

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dunja R. Drakulić

**MODULACIJA APOPTOTSKIH
SIGNALNIH PUTEVA U ČELIJAMA
MOZGA ODRASLIH PACOVA NAKON
HRONIČNOG TRETMANA
DEKSAMETAZONOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dunja R. Drakulić

**MODULATION OF APOPTOTIC
SIGNALING PATHWAYS IN BRAIN
CELLS OF ADULT MALE RATS
AFTER CHRONIC DEXAMETHASONE
TREATMENT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

*Dr Anica Horvat, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearna nauke
„Vinča“*

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

Članovi komisije:

*Dr Mirjana Stojiljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“*

*Dr Milena Kataranovski, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka
istraživanja „Siniša Stanković“, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki
fakultet*

*Dr Nataša Veličković, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka
istraživanja „Siniša Stanković“*

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata: „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara“ (173044, rukovodilac dr Anica Horvat) i „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (41014, rukovodilac prof. dr Mirjana Stojiljković), koje finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Iskreno se zahvaljujem mentoru dr Anici Horvat na pruženoj podršci i poverenju, kao i na dobrim uslovima za eksperimentalni rad. Hvala na strpljivom i pažljivom usmeravanju mog profesionalnog razvoja, na korisnim sugestijama i potpunoj slobodi u radu.

Mentoru prof. dr Nadeždi Nedeljković se zahvaljujem na profesionalnoj podršci, nesebičnoj pomoći i dragocenim savetima.

Zahvaljujem se prof. dr Mirjani Stojiljković na svim sugestijama i savetima.

Posebnu zahvalnost dugujem „mom suđenom/nesuđenom mentoru“ dr Nataši Veličković koja me je strpljivo vodila na početku doktorata, ali i na kraju, nesebično deleći sa mnom svoje znanje, iskustvo i dragoceno vreme. Hvala na prijateljskoj podršci, dostupnosti, velikoj posvećenosti i neprocenjivoj pomoći u izradi ove disertacije i pisanju radova.

Najsrdahnije se zahvaljujem Milošu na „svetlim trenucima“ i iskrenom prijateljstvu koje je obeležilo ovaj period mog života i rada.

Hvala koleginicama Ivani, Nataši, „maloj“ Ivani i Jovani na podršci, prijatnoj i prijateljskoj atmosferi za rad.

Kolegama iz „Majine grupe“ dugujem zahvalnost za „pozajmljena“ antitela, prajmere i ostale hemikalije, ali prvenstveno na divnom druženju.

I na kraju, ali ne i na poslednjem mestu, mami, tati i bratu dugujem beskonačno veliko HVALA, kao i „pridruženim članovima“ na neizmernoj ljubavi, strpljenju, razumevanju i nesebičnoj podršci koju su mi pružali svih ovih godina.

REZIME:

Modulacija apoptotskih signalnih puteva u ćelijama mozga odraslih pacova nakon hroničnog tretmana deksametazonom

Deksametazon, jak sintetski glukokortikoid, se dugi niz godina koristi kao lek u tretmanu različitih bolesti poput psorijaze, adrenalne insuficijencije, bakterijalnog meningitisa, moždanih trauma, šloga, alergija, spazma bronhija, reumatidnog artritisa, itd; ali i kao pomoćni lek u hemo- i radioterapiji. Brojne studije ukazuju da deksametazon može regulisati sinaptičku plastičnost, povećati vijabilnost ćelija i njihovu proliferaciju u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Međutim, uprkos širokoj primeni u terapijske svrhe primećeno je da deksametazon ispoljava i niz negativnih efekata u mozgu, na primer apoptozu u granularnom sloju dentatnog girusa hipokampusa kod mladih i starih pacova, kao i smanjenje kognitivnih funkcija i motornog razvoja. Usled neusklađenosti rezultata mnogih studija, proučavanje sistemskih efekata, kao i efekata deksametazona u mozgu predstavljaju interesantno polje istraživanja prvenstveno jer se efekti niskih doza ovog sintetskog glukokortikoida ne mogu ispitivati centralno usled blokiranja njegovog ulaska dejstvom MDR p-glikoproteina i/ili nekim drugim mehanizmom. Stoga, za potrebe eksperimenta, odrasli mužjaci pacova Wistar soja su podeljeni u dve grupe– kontrolne jedinice i životinje tretirane deksametazonom (100 µg/kg/dan) tokom 7 uzastopnih dana. 28 h nakon završetka hroničnog tretmana životinje su žrtvovane. Sistemski efekat deksametazona je praćen promenom biometrijskih parametara (telesna masa, masa timusa i nadbubrežnih žlezdi), kao i koncentracije kortikosterona u serumu i moždanom tkivu. Kako bi se utvrdilo da li male doze deksametazona dovode do apoptoze u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i prečeonoj kori korišćen je DNK fragmentacioni esej, dok se metodama histološkog bojenja hipokampusa i prečeone kore (*fluoro-jade B* i *krezil ljubičastim*) istraživao obim neuralne smrti i morfološke promene. Western blot i RT-PCR analizama su ispitivane promene u ekspresiji proteina i iRNK markera procesa smrti odnosno preživljavanja ćelija.

Rezultati ove studije su pokazali da hroničan tretman malim dozama deksametazona uzrokuje hipoaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose, koja se ogleda u smanjenju telesne mase, mase timusa i nadbubrežnih žlezdi, kao i kortikosterona u serumu.

Smanjena koncentracija kortikosterona u hipokampusu i prečenoj kori ukazuje na pojavu hipokortikoidnog stanja, praćenog nepromenjenom aktivacijom GR-a i mogućom povećanom aktivacijom MR-a, što generalno štiti ćelije od apoptoze. Primjenjeni DNK fragmentacioni esej nije pokazao prisustvo apoptoze u svim ispitivanim moždanim strukturama. Histološko bojenje hipokampusu i prečene kore je potvrdilo odsustvo neuralne smrti i morfoloških promena. Analizirani markeri apoptoze odnosno preživljavanja u mozgu ukazuju da je u osnovi kasnih efekata tretmana malim dozama deksametazona aktivacija AKT kinaze i MR-a, koji su odgovorni za dalju regulaciju ekspresije ispitivanih nishodnih apoptotskih molekula. Naime, u hipotalamusu, hipokampusu i prečenoj kori je uočeno pomeranje ravnoteže između pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije ka anti-apoptotskim, a u hipofizi ta promena nije detektovana. Dobijeni rezultati ukazuju na tkivno-specifičnu regulaciju ekspresije molekula smrti odnosno preživljavanja. U hipotalamusu i hipokampusu, u ranijoj vremenskoj tački je uočena pojava apoptoze, dok se kasnije aktiviraju anti-apoptotski mehanizmi, što oslikava osetljivost ovih struktura na hroničan tretman deksametazonom i fluktuacije koncentracije glukokortikoida.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da hroničan tretman malim dozama deksametazona ima kapacitet da oblikuje odgovor hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne ose. U mozgu zdravih odraslih Wistar pacova, deksametazon dovodi do nastanka hipokortikoidnog stanja, aktiviranja anti-apoptotske kinaze AKT i MR-a, povećanja ekspresije Bcl-2 molekula i promena u ekspresiji ispitivanih pro-apoptotskih molekula. Ovi podaci ukazuju da bi upravo ovi ispitivani molekuli mogli biti ključni za apoptotsku-rezistenciju i deksametazonom-posredovanu ćelijsku protekciju, koje su uočene u mozgu pacijenata tokom i nakon hemo- i radioterapije.

Ključne reči: deksametazon, mozak, apoptoza/preživljavanje, pacov

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

UDK BROJ: 612.822:591.481.1]:612.013.08]:[615.03:577.171.7] (043.3)

ABSTRACT

Modulation of apoptotic signaling pathways in brain cells of adult male rats after chronic dexamethasone treatment

For many years, dexamethasone, a potent synthetic glucocorticoid, has been used as a medication in the treatment of psoriasis, adrenal insufficiency, bacterial meningitis, brain trauma, stroke, allergies, bronchial spasm, rheumatoid arthritis, etc., and as a co-medicament in chemo- and radiotherapy. Numerous studies suggest that dexamethasone is able to regulate synaptic plasticity, enhance cell viability and proliferation *in vivo* and *in vitro*. However, dexamethasone exerts a number of adverse reactions in the brain, such as apoptosis in the hippocampal granular layer of dentate gyrus in young and old rats, as well as reduced cognitive and motor development. The dexamethasone-induced systemic effects and dexamethasone-provoked effects in the brain are an interesting field of research, mainly because the effects of low-dose dexamethasone treatment could not be tested directly in brain tissue due to the central blocking action of MDR p-glycoprotein and/or some other mechanism. Therefore, for the purposes of the experiment, adult male Wistar rats were divided into two groups – controls and animals treated with dexamethasone (100 µg/kg/day) per 7 days. 28 h upon chronic treatment, rats from both groups were sacrificed. Late systemic effects of dexamethasone were monitored by alterations of biometric parameters (body weight, thymus and adrenal glands mass) and level of corticosterone in serum and brain tissue. Further, using DNA fragmentation assay, present study aimed to determine whether low dose dexamethasone treatment is able to cause apoptosis in the pituitary gland, hypothalamus, hippocampus and prefrontal cortex, while histological staining methods (*fluoro-jade B* and *cresyl violet* staining) were applied to investigate the extent of neuronal death and morphological changes in hippocampus and prefrontal cortex. Changes in protein and mRNA expression of cell death and cell survival markers were examined by Western blot and RT-PCR analyzes.

The results obtained in this thesis revealed that chronic low dose dexamethasone treatment caused hypoactivity of hypothalamus-pituitary-adrenal axis, reflected in the reduction of body weight, thymus and adrenal glands masses, as well as levels of

corticosterone in serum. Decreased concentration of corticosterone in hippocampus and prefrontal cortex of dexamethasone-treated animals indicates the occurrence of hypocortisoid state, accompanied by unaltered activation of GR and possible increased activation of MR, which in general protects cells from apoptosis. DNA fragmentation assay showed unaltered profile of apoptosis in all investigated brain structures of both experimental groups. Histological staining of hippocampus and prefrontal cortex confirmed the absence of neuronal death and morphological changes. The analyzed markers of apoptosis and survival in the brain suggest that late effects of low dose dexamethasone treatment are based on the activation of AKT kinase and MR. Activation of these anti-apoptotic proteins is responsible for the further regulation of investigated downstream apoptotic molecules. In the hypothalamus, hippocampus and prefrontal cortex the shift balance between Bcl-2 family members towards anti-apoptotic Bcl-2 was observed, while in the pituitary gland this change is not detected. The obtained outcome indicates the occurrence of tissue-specific regulation of cell death and/or survival molecules. Furthermore, in the earlier time point, apoptosis was observed in the hypothalamus and hippocampus; however the anti-apoptotic mechanisms were activated later, indicating the sensitivity of these structures to chronic low dose DEX treatment and fluctuations in the concentration of glucocorticoids.

In summary, chronic low dose dexamethasone treatment displayed the capacity to significantly shape the response of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In the brain of healthy adult Wistar rats, dexamethasone created the hypocortisoid conditions, triggered the anti-apoptotic kinase AKT and MR activation, increased the expression of Bcl-2 molecule and altered the expression of investigated pro-apoptotic molecules. These data point that investigated molecules might be crucial for apoptosis-resistance and dexamethasone-mediated cell protection observed during and after chemo- and radiotherapy of patients with brain tumours.

Keywords: dexamethasone, brain, cell death/survival, rat

RESEARCH AREA: Biology

RESEARCH FIELD: Neurobiology

UDC NUMBER: 612.822:591.481.1]:612.013.08]:[615.03:577

SADRŽAJ

UVOD	1
1. Hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osa	2
2. Limbički sistem	5
2.1. Prečeaona kora	5
2.2. Hipokampus	6
3. Steroidni hormoni	7
3.1. Glukokortikoidni hormoni	8
3.1.1. Kortikosteroidni receptori.....	8
3.1.2. Molekulski mehanizam delovanja glukokortikoidnih hormona	10
3.1.3. Delovanje glukokortikoidnih hormona u mozgu	13
3.1.4. Sintetski glukokortikoidni hormon– deksametazon (DEX).....	16
4. Ćelijska smrt	19
4.1. Apoptoza	20
4.2. Proteini apoptotske kaskade	23
4.2.1. Pokretanje apoptoze– spoljašnji put.....	23
4.2.2. Pokretanje apoptoze– unutrašnji put.....	25
Proteini Bcl-2 familije	25
Kaspaze.....	27
NFκB, p53, AKT	28
5. Uloga glukokortikoida u apoptozi i preživljavanju	32
CILJ RADA	34
MATERIJALI I METODE	37
1. Materijali	38
2. Metode	40
2.1. Postupak sa životinjama	40
2.2. Tretman deksametazonom	40
2.3. Źrtvovanje životinja i priprema seruma i tkiva	41
2.4. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu	41
2.5. Analiza fragmentisanosti ćelijske DNK pomoću difenilamin metode ..	42
2.6. Bojenje sa fluoro-jade B, Hoechst 33258 i krezil ljubičastom bojom ...	42

2.7. Izolovanje proteina za „Western blot“ analizu.....	43
2.8. Određivanje koncentracije proteina	45
2.9. Elektroforeza proteina i Western blot analiza.....	46
Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) 46	
„Western blot“ analiza	46
2.10. Izolacija RNK i priprema uzoraka za RT-PCR.....	48
Izolacija RNK	48
Precipitacija RNK	48
Određivanje koncentracije RNK.....	49
RNK elektroforeza.....	49
Reverzna transkripcija (RT).....	49
2.11. Semi-kvantitativan RT-PCR	49
PCR reakcija	49
Elektorforeza PCR produkata	50
3. Statistička obrada rezultata.....	50
REZULTATI	52
1. Efekat deksametazona na biometrijske parametre (telesnu masu, masu timusa i nadbubrežnih žlezdi) i nivo kortikosterona u serumu i moždanom tkivu	53
2. Fragmentacija jedarne DNK u hipotalamusu, hipofizi, hipokampusu i prečeonoj kori životinja izloženih hroničnom tretmanu deksametazonom.....	55
3. Efekat hroničnog tretmana deksametazonom na broj mrtvih ćelija i morfološke promene u hipokampusu i prečeonoj kori	56
4. Efekat hroničnog tretmana deksametazonom na regulatore apoptoze.....	57
4.1. Odgovor hipotalamusa i hipofize na hroničan tretman deksametazonom.....	58
4.2. Odgovor hipokampusu i prečeone kore na hroničan tretman deksametazonom.....	67
4.2.1. Čistoća subćelijskih frakcija	76
4.2.2. Subćelijska distribucija p53 proteina u hipokampusu i prečeonoj kori	77
4.2.3. Subćelijska distribucija članova Bcl-2 familije u hipokampusu i prečeonoj kori	78
5. Ekspresija gena za GR, NFkB, p53, Bcl-2 i Bax u hipokampusu i prečeonoj kori životinja izloženih hroničnom tretmanu deksametazonom.....	82

DISKUSIJA	87
1. <i>Mesto dejstva i efekat deksametazona na aktivnost HHA ose i ekspresiju glukokortikoidnog receptora.....</i>	<i>89</i>
2. <i>Uloga deksametazona u neurodegenerativnim promenama</i>	<i>93</i>
3. <i>Uloga AKT kinaze u odgovoru hipofize, hipotalamusa, hipokampusu i prečeonu kore na hroničan tretman deksametazonom</i>	<i>96</i>
4. <i>Apoptotska signalizacija u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i prečeonu kori nakon hroničnog tretmana deksametazonom</i>	<i>98</i>
ZAKLJUČCI	105
LITERATURA	109
BIOGRAFIJA	124
PRILOZI	126

SKRAČENICE

AC	adenil ciklaza
ACTH	adrenokortikotropni hormon (engl. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AIF	faktor indukcije apoptoze (engl. <i>apoptosis inducing factor</i>)
AKT	protein kinaza B
AVP	arginin vazopresin
APAF-1	faktor aktivacije apoptotičnih proteaza 1 (engl. <i>apoptotic protease activating factor 1</i>)
AP-1	aktivacioni protein-1
ADX	adrenalektomija, uklanjanje nadbubrežnih žlezdi
APO-1	FAS receptor engl. <i>apoptosis antigen 1</i>
Bax	engl. <i>Bcl-2 associated X protein</i>
BBB	krvno-moždana barijera (engl. <i>blood brain barrier</i>)
Bcl-2	engl. B-cell lymphoma 2
BSA	goveđi serumski albumin
CA	sektori hipokampusa (lat. <i>cornus ammoni</i>)
CAD	DNKaze aktivirane kaspazama (engl. <i>caspase activated DNAase</i>)
CD	ćelijska smrt (engl. <i>cell death</i>)
CD95	engl. <i>cluster of differentiation 95</i>
CNS	centralni nervni sistem
CREB	c-AMP zavisno-vezujući protein (engl. <i>cAMP response element-binding protein</i>)
CRH	kortikotropni-oslobađajući hormon (engl. <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
Cu/ZnSOD	bakar/cink superoksid dismutaza
DBD	DNK-vezujući domen (engl. <i>DNA-binding domain</i>)
ddH ₂ O	bidestilovana voda
DEPC	dietilpirokarbonat
DEX	deksametazon
DG	dentatni girus
DISC	engl. <i>death-inducing signaling complex</i>
DFF-45	engl. <i>DNA fragmentation factor 45</i>
DNKaza	DNK endonukleaza
DST	test supresije deksametazonom (engl. <i>dexamethasone suppression test</i>)
DTT	ditiotreitol
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminiscence</i>

EDTA	etilendiamino-tetrasirćetna kiselina
EGTA	etilenglicerol-tetrasirćetna kiselina
ELISA	imunoenzimski test engl. <i>enzyme-linked immunoadsorbent assay</i>
EndoG	endonukleaza G
eNOS	engl. <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
FADD	engl. <i>fas-associated death domain</i>
GAPDH	glicerid-3-fosfat-dehidrogenaza
GK	glukokortikoid
GPRC	membranski receptori spregnuti sa G proteinom (engl. <i>G protein coupled receptors</i>)
GR	glukokortikoidni receptor
GRE	regulatorna sekvenca specifična za glukokortikoide (engl. <i>glucocorticoid response element</i>)
HHA	hipotalamo-hipofizno-adrenalna (nadbubežna) osa
HRP	peroksidaza iz rena
11 β -HSD	11 β -hidroksi steroid dehidrogenaza
Hsp	protein toplotnog šoka (engl. <i>heat shock protein</i>)
IAP	inhibitor apoptoze (engl. <i>inhibitor of apoptosis</i>)
ICAD	engl. <i>inhibitor of caspase activated DNAase</i>
IFN γ	interferon-gama
IKK	kinaza koja fosforiliše I κ B
IL	interleukin
ip	intraperitonealno
K	kontrola
kaspaze	engl. <i>cysteine <u>aspartyl-specific proteases</u></i>
KORT	kortikosteron
LBD	ligand-vezujući domen (engl. <i>ligand-binding domain</i>)
LMO3	engl. <i>LIM domain only protein 3</i>
LPS	lipopolisaharid
MAPK	p38 mitogen aktivirana protein kinaza
Mdm2	negativni regulator p53 proteina (engl. <i>mouse double minute 2 homolog</i>)
MDR1	engl. <i>multiple drug resistance</i>
MnSOD	mangan superoksid dismutaza
mPFC	medijalna prečeaona kora (engl. <i>medial prefrontal cortex</i>)
MR	mineralokortikoidni receptor
NF κ B	jedarni faktor kapa B (engl. <i>nuclear factor kappa B</i>)

nGRE	negativna regulatorna sekvenca specifična za glukokortikoide (engl. <i>negative glucocorticoid response element</i>)
NFM	nemasno mleko u prahu (engl. <i>nonfat milk powder</i>)
NLS	sekvenca neophodna za usmeravanje proteina ka jedru (engl. <i>nuclear localization signal</i>)
NO	azot monoksid
OD	optička gustina (engl. <i>optical density</i>)
PAA	poliakrilamid
PAR	engl. <i>poly (ADP ribose)</i>
PARG	engl. <i>poly (ADP ribose) glycohydrolase</i>
PARP	engl. <i>poly-(ADP-ribose) polymerase</i>
PCA	perhlorna kiselina
PCD	programirana ćelijska smrt (engl. <i>programmed cell death</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze
PFA	paraformaldehid
PFC	prečeaona kora (engl. <i>prefrontal cortex</i>)
PH	homolog plekstrina (engl. <i>platelet and leukocyte C kinase substrate and the KSTR string of amino acids</i>)
PI3 kinaza	fosfatidil inozitol 3 kinaza
POMC	pro-opiomelanokortin (engl. <i>pro-opiomelanocortin</i>)
PIP2	fosfatidil inozitol difosfat
PIP3	fosfatidil inozitol trifosfat
PKC	protein kinaza C
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVDF	poliviniliden fluorid
PVN	paraventrikularno jedro
p53	tumor supresor gen
ROS	reaktivne kiseonične vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RSK	ribozomalna S6 kinaza
RT	sobna temperatura (engl. <i>room temperature</i>)
RT-PCR	reverzno transkripciona lančana reakcija polimeraze
SEM	standardna greška merenja (engl. <i>standard error of measurement</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat
SGK	kinaza indukovana serumom i glukokortikoidima
TAD	domen odgovoran za transkripcionu aktivaciju (engl. <i>transcriptional activation domain</i>)
TEMED	N,N,N',N' - tetrametildiamin

TMB	tetrametilbenzidin
TNF	faktor nekroze tumora (engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
TNFR1	TNF receptor 1
TNFRSF6	engl. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
TRADD	protein koji vezuje kompleks TNF-receptor (engl. <i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>)
WCE	ukupni ćelijski ekstrakt (engl. <i>whole cell extract</i>)

*Priroda nam je dala po dva oka i
po dva uva, a samo jedan jezik
da bi smo mogli više gledati i
slušati, a manje govoriti,
jer se nikad ne može reći toliko
mudrosti
koliko se može prećutati
gluposti.*

(Konfučije)



UVOD

1. Hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osa

Endokrini sistem, zajedno sa nervnim i cirkulatornim sistemom, je neophodan za održavanje homeostaze organizma. Putem cirkulacije se prenose hemijski aktivne materije, između ostalih i hormoni do ciljnih tkiva, dok je u nervnom sistemu osnovni način prenošenja informacija nervni impuls i njime izazvana neurotransmisija posredovana neurotransmiterima. Hipotalamus je istovremeno sastavni deo centralnog nervnog sistema (CNS) i endokrina žlezda. Preko hipofize, hipotalamus kontroliše funkcije „perifernih“ endokrinih žlezda, poput štitaste i nadbubrežne žlezde.

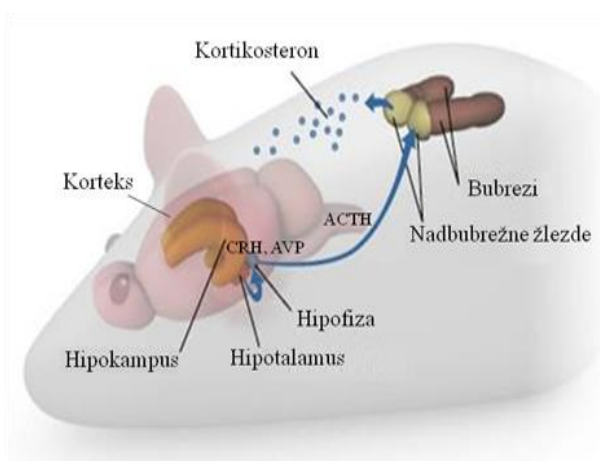
Upravo, kompleksan skup direktnih veza i povratnih sprega između hipotalamusa, hipofize i nadbubrežnih žlezda, odnosno, paraventrikularnog jedra hipotalamusa, prednjeg režanja hipofize i kore nadbubrežne žlezde (*Slika 1*) se naziva hipotalamo-hipofizno-adrenalna (nadbubrežna) osa (HHA osa).

- Neuroendokrini neuroni paraventrikularnog jedra (PVN) hipotalamusa sintetišu i luče peptidni hormon arginin vazopresin (AVP) i kortikotropin-oslobađajući hormon¹ (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH). Ovi hormoni deluju sinergistički i stimulišu sledeću komponentu HHA sistema– prednji režanj hipofize.
- Prednji režanj hipofize zajedno sa srednjim² režnjem ulazi u sastav adenohipofize, koju izgrađuje više različitih tipova ćelija (acidofilne, bazofilne i hromofobne ćelije). Kortikotropne bazofilne ćelije luče pro-opiomelanokortin (engl. *pro-opiomelanocortin*, POMC) od koga nastaju opioidni, melanokortinski peptidi, kao i adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH). U odgovoru na stres, AVP i CRH se oslobađaju u nivou središnjeg uzvišenja (medijalna eminencija, lat. *eminencia mediana*) i putem portnog krvotoka dospevaju do prednjeg režnja hipofize, vezuju se za specifične membranske receptore spregnute sa G proteinom (engl. *G protein coupled receptors*, GPCR) i podstiču oslobađanje ACTH u sistemsku cirkulaciju. Potom ovaj polipeptid deluje na ciljne ćelije preko svojih GPCR i aktivira adenil ciklazu (AC) u kori nadbubrežne žlezde.

¹ CRH je glavni regulator HHA ose (Vale i saradnici, 1981) i njegovo oslobađanje je fino regulisano cirkadijalnim ritmom, trenutnom koncentracijom glukokortikoida (GK) u cirkulaciji, fizičkom aktivnošću, ali i stresom i bolešću.

² Kod ljudi srednji režanj nije razvijen, ali postoji kod većine kičmenjaka.

- Kora nadbubrežne žlezde je glavno ciljno tkivo cirkulišućeg ACTH pod čijim uticajem se luče glukokortikoidni hormoni (GK), kao efektni molekuli HHA ose. GK utiču na metabolizam proteina, ugljenih hidrata i masti, u perifernim tkivima deluju anti-inflamatorno i anti-insulinski, povećavaju nivo glukoze u krvi, utiču na metabolizam vode, itd. Poznato je da GK igraju bitnu ulogu u regulaciji trajanja i amplitude aktivnosti HHA ose, dok je suština njihovog fiziološkog lučenja usklađivanje rada mozga i periferije, prvenstveno radi prilagođavanja energetske potreba organizma u odgovoru na zahteve cirkadijalnog ritma (Young, 2004) i sredine. Biološki efekti GK su obično adaptivne prirode, dok prekomerna ili neadekvatna aktivacija HHA ose može doprineti narušavanju njihove sinteze i oslobađanja i time razvoju patoloških stanja³.

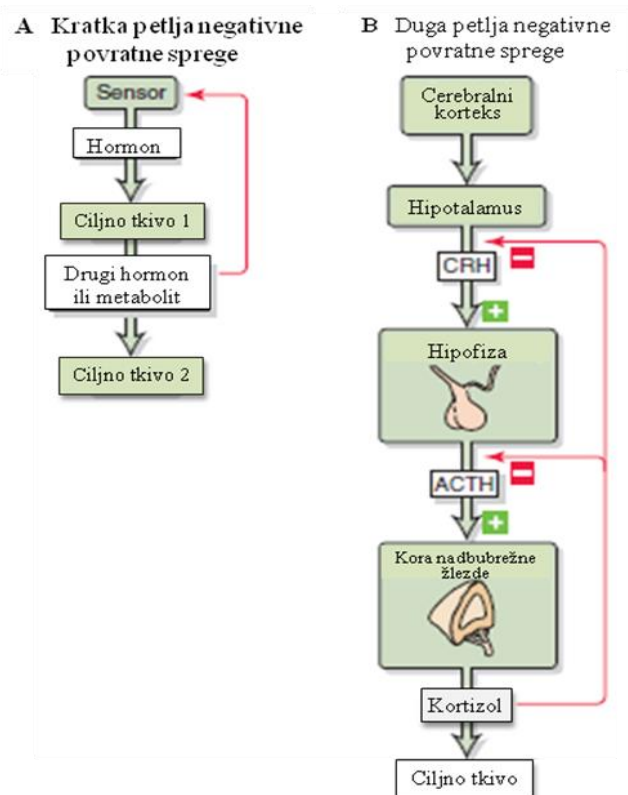


Slika 1. Regulacija HHA ose.

Do PVN-a hipotalamusa dolaze stimulusi putem čula i iz drugih delova mozga i organizma, oslobađaju se CRH i AVP koji kontrolišu lučenje ACTH iz hipofize. ACTH stimuliše oslobađanje kortikosterona iz kore nadbubrežne žlezde, koji aktivacijom glukokortikoidnog receptora u hipofizi i limbičkim regionima mozga podstiče istovremenu aktivaciju (bademasta jedra) i inhibiciju (hipokampus, PVN, hipofiza) HHA ose.

HHA osa je glavni neuroendokrini sistem koji reguliše mnoge procese u organizmu i kontrolišu njegove reakcije, čime se omogućava adaptacija na promene u spoljašnjoj i/ili unutrašnjoj sredini. Aktivnost ovog sistema se ogleda u brzim promenama koncentracije hormona u cirkulaciji u zavisnosti od stimulusa iz spoljašnje i unutrašnje sredine.

³ Uočena je veza povećane koncentracije GK-a i smanjenja reprodukcije, rasta, tiroidnih i imunoloških funkcija, koje mogu da uzrokuju metaboličke poremećaje, kao što su hipertireozam i dijabetes (McEwen i Stellar, 1993) (Munck i saradnici, 1984).



Slika 2. Povratna sprega u regulaciji lučenja hormona (Boron i Boulpaep, 2009).

Regulacija njene aktivnosti se ostvaruje na više nivoa— dugom i kratkom petljom negativne povratne sprege (**Slika 2**), odnosno regulacijom bazalnog nivoa GK (Keller-Wood i Dallman, 1984), ACTH, CRH i u manjem stepenu AVP-a (Joels i saradnici, 1994). Time se sprečava prekomerna reakcija organizma i omogućava se ponovno uspostavljanje stanja homeostaze.

Uočeno je da se u slučaju narušavanja mehanizma negativne povratne sprege može javiti dugotrajna aktivacija HHA ose, čime se povećava mogućnost pojave mnogih bolesti poput kardiovaskularnih oboljenja, hipertenzije, miopatije, dijabetesa i različitih poremećaja u kognitivnim funkcijama (McEwen, 2008).

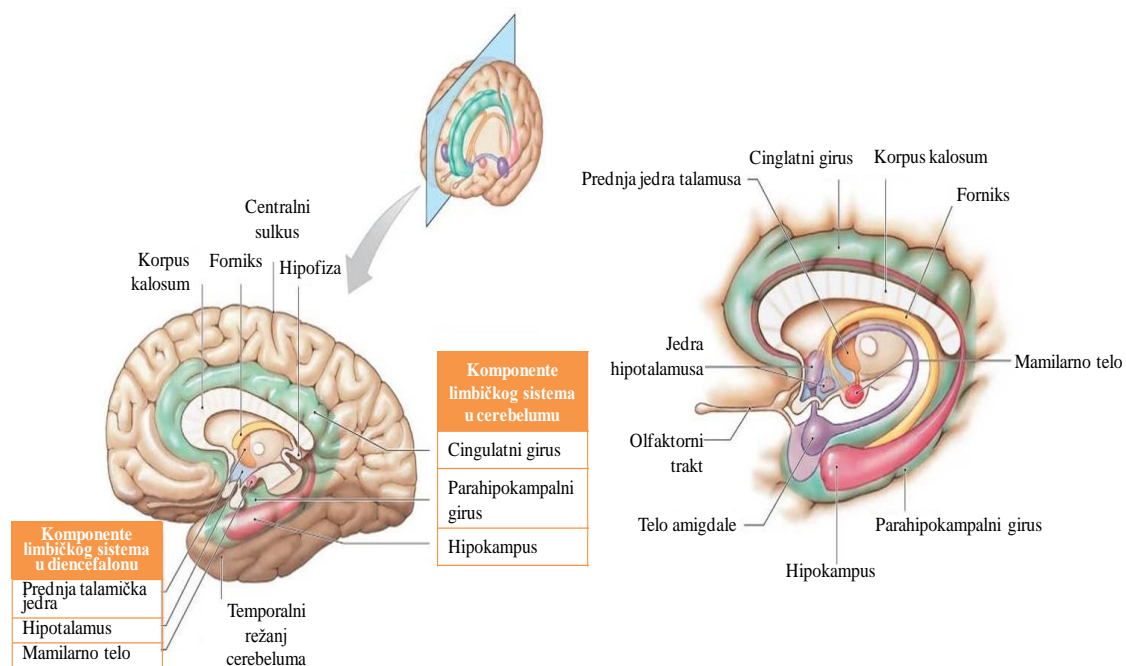
Funkcije HHA ose mogu kontrolisati više moždane strukture kao što su komponente limbičkog sistema⁴— bademasta jedra, hipokampus i prečeaona kora prednjeg mozga. Uglavnom, hipokampus, prednja pojasna kora (lat. *cortex cingulatus*) i prečeaona kora inhibiraju sekreciju GK i aktivnost HHA ose koja je izazvana stresom, dok bademasta jedra i najverovatnije infralimbička kora povećavaju lučenje GK (Herman i saradnici, 2005).

⁴ Više moždane strukture su, pored trenutnog odgovora organizma kojim se omogućava uspešno sagledavanje i savladavanje situacije, neophodne i za konsolidovanje memorije o prirodi i sadržaju datog iskustva, čime se omogućava pamćenje situacije i reakcija koje su bitne za uspostavljanje odgovarajuće strategije izbegavanja u sledećem izazovu.

2. Limbički sistem

Limbički sistem je kompleks evolutivno starih, funkcionalno i anatomski međusobno povezanih kortikalnih i subkortikalnih moždanih struktura, kao što su: prečeaona kora (prefrontalni korteks, engl. *prefrontal cortex*, PFC), hipokampus, bademasta jedra i međumozak (hipotalamus i prednje jedro talamusa) (*Slika 3*). Ovaj sistem je uključen u kontrolu emocija, ponašanja i motivacije koje su neophodne za preživljavanje organizma, kao i motorne funkcije, olfaktornu i senzornu percepciju, formiranje memorije i dugotrajnog pamćenja (Drevets, 2000).

Oštećenja moždanih struktura limbičkog sistema mogu dovesti do narušavanja kognitivnih funkcija, naročito prostorne memorije, pažnje, ali i do pojave mentalnih bolesti (anksioznosti, Alchajmerove bolesti, anterogradne i retrogradne amnezije, Kluver-Buci sindroma, itd).

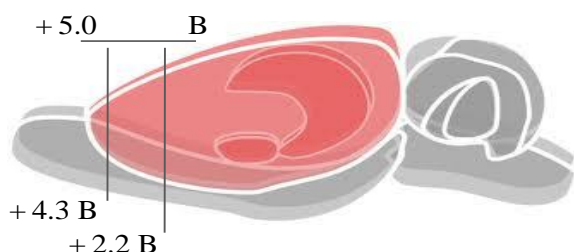


Slika 3. Limbički sistem (Pearson Education Inc, 2011).

2.1. Prečeaona kora

Prečeaona kora kod pacova se nalazi medijalno i orbitalno na insularnim površinama rostralnog prednjeg mozga (Gabbott i saradnici, 2005) (*Slika 4*). Ovaj region je odgovoran za regulaciju kognitivnih funkcija, usmereno ponašanje i integraciju različitih aspekata ponašanja (Neafsey i saradnici, 1986), kao i za kompleksnu kontrolu

aktivnosti HHA sistema. Poznato je da ventralni region PFC-a ima stimulatornu ulogu u regulaciji HHA ose, dok dorzoventralni i medijalni PFC (engl. *medial prefrontal cortex*, mPFC) imaju inhibitorni uticaj na njenu aktivnost (Figueiredo i saradnici, 2003a, Figueiredo i saradnici, 2003b).



Slika 4. Položaj prečione kore u odnosu na bregmu (B).

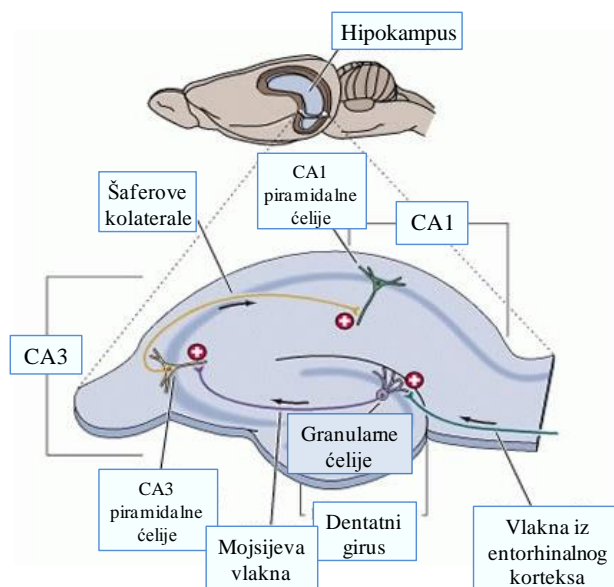
Narušene funkcije mPFC-a su uočene kod mnogih patofizioloških stanja, kao što su određeni tipovi depresije i anksioznost (Gray i McNaughton, 2000),

shizofrenija, sociopatija, opsesivno-kompulsivni poremećaj, itd (Heidbreder i Groenewegen, 2003).

2.2. Hipokampus

Hipokampalna formacija je deo limbičkog sistema koji je odgovoran za formiranje prostorne i deklarativne memorije odnosno formiranje, konsolidaciju i oživljavanje epizodnih uspomena (Morris i saradnici, 1982, Eichenbaum, 2000), učenje, kao i regulaciju autonomnog, neuroendokrinog i imunskog odgovora. Uočeno je da njena stimulacija smanjuje sekreciju GK kod pacova i ljudi (Rubin i Changeux, 1966, Dunn i Orr, 1984), što ukazuju da ovaj moždani region učestvuje u kompleksnoj kontroli aktivnosti HHA ose, kao i da je dovoljan da inhibira njenu aktivnost.

Hipokampalna formacija se prostire unutar medijalnog slepoočnog režnja prednjeg mozga, a čine je: subikulum, pre- i parasubikulum, entorinalna kora, dentatni girus (DG) sa polimorfnim slojem (engl. *hilus*) i tri regiona tzv. pravog hipokampusa (engl. *hippocampus proper*) označena kao CA1, CA2 i CA3 (lat. *cornus ammoni*, ovnujski rogovi) (Bayer, 1980). DG i pravi hipokampus se strukturno veoma razlikuju, mada su funkcionalno blisko povezani i zato se često koristi zajednički naziv hipokampus (**Slika 5**). Iako se predpostavlja da svaki od hipokampalnih regiona ima jedinstvenu funkciju u obradi informacija, do danas prava uloga svakog od njih je malo poznata.



Slika 5. Hipokampus pacova (NeuroscienceNews.com).

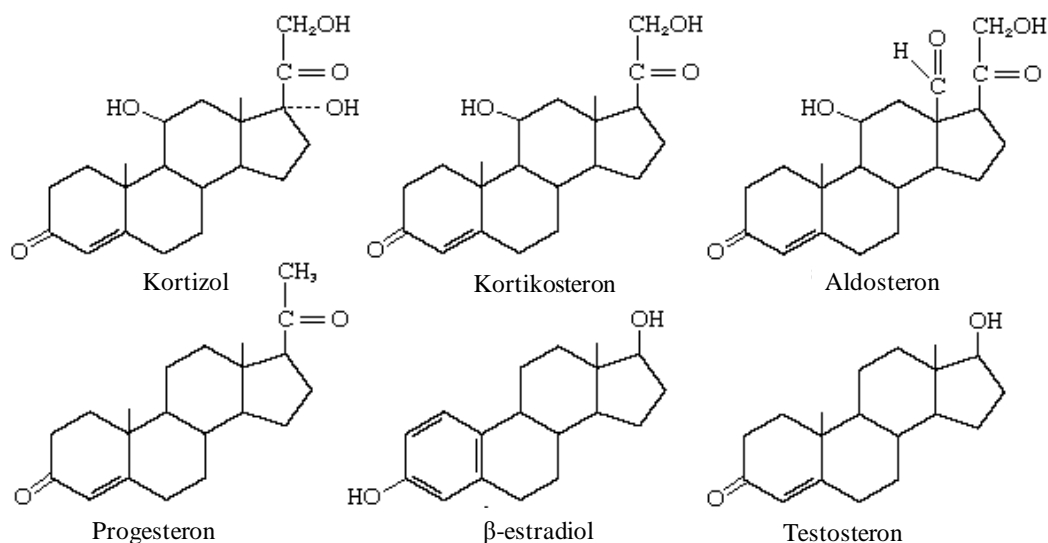
Uočeno je da starenje, visoke koncentracije GK u cirkulaciji i različiti tipovi hroničnih stresora, mogu dovesti do trajnih oštećenja neurona u hipokampusu i smanjiti nivo glukokortikoidnog receptora (GR), narušiti bazalni nivo iRNK za CRH i AVP u PVN-u, ali i sekreciju ACTH u hipofiziotrofičnim neuronima, uzrokujući pojavu produženog

odgovora na stres i smanjiti signalizaciju posredovanu GK u hipokampusu, kao i inhibiciju HHA ose (Sapolsky i saradnici, 1986).

3. Steroidni hormoni

Steroidni hormoni su mali lipofilni molekuli ključni za pravilno funkcionisanje organizma jer deluju na skoro sva tkiva. Nastaju enzimskom obradom holesterola (poreklom iz plazme) u polnim žlezdama (ovarijumi i testisi), kori nadbubrežnih žlezdi (*zona glomerulosa*– mineralokortikoidi, *zona fascikulata*– glukokortikoidi i *zona retikularis*– polni hormoni), centralnom nervnom sistemu, kao i nekim perifernim tkivima (masno tkivo).

Uzimajući u obzir razlike u hemijskoj strukturi, mestu sinteze i lučenja, kao i u biološkoj aktivnosti, steroidni hormoni se mogu podeliti na: mineralokortikoide, glukokortikoide (GK) i polne hormone. Svi steroidni hormoni imaju zajedničku strukturu ciklopentanoperhidrofenantrena sa 17 ugljenikovih atoma i četiri prstena. Dodavanjem hidroksilne grupe na C-11 progesterona nastaje kortikosteron (KORT), osnovni GK kod glodara; dok dodatak hidroksilne grupe na C-17 daje kortizol, osnovni GK kod ljudi. Mineralokortikoid aldosteron se razlikuje od kortikosterona po samo jednoj aldehidnoj grupi i to na C-18 (*Slika 6*) (Joels i de Kloet, 1994).



Slika 6. Hemijski prikaz steroidnih hormona
(<http://www.whitetigernaturalmedicine.com/nutrition/building-blocks-body-fat>)

3.1. Glukokortikoidni hormoni

GK predstavljaju jednu od najviše proučavanih podklasa steroidnih hormona. Deluju na skoro sva tkiva i organe u organizmu, uključujući i mozak, tako što regulišu metaboličke, kardiovaskularne i imunske procese, kao i procese ponašanja (Sapolsky i saradnici, 2000) i olakšavaju ponovno uspostavljanje homeostaze i strategiju suočavanja (de Kloet i saradnici, 2005). Uočeno je da je pojačana aktivnost HHA ose praćena povećanjem nivoa GK i da dovodi do povećanja koncentracije glukoze i lipida u krvi, povećanja kardiovaskularnog tona i imunosupresije, što je neophodno za uspešnu adaptaciju na izmenjene uslove sredine.

