

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Dušanka D. Stanić

**UTICAJ OKSITOCINA NA AKTIVNOST  
OSOVINE HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-  
NADBUBREG I PONAŠNJE PACOVA**

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Dušanka D. Stanić

**EFFECTS OF OXYTOCIN ON THE  
HYPOTHALAMIC-PITUITARY-  
ADRENAL AXIS ACTIVITY AND  
BEHAVIOR OF RATS**

**Doctoral Dissertation**

Belgrade, 2017

**Članovi komisije:**

---

Dr Vesna Pešić, mentor  
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Bosiljka Plećaš – Solarović  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, farmaceutski fakultet

---

Dr David Gurwitz  
professor, Tel-Aviv University, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv, Israel

Kandidat:

Dušanka Stanić

Farmaceutski fakultet

Univerzitet u Beogradu

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

**"IT IS NOT STRESS THAT KILLS US; IT IS OUR REACTION TO IT."**

*Hans Selye (1907-1982)*

## **UTICAJ OKSITOCINA NA AKTIVNOST OSOVINE HIPOTALAMUS- HIPOFIZA-NADBUBREG I PONAŠANJE PACOVA**

### ***Rezime***

Poremećaji raspoloženja, uključujući i depresiju, predstavljaju ozbiljne zdravstvene probleme i prema podacima Svetske zdravstvene organizacije do 2020. godine postaće vodeći uzrok radnog onesposobljavanja na globalnom nivou. Poznato je da je hiperaktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg (HPA) čest pratilac depresivnih poremećaja, kao i da je hronična izloženost stresu vodeći faktor rizika u razvoju ovih bolesti. Jedan od najvećih problema farmakoterapije depresije predstavlja prilično veliki procenat neadekvatnog odgovora pacijenata na terapiju selektivnim inhibitorima preuzimanja serotonina (SSRI), koji predstavljaju lekove prvog izbora. Stoga, identifikacija biomarkera povoljnog odgovora na terapiju atnidepresivima, kao i pronalaženje eventualnog dodatnog tretmana koji bi povećao verovatnoću dobrog odgovora na terapiju od velikog je kliničkog značaja. Poslednjih godina pokazano je da hormon oksitocin učestvuje u modulaciji ponašanja i raspoloženja kao i da ima ulogu u adaptaciji organizma na hronični stres.

Cilj istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom bio je da se ispita uticao oksitocina na ponašanje i parametre aktivnosti HPA osovine u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane dugotrajnom primenom kortikosterona kod pacova Wistar soja. Takođe, cilj je bio i da se u navedenom modelu ispita efekat dodatnog tretmana oksitocinom uz antidepresiv citalopram, lek iz grupe SSRI. Da bi se realizovali postavljeni ciljevi, istraživanja su podeljena u tri faze. U prvoj fazi, ispitivan je uticao različite dužine tretmana kao i različitih doza oksitocina na ponašanje i nivo biogenih amina u plazmi pacova. U drugoj eksperimentalnoj fazi, ispitivan je uticao tretmana oksitocinom u dozi 10 IU/400 µL, *s.c.*, tokom 14 dana na ponašanje i parametre aktivnosti HPA osovine u modelu hroničnog stresa/depresije izazvane primenom kortikosterona u dozi 100 mg/L, *per os*, tokom 21. dana. U trećoj fazi u navedenom modelu depresije, ispitivan je uticao kombinovanog tretmana oksitocinom i citalopramom (10 mg/kg TM, *s.c.*, tokom 14 dana) na ponašanje i ekspresiju gena koji kodiraju proteine

integrin beta 3 (ITGB3) i adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1), za koje se pretpostavlja da mogu biti potencijalni biomarkeri povoljnog odgovora na terapiju lekovima SSRI grupe.

Dobijeni rezultati pokazali su da dvonedeljni tretman oksitocinom u modelu hroničnog stresa/depresije ispoljava anksiolitički i antidepresivni potencijal primenom odgovarajućih testova ponašanja. Takođe, tretman oksitocinom imao je protektivni efekat na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde, što se ogledalo u prevenciji atrofije žlezde indukovane hronično povišenim nivoom glukokortikoida i pozitivnoj modulaciji ekspresije gena Slc6a2 i Slc18a2 koji kodiraju dva najznačajnija kateholaminska transportera - noradrenalinski transporter (NAT) i vezikularni transporter za monoamine 2 (VMAT2). Nadalje, pokazan je i antioksidativni potencijal oksitocina, što je detektovano kao smanjenje stepena oštećenja DNK limfocita nakon *in vitro* tretmana vodonik peroksidom. Proces hipokampalne neurogeneze pacova koji je bio značajno redukovano dugotrajnom primenom kortikosterona, pospešen je koadministracijom oksitocina, što je dovelo do povećanja gustine BDNF+ neurona u dentatnom girusu i CA2 i CA3 regionima hipokampusa. U korišćenom modelu hroničnog stresa/depresije takođe je pokazano da dodatni tretman oksitocinom uz citalopram, povećava ekspresiju gena za ITGB3 u tkivu prefrontalnog korteksa. Konačno, može se zaključiti da rezultati ove doktorske disertacije promovisu hormon oksitocin kao potencijalni dodatni tretman uz antidepresivnu terapiju kod pacijenata koji pate od nekog oblika depresivnog poremećaja, praćenog hronično povišenim nivoom glukokortikoida.

***Ključne reči:*** oksitocin, kortikosteron, model hroničnog stresa/depresije, HPA osovina, testovi ponašanja, citalopram, neurogeneza, ITGB3, CHL1.

**Naučna oblast:** Farmakologija

**Uža naučna oblast:** Neurofarmakologija

**UDK broj:** 591.1:[577.175.3/7:616.89-008.454(043.3)]

## **EFFECTS OF OXYTOCIN ON THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS ACTIVITY AND BEHAVIOR OF RATS**

### ***Summary***

Mood disorders, with depression leading the way, are severe health problems and according to the World Health Organization, depression is becoming the leading cause of disability worldwide. It is known that depressive disorders are frequently accompanied with hyperactivity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, as well as that the chronic stress is one of the most important risk-factors for its development. One of the most important problems of depressive disorders pharmacotherapy is that fairly large percentage of patients does not respond adequately to the therapy with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), which are the first-line treatment drugs. Therefore, the identification of biomarkers of favorable response to antidepressant therapy, as well as discoveries of potential additional treatments, which would increase the probability of favorable response to the primary therapy is of the major clinical importance. In recent years, it has been shown that the hormone oxytocin modulates mood and behavior, and mediates adaptation feedback-response against chronic stress.

The aim of the doctoral dissertation research was to evaluate the influence of oxytocin on the behavior and parameters of HPA axis activity, in the model of the long-term corticosterone administration-induced depression-like symptoms in adult male Wistar rats. Furthermore, the aim was to examine the potential beneficial effect of administering oxytocin alongside citalopram, an antidepressant from SSRI group, in this animal model. In order to fulfil these aims, the experimental work has been conducted in three phases. In the first phase, the effects of different treatment durations and dosages of oxytocin on behavior and plasma levels of biogenic amines were evaluated. In the second experimental phase, the effects of 14-day long oxytocin treatment (10 IU/400  $\mu$ L, *s.c.*) on behavior and HPA axis activity in the model of chronic stress/depression induced by 21-day long corticosterone administration (100 mg/L, *per os*) were investigated. In the third phase, in above-mentioned model of depression, the effect of combined treatment with oxytocin and

citalopram (10 mg/kg BW, *s.c.* for 14 days) on behavior and expression of genes encoding integrin beta-3 (ITGB3) and neural cell adhesion molecule L1-like protein (CHL1), which are considered to be promising biomarkers of favorable response to SSRI therapy, were examined.

The obtained results indicate that in the model of chronic stress/depression, the two-week long treatment with oxytocin showed anxiolytic and antidepressive potential which was evaluated by using appropriate behavioral tests. Oxytocin exerted a protective effect on the adrenal gland function and structure, reflected as the prevention of gland atrophy induced by chronically elevated level of glucocorticoids and positive modulation of gene expression of *Slc6a2* and *Slc18a2* encoding two main catecholamine transporters – noradrenaline transporter (NAT) and vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2). Furthermore, antioxidative potential of oxytocin was shown, which was detected as decreased DNA damage in lymphocytes after *in vitro* incubation with hydrogen peroxide. Adult hippocampal neurogenesis, markedly reduced after long-term corticosterone administration, was ameliorated after oxytocin co-administration, which increased density of BDNF+ neurons in dentate gyrus, as well as in CA2 and CA3 hippocampal regions. In the model of chronic stress/depression, it was demonstrated that the addition of oxytocin to citalopram treatment, further increased expression of gene *Itgb3* encoding ITGB3 protein in prefrontal cortex tissue of rats. In summary, the results from this doctoral dissertation argue for the usefulness of hormone oxytocin as a potential additional treatment, along with therapy with antidepressants, in patients suffering from depressive disorders accompanied with chronically elevated glucocorticoid level.

**Keywords:** *oxytocin, corticosterone, model of chronic stress/depression, HPA axis, behavioral tests, citalopram, neurogenesis, ITGB3, CHL1.*

**Field of Science:** Pharmacology

**Science Subfield:** Neuropharmacology

**UDK number:** 591.1:[577.175.3/.7:616.89-008.454(043.3)



# SPISAK SKRAĆENICA

**A** – adrenalin

**ACTH** – adrenocorticotropic hormone; adrenokortikotropni hormon

**AMPA** –  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

**BDNF** – brain-derived neurotrophic factor; neurotrofični faktor poreklom iz mozga

**BSA** – bovine serum albumine; goveđi serumski albumin

**CA1** - *Cornu Ammonis 1*

**CA2+CA3** - *Cornu Ammonis 2 + Cornu Ammonis 3*

**CAMKII** – kalcijum/kalmodulin zavisna protein kinaza II

**cDNK** – komplementarna DNK

**CHL1** – close homolog of L1; adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1

**CNS** – centralni nervni sistem

**CORT** – kortikosteron

**CREB** – cAMP-response element binding protein; cAMP zavisni transkripcioni faktor

**DAB** – 3,3'-diaminobenzidin

**ddH<sub>2</sub>O** – redestilovana voda

**DEPC** – diethylpyrocarbonate; dietilpirokarbonat

**DG** – dentatni girus

**DN** – damaged nuclei; oštećenje DNK

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**EDTA** – etilendiaminotetrasirćetna kiselina

**EPM** – elevated plus maze; uzdignuti plus lavirint

**FC** – fear conditioning; test kondicioniranja strahom

**FST** – forced swim test; test forsiranog plivanja

**GABA** – gama aminobuterna kiselina

**GR** – glukokortikoidni receptori

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – vodonik peroksid

**HPA** – hypothalamus-pituitary-adrenal axis; osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda

**HPLC** – high pressure liquid chromatography; tečna hromatografija pod visokim pritiskom

**HRP** – horseradish peroxidase; peroksidaza rena

**i.c.v.** - intracerebroventrikularno

**i.p.** – intraperitonealno

**IL-1** – interleukin 1

**IL-6** – interleukin 6

**iRNK** – informaciona ribonukleinska kiselina (RNK)

**ITGB3** - integrin beta 3

**ITGB3BP** – integrin beta-3 binding protein; integrin beta 3 vezujući protein

**LC-ESI-MS/MS** – liquid chromatography-electrosprayionisation-tandem mass spectrometry; tečna hromatografija –elektrosprej jonizacija-tandem masena spektrometrija

**LMP** – low melting point; niska tačka topljenja

**LOOH** – lipid hydroperoxide; lipidni hidroperoksidi

**MAP 2** - microtubule-associated protein 2; protein povezan sa mikrotubulama 2

**MAPK** – protein kinaza aktivirana mitogenom, map kinaza

**MDA** – malondialdehyde; malondialdehid

**MDD** – major depressive disorder; velika depresija

**MNS** – mirror neuron sistem; sistem ogledalo neurona

**MWM** – Morris water maze; Morisov vodeni lavirint

**NA** – noradrenalin

**NAT** – noradrenaline transporter; transporter za noradrenalin

**NGF** – neuron growth factor; faktor rasta neurona

**NORT** – novel object recognition test; test prepoznavanja novog objekta

**NOSK** – skor kometa za ćelije niskog stepena oštećenja

**OFT** - open field test; test otvorenog polja

**OxtR** – oksitocinergički receptor

**OXY** – oksitocin

**PBS** – phosphate buffered saline; fosfatni pufer

**PVDF** – polivinilidendifluorid

**RAM** – radial arm lavirint; radijalni lavirint

**RMET** – The reading the mind in the eyes test; test čitanja misli gledanjem u oči

**RNS** – reactive nitrogen species; reaktivni radikali azota

**ROS** – reactive oxzgen species; reaktivni kiseonični radikali

**RP HPLC** – reversed-phase high pressure liquid chromatography; reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

**RT-PCR** – real time polymerase chain reaction; lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu

*s.c.* – subkutano

**SDS-PAGE** – poliakrilamidna gel elektroforeza

**SEM** – standardna greška

**SERT** – serotoniniski transporter

**SLC6A4** – gen koji kodira serotoniniski transporter

**SNP** – single nucleotide polymorphism; promena na nivou pojedinačnog nukleotida u sekvenci DNK

**SOD** – superoxide dismutase; superoksid dizmutaza

**SSRI** – selective serotonin reuptake inhibitors; selektivni inhibitori preuzimanja serotoninina

**TBA** – tiobarbiturna kiselina

**TBST** – tris-buffered saline tween, tris pufer sa tvinom

**TNF<sub>α</sub>** – tumor necrosis factor α; faktor nekroze tumora α

**TSK** – totalni skor kometa

**VMAT1** – vesicular monoamine transporter 1; vezikularni monoaminski transporter 1

**VMAT2** – vesicular monoamine transporter 2; vezikularni monoaminski transporter 2

**VMATs** - vesicular monoamine transporters; vezikularni monoaminski transporteri

**VOSK** – skor za ćelije visokog stepena oštećenja

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Oksitocin, struktura, mehanizam dejstva i uloga u regulaciji ponašanja .....	1
1.1.1. Oksitocin.....	1
1.1.2. Uticaj oksitocina na centralni nervni sistem (CNS).....	3
1.1.3. Uloga oksitocina u modulaciji ponašanja .....	4
1.1.4. Uloga polimorfizma oksitocinskih receptora u regulaciji ponašanja.....	5
1.1.5. Uticaj oksitocina na aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda .....	7
1.2. Depresija, hronični stres i aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda.....	8
1.2.1. Depresija i hrnični stres .....	8
1.2.2. Eksperimentalni modeli hroničnog stresa i depresivnog ponašanja .....	12
1.2.3. Uticaj promene aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda na ponašanje eksperimentalnih životinja .....	15
1.2.4. Hronični stres, depresivni poremećaji i aktivnost nadbubrežne žlezde .....	17
1.2.5. Aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda i oksidativni stres .....	18
1.2.6. Uticaj hroničnog stresa i depresije na neurogenezu u hipokampusu .....	20
1.3. Terapija depresije selektivnim inhibitorima preuzimanja serotonina .....	23
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	27
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	30
3.1. Eksperimentalne životinje .....	30
3.2. Eksperimentalni protokol .....	30
3.2.1. Hemijske supstance korišćene za tretmane.....	34
3.3. Testovi ponašanja: Test otvorenog polja, Uzdignuti plus lavirint i Test forsiranog plivanja .....	34

3.3.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT).....	35
3.3.2. Uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM) .....	36
3.3.3. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST) .....	37
3.4. Izolacija proteina iz srži nadbubrežne žlezde i hipokampusa i određivanje količine proteina "Western blot" metodom.....	38
3.4.1. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) .....	38
3.4.2. Transfer proteina sa gela na membranu .....	41
3.4.3. Imunodetekcija proteina .....	41
3.5. Izolacija iRNK i lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) .....	44
3.5.1. Ekstrakcija ukupne RNK i merenje koncentracije spektrofotometrijskom metodom.....	44
3.5.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) .....	46
3.5.3. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu, Real-Time PCR (RT- PCR) .....	46
3.6. Histološka analiza nadbubrežne žlezde .....	48
3.7. Određivanje koncentracije biogenih amina u plazmi reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (Reversed-phase high pressure liquid chromatography, RP HPLC) .....	49
3.7.1. Priprema uzoraka za RP HPLC .....	49
3.7.2. Određivanje koncentracije kateholamina HPLC metodom .....	49
3.7.3. Određivanje koncentracije serotonina HPLC metodom .....	50
3.8. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi sistemom tečna hromatografija - elektrosprej jonizacija - tandem masena spektrometrija (Liquid chromatography – ElectrosprayIonisation - Tandem mass spectrometry, LC- ESI-MS/MS) .....	51
3.9. Ispitivanje stepena oštećenja DNK limfocita periferne krvi komet testom.....	52
3.10. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi eksperimentalnih životinja .....	55

3.10.1. Određivanje koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) i malondialdehida (MDA) u plazmi .....	56
3.10.2. Određivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze (SOD) .....	57
3.11. Imunohistohemijska analiza ekspresije Ki-67 i BDNF u neuronima hipokamusa..	58
3.12. Statistička obrada rezultata.....	60
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>62</b>
4.1 Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje i nivo hormona u plazmi eksperimentalnih životinja .....	62
4.1.1. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje Wistar pacova .....	62
4.1.1.1. Ponašanje životinja u testu otvorenog polja (eng. Open field test, OFT) ....	62
4.1.1.2. Ponašanje životinja u uzdignutom plus lavirintu (eng. Elevated plus maze, EPM).....	63
4.1.1.3. Ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST) .....	64
4.1.2. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na na nivo biogenih amina u plazmi .....	65
4.1.2.1. Koncentracija adrenalina u plazmi.....	65
4.1.2.2. Koncentracija noradrenalina u plazmi .....	66
4.1.2.3. Koncentracija serotonina u plazmi.....	67
4.2. Uticaj subhroničnog tretmana oksitocinom u kortikosteronom-indukovanom modelu hroničnog stresa i depresije.....	67
4.2.1. Uticaj tretmana na promenu telesne mase i unos hrane i vode eksperimentalnih životinja .....	68
4.2.1.1. Promena telesne mase .....	68
4.2.1.2. Unos hrane i vode.....	69
4.2.2. Uticaj tretmana na ponašanje eksperimentalnih životinja .....	71
4.2.2.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT) .....	71
4.2.2.2. Uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM).....	73

