i promene na nivou same JNK signalizacije (pJNK/JNK1/2/3), kao i njihove unutarćelijske distribucije u datom eksperimentalnom modelu. Naime, kod stresiranih ženki ovo smanjenje JNK signalizacije je posledica smanjene aktivacije JNK signala (fosfo i total JNK1/2/3) naročito u jedru, dok je kod mužjaka stres prevashodno doveo do translokacije pJNK1/2/3 fosfoformi u jedro. Rezultati do kojih smo došli kod ženki su u skladu sa nedavnim istraživanjima u kojima je istaknuta povezanost između smanjenja nivoa pJNK1/2/3 u hipokampusu sa postojanjem prenatalnog stresa, kao i hroničnog izlaganja nepredvidivom stresoru kod odraslih (eng. *chronic unpredictable stress*, CUMS) (Budziszewska i sar., 2010; Li i sar., 2009). Ovi rezultati ukazuju na to da su uočene polne razlike na nivou pJNK1/2/3 izoformi u jedru kod stresiranih životinja, posledica različite unutarćelijske distribucije ovih izoformi kod ženki i mužjaka, specifično njihove translokacije u jedro. Promene u JNK signalima u jedru mogu se povezati i sa polnim razlikama nađenim na nivou ponašanja ovih životinja (Mitic i sar., 2013). Opadanje aktivnosti JNK signala kod ženki praćeno je smanjenjem imobilnosti, dok je kod mužjaka povećanje imobilnosti u paraleli sa porastom nivoa pJNK1/2/3 u jedru (Mitic i sar., 2013). Štaviše, u stresu aktivacija jedarnih pJNK1/2/3 izoformi dalje aktivira širok spektar transkripcionih faktora poput c-Jun, ATF-2, Elk-1, c-Myc, p53 i NFAT4 (Widmann i sar., 1999), koji regulišu ekspresiju niza gena uključenih u odgovoru na stres i kontrolu brojnih ćelijskih procesa koji se najverovatnije nalaze u osnovi depresivnog ponašanja izazvanog stresom. Dalje, ove polne razlike uočene u nivou pJNK1/2/3 signala mogle bi da budu rezultat polno-različite ushodne regulacije JNK signala bilo kroz aktivaciju MKK3/6 i MMK4/7 (Brust i sar., 2007; Wada i sar., 2001), bilo kroz njihovu deaktivaciju MAPK fosfatazama, kao što su MAPK fosfataza 1 (MKP-1), MKP-3/6, MKP-7 i PP2A (Muda i sar., 1996; Willoughby i Collins, 2005). Ipak, ovakva pretpostavka se čini kao manje verovatna budući da u našem istraživanju nismo uočili razlike u p38 signalizaciji koja je obično ciljana istim ushodnim kinazama i fosfazama, kao što su i

JNK. Dodatnu potvrdu u vezi važnosti uloge JNK signala u odgovoru na stres pružio je naš nalaz da je fluoksetin uticao na pJNK signalizaciju kod životinja izloženih stresu. Kod ženki, fluoksetin je neutralisao promene izazvane stresom u oba ćelijska kompartmana, dok je kod mužjaka njegov efekat bio ograničen na promene u nivou citosolnih pJNK izoformi. Iako, za sada, ne postoje *in vivo* istraživanja koja bi potkrepila naše rezultate u vezi sa efektom fluoksetina na pJNK signalizaciju, dobijeni rezultati su skladu sa postojećim radovima. Naime, pokazano je da fluoksetin jednako kao i imipramin u potpunosti normalizuje nivo pJNK signala kod životinja izloženih stresu (Budziszewska i sar., 2010; Galeotti i Ghelardini, 2012). Sve ukupno, definisanje preciznog molekularnog mehanizma kako fluoksetin utiče na distribuciju i translokaciju pJNK izoformi iz citoplazme u jedro hipokampusa kod stresiranih životinja različitog pola zahteva detaljnije mehanističke studije i dodatnu pažnju. Sa druge strane, ove polno-specifične razlike koje se javljaju na nivou JNK signalizacije u odgovoru na fluoksetin mogu biti posledica i različite gustine serotoninskih receptora ili različite serotoninske transmisije nađene u hipokampusu ženki i mužjaka (Haleem i sar., 199; Lopez i sar., 1998; Stein i sar., 2008), s obzirom da je pokazano da serotoninski receptori aktiviraju JNK signale (Samuvel i sar., 2005; Zhong i sar., 2008). Sve ukupno, naši rezultati ukazuju na postojanje polno-nespecifičnih promena na nivou pGR246 izoforme sa jedne strane, i prisustva specifičnih polnih razlika u aktivaciji kinaza sa druge, prvenstveno u jedru hipokampusa hronično stresiranih pacova tretiranih fluoksetinom.

S obzirom na to da nije nađena veza između JNK signalizacije i fosforilacije GR-a na 246 u hipokampusu ženki izlaganih stresu hronične izolacije analiziran je i doprinos još jedne kinaze iz MAPK familije, ERK1/2, za koju se zna da takođe fosforilišu GR kod pacova. Analizirana je i unutarćelijska distribucija ERK1/2 kinaza kao i nivo fosforilacije, pERK1/2, u datim eksperimentalnim uslovima.

Kada je reč o ERK signalizaciji u hipokampusu, utvrdili smo polno-specifičan efekat kako hroničnog sresa, tako i fluoksetina. Naime, kod ženki stres je doveo do zadržavanja pERK1/2 izoformi u citosolu, dok je kod mužjaka on prouzrokovao njihovu translokaciju u jedro. U poređenju sa postojećim istraživanjima u vezi sa aktivacijom ERK signalizacije (Dwivedi i sar., 2006a; Feng i sar., 2003; Iio i sar., 2011; Qi i sar., 2006), naše istraživanje na precizniji način pojašnjava kako stres utiče na njihovu translokaciju u jedro. Regulatorni mehanizmi unutarćelijske distribucije ERK1/2 proteina detaljno su ispitivani (Roskoski, 2012; Torii i sar., 2004). Ukratko, pored fosforilacije ERK1/2 njihovim ushodnim kinazama, poput MEK i formiranja ERK-MEK heterodimera u citoplazmi, translokacija u jedro praćena je

disocijacijom ERK1/2-MEK1/2 kompleksa i pravilnim funkcionisanjem jedarnih ukotvljujućih vezujućih proteina (eng. *anchored nuclear binding proteins*) (Kondoh i sar., 2005; Lenormand i sar., 1998). Na osnovu naših rezultata, možemo da iznesemo pretpostavku da je zadržavanje pERK1/2 izoformi u citosolu kod ženki posledica poremećaja u disocijaciji ERK1/2-MEK1/2 kompleksa i/ili narušenog ukotvljavanja i pakovanja ERK1/2 proteina u uslovima hroničnog stresa. Takva akumulacija ERK1/2 u citosolu može da dovede do smanjenja aktivnosti ERK1/2 u jedru i posledično do opadanja ERK1/2 signalizacije. Uočene razlike u nivoima pERK1/2 izoformi u jedru hipokampusu između ženki i mužjaka izloženih stresu mogu da imaju za posledicu polno-specifičnu modulaciju na nivou transkripcionih faktora, poput CREB, ATF-2, c-FOS, ELK-1, zatim transkripcionih utišivača, kao i polnih razlika u reorganizaciji hromatina u dogovoru na hronični stres. Kao i kod JNK signala, ne možemo da isključimo mogućnost da su polno-specifične promene u nivou pERK1/2 izoformi, koje smo uočili u uslovima hroničnog stresa, posledica razlika u ushodnoj regulaciji aktivacije ERK1/2 proteina, bilo kroz aktivaciju odgovarajućih ushodnih aktivatora (Pouyssegur i sar., 2002), bilo kroz odgovarajuće ERK1/2 deaktivatore. Dok je za ERK1/2 fosforilaciju pokazano da funkcioniše kao međućelijski signalni mehanizam koji posreduje u ispoljavanju efekata antidepresiva, potkrepljujući dokazi su prilično limitirani činjenicom da je većina proistekla iz studija izvedenim na netretiranim, kontrolnim životinjama ili iz *in vitro* studija (Fumagalli i sar., 2005; Hisaoka i sar., 2001; Tiraboschi i sar., 2004), nasuprot podacima iz studija na *postmortem* depresivnim pacijentima (Dwivedi i sar., 2006a). Naši rezultati ukazuju na postojanje polno-specifične i unutar ćelijski zavisne regulacije ERK1/2 signalizacije u odgovoru na hronični tretman fluoksetinom kod životinja izloženih hroničnom stresu. Dalje, uočili smo da je efekat fluoksetina na ERK1/2 signalizaciju u jedru izraženiji kod ženki, dok je efekat kod mužjaka sličan onome koji su dokumentovali OJ i sar. (2006) kao i (Taler i sar., 2008). Normalizacija ERK1/2 signalizacije u jedru pod uticajem fluoksetina praćena je normalizacijom ponašanja kod ženki (Mitic i sar., 2013), dok kod mužjaka nije pronađeno poklapanje između ERK1/2 signala i normalizacije narušenog ponašanja. Sveukupno, ovi rezultati ukazuju na značaj ERK1/2 fosforilacije kao potencijalne mete dejstva SSRI antidepresiva, kao i značajne uloge narušene ERK1/2 signalizacije u patofiziološkim mehanizmima depresije, posebno kod žena.

Pored analize fosforilacije GR na S232 i S246 i njihovih ushodnih kinaza, dodatno smo analizirali i fosforilaciju GR na T171 ciljanu GSK-3 β kinazom u datom eksperimentalnom modelu. Poput pGR246 izoforme, i na nivou pGR171, iako smo uočili

značajne promene u oba ćelijska kompartmana pod uticajem hronične izolacije, ove promene nisu bile polno-specifične. Naime, kod oba pola stres je značajno smanjio nivo pGR171 izoforme u jedru, što može biti posledica zadržavanja ove izoforme u citosolu, odnosno smanjene translokacije u jedro. Ovo smanjenje jedarne pGR171 izoforme u uslovima hronične izolacije može biti signal koji ograničava eksport GR-a iz jedra i na taj način dovodi do akumulacije GR-a u jedru hipokampusa kod pacova, iako prema našim saznanjima nema konkretnih *in vivo* podataka na pacovima koji direktno povezuju ovu fosfoformu GR-a sa njegovim eksportom iz jedra. S druge strane, eksperimentalno je pokazano je da GR fosforilisan na T171 od strane GSK-3 β kinaze kod pacova i da ova fosforilacija utiče na transkripcionu aktivnost samog GR (Rogatsky i sar., 1998). Iako analog pGR171 kod ljudi (A150) nije fosforilisan od strane GSK-3 β , ova kinaza fosforiliše GR na drugom epitopu a to je S404, što govori o značaju analize GSK-3 β -pGR171 signalizacije (Gallier-Beckley i sar., 2008). Fosforilacija GR-a na S404 dovodi do konformacionih promena samog receptora, utiče na njegovu stabilnost i omogućava izlazak GR-a iz jedra. U skladu sa tim, mi smo pretpostavili da smanjena fosforilacija na pGR171 u jedru od strane GSK-3 β kinaze smanjuje jedarni eksport GR-a. I zaista, kod ženki ovo smanjenje jedarnog pGR171 je praćeno smanjenjem nivoa GSK-3 β kinaze. Interesantno je napomenuti da je pored smanjenja nivoa ukupne GSK-3 β , stres doveo i do smanjenja njene fosfoforme, pGSK-3 β , kod oba pola. Jedno od mogućih objašnjenja istosmernih promena u nivou ukupne i fosforforme GSK-3 β kinaze može se naći u činjenici da je fosforilacija GSK-3 β regulisana i simultanom aktivacijom različitih serotoninskih receptora, 5HT1a i 5HT2a, a koji su sa druge strane u bliskoj vezi sa odgovorom na stres i etiologijom depresije (Berendsen, 1995; Borsini, 1994; Lyons i sar., 1999). Prethodne studije su pokazale da proces fosforilacije GSK-3 β kinaze pod uticajem stimulacije 5HT1a receptora, dok je proces defosforilacije pod uticajem 5HT2a receptora (Li i sar., 2004). U skladu sa tim, mi sugerišemo da poremećaj ravnoteže i istovremena smanjena aktivnost ovih serotoninskih receptora u odgovoru na stres mogu biti odgovorni za smanjene nivoe GSK-3 β i pGSK-3 β u hipokampusu stresiranih ženki. Sve ukupno, naši rezultati su prvi koji pokazuju povezanu GSK-3 β -GR signalizaciju u hipokampusu, što može uticati na regulaciju GR funkcije u ćelijskim procesima u odgovoru na stres preko fosforilacije GR-a GSK-3 β kinazom u jedru.