U mozgu, GK su sastavni deo neuroendokrinih puteva u odgovoru na različite stimulse, utiču na jonsku provodljivost membrane nervnih ćelija, efikasnost transmitterskog sistema, metaboličke osobine i morfologiju neurona (Joels i de Kloet, 1994); kontrolišu nadražljivost neurona, aktivnost specifičnih neurotransmitera i neuropeptidnih sistema (de Kloet, 2000).

3.1.1. Kortikosteroidni receptori

GK se vezuju za dva tipa kortikosteroidnih receptora: mineralokortikoidni receptor (MR ili tip I) i glukokortikoidni receptor (GR ili tip II). Oba receptora ispoljavaju visok

stepen homologije, vezuju iste ligande (kortizol i kortikosteron) sa različitim afinitetom i pokazuju različiti stepen rasprostranjenosti u moždanim strukturama⁵.

Mnoge studije na glodarima, psima i ljudima ukazuju da se za MR sa visokim afinitetom vezuju endogeni GK (kortizol i kortikosteron) i mineralokortikoidni hormoni (aldosteron, deoksikortikosteron). Sa druge strane, za GR se vezuju sa visokim afinitetom sintetski glukokortikoidi, poput deksametazona i RU28362; umereno se vezuju endogeni GK, a gotovo uopšte se ne vezuju mineralokortikoidni hormoni (Reul i saradnici, 2000). Takođe, uočeno je da se deksametazon vezuje sa visokim afinitetom za hipokampalni MR u *in vitro* uslovima kod ljudi, pacova, miševa, ali ne i hrčkova, dok u *in vivo* uslovima pokazuje smanjeni afinitet za isti receptor (Reul i saradnici, 2000).

Reul i de Kloet (1985) su pokazali da je u ranim jutarnjim časovima kada je koncentracija kortikosterona u plazmi $< 1.5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, više od 80 % MR-a zasićeno endogenim ligandima. Sa druge strane, GR postaje zasićen samo u slučaju kad je koncentracija kortikosterona u plazmi visoka ($1\text{--}10 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$), što je karakteristično za vrhunac cirkadijalnog ciklusa i tokom stresa (De Kloet i saradnici, 1998, McEwen, 2008). Treba istaći da se za MR u mozgu, usled odsustva njegovog specifičnog liganda–aldosterona, vezuje kortikosteron sa 10 puta većim afinitetom u odnosu na GR (konstanta disocijacije (K_d) $\approx 0.5\text{--}1 \text{ nM}$ za MR I $\approx 5\text{--}10 \text{ nM}$ za GR).

GR je unutarćelijski protein koji pripada filogenetski očuvanoj superfamiliji steroidnih/tireoidnih hormonskih receptora (inducibilni transkripcioni faktori) u koje spadaju i receptori za mineralokortikoide, androgene, progestine, estrogene, vitamin D, tireoidne hormone, receptor za retinoičnu kiselinu, kao i veliki broj tzv. „receptora siročića“ za koje još nisu identifikovani specifični ligandi (Evans, 1988). Svi ovi receptori su strukturno sastavljeni iz 3 funkcionalna domena (Beato i Klug, 2000) (*Slika 7*):

- N-terminalni domen– region AF-1, moduliše transkripcionu aktivnost receptora. U ovom regionu se nalaze sekvence bitne za interakciju sa komponentama transkripcionog kompleksa i aktivaciju/represiju specifičnih ciljnih gena;

⁵ MR je uglavnom usko rasprostranjen u septalnoj regiji i limbičkim regionima mozga odnosno, u hipokampusu, bademastim jedrima i motornim jedrima moždanog stabla (McEwen i saradnici, 1986). GR je prisutan u skoro svim regionima mozga, mada je njegova najveća koncentracija nađena u CRH neuronima hipotalamusa i u kortikotropnim ćelijama hipofize (Raidmann i saradnici, 2010).

- DNK-vezujući domen– (engl. *DNA-binding domain*, DBD) sadrži sekvence odgovorne za jedarnu lokalizaciju receptora i dva visokokonzervirana takozvana „cinkana prstića” (Zn^{2+}), neophodna za vezivanje za DNK i za regulaciju transkripcije;
- C-terminalni domen– odgovoran za vezivanje liganda (engl. *ligand-binding domain*, LBD) i transaktivirajuću funkciju.



Slika 7. Funkcionalni domeni glukokortikoidnog receptora.

Netransformisani GR je multiproteinski kompleks molekulske mase oko 300 kDa (Pratt, 1997, Pratt i saradnici, 2004) u čiji sastav ulaze: jedna steroid-vezujuća subjednica od 94 kDa odnosno receptorski molekul, kao i dva molekula Hsp90 (engl. *heat shock protein*, Hsp), po jedan molekul Hsp56 i Hsp70, protein molekulske mase 59 kDa (p59), imunofilin FK506, imunofilin rapamicin-vezujuće klase, kao i fosfoprotein molekulske mase 23 kDa (p23) (Hutchison i saradnici, 1993a). U odsustvu liganda, kompleks GR/Hsp je neaktivan i prolazi kroz stalne cikluse disocijacije i ATP-Hsp70-zavisne reasocijacije (Hutchison i saradnici, 1993b).

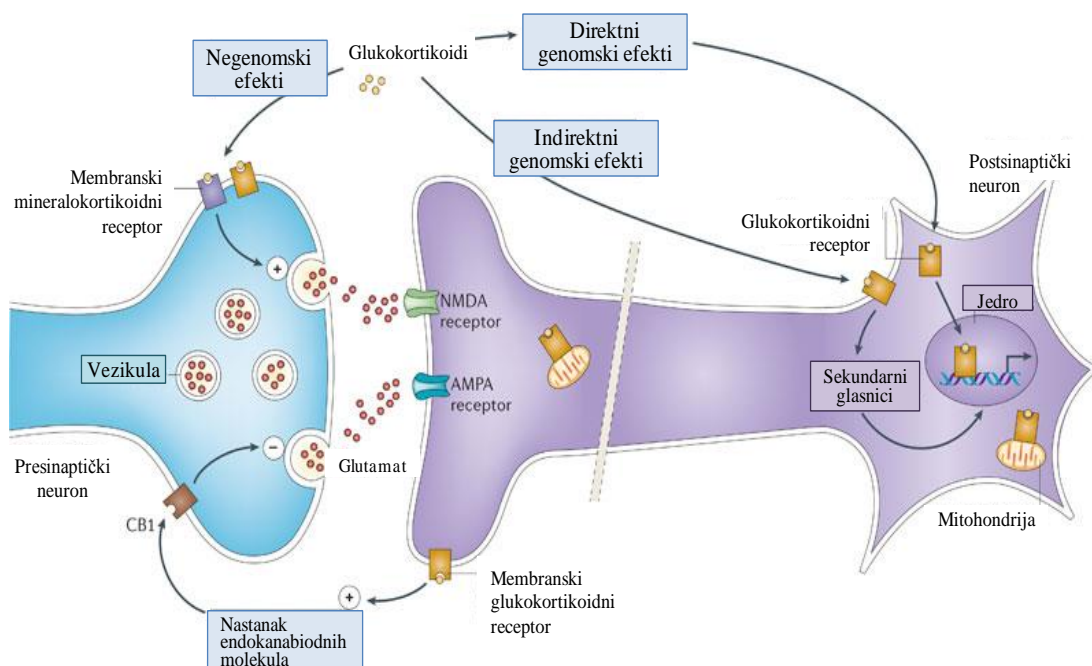
Aktivnost GR-a može biti regulisana brojnim posttranslacionim modifikacijama, kao što su fosforilacija, acetilacija, ubikvitinacija i drugo. Poznato je da fosforilacija zavisna od vezivanja hormona određuje specifičnost GR-a za odgovarajući promotor, interakciju sa kofaktorima, jačinu i trajanje signala, stabilnost receptora (poluživot receptora), kao i njegovu subćelijsku lokalizaciju (Wang, 2001, Ismaili i Garabedian, 2004).

3.1.2. Molekulski mehanizam delovanja glukokortikoidnih hormona

Kortikosteroidni receptori su ligand-vezujući transkripcioni faktori, koji se u slobodnom stanju nalaze u citoplazmi, a po vezivanju hormona formiraju ligand-receptor kompleks, koji prelazi u jedro i utiče na transkripciju gena (Beato i Sanchez-Pacheco, 1996). Uočeni efekti su veoma spori i prvi fiziološki odgovori se javljaju najranije posle 15 minuta, mada češće u roku od nekoliko sati (Haller i saradnici, 2004). Međutim, ovakvi odgovori su u kontrastu sa odgovorima koji se mogu uočiti u neuronima svega nekoliko sekundi do minuta nakon delovanja GK (Di i saradnici, 2003, Karst i saradnici, 2005, Liu i saradnici, 2008, Groeneweg i saradnici, 2012), a koji su odgovorni za

funkcionisanje neurona, neurotransmisiju i ponašanje (Groeneweg i saradnici, 2012). To ukazuje na postojanje alternativnih načina delovanja GK-a u koje nisu uključeni signalni putevi posredovani klasičnom aktivacijom MR-a i GR-a (Groeneweg i saradnici, 2012).

Na osnovu velikog broja dokaza može se pretpostaviti da GK u ćelijama nervnog sistema ispoljavaju spore genomske i brze negenomske efekte (*Slika 8*).



Slika 8. Mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona (Popoli i saradnici, 2012).

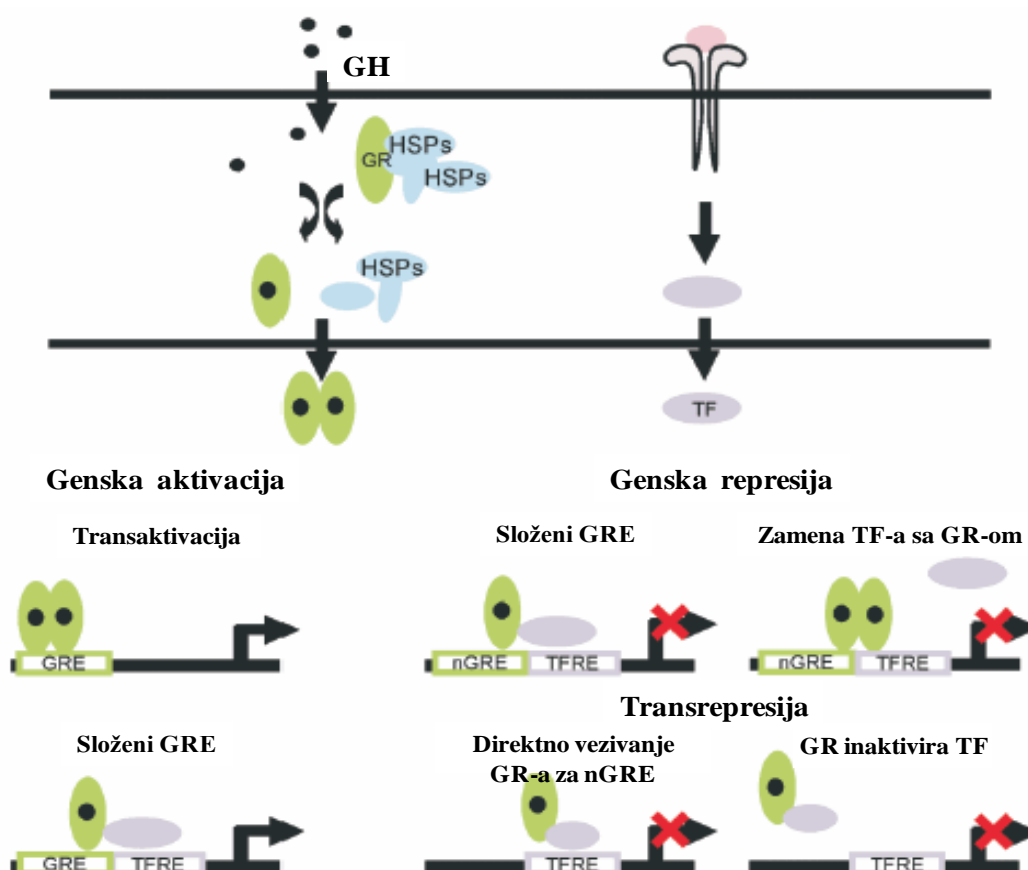
- Spori genomske efekti– mogu biti direktni i indirektni (Popoli i saradnici, 2012). Direktni GK efekti su posredovani specifičnim receptorima u citoplazmi, koji nakon vezivanja liganda prelaze u jedro ili mitohondrije i deluju kao transkripcioni faktori. Nasuprot tome, indirektni efekti su posredovani membranskim receptorima i sekundarnim glasnicima, koji po ulasku u jedro mogu regulisati gensku transkripciju.

U slučaju direktnih efekata, mehanizam delovanja GK se može podeliti u 3 faze (Bamberger i saradnici, 1996). Tokom prve faze, GK kao mali lipofilni molekuli olakšanom difuzijom prolaze kroz ćelijsku membranu efektornih ćelija. Nakon ulaska u ćeliju, reverzibilno se vezuju za GR i formiraju aktivni ligand-receptor kompleks, što dovodi do još nepotpuno opisanih, alosteričnih promena nazvanih aktivacija ili transformacija receptora. Tokom procesa aktivacije dolazi do

ireverzibilne disocijacije receptora od Hsp molekula (Hutchison i saradnici, 1993b) ili/i hiperfosforilacije receptora (Orti i saradnici, 1992). Time se oslobađa signal za jedarnu lokalizaciju (engl. *nuclear localization signal*, NLS) koji omogućava ovom kompleksu da se premesti u jedro. U drugoj fazi, u jedru GR može delovati na dva načina– kao monomer, stupajući u interakciju sa drugim transkripcionim faktorima (NFκB, AP-1), ali bez direktnog vezivanja za DNK (Heck i saradnici, 1994, Bamberger i saradnici, 1996), ili kao dimer, vezujući se za specifične regulatorne sekvence na DNK (engl. *glucocorticoid response element*, GRE). Treću fazu odlikuju promene na nivou transkripcije, koje dovode do aktivacije i/ili inhibicije ekspresije ciljnih gena. Uočeno je da se nastali dimeri vezuju za jednu, multipnu ili složenu GRE sekvencu (Chan i saradnici, 1991) i time direktno ili indirektno stupaju u interakciju sa komponentama transkripcione mašinerije i učestvuju u stabilizaciji pre-inicijacionog kompleksa RNK polimeraze II na promotoru (Bamberger i saradnici, 1996). Osim pozitivne regulacije i povećanja transkripcije, vezivanje specifičnog aktiviranog GR dimera za negativne regulatorne elemente u promotorima nekih gena (engl. *negative glucocorticoid response element*, nGRE) može dovesti do smanjenja transkripcije. Pojava transrepresije gena uočena je kod gena za CRH i POMC (Malkoski i Dorin, 1999), kao i nakon vezivanja GR-a za već aktivirane transkripcione faktore (NFκB, AP-1 i c-AMP zavisno-vezujući protein (engl. *cAMP response element-binding protein*, CREB) što je u osnovi imunosupresivnog dejstva GK (Ray i Prefontaine, 1994) (**Slika 9**).

- Brzi negenomski efekti– javljaju se u novim i stresnim situacijama kada je neophodna brza reakcija organizma, pri čemu se aktivira veliki broj sistema u cilju razvijanja adaptivnog odgovora. Ovi efekti mogu biti posredovani membranskim MR-om (Karst i saradnici, 2005) i GR-om (Di i saradnici, 2003) ili specifičnim, još uvek neidentifikovanim membranskim kortikosteroidnim receptorima. Pretpostavlja se da prenos signala sa membrane zavisi od građe tzv. *signalozoma*, odnosno multiproteinskog kompleksa u čiji sastav ulaze: receptor, mali adapterski molekuli (G protein) i kinaze (npr PI3K/AKT, ERK1/2) (Groeneweg i saradnici, 2012). Iako su strukturno skoro identični receptorima u citoplazmi, utvrđeno je da MR i GR odgovorni za ovaj tip odgovora imaju manji afinitet vezivanja liganda i da su zato verovatno značajni samo u situacijama visokog nivoa GK (Karst i saradnici, 2005).

Ovi efekti podrazumevaju direktno delovanje GK na membranske lipide i proteine (jonske kanale, GABA i glutamatne receptore) i time na fluidnost membrane ili citoplazmatske proteine (proteinske kinaze, fosfolipaze). U brze negenomske efekte ubrajaju se i oni koji mogu biti posredovani proteinima koji disociraju iz kompleksa ligand-GR po vezivanju hormona.



Slika 9. GR signalni put i nivoi regulacije aktivnosti glukokortikoida (Labeur i Holsboer, 2010).

3.1.3. Delovanje glukokortikoidnih hormona u mozgu

GK efekti u CNS-u zavise od vrste, pola i starosti jedinke, koncentracije hormona, trenutka i trajanja izlaganja. Poznato je da GK ispoljavaju u potpunosti različite efekte tokom razvića i sazrevanja organizma, starenja i u procesima regeneracije nervnog sistema (Fietta, 2007). Tako, na primer, u razviću su neophodni za pravilnu regulaciju neurogeneze, mijelinizaciju, gliogenezu, dok kod odraslih u principu imaju modulatornu ulogu koja se ogleda u finoj regulaciji procesa adaptacije, učenja i pamćenja (Fietta, 2007). GK u niskim i veoma visokim koncentracijama imaju bitno različite efekte od efekata srednjih koncentracija. Primećeno je da privremeni porast GK može poboljšati

sinaptičku efikasnost, olakšati formiranje memorije i izvođenje različitih zadataka, ali i eliminirati nepotrebna ponašanja. Sa druge strane, dugotrajni ili intenzivan porast GK smanjuje sinaptičku efikasnost, sintezu neurotrofičkih faktora, kognitivne funkcije i dovodi do neuronalne atrofije, astroglioze, smrti neurona (Arbel i saradnici, 1994) što za posledicu može imati pojavu patofizioloških stanja (Lupien i saradnici, 2002).

Tokom i/ili nakon stresnih situacija ili u patološkim stanjima dolazi do naglog porasta GK u krvi i brzog povećanja koncentracije GK u mozgu, koja se može smanjiti tek kada se nivo hormona u cirkulaciji smanji, jer mozak ne metaboliše kortikosteron ili kortizol u inaktivne metabolite usled nedostatka enzima 11β -HSD⁶ (Moisan i saradnici, 1990).

U hipokampusu, ravnoteža u aktivaciji i/ili ekspresiji kortikosteroidnih receptora je važna za regulaciju kognitivnih funkcija i aktivnost HHA ose. Poznato je da je aktivacija MR-a neophodna za održavanje bazalne aktivnosti HHA sistema i odgovarajućeg inhibitornog impulsa iz hipokampusa na PVN hipotalamusa (De Kloet i saradnici, 1998), kao i za promenu ponašanja u skladu sa novom situacijom (Oitzl i saradnici, 1997). GR je bitan za konsolidaciju pohranjenih informacija (Oitzl i saradnici, 1997), a zajedno sa MR-om učestvuje u negativnoj povratnoj regulaciji kojom se limitira odgovor HHA sistema na stres (De Kloet i saradnici, 1998).

Brojne studije ukazuju da odsustvo GK kao posledica uklanjanja nadbubrežnih žlezdi (adrenalektomija, ADX) ili nedostatka GR-a, kao i poremećaji u ravnoteži u MR/GR utiču na preživljavanje hipokampalnih neurona, kogniciju, neuroendokrinu regulaciju i povećavaju mogućnost pojave bolesti povezanih sa stresom. Tako, povećana aktivacija MR-a (Oitzl i saradnici, 1997, de Kloet, 2000) ili smanjenje broja i/ili ekspresije GR-a u hipokampusu (de Kloet, 2000, Carvalho i Pariante, 2008) koji se javljaju kod obolelih od depresije, osteroporoze i pacijenata sa poremećajima u kognitivnim funkcijama, oslabljenim imunskim sistemom, mogu se povezati sa poremećenom negativnom povratnom spregom i smanjenom osetljivošću HHA ose. To za posledicu ima smanjen

⁶ NADPH- zavisna 11β -hidroksisteroid dehidrogenaza (11β -HSD) spada u familiju enzima koji omogućavaju prevođenje neaktivnih 11 -keto produkata u aktivne i obrnuto. Do danas su otkrivene dve izoforme. NADPH-zavisna 11β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 (11β HSD1) je enzim koji posreduje u prevođenju neaktivnih, 11 keto derivata u aktivan hormon (Seckl, 1997) i time lokalno povećava koncentraciju hormona. Široko je rasprostranjena u tkivima odraslog pacova, posebno u masnom tkivu, jetri i mozgu (Lakshmi i saradnici, 1991, Robson i saradnici, 1998). Sa druge strane, NADPH-zavisna 11β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2 (11β -HSD2) katalizuje suprotan proces, prevodi aktivnu u neaktivnu formu GK. Javlja se u bubrezima, debelom crevu, pljuvačnim žlezdama, placenti, ali ne i u mozgu.

odgovor organizma na stres (Pariante, 2006). Nasuprot tome, kod obolelih od anoreksije, opsesivno-kompulsivnog poremećaja, anksioznosti i drugih psihičkih bolesti, usled narušavanja odnosa MR/GR, tj. povećane aktivacije i/ili ekspresije GR-a u hipokampusu i pojačane negativne povratne regulacije se javlja hiperosetljivost HHA sistema i povećan odgovor HHA sistema na stres (Tsigos i Chrousos, 2002).

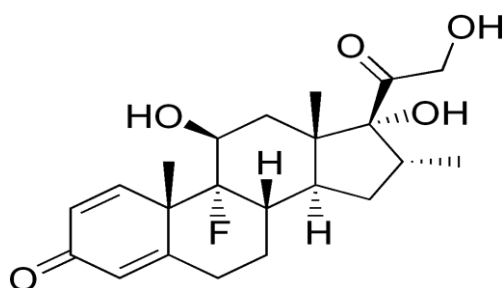
Primećeno je da u hipokampusu adrenalektomisanih pacova ubrzo nakon injeciranja malih doza kortikosterona (1 μ g/100 g težine) predominantno okupiran MR, dok je GR slobodan (Reul i saradnici, 2000). Ovo ukazuje da se GR aktivira samo kad su koncentracije GK izrazito visoke što je posebno važno za regione mozga koji poseduju oba tipa receptora, poput neurona dentantnog girusa i ćelija CA1 regiona (Reul i de Kloet, 1985). Upravo, na osnovu razlike u zasićenosti i funkcijama MR-a i GR-a, pretpostavljeno je da se preko hipokampalnog MR-a, u prisustvu bazalnih koncentracija kortikosterona reguliše aktivnost i senzitivnost HHA ose, dok se GR aktivira samo pri višim koncentracijama GK i posreduje u negativnoj povratnoj regulaciji ovog sistema i uspostavljanju narušene homeostaze (de Kloet i saradnici, 1990, de Kloet, 2000, Reul i saradnici, 2000, Sapolsky i saradnici, 2000, de Kloet i saradnici, 2005).

Osim hipokampusa, moždane regije koju odlikuje velika gustina oba kortikosteroidna receptora i koja je uključena u brojne fiziološke i bihejvioralne adaptacije na stres (De Kloet i saradnici, 1998, Reul i saradnici, 2000), mPFC, takođe, ima bogatu populaciju kortikosteroidnih receptora (Chao i saradnici, 1989, Herman i saradnici, 1993, Patel i saradnici, 2000), koji se aktiviraju tokom stresa (Cullinan i saradnici, 1995, Figueiredo i saradnici, 2003a). Nedavno je uočeno da hronični tretman sa kortikosteronom ili imobilizacioni stres mogu dovesti do remodelovanja apikalnih dendrita piramidalnih neurona u sloju II/III mPFC-a, tako što povećavaju proksimalno grananje i smanjuju gustinu trnolikih nastavaka ovih neurona (Wellman, 2001, Cook i Wellman, 2004, Radley i saradnici, 2004, Radley i saradnici, 2005). Cerqueira i saradnici (2005) su pokazali da kod odraslih mužjaka Wistar pacova hroničan tretman sa deksametazonom dovodi do narušavanja radne memorije i ponašanja, koji su posledica gubitka neurona i atrofije u II sloju infralimbičke, prelimbičke i prednje pojasne kore. Kortikosteron uzrokuje umerene poremećaje u ponašanju i izraženije promene u radnoj memoriji, koji nastaju kao posledica smanjenja volumena III sloja svih ispitivanih regiona PFC-a. Iako nije poznata tačna distribucija MR-a i GR-a u različitim slojevima PFC-a, postoje

dokazi da su II/III sloj PFC-a bogati sa oba receptora (za MR: (Van Eekelen i saradnici, 1988, Ahima i saradnici, 1991); za GR: (Ahima i Harlan, 1990, Cintra i saradnici, 1994, Morimoto i saradnici, 1996), kao i da je GR predominantno prisutan u kori velikog mozga (Ahima i Harlan, 1990, Ahima i saradnici, 1991, Roland i saradnici, 1995). Dakle, aktivacija GR-a u prisustvu deksametazona ili visokih koncentracija kortikosterona može se povezati sa gubitkom neurona svih regiona PFC-a i narušavanjem radne memorije, dok aktivacija MR-a u prisustvu bazalnih koncentracija kortikosterona može biti neophodna za optimalno funkcionisanje mPFC-a (Cerqueira i saradnici, 2005).

3.1.4. Sintetski glukokortikoidni hormon– deksametazon (DEX)

Decenijama unazad, u terapijske svrhe i u cilju lakšeg proučavanja efekata steroidnih hormona, strukture i funkcije specifičnih receptora, je sintetisan veliki broj analoga steroidnih receptora poput GR agonista– deksametazona (DEX), triamcinolon acetonida i drugih. U odnosu na endogene GK, sintetski steroidni hormoni ostvaruju svoje efekte pri mnogo nižim koncentracijama usled visokog afiniteta za receptor, stabilniji su u kompleksu sa receptorom, manje podložni metaboličkoj degradaciji i ispoljavaju smanjen afinitet ili se uopšte ne vezuju za proteine nosače u plazmi (Joels i de Kloet, 1994).



Slika 10. Hemijski prikaz deksametazona.

Deksametazon (9-fluoro-glukokortikoid) (*Slika 10*) se često koristi kao zamena za endogene GK kad ih organizam ne proizvodi u dovoljnoj količini.

Jedan je od najčešće prepisivanih anti-inflamatornih i imunosupresivnih⁷ lekova u tretmanu psorijaze, adrenalne insuficijencije, bakterijskog meningitisa, moždanih trauma, šloga, alergija, spazma bronhija, reumatidnog artritisa, itd.

DEX se koristi u neonatologiji kao agens za sazrevanje pluća prevremeno rođene dece, kao i u onkologiji radi sprečavanja stvaranja otoka i umanjiavanja mučnina i nagona za

⁷ DEX smanjuje lučenje citokina IL 2,4,10, TNF α i IFN γ , smanjuje deobu limfoidnih ćelija i pokreće apoptozu nezrelih timocita čime ostvaruje imunosupresivno dejstvo.

povraćanjem. Takođe, istraživanja su pokazala da primena DEX-a tokom radioterapije doprinosi poboljšanju kliničke slike i smanjuje smrtnost pacijenata (Weissman i saradnici, 1991).

Kod pacijenata obolelih od tumora obično se primenjuju farmakološke doze DEX-a koje imaju sposobnost da suprimiraju aktivnost HHA ose ako se uzimaju duži vremenski period (obično duže od 2 nedelje). Naime, DEX doza od 4 mg svakih 6 h je uobičajena doza koja odgovara kortizolu doze od 400 mg dnevno, što je oko 20 puta veća količina u odnosu na njegovu endogenu produkciju (Nahaczewski i saradnici, 2004). Kod pacijenata kojima je prepisana kratkotrajna DEX terapija (kraća od 14 dana) tretman se može naglo prekinuti jer aktivnost HHA ose nije sasvim suprimirana (Nahaczewski i saradnici, 2004). Međutim, u slučaju dugotrajnih DEX terapija kada se narušava aktivnost HHA ose, pacijentima se obično prepisuju dodatni kratkotrajni DEX tretmani (1–3 dana ili nekoliko dana duže) tokom kojih se doze postepeno smanjuju radi uspostavljanja normalnog funkcionisanja ovog sistema (Nahaczewski i saradnici, 2004).

Osim toga, DEX se primenjuje i u dijagnostici, na primer, u testu supresije deksametazonom (engl. *dexamethasone suppression test*, DST) koji predstavlja jedan od prvih funkcionalnih neuroendokrinoloških testova za detekciju poremećene aktivnosti i regulacije HHA ose (Carroll i saradnici, 1976). Kod zdravih osoba, upotreba DEX-a uzrokuje smanjenje lučenja ACTH i kortizola, dok se kod pacijenata obolelih od kancera i pacijenata podvrgnutih različitim anti-kancerogenim terapijama, kao i kod više od polovine depresivnih pacijenata mogu uočiti smanjeni intenzitet supresije kortikosterona (engl. *hyposuppression*) na DST-u što indirektno ukazuje na pad senzitivnosti negativne povratne sprege HHA sistema (Miller i saradnici, 1992).

Doze DEX-a koje se koriste u medicini su veoma bliske onima koje imaju neurotoksični potencijal i dovode do ozbiljnih oštećenja u hipokampusu (Haynes i saradnici, 2001). Krajem prošlog veka i početkom ovog, je pokazano da u osnovi uočenih promena mogu biti apoptoza granularnih ćelija dentatnog girusa, atrofija dendrita CA3 region i redukcija neurogeneze (Hassan i saradnici, 1996, Almeida i saradnici, 2000, Haynes i saradnici, 2001). Navedene promene najverovatnije nastaju usled zasićenja GR-a, dok je MR oslobođen delovanja endogenog kortikosterona. Haynes i saradnici (2001) su kod odraslih pacova uočili da DEX može dovesti do pojave regionalno-specifične apoptoze

u moždanom tkivu⁸ kada se primeni akutna doza DEX-a veća od 0.7 mg/kg. Neke studije ukazuju da tokom starenja hipokampalne ćelije postaju osetljivije na fluktuacije koncentracije kortikosteoida (Sapolsky i saradnici, 1986, Hassan i saradnici, 1996, Lupien i McEwen, 1997), kao i da je DEX doza korišćena u studiji Haynes- a i saradnika (2001) značajno veća od doze za koju je dokazano da je toksična za granularne ćelije hipokampusu starijih pacova. Sa druge strane, Karssen i saradnici (2005) nisu detektovali pojavu apoptoze u ćelijama dentatnog girusa kod adultnih mužjaka pacova Wistar soja nakon primene niske (50 µg/kg, dva puta dnevno, 5 dana) ili visoke (500 µg/kg, dva puta dnevno, 5 dana) doze DEX-a. Takođe, kod pacova u ranom postnatalnom razviću hroničan tretman DEX-om malom dozom (100 µg/kg, 7 dana) je uzrokovao promene na dendritima, ali ne i apoptozu u neuronima hipokampusu (Tan i saradnici, 2002).

Treba istaći da su direktni efekti malih i umerenih doza DEX-a na mozak i dalje nerazjašnjeni, jer DEX otežano prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (engl. *blood brain barrier*, BBB) (Meijer i saradnici, 1998) usled aktivnosti MDR1a,b (engl. *multiple drug resistance*) p-glikoproteina na površini endotelnih ćelija (de Kloet, 2000). Ovaj protein deluje kao energetska zavisna pumpa kojom se uklanjaju ksenobiotske supstance, u koje spadaju i sintetski glukokortikoidi (De Kloet i saradnici, 1998). Jedno od mogućih objašnjenja dejstva malih doza DEX-a u mozgu može biti da ovaj potentni sintetski hormon ispoljava svoje efekte prevashodno na nivou hipofize i onda indirektno na ostalim moždanim strukturama. Naime, DEX signal na nivou hipofize može uzrokovati inhibiciju aktivnosti HHA ose i smanjiti lučenje ACTH-a koji potom utiče na lučenje kortikosterona. Kao posledica potpune i/ili delimične deprivacije mozga od endogenih GK, kao i male količine DEX-a koje ipak uđu u mozak i koje slabo zamenjuju kortikosteron, nastaje stanje „hemijske adrenalektomije“ (Karssen i saradnici, 2005). Ovo stanje je po svojim karakteristikama slično ADX-u kod pacova ili miševa (de Kloet, 2000). Nasuprot efektima malih i umerenih doza, DEX primenjen u velikoj dozi je detektovan u čeonj kori, hipokampusu i hipotalamusu brzo nakon apliciranja (Birmingham i saradnici, 1993). Upravo, velike doze DEX-a imaju sposobnost narušavanja BBB-a i prodiranja u mozak (Miller i saradnici, 1992). Kod ljudi, nakon

⁸ Apoptotske ćelije su detektovane u striatumu i hipokampusu, ali ne i u lateralnom septalnom jedru (Haynes i saradnici, 2001).

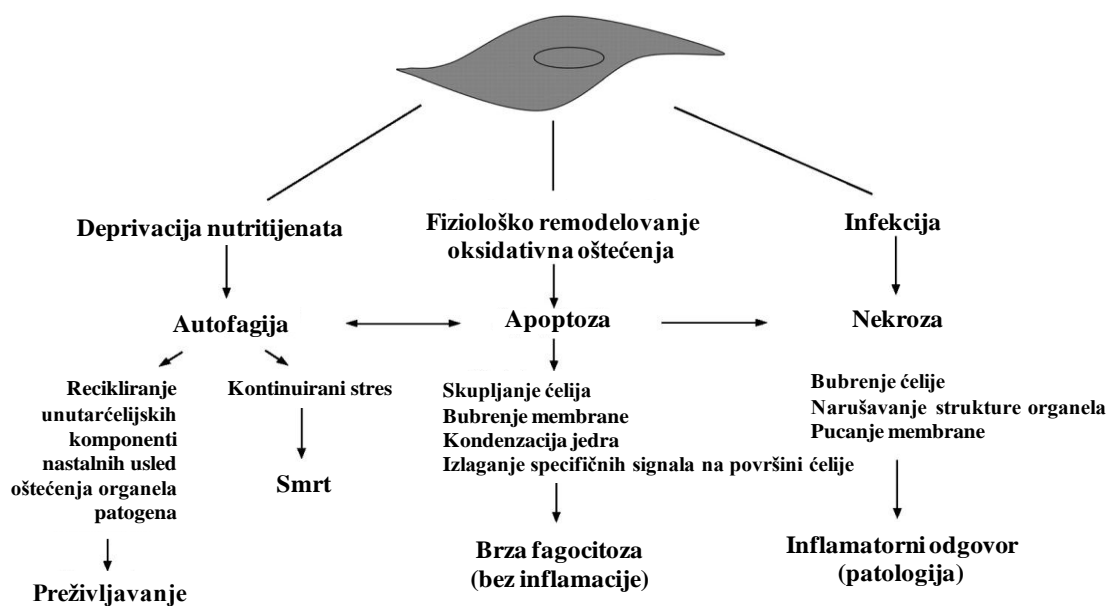
terapija u koje su uključene visoke doze DEX-a javljaju se specifične promene u ponašanju i različiti kognitivni poremećaji poput narušavanja deklarativne i radne memorije, što je slično promenama koje se javljaju nakon injeciranja visokih koncentracija kortikosterona (Cole i saradnici, 2000, Lupien i saradnici, 2002).

4. Ćelijska smrt

Programirana ćelijska smrt (engl. *programmed cell death*, PCD) je jedan od osnovnih mehanizama kontrole razvića, razvoja i diferencijacije višećelijskih organizama. Opšte je prihvaćeno da u toku razvića ljudskog embriona, PCD omogućava uklanjanje čitavih struktura poput repa, kožica između prstiju i drugo, kao i regulaciju broja neurona u nervnom sistemu.

Interakcije između ćelija regulišu pojavu ćelijske smrti na dva fundamentalno različita načina– signalima smrti i signalima preživljavanja. Za preživljavanje većine, ako ne i svih ćelija u višećelijskim organizmima potrebni su specifični signali, trofički faktori u čijem odsustvu ćelije aktiviraju tzv „programe samoubistva“ što je prvi put primećeno tokom razvića imunskog sistema. Novije studije ukazuju na to da u osnovi oba procesa leže zajednički molekularni putevi.

Do danas je opisano nekoliko načina na koje ćelije umiru: apoptoza (ćelijska smrt tipa I, engl. *cell death (CD) type 1*), autofagija (ćelijska smrt tipa II, engl. *cell death (CD) type 2*) i nekroza (ćelijska smrt tipa III, engl. *cell death (CD) type 3*) (*Slika 11*).



Slika 11. Shematski prikaz različitih načina ćelijske smrti.

4.1. Apoptoza

Apoptoza je aktivan, strogo regulisan proces ćelijske autodestrukcije, opisan u normalnim fiziološkim uslovima u toku procesa embriogeneze, razvoja i diferencijacije, ali i u nizu različitih bolesti poput kancera, autoimunskih oboljenja (reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus) i neurodegenerativnih oboljenja (Krammer, 2000).

Najranije promene koje prate apoptozu su gubitak ćelijskih veza, nastanak različitih specijalizovanih membranskih struktura, kondenzacija citoplazme i smanjenje zapremine ćelije usled gubitka unutarćelijske tečnosti i jona (Hacker, 2000), nakon čega se ćelija raspada na nekoliko struktura uokvirenih membranom takozvanih apoptotskih tela (*Slika 12*) (Ziegler i Groscurth, 2004). Na površini apoptotskih tela se pojavljuje fosfatidil-serin, koji okolnim ćelijama služi kao signal „pojedi-me“ (engl. *eat me signal*) (Fadok i saradnici, 1992). Utvrđeno je da su pod delovanjem ATP-zavisne translokaze (Israels i Israels, 1999) u normalnim, fiziološkim uslovima, fosfatidil-serin i fosfatidil-etanolamin raspoređeni na unutrašnjoj strani membrane, a fosfatidil-holin na spoljašnjoj. Nakon apoptotskog signala, aktivnost ovog enzima se smanjuje ili/i potpuno nestaje, što uzrokuje premeštanje fosfatidil-serina na spoljašnju stranu membrane. Potom, makrofagi ili susedne parenhimske ćelije u procesu *eferocitoze* prepoznaju te specifične signale, fagocitiraju/gutaju formirana apoptotska tela i razgrađuju ih.

Iako pojavu apoptoze prati niz specifičnih promena u citoplazmi i različitim organelama, najznačajnije se ipak dešavaju na nivou jedra i jedarca. Apoptotskim promenama su obuhvaćeni, kako proteini, tako i DNK. Naime, aktivacijom kaspaze 6 dolazi do degradacije lamina, strukturnih proteina koji održavaju oblik jedra. Lamini, između ostalog, omogućuju interakciju hromatina i jedarne membrane, što uzrokuje kondenzaciju hromatina i fragmentaciju DNK (Takahashi i saradnici, 1996), dok se jedarce uvećava i granulira (Darzynkiewicz i Traganos, 1998). U isto vreme, hromatin se kondenzuje u jednu ili više masa i formira agregate uz jedarnu membranu. Potom se seče u regionima bogatim AT parovima⁹ pomoću enzima DNK endonukleaza (DNKaza) koja specifično prepoznaje fosfodiesterne veze na polinukleotidnim lancima DNK molekula. Ovi enzimi spadaju u grupu– DNKaza aktiviranih kaspazama (engl. *caspase activated DNAase, CAD*). U normalnim uslovima, CAD su prisutne u neaktivnoj formi

⁹ AT parovi se nalaze u okviru takozvanih „nuclear scaffold sites“.

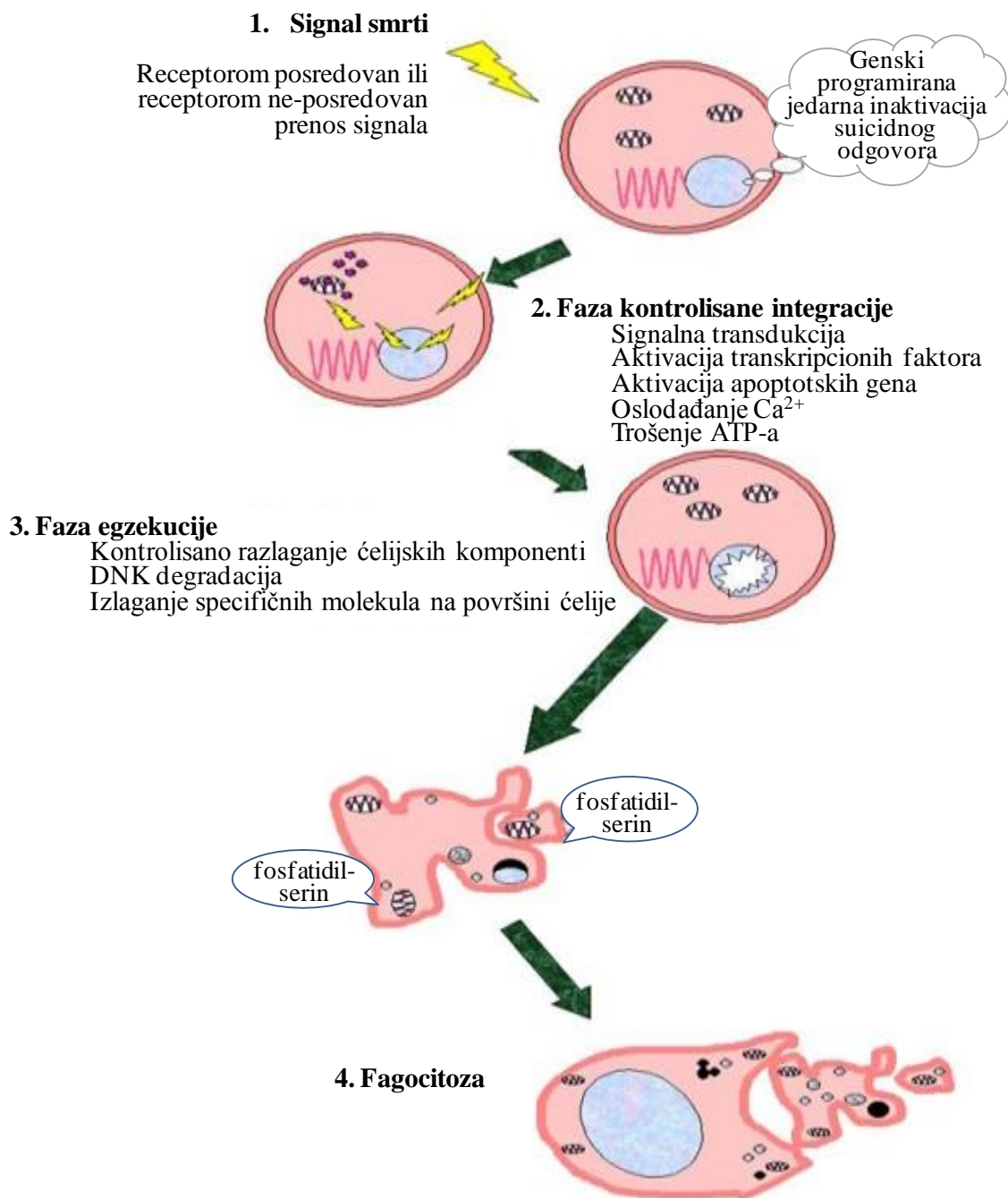
u kompleksu sa inhibitornim proteinima ICAD (engl. *inhibitor of caspase activated DNAase*) i DFF-45 (engl. *DNA fragmentation factor 45*). Tokom apoptoze, inhibitorni molekuli se uklanjaju pomoću kaspaza 3 i 7, čime se CAD enzimi aktiviraju i sa visokom specifičnošću vezuju za takozvani „linker” DNK, odnosno segmente na DNK molekulu između dva nukleozoma, što uzrokuje veoma brzu fragmentaciju DNK (Enari i saradnici, 1998). Isecanjem nastaju fragmenti dužine 300–500 bp, pa 20–200 bp (najčešće se uočavaju fragmenti dužine 180 bp), dok se finalna fragmentacija dešava u makrofagima.