4.2.2.3. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST).....	74
4.2.3. Uticaj tretmana na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde eksperimentalnih životinja .....	75
4.2.3.1. Apsolutna masa i morfometrijska analiza nadbubrežne žlezde .....	76
4.2.3.2. Svetlosna mikroskopija krvnih sudova srži nadbubrežne žlezde.....	78
4.2.3.3. Ekspresija gena Slc6a2 i Slc18a2 i količina proteina transportera za noradrenalin (eng. Noradrenaline transporter, NAT) i vezikularnog transportera za monoamine 2 (eng. Vesicular monoamine transporter 2, VMAT2) u tkivu srži nadbubrežne žlezde .....	78
4.2.3.4. Uticaj tretmana na bazalnu i stresom indukovanu aktivnost nadbubrežne žlezde: koncentracije hormona kortikosterona, adrenalina i noradrenalina u plazmi pre i nakon akutnog stresa.....	81
4.2.3.5. Koncentracija kortikosterona u plazmi .....	81
4.2.3.6. Koncentracije kateholamina u plazmi.....	82
4.2.4. Uticaj tretmana na parametre oksidativnog stresa u krvi Wistar pacova: stepen oštećenja DNK limfocita periferne krvi i koncentracije lipidnih hidroperoksida, malondialdehida i aktivnost superoksid dizmutaze u plazmi.....	84
4.2.4.1. Oštećenje DNK limfocita periferne krvi Wistar pacova .....	84
4.2.4.2. Ukupan broj ćelija sa oštećenjem DNK.....	84
4.2.4.3. Različit stepen oštećenja DNK perifernih limfocita Wistar pacova: ćelije sa niskim i ćelije sa visokim stepenom oštećenja DNK.....	85
4.2.4.4. Vrednosti Totalnog skora kometa (eng. Total comet score, TCS).....	87
4.2.4.5. Uticaj tretmana na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi Wistar pacova.....	88
4.2.4.6. Parametri lipidne peroksidacije u plazmi .....	89
4.2.4.7. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid dizmutaze (SOD) u plazmi.....	90
4.2.5. Uticaj tretmana na ekspresiju parametara neurogeneze u hipokampusu Wistar pacova.....	91
4.2.5.1. Ekspresija nuklearnog faktora Ki-67 u hipokampusu.....	91



4.2.5.2. Ekspresija neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (BDNF) u hipokampusu .....	93
4.2.5.3. Količina proteina BDNF u hipokampusu Wistar pacova.....	96
4.3. Uticaj dodatnog tretmana oksitocinom uz tretman citalopramom na ponašanje i ekspresiju gena Itgb3 i Chl1 u prefrontalnom korteksu Wistar pacova u modelu hroničnog stresa i depresije .....	97
4.3.1. Testovi ponašanja .....	97
4.3.1.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT) .....	97
4.3.1.2. Uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM).....	98
4.3.1.3. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST).....	99
4.3.2. Ekspresija gena koji kodira integrin beta 3 (ITGB3) i adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1) u prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja .....	101
4.3.2.1. Ekspresija Itgb3 iRNK u prefrontalnom korteksu .....	101
4.3.2.2. Ekspresija Chl1 iRNK u prefrontalnom korteksu .....	103
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>104</b>
5.1. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje i nivo hormona u plazmi Wistar pacova.....	104
5.1.1. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje .....	104
5.1.2. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na nivo biogenih amina u plazmi.....	107
5.2. Uticaj dvonedeljnog tretmana oksitocinom na ponašanje i parametre aktivnosti HPA osovine pacova u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane hroničnom primenom kortikosterona.....	109
5.2.1. Uticaj tretmana kortikosteronom i oksitocinom na porast telesne mase i unos hrane i vode eksperimentalnih životinja.....	109
5.2.2. Uticaj oksitocina na ponašanje životinja u modelu hroničnog stresa/depresije	111
5.2.3. Uticaj oksitocina na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde u modelu hroničnog stresa/depresije .....	114

5.2.4. Uticaj oksitocina na parametre oksidativnog stresa u krvi eksperimentalnih životinja u modelu hroničnog stresa/depresije .....	119
5.2.5. Uticaj oksitocina na proces adultne neurogeneze u hipokampusu eksperimentalnih životinja u modelu hroničnog stresa/depresije .....	123
5.3. Uticaj dodatnog tretmana oksitocinom uz tretman citalopramom na ponašanje i ekspresiju Itgb3 i Chl1 iRNK u prefrontalnom korteksu pacova u modelu hroničnog stresa/depresije .....	128
5.3.1. Uticaj tretmana oksitocinom uz citalopram na ponašanje Wistar pacova .....	129
5.3.2. Uticaj tretmana oksitocinom uz citalopram na ekspresiju gena za integrin beta 3 (ITGB3) i adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1) u prefrontalnom korteksu Wistar pacova .....	130
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>135</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>137</b>
<b>8. BIOGRAFIJA .....</b>	<b>171</b>
<b>9. PRILOZI .....</b>	<b>172</b>

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

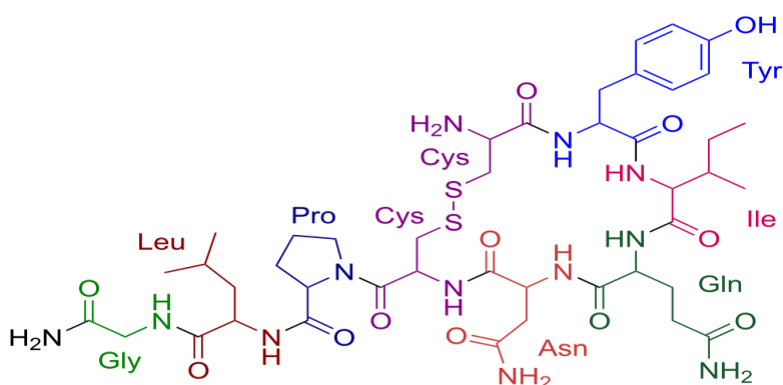
Izjava o korišćenju

# 1. UVOD

## 1.1. Oksitocin, struktura, mehanizam dejstva i uloga u regulaciji ponašanja

### 1.1.1. Oksitocin

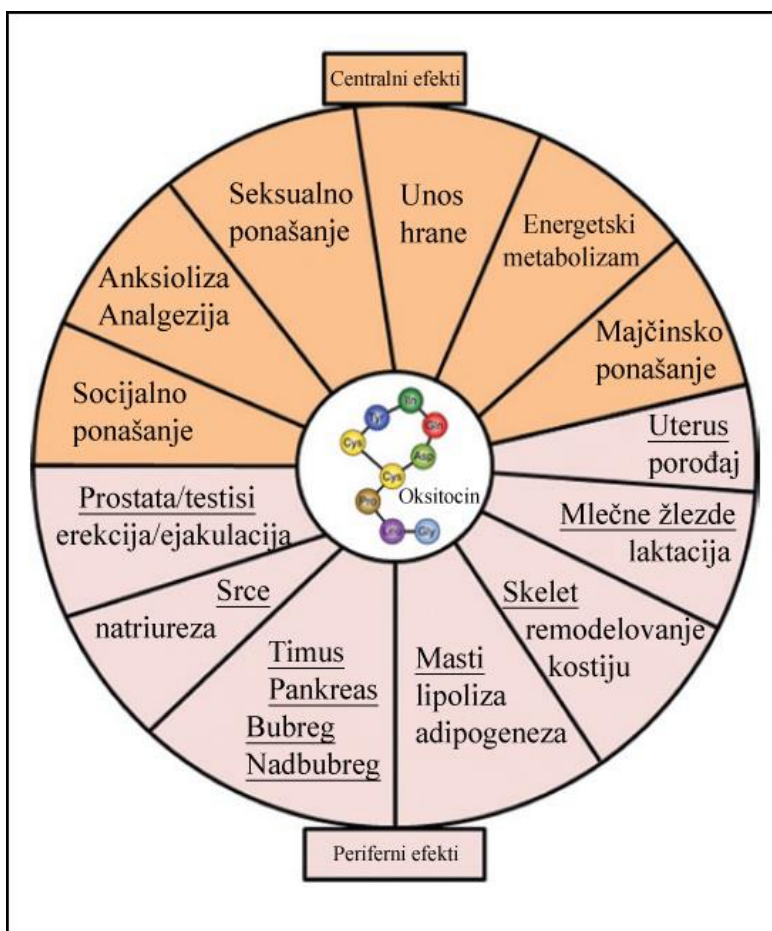
Oksitocin je peptidni hormon koji se sastoji od devet aminokiselina (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH<sub>2</sub>) i jednim S-S mostom između dva cisteinska ostatka (Lee i sar., 2009) (Slika 1). Oksitocin u obliku preprohormona sintetišu neuroni paraventrikularnog i supraoptičkog jedra hipotalamusa, a tokom aksonskog transporta u zadnji režanj hipofize, slobodan hormon se odvaja od prekursora koji sadrži i protein neurofizin (Ivell i Richter, 1984a).



**Slika 1.** Struktura oksitocina (preuzeto sa: <https://www.decodedscience.org/oxytocin-love-hormone-autism/36616/2>)

Značajna karakteristika ovog neuropeptida je ta da je evolutivno veoma dobro očuvan i sledstveno izrazito slične strukture kod različitih životinjskih vrsta (Caldwell i Young, 2006). Poznati efekat oksitocina na kontrakcije uterusa tokom porođaja utvrdio je Dale još 1906. godine u eksperimentima na gravidnim mačkama, a nedugo zatim opisan je i stimulativni uticaj na laktaciju (Ott i Scot, 1910; Schafer i Mackenzie, 1911). Aminokiselinska struktura oksitocina rasvetljena je 1953. godine (du Vigneaud i sar.,

1953a), a ovaj hormon je ubrzo i uspešno sintetisan (du Vigneaud i sar., 1953b). Jedini do danas poznati receptor za oksitocin (OxtR) kloniran je 1992. godine (Kimura i sar., 1992). Sadrži sedam transmembranskih domena i pripada familiji G protein vezujućih receptora i to klasi I (rodopsinu sličan receptor), koji je povezan sa fosfolipazom C (Gimpl, 2008). Nakon aktivacije receptora, nastali inozitoltrifosfat indukuje mobilizaciju  $Ca^{2+}$  iz intracelularnih depoa, a oslobođeni diacilglicerol aktivira protein kinazu C. Dalji signalni put podrazumeva aktivaciju mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), usled porasta intracelularne koncentracije  $Ca^{2+}$ , kao i kalcijum/kalmodulin zavisne protein kinaze II (CAMKII). Aktivacija ovog signalnog puta vodi ka depolarizaciji ćelijske membrane i otvaranju voltažno zavisnih kanala za  $Ca^{2+}$  (Aspe-Sanchez i sar., 2016). Na periferiji, prisustvo oksitocinskih receptora potvrđeno je u uterusu (Maning i sar., 1995), jajnicima (Ivell i Richter, 1984b), mlečnim žlezdama (McNeilly, 1972), ali i u testisima (Pickering i sar., 1989), prostati (Bodanszky i sar., 1992), bubregu (Verbalis i Dohanics, 1991), srcu (Petty i sar., 1985), timusu (Geenen i sar., 1986), pankreasu (Dunning i sar., 1984) kao i u nadbubrežnoj žlezdi (Ang i Jenkins, 1984; Nussey i sar., 1987). Novija istraživanja Young-a i Gainera (2003) i Scordalakes-a i saradnika (2008) potvrdila su da se manje količine oksitocina sintetišu i u parvocelularnim neuronima paraventrikularnog jedra, medijalnoj preoptičkoj regiji i lateralnim amigdalama. Rezultati ovih početnih studija postavili su osnovu za istraživanja znatno većeg obima, koja, pored ispitivanja efekta oksitocina na periferiji, sve više uključuju i ispitivanje delovanja oksitocina u centralnom nervnom sistemu, pre svega njegov uticaj na ponašanje. Dosadašnji potvrđeni efekti oksitocina na različite organe na periferiji, kao i u centralnom nervnom sistemu, prikazani su na Slici 2.



**Slika 2.** Poznati centralni i periferni efekti oksitocina (modifikovano prema referenci: Amri i Pisani, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 2016)

### 1.1.2. Uticaj oksitocina na centralni nervni sistem (CNS)

Centralne efekte oksitocin ostvaruje preko svog receptora, OxtR, koji je, u zavisnosti od vrste, specifično i široko distribuiran u mozgu (Viero i sar., 2010). *In situ* hibridizacijom, kao i studijama na transgenim životinjama utvrđeno je da regije mozga koje sadrže OxtR uključuju neokorteks, ventromedijalno jezgro hipotalamusa, centralne i lateralne amigdale, nukleus akumbens, lateralni septum, preoptičku i ventralnu oblast tegmentuma i hipokampus (Li i sar., 1997; Febo i sar., 2009; betlehem i sar., 2017). Studija Ostrowski (1998) potvrdila je prisustvo iRNK za OxtR u prednjem mozgu, uključujući limbički sistem i amigdale. U skladu sa ovim, oblasti koje sadrže iRNK za OxtR podeljene su na: regione uključene u regulaciju ponašanja povezanog sa reprodukcijom i koji su osetljivi na steroide, regione koje regulišu majčinsko

ponašanje, zatim regione uključene u procese učenja, pamćenja i izgradnje samopouzdanja. Kako je nedvosmisleno pokazano postojanje razlika u distribuciji OxtR u zavisnosti od životinjske vrste, kao i u zavisnosti od pola unutar iste vrste, smatra se da upravo razlike u distribuciji receptora objašnjavaju razlike u efektima koje oksitocin ispoljava na ponašanje kod različitih vrsta, kao i jedinki različitog pola (Lee i sar., 2009). Takođe, smatra se da oksitocin može delovati i kao modulator socijalnog i emocionalnog ponašanja (Meyer-Lindenberg i sar., 2011), s obzirom na to da su njegovi receptori distribuirani u različitim regionima mozga uključenim u centralnu nervnu kontrolu stresa i anksioznosti (Landgraf i Neumann, 2004). Takođe, shodno nalazima da dendriti neurona predstavljaju značajan izvor neuropeptida, kao i da oslobađanje neuropeptida iz dendrita nije direktno vezano za sinaptičku transmisiju, pretpostavljena je uloga oksitocina u modulaciji sinaptičke transmisije (Ludwig i Leng, 2006). Visoke koncentracije neuropeptida u ekstracelularnoj tečnosti mozga omogućavaju im laku difuziju do udaljenih ciljnih ćelija. U tim ćelijama neuropeptidi imaju ulogu u njihovoj funkcionalnoj reorganizaciji i formiranju neuronskih mreža, što se smatra osnovom za ispoljavanje efekata na ponašanje (Ludwig i Leng, 2006).

### **1.1.3. Uloga oksitocina u modulaciji ponašanja**

U studijama u kojima je ispitivan uticaj oksitocina na ponašanje, pokazano je da oksitocin menja reakciju organizma na stresne stimuluse (Uvans-Moberg, 1998; Svanidze i sar., 2012), učestvuje u adaptaciji na hronični stres (Zheng i sar., 2009), ispoljava antinociceptivni efekat (Rash i Campbell, 2014), poboljšava socijalno prepoznavanje (Lieberwirth i Wang, 2014) i reguliše društvene strahove (Guzman i sar., 2014). Visoki nivoi oksitocina u plazmi povezuju se sa većim poverenjem i poverenjem koje osobe osećaju prema drugima (Heinrichs i Domes, 2008; Campbell, 2010). Sličan efekat oksitocina potvrđen je i u studiji Theodoridou-a i saradnika (2009), u kojoj je intranazalna aplikacija oksitocina zdravim dobrovoljcima povećala percepciju drugih ljudi kao ljudi od poverenja. Domes i saradnici (2007) su utvrdili da administracija oksitocina poboljšava sposobnost "čitanja misli" drugih osoba i smanjuje pojavu grešaka tokom prepoznavanja emocija tumačenjem facijalne ekspresije u testu "čitanja misli gledanjem u oči" (The Reading the Mind in the Eyes Test, RMET).

Značajno je da je utvrđeno postojanje pozitivne korelacije nivoa oksitocina u salivi tokom trudnoće i ranog postpartalnog perioda sa stepenom povezanosti i bliskosti majke i deteta (Levine i sar., 2007). S druge strane, nivo ovog hormona u plazmi negativno korelira sa intenzivnom psihološkom patnjom, odnosno sa stepenom depresivne simptomatologije (Gordon i sar., 2008). Daljim istraživanjem u ovoj oblasti, u studiji Perry-ja i saradnika (2010) potvrđeno je postojanje povezanosti oksitocina i tzv. sistema ogledalo neurona (eng. mirror neuron sistem, MNS) uključenih u razumevanje namera, misli i osećanja drugih ljudi.

U istraživanjima Nakajime i saradnika (2014) identifikovana je populacija interneurona u medijalnom prefrontalnom korteksu koji eksprimiraju receptore za oksitocin, a koji su uključeni u regulaciju socijalnog ponašanja. Blokada transmisije iz ovih interneurona kod miševa, dovela je do gubitka interesovanja ženki za mužjake tokom aktivne faze ciklusa. Takođe, pokazano je da je nakon testa forsiranog plivanja sinteza i sekrecija oksitocina u paraventrikularnom i supraoptičkom jedru, frontalnom korteksu, amigdalama i hipokampusu povećana, kao i njegovo oslobađanje iz hipofize u krvotok (Yan i sar., 2015). Kod *OxtR knockout* miševa, zapažena je pojačana agresivnost i poremećaji u ponašanju koji se mogu povezati sa autizmom, kao što je npr. repetitivno ponašanje (Sala i sar., 2015).

#### **1.1.4. Uloga polimorfizma oksitocinskih receptora u regulaciji ponašanja**

Pored toga što je struktura oksitocina kao i njegovih receptora filogenetski dobro očuvana, značajna je činjenica da njihova genska struktura, kao i prostorna ekspresija pokazuje varijacije specifične za vrstu (Aspe-Sanchez i sar., 2016). Ove varijacije se najčešće javljaju u vidu genskog polimorfizma, i smatra se da upravo navedene varijacije stoje u osnovi razlika u nivoima ekspresije i distribucije oksitocina i njegovih receptora u moždanim strukturama između jedinki iste vrste (Young i sar., 1999), ali i između različitih vrsta (Young i sar., 1999; Knafo i sar., 2008). Genetski polimorfizam podrazumeva postojanje dve ili više varijanti određenog lokusa (npr. različite vrste alela) unutar DNK sekvence u okviru neke populacije. U zavisnosti od vrste promena u rasporedu nukleotida, postoje i različite vrste polimorfizama.