Poput stresa, tretman fluoksetinom nije doveo do polno-specifičnih promena na nivou kuplovane GSK-3 β -GR signalizacije u hipokampusu. Naime, fluoksetin je neutralisao promene izazvane hroničnom izolacijom i normalizovao nivoe GSK-3 β -pGR171 proteina u jedru kod oba pola. Kao posledica toga fluoksetin je vratio nivo ukupnog jedarnog GR-a na

nivo kao kod nestresiranih kontrolnih životinja. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa postojećim nalazima, kako našim tako i drugih autora, koji su pokazali da antidepresivi, specifično SSRI, menjaju fosforilacioni status GR, utiču na translokaciju GR-a u jedro i učestvuju u regulaciji transkripcione aktivnosti samog GR-a. Ovi efekti su potvrđeni kako u *in vitro* u ćelijskoj kulturi (Anacker i sar., 2011; Funato i sar., 2006; Lai i sar., 2003), tako i u životinjskim modelima (Frechilla i sar., 1998; Mitic i sar., 2013; Yau i sar., 2002) i kliničkim studijama na humanim uzorcima (Anacker i sar., 2011; Calfa i sar., 2003; Carvalho i sar., 2008). Dalje, rezultati ove teze dodatno identifikuju novo svojstvo fluoksetina da menja fosforilaciju GR-a na još jednom epitopu, T171, u hipokampusu pacova oba pola izloženih hroničnom stresu. Na osnovu gore iznetih zapažanja da povećana fosforilacija GR na T171 može stimulisati eksport GR-a iz jedra u citosol, možemo izneti još jednu pretpostavku da fluoksetin može povećati eksport GR-a iz jedra preko povećanja pGR171 fosforilacije. Štaviše, ovo povećanje jedarnih nivoa pGR171 izoforme se može objasniti sposobnošću fluoksetina da poveća ukupan nivo GSK-3 β kinaze u jedru hipokampusa kod životinja oba pola. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja pokazuje svojstvo fluoksetina da menja fosforilaciju GR-a na T171 u hipokampusu stresiranih životinja i da potencira translokaciju GR-a u jedro u datim eksperimentalnim uslovima. Ovi efekti fluoksetina su se pokazali polni-nespecifičnim u našem model sistemu. Dalje, sposobnost fluoksetina da neutrališe promene izazvane stresom na nivou GSK-3 β signalizacije u jedru, preko povećanja nivoa ukupne kinaze i njene fosfoforme je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Iako većina farmakoloških studija pokazuje da inhibicija GSK-3 β s jedne strane i povećanje nivoa njene fosforilacije na S9 sa druge, predstavljaju deo jednog istog mehanizma kojim antidepresivi različitih klasa ispoljavaju svoje dejstvo, postoje i istraživanja koja prijavljuju hiperaktivaciju GSK-3 β kinaze (Alimohamad i sar., 2005; Kozlovsky i sar., 2006; Roh i sar., 2007). Treba imati u vidu da ove razlike koje se javljaju u nalazima ovih studija mogu biti posledica upotrebe lekova različitih klasa za stabilizaciju raspoloženja koji istovremeno ispoljavaju i antidepresivne efekte. Dalje, *in vivo* aktivacija 5HT1a receptora je dovela do povećanja nivoa pGSK-3 β , dok je blokada 5HT2a receptora imala isti efekat (Li i sar., 2004). Drugim rečima, studije koja se bave istraživanjem veze 5HT signalizacije i signala posredovanih GSK-3 β ukazuju da aktivnost ovih serotoninskih receptora, pogotovu ravnoteža između aktivacije 5HT1a i 5HT2 receptora, može uticati na aktivnost GSK3 β kinaze u mozgu, kao i da može biti odgovorna za nepravilnost u ponašanju i terapijske efekte antidepresiva. Sve ukupno naši rezultati naglašavaju značaj kuplovane signalizacije GSK3 β -GR putanje kao jednog od glavnih

igrača u mehanizmu antidepresivnog efekta flukosetina, koji uspešno normalizuje serotoninisku transmisiju (Berendsen, 1995; Borsini, 1994; Lyons i sar., 1999).

Kao dodatnu meru procene uticaja fosforilacija na aktivnost GR, analiziran je i odnos pGR232/246 izoformi. U stresu, kod ženki uočena je prevaga pGR246 izoforme, dok je kod mužjaka nađena blaga prednost u korist pGR232 izoforme, koja je u saglasnosti sa našim prethodnim rezultatima, u uslovima hroničnog stresa koji je sličan stresu koji je korišćen u sadašnjoj studiji (Adzic i sar., 2009b). Ovi rezultati takođe potvrđuju i naše rezultate iz kliničke studije gde je kod pacijenata sa akutnom depresivnom epizodom nađena povećana fosforilacija GR-a na S226 (analog pacovskog pGR246) u limfocitima periferne krvi, a time i smanjen odnos pGR-S211/226 (Simic i sar., 2012). Takođe, kod žena uočena je i pozitivna povezanost između nivoa jedarnog S226 i nivoa trenutnih samoprocenjenih simptoma depresije, anksioznosti i stresa, kao i negativna povezanost između odnosa pGR-S211/S226 u jedru i nivoa simptoma depresije. Naši rezultati, iz prekliničkih i kliničkih studija, sugerišu da komponente signalnih puteva uključene u fosforilaciju GR-a mogu biti biomarker odgovora na stres i procene nivoa depresivnosti, kao i biomarker dejstva pojedinih antidepresiva.

Postojanje ovakvog polnog dimorfizma u fosforilacionom statusu GR i njegovih ushodnih kinaza u odgovoru na hroničnu socijalnu izolaciju, za posledicu može imati različitu regulaciju GR transkripcione aktivnosti i ekspresije GR regulisanih gena, i sve ukupno različitu regulaciju brojnih ćelijskih procesa. Zaista, nekoliko različitih studija predložilo je zajednički mehanizam koji može objasniti ovakve razlike zasnovane na interakciji određenih GR fosfo-izoformi sa različitim transkripcionim aktivatorima i utišivačima (Blind i Garabedian, 2008; Chen i sar., 2008; Galliher-Beckley i Cidlowski, 2009). Slično gore pomenutom polnom dimorfizmu u borbi sa hroničnim stresom, tretman fluoksetin je takođe, različito uticao na fosforilaciju GR-a u jedru hipokampusa kod ženki i mužjaka. Naime, dok se kod stresiranih ženki dominantan efekat fluoksetina pokazao kroz normalizaciju odnosa pGR232/246 izoformi, kod mužjaka je fluoksetin pokazao prevagu u korist pGR232 izoforme. Interesantno, iako su promene u odnosu fosforilacija 232/246 kod stresiranih životinja oba pola pod uticajem fluoksetina bile istomerne, povećan pGR232/246 odnos, odnosno, dominantnost jedarne pGR232 izoforme kod mužjaka bilo je značajno veće u poređenju sa ženkama. Sve ukupno, ovi rezultati jasno ukazuju na fluoksetin menja GR fosforilacioni status kod stresiranih životinja na polno-specifičan način, što za posledicu može imati različitu regulaciju GR transkripcione aktivnosti.

5.3.3 Efekat stresa i fluoksetina na ekspresiju GR-regulisanih gena u hipokampusu ženki i mužjaka pacova

Da bismo ispitali efekte hroničnog stresa i fluoksetina na GR transkripcionu aktivnost, kao i da li analizirane fosforilacije GR-a u jedru, pGR232, pGR246 i pGR171, utiču na istu, merili smo ekspresiju GR-regulisanih gena: GR-a (autoregulisan) (Herman i Spencer, 1998), BDNF-a (Tapia-Arancibia i sar., 2004), CRH-a (Bao i Swaab, 2010; Holsboer i Ising, 2008), 5 HT1a, p11 i β -arestina 2 u hipokampusu ženki i mužjaka pacova. Geni koji su izabrani, osim što su regulisani GR-om, su geni koji važe za biomarkere glavnih neuralnih puteva koji su ključni u regulaciji odgovora na stres, kao i u mehanizmu dejstva antidepresiva. Naime, geni za GR i CRH su uključeni u regulaciju aktivnosti HPA ose, BDNF učestvuje u modulaciji učenja, formiranju memorije i sinaptičke plastičnosti nervnog sistema (Marmigere i sar., 2003; Musazzi i sar., 2009), 5HT1a učestvuje u serotonergičkoj transmisiji i regulaciji HPA ose (Celada i sar., 2004; Savitz i sar., 2009), a p11 i β -arestin 2 imaju ulogu markera neurogeneze i HPA ose takođe (David i sar., 2009; Egeland i sar., 2010).

Kao što smo naveli, u uslovima hronične socijalne izolacije, translokacija i akumulacija GR-a u jedru u hipokampusu nije isključivo regulisana nivoom KORT-a. Samim tim, povećanje nivoa ukupnog hipokampalnog GR-a i izmenjen fosforilacioni status (pGR232, pGR246 i pGR171) u jedru, mogu uticati na njegovu transkripcionu aktivnost i menjati ekspresiju različitih gena regulisanih GR-om nezavisno od nivoa hormona. I zaista, pokazano je da se različite fosfo-forme GR-a selektivno vezuju za promotore nekih GR-regulisanih gena, i pokazuju različiti transaktivacioni potencijal (Blind i Garabedian, 2008; Chen i sar., 2008; Davies i sar., 2008). U ovoj studiji u uslovima hronične izolacije kod ženki uočili smo da dolazi do smanjenja ekspresije gena za GR, BDNF i CRH, dok nisu uočene promene na nivou 5 HT1a, p11 i β -arestin 2 gena. Kod stresiranih mužjaka, pored pada u ekspresiji gena za GR i BDNF kao kod ženki, zapaženo je povećanje ekspresije gena za CRH, 5HT1a i p11, dok se nivo iRNK za β -arestin 2 nije menjao u odnosu na kontrole. Ovo smanjene ekspresije gena za GR i BDNF (kod oba pola) i CRH (samo kod ženki) u hipokampusu, može se objasniti povećanim nivoom GR-a u jedru u hroničnom stresu. Naši rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da različite vrste hroničnih stresora dovode do smanjene ekspresije ovih gena, kako u hipokampusu pacova tako i u različitim hipokampalnim regionima *postmortem* mozgovu depresivnih pacijenata (Bocchio-Chiavetto i sar., 2010; Chen i sar., 2001b; Karege i sar., 2005). S druge strane, povećanje u nivou iRNA za CRH kod stresiranih mužjaka je takođe u skladu sa našim prethodnim

rezultatima, koji su pokazali da u uslovima hroničnog stresa i niskog KORT-a dolazi do povećanja ekspresije gena za CRH u hipokampusu mužjaka (Adzic i sar., 2009b). Ove polno-specifične razlike na nivou ekspresije gena za CRH kod stresiranih životinja se mogu dodatno objasniti i promenama na nivou pGR232 izoforme u jedru u hipokampusu pacova oba pola. Takođe, polni dimorfizam koji smo primetili u regulaciji ekspresije gena za CRH u uslovima hroničnog stresa, podržava nalaze prethodnih studija koje su pokazale različitu reaktivnost CRH sistema u odgovoru na stres uočenu među polovima (Iwasaki-Sekino i sar., 2009)(Bangasser i sar 2010). U skladu sa navedenim i porast u ekspresiji gena za 5HT1a i p11 kod stresiranih mužjaka odgovara promenama na nivou ukupnog GR-a, kao i promenama na nivou fosfo-formi, povećana pGR232 (stimulatorna) i snižena pGR171 (inhibitorna) izoforma u jedru. Svi ovi rezultati u potpunosti podržavaju prethodne nalaze koji govore o pozitivnoj ulozi ovih fosforilacija u regulaciji transkripcione aktivnosti GR-a i sugerišu na postojanje polno-specifičnog mehanizma u regulaciji GR funkcije u odgovoru na stres, prvenstveno preko izmene fosforilacionog statusa. S druge strane, moramo napomenuti da gledajući izolovano same promene u ekspresiji 5HT1a i p11 gena, kod stresiranih mužjaka nađeni rezultati se u određenoj meri ne slažu sa postojećom literaturom. Naime, većina studija je prijavila da u hroničnom stresu dolazi do smanjenja ekspresije ovih gena u hipokampusu stresiranih životinja, kao i do pada nivoa njihove iRNK u *postmortem* mozgovima depresivnih pacijenata koji su izvršili samoubistvo (Anisman i sar., 2008; Lopez i sar., 1998; Wang i sar., 2008; Warner-Schmidt i sar., 2011; Zhang i sar., 2011). Ipak, ograničenje ovakvih nalaza koje ide u prilog našim rezultatima jeste da većina ovih rezultata dolazi iz studija, kako animalnih tako i kliničkih, koje su imale visok nivo KORT-a za razliku od našeg model sistema, koji se odlikuje niskim KORT-om. U tom pravcu, studija Zhanga i saradnika (2011) je pokazala da traumatski stres povećava ekspresiju gena za p11 u PFC-u pacova, kao i nivo iRNK za p11 u *postmortem* mozgovima pacijenata obolelih od post-traumatskog sindroma (PTSD) koji se odlikuje niskim KORT-om. Isto tako, grupa Shiskine i Digala (2010) pokazala je da mužjaci miševa koji pokazuju ponašanje nalik depresivnom u FST-u imaju povišen nivo ekspresije gena za 5HT1a u korteksu (Morley-Fletcher i sar., 2004). Ove nedoslednosti u promeni ekspresije ovh gena u odgovoru na stres, mogu se objasniti činjenicom da postoje razlike između prirode i dužine upotrebljenog stresora, kao i da se same procedure izlaganja životinja stresorima i dužina njihovog trajanja razlikuju međusobom (Lopez i sar., 1998; McKittrick i sar., 1995). Sve ukupno, naši rezultati ukazuju da ove polno-specifične promene nađene na molekularnom nivou u hipokampusu stresiranih životinja oba pola, što na nivou ekspresija proteina, što ekspresije gena, u potpunosti odgovaraju promenama na nivou njihovog

ponašanja i mogu biti odgovorne za različito ponašanje ženki i mužjaka u odgovoru na hroničnu socijalnu izolaciju.