Osim ovih procesa mogu se javiti i inaktivacija enzima uključenih u DNK reperaciju poput PARP-a (engl. *poly-(ADP-ribose) polymerase*), kao i enzima uključenih u replikaciju DNK, kao što je jedarni enzim DNK topoizomeraza II.

PARP je relativno velika familija proteina koju čini 17 strukturno i funkcionalno različitih članova koji učestvuju u procesima reparacije DNK i PCD-u (Casciola-Rosen i saradnici, 1996). Sve enzime ove grupe odlikuju 4 domena: DBD sa dva Zn^{2+} prstića koji je odgovoran za vezivanje za DNK molekul i konformacione promene; mesto sečenja kaspazama; auto-modifikacioni domen neophodan za oslobađanje proteina sa DNK nakon katalize i za inaktivaciju izazvanu sečenjem; i katalitički domen bitan za procese polimerizacije.

Aktivacija PARP-a se dešava usled metaboličkih, hemijskih i radijacijom nastalih oštećenja molekula DNK, u vidu jednolančanih prekida. Svoju funkciju ovaj protein ostvaruje detekcijom tih prekida i signalizacijom enzimskoj replikacionoj mašineriji, tako što se N-terminus vezuje za oštećeni DNK molekul, konformacijski menja i u prisustvu NAD^+ i ATP-a započinje sintezu poli ADP riboznih (engl. *poly (ADP ribose)*, PAR) lanaca koji predstavljaju signal za različite reparacione enzime poput DNK ligaze III i DNK polimeraze β , kao i za „scaffold” proteine (proteine skele). Nakon popravke PAR lanci se uklanjaju enzimom PARG (engl. *poly (ADP ribose) glycohydrolase*). U nastojanju da popravi oštećenje, PARP povećano troši ATP što može uzrokovati lizu i ćelijsku smrt. Takođe, pojačano stvaranje PAR-a stimuliše oslobađanje faktora indukcije apoptoze (engl. *apoptosis inducing factor*, AIF) iz mitohondrija i aktiviranje procesa nezavisnih od kaspaza koji dovode do ćelijske smrti.

PARP je prvi protein koji je identifikovan kao supstrat za kaspaze 3 i 7. Tokom apoptoze, kaspaza 3 seče PARP na Asp²¹⁴ i Gly²¹⁵, čime nastaju dve neaktivne subjedinice različitih molekulskih masa: 89 kDa koja sadrži auto-modifikacioni i katalitički domen, kao i manja subjedinica od 24 kDa sa DNK-vezujućim domenom.

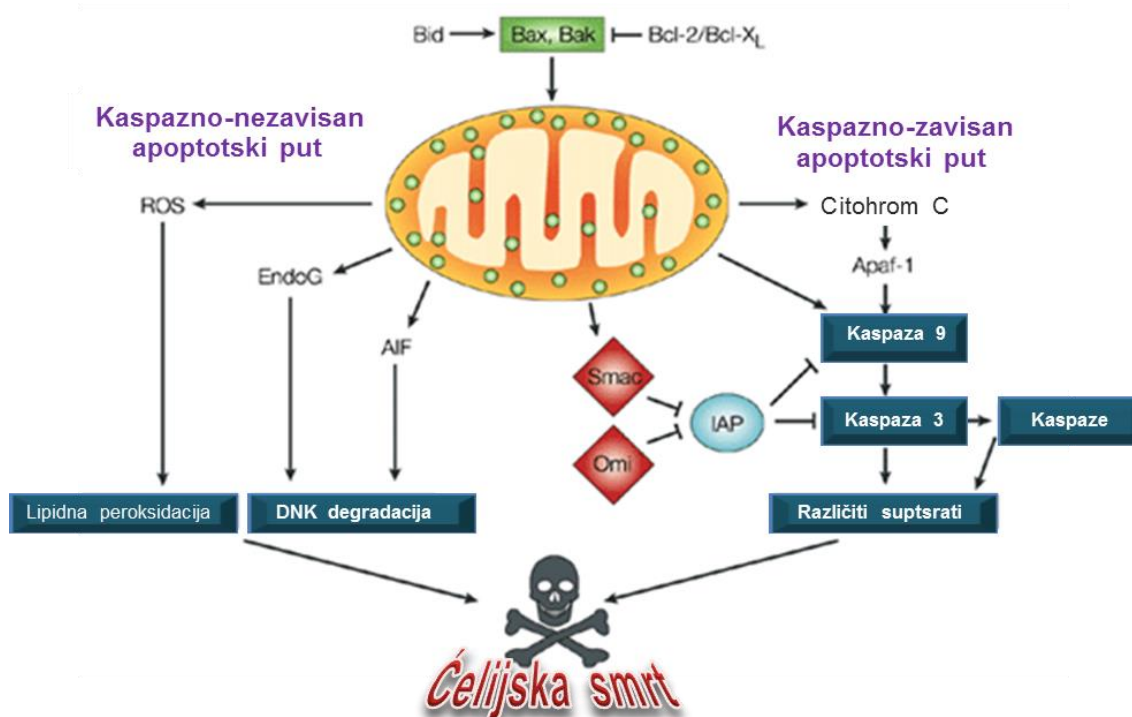


Slika 12: Morfološke promene koje se dešavaju u ćelijama podvrgnutim apoptozi (www.pharmainfo.net).

4.2. Proteini apoptotske kaskade

Stimulusi tzv. *apogeni* (Corcoran i saradnici, 1994) mogu pokrenuti apoptotsku signalizaciju aktivacijom dva konvergirajuća puta: ekstrinzičkim ili spoljašnjim putem, preko receptora smrti i intrinzičkim ili unutrašnjim putem, posredovanim članovima Bcl-2 familije (Marsden i Strasser, 2003). U oba puta dolazi do aktivacije kaskade proteolitičkih enzima, članova familije kaspaza (engl. *cysteine aspartyl-specific proteases*, *CASPASE*) (Kohler i saradnici, 2002).

Međutim, iako kaspaze imaju centralnu ulogu u oba apoptotska mehanizma, apoptoza se može odvijati i nezavisno od njihove aktivacije, takozvanim kaspazno-nezavisnim putem. Uočeno je da reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i nekoliko proteina učestvuju u ovom putu, poput endonukleaze G (EndoG), AIF-a, itd (Donovan i Cotter, 2004) (*Slika 13*).



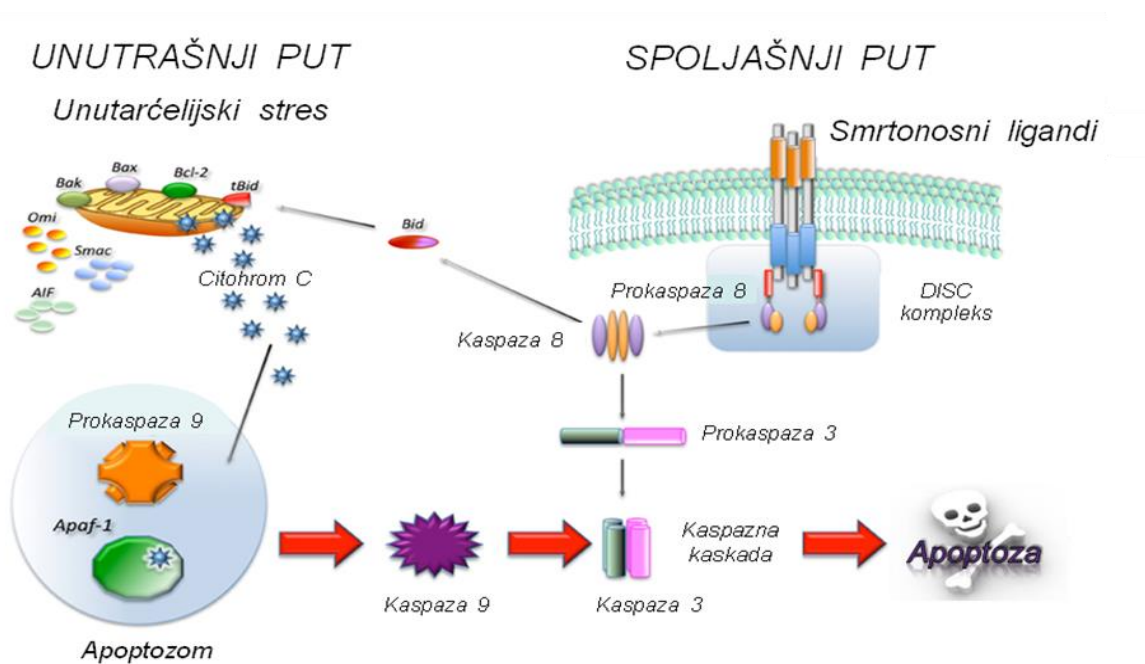
Slika 13. Kaspazno-nezavisni i kaspazno-zavisni apoptotski putevi.

4.2.1. Pokretanje apoptoze– spoljašnji put

Spoljašnji put pokretanja apoptotske kaskade započinje izvan ćelije vezivanjem međusobno veoma sličnih liganada smrti za različite pro-apoptotske receptore u ćelijskoj membrani, što je dalje praćeno aktivacijom kaspaza (Walczak i Sprick, 2001)

(Slika 14). Pro-apoptotski receptori ili receptori smrti su članovi TNF (engl. *tumor necrosis factor*) superfamilije receptora koje karakteriše vanćelijski domen bogat cisteinom i takozvani domen smrti (Varfolomeev i Ashkenazi, 2004). Do danas su detaljno opisane strukture i funkcije nekoliko receptora smrti, poput Fas (CD95), TNFR1 (TNF receptor 1), DR3, DR4 i DR5.

Nakon vezivanja odgovarajućeg liganda dolazi do oligomerizacije receptora i do grupisanja njihovih citoplazmatskih domena. Ovaj proces prati vezivanje odgovarajućih unutarćelijskih adapterskih proteina, u slučaju receptora Fas¹⁰ to je FADD (engl. *fas associated death domain*), odnosno TRADD (engl. *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain*) u slučaju TNFR1¹¹. Ovi adapterski domeni se dalje grupišu u kompleks sa pro-kaspazama 8 i 10, i formira se DISC (engl. *death inducing signaling complex*) što za posledicu ima aktivaciju brojnih apoptotskih gena i proteina (Boatright i saradnici, 2003).



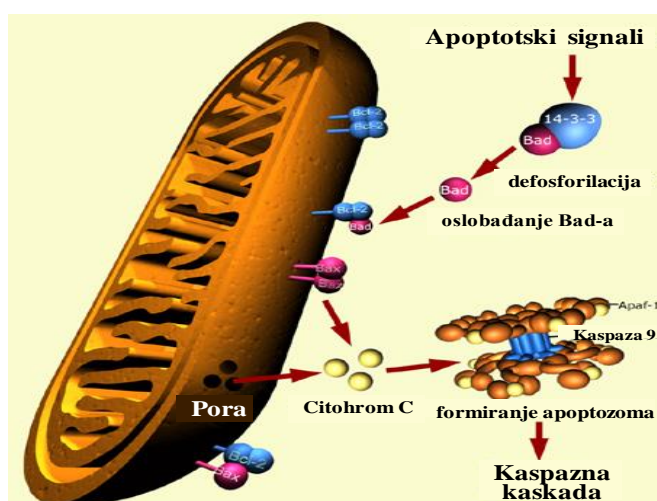
Slika 14. Pokretanje apoptoze, spoljašnji i unutrašnji putevi (www.imgenex.com).

¹⁰ Fas (engl. *apoptosis antigen 1* (APO-1), *cluster of differentiation 95* (CD95), tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNFRSF6)) je lokalizovan na spoljašnjoj membrani ćelija i uključen je u pokretanje apoptoze.

¹¹ TNFR1 (engl. *tumor necrosis factor receptor 1*) po vezivanju TNF-a započinje apoptotsku kaskadu koja je prevashodno uključena u pro-inflamatorni odgovor.

4.2.2. Pokretanje apoptoze– unutrašnji put

Unutrašnji put ili „Bcl-2 kontrolisani put“ (engl. *Bcl-2 controlled pathway*) se obično pokreće teškim oštećenjem DNK molekula, gubitkom ćelijskih faktora preživljavanja ili drugim tipovima jakih stresora. Ključni događaj ovog puta je formiranje *apoptozoma* koji nastaje nakon oslobađanja citohroma c iz mitohondrija (Baliga i Kumar, 2003). Za oslobođeni citohrom c se vezuje APAF-1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*) i u prisustvu energije koja nastaje konverzijom ATP-a i dATP-a, prvo se aktivira kaspaza 9. Kompleks kaspaza 9/apoptozom dalje aktivira efektorsku kaspazu 3, što se u apoptotskoj kaskadi smatra „tačkom bez povratka“ (Marsden i saradnici, 2004).



Slika 15. Formiranje apoptozoma (www.images.google.com).

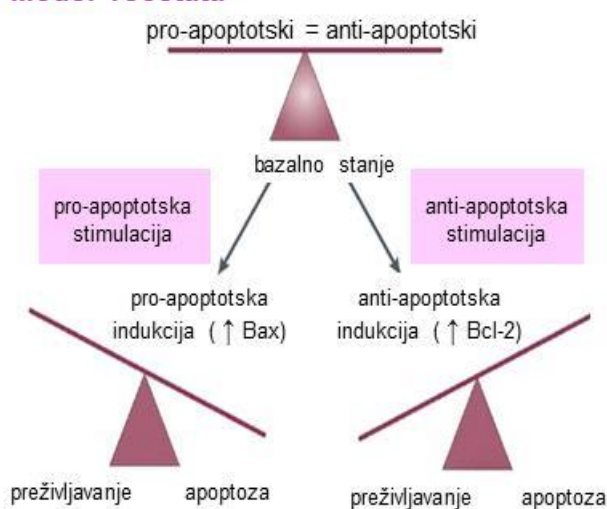
U normalnim, fiziološkim uslovima, spoljašnja mitohondrijalna membrana, predstavlja barijeru koja sprečava oslobađanje apoptotskih proteina. Sledeći apoptotski signal, oslobađanje proteina, se odvija posredstvom formiranja novih pora ili modulacijom već postojećih pora u spoljašnjoj membrani mitohondrije. Sam integritet mitohondrijske membrane regulišu proteini Bcl-2 familije (Slika 15), koji igraju glavnu ulogu u odlučivanju da li će ćelija preživeti ili umreti (Wang, 2001).

Proteini Bcl-2 familije

Bcl-2 familija je evolutivno veoma očuvana i obuhvata proizvode 25 različitih gena (Elmore, 2007). Neki članovi Bcl-2 familije poseduju C-terminalni hidrofobni domen, koji je neophodan za pozicioniranje molekula na/u mitohondrijsku membranu (Korsmeyer, 1999), kao i do četiri konzervirana Bcl-2 homologa domena (BH1–4). Upravo na osnovu strukture domena, kao i njihovih funkcija, proteini Bcl-2 familije se mogu podeliti na (Donovan i Cotter, 2004):

1. Anti-apoptotske: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w i drugi. Mnogi sadrže hidrofobni C-terminalni domen i/ili FKBP38 kojim se mogu vezati za unutarćeljske membrane poput membrane mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i jedra čime održavaju njihov integritet;
2. Pro-apoptotske: Bax, Bak i drugi. Locirani su prevashodno u citoplazmi ili vezani za citoskelet, a po apoptotskom signalu se vezuju za spoljašnju mitohondrijalnu membranu i učestvuju u formiranju i otvaranju pore;
3. BH-3-only proteine ili „stražari” (engl. *sentinels*): Bid, Bad, PUMA, NOXA. U neaktivnoj ćeliji su inaktivirani, a nakon apogena neophodni su za aktivaciju pro-apoptotskih članova.

Model reostata



Slika 16. Model reostata.

U nervnom tkivu sisara, najviše zastupljeni članovi Bcl-2 familije proteina su Bcl-2, Bcl-xl i Bax. Precizan mehanizam kojim proteini Bcl-2 familije regulišu apoptotsku signalizaciju nije još uvek u potpunosti razjašnjen (Donovan i Cotter, 2004), mada je poznato da njihov odnos delom određuje podložnost ćelije signalima smrti (model reostata) (*Slika 16*).

U ćelijama u stanju mirovanja, Bax je u formi monomera prisutan u citoplazmi ili „labavo“ vezan za mitohondrijsku membranu i služi kao senzor ćelijskog oštećenja ili stresa. Bcl-2 protein je zakačen za mitohondrijsku membranu ili se nalazi u intramembranskom prostoru mitohondrija i sprečava premeštanje Bax-a, ugrađivanje Bad proteina u membranu i Bax/Bak dimerizaciju u mitohondrijalnoj membrani (Donovan i Cotter, 2004). U odgovoru na stresne stimuluse, Bcl-2 disosuje sa membrane, dok se Bax protein premešta ka mitohondrijama i stiče mogućnost oligomerizacije (Hsu i saradnici, 1997). Po ugrađivanju u mitohondrijsku membranu, homodimerizacijom sa drugim Bax molekulima dolazi do otvaranja pore/kanala i

oslobađanja citohroma c (Kuwana i Newmeyer, 2003), Ca^{2+} i/ili nekog drugog apoptotskog faktora. U citoplazmi, oslobođeni citohrom c gradi kompleks sa APAF1, koji dalje aktivira inicijatornu kaspazu 9 (*Slika 14*).

U *in vivo* uslovima je uočeno da u neuronima koji ulaze u apoptozu nivo Bax-a raste dok nivo Bcl-2 i Bcl-xl opada (Gillardon i saradnici, 1995, MacGibbon i saradnici, 1997). Naime, kod ljudi u nervnom sistemu, nivo Bax proteina je povećan u neuronima koji su preživeli veća oštećenja i postepeno ulaze u ranu fazu procesa apoptoze. Dok, sa druge strane, nivo Bcl-2 proteina je povećan kad su neuroni pretrpeli manja oštećenja koja nisu dovoljna za pokretanje apoptotske kaskade (*Slika 16*).

Kaspaze

Kaspaze su proteolitički enzimi, direktno ili indirektno odgovorni za morfološke i biohemijske promene koje karakterišu proces apoptoze kao što su bubrenje membrane usled degradacije strukturnih proteina; kondenzacija DNK, usled promena na i/ili u jedru; fragmentacija DNK, zbog aktiviranja jedarnih nukleaza; prepoznavanje umirujućih ćelija od strane okolnih ćelija na osnovu fosfatil-serina koji nastaje kao posledica inaktivacije ATP-translokaze, itd (Zlender, 2003).

U skoro svim ćelijama, kaspaze su prisutne kao neaktivni zimogeni usled delovanja proteina IAP (engl. *inhibitor of apoptosis*), koji direktno inhibiraju kaspaze 8 i 9, i indirektno kaspaze 3 i 7 (Miller, 1999). Aktivacija kaspaza podrazumeva proteolitičku obradu, tako što se zimogeni seku i nastaju velika subjedinica od 20 kDa (p20) i mala subjedinica od 10 kDa (p10) (Reed, 2000).

Do sada je identifikovano 14 strukturno različitih kaspaza, koje se mogu podeliti na:

- Inicijatorske (engl. *upstream*) kaspaze– kaspaze 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 i 12. Ovu grupu kaspaza odlikuje dugačak pro-domen na N-terminalnom kraju koji je neophodan za formiranje platformi za protein-protein interakcije. U ćeliji zimogeni postoje kao neaktivni monomeri, dok se pod uticajem različitih stimulusa, oni prvo regrutuju i pomoću N-terminusa formiraju dimere (Boatright i Salvesen, 2003), nakon čega se aktiviraju u specijalnim multiproteinskim kompleksima (Lamkanfi i saradnici, 2002). Apoptozom je aktivacioni kompleks za kaspazu 9, dok se kaspaze 8 i 10 aktiviraju u DISC kompleksu (*Slika 14*).

- Efektorske (engl. *downstream*) ili egzekutorske kaspaze– kaspaze 3, 6 i 7. Kaspazama ove grupe nedostaje veliki N-terminalni ne-enzimski domen (Walczak i Sprick, 2001) čija funkcija je još uvek nepoznata. Zimogeni kaspaza 3 i 7 javljaju se u vidu dimera (Boatright i Salvesen, 2003), a njihova aktivacija odvija se u dva koraka: prvi podrazumeva proteolitičko isecanje¹², kojim se velika subjedinica odvaja od male i drugi korak, takozvani autokatalitički proces, tokom koga se uklanja pro-domen i time se aktiviraju kaspaze ove grupe (Roy i saradnici, 2001). Poznato je da kaspaze 3, 6 i 7 katalizuju degradaciju mnogobrojnih substrata uključujući citokeratin, citoskeletni protein- α -fodrin, nuklearni NuMa, PARP i drugo (Elmore, 2007). Aktivirana kaspaza 3 prepoznaje tetra-peptidne sekvence na supstratima i hidrolizuje peptidne veze nakon Asp-x-x-Asp motiva. Zimogen kaspaze 3 je protein molekulske težine od 32 kDa koji se nakon apoptotskog signala seče na dve subjedinice od 17 kDa i 12 kDa. Dve subjedinice od 17 kDa i dve subjedinice od 12 kDa obrazuju heterotetramere koji predstavljaju aktiviranu kaspazu 3. Katalitičko mesto kaspaze 3 obuhvata sulfhidrilna grupa Cys²⁸⁵ koja stabilizuje ključne aspartatne ostatke i imadizolni prsten His²³⁷ koji po prepoznavanju, seče peptidnu vezu.

NF κ B, p53, AKT

Treba istaći i da promene u ekspresiji i/ili aktivaciji brojnih transkripcionih faktora (na primer, NF κ B) i onkogeni (na primer, transkripcioni faktori c-myc), faktori rasta ili mitogeni, citoplazmatske serin/treonin kinaze (AKT kinaza), produkta tumor supresor gena (p53), mogu usloviti pokretanje apoptozne signalizacije.

Jedarni faktor kapa B (engl. *nuclear factor κ B*, NF κ B) je proteinski kompleks koji pripada grupi transkripcionih faktora na čiju aktivnost utiču male promene redoks stanja u ćeliji. NF κ B je prisutan u skoro svim ćelijama i uključen je u imunski, inflamatorni, akutno-fazni odgovor, ali i u kontroli ćelijske proliferacije, diferencijacije, apoptoze i onkogeneze (Kucharczak i saradnici, 2003).

NF κ B se sastoji od članova NF κ B/Rel familije, koju čine subjedinice NF κ B1 (p50), NF κ B2 (p52), Rel A (p65), Rel B i c-Rel (Ghosh i saradnici, 1998). Svi članovi familije

¹² Ovaj korak uglavnom izvršava aktivirana inicijatorska kaspaza ili DISC-om aktivirana kaspaza 8 ili apoptozomom aktivirana kaspaza 9.

na N-terminalnom kraju imaju visoko konzervisani Rel homologni domen, odgovoran za vezivanje proteina za DNK, dimerizaciju, interakciju sa inhibitornim proteinom i NLS, dok je C-terminalni region Rel A, Rel B i c-Rel transaktivacioni domen.

Aktivna forma NF κ B je heterodimer koji se sastoji od p65 i p50 ili p52 subjedinice. Uočeno je da različite forme dimera prepoznaju različite κ B motive, a najčešća forma nađena u većini ćelija je p65/p50 heterodimer. U nestimulisanim ćelijama, Rel/NF κ B subjedinice proteina su prisutne u citoplazmi kao neaktivni homo- ili heterodimeri vezani za inhibitorni protein I κ B. Ovaj inhibitorni protein sprečava premeštanje NF κ B u jedro, tako što maskira NLS i sprečava vezivanje NF κ B za DNK i njegovu transaktivacionu funkciju (Ghosh i saradnici, 1998). Brza i prolazna aktivacija NF κ B kompleksa zavisi od fosforilacije I κ B koja je katalizovana I κ B kinaznim kompleksom (IKK) (Kucharczak i saradnici, 2003). Fosforilacijom NF κ B na Ser³² i Ser³⁶, I κ B molekul se obeležava na Lys²¹ i Lys²², što dalje vodi ka proteolitičkoj degradaciji inhibitornog proteina, oslobađanja NLS-a i premeštanja NF κ B u jedro. Po ulasku u jedro p65/p50 se vezuje za κ B responsivne elemente na DNK i stimuliše transkripciju mnogih gena, poput gena za inflamatorne molekule, uključujući citokine, hemokine i adhezivne molekule, gene uključene u ćelijsku proliferaciju ili apoptozu, kao i gene koji kodiraju proteine akutno-faznog odgovora, na primer, gene aktivirane u odgovoru na stres (Cu/ZnSOD, MnSOD ili geni ranog odgovora, Fos) (Ghosh i saradnici, 1998, Ghosh i Hayden, 2008). U nervnom sistemu, NF κ B reguliše i procese uključene u sinaptičku plastičnost, memoriju i učenje.

AKT ili protein kinaza B je ćelijski homolog virusnog onkogenog (*v-AKT*) poreklom iz retrovirusa AKT8 izolovanog iz T-ćelija limfoma glodara (Bellacosa i saradnici, 1991, Bellacosa i saradnici, 1993, Heljic i Brazil, 2011). Danas su identifikovana tri člana¹³ PKB familije: PKB α /AKT1, PKB β /AKT2 i PKB γ /AKT3, koji su kodirani od strane različitih gena, mada pokazuju veliku homologiju i preko 80 % sličnosti u amino-kiselinskom sastavu (Fresno Vara i saradnici, 2004). Sve tri izoforme sadrže: N-terminalni domen sa plekstrin homologim (PH) regionom dužine oko 100 amino kiselina, odgovoran za lipid-protein i protein-protein interakcije; centralni-kinazni

¹³ Sva tri molekula su različito eksprimirana na nivou proteina i iRNK, tako su PKB α /AKT1 i PKB β /AKT2 više zastupljene dok je PKB γ /AKT3 manje (Fresno Vara i saradnici, 2004).

domen bogat serinskim i treoninskim ostacima koji su odgovorni za aktivaciju AKT molekula (T³⁰⁸ na AKT1) i fosforilaciju supstratnih proteina; C-terminalni domen–hidrofobni region bogat prolinom koji poseduje sekundarno regulatorno mesto fosforilacije (S⁴⁷³ na AKT1) (Datta i saradnici, 1999, Fresno Vara i saradnici, 2004).

AKT je serin/treonin kinaza koja se vezuje za fosfatne grupe na fosfatidil inozitol trifosfat (PIP3) kinazi¹⁴. U nestimulisanim ćelijama, nivo PIP3 je mali i AKT se nalazi u citoplazmi u neaktivnoj formi. Nakon stimulacije receptora, raste količina PIP3 u ćeliji i AKT se regrutuje ka ćelijskoj membrani i aktivira se. Naime, interakcija sa PIP3 se odvija preko PH domena, što uzrokuje konformacione promene, čime se oslobađa katalitičko mesto još uvek neaktivnog AKT-a, dok se potpuna aktivacija odvija u prisustvu PKD1 kinaze. Aktivirani AKT se potom oslobađa sa ćelijske membrane i difunduje u citosol gde fosforiliše različite ciljane proteine (Andric i Kostic, 2007). Na taj način, AKT reguliše procese preživljavanja, blokirajući komponente ćelijske smrti u citoplazmi i kontrolišući ekspresiju gena odgovornih za preživljavanje i smrt, kao i metaboličke puteve uključene u ćelijsko preživljavanje (Brunet i saradnici, 2001a).

Poslednjih par decenija identifikacija supstrata za AKT je olakšana otkrićem specifičnog konsenzus peptidnog motiva (RXRXXpS/T) (Brunet i saradnici, 2001a). Ovaj motiv je prisutan u velikom broju proteina za koje je danas poznato da predstavljaju supstrat za AKT u *in vivo* i *in vitro* uslovima, poput transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju komponenti mašinerije ćelijske smrti, članova Bcl-2 superfamilije, regulatora translacije (4 E BP-1), eNOS (engl. *endothelial Nitric Oxide Synthase*), subjedinice telomerazno reverzne transkriptaze, produkta tumor supresor gena BRCA1, drugih proteinskih kinaza (Raf, IκB, GSK-3) (Brunet i saradnici, 2001a).

p53 protein je tumor supresorski protein, kodiran TP53 genom na hromozomu 17 (17p13.1) kod čoveka. Čovečji protein poseduje 7 domena: N-terminalni domen odgovoran za transkripcionu aktivaciju (engl. *transcriptional activation domain*, TAD) sa 2 komplementarna regiona neophodna za regulaciju transkripcije pro-apoptotskih gena; aktivacioni domen bitan za apoptotsku aktivnost molekula (AD2); domen bogat prolinom koji obavlja istu funkciju kao prethodni domen; centralni DBD sa jednim Zn²⁺

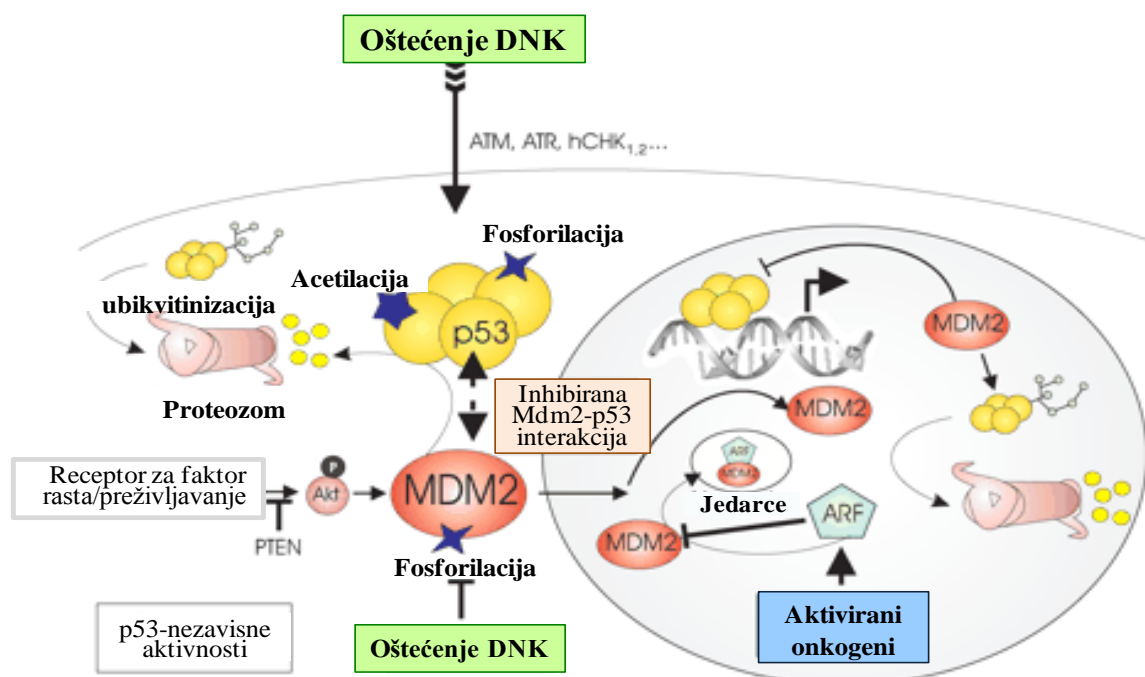
¹⁴ PI3 kinazna katalitička subjedinica generiše fosfatidil fosfate PIP2 i PIP3 neophodne za aktivaciju nekoliko serin/treonin kinaza: AKT/protein kinazu B, kinazu indukovanu serumom i glukokortikoidima (SGK), ribozomalnu S6 kinazu (RSK) i protein kinazu C (PKC) (Brunet i saradnici, 2001b).

prstićem i nekoliko argininskih amino kiselina, kojim se p53 vezuje za svoj ko-represor LMO3 (engl. *LIM domain only protein 3*); domen neophodan za premeštanje u jedro (NLS); homo-oligomerizacioni domen neophodan za aktivnost ovog molekula; i C-terminus koji inhibira vezivanje centralnog domena za DNK.

U normalnim fiziološkim uslovima, p53 je protein sa kratkim poluživotom, prisutan u ćelijama u malim količinama usled stalne degradacije (May i May, 1999). Najpoznatiji negativni regulator p53 proteina je protein Mdm2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*), koji je produkt transkripcije samog p53. On se nalazi u kompleksu sa p53 molekulom, blokira njegov N-terminalni TAD i time ne dozvoljava aktivaciju p53 i njegov prelazak iz citoplazme u jedro. Takođe, Mdm2 je ubikvitin-ligaza koja katalizuje vezivanje ubikvitina za p53 i time ga obeležava za razgradnju u proteozomu.

Nakon oštećenja DNK dolazi do stabilizacije p53 proteina i povećanja njegovog nivoa, N-terminus se fosforiliše, narušava se veza sa Mdm2 i regrutuju se drugi proteini (npr. Pin1) koji omogućavaju konformacione promene i vezivanje transkripcionih koaktivatora (p300 i PCAF). Oni, dalje, acetiluju C-terminalni region i olakšavaju vezivanje za DNK i time aktivaciju ili inaktivaciju specifičnih gena (*Slika 17*).

Konačan efekat p53– uvođenje ćelije u apoptozu ili blokada ćelijskog ciklusa zavisi od većeg broja faktora, kao što su, tip, starost i funkcija ćelije ili stepen oštećenja DNK.



Slika 17. p53 signalni put (<http://mcr.aacrjournals.org/content/1/14/1001/F1.full>).

Kao transkripcioni faktor, p53 kontroliše ekspresiju nekoliko gena, reguliše proces apoptoze i genomsku stabilnost aktivirajući proteine bitne za reparaciju DNK, zaustavljajući ćelijski ciklus dok se oštećenje ne otkloni ili pokreće apoptotsku mašineriju, ukoliko je preveliko oštećenje DNK. Jedna od pretpostavki je da nakon oštećenja DNK, p53 pokreće apoptotsku kaskadu regulacijom transkripcije pojedinih članova Bcl-2 familije, tačnije Bax-a koji je transkripciono regulisan ovim proteinom (Miyashita i Reed, 1995, Almeida i saradnici, 2000). Međutim, pokretanje apoptoze posredstvom p53 moguće je i preko mehanizama koji su nezavisni od transkripcije, kao na primer, direktnim delovanjem p53 na mitohondrije, odnosno oslobađanjem citohroma c i aktivacijom prokaspaze 3 (Marchenko i saradnici, 2000) ili povećanjem ekspresije CD95 receptora na membrani, transportom ovog proteina iz Goldži kompleksa, bez pokretanja transkripcije (Bennett i saradnici, 1998).

5. Uloga glukokortikoida u apoptozi i preživljavanju

Kao što je već spomenuto, endogeni i egzogeni GK kontrolišu i modulišu različite procese u brojnim perifernim tkivima i CNS-u (Roy i Sapolsky, 2003a). Poznato je da su GK neophodni za opstanak neurona i sinaptičku plastičnost, dok su sa druge strane, hronično povećane koncentracije GK uključene u aktivaciju apoptotske kaskade i patofiziologiju mnogih mentalnih poremećaja (Numakawa i saradnici, 2012).

GK-posredovana apoptoza je detektovana u ćelijama perifernih tkiva, poput mioblasta (Singleton i saradnici, 2000), osteoblasta, osteocita i osteosarkoma (Gohel i saradnici, 1999, Rogatsky i saradnici, 1999, Eberhardt i saradnici, 2002), testisa (Yazawa i saradnici, 1999) i limfocitima¹⁵ (Wyllie, 1986). Veliki broj studija, mada ne sve (Gold i saradnici, 2001) ukazuju da su uočene apoptozne aktivnosti GK posredovane glukokortikoidnim receptorima i da zavise od proteinske sinteze (Roy i Sapolsky, 2003a). Međutim, primećeno je da GK u limfocitima mogu direktno da inhibiraju aktivnost NFκB (Riccardi i saradnici, 1999), utiču na razgradnju anti-apoptotskih molekula c-IAP1 i XIAP (Yang i saradnici, 2000), otpuštanje citohroma c i narušavanje mitohondrijskog potencijala (Miyashita i saradnici, 1998, Riccardi i saradnici, 1999), što dalje dovodi do aktivacije kaspaza, isecanja PARP-a i internukleozomalne

¹⁵ Najviše je proučavana apoptoza u limfocitima, koja između ostalog doprinosi uočenim imunosupresivnim aktivnostima GK (Roy i Sapolsky, 2003).

fragmentacije DNK (Compton i Cidlowski, 1986, Miyashita i saradnici, 1998) i naposljetku do pojave apoptoze. Takođe, GK mogu da deluju uzvodno od kaspaza, tako što povećavaju influks Ca^{2+} i uzrokuju aktivaciju Ca^{2+} -zavisnih endonukleaza (Evans-Storms i Cidlowski, 2000). Osim ćelijske smrti koja nastaje kao posledica poremećaja koncentracije endogenih GK, apoptotske promene se mogu uočiti i nakon primene sintetičkih GK, poput DEX-a.

Sa druge strane, uočeno je da GK mogu blokirati apoptozu u osteoblastima, hepatomima, hepatocitima, fibroblastima, mlečnim žlezdama (Evans-Storms i Cidlowski, 2000), granuloznim ćelijskim linijama (Sasson i saradnici, 2001) i imunskom sistemu (Riccardi i saradnici, 1999).

Uklanjanje nadbubrežnih žlezda dovodi u CNS-u do pokretanja apoptotske kaskade (Sloviter i saradnici, 1993a, Sloviter i saradnici, 1993b), koja može biti blokirana specifičnim vezivanjem egzogenih GK za MR i njegovom aktivacijom (Woolley i saradnici, 1990). Aktivirani MR ispoljava anti-apoptotske efekte (Woolley i saradnici, 1990) i doprinosi preživljavanju neurona (Crochemore i saradnici, 2005), tako što povećava odnos različitih anti- vs. pro-apoptotskih molekula pogotovu Bcl-2 proteina (Roy i Sapolsky, 2003a) i smanjuje aktivnost kaspaze 3 (Munier i saradnici, 2012).

Gundisch i saradnici (2012) su uočili da DEX sprečava apoptozu, povećava vijabilnost ćelija i njihovu proliferaciju u *in vivo* i *in vitro* uslovima, aktivacijom GR-a, protein kinaze B/AKT i p38 mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK). Takođe, pokazano je da DEX blokira apoptozu i smanjuje aktivnost pro-apoptotskog $p75^{NTR}$ receptora u povređenoj kičmenoj moždini (Brandoli i saradnici, 2001).

* * *

Usled neusklađenosti rezultata mnogih studija, proučavanje efekata DEX-a kako u osnovnim istraživanjima tako i u prekliničkim i kliničkim studijama predstavlja novo i interesantno polje istraživanja prvenstveno stoga što se efekti niskih doza DEX-a na endogene GK ne mogu ispitivati centralno usled blokiranja njegovog ulaska u mozak dejstvom MDR p-glikoproteina i/ili nekom drugim mehanizmom.



CILJ RADA

Deksametazon je jedan od najčešće prepisivanih lekova u tretmanu mnogih inflamatornih i autoimunskih oboljenja. Često se koristi i kao pomoćni lek u hemo- i radioterapiji pacijenata obolelih od limfoma, sarkoma i karcinoma, budući da smanjuje otok kod obolelih od tumora mozga i reakcije okolnih tkiva, poput inflamacije, kao i citotoksične efekte terapije. Mada, podaci nekoliko prekliničnih i kliničnih istraživanja ukazuju da deksametazon dovodi do smanjenja efekata primenjenih terapija kancera i do pojave rezistencije kod pacijenata koji primaju hemoterapiju.

Brojne studije na životinjama ukazuju da deksametazon može regulisati sinaptičku plastičnost, sprečiti apoptozu, povećati vijabilnost ćelija i njihovu proliferaciju u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Sa druge strane, kod pacova, primećeno je da ovaj potentni sintetski glukokortikoid uslovljava pojavu niza negativnih efekata u perifernim tkivima i mozgu poput apoptoze u mioblastima, osteoblastima, osteocitama, testisima, kao i u granularnom sloju dentatnog girusa hipokampusa, što može uzrokovati smanjenje kognitivnih i motornih funkcija.

Imajući u vidu neusaglašenost rezultata mnogih studija, **osnovni cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita mehanizam dejstva ovog potentnog agoniste glukokortikoidnog receptora na složenu kaskadu apoptotskih signalnih puteva u različitim moždanim strukturama polno zrelih mužjaka pacova Wistar soja.**

U skladu sa navedenim ciljem izučavani su sledeći parametri:

1. Kasni efekat deksametazona na aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose—konkretno na nivo slobodnog kortikosterona u serumu i izabranim tkivnim ekstraktima hipokampusa i prečeoone kore, kao i na ekspresiju glukokortikoidnog receptora u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i prečeonoj kori;
2. Uticaj deksametazona na citomorfološke promene u hipokampusu i prečeonoj kori primenom bojenja *krezil ljubičasto*;
3. Uticaj deksametazona na nivo i obim ćelijske smrti, praćenjem:
 - a. Nivoa fragmentacije DNK u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i prečeonoj kori;
 - b. Broja apoptotskih ćelija pomoću *fluoro-jade B* bojenja preseka hipokampusa i prečeoone kore;

- c. Nivoa signalnih molekula uključenih u apoptotske puteve poput p53, Bcl-2 i Bax u različitim subćelijskim frakcijama hipotalamusa, hipofize, hipokampusa i prečone kore;
 - d. Nivoa ekspresije pro-apoptotskih enzima– citohroma c, prokaspaze 3, sečene kaspaze 3 i PARP u ukupnim ćelijskim ekstraktima hipotalamusa, hipofize, hipokampusa i prečone kore;
4. Uticaj deksametazona na aktivaciju AKT kinaze i proteinsku ekspresiju NFκB u ukupnim ćelijskim ekstraktima hipofize, hipotalamusa, hipokampusa i prečone kore.