Najkarakterističnija i najčešća promena je na nivou pojedinačnog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism, SNP) (Aspe-Sanchez i sar., 2016). SNP locirani na kodirajućim regionima DNK se mogu podeliti na one koje menjaju i one koje ne menjaju raspored aminokiselina u rezultujućem proteinskom molekulu. SNP mutacije koje menjaju strukturu proteina mogu kao rezultat imati nefunkcionalni, izmenjeni protein. Takođe, SNP locirani na nekodirajućim regionima DNK kao rezultat mogu imati promene u lokalizaciji i nivoima ekspresije datog proteina, što se može smatrati posledicom izmenjene aktivnosti specifičnog gena (Plomin i sar., 2008). Druga vrsta polimorfizma su takozvani "mikrosateliti" koji predstavljaju sekvence 2-5 parova baza koje se ponavljaju 5 do 50 puta. Ove mutacije se najčešće zapažaju na nekodirajućim regionima DNK, međutim one ipak mogu dovesti do značajnih razlika u fenotipu (Li i sar., 2004) i mogu se povezati sa razvojem različitih neuroloških i psihijatrijskih poremećaja u humanoju populaciji (Amir i sar., 1999). Istraživanja genetske osnove ponašanja dala su čvrste dokaze o tome da je ispoljeni fenotip pod direktnim uticajem postojeće varijante genotipa, kao i o tome da sam genotip ima značajnu ulogu u procesima socijalizacije. Ovakvi uticaji genetike na socijalizaciju i snalaženje jedinke u različitim uslovima spoljašnje sredine nazivaju se korelacijom genotipa i spoljašnje sredine (Plomin i sar., 2008). S ovim u vezi, poznato je da ponašanje jedinke u različitim uslovima spoljašnje sredine u mnogome zavisi od postojećeg genotipa i obrnuto, da je ispoljavanje efekta određenog genotipa zavisno od uslova okruženja. Tako, ispoljeni fenotipi podrazumevaju više od sume nezavisnih faktora genetike i okruženja: na primer, razlike u ponašanju pojedinaca tokom sličnih socijalnih interakcija su posledica postojanja različitog genotipa (Plomin i sar., 2008).

U nedavnim studijama u kojima je ispitivan polimorfizam oksitocinskih receptora (OxtR), pokazano je da postoji povezanost određenih genskih varijanti OxtR i različitih psihijatrijskih poremećaja (Meyer-Lindenberg i sar., 2011). Ove studije ukazale su na značajan uticaj genotipa OxtR i ispoljavanja osećaja empatije (Rodrigues i sar., 2009), kao i povećanog rizika od obolevanja od nekog oblika depresivnog poremećaja (Myers i sar., 2014). U studiji Thompson-a i saradnika (2011) pokazano je da je kod devojaka koje su tokom mladosti bile izložene nekoj stresnoj situaciji, varijanta OxtR, rs 2254298, povezana sa većim stepenom obolevanja od depresije i anksioznosti. Takođe, pojedine varijante OxtR (rs 2254298 i rs 53576) ukazuju na veću



verovatnoću obolevanja od autizma, pri čemu su dobijeni rezultati u značajnoj meri zavisili od etničke pripadnosti ispitanika uključenih u studiju (Wu i sar., 2006; Jacob i sar., 2007). Iako trenutno ne postoje podaci o povezanosti polimorfizma OxtR i šizofrenije, rezultati nekoliko studija ukazuju na postojanje veze između pojedinih genskih varijanti receptora za oksitocin i vazopresin i karakterističnih promena u ponašanju, kao što su smanjenje pažnje, što predstavlja glavni kognitivni nedostatak kod osoba obolelih od šizofrenije (Powell i sar., 2009; Ratajczak i sar., 2013) kao i ispoljavanja negativne simptomatologije kao što su anhedonija, asocijalnost i nedostatak motivacije (Golimbet i sar., 2015).

#### **1.1.5. Uticaj oksitocina na aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda**

Postoji značajan broj dokaza da oksitocin ispoljava efekat na nadbubrežnu žlezdu, koja predstavlja glavni efektorni organ osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg (eng. hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA). Smatra se da oksitocin ima ulogu jedne vrste faktora rasta ili takozvanog "perifernog modulatora" nadbubrega (Viero i sar., 2010). Pokazano je da kod pacova oksitocin povećava broj hromafinih ćelija u meduli, kao i da dovodi do promena u broju ćelija i zapremini unutrašnjih zona kore (Plećaš i sar., 1989). Takođe, administracija oksitocina povećala je količinu adrenalina (A), noradrenalina (NA), dopamina i serotonina u žlezdi (Plećaš i sar., 1989), dok je njegova centralna administracija ženkama pacova uticala na bazalne koncentracije adrenokortikotropnog hormona (eng. Adrenocorticotropic hormone, ACTH) i kortikosterona u krvi i značajno umanjila odgovor ovih hormona nakon izlaganja životinja stresnoj situaciji (Windle i sar., 2004).

## 1.2. Depresija, hronični stres i aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda

### 1.2.1. Depresija i hronični stres

Poremećaji raspoloženja, uključujući i depresiju, su ozbiljni zdravstveni problemi koji pogađaju oko 20% svetske populacije. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, depresija postaje vodeći uzrok radnog onesposobljavanja širom sveta (Zhao i sar., 2008). Zbog visoke prevalencije, hroničnog toka bolesti, značajnog negativnog uticaja na kvalitet života, pratećih komorbiditeta i povišenog rizika od suicida, depresija se smatra jednim od najvećih zdravstvenih problema današnjice (Gold, 2014). Glavni simptomi depresije podrazumevaju: gubitak interesovanja ili zadovoljstva u gotovo svim aktivnostima (anhedonija), promene u telesnoj masi ili apetitu, promene u spavanju (insomnija ili hipersomnija), gubitak energije i pojačano zamaranje (anergija), osećaj beskorisnosti ili krivice, smanjenje koncentracije, povlačenje u sebe (asocijalnost) kao i česte misli o smrti ili suicidu, pa čak i pokušaj suicida (Coentre i sar., 2017). Kako bi se postavila dijagnoza depresivnog poremećaja, neophodno je postojanje minimum četiri od gorenavedenih simptoma koji traju najmanje dve nedelje (Coentre i sar., 2017). U etiologiji depresije značajnu ulogu imaju faktori same ličnosti, koji su u izvesnoj meri nasledni. Međutim, poznato je da pored njih, u razvoju depresivnih epizoda veliki uticaj imaju i negativna životna iskustva, kao što je gubitak bliske osobe, siromaštvo, loši porodični odnosi, gubitak posla. Iz tog razloga, jednim od glavnih epigenetskih faktora rizika za razvoj depresije, upravo se smatra i hronična izloženost stresu (Zhao i sar., 2008)

Još u doba stare Grčke, Hipokrat (460-370 p.n.e.) je napisao da sve nas opsedaju uznemirujuće sile koje prete da nam poremete unutrašnju ravnotežu. Na svu sreću, postoje unutrašnji sistemi koji nam pomažu da se narušena ravnoteža ponovo uspostavi, a koje je kasnije Galen (129-199) nazvao *vis medicatrix naturae* odnosno isceljujućom (lekovitom) silom prirode (Gold, 2014). Danas, uznemirujuće sile koje prete da naruše ravnotežu nazivamo stresorima, dok u "lekovite" sile prirode ubrajamo mehanizme adaptacije i dinamičku unutrašnju ravnotežu, tj homeostazu (Gold, 2014).

U odgovoru na stres organizam aktivira urođeni, relativno stereotipni mehanizam adaptacije na novonastale uslove sredine, a u cilju održavanja fizioloških, optimalnih uslova unutrašnje sredine (Gold i sar., 1988; Chrousos i Gold, 2009). Stres gotovo uvek prati uzbuđenje koje je najsnažnije kada se stimulus prepozna kao averzivan ili nemoguć za kontrolisanje. Kao i imuni odgovor i drugi mehanizmi adaptacije, odgovor organizma na stres je od suštinskog značaja za preživljavanje jedinke (Gold i sar., 1988; Chrousos i Gold, 2009).

Vekovima nakon Hipokrata, engleski lekar Thomas Sydenham primetio je da i sam adaptivni odgovor, ukoliko je neadekvatan, kao što je to slučaj na primer kod autoimunih oboljenja, može imati dalji destabilišući efekat i dodatno narušiti homeostazu. Slična situacija izmenjenog fiziološkog odgovora organizma na stres javlja se i kod pacijenata obolelih od nekog oblika depresivnog poremećaja (Gold, 2014).

Kada osoba nije pod stresom brojne projekcije neurona poreklom iz prefrontalnog korteksa vrše koordinaciju kompleksne moždane aktivnosti u cilju efektivne regulacije ponašanja, misli i emocija (Arnsten, 2009). Eutimija je raspoloženje koje preovladava, a kognicija nije narušena delovanjem anksioznosti. S druge strane, kada je osoba pod stresom, moždane aktivnosti se preusmeravaju na regulaciju brzih emocionalnih odgovora kroz aktivaciju amigdala i limbičkog sistema (Arnsten, 2009), a anksioznost je esencijalna za preživljavanje omogućavajući usmeravanje pažnje prvenstveno na delovanje stresora i odgovor na novonastalu situaciju (Gold, 2014). Kognitivna funkcija je izmenjena i njena glavna uloga je pronalaženje adekvatnog brzog odgovora na postojeću pretnju (McGaugh, 2004). Takođe, veza limbičkog sistema i aktivnosti HPA osovine tokom fiziološkog odgovora organizma na stres podrazumeva signalizaciju poreklom iz amigdala i prefrontalnog korteksa ka hipokampusu, koja deluje inhibitorno na paraventrikularno jedro hipotalamusa (Hanson i sar., 2011; Gold, 2014).

Fiziološki odgovor organizma na stres, pored aktivacije HPA osovine, podrazumeva noradenalinske transmisije iz *locus ceruleus*-a, kao i aktivaciju simpato-adrenalnog sistema i srži nadbubrežne žlezde da luči kateholamine (Gold, 2014). Takođe, u okviru fiziološkog odgovora organizma na stres javlja se rezistencija na

insulin (Uchida i sar., 2012) i blaga inflamacija (Steptoe i sar., 2007) koje služe da moždanom tkivu obezbede dovoljne količine glukoze tokom karakteristične "bori se ili beži" reakcije. U cilju očuvanja energije u ovakvim situacijama inhibirana je sekrecija hormona rasta, kao i polnih i hormona štitne žlezde (Gold, 2014). Na nivou neurona, esencijalne adaptivne intracelularne promene tokom delovanja stresora podrazumevaju neurogenezu (Duman i Li, 2012) i povećanje plastičnosti neurona (Pittenger i Duman, 2008). Ovi fenomeni u CNS-u omogućavaju sazrevanje novih neurona, podstiču razvoj dendrita i formiranje novih sinapsi, što za posledicu ima adekvatan odgovor na delovanje stresora (Gold, 2014). Na kraju, jednako bitno je i da adekvatan fiziološki odgovor organizma na stres podrazumeva pravovremeno okončanje, u trenutku kada za njim više ne postoji potreba (Gold, 2014).

U određenim situacijama, nažalost, dolazi do poremećaja nekih, ili čak svih, mehanizama uključenih u fiziološki odgovor organizma na stres. Tako je poznato da je disfunkcija HPA osovine čest pratilac velikog broja psihijatrijskih poremećaja povezanih sa stanjima hronične izloženosti stresu, kao što su melanholična i atipična depresija, panični poremećaji, anoreksija nervoza i posttraumatski stresni poremećaj (Graeff, 2007; Pariante i Lightman, 2008; Walker i sar., 2008). Hiperfunkcija HPA osovine se manifestuje i tokom malnutricije, dijabetesa, Kušingovog sindroma, kao i kod osoba koje su bile zlostavljane u detinjstvu (Chrousos i Gold, 1992; Tsigos i Chrousos, 2002; Gold, 2014).

Četiri specifične komponente fiziološkog odgovora organizma na stres, navedene su u Tabeli I.

**Tabela I.** Specifične komponente fiziološkog odgovora organizma na stres.

<p><b>Promene u ponašanju</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uspostavljanje stanja umerene anksioznosti</li> <li>• Izmene u pažnji i kogniciji</li> <li>• Osećaj emocionalne i/ili mentalne nelagodnosti i nezadovoljstva</li> <li>• Izmene u obradi informacija vezanih za zadovoljstvo i nagrađivanje</li> </ul>
<p><b>Metaboličke i promene nivoa hormona i neurotransmitera</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktivacija HPA osovine i porast koncentracije kortizola</li> <li>• Aktivacija simpatikusa i <i>locus ceruleus</i>-a</li> <li>• Aktivacija monoaminergičke transmisije</li> <li>• Aktivacija glutamatergičke transmisije</li> <li>• Blaga inflamacija i rezistencija na insulin</li> </ul>
<p><b>Promovisanje integriteta nervnih ćelija</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pojačana ekspresija neurotrofičnih faktora</li> <li>• Aktivacija neurogeneze</li> <li>• Povećanje plastičnosti neurona</li> </ul>
<p><b>Aдекватno održavanje odgovora na stres</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktiviranje mehanizama koji će održavati adekvatan odgovor dokle god za njim postoji potreba, kao i njegov blagovremeni prestanak</li> </ul>

Potvrđeno je da hronično povišen nivo kortizola dovodi do poremećaja aktivnosti HPA osovine, što nalikuje stanju koje je Bruce McEwen (2007) definisao kao alostatsko opterećenje ili preopterećenje (eng. *allostatic load or overload*). Ovakvo stanje može biti rezultat preteranog delovanja stresora ili neefikasnog odvijanja alostaze, kao što je, na primer, nemogućnost prekidanja fiziološkog odgovora na stres kada za njim više ne postoji potreba (McEwen, 2007). Kod pacijenata koji boluju od

nekog oblika depresivnog poremećaja, takođe je veoma često povišena koncentracija kortizola u plazmi, što ukazuje na neadekvatnu aktivnost HPA osovine. Međutim, kod određenog broja pacijenata koji boluju od depresivnog poremećaja, vrednost ovog hormona u plazmi može biti i normalna (Rubin i sar., 1987; Ciufolini i sar., 2014). Na izmenjenu aktivnosti HPA osovine kod pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja ukazuje i neuobičajeni odgovor nakon testa supresije deksametazonom, koji se takođe zapaža i kod osoba sa visokim porodičnim rizikom za razvoj depresije (Naughton, 2014). Kod zdravih osoba, nakon aplikacije deksametazona, koncentracija kortizola u plazmi ostaje snižena tokom naredna 24 časa. S druge strane, kod oko 70% pacijenata sa depresijom lučenje kortizola nije suprimirano nakon tretmana deksametazonom, ili supresija traje kraće od 24 časa (Naughton, 2014). Veliki broj studija potvrđuje mišljenje da u depresiji postoji značajan poremećaj mehanizma negativne povratne sprege uključenog u regulaciju aktivnosti HPA osovine (Young i sar., 2000; Johnson i sar., 2006, Naughton, 2014). U skladu sa navedenim su i rezultati proučavanja pacijenata sa Kušingovim sindromom, iz kojih se može zaključiti da ovi pacijenti u određenoj meri razvijaju simptome slične onima koji se javljaju u depresiji (Johnson i sar., 2006).

### **1.2.2. Eksperimentalni modeli hroničnog stresa i depresivnog ponašanja**

U cilju razumevanja kompleksne patofiziologije depresije, sproveden je veliki broj studija na laboratorijskim životinjama. U svrhu razvoja validiranih predkliničkih modela hroničnog stresa, primenjivano je nekoliko različitih pristupa i metodologija, najčešće u toku vremenskog perioda od 21 dana. Opisani su različiti animalni modeli hroničnog stresa (Gregus i sar., 2005; Sancora i sar., 2012; Yin i sar., 2016) koji pored ostalog podrazumevaju: izlaganje životinja ponavljanom stresu koji uključuje ograničavanje kretanja i/ili fizičko onesposobljavanje (Watanabe i sar., 1992; Magarinos i McEwen, 1995; Conrad i sar., 1999), primenu hroničnog stresa imobilizacije (Kvetnansky i sar., 1970; Vyas i sar., 2004; Radley i sar., 2005; Kvetnansky i sar., 2016), hroničnu izloženost visokim dozama glukokortikoida (npr. tretman kortikosteronom kod glodara) (Johnson i sar., 2006; Cerqueira i sar., 2007; Donner i sar., 2012), zatim hroničnom nepredvidivom stresu (kao što je postavljanje

kaveza pod izvesnim uglom, periodi bez hrane i vode, promene u režimu svetlo-tama, vlažna prostirka) (Wilner, 2005; Ulrich-Lai i sar., 2006). Nadalje, korišćeno je izlaganje eksperimentalnih životinja hroničnom blagom stresu (Michelsen i sar., 2007; Bessa i sar., 2009), izlaganje stresnim stimulusima tokom ranog neonatalnog perioda, na primer odvajanje od majke (Huot i sar., 2001; Vyas i sar., 2002), kao i stres socijalne izolacije (Grippe i sar., 2009; Jovanović i sar., 2016). U navedenim modelima javljaju se neke od promena karakterističnih za depresivne poremećaje, kao što su povećanje anksioznosti, anhedonija i disfunkcija HPA osovine eksperimentalnih životinja. Hronična primena glukokortikoida, bilo putem vode, hrane ili putem injekcija, smatra se izuzetno često korišćenim animalnim modelom hroničnog stresa koji kod eksperimentalnih životinja dovodi do razvoja depresivnih poremećaja. Ovaj model je proizišao iz rezultata velikog broja studija sprovedenih tokom poslednje četiri decenije, koje su nedvosmisleno potvrdile činjenicu da je hiperaktivnost HPA osovine jedan od najkonzistentnijih bioloških nalaza u psihijatriji velikog depresivnog poremećaja, iako konkretni mehanizmi koji stoje u osnovi ove hiperaktivnosti još uvek nisu poznati (Pariante i Lightman, 2008).

Potvrđeno je da egzogena administracija kortikosterona glodarima, kao eksperimentalni model hroničnog stresa koji se koristi umesto izlaganja životinja delovanju fizičkog ili psihološkog stresora, dovodi do karakterističnih neurobioloških i bihevioralnih promena veoma sličnih onima koje se javljaju prilikom izloženosti jedinke delovanju hroničnog stresa i rezultuje razvojem depresivnog fenotipa (Sterner i Kalynchuk, 2010). U navedenom preglednom radu (Sterner i Kalynchuk, 2010), autori su sumirali rezultate nekoliko desetina studija u kojima je administracija kortikosterona eksperimentalnim životinjama, bilo u obliku *s.c.* injekcije, *s.c.* implanta ili putem vode za piće, dovela do promena u ponašanju, kao i strukturnih i molekularnih poremećaja, koje su sumirane u Tabeli II. Sve zapažene promene javljaju se i tokom disfunkcije HPA osovine, koja se zapaža u situacijama izloženosti hroničnom stresu kao i u depresivnoj psihopatologiji.