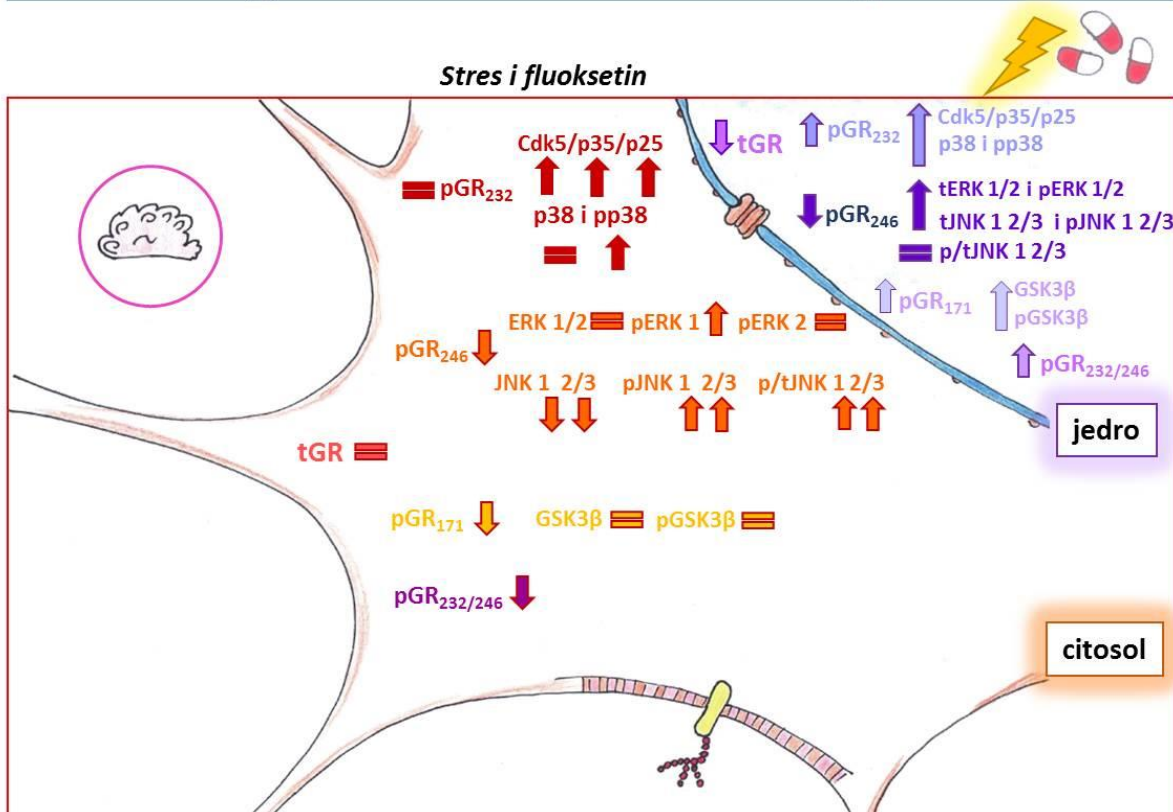
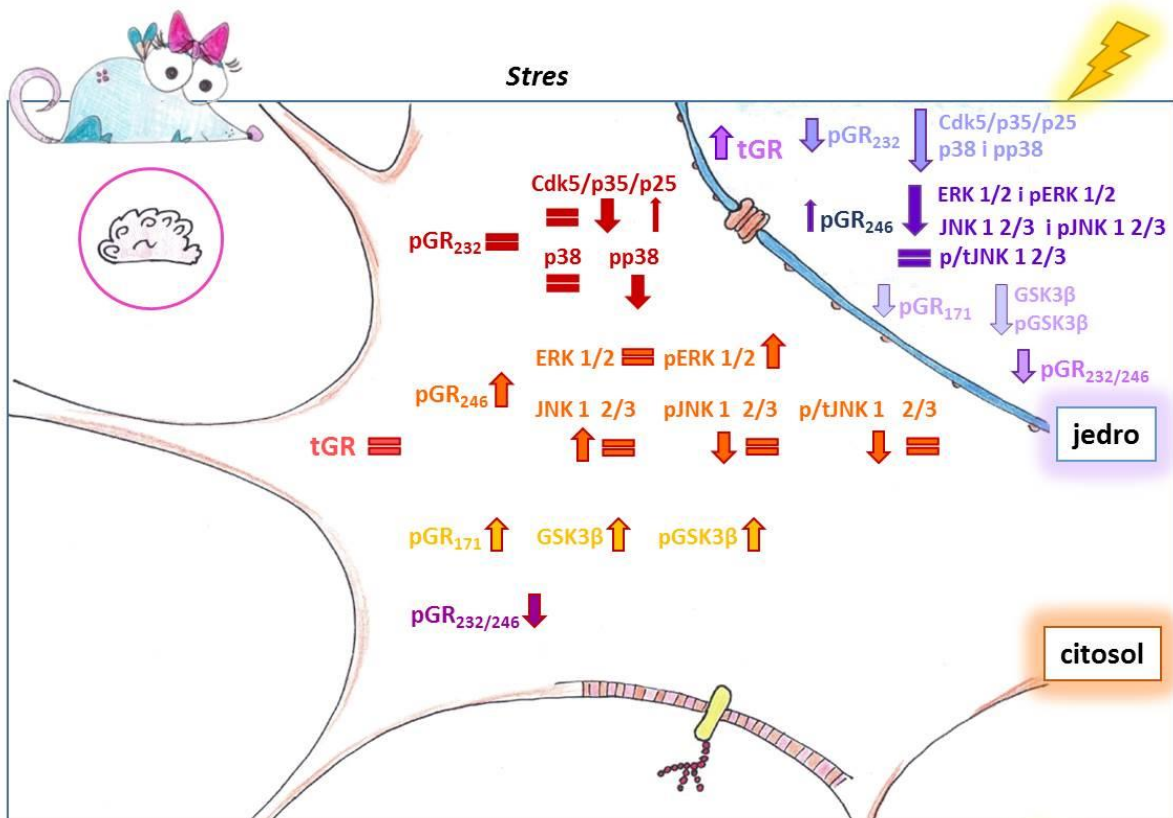
Što se tiče efekta fluoksetina kod stresiranih životinja, uočili smo polno-specifičan efekat na nivou ekspresije većine ovih gena u hipokampusu i sposobnost fluoksetina da u velikoj meri neutrališe promene nastale dejstvom stresora na polno-specifičan način. Naime, kod stresiranih ženki fluoksetin je povećao ekspresiju hipokampalnih gena za BDNF i CRH, dok kod ostalih gena nije imao efekta. Kod stresiranih mužjaka, fluoksetin je smanjio ekspresiju gena za CRH, 5HT1a i p11 gen, dok nije menjao nivo eRNK-a za ostale gene. Odsustvo efekta fluoksetina na ekspresiju gena za GR i BDNF kod stresiranih mužjaka, se može pripisati povećanoj transkripcionoj aktivnosti GR-a koja se javlja kao posledica povećanja stimulatorne pGR232 fosforilacije u jedru u odnosu na nivo pGR246 fosfoforme (na osnovu odnosa pGR232/246 u jedru). Suprotno tome, kod stresiranih ženki delimično povećanje ekspresije za BDNF može se objasniti činjenicom da pod dejstvom fluoksetina dolazi do normalizacije pGR232/246 odnosa u jedru, dok je nivo eRNK za GR ostao nepromenjen. Ovi nalazi ukazuju da uprkos normalizaciji transkripcione aktivnosti GR-a kod ženki, nepromenjen nivo eRNK za GR pod dejstvom fluoksetina može biti posledica aktivacije nekih drugih regulatornih mehanizama, na primer drugih transkripcionih faktora, NFκB ili AP1, koji su uključeni u regulaciju ekspresije GR-a (Dwivedi i sar., 2006b; Kubera i sar., 2011; Tahera i sar., 2006). Nepromenjena ekspresija gena za GR pod dejstvom fluoksetina, koju smo našli kod stresiranih životinja, u saglasnosti je sa prethodnim *in vitro* i *in vivo* studijama koje su pokazale slične nalaze (Bjartmar i sar., 2000; Brady i sar., 1992; Frechilla i sar., 1998; Yau i sar., 2002). Dalje, polni-dimorfizam koji smo uočili na nivou ekspresije BDNF-a pod dejstvom fluoksetina kod stresiranih životinja, može biti posledica ne samo izmenjene transkripcione aktivnosti GR-a preko modifikacije, odnosno, normalizacije pGR232 fosforilacije, posredovane CDK5 i p38 kinazama, već i polno-specifičnom aktivacijom nekih ushodnih regulatornih signala BDNF-a, poput ERK/CREB sistema. I zaista, naši rezultati to potvrđuju. Pod dejstvom fluoksetina kod stresiranih ženki, imamo kompletnu aktivaciju ERK1/2 sistema u jedru, što je u skladu sa istraživanjima koja su pokazala povećanje ekspresije BDNF-a usled aktivacije ERK/CREB sistema pod dejstvom fluoksetina (Manji i sar., 2001; Nibuya i sar., 1995). Nasuprot tome, možemo zaključiti da su izostanak efekta fluoksetina na ERK1/2 signalizaciju kod stresiranih mužjaka i verovatno inaktivni CREB, imali za posledicu odsustvo efekta fluoksetina i na ekspresiju BDNF-a. Dalje, ovaj polno-specifičan efekat fluoksetina na funkciju GR-a se jasno vidi i kroz promene u ekspresiji

drugih GR-reguliranih gena koje smo analizirali. Kako smo naveli, fluoksetin je normalizovao ekspresiju gena za CRH kod ženki i mužjaka izazvanih stresom na suprotan način i dodatno normalizovao ekspresiju gena za 5HT1a i p11 kod stresiranih mužjaka. Sposobnost fluoksetina da neutrališe uticaj stresa na CRH kod ženki, može se povezati sa normalizacijom signalizacije preko pGR232 izoforme u jedru, dok se sa druge povoljni efekat fluoksetina na nivou ekspresije ovih gena kod mužjaka objašnjava promenama na nivou totalnog GR-a u jedru i normalizacije signalizacije preko pGR171 izoforme posredovane GSK-3 β kinazom. Kao i u samom odgovoru na stres, uticaj fluoksetina na ekspresiju 5HT1a i p11 kod stresiranih mužjaka je u suprotnosti sa literaturom. Međutim, iako većina istraživanja pokazuje da antidepresivi smanjuju nivo iRNK za ove gene (Svenningsson i sar., 2006; Warner-Schmidt i sar., 2011; Sun i sar., 2016), postoje istraživanja koja su pokazala da tretman antidepresivima, fluoksetinom i imipraminom, neutrališe efekat stresa i smanjuje ekspresiju ovih gena (Morley-Fletcher i sar., 2004; Shishkina i Dygalo, 2010). Razlog za nekonzistentnost u rezultatima, možemo tražiti ne samo u načinu aplikacije antidepresiva, već prvenstveno i u trajanju i dozi aplikovanih antidepresiva (Lopez i sar., 1998; McKittrick i sar., 1995). Sve ukupno, neophodna su dodatna i detaljnija istraživanja kako bi se razumela uloga indukcije ovih gena u odgovoru na stres i mehanizam njihove „*down-regulacije*“ pod dejstvom fluoksetina kod mužjaka, sa ciljem da se napravi jedan zajednički koherentni molekularni model interakcije ovih gena i njihovih promena u etiologiji poremećaja raspoloženja izazvanih stresom i mehanizma dejstva antidepresiva.

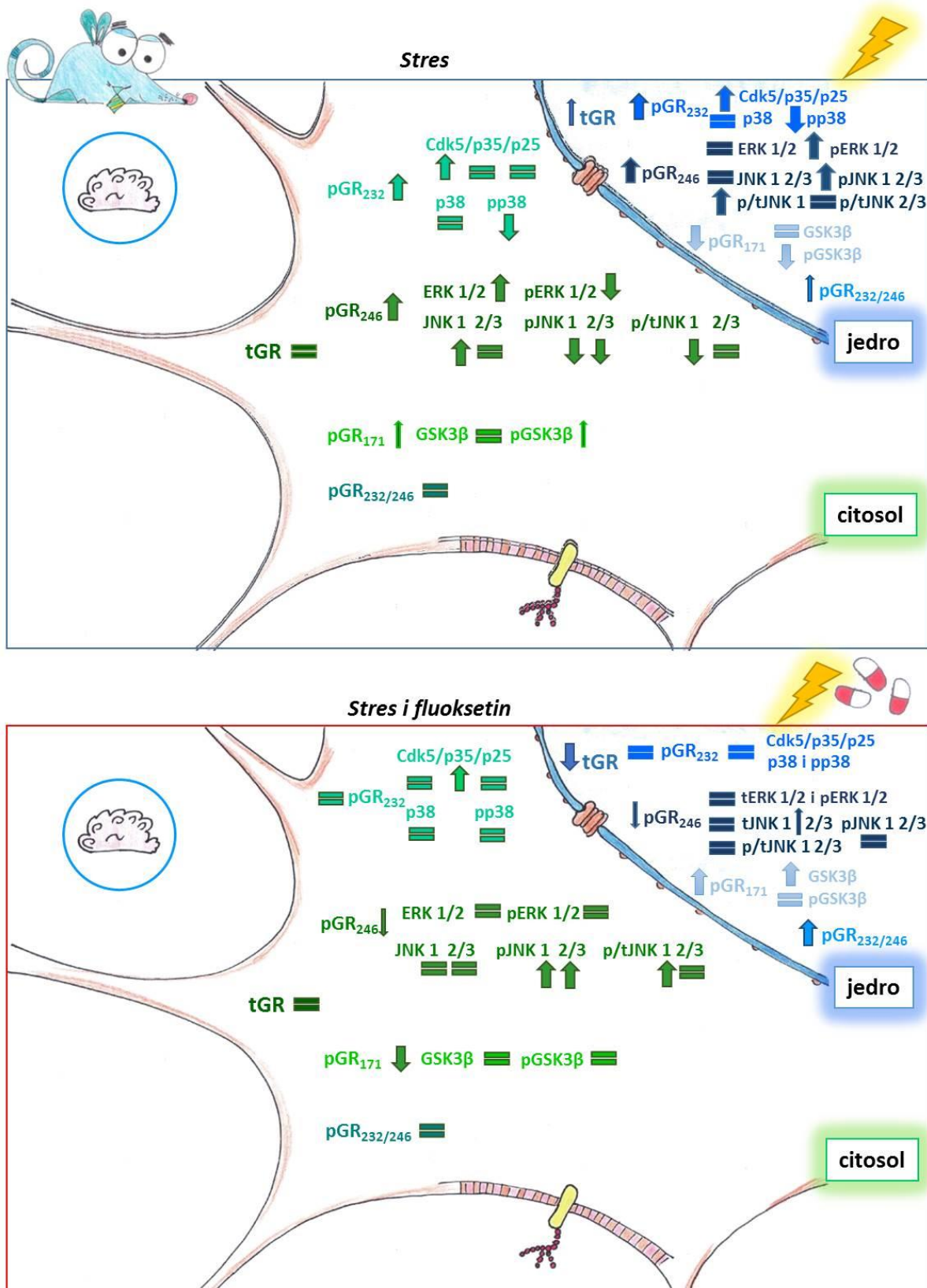
Sve zajedno, naši rezultati pružaju informacije o potencijalnom polno-specifičnom molekularnom mehanizmu/signalizaciji unutar moždane strukture hipokampusu koji može biti odgovoran za terapeutsko dejstvo fluoksetina, SSRI antidepresiva, u normalizaciji ponašanja životinja prethodno narušenog izlaganjem hroničnom stresu socijalne izolacije. Kod stresiranih ženki terapijski efekat fluoksetina pretpostavlja modulaciju GR funkcije, prvenstveno preko izmene fosforilacionog statusa GR-a na S232 u jedru i kompletne aktivacije ushodnih kinaznih signala, CDK5 i MAPK, što za posledicu ima promenu transkripcione aktivnosti GR-a koja se ogleda u izmenjenoj ekspresiji GR-reguliranih gena, pre svega BDNF-a i CRH-a. Kod stresiranih mužjaka naši rezultati ukazuju da je normalizacija ponašanja pod dejstvom fluoksetina više vezana za normalizaciju ukupnog jedarnog GR-a i njegovu fosforilaciju na S246, nezavisno od ispitivanih kinaza, kao i normalizaciju ekspresije gena za CRH, 5HT1a i p11. Takođe, naši rezultati pružaju dodatne