MATERIJALI I METODE

1. Materijali

Hemikalije korišćene u ovom radu su p.a. stepena čistoće. Od firme SERVA, Heidelberg, Nemačka, su nabavljene sledeće hemikalije: Tris baza, glicin, spermin, spermidin, aprotinin, antipain, leupeptin, dietilpirokarbonat (DEPC), agaroz, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin).

Od firme Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD, su nabavljeni: goveđi serumski albumin (BSA), natrijum dodecil sulfat (SDS), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), Tween-20, saharoza, natrijum fluorid, β -merkaptoetanol, ditiotreitrol (DTT), etilendiamino-tetrasirćetna kiselina (EDTA), etilen glicerol tetrasirćetna kiselina (EGTA), akrilamid, folin, DePeX i deksametazon (DEX).

Boja *fluoro-jade B* je proizvod firme Chemicon International Inc, SAD; *Hoechst 33258* je proizvod firme Acros Organics, Fair Lawn, NJ, SAD; boja *krezil ljubičasto* je proizvod firme FD NeuroTechnologies Inc, SAD.

Antitela korišćena u imunoblot analizi su prikazana u **Tabeli 1**. Polivinilidendifluorid (PVDF) membrana i 20 x koncentrovani supstrat za hemiluminiscenciju (engl. *enhanced chemiluminescence*, ECL) su proizvodi firme Millipore Cooperation Biotechnology, SAD.

Za izolaciju RNK je korišćen TRIzol reagens, proizvod firme Invitrogen, SAD. Za prepisivanje totalne RNK u cDNK je upotrebljen First Strand cDNA Synthesis Kit (K1612), Fermentas, Lithuania. Hemikalije korišćene za lančanu polimeraznu reakciju (PCR), kao što su rekombinantna Taq Polimeraza, dNTP, 10 x PCR buffer, su takođe proizvodi firme Fermentas, Lithuania. Svi „prajmeri” korišćeni za RT-PCR su produkti firme Metabion, Nemačka (**Tabela 2**).

Za ispitivanje nivoa kortikosterona u serumu i tkivu korišćen je kit IDS OCTEIA Corticosterone kit, Immunodiagnosics Systems-IDS, Velika Britanija.

Tabela 1. Antitela korišćena u imunoblot analizi

antitelo	proizvođač	kataloški broj	karakteristike
<i>PARP</i>	Cell Signaling Technology, SAD	9542	primarno zečije poliklonsko
<i>GR</i>	Affinity Bioreagents Inc, SAD	PA1-511A	primarno zečije poliklonsko
<i>mHsp70</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-66049	primarno mišije monoklonsko
<i>NFκB (p65)</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-372	primarno zečije poliklonsko
<i>tAKT</i>	Cell Signaling Technology, SAD	9272	primarno zečije poliklonsko
<i>p-AKT</i>	Cell Signaling Technology, SAD	9271S	primarno zečije poliklonsko
<i>β-aktin</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-1615	primarno kozije poliklonsko
<i>p53</i>	Calbiochem, SAD	NS 27F3-4	primarno mišije monoklonsko
<i>α-tubulin</i>	Sigma Aldrich, SAD	T9026	primarno mišije monoklonsko
<i>c-jun</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-1694	primarno zečije poliklonsko
<i>prokaspaza 3</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7148	primarno zečije poliklonsko
<i>sečena kaspaza 3</i>	Cell Signaling Technology, SAD	9661S	primarno zečije poliklonsko
<i>Bcl-2</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-492	primarno zečije poliklonsko
<i>Bax</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7480	primarno mišije monoklonsko
<i>citohrom c</i>	Cell Signaling Technology, SAD	sc-13561	primarno zečije poliklonsko
<i>kozje anti-zečije</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2030	sekundarno
<i>magareće anti-kozije</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2033	sekundarno
<i>magareće anti-mišije</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2318	sekundarno

2. Metode

2.1. Postupak sa životinjama

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar, starosti 3 meseca (n=36–40 po eksperimentalnoj grupi). Težina životinja na početku eksperimenata je bila 355 ± 8 g. Sve životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Univerziteta u Beogradu, u standardnim laboratorijskim uslovima (konstantna temperatura od $22 \pm 2^\circ\text{C}$, vlažnost vazduha od 55 %, svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak, n=3–4 životinje po kavezu) i na *ad libidum* režimu ishrane.

Rad sa eksperimentalnim životinjama je izveden u saglasnosti sa principima koje propisuje publikacija *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80-23) i odobren je od strane Etičkog komiteta za rad sa životinjama u istraživanjima Biološkog fakulteta i Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu (rešenje o odobrenju zavedeno pod brojem 02/11).

2.2. Tretman deksametazonom

Eksperimentalne životinje su bile podeljene u dve grupe:

- 1) K grupa– kontrolne jedinice tretirane fiziološkim rastvorom (0.9 % NaCl rastvoren u 0.001 % etanolu);
- 2) DEX grupa– životinje tretirane deksametazonom (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$, rastvoren u 0.9 % NaCl sa 0.001 % etanolom).

Tretmani su aplicirani u vidu intraperitonealnih injekcija (ip), jednom dnevno u jutarnjim časovima, između 09:00–10:00 h sedam dana. Upotrebljena doza DEX-a je u skladu sa dozama korišćenim u istraživanjima u kojima je prijavljena apoptoza u ćelijama hipokampusa (Almeida i saradnici, 2000).

Podaci iz literature ukazuju da DEX značajno smanjuje telesnu masu životinja (Karssen i saradnici, 2005) i zato je u toku tretmana težina životinja praćena svaki drugi dan i doze DEX-a su prilagođavane masi pojedinačnih životinja.

2.3. Žrtvovanje životinja i priprema seruma i tkiva

Životinje za imunohistohemijske analize (n=2–3 po eksperimentalnoj grupi) su anestetizirane 5 % hloral-hidratom (400 mg/kg), 28 h nakon poslednjeg tretmana, perfundovane sa 0.9 % NaCl (~ 200 ml po životinji) i 4 % paraformaldehidom (PFA). Nakon brze i pažljive izolacije, mozgovi su fiksirani u 4 % PFA rastvoru, 24 h na 4°C i potom dehidratirani u gradijentu saharoze u 0.2 M fosfatnom puferu (10 %, 20 %, 30 %, rastvor saharoze, u svakom po 24 h na 4°C). Mозgovi su zamrznuti u izopentanu, osušeni na suvom ledu i čuvani na -70°C do upotrebe.

Ostale životinje su žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus, Holliston, SAD), 28 h nakon poslednjeg tretmana. Posle izolacije celih mozgova, izolovani su hipotalamus, hipofiza, hipokampus i prečeona kora (PFC)¹⁶, koji su potom zamrzavani u tečnom azotu.

U toku žrtvovanja radi proučavanja sistemskog odgovora na primenjeni glukokortikoid, izolovani su timusi i nadbubrežne žlezde svake pojedinačne životinje. Svaki timus i nadbubrežna žlezda su pažljivo očišćeni od okolnog tkiva i izmereni na digitalnoj vagi (Chyo Balance Corp, Japan).

Takođe, uzimana je krv pojedinačnih životinja u cilju merenja koncentracije kortikosterona (KORT) u serumu. Dobijanje seruma: puna krv pacova je sakupljena u polipropilenske epruvete, ostavljena da koaguliše na sobnoj temperaturi 30 min, nakon čega je centrifugirana na 3000 g, 15 min (Sorvall GLC-3); dobijeni serumi su čuvani na -20°C do ELISA esejja.

2.4. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu

Nivo KORT-a u serumu (n=8–10 jedinki po grupi) i ukupnim ćelijskim ekstraktima (n=8–10 jedinki po grupi) izolovanim iz dve moždane strukture hipokampus i PFC je meren esejem specifičnim za pacovski serum i/ili plazmu i tkivo (IDS OCTEIA Corticosterone kit, Immunodiagnosics Systems-IDS, Velika Britanija). Ukratko, ELISA esej je kompetitivni esej gde je poliklonsko antitelo za KORT vezano za unutrašnju površinu mikrotitar ploče. Standardi, kontrolni i nepoznati uzorci su u

¹⁶ Prečeona kora se prostire ~1mm od bregme ka vrhu celog mozga (~+5.0), te je i izolovana o odnosu na bregmu.

duplikatu nanošeni na ploču i inkubirani sa antitelom koje je konjugovano sa HRP-om. Ploča je zatim ispirana, dodavan je hromogeni supstrat TMB (tetrametilbenzidin) koji dovodi do razvijanja boje. Enzimska reakcija je prekidana dodavanjem STOP rastvora (0.5 M HCl), nakon čega je očitavana apsorbancija na 450 nm i 650 nm (korekciona optička gustina (engl. *optical density*, OD) na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor² Multilabel Counter, PerkinElmer, SAD). Intezitet boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji KORT-a u uzorku. Koncentracije hormona u uzorcima su određivane pomoću 4PL semialgoritamske krive (4PL curve fitting method (GraphPad Prism 5)) i izražene u ng/ml za serum i ng/mg proteina za tkiva. Osetljivost ELISA eseja je 0.55 ng/ml, intra- i interesej varijacije su bile ispod 6.6 % odnosno 8.6 %.

2.5. Analiza fragmentisanosti ćelijske DNK pomoću difenilamin metode

Smrznuta tkiva (n=8–10 po eksperimentalnoj grupi) hipotalamusa, hipofize, hipokampusu i PFC-a je homogenizovano u puferu koji sadrži 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Na₂EDTA i 0.5 % Triton X-100. Dobijeni homogenati su potom centrifugirani na 27000 g, 20 min da bi se razdvojio intaktni hromatin u talogu od fragmentisane DNK koja je u supernatantu. Dobijenim supernatantima je dodavana 5.5 N perhlorna kiselina (PCA), a talogu 0.5 N PCA, tako da je finalna koncentracija u svim uzorcima bila 0.5 N. Uzorci su potom 15 min zagrevani na 90°C i centrifugirani na 1500 g, 10 min, na 4°C da bi se uklonili proteini. Dobijenim supernatantima je dodavan agens koji se vezuje za deoksiribozu– difenilamin i uzorci su ostavljeni 16–20 h na sobnoj temperaturi (RT) da bi se razvila reakcija koja se detektuje pojavom plave boje. Apsorbancija uzoraka je merena na 600 nm, a nivo fragmentisane DNK u uzorcima je izražavan kao procenat ukupne DNK u supernatantu. Fragmentisana DNK u uzorcima izolovanim iz životinja tretiranih DEX-om je izražavana kao procenat u odnosu na fragmentaciju u kontrolnim uzorcima (Bagchi i saradnici, 1999).

2.6. Bojenje sa fluoro-jade B, Hoechst 33258 i krezil ljubičastom bojom

Za imunohistološku analizu, mozgovi životinja obe eksperimentalne grupe (n=2–3 po grupi) su sečeni na kriotomu (Leica, Nemačka) na preseke debljine 16 μm i 25 μm;

preseci su direktno lepljeni na želatinizovane mikroskopske pločice, osušeni preko noći i zamrzavani na -20°C do upotrebe.

Fluoro-jade B bojenje je korišćeno za detekciju neurona u procesu degeneracije, a *Hoechst 33258* boja je upotrebljena za analizu stanja hromatina. Pločice sa preseccima su prvo uranjane u 80 % alkoholni rastvor sa 1 % NaOH i inkubirane sa 0.06 % KMnO_4 rastvorom 10 min, zatim su prebacivane u 0.0001 % rastvor *fluoro-jade B* u 0.1 % sirćetnoj kiselini i nakon 10 min su ispirane u bidestolovanoj vodi (ddH_2O) 3 x po 1 min: uranjane u 0.01 % *Hoechst 33258* u toku 10 min, potom u ksilol radi potpune dehidracije i prekrivene glicerolom i pokrovnim staklom. Preseci su posmatrani na Axio Observer Mikroskopu Z1 (Zeiss, Jena, Nemačka) koristeći sistem filtera kojima se mogu uočiti neurodegenerativne promene pomoću fluoroscein izocianata. Čelije obojene ovom bojom jasno se mogu detektovati kao male svetlo zelene tačke koje se razlikuju u odnosu na pozadinu (Milanovic i saradnici, 2010).

Za *krezil ljubičasto* bojenje– pločice sa preseccima su potapane u *krezil ljubičastu* boju 10–15 min i kratko ispirane sa ddH_2O . Potom su pločice uranjane u gradijent etanola– prvo u 70 %, zatim u 95 % i 100 %, pa u ksilen, da bi na kraju bile pokrivena DePeX-om i pokrovnim staklom i ostavljene da se osuše preko noći. Preseci su posmatrani na Axio Observer Mikroskopu Z1 (Zeiss, Jena, Nemačka).

2.7. Izolovanje proteina za „Western blot“ analizu

Za određivanje nivoa proteinske ekspresije u hipofizi i hipotalamusu je korišćen ukupni ćelijski ekstrakt (engl. *whole cell extract*, WCE), dok su u hipokampusu i PFC-u korišćeni WCE, kao i specifične subćelijske frakcije: citosolna frakcija (citosol), jedarna frakcija (nukleosol) i mitohondrijalna frakcija (mitosol).

Za dobijanje WCE-a, pulovana tkiva hipotalamusa (4 po eksperimentalnoj grupi/izolaciji) i hipofize (6–7 po eksperimentalnoj grupi/izolaciji), kao i pojedinačna tkiva hipokampusu i PFC-a (4 po eksperimentalnoj grupi/izolaciji) su homogenizovana u staklo-teflon Potter-Elvehjem homogenizeru u 4 volumena hladnog (4°C) pufera: 15 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.25 M saharoza, 1 % SDS, 16 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.15 mM spermin i 0.15 mM spermidin, kome su neposredno pred rad dodavani proteazni inhibitori 0.1 mM PMSF, 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g/ml}$

aprotinin i 5 $\mu\text{g/ml}$ antipain. Homogenat je inkubiran na ledu 30 min, centrifugiran na 13000 g, 20 min, na 4°C (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemačka) i finalni supernatant je korišćen kao WCE (Spencer i saradnici, 2000).

Citosolne, jedarne i mitohondrijalne subćelijske frakcije su dobijene iz pojedinih hipokampusa i PFC-a (n=8–10 po grupi). Tkivo je homogenizovano u staklo-teflon Potter-Elvehjem homogenizeru u 2 volumena hladnog (4°C) pufera, koji je sadržao: 10 % glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM Na₂EGTA, 2 mM DTT, proteazne inhibitore (20 mM Na₂MoO₄, 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ antipain, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ tripsin inhibitor i 3 mM benzamidin), kao i fosfatazne inhibitore (20 mM β -glicerofosfat, 5 mM Na₄P₂O₇ x 10H₂O, 2 mM Na₃VO₄ i 25 mM NaF). Homogenat je centrifugiran na 2000 g, 10 min, na 4°C (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemačka), nakon čega je supernatant korišćen za dobijanje citosola i mitohondrijalne frakcije (S1), dok je talog korišćen za dobijanje jedarnog ekstrakta. Centrifugiranjem supernatanta (S1) na 20000 g, 30 min staložene su mitohondrije, a dobijeni supernatant (S2) je dalje centrifugiran na ultracentrifugi na 105000 g, 60 min u cilju izdvajanja citosola. Talog jedara je opran u 0.5 ml homogenizacionog pufera i ponovo centrifugiran na 2000 g, 10 min, na 4°C (Beckman centrifuga, Nemačka). Oprana jedra su potom resuspendovana u 0.5 ml homogenizacionog pufera koji je sadržao 0.5 M NaCl. Ovakva smeša je potom inkubirana 60 min 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 mitohondrijalnog ekstrakta, mitohondrije su oprane u 0.5 ml homogenizacionog pufera i ponovo centrifugirane na 20000 g, 30 min, na 4°C. Oprane mitohondrije su potom resuspendovane u puferu za lizu mitohondrija koji je sadržao 0.05 % Triton X-100. Nakon inkubiranja na ledu 90 min, mitohondrijalna suspenzija je centrifugirana na 20000 g, 60 min, na 4°C u cilju dobijanja mitohondrijalne frakcije (Adzic i saradnici, 2009).

Čistoće subćelijskih frakcija su proveravane metodom Western blot korišćenjem antitela na mHsp70, α -tubulin i c-jun. Pomenuta antitela su specifično detektovala proteine citosola, mitohondrija i jedara, te isključuju međusobnu kontaminaciju.

2.8. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana po metodi Lowry-a (1951) koja je modifikovana¹⁷ po Markwell-u (1978). Metoda se koristi kada je očekivana koncentracija proteina u uzorku u opsegu od 1 mg/ml do 10 mg/ml. Standard za određivanje koncentracije proteina je BSA u koncentracijama 0.2–10 mg/ml.

Korišćeni su sledeći reagensi:

Reagens A: 2 % Na_2CO_3 + 0.4 % NaOH + 0.16 % Na-K-tartarat + 1 % SDS;

Reagens B: 4 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$;

Reagens C: Reagens A: Reagens B (100:1), pravi se neposredno pre upotrebe;

Reagens D: Folin & Ciocalteus Phenol reagens se razblažuje u ddH₂O u odnosu 1:1.

Postupak: Za svaki uzorak (BSA STANDARD/UZORAK) su urađena triplikatna merenja. Slepa proba (blank) je sadržala 900 μl ddH₂O, bez proteina, dok je u ostale epruvete dodavano po 10 μl rastvora BSA/UZORKA i ddH₂O do finalne zapremine od 900 μl . U epruvete je potom dodavano po 100 μl 1 M NaOH, dobro promešano i smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi (RT). Nakon toga je dodavano 3 ml rastvora C, ponovo promešano i ostavljeno da stoji 20 min na RT. Po isteku tog vremena, dodavano je 0.3 ml reagensa D, promešano i smeša je inkubirana 45 min na RT, do razvijanja boje. OD je merena na talasnoj dužini od 750 nm na spektrofotometru S-30 Boeco, Nemačka.

Na osnovu OD_{750nm} očitanih vrednosti za BSA konstruisana je prava i sa nje je određivana koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane OD_{750nm} za uzorak.

¹⁷ Modifikacija se odnosi na dodavanje natrijum-dodecil-sulfata (SDS) u alkalni reagens i povećanje količine bakar-tartaratnog reagensa. Time se omogućava primena ove metode na uzorke koji sadrže saharozu i EDTA u relativno visokoj koncentraciji, što je uobičajeno pri izolovanju ćelija i subćelijskih frakcija (membranskih frakcija). Koncentracija proteina se ovom metodom može određivati bez predhodne solubilizacije i ekstrakcije lipida. Pored toga, SDS sprečava taloženje denaturisanih proteina unutar kivete za merenje, što omogućava merenje većeg broja proba u nizu.

2.9. Elektroforeza proteina i Western blot analiza

Ekspresija specifičnih molekula na nivou proteina je ispitivana imunoblot analizom. Analizirani su apoptotski proteini u WCE uzorcima izolovanim iz hipofize, hipotalamusa, hipokampusa i PFC-a, kao i u subćelijskim frakcijama izolovanim iz hipokampusa i PFC-a pacova Wistar soja podvrgnutih hroničnom tretmanu DEX-om, kao i kod odgovarajućih kontrola.

Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Koncentracije proteina u uzorcima su svedene na 2.5 mg/ml pomoću pufera za izolaciju. Neposredno pred upotrebu alikvoti su pomešani sa puferom za pripremu uzoraka proteina za SDS-PAGE (*2 x Sample Buffer*) i β -merkaptanolom u odnosu 1:9. Posle kuvanja na 100°C, 5 min, uzorci su ohlađeni i nanošeni na SDS-poliakrilamid gel.

Proteini su razdvajani po molekulskoj masi na denaturišućoj SDS-poliakrilamid gel elektroforezi, po metodi Laemmli-ja (Laemmli, 1970). Elektroforeza je rađena na sistemu Mini Protean II (Bio Rad). Proteini su prvo koncentrovani na 5 % gelu i potom razdvajani na 8 %, 10 % i 12 % poliakrilamidnim (PAA) denaturišućim gelovima u puferu za elektroforezu koji sadrži 0.25 M TRIS bazu, 0.192 M glicin i 0.1 % SDS. Na gel je nanošeno po 16 μ l pripremljenih uzoraka (~ 40 μ g). Elektroforeza je trajala oko 90 min pri konstantnom naponu od 100 V na RT. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za Western blot analizu. Kao molekulski marker je korišćen Cruz Marker™ Molecular Weight Standards (Santa Cruz Biotechnology, SAD), koji se sastoji od 9 proteina različitih molekulskih masa (250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa i 11 kDa).

„Western blot“ analiza

Nakon završene elektroforeze, gelovi su potapani u transfer pufer (20 % metanol, 0.025 M TRIS HCl, 0.192 M glicin, pH 8.3). PVDF membrana odgovarajuće veličine je prvo aktivirana 15 sek u 100 % metanolu, zatim je 2 min ispirana ddH₂O i potapana u transfer pufer. Nakon 5–10 min, formiran je sendvič koji se sastojao, redom, od jednog papira Whatman GB003 (Whatman Inc, Velika Britanija), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i jednog papira Whatman (svi natopljeni transfer puferom). Ovako napravljen sendvič je postavljan u aparat za mokri transfer (Trans-Blott Cell, Bio Rad,

SAD) i dodatno potapan u pufer za transfer. Prenos proteina sa gelova na membrane je vršen pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min, na 4°C.

Nakon transfera, membrane su bojene 1 % rastvorom Ponceau S u 5 % sirćetnoj kiselini, da bi se utvrdila efikasnost transfera. Boja Ponceau S je uklanjana sukcesivnim ispiranjem vodom. Potom su PVDF membrane inkubirane 1–2 h u puferu za blokiranje, 5 % nemasnom mleku u prahu (NFM) ili 5 % BSA rastvorenom u TBST puferu (50 mM TRIS HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20), na RT uz blago mućkanje. Nakon toga je tretirana membrana presecana na određenim molekulskim težinama i inkubirana preko noći sa primarnim antitelima na PARP, GR, mHsp70, NFκB, p-AKT, AKT, p53, α-tubulin, c-jun, prokaspazu 3, sečenu kaspazu 3, Bcl-2, Bax, citohrom c i β-aktin na 4°C. Razblaženja primarnih antitela su sledeća: PARP, GR, p-AKT i AKT (1:1000, TBST, 5 % BSA), sečena kaspaza 3 (1:250, TBST, 5 % BSA); mHsp70, NFκB, p53, α-tubulin, c-jun, prokaspaza 3, Bcl-2 i Bax (1:1000, TBST, 2.5 % NFM), citohrom c (1:250, TBST) i β-aktin (1:2500, TBST). Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 5 x po 5 min TBST puferom na RT uz blago mućkanje. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 1.5 h uz mućkanje sa sekundarnim anti-mišjim odnosno zečijim ili kozjim antitelom konjugovanih sa HRP (razblaženje 1:5000, TBST). Nakon inkubacije, membrane su opet ispirane 5 x po 5 min u TBST puferu i nanošen je supstrat za hemiluminiscenciju (ECL).

Membrane su inkubirane u ECL supstratu 5 min, nakon čega su osušene, pokrivene tankom folijom i postavljane u kasete za razvijanje filmova. Na pokrivene membrane su postavljani rendgen filmovi (Fuji, Japan), pri čemu je dužina ekspozicije varirala od 1–5 min. Intenzitet signala na filmu je odgovarao količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Kvantifikacija signala je vršena denzitometrijski u programu za analizu slike ImageJ.

2.10. Izolacija RNK i priprema uzoraka za RT-PCR

Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana po TRIzol¹⁸ metodi prema uputstvu proizvođača (Invitrogen, SAD). Naime, 50–100 mg smrznutog hipokampalnog i kortikalnog moždanog tkiva (n=18–20 po eksperimentalnoj grupi) je homogenizovano u staklo-teflon Potter-Elvehjem homogenizeru (8–10 puta) u 10 volumena TRIzol reagensa. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 5 min, da bi se odvojio nesolubilni materijal, uzorci su centrifugirani na 12000 g, 15 min, na 4°C (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemačka).

Smeša je potom zagrevana u termo-bloku na 37°C, 5 min da bi disosovali preostali nukleo-proteinski kompleksi. Dodavano je 0.2 ml hloroforma na 1 ml korišćenog TRIzol reagensa i tube su snažno mućkane 15 sek. Uzorci su ponovo zagrevani u termo-bloku na 37°C, 2–3 minuta i centrifugirani na 12000 g, 15 min, na 4°C.



Nakon centrifugiranja u tubama su razdvojene tri faze:

1. donja, crveno-roza faza (hloroform);
2. interfaza, beličasta faza (fenol);
3. gornja, prozirna vodena faza.

RNK se nalazi u vodenoj fazi, dok proteini, lipidi i DNK ostaju u donjoj i interfazi. Zapremina vodene faze predstavlja oko 60 % početne zapremine TRIzola korišćenog za homogenizaciju.

Precipitacija RNK

Gornja faza (sa rastvorenim RNK) je prebacivana u novu tubu i dodavan je 1 volumen izopropanola. Posle inkubacije preko noći na -20°C uzorci su centrifugirani na 12000 g, 10 min, na 4°C i supernatant je odbacivan. Talog koji sadrži RNK je resuspendovan u 0.5 ml hladnog 75 % etanola, dobro promućkan i centrifugiran na 7500 g, 5 min, na 4°C. Dobijeni talog je osušen na vazduhu 10–15 min i onda rastvoren u 100 µl sterilne vode sa 0.1 % DEPC-om.

¹⁸ TRIzol je monfazni reagens fenola i guanidin-izocianata. Ovaj reagens čuva integritet RNK i razgrađuje ćelije i većinu ćelijskih komponenti.

Određivanje koncentracije RNK

Koncentracija RNK je određivana spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (Thermo Scientific, SAD) merenjem apsorpcije na 260 nm. Za čistoću uzorka i eventualnu kontaminaciju proteinima određivan je odnos apsorpcija na 260 nm vs. 280 nm; odnos $OD_{260} : OD_{280} \sim 2$ ukazuje na odsustvo proteina u analiziranom uzorku.

RNK elektroforeza

Za određivanje integriteta RNK je urađena 2 % agarozna elektroforeza ukupne RNK, u trajanju od 30 min, pri konstantnoj voltaži od 100 V.

Reverzna transkripcija (RT)

Za sintezu cDNK iz RNK je korišćen First Strand cDNA Synthesis kit. Naime, 2.5 μ g ukupne RNK je inkubirano sa 40 U enzima M-MuLV reverzne transkriptaze, u prisustvu 1 μ l oligo(dT)₁₆ prajmera i 2 μ l 10 mM dNTP-a, 20 U RiboLock ribonukleaznog inhibitora i 5 x First Strand pufera u ukupnoj zapremini od 20 μ l. Sintetisane cDNK su čuvane na -20°C do upotrebe.

2.11. Semi-kvantitativan RT-PCR

Za određivanje nivoa genske ekspresije različitih molekula se koristila reverzno transkripciona lančana polimerazna reakcija (RT-PCR). cDNK je umnožavana koristeći prajmere karakteristične za glukokortikoidni receptor (*GR*, **Tabela 2**), jedarni faktor kapa B (*NF κ B*, **Tabela 2**), tumor supresor gen p53 (*p53*, **Tabela 2**), kao i pro-apoptotski molekul Bax (*Bax*, **Tabela 2**), anti-apoptotski molekul Bcl-2 (*Bcl-2*, **Tabela 2**) i tzv. „housekeeping” gen glicerinaldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (*GAPDH*, **Tabela 2**).

PCR reakcija

Za svaki par prajmera rađeni su kontrolni eksperimenti koji su uključivali variranje temperature i broja ciklusa u cilju definisanja linearnog opsega PCR amplifikacije. Tipičan uzorak za RT-PCR reakciju je sadržao 200 ng cDNK, 1 x PCR pufer, 10 mM dNTP, 2.1 mM MgCl₂, 0.25 μ M prajmere za *GR*, *NF κ B*, *p53*, *Bax* ili *Bcl-2*, 0.125 μ M prajmera za *GAPDH* i 2 U Taq polimeraze u ukupnoj zapremini od 25 μ l. cDNK su umnožavane u PCR aparatu (Eppendorf, Nemačka) u 28 ciklusa za *NF κ B* i *p53*, odnosno u 30 ciklusa za ostala tri gena koristeći sledeće uslove: inicijalna denaturacija

94°C/4 min, zatim denaturacija na 94°C/45 sek; vezivanje prajmera 62°C/1 min (*p53*), 58°C/1 min (*Bax*), 57°C/1 min (*GR*) i 55°C/1 min (*NFkB* i *Bcl-2*), ekstenzija 72°C/1 min i finalna ekstenzija 72°C/4 min.

Tabela 2. Sekvence prajmera korišćene u analizi ekspresije gena za *GR*, *NFkB*, *p53*, *Bcl-2*, *Bax* i *GAPDH*

Prajmer	Sekvence prajmera	Vezivanje prajmera (°C)	Veličina produkta (bp)
<i>GR</i>	5'-TGCAAACCTCAATAGGTCGACCAG-3'	57	522
	5'-TAAACTGGGCCAGTTTCTCTTGC-3'		
<i>NFkB</i> (<i>p65</i> subjedinica)	5'-CAGCGGGGCATGCGTTTCCG-3'	55	318
	5'-GATGCGCTGGCTAATGGCTTG-3'		
<i>p53</i>	5'-TTCCCTCAATAAGCTGTTCTGCC-3'	62	318
	5'-TGCYCTCTTTGCACTCCCTGG-3'		
<i>Bcl-2</i>	5'-GGAGATCGTGATGAAGTAC-3'	55	499
	5'-TCAGGTACTCAGTCATCCA-3'		
<i>Bax</i>	5'-GGCGAATTGGAGATGAACTG-3'	58	378
	5'-TTCTTCCAGATGGTGAGCGA-3'		
<i>GAPDH</i>	5'-TTCATTGACCTCAACTACATG-3'	55	226
	5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'		

Elektroforeza PCR produkata

PCR produkti su analizirani na 2 % agaroznom gelu, kome je dodat etidijum bromid, zajedno sa markerom DNK Molecular Weight Marker X, 0.07-12.2 kbp (Boehringer Mannheim, Nemačka); elektroforeza je trajala 30 min pri konstantnoj voltaži od 100 V. Gelovi su snimani pod UV svetlom na aparatu GelDoc 1000 (BioRad, SAD), kvantifikacija signala je vršena u programu za analizu slika ImageJ.

3. Statistička obrada rezultata

Rezultati analize DNK fragmentisanost su predstavljeni kao srednje vrednosti dobijene iz dva nezavisna eksperimenta \pm SEM (standardna greška merenja) na osnovu formule % fragmentisane DNK = $(OD_{600\text{ nmT}} / OD_{600\text{ nm}} (T + B)) \times 100$, *T*= fragmentisana

DNK, B= intaktna DNA izolovane iz hipofize, hipotalamusa, hipokampusa odnosno PFC-a kontrolnih pacova i pacova tretiranih DEX-om. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su određivane korišćenjem jednofaktorijalne analiza varijanse (engl. *one way analysis of variance* ANOVA), praćena odgovarajućim „multiple range” testom (*Tuckey post hock test*). Statistički značajne razlike su one čija je p vrednost bila manja od 0.05.

Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot-om i RT-PCR-om je izvršena denzitometrijskom analizom signala u programu za analizu slike ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, svaki put sa novom grupom kontrolnih jedinki i životinja tretiranih DEX-om. Izmerene vrednosti OD signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražene u arbitrarnim jedinicama (count). Za Western blot sve vrednosti su izražene u odnosu na β -aktin sa istog blota, dok su u RT-PCR analizi sve vrednosti izražene u odnosu na *GAPDH* iz istih uzoraka; svi rezultati su potom predstavljeni kao procenat od odgovarajuće kontrole. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SEM. Obrada rezultata je urađena u softverskom programu Origin, verzija 7.0 (Jandel Corporation, SAD). Za procenu statističke značajnosti je korišćena jednofaktorijalna ANOVA i post hoc Tukey test. Za sve testove pretpostavljena statistička značajnost je $p < 0.05$.

Kvantifikacija rezultata dobijenih u ELISA eseju za KORT je vršena na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor² Multilabel Counter, PerkinElmer, SAD), pri čemu su istovremeno očitavane vrednosti standarda i na osnovu njih se izračunavala standardna kriva. Koncentracija nepoznatih uzoraka je dobijena sa standardne krive, pri čemu su vrednosti KORT-a izražene u ng/ml za serum odnosno ng/mg proteina za tkivo. Svi uzorci su urađeni u duplikatu. Statističke razlike između eksperimentalnih grupa su određivane korišćenjem Studentovog *t*-testa pri čemu je $p < 0.05$ smatrano statistički značajnom razlikom.

Prilikom određivanja telesne mase, mase timusa i nadbubrežnih žlezdi, statističke razlike između eksperimentalnih grupa su određivane korišćenjem Studentovog *t*-testa; $p < 0.05$ je smatrano statistički značajnom razlikom.

REZULTATI

1. Efekat deksametazona na biometrijske parametre (telesnu masu, masu timusa i nadbubrežnih žlezdi) i nivo kortikosterona u serumu i moždanom tkivu

Ispitivani biometrijski parametri (telesna masa, masa timusa i nadbubrežnih žlezdi) i nivo kortikosterona u serumu su korišćeni kao markeri aktivnosti ispitivanog sintetskog glukokortikoida na periferiji.

Kod kontrolnih životinja je uočeno normalno povećanje telesne mase, dok su životinje tretirane DEX-om neprekidno tokom tretmana gubile na težini. Promene težine tela detektovane kod obe eksperimentalne grupe su dovele do pojave statistički značajne razlike između grupa na kraju tretmana ($p < 0.001$, **Tabela 3**).

Dnevne injekcije DEX-a (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne mase) aplicirane tokom 8 uzastopnih dana su uzrokovale statistički značajno smanjenje mase timusa i nadbubrežnih žlezdi ($p < 0.001$, **Tabela 3**), što je uočeno i u studijama drugih autora (Calogero i saradnici, 1990, Karssen i saradnici, 2005).

Tabela 3. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na biometrijske parametre (telesna masa, masa timusa i nadbubrežnih žlezdi). Ispitivani biometrijski parametri su praćeni kod kontrolnih jedinki i životinja tretiranih DEX-om 28 h nakon hroničnog tretmana. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM; statistički značajne razlike su određene Studentovim t- testom (***) $p < 0.001$ kontrolne vs. DEX tretirane životinje).

Eksperimentalna grupa	Kontrolne životinje	DEX tretirane životinje
Telesna masa (g)	388 \pm 12	334 \pm 9 ***
Masa timusa (mg)	314.9 \pm 18.4	156.4 \pm 6.3 ***
Masa nadbubrežnih žlezdi (mg)	22.1 \pm 1.1	14.3 \pm 0.8 ***

Koncentracija kortikosterona u serumu kontrolne grupe životinja je iznosila 196.5 \pm 44.7 (**Tabela 4**) i bila je u skladu sa nivoom kortikosterona izmerenim za Wistar soj (Merino i saradnici, 2000, Wren i saradnici, 2002). Kod životinja izlaganih hroničnom tretmanu DEX-om je izmereno značajno smanjenje nivoa kortikosterona u serumu ($p < 0.05$, **Tabela 4**), što je detektovano i u studijama drugih autora (Karssen i saradnici, 2005).

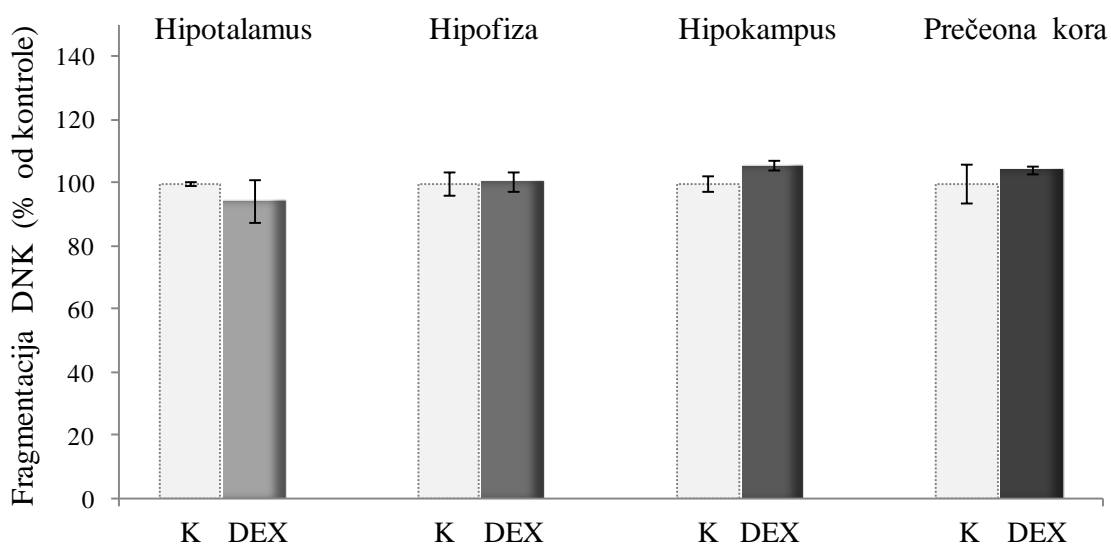
Koncentracija kortikosterona u moždanim strukturama– hipokampus i prečeaona kora (PFC) je bila statistički značajno smanjena kod životinja tretiranih DEX-om u odnosu na kontrolne (**Tabela 4**). Uočeno smanjenje KORT-a u hipokampusu i PFC-u ukazuje da hroničan tretman malom dozom DEX-a može dovesti do nastanka hipokortikoidnog stanja u mozgu (Karssen i saradnici, 2005).

Tabela 4. *Efekat hroničnog tretmana DEX-om na nivo kortikosterona (KORT) u serumu i moždanim strukturama hipokampus (HIPO) i prečeaona kora (PFC). Ispitivani nivoi KORT-a u serumu i moždanom tkivu su praćeni kod kontrolnih jedinki i životinja tretiranih DEX-om 28 h nakon hroničnog tretmana. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM; statistički značajne razlike su određene Studentovim t- testom (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ kontrolne vs. DEX tretirane životinje).*

Eksperimentalna grupa	Kontrolne životinje	DEX tretirane životinje
KORT u serumu (ng/ml)	196.5 \pm 44.7	83.3 \pm 37.4 *
KORT u HIPO-u (ng/mg)	6.8 \pm 0.7	2.8 \pm 0.9 ***
KORTu PFC-u (ng/mg)	3.5 \pm 0.4	1.7 \pm 0.2 **

2. Fragmentacija jedarne DNK u hipotalamusu, hipofizi, hipokampusu i prečeonoj kori životinja izloženih hroničnom tretmanu dekasametazonom

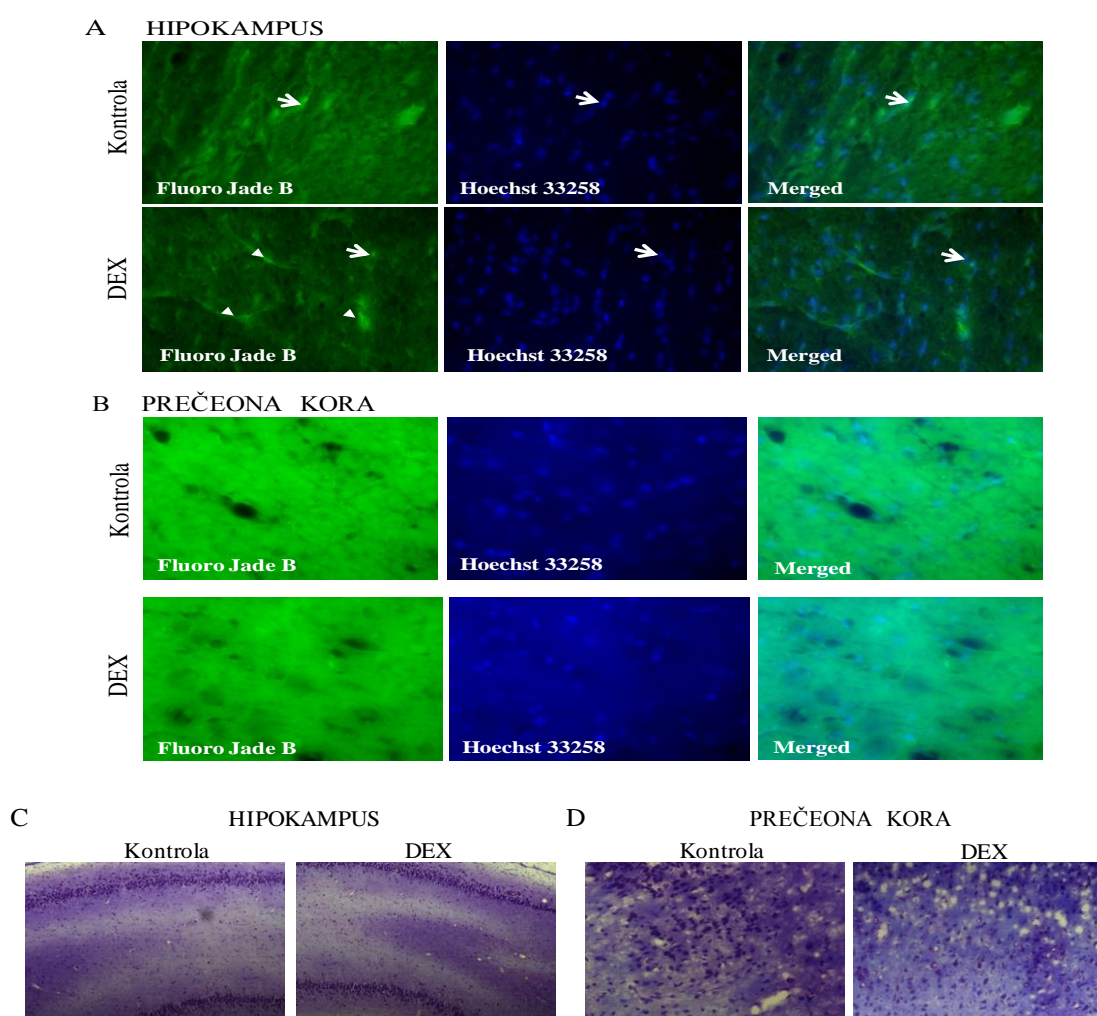
U prvom setu eksperimenata, u moždanim strukturama– hipotalamus, hipofiza, hipokampus i prečeona kora, određivan je nivo fragmentacije DNK i izražavan kao procenat od ukupne nefragmentisane genomske DNK (Filipkowski i saradnici, 1994). Kao što se može videti na *Slici 18*, u odgovoru na hroničan tretman DEX-om, nivo fragmentacije DNK u sve četiri ispitivane moždane strukture je bio na nivou kontrolne grupe životinja.