**Tabela II.** Sličnosti u efektima egzogene administracije kortikosterona i manifestacije depresivnih poremećaja kod ljudi. Prikazani su rezultati velikog broja studija koje su podrazumevale različite načine administracije kortikosterona (*s.c.*, *per os*, putem implantata), kao i različite dužine trajanja samih tretmana (7 do 180 dana), (*modifikovano prema referenci: Sterner i Kalynchuk, Progr. Neuro-Psychopharm. Biol. Psych. 2010*)

Kategorija simptoma	Manifestacija kod ljudi	Manifestacija kod životinja	Administracija i tretman
Simptomi depresije	Depresivno raspoloženje, manjak energije, osećaj bespomoćnosti i bezvrednosti	↑ imobilnosti u FST testu ↓ timarenje	<i>s.c.</i> , <i>per os</i> , <i>s.c.</i> implantat; 7-35 dana
	Anhedonija	↓ unos zaslađenog rastvora, ↓ reakcija na nagradu, ↓ seksualno ponašanje	<i>s.c.</i> , <i>per os</i> ; 10-28 dana
	Promene telesne mase	↓↑ dobijanje na težini	<i>s.c.</i> , <i>per os</i> , <i>s.c.</i> implantat; 7-56 dana
Simptomi anksioznosti	Simptomi pojačane razdražljivosti	↑ defanzivno ponašanje ↑ nepomičnost u testu FC ↓ vreme u otvorenim kracima EPM ↓ vreme u centralnoj zoni OFT arene	<i>s.c.</i> , <i>per os</i> , <i>s.c.</i> implantat; 5-28 dana
Kognicija i memorija	Oštećenje prostorne memorije i izvršne funkcije	↓ memorije u reverznom MWM ↑ vremena do pronalazenja platforme u MWM ↑ broja grešaka u Barnes-ovom lavirintu i RAM ↓ istraživanja novog objekta u NORT testu	<i>s.c.</i> , <i>s.c.</i> implantat; 21-90 dana
Strukturni poremećaji	↓ volumena hipokampusa	↓ neurogeneze, ćelijske proliferacije i sinapsi Gubitak ćelija, atrofija dendrita	<i>s.c.</i> , <i>per os</i> , <i>s.c.</i> implantat; 5–180 dana
	↓ volumena prefrontalnog korteksa	↓ broja sinapsi, ↓ glija ćelija	<i>s.c.</i> ; 15 dana
	↑ volumena amigdala	Hipertrofija dendrita	<i>s.c.</i> ; 1-10 dana
Poremećaji na molekularnom nivou	↓ ekspresija BDNF	↓ ekspresija BDNF	<i>s.c.</i> , <i>s.c.</i> implantat; 10-21 dan
	↓ ekspresija CREB	↓ ekspresija CREB	<i>per os</i> ; 14 dana
	↓ ekspresija relina	↓ ekspresija relina	<i>s.c.</i> ; 21 dan

Skraćenice: FST: Test forsiranog plivanja; FC: test kondicioniranja strahom; EPM: uzdignuti plus lavirint; OFT: test otvorenog polja; MWM: Morisov vodeni lavirint; RAM: radijalni lavirint; NORT: test prepoznavanja novog objekta; BDNF: neurotrofički faktor poreklom iz mozga; CREB: cAMP zavisni transkripcioni faktor; *s.c.*: subkutano.



U studiji Gregus-a i saradnika (2005), korišćena su paralelno dva eksperimentalna tretmana, administracija egzogenog kortikosterona i fizičko sputavanje životinja, u periodu od 21 dana. U ovoj studiji, autori su ukazali na potencijalni problem prilikom upotrebe modela u kojem je stresni stimulus aplikovan od strane eksperimentatora, što je u ovom slučaju bilo fizičko sputavanje eksperimentalnih životinja. Konkretno, upotrebom ovakvih animalnih modela, kod životinja se mogu pojaviti znatne individualne razlike u stepenu aktivacije HPA osovine i sledstvenoj sekreciji kortikosterona. Kao rezultat, može doći do velikih razlika u koncentraciji ovog hormona u plazmi kod životinja iste eksperimentalne grupe. Činjenica je da se životinje izložene delovanju istog stresora mogu međusobno veoma razlikovati u brzini privikavanja na konkretnu manipulaciju. Upravo ove interindividualne razlike mogu kao posledicu imati veliki raspon koncentracija kortikosterona u plazmi, kao i razlike u ponašanju životinja izloženih delovanju istog stresora (Zhao i sar., 2008). Da bi se prevazišao navedeni problem varijabilnog efekta prilikom korišćenja različitih stresnih stimulusa, Gregus i saradnici (2005) predlažu upotrebu standardne doze egzogenog kortikosterona u periodu od 21 dan, kao optimalan model koji uzrokuje promene nalik onima koje se javljaju kod osoba izloženih hroničnom stresu, kao i kod pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja.

### **1.2.3. Uticaj promene aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda na ponašanje eksperimentalnih životinja**

Hronični tretman eksperimentalnih životinja kortikosteronom, glavnim glukokortikoidom glodara, u testovima ponašanja dovodi do karakterističnih promena, koje se mogu povezati sa promenama ponašanja koje se zapažaju kod osoba obolelih od nekog oblika depresivnog poremećaja. Tačnije, kod pacova kojima je aplikovan kortikosteron tokom tri nedelje, u testu forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST) dolazi do povećanja perioda imobilnosti kao i skraćanja perioda od početka testa do prve imobilne epizode (Johnson i sar., 2006; Donner i sar., 2012). FST test, poznat i kao Porsoltov test, je dobro validirani i veoma često korišćeni test za ispitivanje efikasnosti terapije antidepresivima, kao i antidepresivnog potencijala eksperimentalnih supstanci (Porsolt i sar., 2001). U ovom bihevioralnom testu "očaja", tretman

antidepresivima dovodi do značajnog povećanja vremena koje životinje provedu aktivno tražeći izlaz iz cilindra (plivanje, propinjanje i ronjenje), dok se značajno skraćuje vreme koje životinje provedu u imobilnom položaju (Porsolt i sar., 2001).

S druge strane, tokom izvođenja testa otvorenog polja (eng. Open field test, OFT), tretman glukokortikoidima kod životinja dovodi do povlačenja u mračne, periferne delove arene (Donner i sar., 2012; Svanidze i sar., 2012). Ovaj test se koristi za ispitivanje lokomotorne aktivnosti i želje eksperimentalnih životinja za istraživanjem novog prostora (Prut i Belzung, 2003). Povećanje anksioznosti, koje je čest komorbiditet depresivnih poremećaja, kod pacova izloženih blagom stresu dovodi do značajnog smanjenja lokomocije, a takođe i vremena koje životinje provode u centralnoj zoni OF arene (Kushwah i sar., 2016).

Uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM) se smatra pouzdanijim testom za ispitivanje anksioznosti pošto, za razliku od OFT, postavlja životinju pred "teži zadatak", u kome ona bira između ostanka u mračnim, zatvorenim kracima lavirinta i izlaska u aversivne, otvorene i svetle krake (Pellow i sar., 1985; Rodgers, 1997). U EPM testu, anksioznost životinja se ispoljava kao smanjenje broja ulaza u otvorene krake, i smanjenje vremena provedenog u otvorenim kracima ovog plus lavirinta (Pellow i sar., 1985). U studiji Nine Donner i saradnika (2012), *per os* administracija kortikostrona u dozi 400 mg/L, pokazala je jasan anksiojeni efekat u svim izvođenim testovima, OFT, EPM i testu socijalne interakcije. Takođe, i u drugim bihevioralnim testovima, kao što je test vešanja za rep glodara (eng. tail suspension test), evidentan je anksiojeni efekat tretmana kortikosteronom (Zhao i sar., 2008). Sličan efekat na ponašanje ispoljava se i nakon izlaganja eksperimentalnih životinja ponavljanim stresnim stimulusima, kao što su na primer električni nadražaji (Svanidze i sar., 2012). U studiji Grippo i saradnika (2009), stres socijalne izolacije kod glodara doveo je do promena u ponašanju koje se mogu povezati sa simptomima sličnim depresiji: povećanja vremena imobilnosti u FST testu i smanjenja unosa zaslađenog rastvora u testu preferencije saharoze, kojim se kvantifikuje pojava anhedonije. Ono što se jasno može zaključiti je da u velikom broju različitih animalnih modela hroničnog stresa dolazi do karakterističnih promena u ponašanju životinja koje podrazumevaju povećanje anksioznosti, anhedoniju i pojavu ponašanja sličnog depresivnom.

#### 1.2.4. Hronični stres, depresivni poremećaji i aktivnost nadbubrežne žlezde

U studiji Donner i saradnika (2012) tronedeljni tretman kortikosteronom ispoljio je uticaj na nadbubrežnu žlezdu, pre svega dovodeći do njene atrofije. U ovoj studiji, pokazano je značajno smanjenje mase i dijametra žlezde, kao i širine adrenalnog korteksa. Najintenzivniji uticaj je primećen u zoni fascikulati, što je i očekivano, s obzirom da se u njoj proizvodi najveća količina glukokortikoida. Poznato je da u cilju održavanja homeostaze u hromafinim ćelijama srži nadbubrega postoji ravnoteža između sinteze, sekrecije i preuzimanja kateholamina. Noradrenalinski transporter (eng. Noradrenaline transporter, NAT) pripada familiji monoaminergičkih transportera i ima ulogu u regulaciji ekstracelularne koncentracije neurotransmitera, ali i endokrinih kateholamina, nakon njihovog sinaptičkog i nesinaptičkog oslobađanja (Amara i sar., 1998; Hoffman i sar., 1998). DNK koja kodira ovaj transporter izolovana je iz uzoraka humanog, goveđeg i tkiva pacova (Paczkowski i sar., 1999; Lingen i sar., 1994) i eksprimirana je, u zavisnosti od tipa ćelija, i u centralnom nervnom sistemu (Lorang i sar., 1994; Pau i sar., 1997). Na periferiji, ekspresija NAT je opisana i detektovana i na membrani hromafinih ćelija u srži nadbubrežne žlezde (Cubells i sar., 1995; Kippenberger i sar., 1999). Neuroendokrine hromafine ćelije srži nadbubrega imaju isto embrionalno poreklo kao postganglijska simpatikusna nervna vlakna i njihova osnovna uloga je sekrecija adrenalina i noradrenalina tokom fiziološkog odgovora organizma na stres (Phillips i sar., 2001). U meduli, prisustvo NAT je detektovano isključivo na ćelijama koje sintetišu i sekretuju adrenalin (Phillips i sar., 2001), što navodi na pretpostavku da su upravo ove ćelije odgovorne za preuzimanje oslobođenih kateholamina nazad u hromafine ćelije. Takođe, ovaj transporter poseduje nisku selektivnost, tako da, pored noradrenalina, može efikasno da transportuje i adrenalin (Paczkowski i sar., 1999). Uz to, do sada još nije identifikovan transporter specifičan samo za adrenalin (Phillips i sar., 2001).

Sekreciji kateholamina, bez obzira da li su *de novo* sintetisani ili preuzeti nazad u hromafine ćelije, prethodi pakovanje u neurosekretorne vezikule (Tillinger i sar., 2010). Vezikularni monoaminski transporteri (eng. Vesicular monoamine transporters, VMATs) se nalaze na membrani vezikula i imaju ulogu u procesu "pakovanja" monoamina iz citoplazme u same vezikule (Kanner i Schuldiner, 1987; Henry i sar.,

1994). VMAT transporter postoji u dve izoforme, VMAT1, kod glodara dominantno eksprimiran u neuroendokrinim ćelijama (srž nadbubrežne žlezde, tanko crevo) i VMAT2, koji je prvenstveno zastupljen u perifernom, centralnom i enteričkom nervnom sistemu (Weihe i sar., 1994). Međutim, utvrđeno je da, u uslovima stresa, izoforma VMAT2 dobija veći fiziološki značaj jer počinje da se eksprimira i u hromafinim ćelijama. U ovakvim uslovima, kao što je na primer primena stresa imobilizacije kod pacova, primetno je povećanje količine kateholamina u srži nadbubrežne žlezde, koje, uz povećane količine VMAT2 i veći afinitet monoamina za VMAT2 (Tillinger i sar., 2010), omogućava hromafinim ćelijama da adekvatno reaguju na povećan zahtev za kateholaminima u toku fiziološkog odgovora organizma na stres. Ekspresija iRNK, kao i količina ovih transportera u tkivu srži nadbubrega u različitim animalnim modelima intenzivno je proučavana. Santana i saradnici (2015) pokazali su da se kod miševa izloženih nepredvidivom blagom stresu razvija poremećaj funkcije adrenalne medule, u smislu smanjenja ekspresije iRNK za NAT i VMAT2, koje je donekle praćeno i smanjenjem količine proteina NAT i VMAT2 u tkivu, kao i da navedeni poremećaj može imati ulogu u razvoju depresivne simptomatologije. Imajući u vidu da poremećaji funkcije navedenih transportera za kateholamine u centralnom nervnom sistemu mogu biti uključeni u razvoj depresije indukovane stresom (Fan i sar., 2014), modulacija njihove ekspresije može predstavljati potencijalni mehanizam delovanja novih antidepresiva (Crowley i sar., 2008). Dodatno, i sama činjenica da se povećanje kapaciteta za skladištenje kateholamina u srži nadbubrežne žlezde smatra jednim od najvažnijih mehanizama adaptacije organizma na uslove hronične izloženosti stresu (Eisenhofer i sar., 2004), potvrđuje opravdanost ispitivanja ekspresije ova dva transportera u tkivu srži nadbubrežne žlezde pacova, u različitim modelima hroničnog stresa.

#### **1.2.5. Aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda i oksidativni stres**

Smatra se da štetni efekti hronično povišenog nivoa glukokortikoida u plazmi, bilo zbog dugotrajnog uticaja stresa (Dronjak i Gavrilović, 2005; Bouayed i sar., 2009; Spiers i sar., 2014) ili tretmana ovim hormonima (Orzechowski i sar., 2002; Zafir i

Banu, 2009; Gupta i sar., 2015), u velikoj meri mogu biti posledica povećane produkcije reaktivnih produkata kiseonika i azota (eng. Reactive oxygen species, ROS; Reactive nitrogen species, RNS). Ukoliko tokom dužeg vremenskog perioda postoji disbalans u stvaranju reaktivnih radikala i aktivnosti mehanizama antioksidativne zaštite, može doći do razvoja hroničnog oksidativnog stresa. Zafir i Banu (2009) su pokazali da su efekti hronične administracije kortikosterona na oksidativna oštećenja mozga, jetre i srca usled smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima i povećane lipidne peroksidacije slični efektima delovanja psiholoških stresora, kakav je na primer fizičko sputavanje životinje. Genotoksični efekti glukokortikoida (Bali i sar., 1990; Singh i sar., 1994; Flint i sar., 2007) takođe mogu biti posledica povećanog oksidativnog stresa (Liu i sar., 1996). Pokazano je da ROS i RNS mogu oštetiti DNK molekul dovodeći do prekida lanaca, unakrsnog povezivanja DNK, kao i povezivanja molekula DNK i proteina ili formiranja kompleksa sa izmenjenim baznim parovima. Pored toga, poremećaj mehanizma reparacije i uklanjanja pogrešnih baznih parova može negativno uticati na integritet i strukturu DNK molekula (Consiglio i sar., 2010).

Kako je pokazano da pojedini proinflamatorni citokini ( $\text{TNF}_\alpha$ , IL-1, IL-6) mogu različitim molekularnim mehanizmima aktivirati HPA osovinu (Mastorakos i sar., 1993), ispitivanje aktivnosti HPA osovine, pored praćenja nivoa adrenalnih hormona, takođe uključuje i analizu promena nivoa proinflamatornih citokina, kao i parametara oksidativnog stresa. Lokalna produkcija proinflamatornih citokina može da stimuliše i/ili održi povišenu aktivnost HPA osovine tokom hronične izloženosti organizma delovanju stresnih stimulusa (Silverman i sar., 2005), što za posledicu ima i poremećaj u produkciji parametara oksidativnog stresa. Lipidni hidroperoksidi (eng. Lipid hydroperoxide, LOOH) predstavljaju produkte oksidativne degradacije lipida i njihova povećana koncentracija u biološkom materijalu povezuje se sa pojačanim oksidativnim oštećenjem (Gay i sar., 2003). Degradacijom LOOH nastaje malondialdehid (eng. Malondialdehyde, MDA) koji se takođe smatra markerom oksidativnog stresa (Ayala i sar., 2014; Akman i sar., 2015). S druge strane, superoksid dizmutaza (eng. Superoxide dismutase, SOD) je enzim antioksidativne zaštite koji katalizuje razgradnju supeoksidnog radikala ( $\text{O}_2^-$ ) do molekularnog kiseonika ( $\text{O}_2$ ) ili vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Misra i Fridovich, 1972). Smanjenje aktivnosti ovog enzima u plazmi i drugim tkivima dovodi do smanjenja antioksidativnog potencijala čija je osnovna uloga zaštita

od oksidativnog oštećenja u uslovima pojačane produkcije slobodnih radikala (Misra i Fridovich, 1972).

### **1.2.6. Uticaj hroničnog stresa i depresije na neurogenezu u hipokampusu**

Kod pacijenata obolelih od nekog oblika depresivnog poremećaja primetne su promene na specifičnim moždanim strukturama. Prevažodno su opisane promene koje podrazumevaju atrofiju hipokampusa i prefrontalnog korteksa, kao i hipertrofiju amigdala (Duman i Duman, 2015). S obzirom da fiziološki odgovor organizma na delovanje različitih psiholoških stresora podrazumeva aktivaciju neuroendokrinog odgovora, koji uključuje i uticaj glukokortikoida na inhibiciju ćelijske proliferacije i sazrevanje progenitorskih ćelija u adultnom hipokampusu (Fitzsimons i sar., 2016), hronično povišen nivo glukokortikoida za posledicu ima značajno smanjenje stvaranja novih neurona u ovoj oblasti mozga. Međutim, precizni mehanizmi ovakvog efekta stresa, i pre svega glukokortikoida, na proliferaciju matičnih ćelija neurona i dalje nisu poznati i predmet su sve većeg broja najnovijih istraživanja iz oblasti neuronauka (Fitzsimons i sar., 2016).