informacije u cilju dizajniranje efikasnije i polno-specifične terapije u poremećajima raspoloženja izazvanih stresom, sa glavnim fokusom na depresiju.

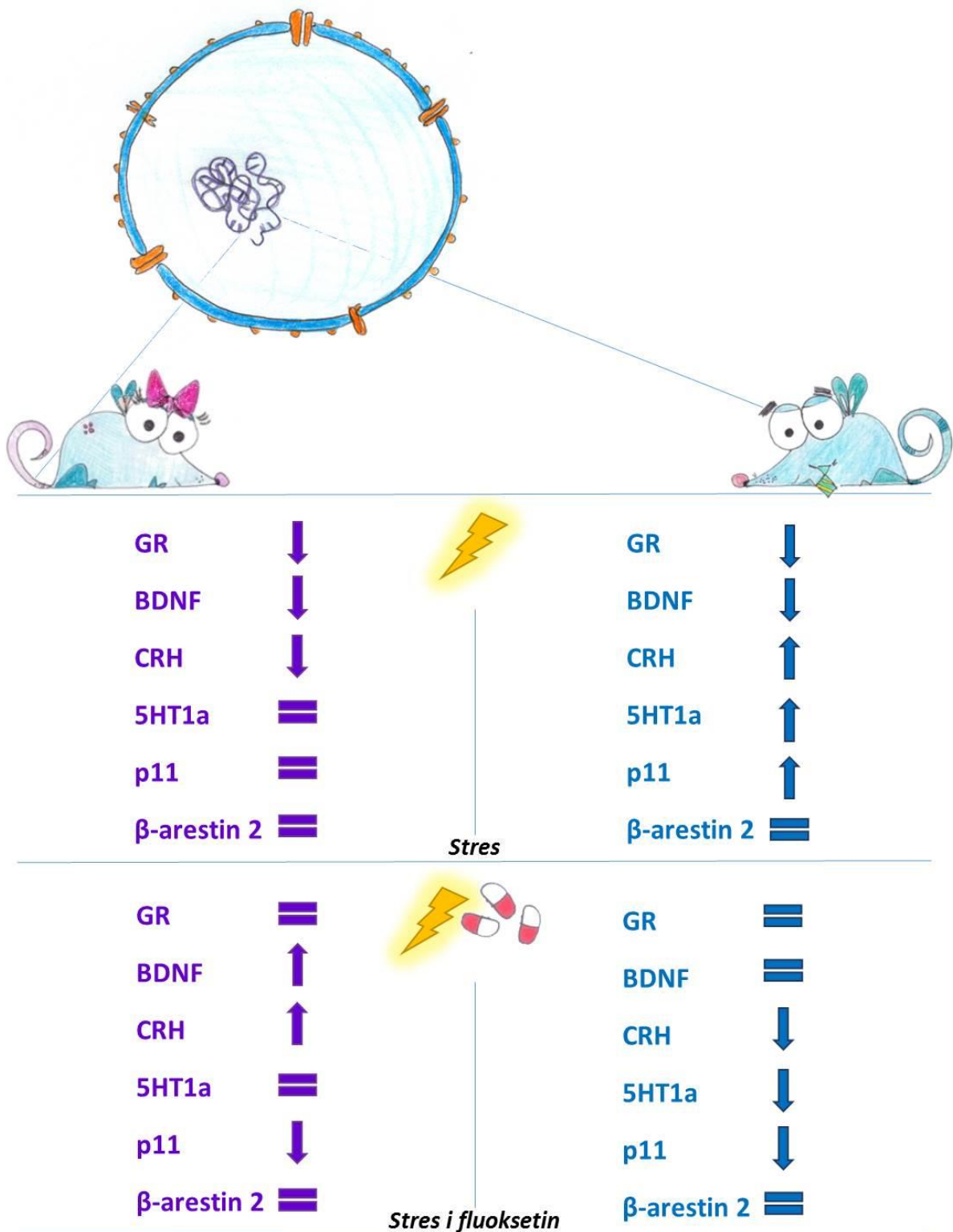
Šematski prikaz rezultata ove doktorske teze i pretpostavljene posledice uočenih molekularnih promena, nakon hroničnog tretmana fluoksetinom u citosolnom i jedarnom ekstraktu hipokampusa pacova oba pola prethodno izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije, prikazane su na slikama 29, 30 i 31.



Slika 29. Šematski prikaz molekularnih promena na nivou proteina nakon hroničnog tretmana fluoksetinom u citosolu i jedru hipokampusa ženki pacova prethodno izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.



Slika 30. Šematski prikaz molekularnih promena na nivou proteina nakon hroničnog tretmana fluoksetinom u citosolu i jedru hipokampusa mužjaka pacova prethodno izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.



Slika 31. Šematski prikaz promena na nivou ekspresije gena nakon hroničnog tretmana fluoksetinom u hipokampusu ženki i mužjaka pacova prethodno izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije.

6. Zaključci

Rezultati opisani u ovoj doktorskoj disertaciji imali su za cilj bolji uvid u fiziološke, molekularne i bihevioralne promene i potencijalne polne-specifične mehanizme preko kojih hronični tretman fluoksetinom, SSRI antidepressiv, deluje na aktivnost HPA ose i signalizaciju posredovanu GR-om u hipokampusu životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije. Na osnovu analize dobijenih podataka mogu se izvesti sledeći zaključci,

Hroničan tretman fluoksetinom:

- normalizovao je ponašanje narušeno hroničnom socijalnom izolacijom kod pacova na polno-specifičan način.
- nije imao efekta na hipoaktivnost HPA ose detektovane u uslovima hronične socijalne izolacije kod životinja oba pola.
- neutralisao je promene na nivou jedarnog GR-a prethodno izmenjenog hroničnom socijalnom izolacijom u hipokampusu životinja oba pola.
- kod stresiranih ženki modulirao je funkciju GR-a, prvenstveno preko fosforilacije GR-a na S232 i aktivacije ushodnih kinaza u jedru, što je za posledicu imalo promenu transkripcione aktivnosti GR-a. Kod mužjaka ovaj efekat fluoksetina je izostao.
- pokazao je da su fosforilacije GR-a na S232 i S246 transkripciono aktivne, dok se fosforilacija na T171 pokazala više odgovornom za lokalizaciju i ćelijsku distribuciju GR-a u hipokampusu stresiranih životinja.
- normalizovao je pGR232/BDNF signalizaciju kod stresiranih ženki, što dodatno objašnjava veću terapijsku efikasnost antidepressiva iz klase SSRI kod žena u odnosu na muškarce.

Sve zajedno, pored toga što naši rezultati potvrđuju ranije navode da antidepresivi ispoljavaju svoj efekat preko modulacije GR funkcije, oni dodatno pokazuju da antidepresivi menjaju aktivnost receptora delujući na fosforilaciju GR i ushodne kinaze sa posebnim naglaskom na polno-specifican mehanizam dejstva SSRI antidepresiva.

7. Literatura

- aan het Rot, M., Mathew, S. J., Charney, D. S., 2009. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ* 180, 305-313.
- Adzic, M., Djordjevic, A., Demonacos, C., Krstic-Demonacos, M., Radojic, M. B., 2009a. The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2181-2188.
- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojic, M., Krstic-Demonacos, M., 2009b. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol* 202, 87-97.
- Adzic, M., 2010. Uloga fosforilacije glukokortikoidnog receptora u mozgu pacova u neuroendokrinoj transdukciji signala pod uticajem akutnog, hroničnog i kombinovanog tipa stresora. Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu.
- Ahmed, S. A., Hissong, B. D., Verthelyi, D., Donner, K., Becker, K., Karpuzoglu-Sahin, E., 1999. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5, 681-686.
- Alimohamad, H., Rajakumar, N., Seah, Y. H., Rushlow, W., 2005. Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum. *Biol Psychiatry* 57, 533-542.
- Almlöf, T., Wright, A. P., Gustafsson, J. A., 1995. Role of acidic and phosphorylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 270, 17535-17540.
- Alonso, J., Angermeyer, M. C., Bernert, S., Bruffaerts, R., Brugha, T. S., Bryson, H., de Girolamo, G., Graaf, R., Demyttenaere, K., Gasquet, I., Haro, J. M., Katz, S. J., Kessler, R. C., Kovess, V., Lepine, J. P., Ormel, J., Polidori, G., Russo, L. J., Vilagut, G., Almansa, J., Arbabzadeh-Bouchez, S., Autonell, J., Bernal, M., Buist-Bouwman, M. A., Codony, M., Domingo-Salvany, A., Ferrer, M., Joo, S. S., Martinez-Alonso, M., Matschinger, H., Mazzi, F., Morgan, Z., Morosini, P., Palacin, C., Romera, B., Taub, N., Vollebergh, W. A., ESEMED/MhedeA Investigators, E. S. o. t. E. o. M. D. P., 2004. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of

- the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMED) project. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 21-27.
- Anacker, C., Zunszain, P. A., Cattaneo, A., Carvalho, L. A., Garabedian, M. J., Thuret, S., Price, J., Pariante, C. M., 2011. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry* 16, 738-750.
- Anisman, H., Matheson, K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 525-546.
- Anisman, H., Merali, Z., Hayley, S., 2008. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 85, 1-74.
- Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., Nemeroff, C. B., 1999. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 160, 1-12.
- Avenant, C., Ronacher, K., Stubrud, E., Louw, A., Hapgood, J. P., 2010. Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* 327, 72-88.
- Baldi, E., Bucherelli, C., 2005. The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity Biol Toxicol Med* 3, 9-21.
- Bamberger, C. M., Schulte, H. M., Chrousos, G. P., 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17, 245-261.
- Bangasser, D.A., Curtis, A., Reyes, B.A., Betheam T.T., Parastatidis, I., Ischiropoulos, H., Van Bockstaele, E.J., Valentino, R.J. 2010. Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Mol Psychiatry*. 2010, 896-904.
- Bao, A. M., Swaab, D. F., 2010. Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in depression focus on the human *postmortem* hypothalamus. *Vitam Horm* 82, 339-365.
- Becker, C., Zeau, B., Rivat, C., Blugeot, A., Hamon, M., Benoliel, J. J., 2008. Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystinin. *Mol Psychiatry* 13, 1079-1092.
- Beger, C., Gerdes, K., Lauten, M., Tissing, W. J., Fernandez-Munoz, I., Schrappe, M., Welte, K., 2003. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform

- gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol* 122, 245-252.
- Bei, E., Salpeas, V., Pappa, D., Anagnostara, C., Alevizos, V., Moutsatsou, P., 2009. Phosphorylation status of glucocorticoid receptor, heat shock protein 70, cytochrome c and Bax in lymphocytes of euthymic, depressed and manic bipolar patients. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1162-1175.
- Belmaker, R. H., Agam, G., 2008. Major depressive disorder. *N Engl J Med* 358, 55-68.
- Berendsen, H. H., 1995. Interactions between 5-hydroxytryptamine receptor subtypes: is a disturbed receptor balance contributing to the symptomatology of depression in humans? *Pharmacol Ther* 66, 17-37.
- Berton, O., McClung, C. A., Dileone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., Graham, D., Tsankova, N. M., Bolanos, C. A., Rios, M., Monteggia, L. M., Self, D. W., Nestler, E. J., 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864-868.
- Berton, O., Nestler, E. J., 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7, 137-151.
- Bjartmar, L., Johansson, I. M., Marcusson, J., Ross, S. B., Seckl, J. R., Olsson, T., 2000. Selective effects on NGFI-A, MR, GR and NGFI-B hippocampal mRNA expression after chronic treatment with different subclasses of antidepressants in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 151, 7-12.
- Blind, R. D., Garabedian, M. J., 2008. Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 150-157.
- Bocchio-Chiavetto, L., Bagnardi, V., Zanardini, R., Molteni, R., Nielsen, M. G., Placentino, A., Giovannini, C., Rilloso, L., Ventriglia, M., Riva, M. A., Gennarelli, M., 2010. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analysis. *World J Biol Psychiatry* 11, 763-773.
- Borsini, F., 1994. Balance between cortical 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptor function: hypothesis for a faster antidepressant action. *Pharmacol Res* 30, 1-11.
- Boulton, T. G., Cobb, M. H., 1991. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 2, 357-371.
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., Yancopoulos, G. D., 1991. ERKs: a