Slika 18. Merenje nivoa fragmentacije DNK difenilaminskim kolorimetrijskim esejom. Rezultati predstavljaju procenat fragmentacije u odnosu na kontrolnu grupu životinja i računati su po sledećoj formuli $\% \text{DNK fragmentata} = (OD_{600nm}T / OD_{600nm}(T+B)) \times 100$, T= fragmentisana DNK, B= nefragmentisana DNK izolovana iz moždanog tkiva životinja izloženih hroničnom tretmanu DEX-om. Rezultati su izražavani kao srednja vrednost merenja \pm SEM; statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey testom.

3. Efekat hroničnog tretmana deksametazonom na broj mrtvih ćelija i morfološke promene u hipokampusu i prečeonoj kori

U našem model sistemu, 28 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om u hipokampusu i prečeonoj kori pomoću *fluoro-jade B* bojenja nisu detektovane značajne promene u broju specifično obojenih mrtvih ćelija (*Slika 19A, B*), dok je *krezil ljubičasto* bojenje ukazalo da u ispitivanim regionima nije došlo do značajnih morfoloških promena (*Slika 19C, D*).



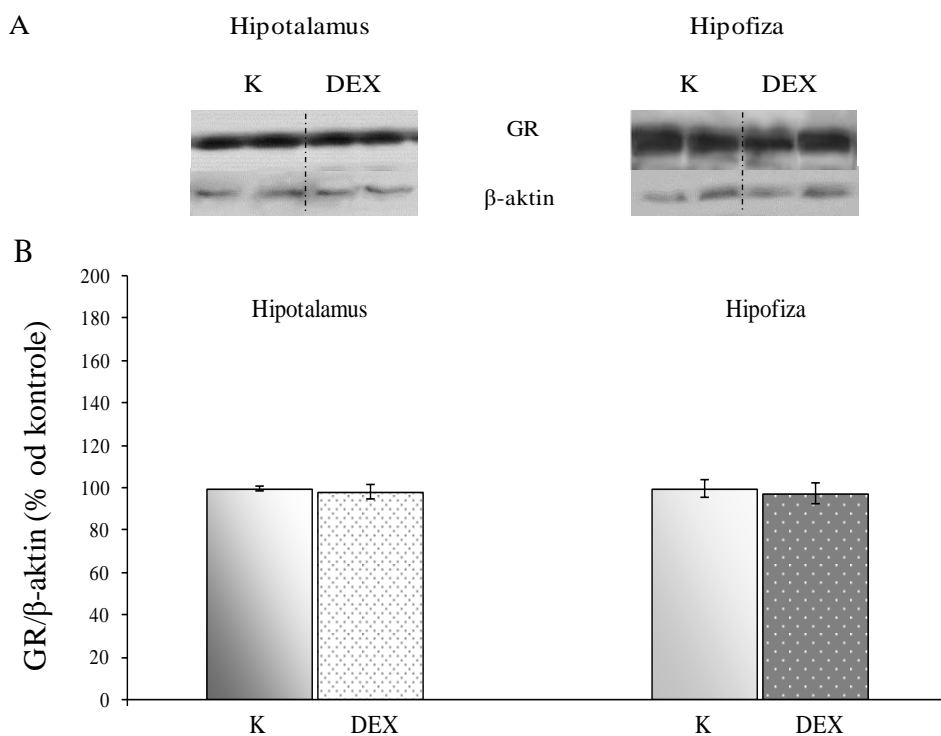
Slika 19. Efekti hroničnog tretmana DEX-om na broj specifično obojenih mrtvih ćelija (A, B) i morfološke odlike ćelija u hipokampusu i prečeonoj kori (C, D). Bojenje sa fluoro-jade B i Hoechst 33258 bojom mozгова kontrolnih jedinki i pacova tretiranih DEX-om. Degenerišući neuroni su obeleženi strelicama, a krvni sudovi su obeleženi trouglovima (A, B). Bojenje sa krezil ljubičastom bojom mozгова kontrolnih i pacova tretiranih DEX-om (C, D). U svakoj eksperimentalnoj grupi korišćene su 2–3 životinje.

4. Efekat hroničnog tretmana deksametazonom na regulatore apoptoze

Nakon analize fragmentisanosti jedarne DNK, *fluoro-jade B* i *krezil ljubičastog* bojenja, ispitivan je efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju glukokortikoidnog receptora (GR) i apoptotskih molekula u ukupnom ćelijskom ekstraktu (WCE) hipotalamusa, hipofize, hipokamusa i PFC-a odraslih pacova, kao i efekat na distribuciju pojedinih apoptotskih molekula u ćelijskim frakcijama hipokamusa i PFC-a.

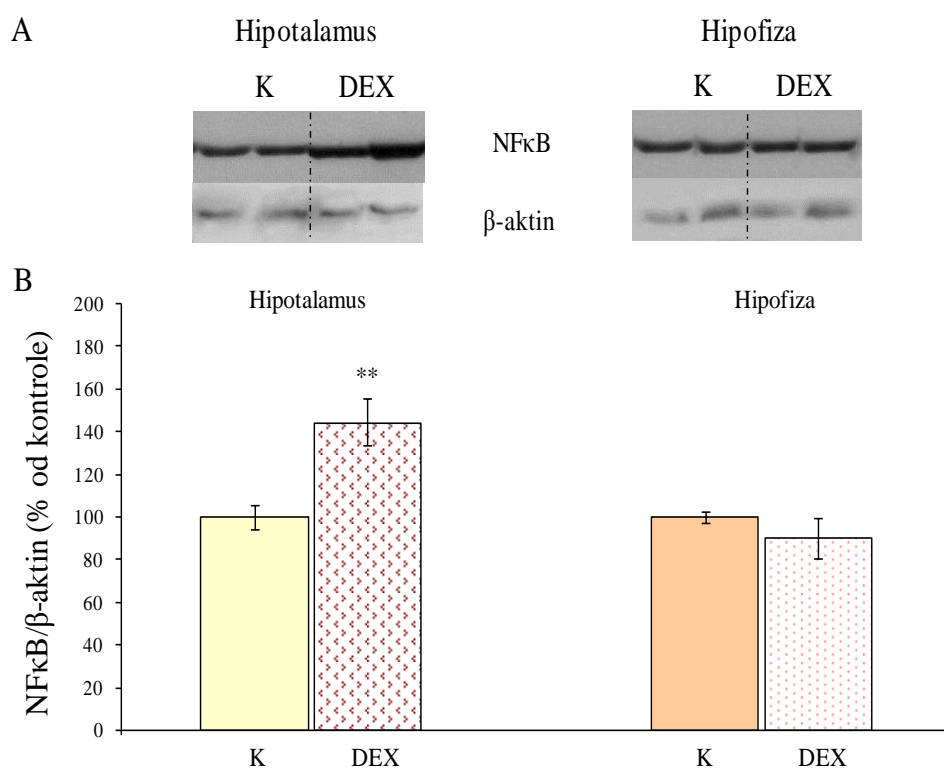
4.1. Odgovor hipotalamusa i hipofize na hroničan tretman deksametazonom

U ćelijama, glukokortikoidi svoje efekte mogu ostvariti posredstvom specifičnog receptornog proteina (GR), čijom se aktivacijom, dimerizacijom, translokacijom u jedro i vezivanjem za DNK sekvence, pokreće aktivacija i/ili inhibicija ekspresije ciljnih gena. U zadatim eksperimenatalnim uslovima, proteinska ekspresija GR proteina je analizirana u WCE hipotalamusa i hipofize Western blot metodom. Analiza receptora u obe ispitivane komponente HHA ose nije pokazala značajne razlike između kontrolnih jedinki (K) i životinja tretiranih DEX-om (DEX) (*Slika 20*).



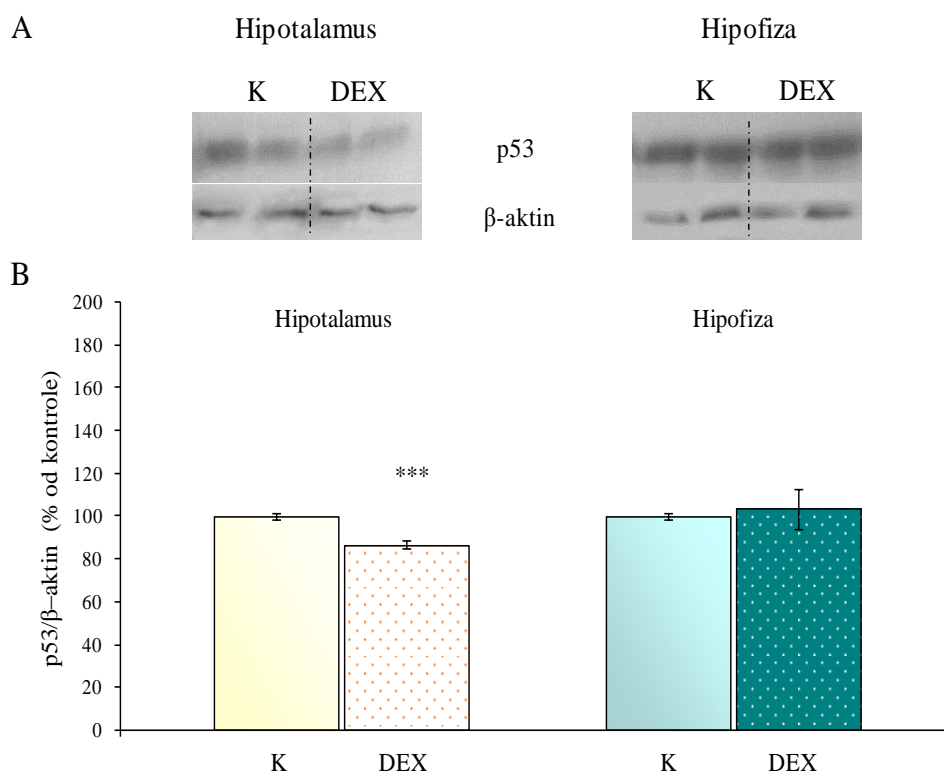
Slika 20. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju GR proteina u hipotalamusu i hipofizi pacova. Reprezentativni imunoblotovi za GR u hipotalamusu i hipofizi (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za GR iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey u odnosu na kontrolnu grupu.

U prisustvu citokina, faktora rasta, mitogena, jonizujućeg zračenja ili nekog drugog stimulusa, transkripcioni faktor NFκB (p50 i p65) se aktivira i brzo transportuje iz citosola u jedro gde reguliše ekspresiju mnogih molekula poput citokina, adhezionih molekula, imunoreceptora i transkripcionih faktora (Webster i Perkins, 1999). U poređenju sa kontrolnom grupom, sadržaj NFκB proteina je statistički značajno povećan u WCE hipotalamusa ($p < 0.01$, **Slika 21**), dok u hipofizi ekspresija p65 subjedinice NFκB nije bila promenjena nakon tretmana DEX-om (**Slika 21**).



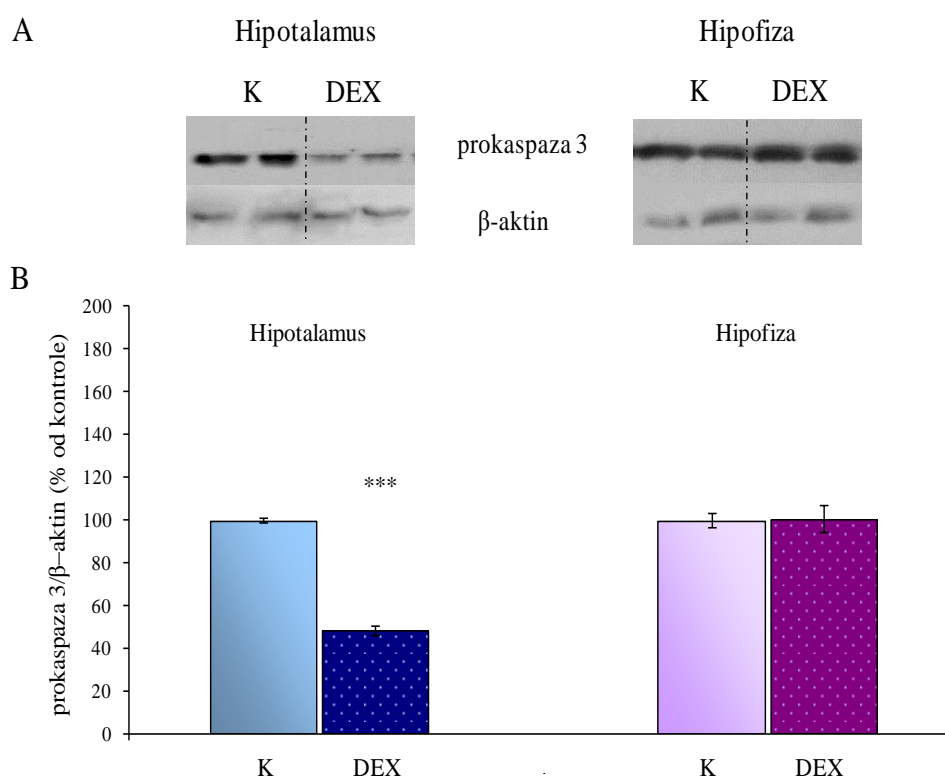
Slika 21. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju NFκB proteina u hipotalamusu i hipofizi pacova. Reprerentativni imunoblotovi za NFκB u hipotalamusu i hipofizi (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za NFκB iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$).

p53 tumor supresor protein ima važnu ulogu u ćelijskom odgovoru usled oštećenja DNK ili drugih genomskih aberacija, jer aktivacija p53 proteina dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa ili apoptoze (Zlender, 2003). p53 može pokrenuti apoptozu narušavajući odnos pro- i anti-apoptotskih proteina Bcl-2 superfamilije ili podstičući aktivnost gena koji povećavaju produkciju reaktivnih kiseonikovih vrsta, koji su snažni aktivatori oštećenja mitohondrija i apoptoze (Zlender, 2003). U ovoj studiji, nakon hroničnog tretmana DEX-om, ukupna koncentracija produkta tumor supresor gena p53 je bila statistički smanjena u hipotalamusu ($p < 0.001$, **Slika 22**) i nepromenjena u hipofizi (**Slika 22**).



Slika 22. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju p53 proteina u hipotalamusu i hipofizi pacova. Reprezentativni imunoblotovi za p53 u hipotalamusu i hipofizi (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za p53 iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

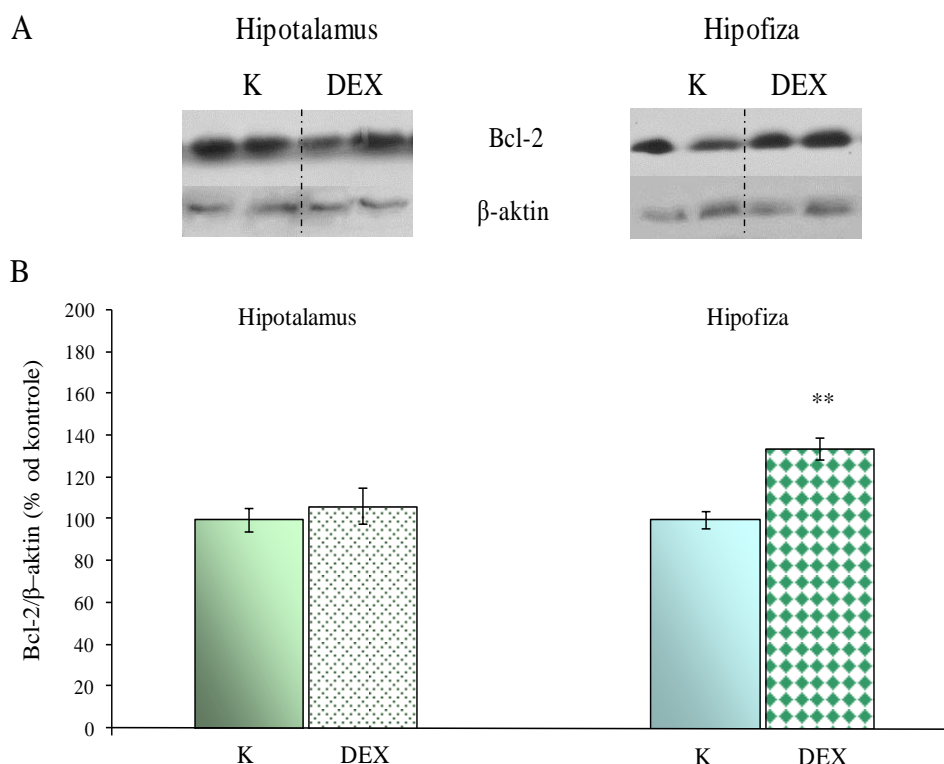
Prokaspaza 3 je protein koji se konstitutivno eksprimira u mozgu. Pod dejstvom različitih stimulusa ona se aktivira i nastaje kaspaza 3 koja dovodi do degradacije više od 40 različitih proteina, između ostalih i jedarnog enzima PARP (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*). Dobijeni rezultati, analizom proteinske ekspresije prokaspaze 3, pokazuju statistički značajno smanjenje koncentracije prokaspaze 3 u WCE hipotalamusa ($p < 0.001$, **Slika 23**), dok se u hipofizi ekspresija ispitivanog proteina nije menjala (**Slika 23**). U istim eksperimentalnim uslovima, nisu detektovane imunoblot trake za sečenu kaspazu 3 i citohrom c, što je u skladu sa rezultatima za DNK fragmentaciju, *fluoro jade B* bojenje i odsustvo apoptoze.



Slika 23. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju proteina prokaspaza 3 u hipotalamusu i hipofizi pacova. Reprezentativni imunoblotovi za prokaspazu 3 u hipotalamusu i hipofizi (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za prokaspazu 3 iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

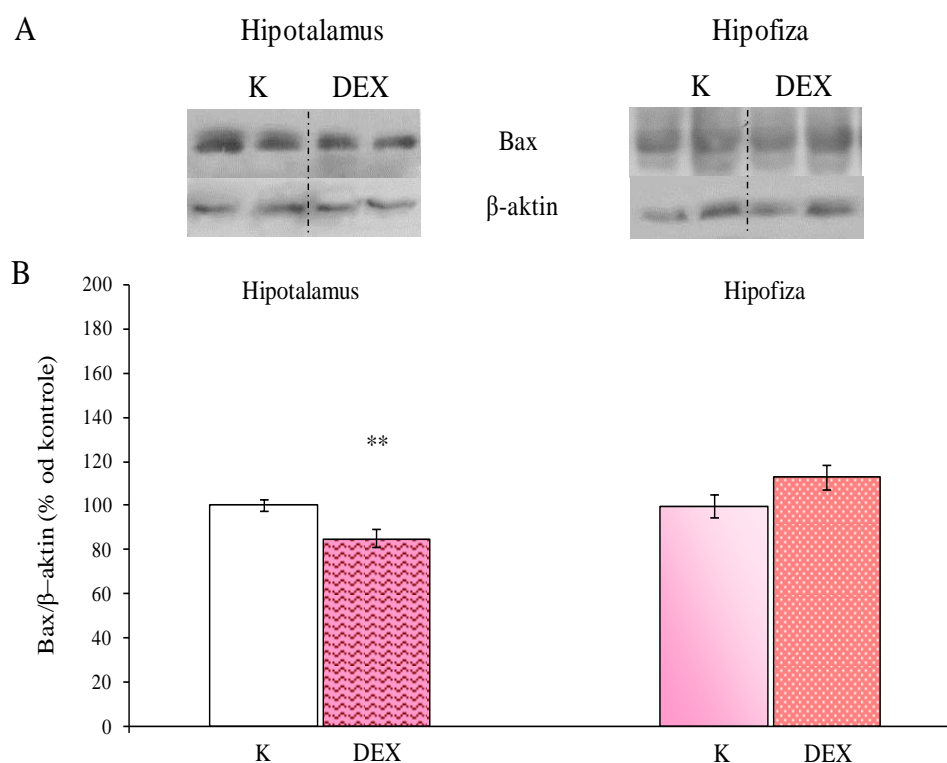
U cilju analize efekta hroničnog tretmana DEX-om na inicijaciju apoptoze mitohondrijalnim putem, praćena je koncentracija pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije: Bcl-2 i Bax proteina.

Analiza ekspresije Bcl-2 proteina nije pokazala statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u hipotalamusu (*Slika 25*), dok je ekspresija Bcl-2 proteina bila značajno povećana u hipofizi (133.95 ± 5.22 , $p < 0.01$, *Slika 25*).



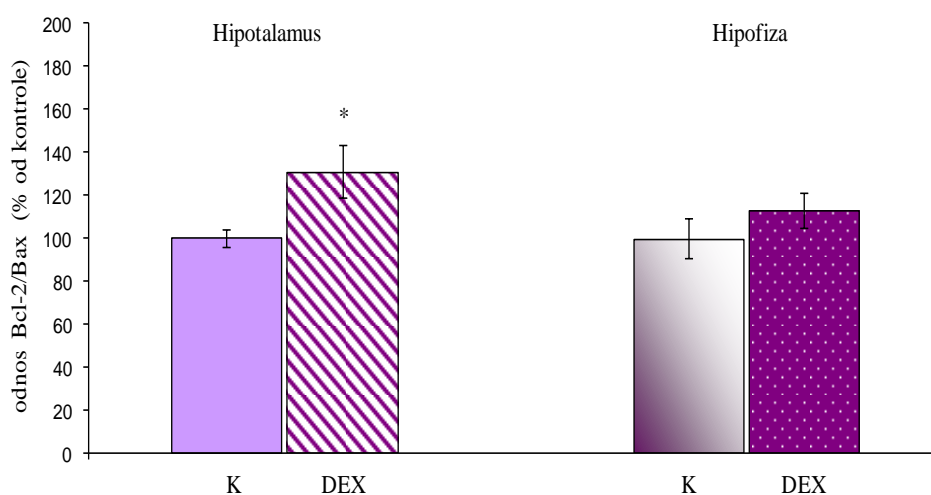
Slika 25. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju Bcl-2 proteina u hipotalamusu i hipofizi pacova. Reprezentativni imunoblotovi za Bcl-2 u hipotalamusu i hipofizi (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za Bcl-2 iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey: ** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$).

Kao što je prikazano na *Slici 26*, u hipotalamusu je koncentracija Bax proteina značajno smanjena kod životinja tretiranih DEX-om u odnosu na kontrolnu grupu (85.19 ± 3.97 , $p < 0.01$), dok je u hipofizi bila nepromenjena (112.98 ± 5.44).



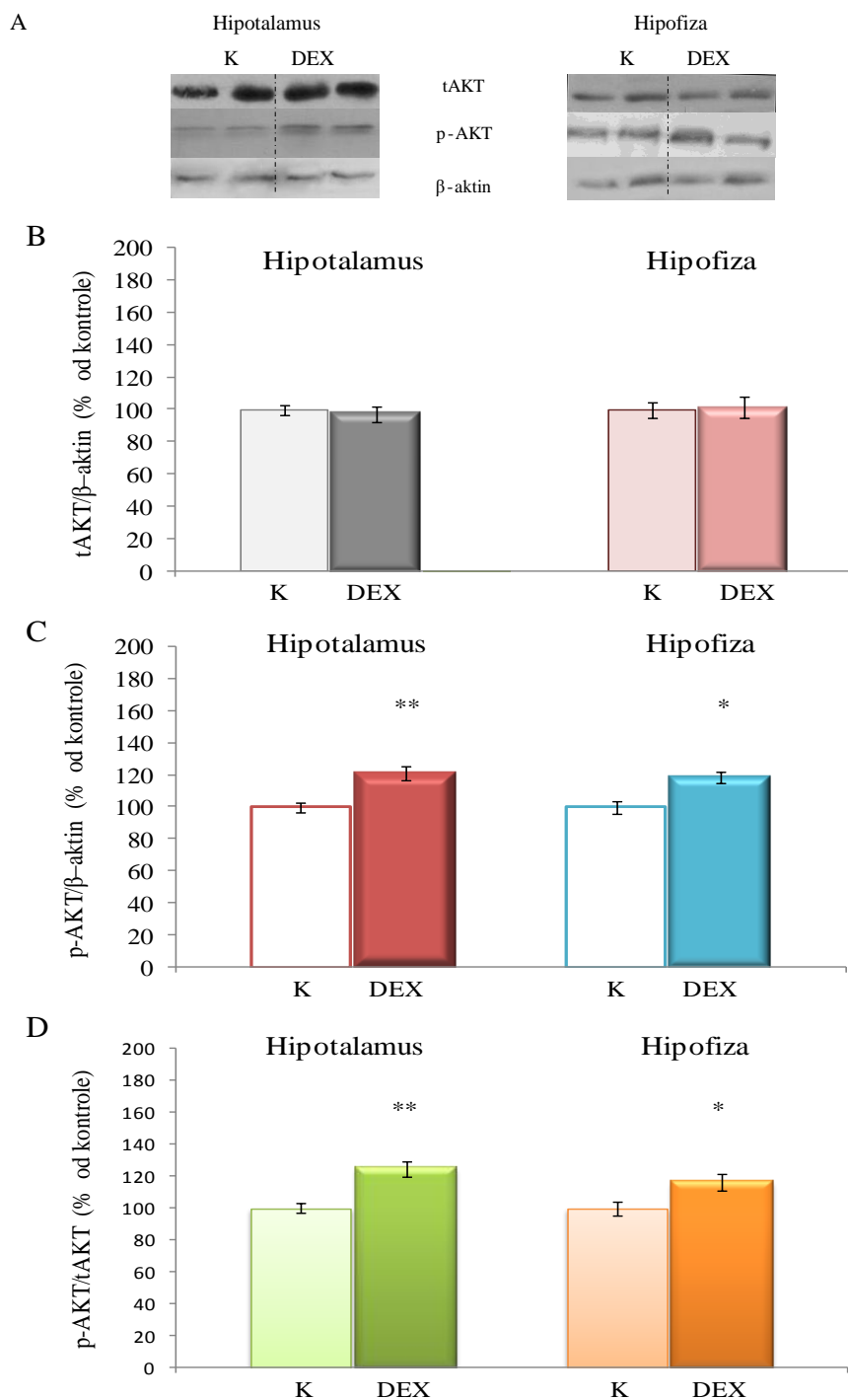
Slika 26. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju Bax proteina u hipotalamusu i hipofizi pacova. Reprezentativni imunoblotovi za Bax u hipotalamusu i hipofizi (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za Bax iz tri nezavisna eksperimenata predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$).

Ravnoteža između pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije je od ključne važnosti za sudbinu ćelije. Direktno upoređivanje nivoa Bax i Bcl-2 proteina u WCE izolovanim iz hipotalamusa ukazuje da hroničan tretman DEX-om povećava odnos Bcl-2/Bax proteina i pomera ovu fino regulisanu ravnotežu ka anti-apoptotskom molekulu Bcl-2 ($p < 0.05$), dok je u WCE hipofize ovaj odnos bio povećan ali to povećanje nije statistički značajno (*Slika 27*).



Slika 27. Relativan odnos Bcl-2/Bax proteina u hipotalamusu i hipofizi kod kontrolnih jedinki i životinja tretiranih DEX-om. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta za ispitivane proteine; statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$).

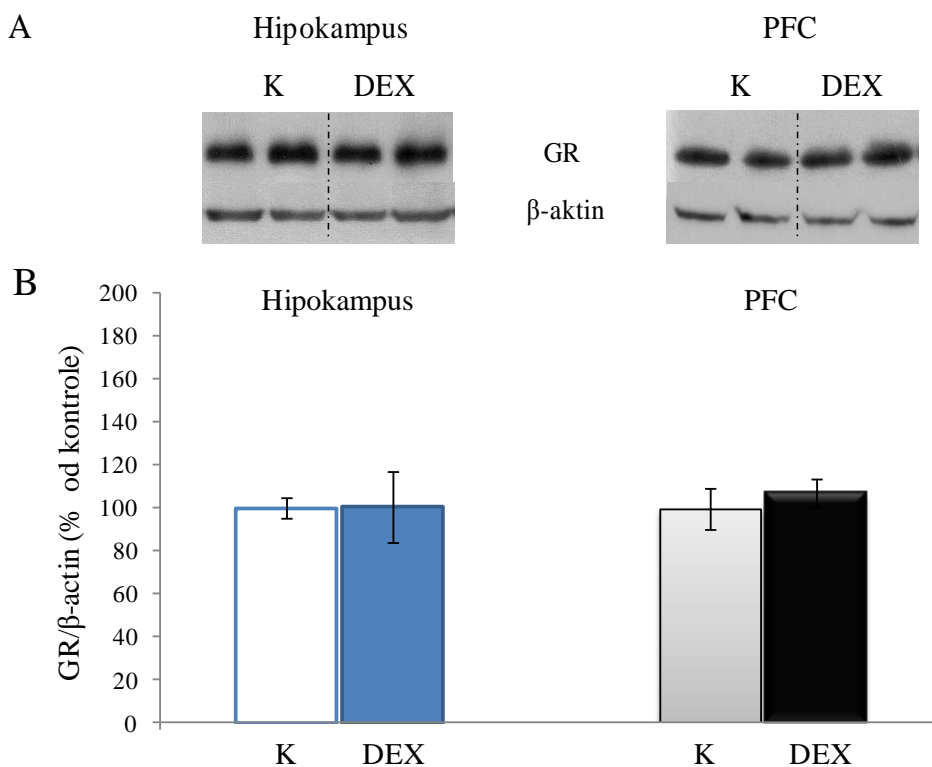
U cilju identifikovanja proteina koji regulišu procese apoptoze odnosno preživljavanja, ispitivan je efekat tretmana DEX-om na ekspresiju i aktivaciju ključnog molekula u ćelijskom preživljavanju, AKT kinaze. U zadatim eksperimentalnim uslovima, ukupna koncentracija proteina AKT (tAKT) se nije menjala u WCE izolovanim iz hipotalamusa i hipofize (*Slika 28A, B*), dok je koncentracija fosforilisanih izoformi proteina AKT (p-AKT) bila značajno povećana nakon delovanja DEX-a ($p < 0.01$ u hipotalamusu i $p < 0.05$ u hipofizi, *Slika 28A, C*). Relativni odnos p-AKT/tAKT, koji ilustruje aktivnost AKT kinaze, je pokazao značajno povećanje aktivnosti AKT kinaze u odgovoru na DEX u obe ispitivane strukture ($p < 0.01$ u hipotalamusu i $p < 0.05$ u hipofizi) (*Slika 28D*).



Slika 28. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju AKT proteina u hipotalamusu i hipofizi pacova. Reprerativni imunoblotovi za tAKT i p-AKT u hipotalamusu i hipofizi (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije tAKT iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Kvantifikacija proteinske ekspresije p-AKT iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (C). Relativni odnos ekspresije proteina p-AKT/tAKT kao pokazatelj aktivnosti AKT proteina iz tri nezavisna eksperimenta predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole (D). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu.

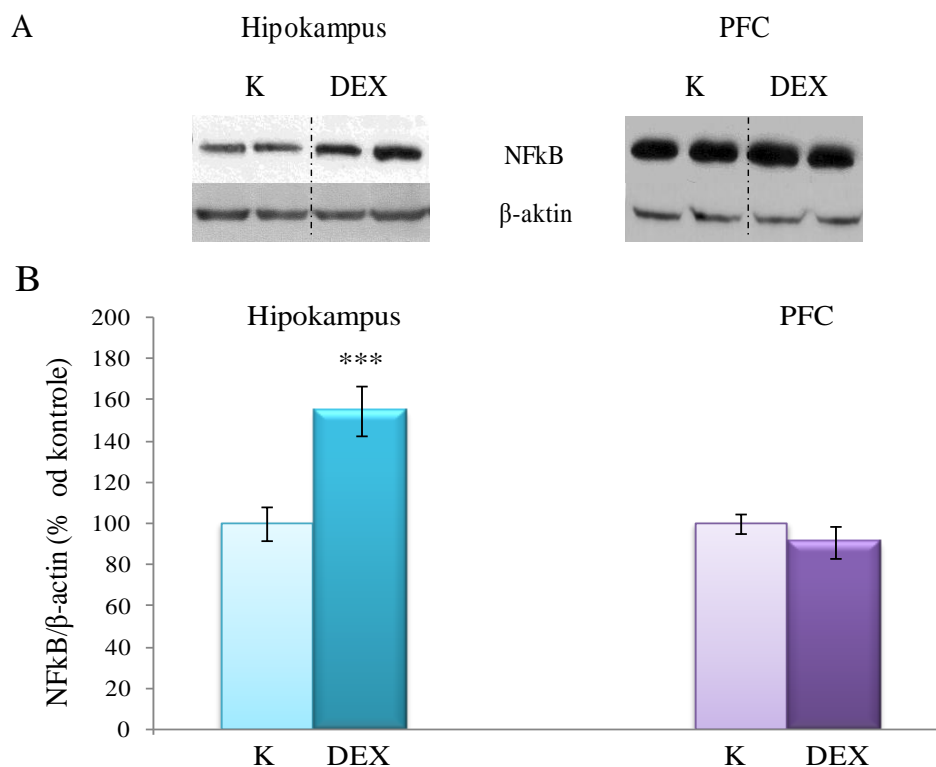
4.2. Odgovor hipokampusa i prečeeone kore na hroničan tretman deksametazonom

U WCE izolovanim iz hipokampusa i PFC-a ekspresija GR proteina je bila nepromenjena 28 h nakon hroničnog tretmana DEX-om (*Slika 29*).



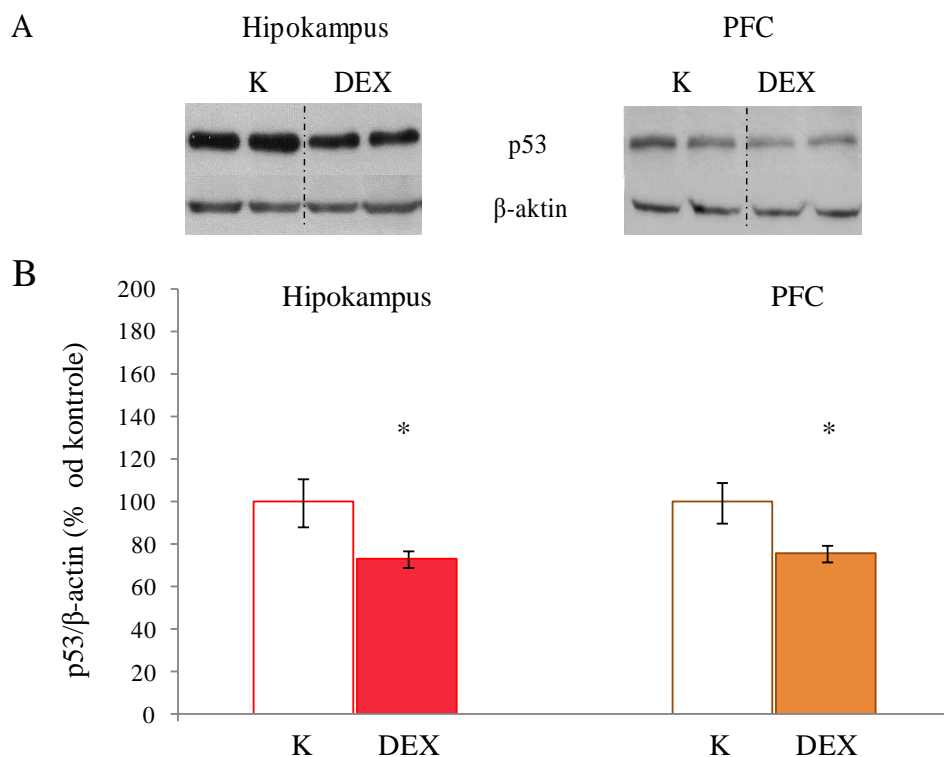
Slika 29. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju GR proteina u hipokampusu i PFC-u. Reprerentativni imunoblotovi za GR u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za GR iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey u odnosu na kontrolnu grupu.

U poređenju sa kontrolnom grupom, sadržaj NFκB proteina (identifikovan preko p65 subjedinice) je statistički značajno povećan u hipokampusu ($p < 0.001$, *Slika 30*), dok je u PFC-u ekspresija p65 subjedinice NFκB bila nepromenjena (*Slika 30*).



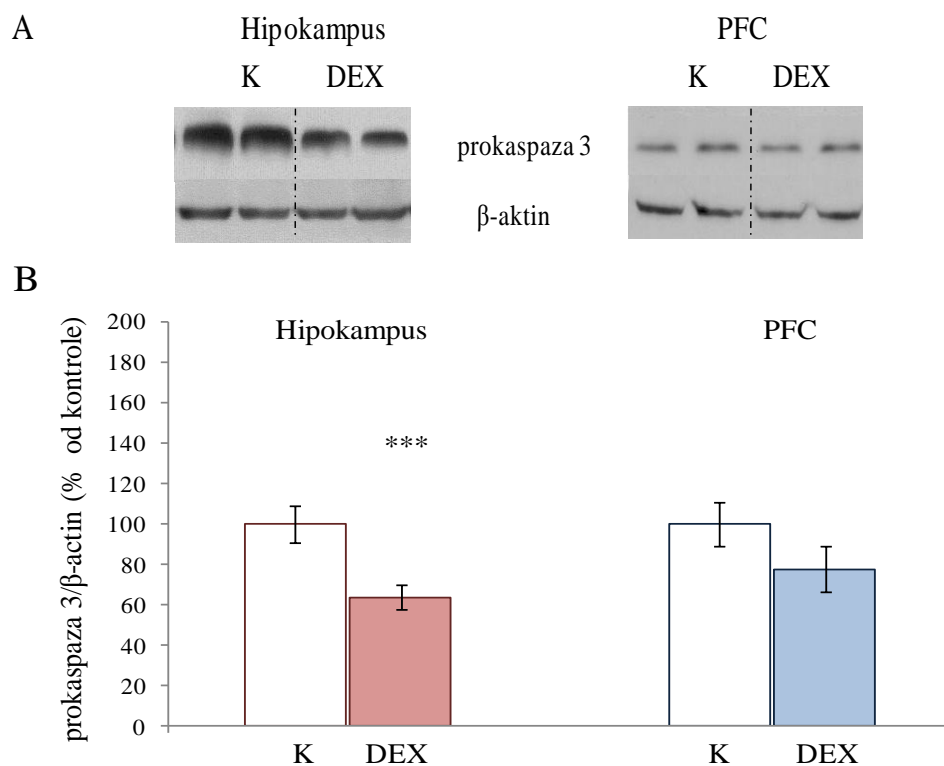
Slika 30. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju NFκB proteina u hipokampusu i PFC-u. Reprezentativni imunoblotovi za NFκB (p65) u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za NFκB iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

Nakon hroničnog tretmana DEX-om ukupna koncentracija produkta tumor supresor gena p53 je bila statistički smanjena u obe moždane strukture (73.28 ± 3.58 , $p < 0.05$ u hipokampusu i 75.83 ± 4.32 , $p < 0.05$ u PFC-u, **Slika 31**)



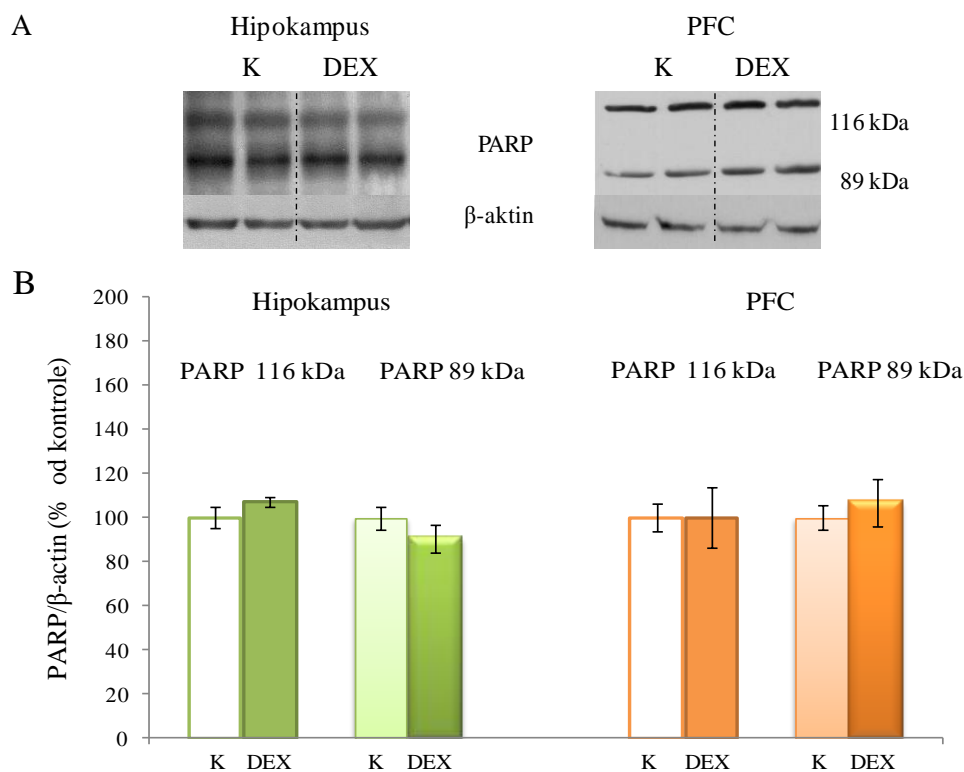
Slika 31. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju p53 proteina u hipokampusu i PFC-u. Reprerzentativni imunoblotovi za p53 u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za p53 iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$).

Koncentracija prokaspaze 3 je značajno smanjena u WCE izolovanim iz hipokampusu ($p < 0.001$, *Slika 32*), dok je u PFC-u bila smanjena ali ne statistički značajno (*Slika 32*). U istim eksperimentalnim uslovima, nisu detektovane imunoblot trake za sečenu kaspazu 3 i citohrom c, što je u skladu sa rezultatom za DNK fragmentaciju i *fluoro jade B* bojanje i odsustvom apoptoze.