Novije studije koje su usmerene na (pojavu) ispitivanje "adultne neurogeneze" unele su dosta entuzijazma, ali i skepticizma, u naučna istraživanja. Tehnička ograničenja u istraživanju procesa nastajanja novih neurona tokom zrelog doba, naročito u humanoj populaciji, smanjivala su verovatnoću da se može dobiti naučna potvrda činjenice da je adultna neurogeneza značajna za održavanje normalne moždane aktivnosti (Egeland i sar., 2015). Međutim, podaci dobijeni iz skorašnjih studija sprovedenih na kulturama ćelija upućuju na zaključak da se adultna neurogeneza kod ljudi u značajnoj meri odigrava tokom čitavog života (Spalding i sar., 2013; Welberg, 2013), kao i da mnoge funkcije dentatnog girusa (eng. dentate gyrus, DG), kao i samog hipokampusa, najverovatnije podrazumevaju i aktivaciju ovako nastalih novih neurona (Egeland i sar., 2015). Na primer, mnogi autori postavili su hipotezu da razvoj novih neurona doprinosi povećanju neuronske plastičnosti, koja ima pozitivan uticaj na proces adaptacije (Kempermann, 2012). Razvoj ove teorije postavio je proces adultne neurogeneze u okvire evolutivnog značaja, s obzirom da je dobro poznato da povećanje

kapaciteta adaptacije ima velikog značaja u preživljavanju i prilagođavanju organizma tokom izloženosti različitim životnim izazovima kao što je na primer hronična izloženost stresu (Egeland i sar., 2015). Hipokampus je struktura mozga koja se primarno povezuje sa procesima formiranja i pozivanja memorije, učenjem i orijentacijom u prostoru (Egeland i sar., 2015). Međutim, takođe se smatra da hipokampus ima veliki značaj i u regulaciji raspoloženja i odgovora organizma na stres. Hipokampus je bogat glukokortikoidnim receptorima (GR), što ga čini izuzetno osetljivim na povišene vrednosti ovih hormona i može uticati na prevashodno suprimirajuću ulogu koju hipokampus ima u regulaciji aktivnosti HPA osovine (Sapolsky i sar., 1983; Workman i sar., 2014). Smatra se da GR imaju ulogu transkripcionih faktora, koji mogu delovati kao aktivatori ili supresori i na taj način regulisati deobu i razvoj novonastalih ćelija (Egeland i sar., 2015). Takođe, smatra se da glukokortikoidi ispoljavaju i indirektno efekte putem uticaja na glija ćelije, interneurone i okolnu vaskulaturu (Egeland i sar., 2015). Povišen nivo glukokortikoida dovodi do funkcionalnih promena u neuronima, smanjenja neurogeneze i plastičnosti, uključujući i gubitak neurona i redukciju remodelovanja dendrita što je pokazano kod eksperimentalnih životinja (Workman i sar., 2013, 2014), ali i kod depresivnih pacijenata (Sheline, 1996; Sheline i sar., 1999, 2003; Campbell i sar., 2004). Veruje se da su upravo procesi definisanja odgovora organizma na stres regulisani kroz odvijanje procesa neurogeneze, mada još uvek nisu poznati precizni mehanizmi ovakve regulacije. U prvim studijama iz ove oblasti na glodarima, pokazano je da izloženost stresu ima najizraženiji efekat u subgranularnoj zoni dentatnog girusa (Cameron i Gould, 1994). Akutna ali i hronična izloženost stresu značajno smanjuje ćelijsku proliferaciju u ovoj oblasti (Schoenfeld i Gould, 2012). U modelu hroničnog nepredvidivog blagog stresa kod glodara, pokazana je smanjena neurogeneza, otežano snalaženje pri daljem izlaganju životinje delovanju istog stresora, kao i razvoj depresivnog fenotipa (Wong i Herbert, 2004; Mirescu i Gould, 2006). U skladu sa ovim nalazima su i rezultati novijih studija na različitim animalnim modelima hroničnog stresa i depresije koji ukazuju na činjenicu da je proces adultne neurogeneze od izuzetnog značaja za regulaciju odgovora organizma na delovanje različitih stresora (Egeland i sar., 2015). Novonastali neuroni mogu ublažiti neuroendokrini odgovor na stres i na taj način delovati kao svojevrsni "puferi stresa" (Snyder i sar., 2011; Surget i

sar., 2011). Identifikacija molekularnih mehanizama koji leže u osnovi negativne modulacije procesa neurogeneze, primećene tokom izloženosti jedinke stresu i tokom razvoja depresivne simptomatologije, mogu dati značajne podatke o potencijalnim „ciljnim mehanizmima“ koji mogu poslužiti kao osnova za razvoj novih terapijskih režima ovakvih patoloških stanja (Cameron i Gould, 1994; Gould i sar., 1997).

Neurotrofični faktori su od izuzetnog značaja za razvoj i preživljavanje novonastalih neurona, kao i za normalno funkcionisanje zrelih neurona (Egeland i sar., 2015). Iz tog razloga ne iznenađuje činjenica da ovi faktori imaju veliki značaj u procesu adultne neurogeneze. Jedan od najzastupljenijih neurotrofina u mozgu je neurotrofični faktor poreklom iz mozga (eng. Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) koji pomaže preživljavanje postojećih i omogućava rast i diferencijaciju novih neurona i sinapsi (Huang i sar., 2001). Pokazano je da stres utiče na ekspresiju nekoliko različitih neurotrofičnih faktora u mozgu, uključujući i BDNF (Mahar i sar., 2013). Takođe, utvrđeno je da su stres, depresija i neurogeneza povezani sa promenama u ekspresiji BDNF, mada još uvek nije u potpunosti razjašnjeno na koji način BDNF utiče na ove procese. Na primer, akutni stres dovodi do reverzibilnog smanjenja ekspresije iRNK za BDNF i količine ovog proteina u hipokampusu, upućujući na zaključak da je ekspresija BDNF pod velikim uticajem ne samo stresa kao takvog, već i dužine njegovog trajanja (Gray i sar., 2013). Takođe, u studiji Schmidt-a i Duman-a (2007) pokazano je da BDNF dovodi do modulacije aktivnosti drugih neurotrofičnih faktora, kao što je vaskularni faktor rasta endotela što ukazuje i na njegove indirektno efekte na neurogenezu. U skladu sa ovim, u novijoj studiji Waterhouse-a i saradnika (2012) potvrđeno je da je potencijacija diferencijacije i sazrevanja novih neurona delimično posledica stimulacije oslobađanja inhibitornog neurotransmitera GABA iz interneurona pod uticajem BDNF. Jedan od mehanizama negativnog uticaja stresa na ekspresiju BDNF može biti i uticaj samih glukokortikoida, za koje je potvrđeno da dovode do inhibicije ekspresije ovog neurotrofičnog faktora u različitim tipovima ćelija kao i kulturama neurona (Matrisciano i sar., 2011). Uz to, pored direktnog delovanja na ekspresiju BDNF, glukokortikoidi utiču i na njegov signalni put, što uključuje regulaciju nivoa i aktivnosti mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) i fosfolipaze Cy, koje su zavisne od BDNF (Suri i Vaidya, 2013). Ova međusobna povezanost aktivnosti BDNF i glukokortikoida, koja može biti od velikog značaja za



proces adultne neurogeneze, potvrđena je i u tkivu hipokampusa u *in vitro* studijama. Naime, u kulturi neurona hipokampusa koji su u fazi razvoja, pokazano je da je razvoj dendrita i glutamatnih receptora indukovano BDNF-om, blokiran nakon tretmana glukokortikoidima, kao i to da tretman glukokortikoidima dovodi do smanjenog influksa  $Ca^{2+}$  u zrele neurone (Kumamaru i sar., 2008). Činjenica da je ekspresija BDNF smanjena u uslovima izloženosti stresu, kao i da kod glodara određene vrste antidepresiva dovode do pozitivne modulacije njegove ekspresije (Dwivedi i sar., 2006), otvara put istraživanjima novih supstanci koje bi povećavanjem ekspresije neurotrofičnih faktora imale pozitivan efekat kod pacijenata obolelih od nekog oblika poremećaja raspoloženja.

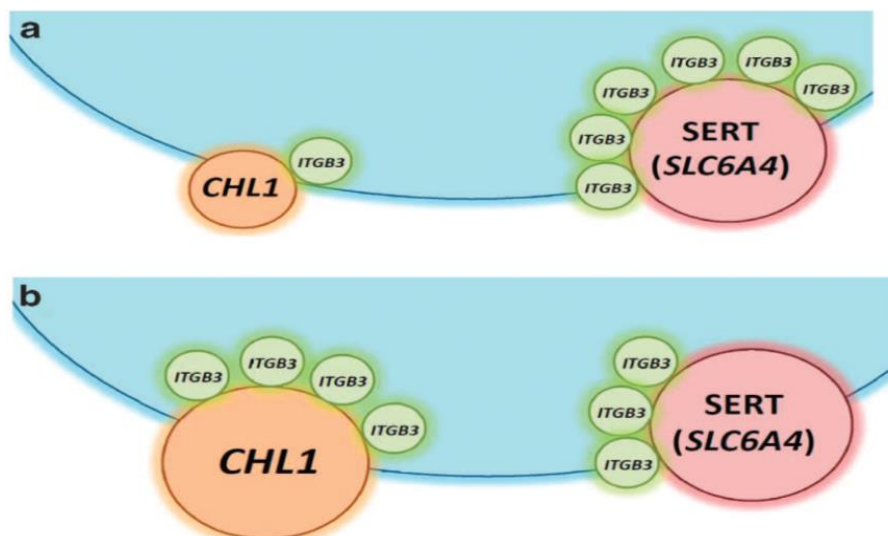
Pored BDNF, markerom neurogeneze smatra se i nuklearni faktor Ki-67, koji se eksprimira u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa i predstavlja marker ćelijske proliferacije (Scholzen i Gerdes, 2000; Bullwinkel i sar., 2006). Hronična izloženost stresnim stimulusima dovodi do smanjenja ćelijske proliferacije. To je pokazano u studiji gde je izlaganje stresu mladunaca pacova dovelo do smanjenja ekspresije Ki-67 proteina u regiji hipokampusa (Bath i sar., 2016). Takođe, aplikacija deksametazona mladuncima miševa (Noorlander i sar., 2014) i pacova (Claessens i sar., 2012) dovela je do značajnog smanjenja volumena hipokampusa, kao i broja ćelija koje ekspimiraju Ki-67 u ovoj moždanoj regiji. Ovi rezultati ukazuju da štetni efekti glukokortikoida na adultnu neurogenezu u hipokampusu, mogu biti i posledica smanjene proliferacije ćelija u ovoj oblasti, što se ogleda u redukciji ekspresije faktora Ki-67 u neuronima.

### **1.3. Terapija depresije selektivnim inhibitorima preuzimanja serotonina**

Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (eng. Selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI), kao što su paroksetin, citalopram i drugi, predstavljaju lekove prvog izbora u terapiji pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja još od '80-tih godina (Gelenberg, 2010; Clark i sar., 2012). Ovi lekovi poseduju veliki afinitet vezivanja za

presinaptički transporter za serotonin, čime inhibiraju njegovu aktivnost. Na taj način povećava se količina serotonina u centralnom nervnom sistemu, prvenstveno u talamusu i prefrontalnom korteksu (van Praag i sar., 1987; Price i sar., 1990). Međutim, kod pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja, prvi efekti terapije antidepresivima vidljivi su tek nakon tri nedelje njihove primene, dok se bioraspoloživost serotonina povećava već nakon nekoliko dana (Gelenberg, 2010; Clark i sar., 2012). Ova saznanja su navela na zaključak da su, pored stimulacije serotoninske transmisije, još neki mehanizmi delovanja SSRI terapije uključeni u nastanak remisije i redukcije simptoma depresije. U prethodnim godinama je pokazano da antidepresivi iz grupe SSRI, pored povećanja raspoloživosti serotonina, deluju stimulatorno na procese sinaptogeneze i neurogeneze (Thomas i Peterson, 2008; Eisch i Petrik, 2012) i migraciju hipokampalnih matičnih ćelija (Thomas i Peterson, 2008), za čiji je tok potreban duži vremenski period i za koje se smatra da imaju ulogu u remisiji depresivnih simptoma. Na koji način SSRI utiču na gorenavedene procese, nije poznato. Kako preko 30% pacijenata ne odgovori na terapiju lekovima prvog izbora, postoji potreba za pronalaženjem biomarkera koji bi omogućili pouzdano predviđanje povoljnog odgovora svakog pojedinačnog pacijenta na terapiju. Identifikacija biomarkera dobrog odgovora na SSRI terapiju značajno bi poboljšala izbor leka i adekvatne doze i na taj način u velikoj meri pomogla lekarima (Oved i sar., 2012). U tu svrhu se od nedavno koriste farmakogenomska ispitivanja, a studija Oved i saradnika (2013) na limfoblastoidnim ćelijskim linijama, pokazala je da se posle hronične primene paroksetina povećava ekspresija gena za integrin beta 3 (eng. Integrin beta-3, ITGB3). Protein ITGB3, kodiran ovim genom, značajan je za aktivnost serotoninskog transportera, kao i za proces sinaptogeneze, podsticanjem ćelijske adhezije i formiranja veza između susednih ćelija (Oved i sar., 2013). ITGB3 reguliše jačinu ekscitatorne sinaptičke transmisije (Cingolani i Goda, 2008), kao i ekspresiju AMPA receptora za glutamat u hipokampusu (Pozo i sar., 2012), što može imati pozitivan uticaj na formiranje novih sinapsi, a što s druge strane može voditi ka remisiji depresivnih simptoma (Hanson i sar., 2012; Eisch i Petrik, 2012). Smatra se da je za proces remisije depresivnih simptoma od velikog značaja formiranje novih veza između neurona, prvenstveno u prefrontalnom korteksu (Thomas i Peterson, 2008; Eish i Petrik, 2012). Takođe, pokazano je da je prisustvo ITGB3 neophodno za aktivnost adhezionog molekula nervnih ćelija sličnog proteinu L1 (eng. Close homolog of L1,

CHL1). Niska ekspresija CHL1 molekula, koji je takođe uključen u procese neurogeneze i sinaptogeneze, povezana je sa većom osetljivošću ćelijskih kultura na paroksetinom indukovanu inhibiciju rasta (Oved i sar., 2013). U vezi sa ovim nalazom, Oved i saradnici (2013) postavili su hipotezu o međusobnoj interakciji ITGB3, CHL1 i molekula serotoninskog transportera (SERT). Ova hipoteza je proistekla iz rezultata studija na *Itgb3-knockout* miševima kod kojih je aktivnost SERT-a bila drastično smanjena (Carneiro i sar., 2008), što ukazuje na činjenicu da je ITGB3 potreban za normalnu aktivnost SERT-a. Integrini takođe interaguju sa CHL1 molekulom i neophodni su za aktivnost ovog molekula u procesima ćelijske migracije i razvoja neurona (Buhusi i sar., 2003; Demyanenko i sar., 2004; Schlatter i sar., 2008). Pretpostavlja se da u ćelijskoj membrani postoji kompeticija CHL1 i SERT za ograničeni broj molekula ITGB3 (Slika 3). Smanjenje broja molekula CHL1 ili povećanje gustine ITGB3 molekula omogućava da veća količina ITGB3 interaguje sa SERT transporterom, povećavajući njegovu aktivnost (Oved i sar., 2013). U tom slučaju, može se očekivati povećana osetljivost i bolji odgovor na terapiju antidepresivima iz grupe SSRI, što CHL1 i ITGB3 molekule čini dobrim biomarkerima povoljnog odgovora pacijenata na terapiju ovim lekovima i određivanje ekspresije ovih molekula može doprineti uspešnom farmakogenomskom pristupu terapiji pacijenata koji boluju od depresivnih poremećaja.



**Slika 3.** Pretpostavljeni međusobni odnos membranskih proteina CHL1 i SERT, i njihova kompeticija oko ograničenog pula ITGB3. **a)** Pri niskoj ekspresiji CHL1, više ITGB3 je na raspolaganju SERT, povećavajući mu aktivnost. **b)** Pri visokoj ekspresiji CHL1, više ITGB3 interaguje sa CHL1, ostavljajući manju količinu za SERT, što se može negativno odraziti na aktivnost ovog transportera. Skraćenice: CHL1, adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1; SERT, serotoninški transporter; SLC6A4, gen koji kodira SERT protein; ITGB3, integrin beta 3. (preuzeto iz reference: Oved, K., i sar., *Transl. Psych.*, 2013)

## 2. CILJEVI RADA

Imajući u vidu sve prethodno navedeno, istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom imala su za cilj ispitivanje uticaja hormona oksitocina na ponašanje i parametre aktivnosti HPA osovine u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane dugotrajnom primenom kortikosterona kod pacova Wistar soja. Takođe, cilj je bio i da se ispita kakav je efekat dodatnog tretmana oksitocinom uz antidepresiv citalopram, iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, lekova prvog izbora u terapiji pacijenata koji boluju od nekog od depresivnih poremećaja.

Da bi se realizovali postavljeni ciljevi, istraživanja ove disertacije bila su podeljena u tri faze.

U **prvoj eksperimentalnoj fazi**, ispitivan je uticaj akutnog i subhroničnog tretmana primenom dve doze oksitocina: 0.25 IU/400  $\mu$ L i 10 IU/400  $\mu$ L, na ponašanje i nivo biogenih amina u plazmi eksperimentalnih životinja. Cilj prve eksperimentalne faze bio je da se ispituju:

- Promene u ponašanju životinja korišćenjem sledećih testova: test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT), uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM) i test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST).
- Eventualne promene koncentracija adrenalina, noradrenalina i serotonina u plazmi.
- Konačno, cilj je bio da se odredi koja doza i trajanje tretmana oksitocinom ispoljava značajan uticaj na analizirane parametre, te da se nadalje koristi u daljim fazama istraživanja.

U **drugoj eksperimentalnoj fazi**, cilj je bio da se ispita uticaj subhroničnog tretmana oksitocinom u dozi od 10 IU/400  $\mu$ L, na ponašanje i parametre aktivnosti HPA osovine eksperimentalnih životinja, u modelu hroničnog stresa/depresije izazvane hroničnom primenom kortikosterona. U drugoj fazi istraživanja, u navedenom modelu, cilj je bio da se ispita uticaj eksperimentalnih tretmana na:

- Promenu telesne mase, kao i unos hrane i vode eksperimentalnih životinja.
- Ponašanje životinja korišćenjem baterije testova ponašanja koju su sačinjavali testovi: OFT, EPM i FST.
- Na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde određivanjem apsolutne mase, površine korteksa i srži ekvatorijalnih isečaka žlezde, kao i različitih zona unutar korteksa žlezde i zapremine krvnih sudova u srži; promenu ekspresije gena i količine proteina za transportere za noradrenalin (eng. Noradrenaline transporter, NAT) i vezikularni monoaminski transporter 2 (eng. Vesicular monoamine transporter 2, VMAT2) u srži nadbubrega; bazalnu i stresom indukovanu aktivnost nadbubrežne žlezde određivanjem koncentracije hormona adrenalina, noradrenalina i kortikosterona u uzorcima plazme.
- Parametre oksidativnog stresa u krvi životinja određivanjem bazalnog oštećenja DNK limfocita periferne krvi i stepena oštećenja nakon *in vitro* tretmana vodonik peroksidom. Takođe, cilj je bio i da se odrede koncentracije lipidnih hidroperoksida (eng. Lipid hydroperoxide, LOOH), malondialdehida (eng. Malondialdehyde, MDA) i aktivnost enzima superoksid dizmutaze (eng. Superoxide dismutase, SOD) u uzorcima plazme.
- Gustinu i distribuciju ćelija koje ispoljavaju parametre od značaja za neurogenezu: neurotrofični faktor poreklom iz mozga (eng. Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) i nuklearni faktor Ki-67 u hipokampusu, strukturi mozga za koju je pokazano da je značajno izmenjena kod pacijenata koji boluju od nekog od depresivnih poremećaja.