- family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.
- Bowley, M. P., Drevets, W. C., Ongur, D., Price, J. L., 2002. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 52, 404-412.
- Boyle, M. P., Brewer, J. A., Funatsu, M., Wozniak, D. F., Tsien, J. Z., Izumi, Y., Muglia, L. J., 2005. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 473-478.
- Bradley, R. G., Binder, E. B., Epstein, M. P., Tang, Y., Nair, H. P., Liu, W., Gillespie, C. F., Berg, T., Evces, M., Newport, D. J., Stowe, Z. N., Heim, C. M., Nemeroff, C. B., Schwartz, A., Cubells, J. F., Ressler, K. J., 2008. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry* 65, 190-200.
- Brady, L. S., Gold, P. W., Herkenham, M., Lynn, A. B., Whitfield, H. J., Jr., 1992. The antidepressants fluoxetine, idazoxan and phenelzine alter corticotropin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain: therapeutic implications. *Brain Res* 572, 117-125.
- Bramham, C. R., 2007. Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Prog Brain Res* 163, 453-471.
- Bravo, J. A., Diaz-Veliz, G., Mora, S., Ulloa, J. L., Berthoud, V. M., Morales, P., Arancibia, S., Fiedler, J. L., 2009. Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection. *Behav Pharmacol* 20, 273-285.
- Bruna, A., Nicolas, M., Munoz, A., Kyriakis, J. M., Caelles, C., 2003. Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *EMBO J* 22, 6035-6044.
- Brust, T. B., Cayabyab, F. S., MacVicar, B. A., 2007. C-Jun N-terminal kinase regulates adenosine A1 receptor-mediated synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 53, 906-917.
- Buckingham, J.C., 2006. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 147, 258-268.
- Budziszewska, B., Lason, W., 1994. Pharmacological modulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the rat central nervous system. *Pol J Pharmacol* 46, 97-102.

- Budziszewska, B., Szymanska, M., Leskiewicz, M., Basta-Kaim, A., Jaworska-Feil, L., Kubera, M., Jantas, D., Lason, W., 2010. The decrease in JNK- and p38-MAP kinase activity is accompanied by the enhancement of PP2A phosphate level in the brain of prenatally stressed rats. *J Physiol Pharmacol* 61, 207-215.
- Burke, H. M., Davis, M. C., Otte, C., Mohr, D. C., 2005. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 30, 846-856.
- Calfa, G., Kademian, S., Ceschin, D., Vega, G., Rabinovich, G. A., Volosin, M., 2003. Characterization and functional significance of glucocorticoid receptors in patients with major depression: modulation by antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology* 28, 687-701.
- Campbell, S., MacQueen, G., 2006. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Curr Opin Psychiatry* 19, 25-33.
- Cargnello, M., Roux, P. P., 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
- Carrasco, G. A., Van de Kar, L. D., 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463, 235-272.
- Carroll, B. J., 1982. Clinical applications of the dexamethasone suppression test for endogenous depression. *Pharmacopsychiatria* 15, 19-25.
- Carvalho, L. A., Juruena, M. F., Papadopoulos, A. S., Poon, L., Kerwin, R., Cleare, A. J., Pariante, C. M., 2008. Clomipramine in vitro reduces glucocorticoid receptor function in healthy subjects but not in patients with major depression. *Neuropsychopharmacology* 33, 3182-3189.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386-389.
- Cattaneo, A., Gennarelli, M., Uher, R., Breen, G., Farmer, A., Aitchison, K. J., Craig, I. W., Anacker, C., Zunsztain, P. A., McGuffin, P., Pariante, C. M., 2013. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology* 38, 377-385.
- Celada, P., Puig, M., Amargos-Bosch, M., Adell, A., Artigas, F., 2004. The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 29, 252-265.
- Charlton, B. G., 1992. Stress. *J Med Ethics* 18, 156-159.

- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67, 259-284.
- Chen, B., Dowlatsahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., Young, L. T., 2001a. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50, 260-265.
- Chen, R. H., Sarnecki, C., Blenis, J., 1992. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12, 915-927.
- Chen, W., Dang, T., Blind, R. D., Wang, Z., Cavasotto, C. N., Hittelman, A. B., Rogatsky, I., Logan, S. K., Garabedian, M. J., 2008. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol* 22, 1754-1766.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M. H., 2001b. MAP kinases. *Chem Rev* 101, 2449-2476.
- Chen, Z. Y., Jing, D., Bath, K. G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C. J., Herrera, D. G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B. S., Hempstead, B. L., Lee, F. S., 2006. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 314, 140-143.
- Chrousos, G. P., Gold, P. W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267, 1244-1252.
- Conway-Campbell, B. L., McKenna, M. A., Wiles, C. C., Atkinson, H. C., de Kloet, E. R., Lightman, S. L., 2007. Proteasome-dependent down-regulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone. *Endocrinology* 148, 5470-5477.
- Cook, S. C., Wellman, C. L., 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60, 236-248.
- Coppen, A., 1967. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113, 1237-1264.
- Critchlow, V., Liebelt, R. A., Bar-Sela, M., Mountcastle, W., Lipscomb, H. S., 1963. Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am J Physiol* 205, 807-815.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B. A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Cuadrado, A., Nebreda, A. R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429, 403-417.
- Czeh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., Fuchs, E., 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites,

- hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12796-12801.
- Dalla, C., Antoniou, K., Drossopoulou, G., Xagoraris, M., Kokras, N., Sfikakis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2005. Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience* 135, 703-714.
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D. A., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Artymyshyn, R. P., Gardier, A. M., Gerald, C., Antonijevic, I. A., Leonardo, E. D., Hen, R., 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479-493.
- Davies, L., Karthikeyan, N., Lynch, J. T., Sial, E. A., Gkourtsa, A., Demonacos, C., Krstic-Demonacos, M., 2008. Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol* 22, 1331-1344.
- Davis, M., Whalen, P. J., 2001. The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6, 13-34.
- Davis, R. J., 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- De Bellis, M. D., Baum, A. S., Birmaher, B., Keshavan, M. S., Eccard, C. H., Boring, A. M., Jenkins, F. J., Ryan, N. D., 1999. A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part I: Biological stress systems. *Biol Psychiatry* 45, 1259-1270.
- de Kloet, E. R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.
- DeBattista, C., Belanoff, J., Glass, S., Khan, A., Horne, R. L., Blasey, C., Carpenter, L. L., Alva, G., 2006. Mifepristone versus placebo in the treatment of psychosis in patients with psychotic major depression. *Biol Psychiatry* 60, 1343-1349.
- Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V., Pruessner, J. C., 2009. The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage* 47, 864-871.
- Deussing, J.M., 2006. Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3, 375-383.
- Djordjevic, A., Adzic, M., Djordjevic, J., Radojicic, M. B., 2009a. Chronic social isolation is related to both upregulation of plasticity genes and initiation of proapoptotic signaling in Wistar rat hippocampus. *J Neural Transm (Vienna)* 116, 1579-1589.

- Djordjevic, A., Adzic, M., Djordjevic, J., Radojicic, M. B., 2009b. Stress type dependence of expression and cytoplasmic-nuclear partitioning of glucocorticoid receptor, hsp90 and hsp70 in Wistar rat brain. *Neuropsychobiology* 59, 213-221.
- Djordjevic, S., Kovacevic, I., Miljkovic, B., Vuksanovic, J., Pokrajac, M., 2005. Liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma: application to clinical study. *Farmaco* 60, 345-349.
- Doble, B. W., Woodgett, J. R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116, 1175-1186.
- Drevets, W. C., 2000. Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog Brain Res* 126, 413-431.
- Drouin, J., Sun, Y. L., Chamberland, M., Gauthier, Y., De Lean, A., Nemer, M., Schmidt, T. J., 1993. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 12, 145-156.
- Duma, D., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., 2006. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 11-21.
- Duman, C. H., Schlesinger, L., Kodama, M., Russell, D. S., Duman, R. S., 2007. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 61, 661-670.
- Duman, R. S., 2004. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 56, 140-145.
- Duman, R. S., Monteggia, L. M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59, 1116-1127.
- Dunn, A. J., Swiergiel, A. H., de Beaurepaire, R., 2005. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29, 891-909.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H. S., Conley, R. R., Pandey, G. N., 2006a. ERK MAP kinase signaling in post-mortem brain of suicide subjects: differential regulation of upstream Raf kinases Raf-1 and B-Raf. *Mol Psychiatry* 11, 86-98.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H. S., Pandey, G. N., 2006b. Antidepressants reverse corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. *Neuroscience* 139, 1017-1029.

- Egeland, M., Warner-Schmidt, J., Greengard, P., Svenningsson, P., 2010. Neurogenic effects of fluoxetine are attenuated in p11 (S100A10) knockout mice. *Biol Psychiatry* 67, 1048-1056.
- Einat, H., Yuan, P., Gould, T. D., Li, J., Du, J., Zhang, L., Manji, H. K., Chen, G., 2003. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* 23, 7311-7316.
- Eisch, A. J., Bolanos, C. A., de Wit, J., Simonak, R. D., Pudiak, C. M., Barrot, M., Verhaagen, J., Nestler, E. J., 2003. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* 54, 994-1005.
- El Hage, W., Powell, J. F., Surguladze, S. A., 2009. Vulnerability to depression: what is the role of stress genes in gene x environment interaction? *Psychol Med* 39, 1407-1411.
- Embi, N., Rylatt, D. B., Cohen, P., 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107, 519-527.
- Eom, T. Y., Jope, R. S., 2009. Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α /beta impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol Psychiatry* 66, 494-502.
- Evans, R. M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Bast, R. C., Jr., Woodgett, J. R., Mills, G. B., 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11960-11965.
- Feldman, S., Conforti, N., Weidenfeld, J., 1995. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 19, 235-240.
- Feng, P., Guan, Z., Yang, X., Fang, J., 2003. Impairments of ERK signal transduction in the brain in a rat model of depression induced by neonatal exposure of clomipramine. *Brain Res* 991, 195-205.
- Fernandes, K. B., Tavares, R. F., Pelosi, G. G., Correa, F. M., 2007. The paraventricular nucleus of hypothalamus mediates the pressor response to noradrenergic stimulation of the medial prefrontal cortex in unanesthetized rats. *Neurosci Lett* 426, 101-105.

- Flores, B. H., Kenna, H., Keller, J., Solvason, H. B., Schatzberg, A. F., 2006. Clinical and biological effects of mifepristone treatment for psychotic depression. *Neuropsychopharmacology* 31, 628-636.
- Floyd, N. S., Price, J. L., Ferry, A. T., Keay, K. A., Bandler, R., 2001. Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 432, 307-328.
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M. J., 1999. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286, 1155-1158.
- Franklin, T. B., Perrot-Sinal, T. S., 2006. Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions. *Psychoneuroendocrinology* 31, 38-48.
- Frechilla, D., Otano, A., Del Rio, J., 1998. Effect of chronic antidepressant treatment on transcription factor binding activity in rat hippocampus and frontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22, 787-802.
- Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., Saklatvala, J., 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039-1049.
- Frodl, T., Carballo, A., Fagan, A. J., Lisiecka, D., Ferguson, Y., Meaney, J. F., 2012. Effects of early-life adversity on white matter diffusivity changes in patients at risk for major depression. *J Psychiatry Neurosci* 37, 37-45.
- Fuchs, E., Flugge, G., 1998. Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 295-300.
- Fumagalli, F., Molteni, R., Calabrese, F., Frasca, A., Racagni, G., Riva, M. A., 2005. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J Neurochem* 93, 1551-1560.
- Funato, H., Kobayashi, A., Watanabe, Y., 2006. Differential effects of antidepressants on dexamethasone-induced nuclear translocation and expression of glucocorticoid receptor. *Brain Res* 1117, 125-134.
- Galea, L. A., McEwen, B. S., Tanapat, P., Deak, T., Spencer, R. L., Dhabhar, F. S., 1997. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* 81, 689-697.

- Galeotti, N., Ghelardini, C., 2012. Selective modulation of the PKC ν epsilon/p38MAP kinase signalling pathway for the antidepressant-like activity of amitriptyline. *Neuropharmacology* 62, 289-296.
- Gallier-Beckley, A. J., Cidlowski, J. A., 2009. Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 61, 979-986.
- Gallier-Beckley, A. J., Williams, J. G., Collins, J. B., Cidlowski, J. A., 2008. Glycogen synthase kinase 3 β -mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 28, 7309-7322.
- Gershon, A. A., Vishne, T., Grunhaus, L., 2007. Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry* 61, 145-153.
- Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
- Goel, N., Bale, T. L., 2009. Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. *J Neuroendocrinol* 21, 415-420.
- Gold, P. W., Chrousos, G., Kellner, C., Post, R., Roy, A., Augerinos, P., Schulte, H., Oldfield, E., Loriaux, D. L., 1984. Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotropin-releasing factor. *Am J Psychiatry* 141, 619-627.
- Gold, P. W., Chrousos, G. P., 2002. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7, 254-275.
- Goode, N., Hughes, K., Woodgett, J. R., Parker, P. J., 1992. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 β by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem* 267, 16878-16882.
- Gormley, G. J., Lowy, M. T., Reder, A. T., Hospelhorn, V. D., Antel, J. P., Meltzer, H. Y., 1985. Glucocorticoid receptors in depression: relationship to the dexamethasone suppression test. *Am J Psychiatry* 142, 1278-1284.
- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., McEwen, B. S., 1992. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12, 3642-3650.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., Fuchs, E., 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3168-3171.