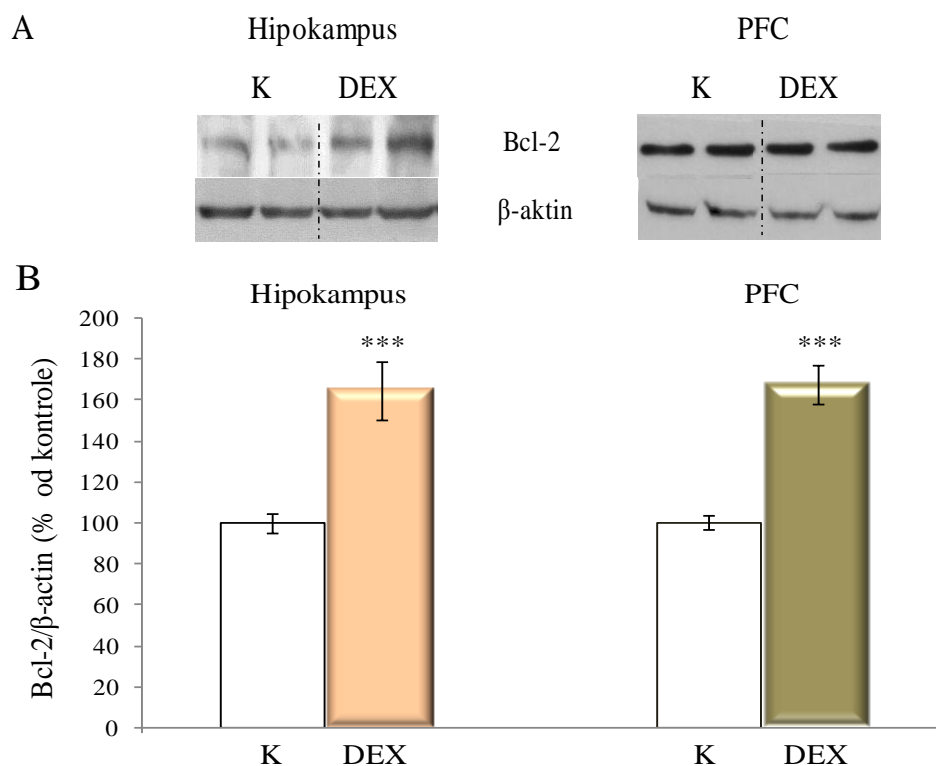
Slika 32. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju proteina prokaspaze 3 u hipokampusu i PFC-u. Reprezentativni imunoblotovi za prokaspazu 3 u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije prokaspaze 3 iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

U zadatim eksperimentalnim uslovima, u hipokampusu i PFC-u ekspresija celokupnog PARP-a (116 kDa), kao i sečenog velikog fragmenta (89 kDa) nisu bile statistički promenjene kod životinja tretiranih DEX-om u odnosu na kontrolne (*Slika 33*).



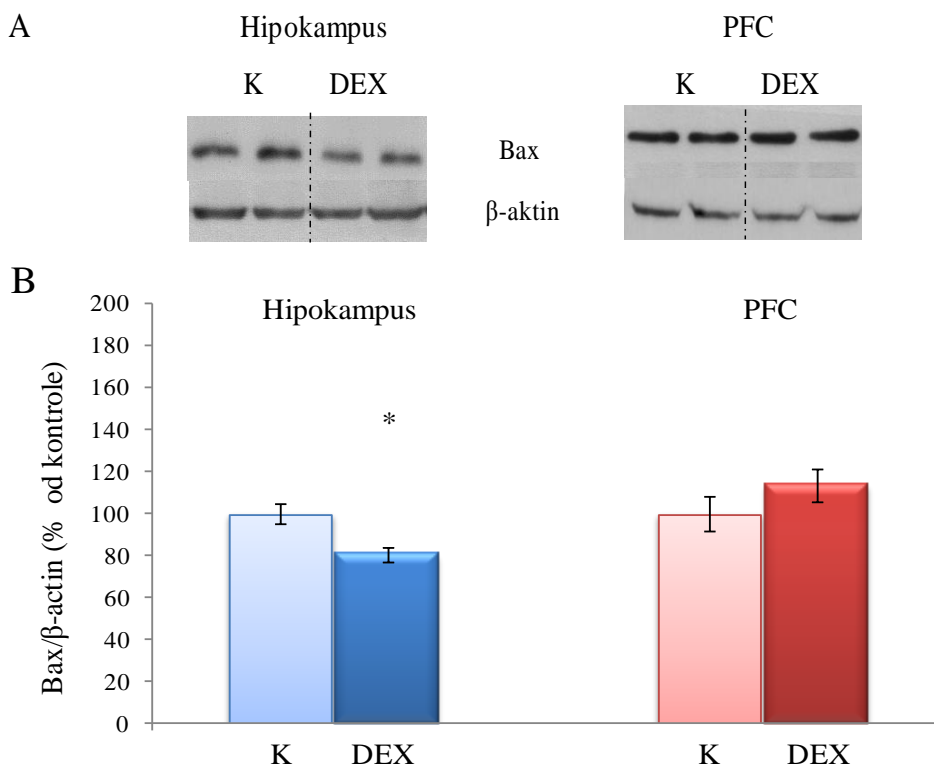
Slika 33. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju PARP proteina u hipokampusu i PFC-u pacova. Reprerentativni imunoblotovi za PARP u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije za PARP iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey odnosu na kontrolnu grupu.

U obe ispitivane moždane strukture ekspresija Bcl-2 proteina je bila statistički povećana nakon tretmana DEX-om (164.79 ± 14.09 , $p < 0.001$ u hipokampusu; 167.87 ± 9.57 , $p < 0.001$ u PFC-u, *Slika 34*).



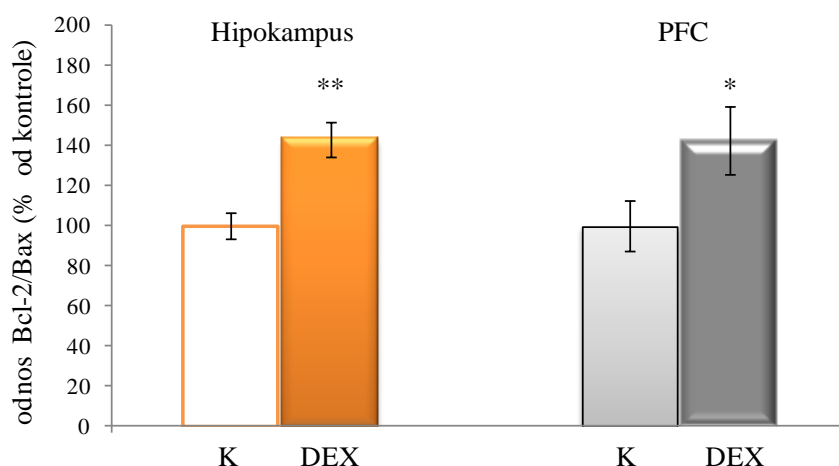
Slika 34. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju Bcl-2 proteina u hipokampusu i PFC-u pacova. Reprerzentativni imunoblotovi za Bcl-2 u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija Bcl-2 proteinske ekspresije iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

Kao što je prikazano na *Slici 35*, u hipokampusu koncentracija Bax proteina je značajno smanjena kod životinja tretiranih DEX-om u odnosu na kontrolnu grupu (100 ± 8.25 vs 80.88 ± 3.41 , $p < 0.05$), dok analiza ekspresije istog proteina u PFC-u nije pokazala statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa.



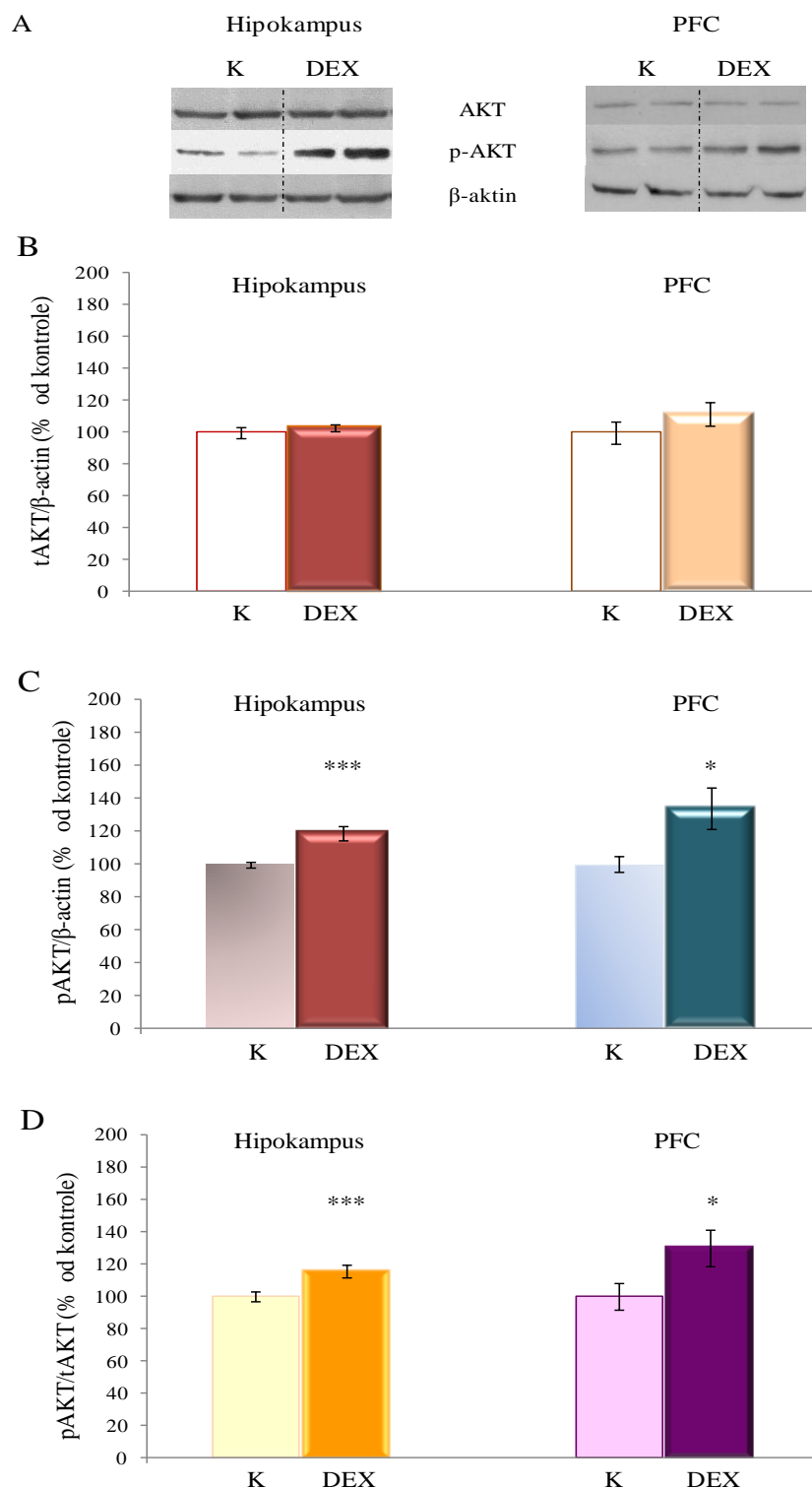
Slika 35. *Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju Bax proteina u hipokampusu i PFC-u pacova. Reprezentativni imunoblotovi za Bax protein u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija Bax proteinske ekspresije iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$).*

Direktno upoređivanje nivoa Bcl-2 i Bax proteina u WCE hipokampusu i PFC-a ukazuje da hroničan tretman DEX-om dovodi do statistički značajnog povećanja odnosa Bcl-2/Bax proteina, što pomera ovu fino regulisanu ravnotežu ka anti-apoptotskom molekulu Bcl-2 (143.02 ± 8.86 , $p < 0.01$ u hipokampusu odnosno 142.76 ± 16.99 , $p < 0.01$ u PFC-u, **Slika 36**).



Slika 36. Relativan odnos Bcl-2/Bax proteina u hipokampusu i PFC-u kod kontrolnih jedinki i životinja tretiranih DEX-om. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta za ispitivane proteine, a statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu.

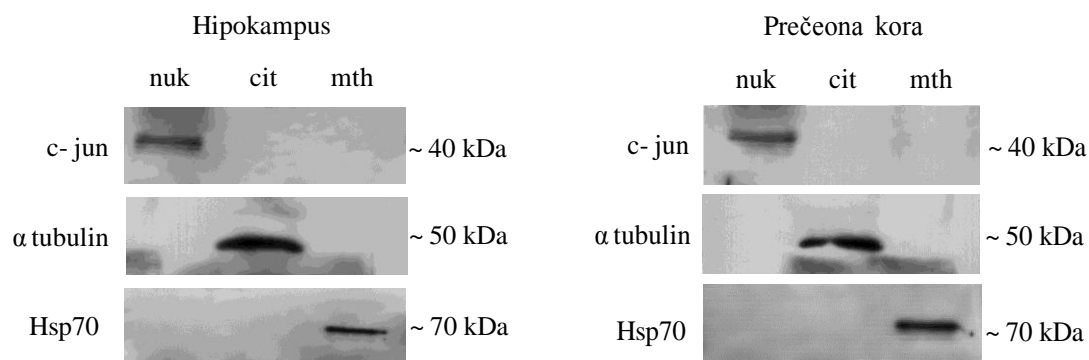
Potom je ispitivan efekat tretmana DEX-om na ekspresiju i aktivaciju efektnog proteina– AKT kinaze. U zadatim eksperimentalnim uslovima, ukupna koncentracija proteina AKT (tAKT) se nije menjala u WCE izolovanim iz hipokampusu i PFC-a (**Slika 37A, B**), dok je koncentracija fosforilisanih izoformi proteina AKT (p-AKT) bila značajno povećana nakon delovanja DEX-a ($p < 0.001$ u hipokampusu i $p < 0.05$ u PFC-u, **Slika 37A, C**). Relativni odnos p-AKT/tAKT je pokazao značajno povećanje aktivnosti AKT kinaze u odgovoru na DEX u obe ispitivane strukture (**Slika 37D**).



Slika 37. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju tAKT, p-AKT proteina i njihov odnos u hipokampusu i PFC-u pacova. Reprerzentativni imublotovi tAKT i p-AKT proteina u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija tAKT, p-AKT proteinske ekspresije i njihov odnos iz tri nezavisna eksperimenta predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B, C, D). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * $p < 0.05$ i *** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu.

4.2.1. Čistoća subćelijskih frakcija

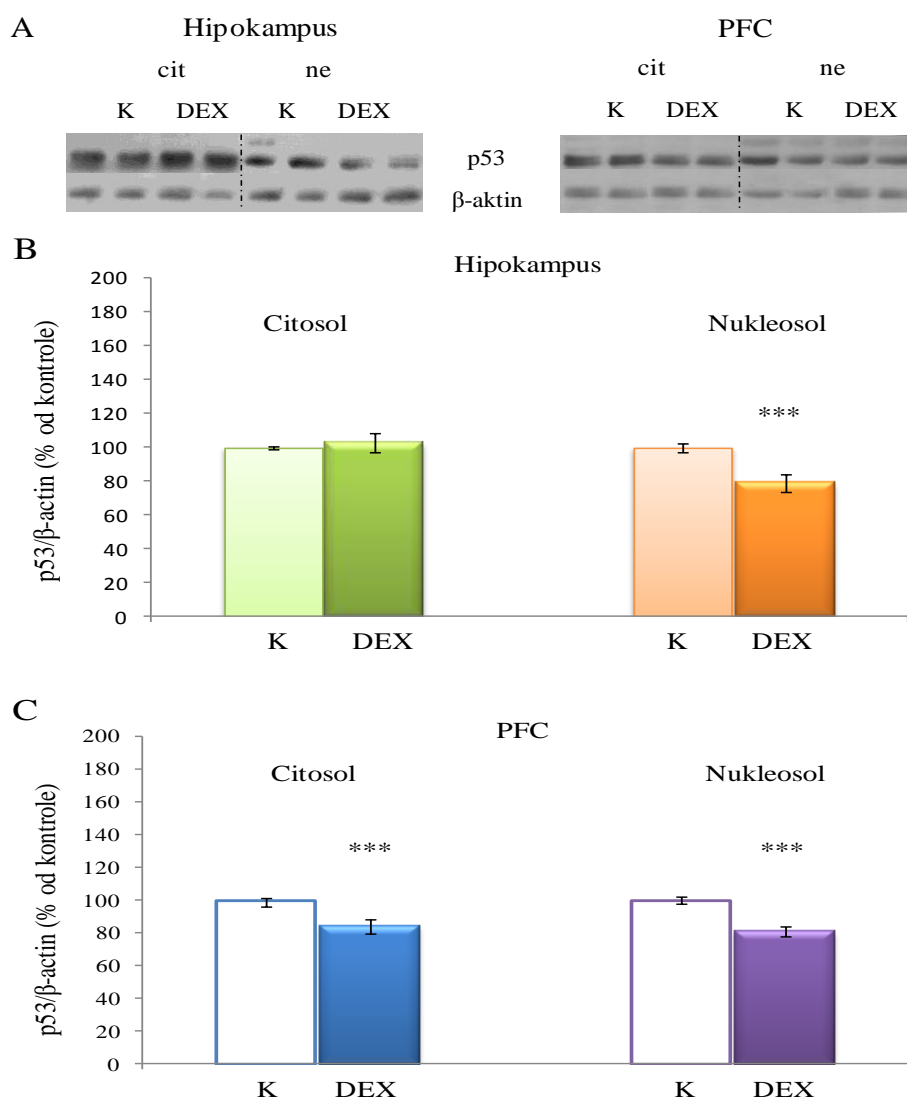
Čistoća izolovanih ćelijskih frakcija hipokampusa i prečeeone kore je proverana i potvrđena korišćenjem antitela na c-jun za jedarnu frakciju, α -tubulin za citosolnu frakciju i mHsp70 za mitohondrijalnu frakciju.



Slika 38. Čistoća ćelijskih frakcija izolovanih iz hipokampusa i prečeeone kore je potvrđena korišćenjem antitela na c-jun za jedarnu frakciju (nuk), α -tubulin za citosolnu frakciju (cit) i mHsp70 za mitohondrijalnu frakciju (mth).

4.2.2. Subćelijska distribucija p53 proteina u hipokampusu i prećeonoj kori

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivana i subćelijska distribucija p53 proteina 28 h nakon hroničnog tretmana DEX-om. U pogledu p53 proteina u citosolnoj frakciji hipokampusa ANOVA nije pokazala statistički značajnu razliku između analiziranih grupa, dok je u istoj ćelijskoj frakciji PFC-a uočeno smanjenje sadržaja p53 ($p < 0.001$, *Slika 39*); u jedarnoj frakciji obe strukture ekspresija p53 proteina je bila statistički značajno smanjena ($p < 0.001$).



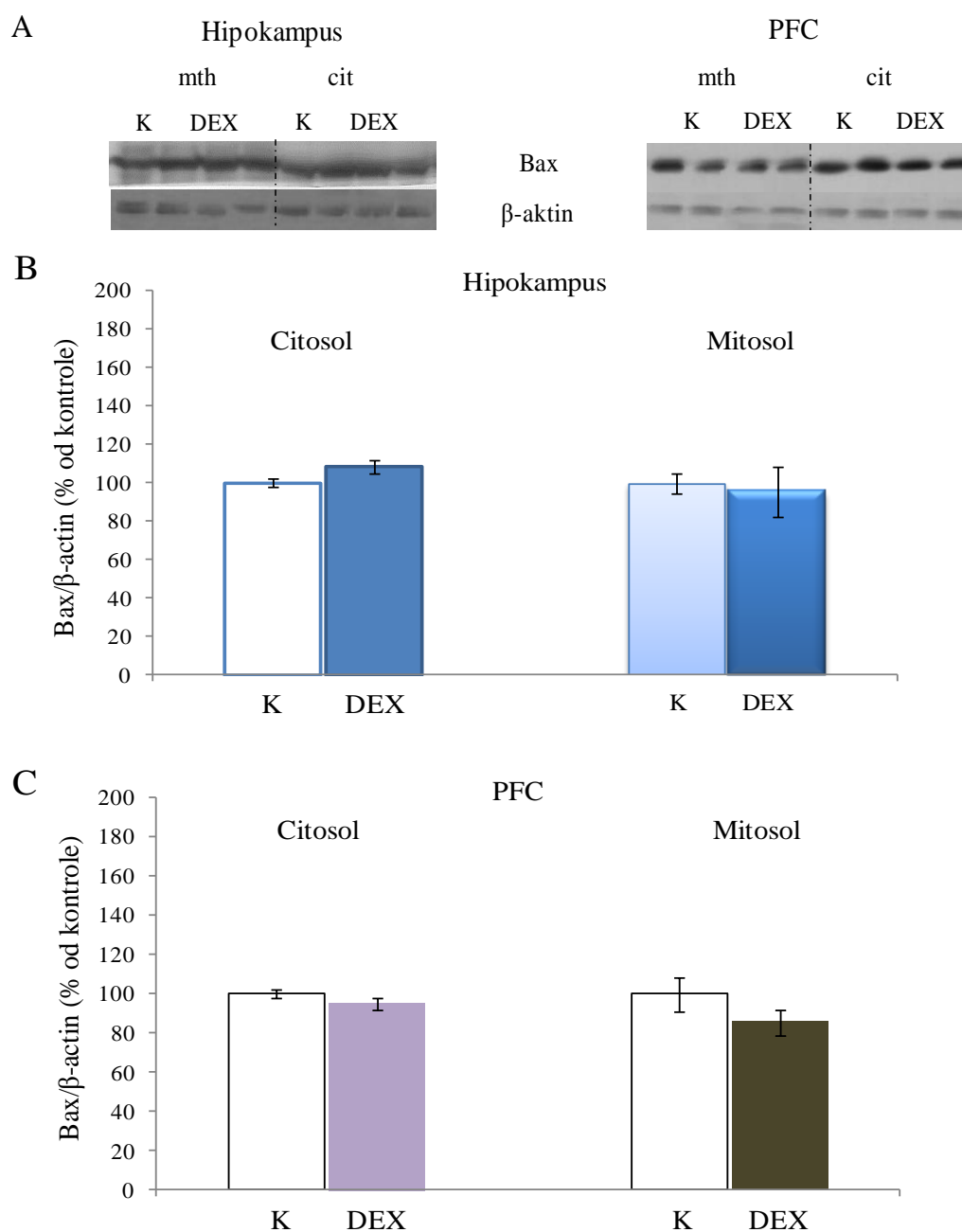
Slika 39. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju p53 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa (B) i PFC-a (C) kontrolnih jedinki (K) i životinja tretiranih DEX-om (DEX). Reprerativni imunoblotovi za p53 u hipokampusu i PFC-u (A). Vrednosti za p53 protein su normalizovane prema vrednostima za β-aktin u istim uzorcima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

4.2.3. Subćelijska distribucija članova Bcl-2 familije u hipokampusu i prećeonoj kori

Ekspresija članova Bcl-2 familije je ispitivana i u subćelijskim frakcijama (citosolu i mitohondrijama) Western blot metodom, pošto je analiza Bcl-2 i Bax u ukupnom ćelijskom ekstraktu pokazala značajne razlike između kontrolnih jedinki i životinja tretiranih DEX-om (*Slika 34 i 35*).

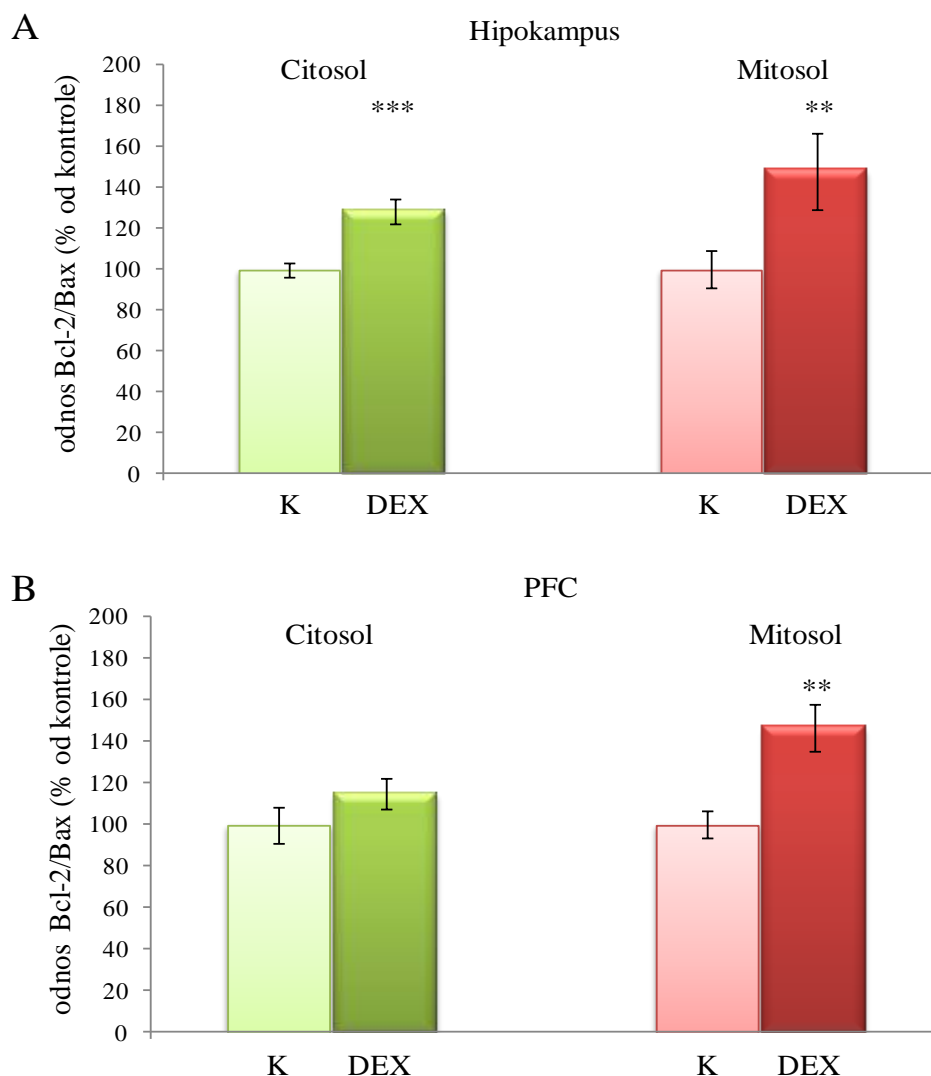
Kao što je prikazano na *Slici 40*, ispitivanjem subćelijske distribucije Bcl-2 proteina u hipokampusu pokazano je da DEX dovodi do povećanja nivoa proteina u obe ćelijske frakcije, s tim da je u mitohondrijskoj frakciji povećanje bilo izraženije (161.96 ± 10.95 , $p < 0.001$). U kortikalnoj citosolnoj frakciji, ekspresija Bcl-2 proteina je bila nepromenjena (*Slika 40*), dok je nivo proteina bio značajno povećan u mitohondrijskoj frakciji (128.36 ± 8.40 , $p < 0.05$, *Slika 40*).

U obe ispitivane strukture, ekspresija proteina Bax u citosolnoj i mitohondrijskoj frakciji je bila nepromenjena (u hipokampusu, citosol 100 ± 2.03 vs 108.12 ± 3.4 , i u mitohondrijama 100 ± 5.15 vs 95.15 ± 12.84 ; u PFC-u, citosol 100 ± 2.43 vs 95.21 ± 3.07 , i u mitohondrijama 100 ± 8.79 vs 85.50 ± 6.64) (**Slika 41**).



Slika 41. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju Bax proteina u citosolnom i mitohondrijskom ekstraktu hipokampusu (B) i PFC-a (C) kontrolnih jedinki (K) i DEX tretiranih (DEX) životinja. Reprezentativni imunoblotovi za Bax u hipokampusu i PFC-u (A). Vrednosti za Bax protein su normalizovane prema vrednostima za β -aktin u istim uzorcima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey.

Direktno upoređivanje nivoa proteina Bcl-2 i Bax u subćelijskim frakcijama hipokampusa i PFC-a ukazuje da je 28 h nakon hroničnog tretman DEX-om odnos Bcl-2/Bax proteina statistički značajno povećan i pomeren ka anti-apoptotskom molekulu Bcl-2 (*Slika 42*).

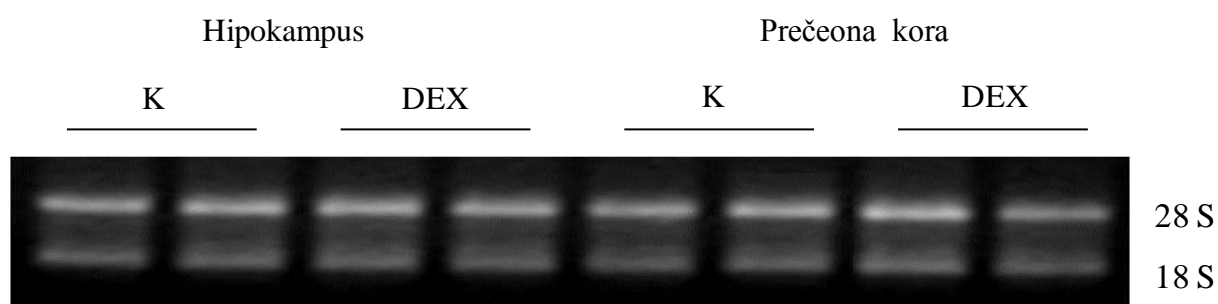


Slika 42. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na odnos Bcl-2 i Bax proteina u citosolnom i mitohondrijskom ekstraktu hipokampusa (B) i PFC-a (C) kontrolnih jedinki (K) i životinja tretiranih DEX-om (DEX). Vrednosti za Bcl-2 i Bax protein su normalizovane prema vrednostima za β -aktin u istim uzorcima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$.

5. Ekspresija gena za GR, NFκB, p53, Bcl-2 i Bax u hipokampusu i prečeonoj kori životinja izloženih hroničnom tretmanu deksametazonom

Kasni efekat hroničnog tretmana DEX-om u regulaciji genske ekspresije je praćen merenjem nivoa iRNK-a za GR, NFκB, p53, Bcl-2 i Bax u hipokampusu i PFC-u. Izabrani geni su uključeni u regulaciju stimulusom posredovanih aktivnosti CNS-a. GR direktno reguliše transkripciju izuzetno velikog broja gena i na taj način utiče na sudbinu ćelije u fiziološkim i patološkim stanjima; NF-κB kao transkripcioni faktor zajedno sa GR-om pravi finu ravnotežu od koje zavisi funkcionisanje svake ćelije. Naime, nivo ekspresije GR gena reguliše aktivnost HHA ose (Kolber i saradnici, 2008), dok je produkt NFκB gena uključen u modulaciju procesa učenja, kao i u procese formiranja memorije i one koji regulišu sinaptičku plastičnost hipokampusu i kore velikog mozga (Meffert i Baltimore, 2005). Osim toga, NFκB je sa još najmanje jednim transkripcionim faktorom, poput p53, uključen u regulaciju ekspresije proteina koji podstiču ili potiskuju procese preživljavanja odnosno apoptoze u ćelijama nervnog sistema na nivou jedra, dok su produkti gena Bcl-2 superfamilije neophodni za kontrolu ovih procesa na nivou mitohondrija (Meffert i Baltimore, 2005).

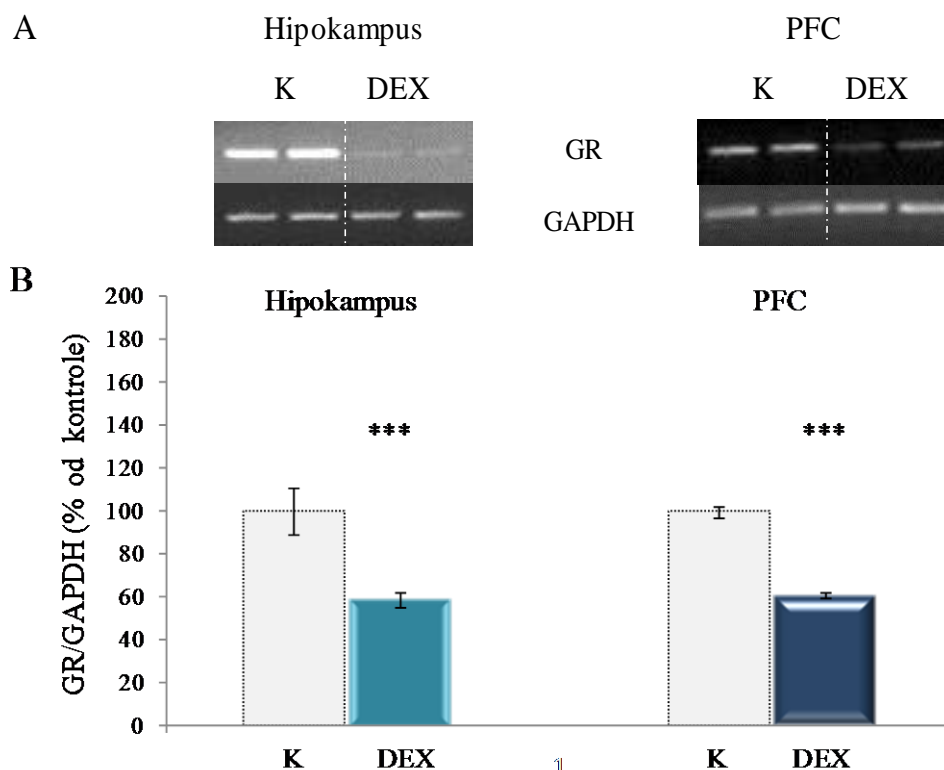
Kvalitet i integritet ukupne RNK je analiziran na 2 % agaroznom gelu (*Slika 43*); u svakom uzorku su uočljive 28 S i 18 S subjedinice koje odgovaraju ribozomalnoj RNK.



Slika 43. Agarozna elektroforeza ukupnih RNK (5 µg po uzorku) izolovanih iz hipokampusu i prečeone kore kontrolnih jedinki (K) i životinja tretiranih DEX-om (DEX) 28 h nakon poslednje injekcije. Oznacene su pozicije 28 S i 18 S subjedinice ribozomalnih RNK.

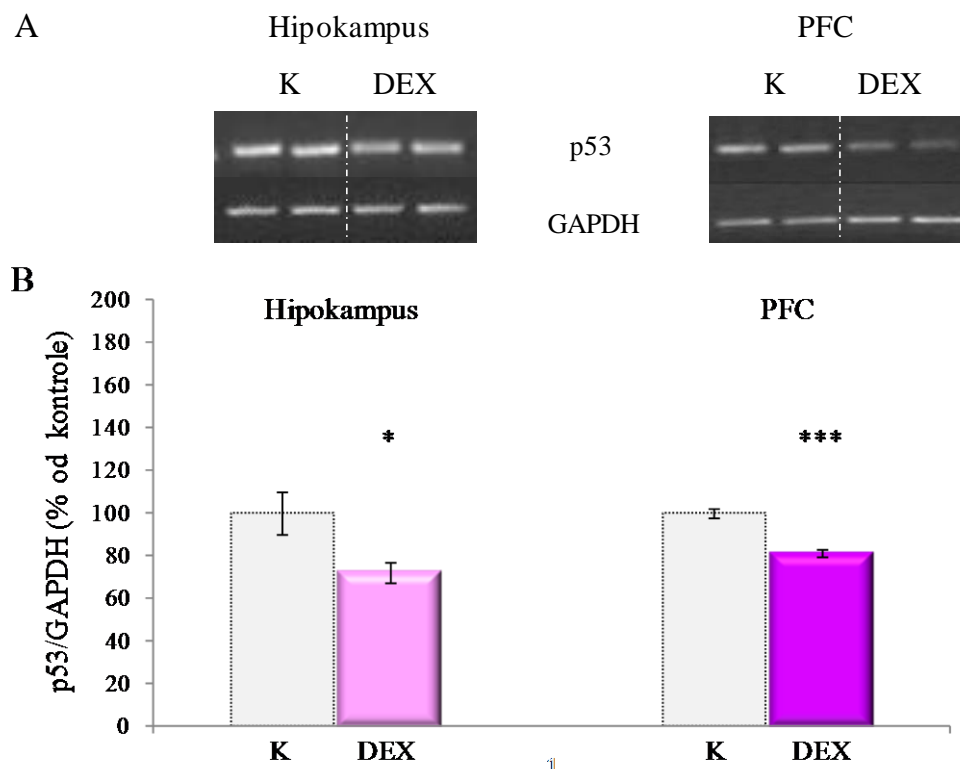
U zadatim eksperimentalnim uslovima je uočeno da su svi ispitivani geni konstitutivno ekspimirani u obe moždane strukture u kontrolnim pacovima.

Kao što je pokazano na *Slici 44*, ekspresija gena za GR je bila značajno smanjena, za oko 40 % u obe ispitivane moždane strukture ($p < 0.001$).



Slika 44. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju gena za GR u hipokampusu i PFC-u pacova. Reprerzentativne slike za GR u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija genske ekspresije za GR iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

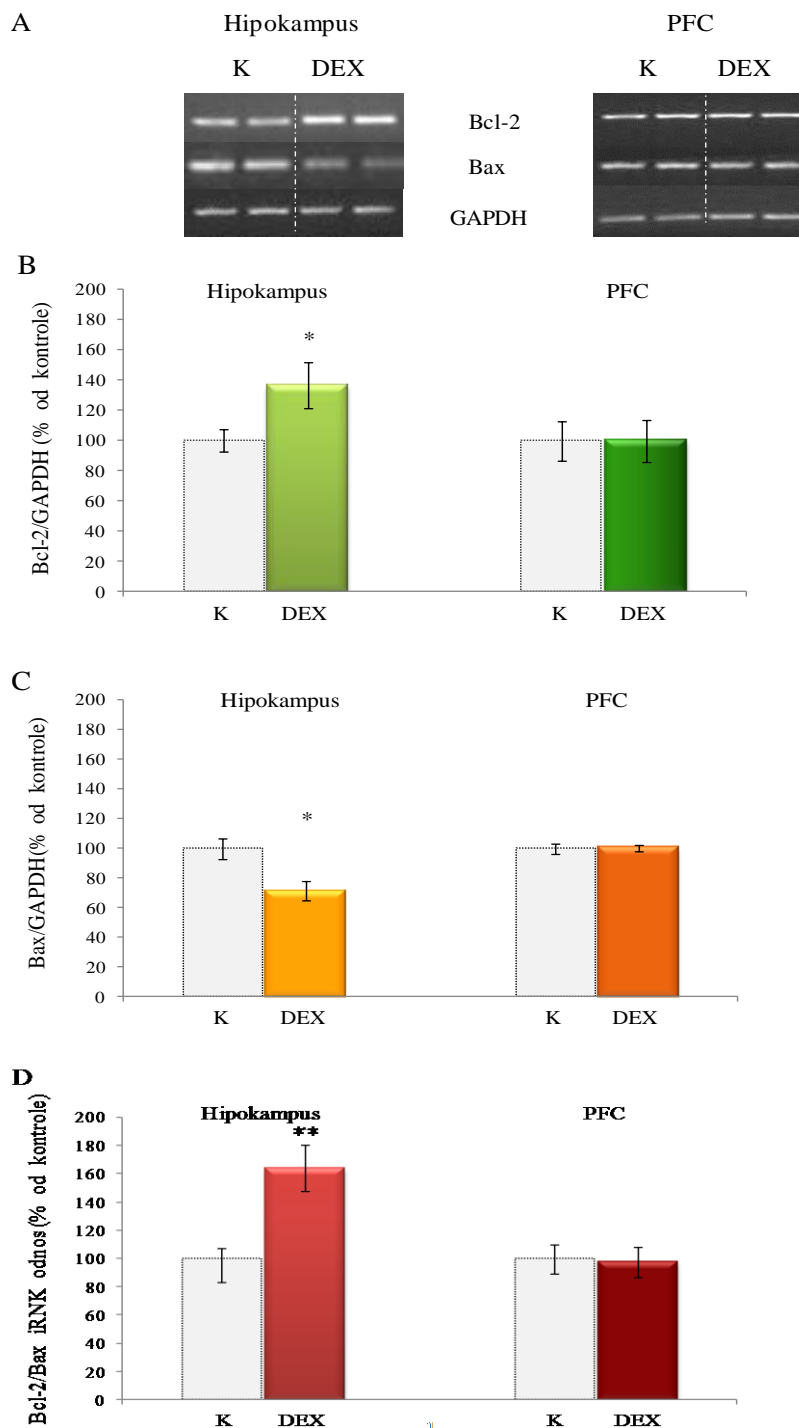
Nivo ekspresije iRNK za p53 je bio značajno smanjen 28 h nakon hroničnog tretmana DEX-om u obe ispitivane moždane strukture ($p < 0.05$ u hipokampusu i $p < 0.001$ u PFC-u, *Slika 46*).



Slika 46. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju gena za p53 u hipokampusu i PFC-u pacova. Reprezentativne slike za p53 u hipokampusu u i PFC-u (A). Kvantifikacija genske ekspresije za p53 iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * $p < 0.05$ i *** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu.

U poređenju sa kontrolnom grupom životinja, u hipokampusu DEX je uzrokovao povećanje ekspresije gena za Bcl-2 ($p < 0.05$, *Slika 47A, B*) i značajno smanjio ekspresiju gena za Bax ($p < 0.05$, *Slika 47A, C*), dok u PFC-u isti tretman nije značajno menjao nivo iRNK za Bax i Bcl-2 (*Slika 47B, C*).

Kao što je pokazano na *Slici 47D*, odnos iRNK za anti- i pro-apoptotske molekule Bcl-2 familije je značajno povećan u hipokampusu ($p < 0.01$), dok je u PFC-u ispitivani odnos nepromenjen.



Slika 47. Efekat hroničnog tretmana DEX-om na ekspresiju gena za Bcl-2 i Bax u hipokampusu i PFC-u pacova. Reprerativni slike za Bcl-2 i Bax u hipokampusu i PFC-u (A). Kvantifikacija genske ekspresije za Bcl-2 iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Kvantifikacija genske ekspresije za Bax iz tri nezavisna eksperimenta predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (C). Odnos iRNK za Bcl-2 i Bax iz tri nezavisna eksperimenta predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole (D). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu.

DISKUSIJA

Glukokortikoidi kontrolišu veliki broj fizioloških procesa, poput metabolizma, imunskog odgovora, rada kardiovaskularnog sistema, razvića i reprodukcije (Schlossmacher i saradnici, 2011). Na ćelijskom nivou, glukokortikoidi utiču na ključne signalne puteve, ostvarujući tako uticaj na različite procese, od proliferacije i diferencijacije do ćelijske smrti.

Dugi niz godina posebno se istražuje uloga glukokortikoida u mozgu. Poznato je da povišen nivo endogenih glukokortikoida usled hroničnog stresa ili dugotrajna terapija prirodnim i/ili sintetskim agonistima glukokortikoidnih receptora dovode do atrofije dendrita i gubitka sinapsi u regionima koji regulišu funkciju hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) ose. Sintetski glukokortikoid- deksametazon (DEX) ispoljava dvojne efekte; naime, nakon jednokratne aplikacije DEX podstiče formiranje memorije ukoliko je proces učenja iniciran stresorom, dok je njegovo dugotrajno dejstvo štetno i manifestuje se brojnim poremećajima. Takođe, pokazano je da imobilizacioni stres i primena visokih doza kortikosterona i DEX-a dovodi do atrofije dendrita u medijalnoj prečeonj kori (mPFC) (Sousa i saradnici, 2000, Wellman, 2001, Radley i saradnici, 2004, Radley i saradnici, 2005), kao i do drastičnog smanjenja broja trnolikih izraštaja na apikalnim dendritima piramidnih neurona II/III sloja kore, na kojima se završavaju eferentne projekcije hipokampusu (Cerqueira i saradnici, 2005). Stoga se smatra da su hipokampus i mPFC ključna mesta delovanja kako endogenih, tako i sintetskih glukokortikoida, koji u tim moždanim strukturama utiču na morfologiju i funkciju nervnih ćelija.