U **trećoj eksperimentalnoj fazi** disertacije, ispitivan je uticaj subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) u animalnom modelu depresije uz tretman citalopramom, koji pripada antidepressivima iz grupe SSRI. Cilj eksperimenata treće faze bio je da se ispituju efekti kombinovanog tretmana oksitocinom i citalopramom praćenjem:

- Ponašanja eksperimentalnih životinja korišćenjem baterije testova ponašanja koju su sačinjavali testovi: OFT, EPM i FST.

- Promena u ekspresiji gena za integrin beta 3 (eng. Integrin beta-3, ITGB3) i adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (eng. Close homolog of L1, CHL1) u tkivu prefrontalnog korteksa, koji kodiraju proteine za koje se pretpostavlja da su dobri biomarkeri povoljnog odgovora na terapiju antidepresivima SSRI grupe.

### **3. MATERIJAL I METODE**

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

U eksperimentalnom radu korišćeni su pacovi Wistar nesrodničkog ("outbred") soja, muškog pola, starosti 8 nedelja na početku eksperimenta, sa farme laboratorijskih životinja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su odgajane u štalici Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Pacovi su grupno (3-4 životinje) čuvani u providnim pleksiglas kavezima dimenzija 25 cm×41 cm×15 cm, pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 21±2 °C, relativna vlažnost vazduha 50% - 60% i režim 12 h svetlo – 12 h mrak) i sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Kavezi su čišćeni i šuška menjana tri puta nedeljno. Takođe, jednom nedeljno je praćen utrošak hrane i vode (po kavezu) kao i porast telesne mase svake životinje pojedinačno. Rad sa eksperimentalnim životinjama je izveden u skladu sa propisima Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, broj dozvole: 323-07-00067/2015-05.

#### **3.2. Eksperimentalni protokol**

Studija je obuhvatila tri grupe eksperimenata.

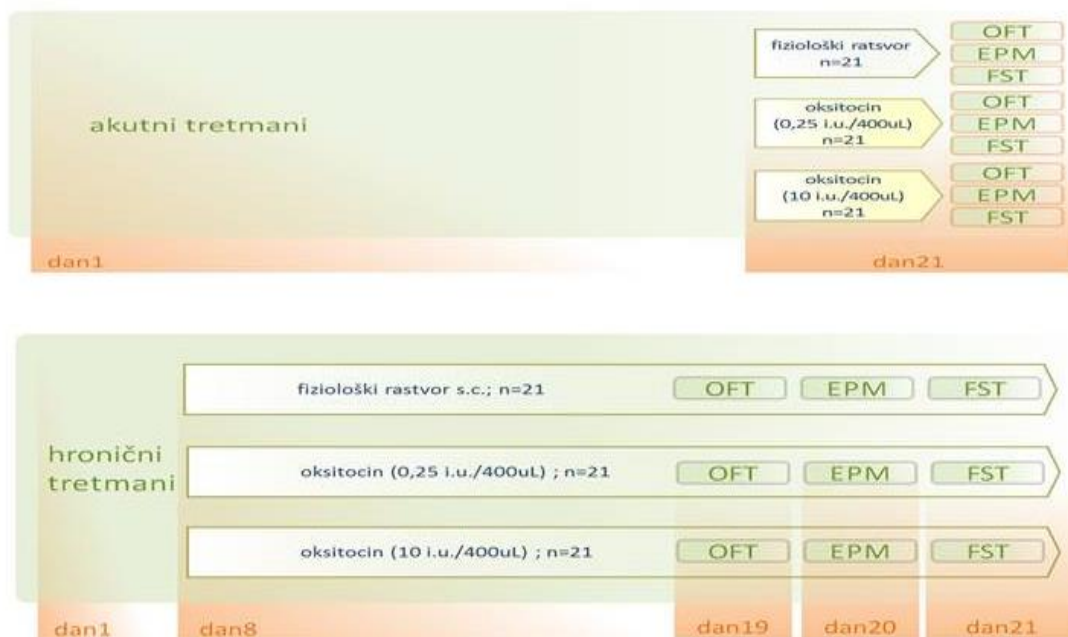
U **prvoj grupi** eksperimenata ispitivan je uticaj akutnog i subhroničnog tretmana okistocinom na 1) ponašanje eksperimentalnih životinja kao i 2) nivo biogenih amina: adrenalina, noradrenalina i serotonina, u plazmi eksperimentalnih životinja.

**Druga grupa** eksperimenata imala je za cilj ispitivanje efekata subhroničnog tretmana oksitocinom na 1) ponašanje eksperimentalnih životinja, 2) parametre aktivnosti HPA osovine u plazmi: adrenalina, noradrenalina i kortikosterona, 3) odgovor HPA osovine na akutni stres životinja, 4) parametre oksidativnog stresa u



plazmi i stepen oštećenja DNK limfocita periferne krvi i 5) parametre koji podržavaju adultnu neurogenezu u hipokampusu, u animalnom modelu depresije indukovane hroničnom primenom kortikosterona.

Cilj **treće grupe** eksperimenata bio je da se ispita dodatni efekat dvonedeljnog tretmana oksitocinom uz tretman antidepresivom citalopramom. Citalopram, kao antidepresiv koji pripada grupi selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (eng. Selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), predstavlja tipičan lek prvog izbora u tretmanu depresivnih poremećaja. U trećoj fazi eksperimenta praćeni su efekti tretmana na 1) ponašanje eksperimentalnih životinja i 2) ekspresiju gena za ITGB3 i CHL1, proteine za koje se smatra da su potencijalni biomarkeri povoljnog odgovora na terapiju antidepresivima iz grupe SSRI.

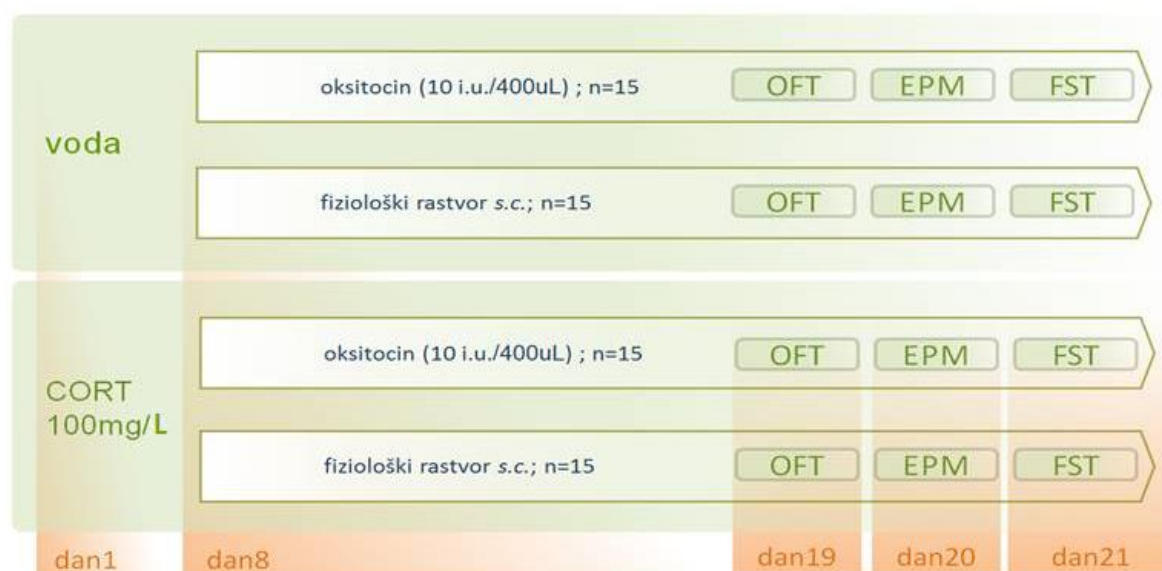


**Slika 4.** Eksperimentalne grupe i tretmani prve faze istraživanja.

U celokupno istraživanje bilo je uključeno ukupno 291 životinja. U prvoj fazi istraživanja, životinje (n=126) su nasumično podeljene u šest eksperimentalnih grupa (n=21) u zavisnosti od tretmana (Slika 4): oksitocin u dve doze (0.25 IU/400  $\mu$ L i 10

IU/400  $\mu$ L, *s.c.*) jednokratno i subhronično, tokom 14 dana). Kontrolne grupe životinja su, umesto oksitocina, primale fiziološki rastvor (400  $\mu$ L, *s.c.*).

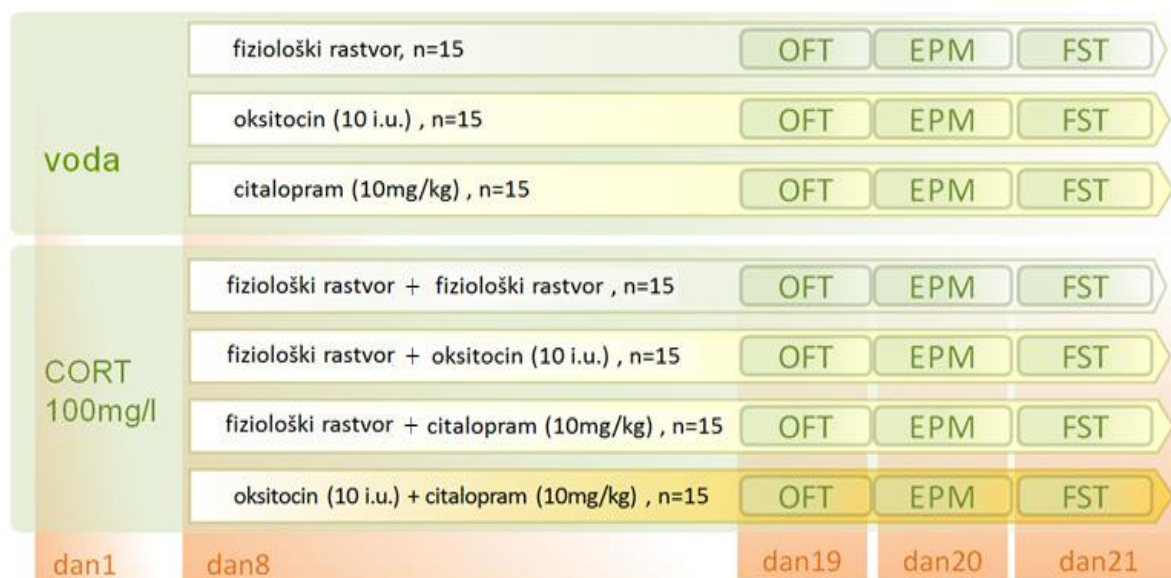
U drugoj fazi istraživanja, životinje su (n=60) nasumično podeljene u četiri eksperimentalne grupe (Slika 5). Prva grupa životinja je dobijala *per os* rastvor kortikosterona (100 mg/L, 21 dan). Druga grupa primala je oksitocin (10 IU/400  $\mu$ L *s.c.*, tokom 14 dana). Treća grupa životinja bila je tretirana kombinacijom ova dva tretmana (10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* oksitocina tokom poslednjih 14 dana tretmana kortikosteronom). Životinje kontrolne grupe su dobijale fiziološki rastvor (400  $\mu$ L) 14 dana *s.c.* i, umesto rastvora kortikosterona, 21 dan rastvarač *per os*.



**Slika 5.** Algoritam druge faze istraživanja: eksperimentalne grupe i tretmani. Skraćenica: CORT, kortikosteron. Skraćenice: CORT, kortikosteron.

U trećoj fazi istraživanja, koja podrazumeva ispitivanje eventualnog dodatnog uticaja oksitocina na efekte antidepresiva citaloprama, životinje (n=105) su nasumično podeljene u sedam eksperimentalnih grupa (n=15) i pored kontrolne grupe (1) koja je dobijala fiziološki rastvor (400  $\mu$ L) *s.c.* tokom 14 dana i rastvarač *per os* tokom 21 dan, izložene sledećim tretmanima: (2) oksitocin u dozi 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.*, tokom 14 dana (OXY), (3) citalopram u dozi 10 mg/kg TM, *s.c.*, tokom 14 dana (CIT), (4) kortikosteron 100 mg/L, 21 dan, *per os*, tokom 21 dan (CORT), (5) kortikosteron i

okситocin tokom poslednjih 14 dana tretmana kortikosteronom (CORT+OXY), (6) kortikosteron i citalopram tokom poslednjih 14 dana tretmana kortikosteronom (CORT+CIT) i (7) oksitocin i citalopram tokom poslednjih 14 dana tretmana kortikosteronom (CORT+OXY+CIT) (Slika 6).



**Slika 6.** Algoritam treće faze istraživanja: eksperimentalne grupe i tretmani. Skraćenice: CORT, kortikosteron.

Nakon završenih eksperimenata, životinje su žrtvovane uvođenjem u opštu anesteziju upotrebom 50 mg/kg *i.p.* natrijum-tiopental (Nesdonal<sup>®</sup>, Roche, Švajcarska). Puna krv za analize je prikupljena kardijačnom punkcijom. Moždano tkivo je izolovano i iz jedne serije izdvojeni su prefrontalni korteksi i hipokampusi za RT-PCR analizu. Ovi uzorci su čuvani u ependorficama u RNA Later-u (QUIAGEN., kat. br. 76106, SAD) na -80 °C do analiziranja. Druga serija uzoraka moždanog tkiva eksperimentalnih životinja je odmah po žrtvovanju sprovedena i kalupljena u parafinu za imunohistohemijsku analizu. Nadbubrežne žlezde su pažljivo vađene, razdvajane od okolnog masnog i vezivnog tkiva, a potom je merena masa organa. Jedna grupa organa je sprovedena za histološku analizu po standardnom protokolu, dok je druga grupa čuvana na -80 °C do analize količine proteina i iRNK za kateholaminske transportere.

### 3.2.1. Hemijske supstance korišćene za tretmane

Kortikosteron (Sigma Aldrich Co., kat. br. C2505, SAD) je rastvaran u 2% rastvoru polisorbata 80 (Tween<sup>®</sup> 80, Fargon, kat. br. 102254, SAD) u česmenskoj vodi. S obzirom da je ovaj hormon fotosenzitivan, pojilice sa rastvorom kortikosterona su uvijane u aluminijumsku foliju da bi se sprečila njegova degradacija. Oksitocin (Sigma-Aldrich Co., kat. br. O3251, SAD) je rastvaran u fiziološkom rastvoru do finalnih koncentracija 0.625 IU/mL i 25 IU/mL, kako bi se dobila odgovarajuća doza koja je korišćena za tretmane (0.25 IU/400  $\mu$ L, odnosno 10 IU/400  $\mu$ L). Citalopram hidrobromid (Actavis, kat.br. 01D\_22114624, Bugarska) je rastvaran u fiziološkom rastvoru u koncentraciji 10 mg citaloprama/mL. Kontrolnim grupama životinja je umesto rastvora kortikosterona davan rastvarač (2% Tween 80<sup>®</sup>) *per os* i 400  $\mu$ L fiziološkog rastvora *s.c.* tokom 14 dana. Sveže pripremljeni rastvori su aplikovani svakoga dana u isto vreme (između 9:00 i 10:00 h).

### 3.3. Testovi ponašanja: Test otvorenog polja, Uzdignuti plus lavirint i Test forsiranog plivanja

Kako bi se ispitala anksioznost i ponašanje životinja koje se može povezati sa depresijom, korišćeni su sledeći testovi ponašanja: test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT), uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM) i test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST).

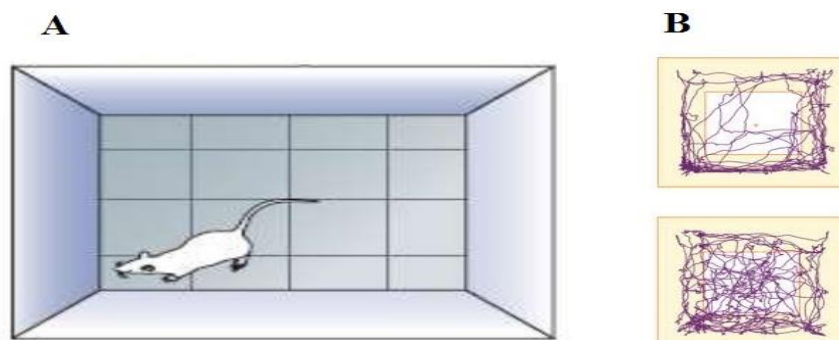
U prvoj eksperimentalnoj fazi, od životinja koje su primale akutne tretmane je nasumičnim odabirom korišćeno po 7 životinja za izvođenje svakog testa ponašanja pojedinačno. Životinje koje su primale subhronične tretmane u prvoj eksperimentalnoj fazi, kao i životinje druge i treće faze eksperimenta, testirane su baterijom bihevioralnih testova po sledećem rasporedu: test otvorenog polja (OFT), uzdignuti plus lavirint (EPM) i test forsiranog plivanja (FST). Razmak između dva testa ponašanja bio je 24 časa. Kako bi se izbegao efekat jednog testa na ponašanje životinja

ispitivano drugim bihevioralnim testom, prvo je izvođen najmanje stresan test, a na kraju test koji je izvor najvećeg stesa za eksperimentalne životinje. Svi testovi ponašanja izvođeni su između 9:00 i 15:00 h u zvučno izolovanoj i slabo osvetljenoj prostoriji pod infracrvenim svetlom. Prostorija je bila opremljena digitalnom kamerom povezanom sa softverom ANY-maze (Stoelting Co., Velika Britanija), kojim su dobijeni rezultati analizirani. Aparature korišćene u izvođenju testova ponašanja su čišćene i dezinfikovane nakon završetka testa svake eksperimentalne životinje.

### 3.3.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT)

Test otvorenog polja služio je za ispitivanje eksplorativne/istraživačke aktivnosti, kao i ponašanja povezanog sa povećanom anksioznošću eksperimentalnih životinja. Test je izvođen u ograđenom, kvadratnom, drvenom polju, dimenzija 100x100 cm, sa crnim gumenim podom i 40 cm visokim zidovima (Slika 7) u trajanju od 10 min. Na početku testa, životinja je postavljana u centar polja, a praćeni su sledeći parametri:

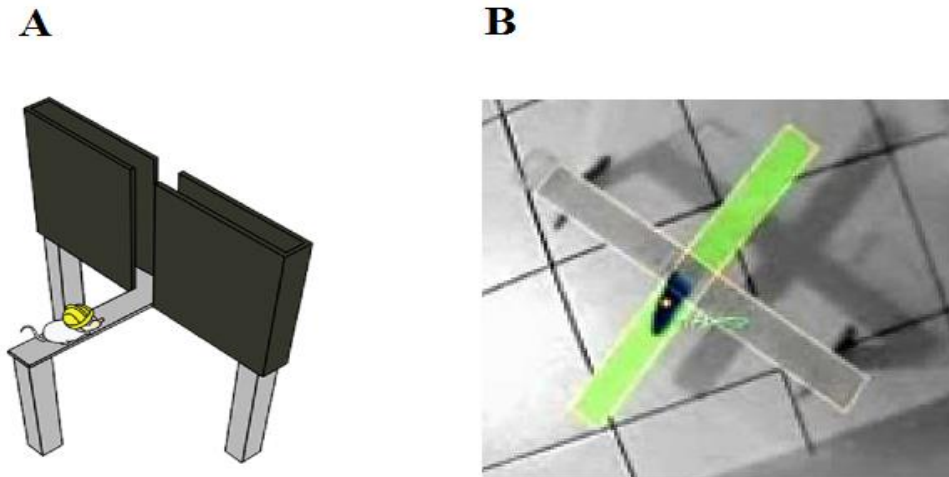
- Ukupni pređeni put životinje,
- Vreme provedeno u centralnoj zoni OF arene,
- Broj ulaza u centralnu zonu OF arene,
- Vreme provedeno u imobilnom položaju.