- Greden, J. F., 2001. The burden of recurrent depression: causes, consequences, and future prospects. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 22, 5-9.
- Groves, J. O., 2007. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry* 12, 1079-1088.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., Davis, R. J., 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15, 2760-2770.
- Habib, K. E., Gold, P. W., Chrousos, G. P., 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30, 695-728; vii-viii.
- Hajszan, T., MacLusky, N. J., Leranth, C., 2005. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 21, 1299-1303.
- Haleem, D.J., 2011. Raphe-hippocampal serotonin neurotransmission in the sex related differences of adaptation to stress focus on serotonin-1A receptor. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 512-521.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., Ulevitch, R. J., 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.
- Heim, C., Mletzko, T., Purselle, D., Musselman, D. L., Nemeroff, C. B., 2008. The dexamethasone/corticotropin-releasing factor test in men with major depression: role of childhood trauma. *Biol Psychiatry* 63, 398-405.
- Heim, C., Nemeroff, C. B., 1999. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry* 46, 1509-1522.
- Heim, C., Newport, D. J., Heit, S., Graham, Y. P., Wilcox, M., Bonsall, R., Miller, A. H., Nemeroff, C. B., 2000. Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA* 284, 592-597.
- Heim, C., Plotsky, P. M., Nemeroff, C. B., 2004. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 641-648.
- Heine, V. M., Zareno, J., Maslam, S., Joels, M., Lucassen, P. J., 2005. Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. *Eur J Neurosci* 21, 1304-1314.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20, 78-84.

- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Cullinan, W. E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24, 151-180.
- Herman, J. P., Prewitt, C. M., Cullinan, W. E., 1996. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol* 10, 371-394.
- Herman, J. P., Spencer, R., 1998. Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo. *J Neurosci* 18, 7462-7473.
- Hery, M., Semont, A., Fache, M. P., Faudon, M., Hery, F., 2000. The effects of serotonin on glucocorticoid receptor binding in rat raphe nuclei and hippocampal cells in culture. *J Neurochem* 74, 406-413.
- Herzog, C. J., Czeh, B., Corbach, S., Wuttke, W., Schulte-Herbruggen, O., Hellweg, R., Flugge, G., Fuchs, E., 2009. Chronic social instability stress in female rats: a potential animal model for female depression. *Neuroscience* 159, 982-992.
- Heydendael, W., Jacobson, L., 2010. Widespread hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis-relevant and mood-relevant effects of chronic fluoxetine treatment on glucocorticoid receptor gene expression in mice. *Eur J Neurosci* 31, 892-902.
- Hisaoka, K., Nishida, A., Koda, T., Miyata, M., Zensho, H., Morinobu, S., Ohta, M., Yamawaki, S., 2001. Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. *J Neurochem* 79, 25-34.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.
- Holsboer, F., 2001. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62, 77-91.
- Holsboer, F., Barden, N., 1996. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17, 187-205.
- Holsboer, F., Ising, M., 2008. Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 583, 350-357.
- House, J. S., 2001. Social isolation kills, but how and why? *Psychosom Med* 63, 273-274.
- Hurley, K. M., Herbert, H., Moga, M. M., Saper, C. B., 1991. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308, 249-276.
- Iio, W., Matsukawa, N., Tsukahara, T., Kohari, D., Toyoda, A., 2011. Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade. *Neurosci Lett* 504, 281-284.

- Ip, Y. T., Davis, R. J., 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-219.
- Irusen, E., Matthews, J. G., Takahashi, A., Barnes, P. J., Chung, K. F., Adcock, I. M., 2002. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109, 649-657.
- Ismaili, N., Garabedian, M. J., 2004. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 86-101.
- Issa, A. M., Rowe, W., Gauthier, S., Meaney, M. J., 1990. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 10, 3247-3254.
- Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H., Imai, K., 2002. Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* 16, 2382-2392.
- Iwasaki-Sekino, A., Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Yamauchi, N., Shibasaki, T., 2009. Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, 226-237.
- Jacobson, L., Sapolsky, R., 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12, 118-134.
- Guan, J.S., Su, C.S., Gao, L., Joseph, N., Xie, Y., Zhou, Y., Durak, O., Zhang, L., Zhu, J.J., Clauser, K.R., Carr, S.A., and Tsai, L.H., 2011. Cdk5 Is Required for Memory Function and Hippocampal Plasticity via the cAMP Signaling Pathway. *PLoS One* 6, e25735.
- Jakovljevic, M., 2013. Serotonin i Depresija, mitovi i činjenice. *Pro Mente*, Zagreb, 2013,
- Joels, M., de Kloet, E. R., 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43, 1-36.
- Johnson, G. L., Lapadat, R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Juruena, M. F., Cleare, A. J., Pariante, C. M., 2004. [The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression]. *Rev Bras Psiquiatr* 26, 189-201.

- Kaidanovich-Beilin, O., Milman, A., Weizman, A., Pick, C. G., Eldar-Finkelman, H., 2004. Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry* 55, 781-784.
- Kajantie, E., Phillips, D. I., 2006. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 31, 151-178.
- Kang, H., Welcher, A. A., Shelton, D., Schuman, E. M., 1997. Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 19, 653-664.
- Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., La Harpe, R., 2005. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* 136, 29-37.
- Kasckow, J. W., Baker, D., Geraciotti, T. D., Jr., 2001. Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides* 22, 845-851.
- Katz, E. R., Stowe, Z. N., Newport, D. J., Kelley, M. E., Pace, T. W., Cubells, J. F., Binder, E. B., 2012. Regulation of mRNA expression encoding chaperone and co-chaperone proteins of the glucocorticoid receptor in peripheral blood: association with depressive symptoms during pregnancy. *Psychol Med* 42, 943-956.
- Kaufman, J., Yang, B. Z., Douglas-Palumberi, H., Grasso, D., Lipschitz, D., Houshyar, S., Krystal, J. H., Gelernter, J., 2006. Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. *Biol Psychiatry* 59, 673-680.
- Kazlauskas, A., Cooper, J. A., 1988. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J Cell Biol* 106, 1395-1402.
- Keller-Wood, M. E., Dallman, M. F., 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5, 1-24.
- Keller, M. C., Neale, M. C., Kendler, K. S., 2007. Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. *Am J Psychiatry* 164, 1521-1529; quiz 1622.
- Kendler, K. S., Gatz, M., Gardner, C. O., Pedersen, N. L., 2006. A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am J Psychiatry* 163, 109-114.
- Kendler, K. S., Thornton, L. M., Prescott, C. A., 2001. Gender differences in the rates of exposure to stressful life events and sensitivity to their depressogenic effects. *Am J Psychiatry* 158, 587-593.
- Kessler, R. C., 2003. Epidemiology of women and depression. *J Affect Disord* 74, 5-13.

- Kessler, R. C., Frank, R. G., 1997. The impact of psychiatric disorders on work loss days. *Psychol Med* 27, 861-873.
- Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., Sun, Y., Burlingame, A. L., Wang, Z. Y., 2009. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* 11, 1254-1260.
- Kino, T., Ichijo, T., Amin, N. D., Kesavapany, S., Wang, Y., Kim, N., Rao, S., Player, A., Zheng, Y. L., Garabedian, M. J., Kawasaki, E., Pant, H. C., Chrousos, G. P., 2007. Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *Mol Endocrinol* 21, 1552-1568.
- Kitay, J. I., 1961. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology* 68, 818-824.
- Kitchener, P., Di Blasi, F., Borrelli, E., Piazza, P. V., 2004. Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *Eur J Neurosci* 19, 1837-1846.
- Kockeritz, L., Doble, B., Patel, S., Woodgett, J. R., 2006. Glycogen synthase kinase-3--an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug Targets* 7, 1377-1388.
- Kokras, N., Dalla, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2011. Sex differences in pharmacokinetics of antidepressants. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7, 213-226.
- Konarski, J. Z., McIntyre, R. S., Kennedy, S. H., Rafi-Tari, S., Soczynska, J. K., Ketter, T. A., 2008. Volumetric neuroimaging investigations in mood disorders: bipolar disorder versus major depressive disorder. *Bipolar Disord* 10, 1-37.
- Kondoh, K., Torii, S., Nishida, E., 2005. Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma* 114, 86-91.
- Korte, M., Staiger, V., Griesbeck, O., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., 1996. The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *J Physiol Paris* 90, 157-164.
- Kozlovsky, N., Amar, S., Belmaker, R. H., Agam, G., 2006. Psychotropic drugs affect Ser9-phosphorylated GSK-3 beta protein levels in rodent frontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 9, 337-342.
- Krishnan, K. R., Doraiswamy, P. M., Lurie, S. N., Figiel, G. S., Husain, M. M., Boyko, O. B., Ellinwood, E. H., Jr., Nemeroff, C. B., 1991. Pituitary size in depression. *J Clin Endocrinol Metab* 72, 256-259.

- Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., Lee, F. S., Tamminga, C. A., Cooper, D. C., Gershenfeld, H. K., Nestler, E. J., 2007. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131, 391-404.
- Krishnan, V., Nestler, E. J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894-902.
- Krishnan, V., Nestler, E. J., 2010. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry* 167, 1305-1320.
- Krstic, M. D., Rogatsky, I., Yamamoto, K. R., Garabedian, M. J., 1997. Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 17, 3947-3954.
- Kubera, M., Obuchowicz, E., Goehler, L., Brzeszcz, J., Maes, M., 2011. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 744-759.
- Kudielka, B. M., Kirschbaum, C., 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 69, 113-132.
- Kvetnansky, R., Pacak, K., Fukuhara, K., Viskupic, E., Hiremagalur, B., Nankova, B., Goldstein, D. S., Sabban, E. L., Kopin, I. J., 1995. Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann N Y Acad Sci* 771, 131-158.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., Woodgett, J. R., 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Meaney, M. J., Plotsky, P. M., 2000. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122, 81-103.
- Lai, M., McCormick, J. A., Chapman, K. E., Kelly, P. A., Seckl, J. R., Yau, J. L., 2003. Differential regulation of corticosteroid receptors by monoamine neurotransmitters and antidepressant drugs in primary hippocampal culture. *Neuroscience* 118, 975-984.

- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., i sar., 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.
- Lee, S. Y., Kang, J. S., Song, G. Y., Myung, C. S., 2006. Stress induces the expression of heterotrimeric G protein beta subunits and the phosphorylation of PKB/Akt and ERK1/2 in rat brain. *Neurosci Res* 56, 180-192.
- Lenormand, P., Brondello, J. M., Brunet, A., Pouyssegur, J., 1998. Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* 142, 625-633.
- Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C. R., Hamer, D. H., Murphy, D. L., 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274, 1527-1531.
- Li, H., Zhang, L., Huang, Q., 2009. Differential expression of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the hippocampus of rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behav Brain Res* 205, 32-37.
- Li, X., Zhu, W., Roh, M. S., Friedman, A. B., Rosborough, K., Jope, R. S., 2004. In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 29, 1426-1431.
- Lifschytz, T., Shalom, G., Lerer, B., Newman, M. E., 2006. Sex-dependent effects of fluoxetine and triiodothyronine in the forced swim test in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 16, 115-121.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., Meaney, M. J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lopez, J. F., Chalmers, D. T., Little, K. Y., Watson, S. J., 1998. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 43, 547-573.

- Lowy, M. T., 1991. Corticosterone regulation of brain and lymphoid corticosteroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39, 147-154.
- Lu, N. Z., Cidlowski, J. A., 2006. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16, 301-307.
- Lu, N.Z., Cidlowski, J.A., 2005. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 18, 331-342.
- Lutter, M., Sakata, I., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S. A., Anderson, J. G., Jung, S., Birnbaum, S., Yanagisawa, M., Elmquist, J. K., Nestler, E. J., Zigman, J. M., 2008. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci* 11, 752-753.
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., Wihler, C., Koliatsos, V. E., Tessarollo, L., 1999. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15239-15244.
- Maes, M., Kubera, M., Mihaylova, I., Geffard, M., Galecki, P., Leunis, J. C., Berk, M., 2013. Increased autoimmune responses against auto-epitopes modified by oxidative and nitrosative damage in depression: implications for the pathways to chronic depression and neuroprogression. *J Affect Disord* 149, 23-29.
- Magarinos, A. M., McEwen, B. S., 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 69, 83-88.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., Duman, R. S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110.
- Malkesman, O., Maayan, R., Weizman, A., Weller, A., 2006. Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behav Brain Res* 175, 408-414.
- Malkoski, S. P., Dorin, R. I., 1999. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* 13, 1629-1644.
- Malviya, S. A., Kelly, S. D., Greenlee, M. M., Eaton, D. C., Duke, B. J., Bourke, C. H., Neigh, G. N., 2013. Estradiol stimulates an anti-translocation expression pattern of glucocorticoid co-regulators in a hippocampal cell model. *Physiol Behav* 122, 187-192.

- Manji, H. K., Drevets, W. C., Charney, D. S., 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7, 541-547.
- Mao, Y., Ge, X., Frank, C. L., Madison, J. M., Koehler, A. N., Doud, M. K., Tassa, C., Berry, E. M., Soda, T., Singh, K. K., Biechele, T., Petryshen, T. L., Moon, R. T., Haggarty, S. J., Tsai, L. H., 2009. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* 136, 1017-1031.
- Marmigere, F., Givalois, L., Rage, F., Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., 2003. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus* 13, 646-655.
- Martinowich, K., Manji, H., Lu, B., 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 10, 1089-1093.
- Matsubara, T., Funato, H., Kobayashi, A., Nobumoto, M., Watanabe, Y., 2006. Reduced Glucocorticoid Receptor alpha Expression in Mood Disorder Patients and First-Degree Relatives. *Biol Psychiatry* 59, 689-695.
- McCauley, J., Kern, D. E., Kolodner, K., Dill, L., Schroeder, A. F., DeChant, H. K., Ryden, J., Derogatis, L. R., Bass, E. B., 1997. Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA* 277, 1362-1368.
- McEwen, B. S., 2005. Stressed or stressed out: what is the difference? *J Psychiatry Neurosci* 30, 315-318.
- McEwen, B. S., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87, 873-904.
- McEwen, B. S., Gianaros, P. J., 2010. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1186, 190-222.
- McEwen, B. S., Stellar, E., 1993. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153, 2093-2101.
- McEwen, B. S., Wingfield, J. C., 2010. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm Behav* 57, 105-111.
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., Meaney, M. J., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12, 342-348.
- McKay, L. I., Cidlowski, J. A., 1998. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 12, 45-56.