Sintetski glukokortikoidni analozi, poput DEX-a, u širokoj su upotrebi kao lekovi. DEX je snažan selektivni ligand glukokortikoidnog receptora (GR), koji svoje efekte ispoljava na nivou energetskeg metabolizma, imunskog sistema i HHA ose (Karssen i saradnici, 2005). Koristi se u dijagnostičke i istraživačke svrhe radi testiranja funkcije HHA ose, na primer za Kušingovu bolest i afektivne poremećaje (Karssen i saradnici, 2005). Takođe se često primenjuje i kao pomoćni lek u hemo- i radioterapiji obolelih od limfoidnih tumora i solidnih malignih tumora mozga, zbog svoje delotvornosti u samom lečenju malignosti i sposobnosti da spreči nastanak moždanih otoka, smanji bol, mučninu, povraćanje i citotoksične reakcije nastale usled terapije (Rutz i Herr, 2004, Zhang i saradnici, 2006). Uprkos širokoj primeni DEX-a u terapijske svrhe, primećeno je da on ispoljava i niz negativnih efekata u mozgu, poput ćelijske smrti granularnih

neurona dentatnog girusa u hipokampusu mladih i starih pacova (Almeida i saradnici, 2000), kao i smanjenje kognitivnih funkcija i motornog razvoja pacova (Zuloaga i saradnici, 2012).

S obzirom na to da su hipofiza i hipotalamus centralne komponente HHA ose, dok su hipokampus i prečeaona kora (PFC) više moždane strukture aktivno uključene u njenu regulaciju i za koje je pokazano da su osetljive na izlaganje sintetskim glukokortikoidima (McEwen, 1999), cilj ove doktorske disertacije je bio da se na zdravim mužjacima Wistar pacova ispita sistemski odgovor organizma i uticaj hroničnog tretmana DEX-om na apoptotsku signalizaciju u navedenim moždanim strukturama.

1. Mesto dejstva i efekat deksametazona na aktivnost HHA ose i ekspresiju glukokortikoidnog receptora

Efekti DEX-a u mozgu mogu biti posredovani kako aktivacijom glukokortikoidnih receptora u CNS-u, tako i njihovom aktivacijom u perifernim organima. Pokazano je, naime, da aktivacijom glukokortikoidnih receptora DEX smanjuje oslobađanje kortikosterona koje je posredovano stresom, kao i da se taj efekat može umanjiti lezijama različitih delova mozga, poput hipokampusa. Ovi nalazi ilustruju da DEX ostvaruje centralne efekte na aktivnost HHA ose preko hipokampusa (Feldman i saradnici, 1973, Feldman i saradnici, 1983, Feldman i Weidenfeld, 1991, Feldman i Weidenfeld, 1993). Međutim, sa druge strane, rezultati nekih studija ukazuju na to da je hipofiza primarna meta delovanja DEX-a (de Kloet i saradnici, 1974, De Kloet i saradnici, 1975, Miller i saradnici, 1992, Cole i saradnici, 2000, Reul i saradnici, 2000) i da je sposobnost preuzimanja DEX-a u CNS-u smanjena usled postojanja krvno-moždane barijere (de Kloet i saradnici, 1974, De Kloet i saradnici, 1975). Naime, kada je praćen unos ^3H -DEX-a u hipofizu i mozak pacova, otkrivena je relativno visoka koncentracija ^3H -DEX-a u hipofizi i nešto manja koncentracija u medijalno-bazalnom hipotalamusu, čija se jedra (lučno jedro (lat. *nucleus arcuatus*) i region drške (infundibulum)) nalaze se izvan krvno-moždane barijere, dok je u ostalim moždanim strukturama bila minimalna (Warembourg, 1975). Nekoliko istraživanja je pružilo podatke o mehanizmu koji je u velikoj meri odgovoran za otežan pristup DEX-a u mozak (Meijer i saradnici, 1998, Karssen i saradnici, 2005). Otkriveno je da MDR p-

glikoprotein (produkt *mdr1a* gena, engl. *multiple drug resistance*, MDR), prisutan na endotelnim ćelijama moždanih krvnih sudova i granularnim neuronima dentatnog girusa, aktivno izbacuje DEX iz moždanog tkiva, otežavajući na taj način njegov unos u CNS. U prilog ovom zaključku idu i rezultati studije Mason i saradnika (2008), koji pokazuju da je akumulacija ³H-DEX, pet puta veća u mozgu MDR1a *knock-out* miševa u odnosu na miševe divljeg tipa istog soja.

Nezavisno od toga koliko je mala količina DEX-a koja ipak prođe kroz krvno-moždanu barijeru i stigne do pojedinih regiona mozga, DEX koji prođe u hipofizu blokira sekretornu funkciju nadbubrežnih žlezda, što se lako može dokazati modifikovanim DST/CRH testom (engl. *dexamethasone suppression test/corticotropin-releasing hormone test*, *CRH challenge test*) (Cole i saradnici, 2000). Nalazi ovog testa ukazuju da čak i male doze DEX-a ostvaruju snažan inhibični uticaj na lučenje endogenih glukokortikoida na nivou hipofize, kao i da DEX ispoljava snažan sistemski odgovor na periferiji (Karssen i saradnici, 2005). To su pokazali i rezultati prezentovani u ovoj doktorskoj tezi. Odabrani parametri, kao što su nivo kortikosterona u serumu, telesna masa, masa timusa i nadbubrežnih žlezda, ispitani su kao markeri aktivnosti DEX-a na periferiji, ali i kao markeri aktivnosti HHA ose nakon hroničnog tretmana DEX-om. Naime, periferni efekti DEX-a su potvrđeni značajnim gubitkom telesne mase i smanjenjem mase timusa i nadbubrežnih žlezdi, kao i smanjenim lučenjem kortikosterona. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju da hroničan tretman DEX-om može uzrokovati hipoaktivnost (res-supresija) HHA ose, atrofiju nadbubrežnih žlezdi (Karssen i saradnici, 2005) i involuciju timusa kod glodara kao posledicu ćelijske smrti, apoptoze (Chmielewski i saradnici, 2000, Karssen i saradnici, 2005). Uočeno smanjenje telesne mase je najverovatnije posledica supresije gena za kortikotropin-oslobađajući hormon (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) u hipotalamusu odnosno, smanjenja njegove sinteze i lučenja (Michel i Cabanac, 1999). Smanjena ekspresija CRH dovodi do smanjenja sinteze i oslobađanja glukokortikoida, što dalje može dovesti do narušavanja metabolizma glukoze (Franco-Colin i saradnici, 2006), lipida (Kaur i saradnici, 1989) i kateholamina. Naši rezultati za sistemski odgovor organizma na hroničan tretman malim dozama DEX-a bitni su za proučavanje efekata DEX-a kako u osnovnim istraživanjima tako i u prekliničkim studijama, prvenstveno jer se efekti niskih doza DEX-a na endogene glukokortikoide ne

mogu ispitivati u centralnim moždanim strukturama usled blokiranja njegovog ulaska u mozak dejstvom MDR p-glikoproteina.

Upoređujući rezultate koji se odnose na promenu koncentracije kortikosterona u serumu 4 h i 28 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om uočava se postojanje vremenske razlike u stepenu supresije aktivnosti HHA ose. Naime, nivo kortikosterona u serumu 4 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om je bio znatno niži (kontrolne životinje 231.8 ± 45.4 vs. jedinke tretirane DEX-om 9.50 ± 5.59 , $p < 0.01$) od nivoa ovog hormona detektovanog 28 h nakon završetka tretmana (kontrolne životinje 196.5 ± 44.7 vs. jedinke tretirane DEX-om 83.3 ± 37.4 , $p < 0.05$), što nagoveštava da se komponente HHA ose postepeno vraćaju u normalu nakon izbacivanja DEX-a. Calogero i saradnici (1990) su takođe uočili reverzibilne efekte na nivou aktivnosti HHA ose nakon hroničnog tretmana DEX-om. Njihovi rezultati ukazuju da doza od $100 \mu\text{g/kg}$ injecirana 7 dana dovodi do statistički značajnog smanjenja telesne mase, mase timusa i nadbubrežnih žlezdi kod pacova, ali da se po završetku tretmana svi parametri, osim mase timusa, postepeno oporavljaju i dostižu kontrolni nivo 22 dana nakon završetka tretmana. Naime, uspostavljanje normalne funkcije hipotalamusa i bazalnog nivoa CRH detektovano je 3 dana nakon prestanka tretmana, dok je funkcija hipofize, praćena na osnovu nivoa ACTH normalizovana nakon 4 dana, a značajno se povećala 8 dana po završetku tretmana. Ovi rezultati jasno ukazuju da DEX ostvaruje nezavisne uticaje na pojedinačne komponente HHA ose, te da one različito reaguju na stimulus i da se različito oporavljaju (Calogero i saradnici, 1990).

Pretpostavlja se da su različiti efekti DEX-a u hipofizi i u mozgu uslovljeni različitim nivoom ulaska ovog potentnog glukokortikoidnog agoniste u te regione, kao i drugačijim afinitetom vezivanja DEX-a za kortikosteroidne receptore u hipofizi i mozgu. Ispitivanjem dozno-zavisnog odgovora na DEX i stepena aktiviranja receptora za glukokortikoide u hipofizi i mozgu, uočeno je da visoke doze DEX-a izazivaju pojavu nefizioloških stanja koja su uslovljena pojačanom aktivacijom GR-a i smanjenjem aktivacije MR-a (Reul i saradnici, 1987b, Reul i saradnici, 1987a, Spencer i saradnici, 1990, Miller i saradnici, 1992). S druge strane, efekti niskih doza DEX-a predstavljaju interesantan animalni model za proučavanje uticaja različitih metaboličkih faktora i procesa važnih za glukokortikoid-zavisne mehanizme u mozgu (Karszen i saradnici, 2005). U eksperimentalnom modelu korišćenom u ovoj doktorskoj disertaciji,

nivoi endogenog kortikosterona u hipokampusu i PFC-u su takođe bili statistički značajno smanjeni kao posledica supresije HHA ose. Karssen i saradnici (2005) ističu da je delovanje kortikosterona na periferiji dobro zamenjeno aktivnošću ovog sintetskog glukokortikoida, dok u CNS-u, usled slabog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru DEX, ne može da nadomesti nedostatak endogenog glukokortikoida. Stoga, DEX-om izazvana supresija hormona hipofize i smanjeno oslobađanje endogenog kortikosterona na periferiji, uz istovremeni slab prolazak DEX-a kroz krvno-moždanu barijeru u CNS, izaziva nastanak stanja takozvane „hemijske adrenalektomije“ u mozgu, uz očuvanu aktivnost glukokortikoidnog sistema na periferiji (Karssen i saradnici, 2005). To uslovljava pojavu tkivno-specifičnog hipokortikoidnog stanja u CNS-u (Karssen i saradnici, 2005), što pretpostavljamo da se dešava u našim eksperimentalnim uslovima.

Hipoteza da hronični tretman niskim dozama DEX-a uzrokuje promenu ekspresije GR-a u mozgu ispitana je na nivou GR proteina u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i PFC-u, kao i njegove iRNK u hipokampusu i PFC-u. Rezultati su pokazali da se 28 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om, nivo ukupnog GR proteina u sve četiri moždane strukture ne menja značajno u odnosu na kontrolne životinje, dok je količina iRNK za GR u hipokampusu i PFC-u bila statistički značajno smanjena nakon tretmana. Studija Terzić i saradnika (2003) ukazuje na značajno smanjenje količine iRNK za GR, nepromenjenju količinu GR proteina i za oko 30 % smanjenu GRE-vezujuću aktivnost receptora u mozgu pacova nakon tretmana DEX-om. Poznato je, takođe, da aktivacija GR-a agonistima prolazno menja gensku ekspresiju, tako na primer brzi efekti DEX-a se ostvaruju transrepresijom koju potom može, ali i ne mora da prati talas transaktivacije. Na nivou transkriptoma promene se obično uočavaju u vremenskom okviru 1–72 h. Naime, Okret i saradnici (1986) su u kulturi ćelija hematoma pacova, 6 h nakon tretmana DEX-om, uočili smanjenu količinu iRNK za 50 %, dok je nakon 24 h smanjenje bilo 95 %, sa tim da se posle 72 h količina iRNK za GR vratila na kontrolni nivo. Iz prethodno navedenog može se zaključiti da hronični tretman niskom dozom DEX-a ima različite efekte na ekspresiju GR proteina i njegove iRNK, time što dovodi do smanjenja genske ekspresije, ali ne i do promene u nivou njegovog proteina. Uočene promene se mogu objasniti smanjenjem koncentracije kortikosterona u serumu i moždanom tkivu, kao i slabim prelaskom DEX-a kroz krvno-moždanu barijeru, što za

posledicu može imati povećanu aktivaciju MR-a, dok GR ostaje neaktivan (Karssen i saradnici, 2005).

2. Uloga deksametazona u neurodegenerativnim promenama

Neurodegeneracija uzokovana glukokortikoidima se najčešće uočava u regionima koji regulišu funkciju HHA ose, poput hipokampusa i PFC-a. Gubitak neurona u tim regionima može biti posledica narušavanja energetskeg metabolizma i transporta glukoze, kojim se smanjuju energetske zalihe u ćeliji i remeti oslobađanje i preuzimanje glutamata, kao i usled aktiviranja raznih vanćelijskih i unutarćelijskih kaskada, koje najčešće uključuju Ca^{2+} , kiseonikove slobodne radikale, endonukleaze i druge pro-apoptotske faktore (Reagan i McEwen, 1997).

Neurodegenerativne promene koje nastaju nakon primene DEX-a su u osnovi drugačije u odnosu na promene posredovane endogenim glukokortikoidima, ali su veoma slične onim koje se javljaju nakon uklanjanja nadbubrežnih žlezdi (adrenalektomija, ADX¹⁹) (Haynes i saradnici, 2001). Pretpostavlja se da nakon ADX-a smrt neurona nastaje kao posledica narušene neurotransmisije, poput redukcije glutamatne transmisije u dentatnom girusu i povezanim regionima (Lowy i saradnici, 1993), dok je nakon tretmana DEX-om utvrđena povećana glutamatna transmisija i smanjena astrogliozna (Kerr i saradnici, 1992). Povećana glutatom-posredovana transmisija može pokrenuti Ca^{2+} -zavisne proteaze i druge Ca^{2+} -regulisane proteine koji dovode do degeneracije citoskeletnih proteina i lipaza, nastanka slobodnih radikala (Sapolsky, 1999), kao i smanjenja kapaciteta oksidativnih enzima, čime neuroni postaju osetljiviji na slobodne radikale (McIntosh i Sapolsky, 1996). Upravo, hipoteza da DEX u mozgu dovodi do oštećenja neurona sličnih onim koji se javljaju nakon ADX-a je podržana činjenicama da male doze DEX-a smanjuju sistemsko oslobađanje endogenih glukokortikoida, kao i

¹⁹ Poznato je da ADX nakon 3 dana uzrokuje brz gubitak ćelija dentatnog girusa (Gould i saradnici, 1990), kao i da je taj gubitak pojačan 7 dana nakon operacije i praćen smanjenjem veličine ćelijskih tela i dendritskih grana, dok se nakon 3–4 meseca može detektovati skoro potpun gubitak granularnih ćelija dentatnog girusa (Sloviter i saradnici, 1993a, Sloviter i saradnici, 1993b). Međutim, degranulacija dentatnog girusa može biti sprečena dodavanjem kortikosterona i aldosterona, ukazujući da njihovo vezivanje za MR može zaštititi ćelije od ADX-posredovane smrti (Gould i saradnici, 1991).

da otežano ulaze i ujedno slabo nadoknađuju endogeni kortikosteron u mozgu (Haynes i saradnici, 2001).

Poznato je da akutno davanje DEX-a može usloviti nastanak subletalnih oštećenja neurona, kao i regionalno-ograničenu smrt u dentatnom girusu (Hassan i saradnici, 1996, Sousa i saradnici, 2000, Haynes i saradnici, 2001), CA1 i CA3 regionima hipokampusa (Haynes i saradnici, 2001) i u drugim moždanim strukturama. Nekoliko studija ukazuje da se pod dejstvom glukokortikoida može javiti apoptoza i nekroza, sa tim da tip smrti neurona zapravo zavisi od primenjene doze (Reagan i McEwen, 1997, Roy i Sapolsky, 2003b, Roy i Sapolsky, 2003a). Tako je, na primer, pojava apoptoze u granularnim neuronima dentatnog girusa hipokampusa karakteristična za tretmane malim dozama glukokortikoida (Almeida i saradnici, 2000), dok se nekroza javlja nakon primene većih doza u velikom broju neurona različitih moždanih struktura i njihovih slojeva, ili nakon ADX-a u kombinaciji sa tretmanom DEX-om u glijalnim ćelijama (Morita i saradnici, 1999), što posredno može uzrokovati odumiranje neurona. U našim eksperimentalnim uslovima, difenilaminski DNK fragmentacioni esej nije pokazao pojavu apoptoze ni u jednoj ispitivanoj moždanoj strukturi. Takođe, na nivou hipokampusa i PFC-a, korišćenjem specifične fluorescentne boje *fluoro jade B* kod životinja tretiranih DEX-om nisu detektovane značajne promene u broju specifično obojenih ćelija u odnosu na kontrolne, dok je bojenje *krezil-ljubičastom* bojom ukazalo na odsustvo značajnih morfoloških promena u ispitivanim regionima 28 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om.

Almeida i saradnici (2000) su koristeći istu dozu DEX-a i tip aplikacije, TUNEL metodom 4 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om detektovali apoptozu samo u subgranularnoj zoni hipokampusa kod polno zrelih i starih pacova (Almeida i saradnici, 2000). Takođe, mi smo u istoj vremenskoj tački uočili umerenu pojavu apoptoze u hipokampusu i hipotalamusu, što može objasniti rezultate za prokaspazu 3, PARP i p53 u kasnijoj vremenskoj tački (podaci za spomenutu vremensku tačku 4 h nisu prikazani). S obzirom na to da je apoptoza relativno brz fenomen i da je vreme poluživota DEX-a kod pacova 2.3 h (Samtani i Jusko, 2005), uočeni nedostatak apoptoze 28 h nakon poslednje injekcije DEX-a u našoj studiji može proisteći kao posledice brzog uklanjanja mrtvih ćelija (Haynes i saradnici, 2001), usled relativno kasne vremenske tačke detekcije u odnosu na studiju Almeide i saradnika (2000).

Naime, Haynes i saradnici (2001) su uočili relativno kratkotrajnu aktivaciju mikroglije u striatumu, hipokampusu i lateralnom septalnom jedru nakon tretmana DEX-om. U njihovim eksperimentalnim uslovima, nivo apoptoze uzrokovane DEX-om je bio relativno umeren i OX42 imunoreaktivnost je bila maksimalna 24 h nakon apliciranja DEX-a, da bi se u roku od 72 h vratila na kontrolni nivo. Nalazi te studije ukazuju da su procesi aktivacije, reakcije, detekcije i fagocitoze brzi, kao i da se većina apoptotskih ćelija nastalih pod uticajem DEX-a uklanja u kratkom vremenskom periodu odnosno do 48 h (Haynes i saradnici, 2001). Sa druge strane, naši rezultati mogu biti posledica i relativno male primenjene doze jer je ista grupa autora kod odraslih pacova pokazala da DEX dovodi do pojave regionalno-specifične apoptoze²⁰, tek kad se primeni doza veća od 0.7 mg/kg (Haynes i saradnici, 2001), što je mnogo veća doza u odnosu na korišćenu u našoj studiji.

Treba isteći da su naši rezultati u skladu sa istraživanjima drugih autora u kojima je praćeno delovanje DEX-a na mozak i u kojima nije detektovana apoptoza u ćelijama dentatnog girusa nakon primene niske (50 µg/kg, dva puta dnevno, 5 dana) ni nakon visoke (500 µg/kg, dva puta dnevno, 5 dana) doze aplicirane potkožno odraslim mužjacima pacova (Karssen i saradnici, 2005). Kod pacova u ranom postnatalnom razviću (starost pacova je bila 1–3 dana) ista doza DEX-a je uzrokovala promene na dendritima, ali ne i apoptozu u neuronima hipokampusa 24 h nakon završenog hroničnog tretmana, dok je na ultrastrukturnom nivou većina ćelija izgledala normalno u obe eksperimentalne grupe (Tan i saradnici, 2002). Takođe, Tan i saradnici (2002) su Nisslovim bojenjem hipokampalnih preseka uočili odsustvo degenerišućih neurona i nepromenjene morfološke karakteristike piramidnih i granularnih neurona kako nakon akutnog, tako i nakon hroničnog tretmana DEX-om. U našim eksperimentima, nedostatak apoptoze u ispitivanim moždanim strukturama 28 h nakon poslednje injekcije DEX-a je najverovatnije posledica aktivacije MR-a, jer je nivo kortikosterona, iako smanjen, dovoljno visok da uzrokuje njegovu aktivaciju, dok GR ostaje neaktivan (Karssen i saradnici, 2005), što je u skladu sa našim rezultatima za GR. Smanjene koncentracije kortikosterona u serumu i moždanom tkivu, koje su uočene nakon hroničnog tretmana malom dozom DEX-a mogu izazvati velike promene u aktivaciji

²⁰ Apoptotske ćelije su detektovane u striatumu i hipokampusu, ali ne i u lateralnom septalnom jedru (Haynes i saradnici, 2001).

GR-a i MR-a i narušiti ravnotežu u njihovom odnosu (Karssen i saradnici, 2005). Upravo, razlika u aktivaciji ovog dvojnog receptorskog sistema može dovesti do suptilnih promena u ravnoteži pro- i anti-apoptotskih molekula (Almeida i saradnici, 2000) koji su neophodni za procese preživljavanja ili smrti neurona (Abraham i saradnici, 2001). Treba istaći i da rezultati nekoliko *in vitro* studija na neuronima miša, pacova, psa i čoveka, ukazuju da se DEX vezuje direktno za MR, ali sa mnogo manjim afinitetom u odnosu na GR (Reul i saradnici, 1990, Rupprecht i saradnici, 1993, Grossmann i saradnici, 2004), što može objasniti i uočene promene u hipofizi. Naime, aktivirani MR ispoljava anti-apoptotske efekte (Woolley i saradnici, 1990, Sousa i saradnici, 2000) i potpomaže preživljavanje neurona (Crochemore i saradnici, 2005), tako što povećava odnos anti- vs. pro-apoptotskih molekula i smanjuje aktivnost kaspaze 3 (Munier i saradnici, 2012).

Takođe, naš rezultat je u skladu sa nalazima nekoliko studija u kojima su praćeni efekti moždanog udara i hipoksično-ishemičnih promena, koji su ukazali da DEX sprečava apoptozu u neuronima i da, čak, može imati neuroprotektivne efekte (Limbourg i saradnici, 2002). Zhang i saradnici (2006) su utvrdili da, u ćelijama različitih tipova i subtipova tumora mozga, tretman DEX-om povećava bazalnu vijabilnost i značajno smanjuje apoptozu, dok u kombinaciji sa cisplatinom može značajno da inhibira delovanje ispitivanog hemoterapeutika.

3. Uloga AKT kinaze u odgovoru hipofize, hipotalamusa, hipokampusa i prećeone kore na hroničan tretman deksametazonom

Radi identifikovanja proteina koji regulišu procese apoptoze odnosno preživljavanja, ispitivali smo kasni efekat tretmana DEX-om na ekspresiju i aktivaciju efektornog proteina AKT kinaze. Veliki broj studija ukazuje da AKT kontroliše funkcije mnogih molekula ukljućenih u ćelijsko preživljavanje, progresiju ćelijskog ciklusa, migraciju i ćelijski rast (Fresno Vara i saradnici, 2004) u neuronima, fibroblastima i hematopoetićnim ćelijama (Minshall i saradnici, 1996, Dudek i saradnici, 1997, Kulik i Weber, 1998). Takođe, uočeno je da AKT može direktno blokirati apoptozu izazvanu različitim stimulusima, poput UV zraćenja, deprivacije faktora rasta, DNK oštećenja (Datta i saradnici, 1999, Limbourg i saradnici, 2002), na taj način što blokira

„mašineriju” smrti u citoplazmi, reguliše ekspresiju gena uključenih u ćelijsko preživljavanje i smrt, kao i metaboličke puteve neophodne za procese preživljavanja (Brunet i saradnici, 2001a, Brunet i saradnici, 2001b).

Glukokortikoidi mogu posredovati u aktivaciji PI3K/AKT signalnih puteva u *in vitro* uslovima (Limbourg i saradnici, 2002), kao i u limfoidnim i ne-limfoidnim ćelijama (Herr i saradnici, 2007). Uočeno je da su PI3K/AKT signalni putevi aktivirani na glukokortikoidima-zavisan način i inhibirani nakon tretmana sa antagonistom glukokortikoida RU486 i inhibitorom PI3 kinaze (PI3K) LY294002, ali ne sa transkripcionim inhibitorima (Limbourg i Liao, 2003). Dokazi da su ti efekti posredovani glukokortikoidima temelje se na transfekcionim studijama u COS7 ćelijama koje ne poseduju kortikosteroidne receptore. Naime, tretman DEX-om nije bio u mogućnosti da aktivira PI3K ili AKT kada ćelija ne poseduje endogeni receptor, međutim nakon transfekcije humanog GR-a ili dimerizaciono-defektnog receptornog mutanta (A458T), koji nema sposobnost vezivanja za DNK, i samim tim transaktivacije ciljnih gena, utvrđena je aktivacija AKT-a (Limbourg i saradnici, 2002). Takođe, ista grupa autora je dokazala netranskripcionu aktivaciju AKT-a u embrionalnim fibroblastima (MEF) poreklom iz genetički modifikovanih miševa. Dakle, DEX je mogao da aktivira AKT samo u divljem soju MEF-a i ćelijama koje poseduju receptore sa defektnim sekvencama za vezivanje za DNK, dok je aktivacija AKT-a izostala u defektnim MEF ćelijama (Limbourg i saradnici, 2002). Ipak, detaljni mehanizam kojim receptori za koji su vezani ligandi aktiviraju PI3K/AKT signalne puteve u neuronima nije u potpunosti objašnjen.

U zadatim eksperimentalnim uslovima, ukupna koncentracija proteina AKT (tAKT) se nije menjala u ukupnim ćelijskim ekstraktima izolovanim iz hipofize, hipotalamusa, hipokampusa i PFC-a, dok je koncentracija fosforilisanog proteina AKT (p-AKT) bila značajno povećana 28 h nakon završenog tretmana DEX-om. Relativan odnos p-AKT/tAKT, koji ilustruje aktivnost AKT kinaze, pokazao je značajno povećanje aktivnosti AKT kinaze u odgovoru na DEX u svim ispitivanim strukturama. Na osnovu rezultata skorašnje studije autora Yu-Shengyou i Li (2013), koja ukazuje da DEX smanjuje apoptozu putem aktivacije AKT kinaze u drugim tkivima, može se pretpostaviti da detektovana aktivacija AKT kinaze u ovom eksperimentalnom modelu je ključna za pokretanje anti-apoptotskih signalnih puteva u mozgu 28 h nakon

završetka hroničnog tretmana DEX-om, pa čak i za rezistenciju na apoptozu koja je uočena nakon hemoterapije kod pacijenata (Herr i saradnici, 2007).

4. Apoptotska signalizacija u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i prečenoj kori nakon hroničnog tretmana deksametazonom

Imajući u vidu neusklađenost rezultata mnogih istraživanja, u ovoj studiji su praćeni efekti hroničnog tretmana DEX-om na apoptotsku signalizaciju u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i PFC-u.

Apoptoza izazvana glukokortikoidima kod odraslih životinja se može javiti kao posledica promena u mitohondrijskim anti- i pro-apoptotskim molekulima Bcl-2 familije (Almeida i saradnici, 2000, Noguchi i saradnici, 2008). Proteini Bcl-2 familije su ključni za procese apoptoze zbog svoje sposobnosti da regulišu integritet mitohondrijalne spoljašnje membrane. Tako, anti-apoptotski molekuli Bcl-2 i Bcl-x_l, delujući samostalno kao homo- i heterodimeri ili zajedno sa drugim proteinima poput Bax-a kao heterodimeri, održavaju osmotski balans i integritet mitohondrijske membrane i sprečavaju oslobađanje apoptotskih proteina iz mitohondrija. Nakon apogena, pro-apoptotski molekuli Bax i Bak, doprinose narušavanju spoljašnje membrane i olakšavaju oslobađanje apoptotskih faktora iz mitohondrija (Du i saradnici, 2009a, Du i saradnici, 2009b). Sa druge strane, postoji mogućnost da se Bcl-2/Bcl-x_l heterodimeri mogu vezati za Apaf-I i na taj način sprečiti formiranje kompleksa Apaf-I-kaspaza 9 i aktivaciju kaspaze 9 (Green i Reed, 1998) i time sprečiti pokretanje apoptotske kaskade.

S obzirom na to da odnos apoptotskih molekula Bcl-2 familije u ćeliji deluje kao reostat koji kontroliše da li će pojedine ćelije opstati ili umreti nakon povrede (Oltvai i Korsmeyer, 1994), ispitivali smo ekspresiju anti-apoptotskog Bcl-2 i pro-apoptotskog Bax proteina u hipofizi, hipotalamusu, hipokampusu i PFC-u 28 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om. U našoj studiji je uočeno povećanje proteinske ekspresije Bcl-2 u ukupnim ćelijskim ekstraktima izolovanim iz svih moždanih struktura, sa tim da detektovano povećanje u hipotalamusu nije bilo statistički značajno. Sa druge strane, ekspresija proteina Bax je bila statistički značajno smanjena u hipotalamusu i

hipokampusu, dok u hipofizi i PFC-u nije detektovana značajna promena količine ovog proteina. Direktnim upoređivanjem nivoa ekspresije Bcl-2 i Bax proteina u ukupnim ćelijskim ekstraktima u svim ispitivanim strukturama je utvrđeno da hronični tretman malim dozama DEX-a dovodi do pomeranja ravnoteže ka anti-apoptotskom molekulu Bcl-2 u hipotalamusu, hipokampusu i PFC-u, dok takva promena nije uočena u hipofizi. Jedno od mogućih objašnjenja dobijenih rezultata za hipofizu i delom za hipotalamus leži u tome što se ove strukture, hipofiza u potpunosti i pojedina jedra hipotalamusa, nalaze izvan krvno-moždane barijere i predstavljaju mesto do kojeg DEX stiže i direktno ostvaruje efekte. Može se pretpostaviti da u hipofizi i pojedinim jedrima hipotalamusa nema značajnijih fluktuacija hormona, jer je smanjena koncentracija endogenog glukokortikoida– kortikosterona, verovatno trenutno nadoknađena DEX-om. S toga, uočeni kasni efekti DEX-a u ovim tkivima mogu proisteći iz aktivacije MR-a putem oba glukokortikoida, što je dalje odgovorno za povećanje aktivacije i proteinske ekspresije anti-apoptotskih molekula. Sa druge strane, promene u ekspresiji ispitivanih članova Bcl-2 familije, kao i njihovog proteinskog odnosa u hipokampusu, PFC-u i ostalim jedrima hipotalamusa, mogu biti posledica aktivacije MR-a nakon vezivanja samo kortikosterona koji je detektovan u moždanom tkivu, jer DEX apliciran u malim količinama ne prolazi krvno-moždanu barijeru i ne dospeva u mozak.

Radi preciznije analize signalnih puteva koji dovode do apoptoze, praćena je subćelijska distribucija ovih proteina u hipokampusu i PFC-u i detektovano je statistički značajno povećanje ekspresije Bcl-2 u mitohondrijama, kao i povećanje Bcl-2/Bax odnosa u obe strukture. Paralelno, u hipokampusu i PFC-u je praćena ekspresija iRNK za Bcl-2 i Bax. U PFC-u nisu uočene promene u ekspresiji iRNK za Bcl-2 i Bax, kao ni promene odnosa nivoa iRNK za ove proteine, dok je u hipokampusu utvrđeno povećanje ekspresije iRNK za Bcl-2, smanjenje nivoa iRNK za Bax, što za posledicu ima povećanje odnosa Bcl-2/Bax iRNK. Naši rezultati ukazuju na prevagu anti-apoptotskih molekula u obe moždane strukture, što je u skladu sa odsustvom apoptoze u ispitivanom eksperimentalnom modelu. Međutim, ranije je pokazano da Bax ima ključnu ulogu u apoptozi izazvanoj DEX-om u hipokampusu odraslih mužjaka pacova (Almeida i saradnici, 2000), iako druge studije ističu da tretman DEX-om ne menja ekspresiju Bax proteina kod neonatalnih pacova (Tan i saradnici, 2002, Zuloaga i saradnici, 2012).

Neusklađenost rezultata našeg istraživanja i studije Almeida i saradnika (2000) može biti posledica ranije eksperimentalne tačke koja je korišćena u tom istraživanju, pozitivnog tkivno-specifičnog odgovora ispitivanih moždanih struktura, kao i moguće aktivacije MR-a, čija aktivacija štiti ćelije od apoptoze (Karssen i saradnici, 2005) i povećava ekspresiju Bcl-2 proteina (Planey i saradnici, 2002).

Brojne studije ukazuju da aktivirana AKT kinaza direktno sprečava konformacione promene Bax proteina i njegovo premeštanje u mitohondrije (Tsuruta i saradnici, 2002), kao i da povećava ekspresiju anti-apoptotskog proteina Bcl-2 i time podstiče preživljavanje neurona (Brunet i saradnici, 2001a, Brunet i saradnici, 2001b, Tsuruta i saradnici, 2002). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da aktivacija AKT kinaze u hipotalamusu ostvaruje uticaj na ekspresiju oba ispitivana člana Bcl-2 familije, dok u hipofizi utiče samo na ekspresiju Bcl-2 proteina. U našim eksperimentalnim uslovima, aktivirana AKT kinaza, pored aktiviranog MR-a, dovodi do pomeranje ravnoteže između ispitivanih apoptotskih molekula Bcl-2 familije ka anti-apoptotskom molekulu Bcl-2 i u druge dve ispitivane moždane strukture, s tim da je ta ravnoteža u slučaju hipokampusa izražena na nivou proteina i RNK, dok je kod PFC-a uočena promena samo na nivou proteina.

Aktivacija promotera (Bax, Bcl-xs) i/ili supresora ćelijske smrti (Bcl-2, Bcl-X_L) može uvesti ćelije u krajnju fazu apoptoze, takozvanu fazu egzekucije, za koju je ključna inicijacija složene kaskade kaspaza (Almeida i saradnici, 2000). Unutar familije kaspaza, upravo aktivacija kaspaze 3 predstavlja kritičan korak u pokretanju apoptotskog događaja, koji dovodi do selektivne aktivacije i inaktivacije brojnih supstrata, kao što je PARP. U našoj studiji, nivo prokaspaze 3 u hipofizi i PFC-u nije bio značajno promenjen kod životinja tretiranih DEX-om u odnosu na kontrole, što je, takođe u skladu sa odsustvom apoptoze. U hipotalamusu i hipokampusu je detektovano statistički značajno smanjenje ekspresije ovog proteina. U tim tkivima je 4 h nakon završenog hroničnog tretmana DEX-om uočeno značajno povećanje količine DNK fragmenata koje su odlika apoptoze, dok je *fluoro jade B* bojenje preseka hipokampusa ukazalo na blago povećan broj degenerišućih ćelija (podaci nisu prikazani). S obzirom na uočeno smanjenje ekspresije ovog zimogena u tački 28 h, može se pretpostaviti da se u tački 4 h veći deo prokaspaze 3 prevodi u aktivnu formu, čime se njena koncentracija u ćelijama smanjuje, kao i da se apoptoza odvija na kaspazno-zavisan način. Naši

rezultati su u skladu sa podacima da se kod neonatalnih jedinki ćelije sa aktiviranim kaspazama uočavaju 4 h nakon tretmana DEX-om, da njihov broj dostiže vrhunac nakon 6–8 h, dok nakon 12 h ove ćelije nestaju. Ovome idu u prilog i nalazi Haynes i saradnika (2001) koji ukazuju na već spomenuto prisustvo prolazne reaktivne mikroglijeze u striatumu, hipokampusu i lateralnom septalnom jedru nakon tretmana DEX-om, koja je odgovorna za fagocitozu apoptotskih ćelija. Na osnovu svih ovih rezultata može se prepostaviti da su u našim eksperimentalnim uslovima, 28 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om, ćelije koje su ušle u proces apoptoze uklonjene fagocitozom i da se *de novo* sinteza ispitivanog proteina koji je bio neophodan za fazu egzekucije, nije u potpunosti odvila.

Isecanje prokaspaze 3 predstavlja ključni momenat u njenoj aktivaciji, i zato je imunoblot metodom ispitivan nivo sečene kaspaze 3 u mozgu, kao i nivo citohroma c oslobođenog u citoplazmu. Dakle, ni u jednoj ispitivanoj moždanoj strukturi nisu uočene trake za fragment kaspaze 3, kao ni za citohrom c, što posredno ukazuje na odsustvo apoptoze. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim nalazima da tretman DEX-om ne utiče na ekspresiju aktivne kaspaze 3 u korteksu pacova 24 h nakon tretmana (Menshanov i saradnici, 2012). Ispitujuću efekat iste doze DEX-a u nekoliko sektora hipokampusa kod neonatalnih pacova, Tan i saradnici (2002) nisu detektovali ćelije sa aktiviranom kaspazom 3, što takođe sugerije da ova kaskada nije aktivirana 24 h nakon tretmana DEX-om.

Poznato je da DEX ima sposobnost da spreči apoptozu kod neonatalnih pacova nakon hipoksično-ishemične povrede (Ekert i saradnici, 1997) i da poboljša neurobihevioralne sposobnosti, smanji količinu C-tau proteina u serumu i moždani otok, kao i aktivnost kaspaze 3 kod životinja obolelih od bakterijskog meningitisa (Irazuzta i saradnici, 2005). U *in vitro* uslovima, pre-tretman hepatocita DEX-om dovodi do inhibicije TNF- α -posredovane apoptoze, dok u *in vivo* uslovima nakon povrede jetre DEX sprečava aktivaciju kaspaza 8, 9, 3 i oslobađanje citohroma c iz mitohondrija (Oh i saradnici, 2006). Ovi podaci su u skladu sa našim rezultatima za kaspazu 3 i citohrom c, kao i sa odsustvom apoptoze u svim ispitivanim moždanim strukturama, što implicira da 28 h nakon završenog hroničnog tretmana, DEX može stimulisati puteve preživljavanja nakon različitih vrsta povreda ili oštećenja i da može ispoljiti protektivnu ulogu.

U zadatim eksperimentalnim uslovima, ekspresija celokupnog PARP-a (116 kDa) je ostala nepromenjena u hipotalamusu, hipofizi, hipokampusu i PFC-u. Ekspresija velikog isečenog fragmenta (89 kDa) u hipotalamusu je bila smanjena, dok je u hipofizi, hipokampusu i PFC-u ostala nepromenjena kod životinja tretiranih DEX-om u odnosu na kontrolne. Ovaj rezultat je u skladu sa dobijenim podacima za sečenu kaspazu 3 i citohrom c, kao i sa podacima iz literature da aktivirani AKT može inhibirati fosforilaciju kaspaze 9 na Ser¹⁹⁶ i time doprineti supresiji aktivacije kaspaze 3 (Cardone i saradnici, 1998) i njenih nishodnih proteina.

Aktivni p53 direktno povećava ekspresiju različitih „gena smrti” uključujući pro-apoptotske molekule Bcl-2 familije (Miyashita i Reed, 1995) i time doprinosi pojavi apoptoze. Pokazano je da je p53 neophodan za kontrolu smrti u neuronima simpatičkih ganglija nakon smanjenja količine faktora rasta neurona (engl. *nerve growth factor*, NGF) tako što dovodi do povećane transkripcije Bax proteina (Aloyz i saradnici, 1998). U ovoj tezi je zapaženo smanjenje ekspresije produkta tumor supresor gena p53 u hipotalamusu, hipokampusu i PFC-u, dok je njegova ekspresija u hipofizi bila nepromenjena. Takođe, detektovana promena iRNK za p53 u hipokampusu i PFC-u je u saglasnosti sa uočenim promenama proteinskog sadržaja i odsustvom apoptoze u ovom model sistemu. Naime, RT-PCR analiza je pokazala značajno smanjenje količine iRNK za p53, dok je analiza subćelijske distribucije ukazala na smanjenjeno prisustvo ovog proteina u jedru u obe ispitivane strukture. Međutim, rezultati naše studije ne slažu se sa studijom Almeida i saradnika (2000) koji su uočili značajno povećanje ekspresije p53 proteina, uključujući i fosforilisanih formi kod 3 meseca starih pacova, 4 h nakon završetka hroničnog tretmana DEX-om. Razlika u rezultatima dve studije je najverovatnije posledica toga da su u našim eksperimentima korišćene cele moždane strukture i promene su praćene 28 h nakon tretmana DEX-om.

Treba istaći da su naši rezultati za ekspresiju p53 proteina i njegove iRNK u korelaciji sa podacima da aktivirani AKT reguliše bazalnu količinu p53 proteina i održava je na niskom nivou. Naime, Yamaguchi i saradnici (2001) ističu da AKT podstiče preživljavanje neurona u hipokampusu, inhibirajući aktivnost produkta tumor supresor gena p53. Međutim, tačan mehanizam kojim se inhibira aktivnost p53 proteina je nepoznat, jer ova serin/treonin kinaza ne fosforiliše p53 protein direktno (Yamaguchi i saradnici, 2001). Pretpostavlja se AKT reguliše fosforilaciju proteina Mdm2 koji se

vezuje za p53 i tako inhibira procese regulisane aktivnim p53 molekulom (Brunet i saradnici, 2001a, Brunet i saradnici, 2001b). Takođe, rezultati nekoliko studija ukazuju da AKT pored regulacije aktivnosti samog p53 proteina, može podstaći preživljavanje ćelija, direktno inhibirajući transkripciju gena za Bax (Brunet i saradnici, 2001a, Brunet i saradnici, 2001b), koji je pod direktnom kontrolom p53. Sa druge strane, pored Bax-a, AKT može smanjiti ekspresiju drugih gena koji učestvuju u p53-posredovanoj smrti neurona, na primer pro-apoptotskog člana Bcl-2 familije Noxa (Oda i saradnici, 2000a) i mitohondrijskog proteina p53AIP1 (Oda i saradnici, 2000b).

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitana i ekspresija NFκB molekula. Funkcionalni NFκB kompleksi (većinom p50 i p65) prisutni su u svim ćelijama nervnog sistema, uključujući neurone, astrocite, mikroglijske ćelije i oligodentrocite (Kucharczak i saradnici, 2003). NFκB signalni put može biti aktiviran nizom stimulusa, između ostalog i opioidima, glutamatom, faktorima rasta nervnih ćelija, promenom potencijala membrane. Iako neke studije tvrde da ovaj transkripcioni faktor može imati pro-apoptotsku ulogu, većina ukazuje na njegove citoprotektivne efekte, naročito u neuronima (Kucharczak i saradnici, 2003). Naime, poznato je da aktivirani NF-κB (p65 subjedinica) pokreće ekspresiju brojnih pro-inflamatornih citokina u mikrogliji i astrocitima (O'Neill i Kaltschmidt, 1997, Kulms i Schwarz, 2006), što može imati štetne efekte na preživljavanje neurona. Ali, sa druge strane, u samim neuronima ovaj transkripcioni faktor podstiče ekspresiju anti-apoptotskih gena (Mattson i Camandola, 2001, Poppelmann i saradnici, 2005), čime ispoljava i neuroprotektivnu funkciju.