**Slika 7.** Test otvorenog polja (OFT): A. Šematski prikaz aparature; B. Ukupni pređeni put eksperimentalne životinje (prikaz rezultata putanja kretanja životinja zabeleženih korišćenjem AnyMaze® softvera). (preuzeto sa: <https://www.slideshare.net/AdvaitaMv/screening-of-anxiolytics-44529278>)

### 3.3.2. Uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM)

Uzdignuti plus lavirint (EPM) je često korišćen test za određivanje stepena anksioznosti eksperimentalnih životinja. Arenu za izvođenje EPM testa činila je uzdignuta drvena platforma oblika znaka plus (+) sa crnim, gumenim podom (Slika 8).



**Slika 8.** Uzdignuti plus lavirint (EPM): A. Šematski prikaz EPM platforme; B. AnyMaze® snimak EPM testa u realnom vremenu. (preuzeto sa: <https://mazeengineers.com/elevated-plus-maze-test/> i <https://www.youtube.com/watch?v=UjvnG5BquiM>)

Platforma se sastojala od dva zatvorena kraka dimenzija 10×50 cm, sa 40 cm visokim zidovima sa obe strane i na kraju kraka, i dva otvorena kraka istih dimenzija. Visina platforme iznosila je 50 cm. Svi kraci su međusobno povezani kvadratnom zonom dimenzija 10×10 cm, bez zidova. Na početku svakog petominutnog testa, životinja je postavljana u centralnu kvadratnu zonu, okrenuta uvek ka istom zatvorenom kraku EPM platforme. EPM test je izvođen u trajanju od 5 min. Praćeni su sledeći parametri anksioznosti životinje:

- Broj ulazaka životinje u otvorene krake EPM platforme,
- Vreme provedeno u otvorenim kracima EPM platforme.

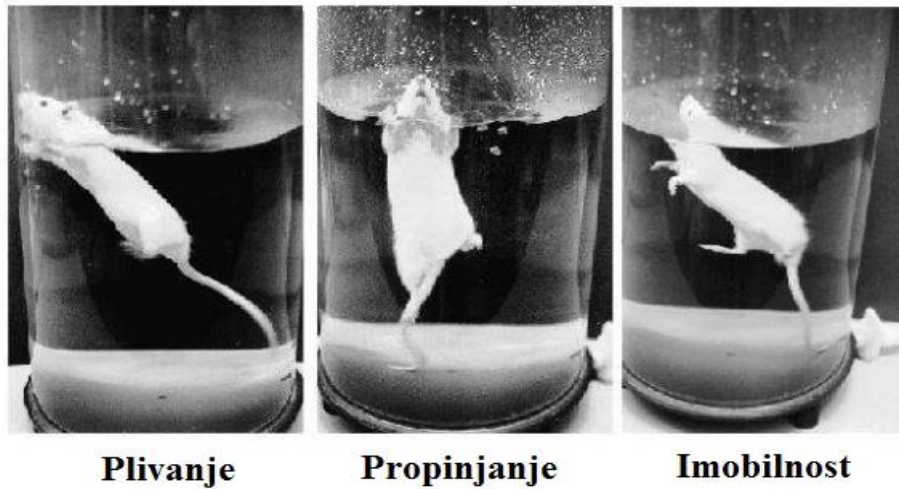
### **3.3.3. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST)**

Test forsiranog plivanja (FST) se smatra bihevioralnim modelom "očaja", i široko je u upotrebi kao test za validaciju antidepresivnog potencijala eksperimentalnih supstanci (Porsolt i sar., 2001). Protokol FST testa podrazumeva trening eksperimentalnih životinja u trajanju od 15 min. Nakon 24 časa izvođen je petominutni test, čiji su snimci naknadno analizirani merenjem vremena koje životinja provede u nekom od prethodno definisanih položaja. Za izvođenje FST testa, životinje su postavljane u providan stakleni cilindar (visine 45 cm i dijametra 20 cm) (Slika 9), koji je napunjen vodom temperature 22-25 °C. Visina vode u cilindru je bila podešavana kako bi svaka životinja plivala pod uslovima koji su onemogućavali izlazak iz cilindra i dodir sa dnom cilindra nogom ili repom. Nakon završetka svakog FST testa, cilindar je opran i voda u njemu zamenjena čistom česmenskom vodom. Odmah nakon izvođenja FST testa, životinje su brisane peškirom, postavljane pored grejalice i nakon toga vraćene u svoj kavez.

Parametri koji su određivani i analizirani su:

- Vreme koje životinja provede u imobilnom položaju,
- Latentno vreme (vreme od početka testa do prve imobilne epizode),
- Vreme koje životinja provede plivajući,
- Vreme koje životinja provede propinjući se na zidove cilindra,
- Broj zaranjanja životinje.





**Slika 9.** Prikaz testa forsiranog plivanja (FST) sa tri karakteristična analizirana ponašanja eksperimentalnih životinja. (preuzeto sa: <https://www.slideshare.net/urchauhan/in-vivo-model-of-depression>)

### **3.4. Izolacija proteina iz srži nadbubrežne žlezde i hipokampusa i određivanje količine proteina "Western blot" metodom**

Količina dva najznačajnija transportera za kateholamine, noradrenalinaskog transportera (eng. Noradrenaline transporter, NAT) i vezikularnog transportera za monoamine 2 (eng. Vesicular monoamine transporter 2, VMAT2) određivana je u uzorcima srži nadbubrežne žlezde, dok je u hipokampusu određivana količina neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (eng. Brain derived neurotrophic factor, BDNF).

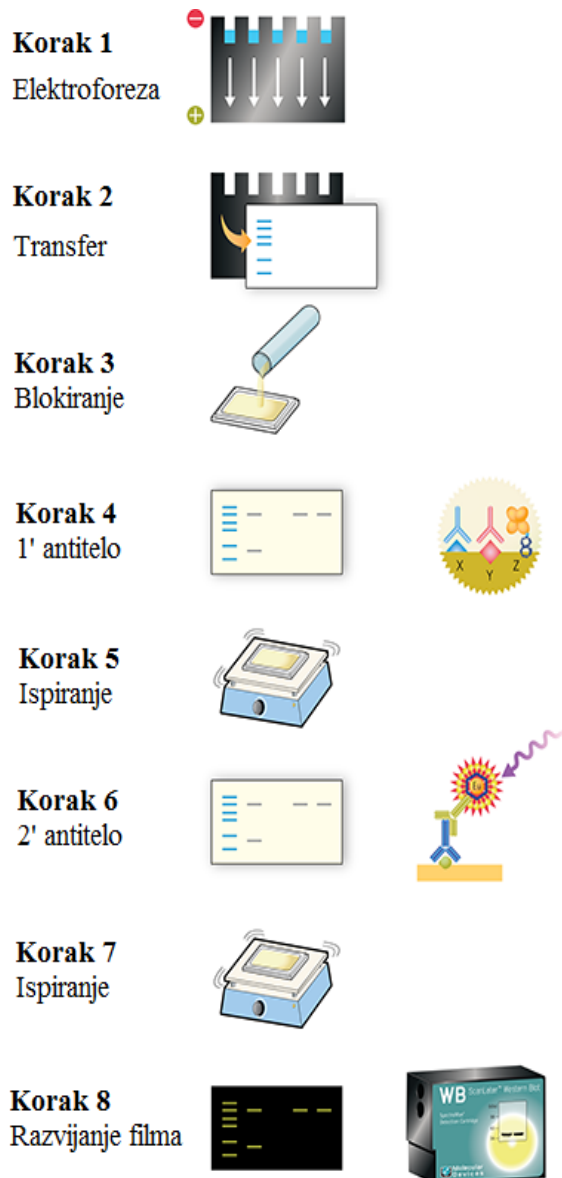
#### **3.4.1. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)**

Iz uzoraka nadbubrežne žlezde čuvanih na -80 °C, neposredno pred analizu korteks je mehanički uklonjen na ledu. Dobijeno tkivo srži, kao i tkivo hipokampusa (čuvano na -80 °C nakon izolovanja prilikom žrtvovanja) su homogenizovani u 300 µL



RIPA lizirajućeg pufera (Santa Cruz Biotechnology, kat. br. sc-24948, Heidelberg, Nemačka) na 4 °C pomoću ultraturske homogenizera T8 IKA-WERKE. Homogenizati su ostavljeni 1 h na 4 °C da liziraju i centrifugirani na 12.000×g tokom 20 min na 4 °C. U dobijenom supernatantu je određivana količina ukupnih proteina po metodi Lowry-ja i saradnika (1951). Kao standard za određivanje koncentracije proteina korišćen je goveđi serumski albumin (eng. Bovine serum albumine, BSA, Sigma Aldrich Co., kat. br. A2058, SAD) u koncentracijama 0.2-10 mg/mL. Merenje je rađeno u duplikatu za svaki uzorak i standardni rastvor. Koncentracije proteina u uzorcima su svedene na istu vrednost (3 mg/mL) razblaživanjem sa redestilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O).

Neposredno pred elektroforetsko razdvajanje, uzorci su pomešani sa puferom za pripremu uzoraka proteina za SDS-poliakrilamid gel elektroforezu (SDS-PAGE) (62.5 mM Tris-HCl, Sigma Aldrich Co., kat. br. T6666, SAD, pH=6.8, 10% glicerol, 2% SDS, Sigma Aldrich Co., kat. br. L3771, SAD, 0.002% bromfenolplavo, Sigma Aldrich Co., kat. br. B0126, SAD 5% β-merkaptotanol, Sigma Aldrich Co., kat. br. M6250, SAD) u odnosu 1:1 tako da su finalne koncentracije u uzorcima bile 1.5 mg/mL. Posle kuvanja na 100 °C tokom 5 min, uzorci su ohlađeni i po 30 μL pripremljenih uzoraka (oko 45 μg ukupnih proteina) je nanošeno i razdvajano na osnovu molekulske mase pomoću 10% denaturišuće SDS-poliakrilamid gel elektroforeze. Elektroforeza je rađena na sistemu Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD). Proteini su prvo koncentrovani na 4% gelu (0.5 M Trizma<sup>®</sup> baza, Sigma Aldrich Co., kat. br. T1503, SAD, pH=6.8, 30% akrilamid-bisakrilamid, Sigma Aldrich Co., kat. br. A2917, SAD, 10% SDS, Sigma Aldrich Co., kat. br. L3771, SAD, TEMED, Sigma Aldrich Co., kat. br. T9281, SAD i ddH<sub>2</sub>O), dok je sama elektroforeza trajala oko 90 min pri konstantnom naponu od 100 V na sobnoj temperaturi, u puferu za elektroforezu koji sadrži 0.25 M Trizma<sup>®</sup> bazu (Sigma Aldrich Co., kat. br. T1503, SAD), 0.192 M glicin (Sigma Aldrich Co., kat. br. G8898, SAD), 0.1% SDS (Sigma Aldrich Co., kat. br. L3771, SAD) i ddH<sub>2</sub>O. Radi lakšeg i preciznijeg lokalizovanja ispitivanih proteina, na svaki gel nanoseni su i proteini poznatih molekulske masa PageRuler<sup>™</sup> Plus Prestained protein Ladder (Thermo Scientific, kat. br. 26619, Massachusetts, SAD), kao i standardni uzorak radi anuliranja eventualne greške u proceduri. Dobijeni gelovi korišćeni su za Western blot analizu.



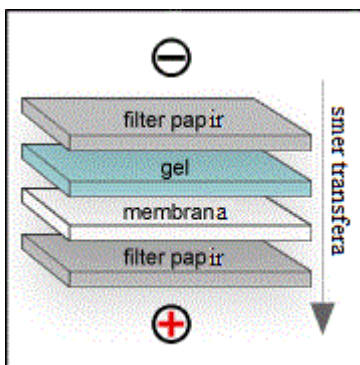
**Slika 10.** Postupak izvođenja Western blot analize: Nakon elektroforeze (korak 1) izvršen je transfer proteina sa gela na PVDF membranu (korak 2) i tako dobijena membrana blokirana je inkubacijom u 5% rastvoru nemasnog mleka u prahu (korak 3). Nakon inkubacije sa 1' antitelom (korak 4) i ispiranja u TBTS-u (korak 5), sledi inkubacija sa 2' antitelom (korak 6) i ponovno ispiranje membrane u TBST-u (korak 7). Na kraju, nanošenjem supstrata za hemiluminescenciju, vršena je vizuelizacija 2' antitela (korak 8).

(preuzeto sa: <https://www.moleculardevices.com/systems/microplate-readers/multi-mode-readers/scanlater-western-blot-detection-cartridge#tab-1>)

Western blot analiza (Slika 10) podrazumeva postupak prenosa proteina sa elektroforetskog gela na polivinilidendifluorid (PVDF) membranu i, nakon toga, detekciju specifičnih proteina upotrebom odgovarajućih primarnih i sekundarnih antitela spregnutih sa enzimom.

### 3.4.2. Transfer proteina sa gela na membranu

Gelovi dobijeni elektroforezom su potapani u pufer za transfer (20% metanol, Sigma Aldrich Co., kat. br. 322415, SAD, 0.025 M Tris-HCl, Sigma Aldrich Co., kat. br. T6666, SAD i 0.192 M glicin, Sigma Aldrich Co., kat. br. G8898, SAD, pH=8.3). PVDF membrana (Hybond™ P, Amersham Bioscience, GE Healthcare, kat. br. 10600023, Buckinghamshire, Velika Britanija) je prvo aktivirana potapanjem u 100% metanol (Sigma Aldrich Co., kat. br. 322415, SAD) tokom 15 s, a zatim je 2 min ispirana u ddH<sub>2</sub>O i potapana u pufer za transfer. Nakon 10 min, formiran je "sendvič" (Slika 11), koji se sastojao od gel blot papira Whatman GB003 (Whatman Inc., kat. br. WHA10427804, Velika Britanija), poliakrilamidnog gela, PDVF membrane i Whatman GB003 papira, redom. Sve komponente "sendviča" su prethodno natopljene transfer puferom.



**Slika 11.** Šematski prikaz Western blot "sendviča". (preuzeto sa: <http://www.cardio-research.com/protocols/western-blot>)

Sendvič je postavljen u aparat za vlažni transfer Trans-Blot Cell sistema (Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD). Sistem je zatim napunjen puferom za transfer vodeći računa da sendvič bude potpuno potopljen. Prenos proteina sa gela na PVDF membranu je trajao preko noći, na 4 °C pri konstantnoj amperazi od 20 mA po gelu.

### 3.4.3. Imunodetekcija proteina

Da bi se utvrdila efikasnost transfera, membrane su bojene 1% rastvorom Ponceau S (Sigma-Aldrich Co., kat. br. P3504, SAD) u 5% sirćetnoj kiselini, nakon čega je boja uklanjana ispiranjem ddH<sub>2</sub>O. Zatim, membrane su blokirane inkubacijom u

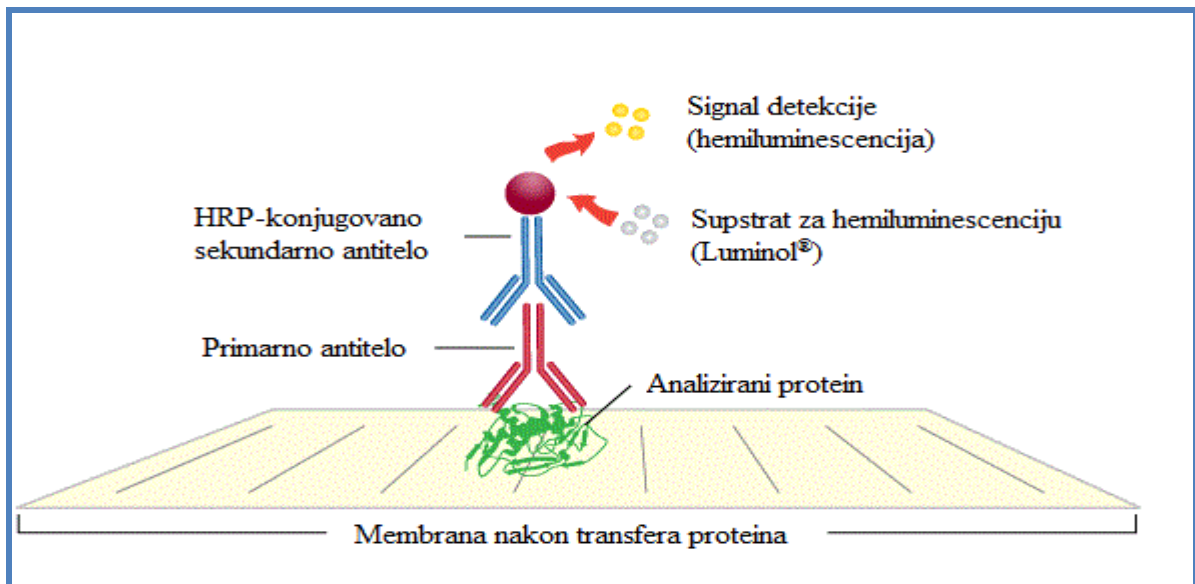
5% rastvoru nemasnog mleka u prahu u TBST puferu (eng. Tris-buffered saline-Tween, TBST) (50 mM Tris-HCl, Sigma Aldrich Co., kat. br. T6666, SAD, pH=7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Tween<sup>®</sup> 20, Sigma Aldrich Co., kat. br. P9416, SAD) na sobnoj temperaturi, na šejkeru u trajanju od 1 h. Nakon toga, membrana je sečena na odgovarajućim molekulskim masama i inkubirana sa primarnim antitelima preko noći na 4 °C. Po završenoj inkubaciji, membrane su ispirane 3 puta po 15 min u TBST puferu na sobnoj temperaturi, uz mešanje na šejkeru, a zatim inkubirane 1.5 h uz mešanje sa odgovarajućim sekundarnim anti-zečijim ili anti-mišijim antitelom konjugovanim sa HRP-om. Karakteristike svih primarnih i sekundarnih antitela korišćenih u Western blot analizi, kao i njihova razblaženja, prikazana su u Tabeli III.