- McKinney, W. T., 2001. Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry. *Semin Clin Neuropsychiatry* 6, 68-78.
- McKittrick, C. R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S., Sakai, R. R., 1995. Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry* 37, 383-393.
- Menke, A., Arloth, J., Putz, B., Weber, P., Klengel, T., Mehta, D., Gonik, M., Rex-Haffner, M., Rubel, J., Uhr, M., Lucae, S., Deussing, J. M., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., Binder, E. B., 2012. Dexamethasone stimulated gene expression in peripheral blood is a sensitive marker for glucocorticoid receptor resistance in depressed patients. *Neuropsychopharmacology* 37, 1455-1464.
- Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M. O., Anisman, H., 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci* 24, 1478-1485.
- Miller, A. L., Webb, M. S., Copik, A. J., Wang, Y., Johnson, B. H., Kumar, R., Thompson, E. B., 2005. p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* 19, 1569-1583.
- Mitic, M., Simic, I., Djordjevic, J., Radojic, M. B., Adzic, M., 2013. Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. *Neuropharmacology* 70, 100-111.
- Monteggia, L. M., Luikart, B., Barrot, M., Theobald, D., Malkovska, I., Nef, S., Parada, L. F., Nestler, E. J., 2007. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry* 61, 187-197.
- Morley-Fletcher, S., Darnaudery, M., Mocaer, E., Froger, N., Lanfumey, L., Laviola, G., Casolini, P., Zuena, A. R., Marzano, L., Hamon, M., Maccari, S., 2004. Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in prenatally stressed rats. *Neuropharmacology* 47, 841-847.
- Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A., Arkinstall, S., 1996. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 271, 27205-27208.

- Mullen, P. E., Martin, J. L., Anderson, J. C., Romans, S. E., Herbison, G. P., 1996. The long-term impact of the physical, emotional, and sexual abuse of children: a community study. *Child Abuse Negl* 20, 7-21.
- Mulrow, C. D., Williams, J. W., Jr., Chiquette, E., Aguilar, C., Hitchcock-Noel, P., Lee, S., Cornell, J., Stamm, K., 2000. Efficacy of newer medications for treating depression in primary care patients. *Am J Med* 108, 54-64.
- Munck, A., Guyre, P. M., Holbrook, N. J., 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5, 25-44.
- Murgatroyd, C., Patchev, A. V., Wu, Y., Micale, V., Bockmuhl, Y., Fischer, D., Holsboer, F., Wotjak, C. T., Almeida, O. F., Spengler, D., 2009. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 12, 1559-1566.
- Murphy, E. K., Spencer, R. L., Sipe, K. J., Herman, J. P., 2002. Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR) protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus. *Endocrinology* 143, 1362-1370.
- Musazzi, L., Cattaneo, A., Tardito, D., Barbon, A., Gennarelli, M., Barlati, S., Racagni, G., Popoli, M., 2009. Early raise of BDNF in hippocampus suggests induction of posttranscriptional mechanisms by antidepressants. *BMC Neurosci* 10, 48.
- Nakagawa, S., Kim, J. E., Lee, R., Malberg, J. E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y. J., Nestler, E. J., Duman, R. S., 2002. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 22, 3673-3682.
- Neigh, G. N., Nemeroff, C. B., 2006. Reduced glucocorticoid receptors: consequence or cause of depression? *Trends Endocrinol Metab* 17, 124-125.
- Nemeroff, C. B., 1986. The interaction of neurotensin with dopaminergic pathways in the central nervous system: basic neurobiology and implications for the pathogenesis and treatment of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 11, 15-37.
- Nemeroff, C. B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C. D., Loosen, P. T., Vale, W., 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226, 1342-1344.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., Monteggia, L. M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.
- Newton, S. S., Duman, R. S., 2004. Regulation of neurogenesis and angiogenesis in depression. *Curr Neurovasc Res* 1, 261-267.

- Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R. S., 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15, 7539-7547.
- Noguchi, T., Makino, S., Matsumoto, R., Nakayama, S., Nishiyama, M., Terada, Y., Hashimoto, K., 2010. Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology* 151, 4344-4355.
- Nolen-Hoeksema, S., 2001. Gender Differences in Depression. *Current Directions in Psychological Science* 10, 173-176.
- O'Brien, W. T., Harper, A. D., Jove, F., Woodgett, J. R., Maretto, S., Piccolo, S., Klein, P. S., 2004. Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* 24, 6791-6798.
- Oakley, R. H., Cidlowski, J. A., 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132, 1033-1044.
- Oakley, R. H., Revollo, J., Cidlowski, J. A., 2012. Glucocorticoids regulate arrestin gene expression and redirect the signaling profile of G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17591-17596.
- Ohshima, T., Ogura, H., Tomizawa, K., Hayashi, K., Suzuki, H., Saito, T., Kamei, H., Nishi, A., Bibb, J. A., Hisanaga, S., Matsui, H., Mikoshiba, K., 2005. Impairment of hippocampal long-term depression and defective spatial learning and memory in p35 mice. *J Neurochem* 94, 917-925.
- Oitzl, M. S., Champagne, D. L., van der Veen, R., de Kloet, E. R., 2010. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 34, 853-866.
- Opmeer, E. M., Kortekaas, R., Aleman, A., 2010. Depression and the role of genes involved in dopamine metabolism and signalling. *Prog Neurobiol* 92, 112-133.
- Orti, E., Mendel, D. B., Smith, L. I., Munck, A., 1989. Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J Biol Chem* 264, 9728-9731.
- Pacak, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22, 502-548.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., Pouyssegur, J., 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.

- Palanza, P., 2001. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25, 219-233.
- Papadimitriou, A., Priftis, K. N., 2009. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 16, 265-271.
- Papadopoulou S., Siamatras, T., Delgado-Morales, R., Amin, N.D., Shukla, V., Zheng, Z.L., Pant, H.C., Almeida, O.F.X., and Kino, T., 2015. Acute and chronic stress differentially regulate cyclin-dependent kinase 5 in mouse brain: implications to glucocorticoid actions and major depression. *Translational Psychiatry* 5, e578.
- Papolos, D. F., Edwards, E., Marmur, R., Lachman, H. M., Henn, F. A., 1993. Effects of the antiglucocorticoid RU 38486 on the induction of learned helpless behavior in Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 615, 304-309.
- Pardon, M. C., Roberts, R. E., Marsden, C. A., Bianchi, M., Latif, M. L., Duxon, M. S., Kendall, D. A., 2005. Social threat and novel cage stress-induced sustained extracellular-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation but differential modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of NMRI mice. *Neuroscience* 132, 561-574.
- Pariante, C. M., Lightman, S. L., 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31, 464-468.
- Pariante, C. M., Miller, A. H., 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 49, 391-404.
- Pariante, C. M., Pearce, B. D., Pisell, T. L., Sanchez, C. I., Po, C., Su, C., Miller, A. H., 1999. The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* 140, 4359-4366.
- Peiffer, A., Veilleux, S., Barden, N., 1991. Antidepressant and other centrally acting drugs regulate glucocorticoid receptor messenger RNA levels in rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 16, 505-515.
- Peineau, S., Taghibiglou, C., Bradley, C., Wong, T. P., Liu, L., Lu, J., Lo, E., Wu, D., Saule, E., Bouschet, T., Matthews, P., Isaac, J. T., Bortolotto, Z. A., Wang, Y. T., Collingridge, G. L., 2007. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron* 53, 703-717.
- Pepin, M. C., Govindan, M. V., Barden, N., 1992. Increased glucocorticoid receptor gene promoter activity after antidepressant treatment. *Mol Pharmacol* 41, 1016-1022.

- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., Swanson, L. W., 2001. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev* 38, 247-289.
- Pilar Matud, M., 2004. Gender differences in stress and coping styles. *Personality and Individual Differences* 37, 1401-1415.
- Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., Ylinen, A., 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911, 369-391.
- Pittenger, C., Duman, R. S., 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 88-109.
- Pitychoutis, P. M., Pallis, E. G., Mikail, H. G., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2011. Individual differences in novelty-seeking predict differential responses to chronic antidepressant treatment through sex- and phenotype-dependent neurochemical signatures. *Behav Brain Res* 223, 154-168.
- Pliakas, A. M., Carlson, R. R., Neve, R. L., Konradi, C., Nestler, E. J., Carlezon, W. A., Jr., 2001. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci* 21, 7397-7403.
- Plotsky, P. M., Meaney, M. J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18, 195-200.
- Polman, J.A.E. 2016. Glucocorticoid signature in a neuronal genomic context. PhD Thesis, Leiden University
- Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47, 379-391.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Pouyssegur, J., Volmat, V., Lenormand, P., 2002. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755-763.
- Pratt, W. B., Toft, D. O., 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360.
- Purba, J. S., Hoogendijk, W. J., Hofman, M. A., Swaab, D. F., 1996. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry* 53, 137-143.

- Qi, M., Elion, E. A., 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118, 3569-3572.
- Qi, X., Lin, W., Li, J., Pan, Y., Wang, W., 2006. The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress. *Behav Brain Res* 175, 233-240.
- Qi, D. i Rodrigues, B., 2007. Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E654-67.
- Raadsheer, F. C., Hoogendijk, W. J., Stam, F. C., Tilders, F. J., Swaab, D. F., 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60, 436-444.
- Rajkowska, G., 2003. Depression: what we can learn from postmortem studies. *Neuroscientist* 9, 273-284.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S. D., Meltzer, H. Y., Overholser, J. C., Roth, B. L., Stockmeier, C. A., 1999. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* 45, 1085-1098.
- Raman, M., Chen, W., Cobb, M. H., 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.
- Rasmusson, A. M., Shi, L., Duman, R., 2002. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology* 27, 133-142.
- Reul, J. M., de Kloet, E. R., 1986. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J Steroid Biochem* 24, 269-272.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A. S., Duffraisse, M., Laudet, V., 2001. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 17, 554-556.
- Robinson, M. J., Cobb, M. H., 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 180-186.
- Rogatsky, I., Logan, S. K., Garabedian, M. J., 1998. Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2050-2055.
- Roh, M. S., Seo, M. S., Kim, Y., Kim, S. H., Jeon, W. J., Ahn, Y. M., Kang, U. G., Juhnn, Y. S., Kim, Y. S., 2007. Haloperidol and clozapine differentially regulate signals

- upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex. *Exp Mol Med* 39, 353-360.
- Rohleder, N., Schommer, N. C., Hellhammer, D. H., Engel, R., Kirschbaum, C., 2001. Sex differences in glucocorticoid sensitivity of proinflammatory cytokine production after psychosocial stress. *Psychosom Med* 63, 966-972.
- Roskoski, R., Jr., 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.
- Roth, T. L., Lubin, F. D., Funk, A. J., Sweatt, J. D., 2009. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry* 65, 760-769.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A. R., 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.
- Rubin, R. T., Poland, R. E., Lesser, I. M., Winston, R. A., Blodgett, A. L., 1987. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry* 44, 328-336.
- Ruhe, H. G., Mason, N. S., Schene, A. H., 2007. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* 12, 331-359.
- Rutledge, R. G., Cote, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31, e93.
- Rygula, R., Abumaria, N., Havemann-Reinecke, U., Ruther, E., Hiemke, C., Zernig, G., Fuchs, E., Flugge, G., 2008. Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: effects of reboxetine, haloperidol and diazepam. *Behav Pharmacol* 19, 183-196.
- Sachar, E. J., Baron, M., 1979. The biology of affective disorders. *Annu Rev Neurosci* 2, 505-517.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castren, M., Castren, E., 2005. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 25, 1089-1094.
- Samuvel, D. J., Jayanthi, L. D., Bhat, N. R., Ramamoorthy, S., 2005. A role for p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of the serotonin transporter: evidence for

- distinct cellular mechanisms involved in transporter surface expression. *J Neurosci* 25, 29-41.
- Sanchez, M. M., Aguado, F., Sanchez-Toscano, F., Saphier, D., 1998. Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. *Endocrinology* 139, 579-587.
- Sandi, C., Cordero, M. I., Ugolini, A., Varea, E., Caberlotto, L., Large, C. H., 2008. Chronic stress-induced alterations in amygdala responsiveness and behavior--modulation by trait anxiety and corticotropin-releasing factor systems. *Eur J Neurosci* 28, 1836-1848.
- Sapolsky, R. M., 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57, 925-935.
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., McEwen, B. S., 1986. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7, 284-301.
- Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W. C., 2009. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88, 17-31.
- Schaaf, M. J., De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., 2000. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress* 3, 201-208.
- Schmidt, M. V., Sterlemann, V., Wagner, K., Niederleitner, B., Ganea, K., Liebl, C., Deussing, J. M., Berger, S., Schutz, G., Holsboer, F., Muller, M. B., 2009. Postnatal glucocorticoid excess due to pituitary glucocorticoid receptor deficiency: differential short- and long-term consequences. *Endocrinology* 150, 2709-2716.
- Seckl, J. R., Fink, G., 1992. Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo. *Neuroendocrinology* 55, 621-626.
- Shah, K., Lahiri, D. K., 2014. Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *J Cell Sci* 127, 2391-2400.
- Sheline, Y. I., 2003. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry* 54, 338-352.
- Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., Vannier, M. W., 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3908-3913.