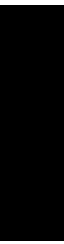
Pokazano je da aktivacija NFκB signalnog puta može smanjiti i neurodegeneraciju, pokretanjem ekspresije mnogih anti-apoptotskih gena, poput IAP-a, koji štiti neurone u eksperimentalnim modelima moždanog udara, MnSOD, koja predstavlja mitohondrijski antioksidativni neuroprotektivni enzim, kao i Bcl-2 i Bcl-x_l (Mattson i Camandola, 2001), koji inhibiraju apoptotske puteve. Međutim, malo je podataka o efektima glukokortikoida na aktivaciju NFκB signalnog puta. Unlap i Jope (1997) su pokazali da jednokratna doza DEX-a od 2 mg/kg kod odraslih mužjaka pacova smanjuje nivo IκBα proteina u hipokampusu i kori velikog mozga (Unlap i Jope, 1995), što je neophodno za njegovu aktivaciju. Takođe, u L929 ćelijama glodara je uočeno da je aktivacija NFκB uključena u DEX-om posredovanu protekciju ćelija od citotoksičnog efekta TNF-α (Mendoza-Milla i saradnici, 2005). U našim eksperimentalnim uslovima, uočene

promene u ekspresiji proteina NF κ B u ukupnim ćelijskim ekstraktima izolovanim iz hipofize, hipotalamusa, hipokampusa i PFC-a, zajedno sa promenama u ekspresiji NF κ B gena u hipokampusu i PFC-u, poklapaju se sa promenama u ekspresiji anti-apoptotskog Bcl-2 proteina i aktivacijom AKT proteina. Naime, poznato je da AKT-om posredovana fosforilacija I κ B uslovljava njegovu disocijaciju sa NF κ B proteina i time obeležava ovaj inhibicioni molekul za razgradnju u proteozomu, nakon čega se slobodni NF κ B molekul premešta u jedro i podstiče ekspresiju anti-apoptotskih gena, poput Bcl-xL, A1 i nekoliko IAP gena (Brunet i saradnici, 2001a, Brunet i saradnici, 2001b), što je u skladu sa našim rezultatima za sve ispitivane meždane strukture.

* * *

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da 28 h nakon završetka hroničnog tretmana niskom dozom DEX-a dolazi do aktivacije divergentnih anti-apoptotskih signalnih puteva, a za sve njih je polazna tačka aktivacija AKT kinaze i MR-a. Aktivacija ova dva anti-apoptotska molekula uzrokuje povećanje ekspresije drugih anti-apoptotskih molekula poput Bcl-2 i NF κ B i smanjenje ekspresije ispitivanih pro-apoptotskih molekula, čime se ćelije generalno štite od apoptoze. Uočene promene mogu biti značajne za procese kognicije, formiranje memorije i učenje, sa obzirom da su sve ispitivane moždane strukture međusobno fiziološki i morfološki povezane. Takođe, zapažene modifikacije u aktivaciji i ekspresiji ispitivanih proteina mogu biti odgovorne i za rezistenciju na apoptozu i ćelijsku protekciju posredovanu DEX-om koje su uočene u mozgu pacijenata tokom i nakon hemo- i radioterapije.

ZAKLJUČCI



Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pružaju mogućnost boljeg razumevanja fizioloških i molekularnih promena u komponentama hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose i limbičkog sistema 28 h nakon završetka hroničnog tretmana malom dozom deksametazona. Uočeni efekti deksametazona su bitni za procese kognicije, formiranja memorije i učenje, sa obzirom da su sve ispitivane moždane strukture međusobno fiziološki i morfološki povezane.

Na osnovu predstavljenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Hronični tretman deksametazonom, pojedinačnim dnevnim dozama od 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dovodi do promena ispitivanih biometrijskih parametara i koncentracije kortikosterona u serumu, što predstavlja potvrdu primenjenog tretmana;
2. Smanjena koncentracija kortikosterona u hipokampusu i prečenoj kori ukazuje na nastanak specifičnog hipokortikoidnog stanja u mozgu, koji se karakteriše aktivacijom MR-a dok je GR neaktivan, što generalno štiti ćelije od apoptoze;
3. Za razliku od drugih ispitivanih moždanih struktura hipofiza se u potpunosti nalazi izvan krvno-moždane barijere i u njoj deksametazon direktno nadoknađuje smanjeni kortikosteron, na osnovu čega se može zaključiti da u ovoj strukturi ne dolazi do pojave hipokortikoidnog stanja. Uočeni kasni efekat deksametazona na nivou ove strukture je povezan sa aktivacijom AKT kinaze i sa povećanjem ekspresije Bcl-2 proteina, ali bez pomeranja ravnoteže između pro- i anti-apoptotskih molekula, što može biti posledica istovremene aktivacije MR-a od strane kortikosterona i deksametazona;
4. Ispitivanje efekata deksametazona u hipotalamusu ukazuje na izraženu osetljivost ove strukture na fluktuacije koncentracije glukokortikoida, kako u serumu tako i u moždanom tkivu, koje su praćene aktivacijom AKT-a, smanjenom ekspresijom pro-apoptotskih molekula p53, prokaspaze 3, PARP i Bax, povećanjem količine anti-apoptotskog proteina Bcl-2, kao i pomeranjem ravnoteže između članova Bcl-2 familije ka anti-apoptotskim molekulima;

5. Hipokortikoidno stanje u hipokampusu u ovom animalnom modelu se karakteriše mogućom pojavom adaptivnog odgovora na apoptozu registrovanu 4 h nakon završetka hroničnog tretmana deksametazonom, koje se ogleda povećanjem ekspresije anti-apoptotskih molekula Bcl-2 i NFκB, smanjenjem ekspresije pro-apoptotskih proteina p53 i prokaspaze 3, odsustvom aktivnosti sečene kaspaze 3, nepromenjenom ekspresijom PARP-a, a za sve navedene promene polaznu tačku predstavlja aktivacija AKT kinaze i MR-a;
6. Promene u ekspresiji i subćelijskoj distribuciji regulatora apoptoze u prečeonj kori pokazuju da hroničan tretman deksametazonom takođe ispoljava anti-apoptotski efekat, ilustrovan aktivacijom AKT kinaze i pomeranjem ravnoteže između članova Bcl-2 familije ka anti-apoptotskim molekulima, sa tim da je na osnovu dobijenih rezultata ova moždana struktura manje osetljiva na fluktuacije koncentracije glukokortikoida u odnosu na hipokampus.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da se molekularni mehanizam dugotrajnog dejstva deksametazona koji je zajednički za sve ispitivane moždane strukture zasniva na aktivaciji AKT kinaze i MR-a. Aktivacija ovih molekula ispoljava anti-apoptotski efekat kroz nishodnu regulaciju ekspresije i/ili aktivacije anti- i pro-apoptotskih molekula. Na osnovu markera apoptoze i preživljavanja analiziranih u ovoj studiji, hipotalamus i hipokampus su moždane strukture izrazito osetljivije na hronični tretman deksametazonom jer u njima dolazi do pojave apoptoze u ranijoj vremenskoj tački, dok se kasnije aktiviraju anti-apoptotski mehanizmi. Takođe, za hipotalamus, hipokampus i prečeonu koru je karakteristično pomeranje ravnoteže između pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije ka anti-apoptotskim molekulima, dok u hipofizi ne dolazi do takve promene, što ukazuje na tkivno-specifičnu regulaciju molekula smrti i preživljavanja.

Na osnovu navedenog može se zaključiti da aktivacija AKT kinaze, koja vodi favorizovanju anti-apoptotskog molekula Bcl-2 i smanjenju ekspresije ispitivanih pro-apoptotskih molekula, može biti ključni događaj u protekciji ćelija nakon tretmana

deksametazonom, kao i za pojavu deksametazonom posredovane rezistencije na apoptozu koje su uočene u mozgu pacijenata tokom i nakon hemo- i radioterapije.

Dodatna istraživanja delovanja deksametazona unutar mozga mogla bi omogućiti razvoj novih terapijskih strategija za manipulaciju odgovora specifičnih ćelija uključenih u ćelijsku protekciju i rezistenciju na apoptozu koje se javljaju kod pacijenata obolelih od tumora mozga.

LITERATURA



- Abraham, I. M., Harkany, T., Horvath, K. M. i Luiten, P. G. (2001) Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? *J Neuroendocrinol* **9**, 749-60
- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojicic, M. i Krstic-Demonacos, M. (2009) Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol* **1**, 87-97
- Ahima, R., Krozowski, Z. i Harlan, R. (1991) Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol* **3**, 522-38
- Ahima, R. S. i Harlan, R. E. (1990) Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* **3**, 579-604
- Almeida, O. F., Conde, G. L., Crochemore, C., Demeneix, B. A., Fischer, D., Hassan, A. H., Meyer, M., Holsboer, F. i Michaelidis, T. M. (2000) Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* **5**, 779-90
- Aloyz, R. S., Bamji, S. X., Pozniak, C. D., Toma, J. G., Atwal, J., Kaplan, D. R. i Miller, F. D. (1998) p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol* **6**, 1691-703
- Arbel, I., Kadar, T., Silbermann, M. i Levy, A. (1994) The effects of long-term corticosterone administration on hippocampal morphology and cognitive performance of middle-aged rats. *Brain Res* **1-2**, 227-35
- Bagchi, D., Carryl, O. R., Tran, M. X., Bagchi, M., Garg, A., Milnes, M. M., Williams, C. B., Balmoori, J., Bagchi, D. J., Mitra, S. i Stohs, S. J. (1999) Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Mol Cell Biochem* **1-2**, 109-16
- Baliga, B. i Kumar, S. (2003) Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death Differ* **1**, 16-8
- Bamberger, C. M., Schulte, H. M. i Chrousos, G. P. (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* **3**, 245-61
- Bayer, S. A. (1980) Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* **1**, 87-114
- Beato, M. i Klug, J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* **3**, 225-36
- Beato, M. i Sanchez-Pacheco, A. (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* **6**, 587-609
- Bellacosa, A., Franke, T. F., Gonzalez-Portal, M. E., Datta, K., Taguchi, T., Gardner, J., Cheng, J. Q., Testa, J. R. i Tsichlis, P. N. (1993) Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* **3**, 745-54
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. i Tsichlis, P. N. (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **5029**, 274-7
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R. i Weissberg, P. (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **5387**, 290-3

- Birmingham, M. K., Sar, M. i Stumpf, W. E. (1993) Dexamethasone target sites in the central nervous system and their potential relevance to mental illness. *Cell Mol Neurobiol* **4**, 373-86
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R. i Salvesen, G. S. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **2**, 529-41
- Boatright, K. M. i Salvesen, G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 725-31
- Brandoli, C., Shi, B., Pflug, B., Andrews, P., Wrathall, J. R. i Mocchetti, I. (2001) Dexamethasone reduces the expression of p75 neurotrophin receptor and apoptosis in contused spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res* **1**, 61-70
- Brunet, A., Datta, S. R. i Greenberg, M. E. (2001a) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* **3**, 297-305
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A. i Greenberg, M. E. (2001b) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* **3**, 952-65
- Calogero, A. E., Kamilaris, T. C., Johnson, E. O., Tartaglia, M. E. i Chrousos, G. (1990) Recovery of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis after discontinuation of prolonged treatment with the synthetic glucocorticoid agonist dexamethasone. *Endocrinology* **4**, 1574-9
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. i Reed, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **5392**, 1318-21
- Carroll, Curtis, G. C. i Mendels, J. (1976) Neuroendocrine regulation in depression. I. Limbic system-adrenocortical dysfunction. *Arch Gen Psychiatry* **9**, 1039-44
- Carvalho, L. A. i Pariante, C. M. (2008) In vitro modulation of the glucocorticoid receptor by antidepressants. *Stress* **6**, 411-24
- Casciola-Rosen, L., Nicholson, D. W., Chong, T., Rowan, K. R., Thornberry, N. A., Miller, D. K. i Rosen, A. (1996) Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* **5**, 1957-64
- Cerqueira, J. J., Pego, J. M., Taipa, R., Bessa, J. M., Almeida, O. F. i Sousa, N. (2005) Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci* **34**, 7792-800
- Chan, G. C., Hess, P., Meenakshi, T., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A. i Payvar, F. (1991) Delayed secondary glucocorticoid response elements. Unusual nucleotide motifs specify glucocorticoid receptor binding to transcribed regions of alpha 2u-globulin DNA. *J Biol Chem* **33**, 22634-44
- Chao, H. M., Choo, P. H. i McEwen, B. S. (1989) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain. *Neuroendocrinology* **4**, 365-71
- Chmielewski, V., Drupt, F. i Morfin, R. (2000) Dexamethasone-induced apoptosis of mouse thymocytes: prevention by native 7alpha-hydroxysteroids. *Immunol Cell Biol* **3**, 238-46
- Cintra, A., Bhatnagar, M., Chadi, G., Tinner, B., Lindberg, J., Gustafsson, J. A., Agnati, L. F. i Fuxe, K. (1994) Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell

populations in developing, adult, and aging brain. *Ann N Y Acad Sci* 42-61; discussion 61-3

- Cole, M. A., Kim, P. J., Kalman, B. A. i Spencer, R. L. (2000) Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. *Psychoneuroendocrinology* **2**, 151-67
- Compton, M. M. i Cidlowski, J. A. (1986) Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* **1**, 38-45
- Cook, S. C. i Wellman, C. L. (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* **2**, 236-48
- Corcoran, G. B., Fix, L., Jones, D. P., Moslen, M. T., Nicotera, P., Oberhammer, F. A. i Buttyan, R. (1994) Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **2**, 169-81
- Crochemore, C., Lu, J., Wu, Y., Liposits, Z., Sousa, N., Holsboer, F. i Almeida, O. F. (2005) Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Mol Psychiatry* **8**, 790-8
- Cullinan, W. E., Herman, J. P., Battaglia, D. F., Akil, H. i Watson, S. J. (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* **2**, 477-505
- Darzynkiewicz, Z. i Traganos, F. (1998) Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 33-73
- Datta, S. R., Brunet, A. i Greenberg, M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **22**, 2905-27
- de Kloet, E. R. (2000) Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* **1-3**, 187-98
- de Kloet, E. R., Joels, M. i Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* **6**, 463-75
- de Kloet, E. R., Reul, J. M. i Sutanto, W. (1990) Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* **3**, 387-94
- de Kloet, E. R., van der Vies, J. i de Wied, D. (1974) The site of the suppressive action of dexamethasone on pituitary-adrenal activity. *Endocrinology* **1**, 61-73
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S. i Joels, M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* **3**, 269-301
- De Kloet, R., Wallach, G. i McEwen, B. S. (1975) Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* **3**, 598-609
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C. i Tasker, J. G. (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* **12**, 4850-7
- Donovan, M. i Cotter, T. G. (2004) Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* **2-3**, 133-47
- Drevets, W. C. (2000) Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry* **8**, 813-29
- Du, J., McEwen, B. i Manji, H. K. (2009a) Glucocorticoid receptors modulate mitochondrial function: A novel mechanism for neuroprotection. *Commun Integr Biol* **4**, 350-2
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B. S. i Manji, H. K. (2009b) Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9**, 3543-8

- Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. i Greenberg, M. E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* **5300**, 661-5
- Dunn, J. D. i Orr, S. E. (1984) Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp Brain Res* **1**, 1-6
- Eberhardt, W., Schulze, M., Engels, C., Klasmeier, E. i Pfeilschifter, J. (2002) Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors. *Mol Endocrinol* **8**, 1752-66
- Eichenbaum, H. (2000) Hippocampus: mapping or memory? *Curr Biol* **21**, R785-7
- Ekert, P., MacLusky, N., Luo, X. P., Lehotay, D. C., Smith, B., Post, M. i Tanswell, A. K. (1997) Dexamethasone prevents apoptosis in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) by a reactive oxygen species-independent mechanism. *Brain Res* **1**, 9-17
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **4**, 495-516
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. i Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **6662**, 43-50
- Evans-Storms, R. B. i Cidlowski, J. A. (2000) Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor-kappaB. *Endocrinology* **5**, 1854-62
- Evans, R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **4854**, 889-95
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. i Henson, P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **7**, 2207-16
- Feldman, S., Conforti, N. i Chowers, I. (1973) Effect of dexamethasone on adrenocortical responses in intact and hypothalamic deafferented rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* **4**, 660-4
- Feldman, S., Siegel, R. A., Weidenfeld, J., Conforti, N. i Melamed, E. (1983) Role of medial forebrain bundle catecholaminergic fibers in the modulation of glucocorticoid negative feedback effects. *Brain Res* **2**, 297-300
- Feldman, S. i Weidenfeld, J. (1991) Depletion of hypothalamic norepinephrine and serotonin enhances the dexamethasone negative feedback effect on adrenocortical secretion. *Psychoneuroendocrinology* **5**, 397-405
- Feldman, S. i Weidenfeld, J. (1993) The dorsal hippocampus modifies the negative feedback effect of glucocorticoids on the adrenocortical and median eminence CRF-41 responses to photic stimulation. *Brain Res* **1-2**, 227-32
- Fietta, P. (2007) Glucocorticoids and brain functions. *Riv Biol* **3**, 403-18
- Figueiredo, H. F., Bodie, B. L., Tauchi, M., Dolgas, C. M. i Herman, J. P. (2003a) Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* **12**, 5249-58

- Figueiredo, H. F., Bruestle, A., Bodie, B., Dolgas, C. M. i Herman, J. P. (2003b) The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci* **8**, 2357-64
- Filipkowski, R. K., Hetman, M., Kaminska, B. i Kaczmarek, L. (1994) DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport* **12**, 1538-40
- Franco-Colin, M., Villanueva, I., Pinon, M. i Racotta, R. (2006) The effects of sympathectomy and dexamethasone in rats ingesting sucrose. *Int J Biol Sci* **1**, 17-22
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. i Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **2**, 193-204
- Gabbott, P. L., Warner, T. A., Jays, P. R., Salway, P. i Busby, S. J. (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* **2**, 145-77
- Ghosh, S. i Hayden, M. S. (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 837-48
- Ghosh, S., May, M. J. i Kopp, E. B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **225-60**
- Gillardon, F., Baurle, J., Wickert, H., Grusser-Cornehls, U. i Zimmermann, M. (1995) Differential regulation of bcl-2, bax, c-fos, junB, and krox-24 expression in the cerebellum of Purkinje cell degeneration mutant mice. *J Neurosci Res* **5**, 708-15
- Gohel, A., McCarthy, M. B. i Gronowicz, G. (1999) Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology* **11**, 5339-47
- Gold, R., Buttgereit, F. i Toyka, K. V. (2001) Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* **1-2**, 1-8
- Gould, E., Woolley, C. S., Cameron, H. A., Daniels, D. C. i McEwen, B. S. (1991) Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *J Comp Neurol* **3**, 486-93
- Gould, E., Woolley, C. S. i McEwen, B. S. (1990) Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. *Neuroscience* **2**, 367-75
- Green, D. R. i Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **5381**, 1309-12
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R. i Joels, M. (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol* **2**, 299-309
- Grossmann, C., Scholz, T., Rochel, M., Bumke-Vogt, C., Oelkers, W., Pfeiffer, A. F., Diederich, S. i Bahr, V. (2004) Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur J Endocrinol* **3**, 397-406
- Hacker, G. (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **1**, 5-17
- Haller, T., Dietl, P., Stockner, H., Frick, M., Mair, N., Tinhofer, I., Ritsch, A., Enhorning, G. i Putz, G. (2004) Tracing surfactant transformation from cellular release to insertion into an air-liquid interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **5**, L1009-15
- Hassan, A. H., von Rosenstiel, P., Patchev, V. K., Holsboer, F. i Almeida, O. F. (1996) Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol* **1**, 43-52

- Haynes, L. E., Griffiths, M. R., Hyde, R. E., Barber, D. J. i Mitchell, I. J. (2001) Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience* **1**, 57-69
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. i Cato, A. C. (1994) A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* **17**, 4087-95
- Heidbreder, C. A. i Groenewegen, H. J. (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* **6**, 555-79
- Heljic, M. i Brazil, D. P. (2011) Protein kinase B/Akt regulation in diabetic kidney disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 98-104
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K. i Figueiredo, H. (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **8**, 1201-13
- Herman, J. P., Watson, S. J., Chao, H. M., Coirini, H. i McEwen, B. S. (1993) Diurnal Regulation of Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor mRNAs in Rat Hippocampus. *Mol Cell Neurosci* **2**, 181-90
- Herr, I., Gassler, N., Friess, H. i Buchler, M. W. (2007) Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* **2**, 271-91
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G. i Youle, R. J. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **8**, 3668-72
- Hutchison, K. A., Scherrer, L. C., Czar, M. J., Ning, Y., Sanchez, E. R., Leach, K. L., Deibel, M. R., Jr. i Pratt, W. B. (1993a) FK506 binding to the 56-kilodalton immunophilin (Hsp56) in the glucocorticoid receptor heterocomplex has no effect on receptor folding or function. *Biochemistry* **15**, 3953-7
- Hutchison, K. A., Scherrer, L. C., Czar, M. J., Stancato, L. F., Chow, Y. H., Jove, R. i Pratt, W. B. (1993b) Regulation of glucocorticoid receptor function through assembly of a receptor-heat shock protein complex. *Ann N Y Acad Sci* 35-48
- Irazuzta, J., Pretzlaff, R. K., DeCourten-Myers, G., Zemlan, F. i Zingarelli, B. (2005) Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med* **1**, 146-50
- Ismaili, N. i Garabedian, M. J. (2004) Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 86-101
- Israels, L. G. i Israels, E. D. (1999) Apoptosis. *Stem Cells* **5**, 306-13
- Joels, M. i de Kloet, E. R. (1994) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* **1**, 1-36
- Joels, M., Heslen, W., Karst, H. i de Kloet, E. R. (1994) Steroids and electrical activity in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* **4-6**, 391-8
- Karssen, A. M., Meijer, O. C., Berry, A., Sanjuan Pinol, R. i de Kloet, E. R. (2005) Low doses of dexamethasone can produce a hypocorticosteroid state in the brain. *Endocrinology* **12**, 5587-95
- Karst, H., Berger, S., Turiault, M., Tronche, F., Schutz, G. i Joels, M. (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**, 19204-7

- Kaur, N., Sharma, N. i Gupta, A. K. (1989) Effects of dexamethasone on lipid metabolism in rat organs. *Indian J Biochem Biophys* **6**, 371-6
- Keller-Wood, M. E. i Dallman, M. F. (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* **1**, 1-24
- Kerr, D. S., Campbell, L. W., Thibault, O. i Landfield, P. W. (1992) Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca²⁺ conductances: relevance to brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **18**, 8527-31
- Kohler, C., Orrenius, S. i Zhivotovsky, B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* **1-2**, 97-110
- Kolber, B. J., Wieczorek, L. i Muglia, L. J. (2008) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function. *Stress* **5**, 321-38
- Korsmeyer, S. J. (1999) Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lect* 21-41
- Krammer, P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **6805**, 789-95
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y. i Gelinas, C. (2003) To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* **56**, 8961-82
- Kulik, G. i Weber, M. J. (1998) Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* **11**, 6711-8
- Kulms, D. i Schwarz, T. (2006) NF-kappaB and cytokines. *Vitam Horm* 283-300
- Kuwana, T. i Newmeyer, D. D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 691-9
- Labeur, M. i Holsboer, F. (2010) Molecular mechanisms of glucocorticoid receptor signaling. *Medicina (B Aires)* **5**, 457-62
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **5259**, 680-5
- Lakshmi, V., Sakai, R. R., McEwen, B. S. i Monder, C. (1991) Regional distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain. *Endocrinology* **4**, 1741-8
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X. i Vandenabeele, P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **4**, 358-61
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. i Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **6495**, 346-7
- Limbourg, F. P., Huang, Z., Plumier, J. C., Simoncini, T., Fujioka, M., Tuckermann, J., Schutz, G., Moskowitz, M. A. i Liao, J. K. (2002) Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J Clin Invest* **11**, 1729-38
- Limbourg, F. P. i Liao, J. K. (2003) Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J Mol Med (Berl)* **3**, 168-74
- Liu, Y., Kamitakahara, A., Kim, A. J. i Aguilera, G. (2008) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element binding protein phosphorylation is required but not sufficient for activation of corticotropin-releasing hormone transcription. *Endocrinology* **7**, 3512-20

- Lowy, M. T., Gault, L. i Yamamoto, B. K. (1993) Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem* **5**, 1957-60
- Lupien, S. J. i McEwen, B. S. (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev* **1**, 1-27
- Lupien, S. J., Wilkinson, C. W., Briere, S., Menard, C., Ng Ying Kin, N. M. i Nair, N. P. (2002) The modulatory effects of corticosteroids on cognition: studies in young human populations. *Psychoneuroendocrinology* **3**, 401-16
- MacGibbon, G. A., Lawlor, P. A., Sirimanne, E. S., Walton, M. R., Connor, B., Young, D., Williams, C., Gluckman, P., Faull, R. L., Hughes, P. i Dragunow, M. (1997) Bax expression in mammalian neurons undergoing apoptosis, and in Alzheimer's disease hippocampus. *Brain Res* **1-2**, 223-34
- Malkoski, S. P. i Dorin, R. I. (1999) Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* **10**, 1629-44
- Marchenko, N. D., Zaika, A. i Moll, U. M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **21**, 16202-12
- Marsden, V. S., Ekert, P. G., Van Delft, M., Vaux, D. L., Adams, J. M. i Strasser, A. (2004) Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol* **6**, 775-80
- Marsden, V. S. i Strasser, A. (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 71-105
- Mattson, M. P. i Camandola, S. (2001) NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* **3**, 247-54
- May, P. i May, E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **53**, 7621-36
- McEwen, B. S. (1999) Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 105-22
- McEwen, B. S. (2008) Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism* S11-5
- McEwen, B. S., De Kloet, E. R. i Rostene, W. (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* **4**, 1121-88
- McEwen, B. S. i Stellar, E. (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* **18**, 2093-101
- McIntosh, L. J. i Sapolsky, R. M. (1996) Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology* **3-4**, 873-82
- Meffert, M. K. i Baltimore, D. (2005) Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* **1**, 37-43
- Meijer, O. C., de Lange, E. C., Breimer, D. D., de Boer, A. G., Workel, J. O. i de Kloet, E. R. (1998) Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* **4**, 1789-93
- Mendoza-Milla, C., Machuca Rodriguez, C., Cordova Alarcon, E., Estrada Bernal, A., Toledo-Cuevas, E. M., Martinez Martinez, E. i Zentella Dehesa, A. (2005) NF-kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett* **18**, 3947-52

- Menshanov, P. N., Muzyka, V. V. i Dygalo, N. N. (2012) Effects of dexamethasone on the development of neonatal rats and level of active caspase-3 in brain cortex. *Bull Exp Biol Med* **4**, 478-80
- Merino, J. J., Cordero, M. I. i Sandi, C. (2000) Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *Eur J Neurosci* **9**, 3283-90
- Michel, C. i Cabanac, M. (1999) Effects of dexamethasone on the body weight set point of rats. *Physiol Behav* **1-2**, 145-50
- Milanovic, D., Popic, J., Pesic, V., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Kanazir, S., Jevtovic-Todorovic, V. i Ruzdijic, S. (2010) Regional and temporal profiles of calpain and caspase-3 activities in postnatal rat brain following repeated propofol administration. *Dev Neurosci* **4**, 288-301
- Miller, A. H., Spencer, R. L., Pulera, M., Kang, S., McEwen, B. S. i Stein, M. (1992) Adrenal steroid receptor activation in rat brain and pituitary following dexamethasone: implications for the dexamethasone suppression test. *Biol Psychiatry* **10**, 850-69
- Miller, D. K. (1999) Activation of apoptosis and its inhibition. *Ann N Y Acad Sci* 132-57
- Minshall, C., Arkins, S., Freund, G. G. i Kelley, K. W. (1996) Requirement for phosphatidylinositol 3'-kinase to protect hemopoietic progenitors against apoptosis depends upon the extracellular survival factor. *J Immunol* **3**, 939-47
- Miyashita, T., Nagao, K., Krajewski, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., Inoue, T. i Yamada, M. (1998) Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ* **12**, 1034-41
- Miyashita, T. i Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **2**, 293-9
- Moisan, M. P., Seckl, J. R., Brett, L. P., Monder, C., Agarwal, A. K., White, P. C. i Edwards, C. R. (1990) 11Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Messenger Ribonucleic Acid Expression, Bioactivity and Immunoreactivity in Rat Cerebellum. *J Neuroendocrinol* **6**, 853-8
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K. i Kawata, M. (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res* **3**, 235-69
- Morita, K., Ishimura, K., Tsuruo, Y. i Wong, D. L. (1999) Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. *Brain Res* **2**, 309-16
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N. i O'Keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **5868**, 681-3
- Munck, A., Guyre, P. M. i Holbrook, N. J. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* **1**, 25-44
- Munier, M., Law, F., Meduri, G., Le Menuet, D. i Lombes, M. (2012) Mineralocorticoid receptor overexpression facilitates differentiation and promotes survival of embryonic stem cell-derived neurons. *Endocrinology* **3**, 1330-40
- Nahaczewski, A. E., Fowler, S. B. i Hariharan, S. (2004) Dexamethasone therapy in patients with brain tumors--a focus on tapering. *J Neurosci Nurs* **6**, 340-3

- Neafsey, E. J., Hurley-Gius, K. M. i Arvanitis, D. (1986) The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus. *Brain Res* **2**, 261-70
- Noguchi, K. K., Walls, K. C., Wozniak, D. F., Olney, J. W., Roth, K. A. i Farber, N. B. (2008) Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death Differ* **10**, 1582-92
- Numakawa, T., Adachi, N., Richards, M., Chiba, S. i Kunug, H. (2012) The influence of glucocorticoids on neuronal survival and synaptic function. *Biomolecular Concepts* 495–504
- O'Neill, L. A. i Kaltschmidt, C. (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* **6**, 252-8
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. i Tanaka, N. (2000a) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **5468**, 1053-8
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. i Taya, Y. (2000b) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **6**, 849-62
- Oh, H. Y., Namkoong, S., Lee, S. J., Por, E., Kim, C. K., Billiar, T. R., Han, J. A., Ha, K. S., Chung, H. T., Kwon, Y. G., Lee, H. i Kim, Y. M. (2006) Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by upregulation of cFLIP. *Cell Death Differ* **3**, 512-23
- Oitzl, M. S., de Kloet, E. R., Joels, M., Schmid, W. i Cole, T. J. (1997) Spatial learning deficits in mice with a targeted glucocorticoid receptor gene disruption. *Eur J Neurosci* **11**, 2284-96
- Oltvai, Z. N. i Korsmeyer, S. J. (1994) Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **2**, 189-92
- Orti, E., Bodwell, J. E. i Munck, A. (1992) Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* **1**, 105-28
- Pariante, C. M. (2006) The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? *J Psychopharmacol* **4 Suppl**, 79-84
- Patel, P. D., Lopez, J. F., Lyons, D. M., Burke, S., Wallace, M. i Schatzberg, A. F. (2000) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res* **6**, 383-92
- Planey, S. L., Derfoul, A., Steplewski, A., Robertson, N. M. i Litwack, G. (2002) Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis in 697 pre-B lymphocytes by the mineralocorticoid receptor N-terminal domain. *J Biol Chem* **44**, 42188-96
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S. i Sanacora, G. (2012) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* **1**, 22-37
- Poppelmann, B., Klimmek, K., Strozyk, E., Voss, R., Schwarz, T. i Kulms, D. (2005) NF{kappa}B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis. *J Biol Chem* **16**, 15635-43
- Pratt, W. B. (1997) The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 297-326

- Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Morishima, Y. i Murphy, P. J. (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 41-58
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Janssen, W. G., Hof, P. R., McEwen, B. S. i Morrison, J. H. (2005) Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol* 1, 199-203
- Radley, J. J., Sisti, H. M., Hao, J., Rocher, A. B., McCall, T., Hof, P. R., McEwen, B. S. i Morrison, J. H. (2004) Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 1, 1-6
- Ray, A. i Prefontaine, K. E. (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2, 752-6
- Reagan, L. P. i McEwen, B. S. (1997) Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat* 3, 149-67
- Reed, J. C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 5, 1415-30
- Reul, J. M. i de Kloet, E. R. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 6, 2505-11
- Reul, J. M., Gesing, A., Droste, S., Stec, I. S., Weber, A., Bachmann, C., Bilanz-Bleuel, A., Holsboer, F. i Linthorst, A. C. (2000) The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* 1-3, 235-49
- Reul, J. M., Sutanto, W., van Eekelen, J. A., Rothuizen, J. i de Kloet, E. R. (1990) Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. *Adv Exp Med Biol* 243-56
- Reul, J. M., van den Bosch, F. R. i de Kloet, E. R. (1987a) Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 5, 407-12
- Reul, J. M., van den Bosch, F. R. i de Kloet, E. R. (1987b) Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J Endocrinol* 3, 459-67
- Riccardi, C., Cifone, M. G. i Migliorati, G. (1999) Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GTR and GILZ, two dexamethasone-induced genes. *Cell Death Differ* 12, 1182-9
- Robson, A. C., Leckie, C. M., Seckl, J. R. i Holmes, M. C. (1998) 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1-2, 1-10
- Rogatsky, I., Hittelman, A. B., Pearce, D. i Garabedian, M. J. (1999) Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 7, 5036-49
- Roland, B. L., Krozowski, Z. S. i Funder, J. W. (1995) Glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptors, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 expression in rat brain and kidney: in situ studies. *Mol Cell Endocrinol* 1, R1-7
- Roy, M. i Sapolsky, R. M. (2003a) The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology* 1, 24-31
- Roy, M. i Sapolsky, R. M. (2003b) The neuroprotective effects of virally-derived caspase inhibitors p35 and crmA following a necrotic insult. *Neurobiol Dis* 1, 1-9
- Roy, S., Bayly, C. I., Gareau, Y., Houtzager, V. M., Kargman, S., Keen, S. L., Rowland, K., Seiden, I. M., Thornberry, N. A. i Nicholson, D. W. (2001) Maintenance of caspase-3

proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **11**, 6132-7

- Rubin, M. M. i Changeux, J. P. (1966) On the nature of allosteric transitions: implications of non-exclusive ligand binding. *J Mol Biol* **2**, 265-74
- Rupprecht, R., Arriza, J. L., Spengler, D., Reul, J. M., Evans, R. M., Holsboer, F. i Damm, K. (1993) Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* **4**, 597-603
- Rutz, H. P. i Herr, I. (2004) Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. *Cancer Biol Ther* **8**, 715-8
- Samtani, M. N. i Jusko, W. J. (2005) Stability of dexamethasone sodium phosphate in rat plasma. *Int J Pharm* **1-2**, 262-6
- Sapolsky, R. M. (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* **6**, 721-32
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C. i McEwen, B. S. (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* **3**, 284-301
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M. i Munck, A. U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* **1**, 55-89
- Sasson, R., Tajima, K. i Amsterdam, A. (2001) Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology* **2**, 802-11
- Satoh, M. S. i Lindahl, T. (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **6367**, 356-8
- Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D. K., Thornberry, N. A., Yamin, T. T. i Nicholson, D. W. (1996) CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **4**, 1841-4
- Schlossmacher, G., Stevens, A. i White, A. (2011) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol* **1**, 17-25
- Seckl, J. R. (1997) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol* **1**, 49-99
- Singleton, J. R., Baker, B. L. i Thorburn, A. (2000) Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis. *Endocrinology* **8**, 2945-50
- Sloviter, R. S., Dean, E. i Neubort, S. (1993a) Electron microscopic analysis of adrenalectomy-induced hippocampal granule cell degeneration in the rat: apoptosis in the adult central nervous system. *J Comp Neurol* **3**, 337-51
- Sloviter, R. S., Sollas, A. L., Dean, E. i Neubort, S. (1993b) Adrenalectomy-induced granule cell degeneration in the rat hippocampal dentate gyrus: characterization of an in vivo model of controlled neuronal death. *J Comp Neurol* **3**, 324-36
- Sousa, A. R., Lane, S. J., Cidlowski, J. A., Staynov, D. Z. i 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* **5**, 943-50
- Spencer, R. L., Kalman, B. A., Cotter, C. S. i Deak, T. (2000) Discrimination between changes in glucocorticoid receptor expression and activation in rat brain using western blot analysis. *Brain Res* **2**, 275-86

- Spencer, R. L., Young, E. A., Choo, P. H. i McEwen, B. S. (1990) Adrenal steroid type I and type II receptor binding: estimates of in vivo receptor number, occupancy, and activation with varying level of steroid. *Brain Res* **1**, 37-48
- Takahashi, A., Musy, P. Y., Martins, L. M., Poirier, G. G., Moyer, R. W. i Earnshaw, W. C. (1996) CrmA/SPI-2 inhibition of an endogenous ICE-related protease responsible for lamin A cleavage and apoptotic nuclear fragmentation. *J Biol Chem* **51**, 32487-90
- Tan, C. K., Yan, J., Ananth, C. i Kaur, C. (2002) Dexamethasone induces dendritic alteration but not apoptosis in the neurons of the hippocampus in postnatal rats. *Neurosci Lett* **3**, 206-10
- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S. i Dixit, V. M. (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **5**, 801-9
- Tsigos, C. i Chrousos, G. P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **4**, 865-71
- Tsuruta, F., Masuyama, N. i Gotoh, Y. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* **16**, 14040-7
- Unlap, T. i Jope, R. S. (1995) Inhibition of NFkB DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain. *Neurosci Lett* **1**, 41-4
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. i Rivier, J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* **4514**, 1394-7
- Van Eekelen, J. A., Jiang, W., De Kloet, E. R. i Bohn, M. C. (1988) Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J Neurosci Res* **1**, 88-94
- Varfolomeev, E. E. i Ashkenazi, A. (2004) Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **4**, 491-7
- Walczak, H. i Sprick, M. R. (2001) Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem Sci* **7**, 452-3
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **22**, 2922-33
- Warembourg, M. (1975) Radioautographic study of the rat brain and pituitary after injection of 3H dexamethasone. *Cell Tissue Res* **2**, 183-91
- Webster, G. A. i Perkins, N. D. (1999) Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* **5**, 3485-95
- Weissman, D. E., Janjan, N. A., Erickson, B., Wilson, F. J., Greenberg, M., Ritch, P. S., Anderson, T., Hansen, R. M., Chitambar, C. R., Lawton, C. A. i et al. (1991) Twice-daily tapering dexamethasone treatment during cranial radiation for newly diagnosed brain metastases. *J Neurooncol* **3**, 235-9
- Wellman, C. L. (2001) Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* **3**, 245-53
- Woolley, C. S., Gould, E. i McEwen, B. S. (1990) Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* **1-2**, 225-31
- Wren, A. M., Small, C. J., Abbott, C. R., Jethwa, P. H., Kennedy, A. R., Murphy, K. G., Stanley, S. A., Zollner, A. N., Ghatei, M. A. i Bloom, S. R. (2002) Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology* **11**, 4227-34

- Wyllie, A. H. (1986) What is apoptosis? *Histopathology* **9**, 995-8
- Yamaguchi, A., Tamatani, M., Matsuzaki, H., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M. P., Mitsuda, N. i Tohyama, M. (2001) Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem* **7**, 5256-64
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. i Ashwell, J. D. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **5467**, 874-7
- Yazawa, H., Sasagawa, I., Ishigooka, M. i Nakada, T. (1999) Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Hum Reprod* **7**, 1806-10
- Young, A. H. (2004) Cortisol in mood disorders. *Stress* **4**, 205-8
- Zhang, C., Beckermann, B., Kallifatidis, G., Liu, Z., Rittgen, W., Edler, L., Buchler, P., Debatin, K. M., Buchler, M. W., Friess, H. i Herr, I. (2006) Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncol* **5**, 1295-301
- Ziegler, U. i Groscurth, P. (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 124-8
- Zlender, V. (2003) [Apoptosis--programmed cell death]. *Arh Hig Rada Toksikol* **4**, 267-74
- Zuloaga, D. G., Carbone, D. L., Quihuis, A., Hiroi, R., Chong, D. L. i Handa, R. J. (2012) Perinatal dexamethasone-induced alterations in apoptosis within the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus are influenced by age and sex. *J Neurosci Res* **7**, 1403-12

BIOGRAFIJA



Dunja Drakulić je rođena 23.04.1979. godine u Beogradu. Zemunsku I gimnaziju je završila 1998. i iste godine upisala Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, odsek Primenjena genetika. Diplomski rad sa temom „**Efekat jonizujućeg zračenja na hidrolizu vanćelijskih adeninskih nukleotida u mozgu ženki pacova u različitim fazama postnatalnog razvića**” je uradila pod rukovodstvom dr Anice Horvat, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 29.11.2007. sa srednjom ocenom 8.52 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Doktorske studije na Katedri za Neuronauke, smer Neurobiologija sa neuroimunologijom, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, je upisala školske 2007/2008. godine. Od 01.07.2008. godine je zaposlena kao istraživač-pripravnik na projektu „**Signalni putevi delovanja steroidnih hormona i uticaj endogenih i egzogenih faktora na modulaciju procesa u ćelijama sisara**”, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u periodu 2006-2010. godine (143044B), pod rukovodstvom dr Anice Horvat, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu.

Tokom 2010. i 2011. godine je bila uključena na međunarodne projekte ETT i OTKA, PI: prof Ferenc Bari i TAMOP 4.2.2-08/01-2008-0000 i ETT i OTKA, PI: prof Ferenc Bari i TAMOP 4.2.2-08/01-2008-0002.

Od 2011. do danas je zaposlena kao istraživač-saradnik na projektima: „**Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara**”, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (173044), pod rukovodstvom dr Anice Horvat, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu. Takođe, kao istraživač-saradnik je uključena na projekat „**Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju**”, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (41014), pod rukovodstvom prof dr Mirjane Stojiljković, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu, naučnog savetnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

Autor je jednog i koautor jedanaest radova u međunarodnim časopisima, kao i brojnih međunarodnih i domaćih kongresnih saopštenja štampanih u celini i izvodu.

PRILOZI



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Дуња Р. Дракулић

број индекса КА070101

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**Модулација апоптотских сигналних путева у ћелијама мозга одраслих
пацова након хроничног третмана дексаметазоном**

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2013.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Дуња Р. Дракулић

Број индекса КА070101

Студијски програм Неуробиологија са неуроимунологијом

Наслов рада Модулација апоптотских сигналних путева у ћелијама мозга
одраслих пацова након хроничног третмана дексаметазоном

Ментор др Аница Хорват и др Надежда Недељковић

Потписани/а Дуња Р. Дракулић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2013.

Аница Хорват

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

**Модулација апоптотских сигналних путева у ћелијама мозга одраслих
пацова након хроничног третмана дексаметазоном**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2013.



1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате 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. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.