- Shen, C. P., Tsimberg, Y., Salvadore, C., Meller, E., 2004. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci* 5, 36.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., Iyo, M., 2003. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54, 70-75.
- Shirayama, Y., Chen, A. C., Nakagawa, S., Russell, D. S., Duman, R. S., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22, 3251-3261.
- Shishkina, G. T., Dygalo, N. N., 2010. [Neurobiological mechanisms of depression and antidepressant therapy]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 60, 138-152.
- Silva, R., Mesquita, A. R., Bessa, J., Sousa, J. C., Sotiropoulos, I., Leao, P., Almeida, O. F., Sousa, N., 2008. Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. *Neuroscience* 152, 656-669.
- Simic, I., Maric, N. P., Mitic, M., Soldatovic, I., Pavlovic, Z., Mihaljevic, M., Andric, S., Radojicic, M. B., Adzic, M., 2013. Phosphorylation of leukocyte glucocorticoid receptor in patients with current episode of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40, 281-285.
- Sousa, A. R., Lane, S. J., Cidlowski, J. A., Staynov, D. Z., Lee, T. H., 2000. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* 105, 943-950.
- Spiliotaki, M., Salpeas, V., Malitas, P., Alevizos, V., Moutsatsou, P., 2006. Altered glucocorticoid receptor signaling cascade in lymphocytes of bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology* 31, 748-760.
- Stambolic, V., Woodgett, J. R., 1994. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303 (Pt 3), 701-704.
- Stein, P., Savli, M., Wadsak, W., Mitterhauser, M., Fink, M., Spindelegger, C., Mien, L. K., Moser, U., Dudczak, R., Kletter, K., Kasper, S., Lanzenberger, R., 2008. The serotonin-1A receptor distribution in healthy men and women measured by PET and [carbonyl-11C]WAY-100635. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 2159-2168.
- Sterling, P., Eyer, J., 1988. "Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In Fisher, S.; Reason, J. T. *Handbook of life stress, cognition, and health*. Chicester, NY: Wiley. ISBN 9780471912699. OCLC 17234042.

- Stockmeier, C. A., Mahajan, G. J., Konick, L. C., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Meltzer, H. Y., Uylings, H. B., Friedman, L., Rajkowska, G., 2004. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56, 640-650.
- Stokes, P. E., Holtz, A., 1997. Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. *Clin Ther* 19, 1135-1250.
- Sullivan, P. F., Neale, M. C., Kendler, K. S., 2000. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157, 1552-1562.
- Sun, H.L., Zhou, Z.Q., Zhang, G.F., Yang, C., Wang, X.M., Shen, J.C., Hashimoto, K., Yang, J.J., 2016. Role of hippocampal p11 in the sustained antidepressant effect of ketamine in the chronic unpredictable mild stress model. *Transl. Psychiatry* 6, e741.
- Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El Yacoubi, M., Vaugeois, J. M., Nomikos, G. G., Greengard, P., 2006. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 311, 77-80.
- Swaab, D. F., Bao, A. M., Lucassen, P. J., 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 4, 141-194.
- Szymanska, M., Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Leskiewicz, M., Regulska, M., Lason, W., 2009. The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, 822-832.
- Tahera, Y., Meltzer, I., Johansson, P., Canlon, B., 2006. Restraint stress modulates glucocorticoid receptors and nuclear factor kappa B in the cochlea. *Neuroreport* 17, 879-882.
- Taler, M., Bar, M., Korob, I., Lomnitski, L., Baharav, E., Grunbaum-Novak, N., Weizman, A., Gil-Ad, I., 2008. Evidence for an inhibitory immunomodulatory effect of selected antidepressants on rat splenocytes: possible relevance to depression and hyperactive-immune disorders. *Int Immunopharmacol* 8, 526-533.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., Arancibia, S., 2004. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* 25, 77-107.
- Thornton, T. M., Rincon, M., 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5, 44-51.
- Tiraboschi, E., Giambelli, R., D'Urso, G., Galletta, A., Barbon, A., de Bartolomeis, A., Gennarelli, M., Barlati, S., Racagni, G., Popoli, M., 2004. Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation. *Neuroreport* 15, 2393-2396.

- Todorovic, C., Sherrin, T., Pitts, M., Hippel, C., Rayner, M., Spiess, J., 2009. Suppression of the MEK/ERK signaling pathway reverses depression-like behaviors of CRF2-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 1416-1426.
- Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., Nishida, E., 2004. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7, 33-44.
- Tsai, L. H., Delalle, I., Caviness, V. S., Jr., Chae, T., Harlow, E., 1994. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 419-423.
- Tsigos, C., Chrousos, G. P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-871.
- Uher, R., 2008. The implications of gene-environment interactions in depression: will cause inform cure? *Mol Psychiatry* 13, 1070-1078.
- Van de Kar, L. D., Blair, M. L., 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 20, 1-48.
- van der Hart, M. G., Czeh, B., de Biurrun, G., Michaelis, T., Watanabe, T., Natt, O., Frahm, J., Fuchs, E., 2002. Substance P receptor antagonist and clomipramine prevent stress-induced alterations in cerebral metabolites, cytogenesis in the dentate gyrus and hippocampal volume. *Mol Psychiatry* 7, 933-941.
- Vandevyver, S., Dejager, L., Libert, C., 2012. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* 13, 364-374.
- Videbech, P., Ravnkilde, B., 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161, 1957-1966.
- Wada, T., Nakagawa, K., Watanabe, T., Nishitai, G., Seo, J., Kishimoto, H., Kitagawa, D., Sasaki, T., Penninger, J. M., Nishina, H., Katada, T., 2001. Impaired synergistic activation of stress-activated protein kinase SAPK/JNK in mouse embryonic stem cells lacking SEK1/MKK4: different contribution of SEK2/MKK7 isoforms to the synergistic activation. *J Biol Chem* 276, 30892-30897.
- Wang, R., Xu, Y., Wu, H. L., Li, Y. B., Li, Y. H., Guo, J. B., Li, X. J., 2008. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT1 and 5-HT2 receptors. *Eur J Pharmacol* 578, 43-50.
- Wang, X., Wu, H., Miller, A. H., 2004. Interleukin 1alpha (IL-1alpha) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function. *Mol Psychiatry* 9, 65-75.

- Wang, Z., Chen, W., Kono, E., Dang, T., Garabedian, M. J., 2007. Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol* 21, 625-634.
- Warner-Schmidt, J. L., Vanover, K. E., Chen, E. Y., Marshall, J. J., Greengard, P., 2011. Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9262-9267.
- Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B. S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588, 341-345.
- Watson, S., Gallagher, P., Porter, R. J., Smith, M. S., Herron, L. J., Bulmer, S., North-East Mood Disorders Clinical Research, G., Young, A. H., Ferrier, I. N., 2012. A randomized trial to examine the effect of mifepristone on neuropsychological performance and mood in patients with bipolar depression. *Biol Psychiatry* 72, 943-949.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M. J., 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7, 847-854.
- Webster, M. J., Knable, M. B., O'Grady, J., Orthmann, J., Weickert, C. S., 2002. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry* 7, 985-994, 924.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L., 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Willoughby, E. A., Collins, M. K., 2005. Dynamic interaction between the dual specificity phosphatase MKP7 and the JNK3 scaffold protein beta-arrestin 2. *J Biol Chem* 280, 25651-25658.
- Wong, D. T., Bymaster, F. P., Engleman, E. A., 1995. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 57, 411-441.
- Wong, M. L., Licinio, J., 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* 2, 343-351.
- Woolley, C. S., Gould, E., McEwen, B. S., 1990. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531, 225-231.

- Wray, N. R., Pergadia, M. L., Blackwood, D. H., Penninx, B. W., Gordon, S. D., Nyholt, D. R., Ripke, S., MacIntyre, D. J., McGhee, K. A., Maclean, A. W., Smit, J. H., Hottenga, J. J., Willemsen, G., Middeldorp, C. M., de Geus, E. J., Lewis, C. M., McGuffin, P., Hickie, I. B., van den Oord, E. J., Liu, J. Z., Macgregor, S., McEvoy, B. P., Byrne, E. M., Medland, S. E., Statham, D. J., Henders, A. K., Heath, A. C., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Boomsma, D. I., Madden, P. A., Sullivan, P. F., 2012. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. *Mol Psychiatry* 17, 36-48.
- Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U. A., Su, M. S., Kuida, K., Boucher, D. M., 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12759-12764.
- Yau, J. L., Hibberd, C., Noble, J., Seckl, J. R., 2002. The effect of chronic fluoxetine treatment on brain corticosteroid receptor mRNA expression and spatial memory in young and aged rats. *Brain Res Mol Brain Res* 106, 117-123.
- Yoon, S., Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- Young, A. H., Gallagher, P., Watson, S., Del-Estal, D., Owen, B. M., Ferrier, I. N., 2004. Improvements in neurocognitive function and mood following adjunctive treatment with mifepristone (RU-486) in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 29, 1538-1545.
- Young, E., Korszun, A., 2010. Sex, trauma, stress hormones and depression. *Mol Psychiatry* 15, 23-28.
- Young, E. A., Altemus, M., Parkison, V., Shastri, S., 2001. Effects of estrogen antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats. *Neuropsychopharmacology* 25, 881-891.
- Zafir, A., Banu, N., 2009. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12, 167-177.
- Zhang, L., Su, T. P., Choi, K., Maree, W., Li, C. T., Chung, M. Y., Chen, Y. S., Bai, Y. M., Chou, Y. H., Barker, J. L., Barrett, J. E., Li, X. X., Li, H., Benedek, D. M., Ursano, R., 2011. P11 (S100A10) as a potential biomarker of psychiatric patients at risk of suicide. *J Psychiatr Res* 45, 435-441.
- Zhong, P., Liu, W., Gu, Z., Yan, Z., 2008. Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. *J Physiol* 586, 4465-4479.

- Zhong, P., Liu, X., Zhang, Z., Hu, Y., Liu, S. J., Lezama-Ruiz, M., Joksimovic, M., Liu, Q. S., 2014. Cyclin-dependent kinase 5 in the ventral tegmental area regulates depression-related behaviors. *J Neurosci* 34, 6352-6366.
- Zhu, W. L., Shi, H. S., Wang, S. J., Xu, C. M., Jiang, W. G., Wang, X., Wu, P., Li, Q. Q., Ding, Z. B., Lu, L., 2012. Increased Cdk5/p35 activity in the dentate gyrus mediates depressive-like behaviour in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 15, 795-809.
- Zobel, A. W., Nickel, T., Sonntag, A., Uhr, M., Holsboer, F., Ising, M., 2001. Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression. a prospective study. *J Psychiatr Res* 35, 83-94.
- Zorner, B., Wolfer, D. P., Brandis, D., Kretz, O., Zacher, C., Madani, R., Grunwald, I., Lipp, H. P., Klein, R., Henn, F. A., Gass, P., 2003. Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: behaviorally more hyperactive than "depressive". *Biol Psychiatry* 54, 972-982.

Biografija autora

Miloš (Zoran) Mitić rođen je 22. septembra 1984. godine u Beogradu. Osnovnu školu i srednju Medicinsku školu Beograd završio je sa odličnim uspehom. Školske 2003/04. upisao je Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Biohemija) na kome je diplomirao 2009. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Školske 2009/10. upisao je doktorske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, smer Neuronauke.

Od 1. juna 2009. godine zaposlen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, gde i sada radi na radnom mestu istraživač-saradnik u okviru projekta III 41029 „*Definisanje klastera molekulskih biomarkera za poboljšanje i terapiju poremećaja raspoloženja*“, finansiranog od strane Ministarstva nauke Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića, višeg naučnog saradnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. Od februara 2014. godine angažovan je i na međunarodnom projektu R21 MH098793-01A1 pod nazivom “*Pre-Clinical and Patient Studies of Affective Disorders in Serbia*” finansiranom od strane Nacionalnog Instituta za Zdravlje (NIH), SAD.

Od 2012. godine predsednik je Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. Takođe Miloš Mitić je član Društva za neuronauke Srbije, EBBS-a i FENS-a. Dobitnik je stipendije FENS-a za učešće na FENS Featured Regional Meeting (FFRM) 2015. godine u Solunu, od 7-10 oktobra.

U dosadašnjoj naučnoj karijeri Miloš Mitić je autor i koautor **17** radova u vodećim međunarodnim naučnim časopisima, od kojih je u **4** rada prvi autor, zatim jednog poglavlja u knjizi, kao i brojnih međunarodnih kongresnih saopštenja štampanih u celini i izvodu

Prilozi

Doktorska disertacija

Diskusija

Prilozi

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милош Митић

Број индекса Б3232/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Полно-специфичан ефекат флуоксетина на сигнализацију посредовану гдукокортикоидним рецептором у хипокампусу пацова излаганих хроничном стресу изолације

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Milosh Mitic

Doktorska disertacija

Diskusija

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског радаИме и презиме аутора Милош МитићБрој индекса Б3232/2009Студијски програм БиологијаНаслов рада Полно-специфичан ефекат флуоксетина на сигнализацију посредовану глукокортикоидним рецептором у хипокампусу пацова излаганих хроничном стресу изолације.Ментор др Мирослав Ацић и проф. др Надежда Недељковић

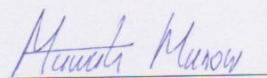
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____



Изјава о коришћењу

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

Полно-специфичан ефекат флуоксетина на сигнализацију посредовану глукортикоидним рецептором у хипокампусу пацова излаганих хроничном стресу изолације.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

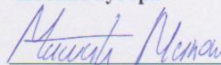
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