Nakon ponovnog ispiranja (tri puta po 15 min u TBST puferu), nanošen je supstrat za hemiluminiscenciju (Immobilion<sup>™</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corp., kat. br. WBLKS0500, Billerica, SAD) kojim je izvršena vizuelizacija sekundarnog antitela (Slika 12).

Detekcija traka rađena je u mračnoj sobi pod infracrvenom svetlosti na filmovima ORTHO CP-GU X-ray film (AGFA, Belgija) u kaseti za detekciju Hypercassette (Amersham Life Science, SAD). Membrana je postavljena između dve providne folije, a preko membrane je stavljan film. Dužina ekspozicije je varirala od 1–10 min, dok je intenzitet dobijenog signala, koji je odgovarao količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima, određivan denzitometrijski. Filmovi su skenirani i signal kvantifikovan upotrebom programa za obradu slike ImageJ Ver. 2.0, Macintosh, SAD. Izmerene vrednosti signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražene u arbitrarnim jedinicama (a.u.). Sve vrednosti su izražene u odnosu na signal β-aktina sa istog blota.

**Tabela III.** Karakteristike i razblaženja primarnih i sekundarnih antitela korišćenih u Western blot analizi.

Antitelo	Proizvođač	Kat. Br.	Karakteristike	Razblaženje
Anti-NET	Abcam, UK	ab41559	Primarno zečje poliklonalno antitelo	1:1000 (TBST)
Anti-VMAT 2	Abcam, UK	ab81855	Primarno zečje poliklonalno antitelo	1:5000 (TBST)
Anti-BDNF	Abcam, UK	ab72439	Primarno zečje poliklonalno antitelo	1:1000 (TBST)
Anti- $\beta$ -Actin	Abcam, UK	ab8226	Primarno mišje monoklonalno antitelo	1:2500 (TBST)
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	Abcam, UK	ab6721	Sekundarno zečje poliklonalno antitelo	1:5000 (TBST)
Goat Anti-Mouse IgG HRP	Abcam, UK	ab6789	Sekundarno mišje poliklonalno antitelo	1:5000 (TBST)

**Slika 12.** Ilustracija mehanizma detekcije Western blot signala. (preuzeto sa: [http://www.leinco.com/general\\_wb](http://www.leinco.com/general_wb))

### **3.5. Izolacija iRNK i lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)**

Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (RT-PCR) izvođena je u cilju ispitivanja ekspresije gena *Slc6a2* i *Slc18a2* koji kodiraju dva najznačajnija transportera za kateholamine u tkivu srži nadbubrežne žlezde, NAT i VMAT2. Uzorci žlezde su do analiziranja čuvani na -80 °C.

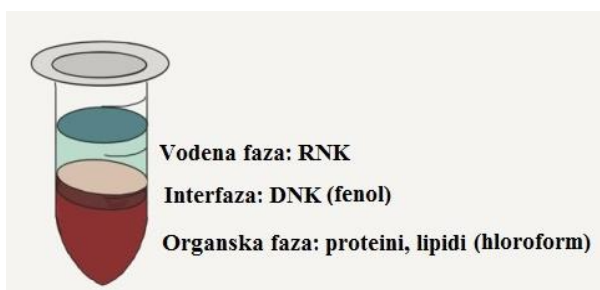
Kako bi se ispitala ekspresije gena *Itgb3* i *Chl1*, koji kodiraju proteine ITGB3 i CHL1, koji se smatraju potencijalnim biomarkerima povoljnog odgovora pacijenata na tretman antidepresivima iz grupe SSRI, takođe je izvođena RT-PCR analiza. U tkivu prefrontalnog korteksa ispitivan je nivo genske ekspresije ova dva biomarkera, iz uzoraka dobijenih tokom izvođenja treće eksperimentalne faze. Uzorci su do analiziranja čuvani u rastvoru RNA-later (QUIAGEN., kat. br. 76106, SAD) na -80 °C.

#### **3.5.1. Ekstrakcija ukupne RNK i merenje koncentracije spektrofotometrijskom metodom**

Ekstrakcija ukupne RNK iz uzoraka srži nadbubrega i prefrontalnog korteksa izvršena je upotrebom Trizol<sup>®</sup> reagensa (Invitrogen, kat. br. 10-296-028, Kalifornija, SAD) u sterilnim uslovima. Neposredno pre izvođenja analize, izolovana je srž iz uzoraka nadbubrežne žlezde mehaničkim odstranjivanjem korteksa na ledu.

DEPC voda je napravljena dodavanjem 0.1 mL dietilpirokarbonata 97% NMR (Sigma-Aldrich, kat. br. D5758, Nemačka) sterilnoj, redestilovanoj vodi. Nakon toga, rastvor je autoklaviran i resuspendovan u sterilne epruvete. Analizirano tkivo je preneto u ependorfice u koje je prethodno ispipetirano 300-1000 µL Trizola<sup>®</sup> (Invitrogen, kat. br. 10-296-028, Kalifornija, SAD) (4 °C), i postavljeno u termo blokove za hlađenje. Homogenizacija tkiva je vršena pomoću ultratureks homogenizera T8 IKA-WERKE (IKA, Nemačka). Pre rada, homogenizer je ispiran 1 min u ddH<sub>2</sub>O, zatim u DEPC vodi

i nakon toga u Trizolu<sup>®</sup>. Ovaj postupak je ponavljan pre homogenizacije svakog ispitivanog uzorka. Da bi se sprečilo uništavanje RNK toplotom, tkivo je homogenizovano više puta u maksimalnom trajanju od 20 s, a u pauzama je uzorak držan na ledu. Dobijeni supernatant je razliven u ependorfice i inkubiran 5 min na 30 °C u termostatu (Eppendorf Termostat Plus, Nemačka). Potom je dodat hloroform (Sigma-Aldrich, kat. br. 288306, Nemačka) u zapremini od 1/5 volumena Trizola<sup>®</sup>. Uzorci su blago ručno promućkani i inkubirani 3 min na 30 °C u termostatu i nakon toga centrifugirani na 4 °C na 12.000×g u trajanju od 20 min. Tokom centrifugiranja dolazi do razdvajanja tri faze, kao što je prikazano na Slici 13.



**Slika 13.** Faze u procesu izolacije RNK: gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza u kojoj se nalazi DNK i donja faza u kojoj se nalaze lipidi i proteini. (preuzeto sa: <https://insitutech.wordpress.com/2016/05/28/trizol-total-rna-isolation/>)

Nakon centrifugiranja, gornja, bistra faza (u kojoj se nalazi ekstrahovana ukupna RNK) je pažljivo ispipetirana u sterilne ependorfice postavljene u termo blok za hlađenje na 4 °C. Uzorcima je dodat 3 M Na-acetat, pH=5.0, i to 1/10 zapremine dobijenog supernatanta. Nakon mešanja na vorteksu, dodata je dvostruka zapremina (u odnosu na ukupnu zapreminu u ependorfici) 96% etanola ohlađenog na -20 °C. Uzorci su promešani i ostavljeni na -20 °C preko noći. Sutradan, uzorci su promešani na vorteksu i centrifugirani na 12.000×g tokom 10 min na 4 °C. Radi prečišćavanja dobijenog ekstrakta RNK, gornja faza je mešana sa etanolom različitih koncentracija. Prvo je u nju dodat 1 mL 75% etanola ohlađenog na -20 °C. Nakon mešanja, ependorfice su centrifugirane na 12.000×g tokom 20 min, na 4 °C. Ponovo je odlivena gornja faza i dodat je po 1 mL 96% etanola ohlađenog na -20 °C. Uzorci RNK u etanolu su centrifugirani 15 min na 12.000×g na 4°C, etanol je odliven, a ependorfice

su ostavljene 20 min na filter papiru da se talog osuši. Potom je talog, u kome se nalazi RNK, rastvoren u 20-30  $\mu\text{L}$  DEPC vode i uzorci su promešani na vorteksu.

Koncentracija RNK u uzorcima određivana je spektrofotometrijskom metodom na aparatu Nano drop (Thermo Scientific, SAD) očitavanjem apsorbance na 260 nm. Stepenn prečišćenosti uzoraka je određivan iz odnosa apsorbancija na 260 nm i 280 nm (odnos  $\text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} \sim 2$  ukazuje na odsustvo proteina u analiziranom uzorku).

### **3.5.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)**

Reverzna transkripcija je vršena korišćenjem Ready-To-Go You-Prime First-Strand Bead (GE Healthcare, kat. br. 27-9261-01, Velika Britanija) i pd(N)<sub>6</sub> prajmera, po protokolu proizvođača. Uzorci su pripremani tako da je 12  $\mu\text{L}$  uzorka sadržavalo 1.500 ng RNK. Za potrebe prepisa, uzorci su inkubirani u termostatu na 65 °C tokom 10 min. Nakon toga, uzorci su držani na hladnom, a za to vreme je pripremljena reakciona smeša tako što su po 2 kuglice reakcione smeše rastvarane sa 40  $\mu\text{L}$  DEPC vode uz dodatak po 2  $\mu\text{L}$  pd(N)<sub>6</sub> prajmera koncentracije 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Svakom analiziranom uzorku je dodato po 21  $\mu\text{L}$  ove reakcione smeše. Uzorci su, zatim, blago izmešani i inkubirani na 37 °C tokom 1 h za gene *Slc6a2* i *Slc18a2* u srži, odnosno 2 h za gene *Itgb3* i *Chl1* u prefrontalnom korteksu.

### **3.5.3. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu, Real-Time PCR (RT-PCR)**

Za Real-Time PCR pripremana je reakciona smeša sa sledećim komponentama:

- Test za kvantitativno utvrđivanje genske ekspresije sa specifičnim početnim sekvencama (prajmerima) za amplifikaciju ciljanog gena obeleženim 6-FAM bojom i TaqMan<sup>®</sup> MGB probom u zapremini 1.25  $\mu\text{L}$  po bunariću. Korišćeni testovi za ciljane i kontrolne gene, Assay-on-Demand Gene Expression Products (Thermo Fischer Scientific, Masačusets, SAD), su navedeni u Tabelama IV i V,



- Master mix, TaqMan Universal Master Mix With AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 4304437, Masačusets, SAD) u zapremini 12.5  $\mu$ L po bunariću. Ovaj Master mix sadrži TaqMan polimerazu, dNTP, pufer,  $MgCl_2$  i pasivnu boju ROX,
- DEPC voda, koja je dodavana do ukupne zapremine od 15  $\mu$ L po bunariću.

Pomenuta smeša je nanošena na PCR ploču, a zatim su u bunariće dodavani uzorci cDNK (po 10  $\mu$ L) u koncentraciji 1-10 ng prepisane cDNK u zavisnosti od tkiva i ispitivanog gena.

**Tabela IV.** Karakteristike početnih sekvenci (prajmera) korišćenih za Real-Time PCR analizu ekspresije gena *Slc6a2* i *Slc18a2* koji kodiraju transportere NAT i VMAT2 u tkivu srži nadbubrežne žlezde pacova.

Gen	Gen ID	Kat. Br.	Dužina amplikona
<i>Slc6a2</i> (NET)	79212	Rn00580267_m1	94
<i>Slc18a2</i> (VMAT2)	25549	Rn00564688_m1	54
<i>Ppia</i> (Ciklofilin A, kontrola)	25518	Rn00690933_m1	149

**Tabela V.** Karakteristike početnih sekvenci (prajmera) korišćenih za Real-Time PCR analizu ekspresije gena *Itgb3* i *Chl1* koji kodiraju proteine ITGB3 i CHL1 u tkivu prefrontalnog korteksa pacova.

Gen	Kat. Br.	Proizvođač
<i>Itgb3</i>	Rn00596601_m1	Applied Biosystems, SAD
<i>Chl1</i>	KSPQ12012	Sigma-Aldrich, SAD
<i>Gusb</i> (kontrola)	Rn00566655_m1	Applied Biosystems, SAD

PCR reakcija je izvođena na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD) po sledećem protokolu: 2 min na 50 °C, zatim 10 min na 95 °C praćeno sa 40 ciklusa na 95 °C i po 15 s i 60 s na 60 °C. Svaki uzorak je postavljan u triplicatu, a za kvantifikaciju korišćena je  $C_T$  metoda (Livak i Schmittgen, 2001). Dobijeni rezultati analizirani su RQ Study Add ON

softverom. Kao endogena kontrola za ekspresiju Slc6a2 i Slc18a2 gena korišćen je gen za ciklofilin A, odnosno Gusb za ekspresiju gena Itgb3 i Chl1. Svi transkripti su normalizovani u odnosu na ekspresiju jednog od ova dva kontrolna gena. Zbog individualnih razlika među životinjama, kao kalibrator je uziman uzorak kontrolne grupe čija je vrednost bila blizu srednje vrednosti svih uzoraka i sa najmanjom greškom merenja.

### **3.6. Histološka analiza nadbubrežne žlezde**

Odmah po žrtvovanju, izolovana je leva nadbubrežna žlezda. Nakon merenja, tkivo je fiksirano u Buen fiksativu tokom 48 sati. Zatim su preparati dehidrirani standardnim postupkom, potapanjem u seriju alkohola rastućih koncentracija, i nakon prosvetljavanja u ksilolu, organi su ukalupljeni u parafin. Histološki preparati levog nadbubrega dobijeni su serijskim sečenjem preseka debljine 6  $\mu\text{m}$  na rotacionom mikrotomu Leica RM2135 (Leica, Nemačka). Isecci su deparafinizirani i rehidrirani serijom alkohola opadajućih koncentracija i destilovanom vodom, i zatim korišćeni za tkivno bojenje hematoksilinom i eozinom (HE bojenje). Morfometrijska analiza površine preseka žlezde, kao i njenih regiona rađena je pod mikroskopom Olympus BX50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka) uz upotrebu kompjuterskog softvera za obradu slike (MicroImage, Ver. 4.0., Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemačka).

Na serijskim presecima merena je površina ukupnog preseka nadbubrežne žlezde. Tri preseka sa najvećom površinom od svakog analiziranog preparata su korišćena za određivanje površine čitavog korteksa, njegovih zona (zone glomeruloze, zone fascikulate i zone retikularis), kao i srži, metodom brojanja pogodaka upotrebom  $A_{100}$  mrežice i na uveličanju  $40\times$ . Takođe na isti način je određena ukupna površina hromafinih ćelija i krvnih sudova u adrenalnoj meduli na uveličanju  $100\times$ . Konačna vrednost za svaki ispitivani preparat nadbubrežne žlezde bila je srednja vrednost dobijena analizom tri ekvatorijalna preseka.

### **3.7. Određivanje koncentracije biogenih amina u plazmi reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (Reversed-phase high pressure liquid chromatography, RP HPLC)**

Za određivanje koncentracije biogenih amina u plazmi eksperimentalnih životinja, sistem za tečnu hromatografiju sastojao se od dve faze: stacionarne, koju predstavlja porozni materijal u koloni i mobilne, koju predstavlja tečnost u kojoj se vrši hromatografsko razdvajanje i koja pod pritiskom kontinuirano protiče kroz sistem. Metoda reverzno-fazne tečne hromatografije podrazumeva da je mobilna faza polarna, dok je stacionarna faza nepolarna.

#### **3.7.1. Priprema uzoraka za RP HPLC**

Za određivanje koncentracije biogenih amina korišćena je plazma dobijena centrifugiranjem pune krvi na  $30.000\times g$  na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  tokom 15 min, a tako dobijeni uzorci su čuvani na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analiziranja. Neposredno pre analize, uzorci su odmrzavani, centrifugirani na  $30.000\times g$  na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  tokom 15 min, a zatim je supernatant filtriran kroz filtre sa porama promera  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ .

#### **3.7.2. Određivanje koncentracije kateholamina HPLC metodom**

Kateholamini u plazmi su određivani nakon ekstrakcije na aktiviranom aluminijum-oksidu: u 1 mL uzorka plazme je dodavano po 50  $\mu\text{L}$  rastvora internog standarda (dihidroksibenzilamina). Ovako pripremljeni uzorci ubrizgavani su u kolonu za ekstrakciju od aluminijum-oksida u kojoj se nalazio odgovarajući pufer. Nakon mešanja u trajanju od 20 min i ispiranja (dva puta) sa 1 mL reagensa za ispiranje, kateholamini su eluirani sa 120  $\mu\text{L}$  reagensa za ekstrakciju. Svi navedeni reagensi uključujući i rastvor internog standarda, kao i puferovana kolona sadržani su u originalnom kitu za određivanje koncentracije kateholamina u plazmi (Recipe, kat. br. 1000, Minhen, Nemačka). Njegova osetljivost bila je 5 ng/L, sa intra esej

koeficijentima varijacije 6.7% za noradrenalin i 7.6% za adrenalin, odnosno inter esej koeficijentima varijacije 5.3% za noradrenalin i 4.2% za adrenalin.

Za HPLC separaciju i kvantifikaciju kateholamina korišćena je aparatura koja se sastojala od HPLC pumpe (Waters 1515, Francuska), HPLC autosamplera (Waters 270, Francuska) i elektrohemijuskog detektora (Waters 2465, Francuska). Sistem za hromatografsko razdvajanje sastojao se od HPLC kolone za određivanje kateholamina u uzorcima plazme (Chromosystems, kat. br. 5000, Nemačka) i originalne mobilne faze (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 0.1 mM na-EDTA i 4%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , pH=4.7).

Svi uzorci su ubrizgavani u količini od 50  $\mu\text{L}$  u brizgalicu HPLC pumpe. Protok mobilne faze podešavan je na 1 mL/min, napon elektrohemijuskog detektora na 0.55 V i njegova osetljivost na 2 nA/V. Karakteristike metode bile su: linearnost do 10.000 ng/L, limit detekcije 15 ng/L, intra esej koeficijent varijacije manji od 11.4% i inter esej koeficijent varijacije manji od 12.7% jednako za noradrenalin i adrenalin. Koncentracije kateholamina u uzorcima određivane su metodom standardne krive i izračunavane korišćenjem kompjuterskog programa Empower 2 (Waters<sup>®</sup> Empower<sup>™</sup> 2 Software, 720001257EN, Waters, S.A.S., Francuska).

### **3.7.3. Određivanje koncentracije serotonina HPLC metodom**

Koncentracija serotonina u plazmi određivana je nakon precipitacije proteina upotrebom originalnog reagensa za precipitaciju. Svi korišćeni reagensi, uključujući i rastvor internog standarda, kao i HPLC kolonu, sadržani su u originalnom kitu za određivanje koncentracije serotonina u plazmi (Recipe, kat. br. 7000, Minhen, Nemačka). Pomešano je 100  $\mu\text{L}$  plazme, 100  $\mu\text{L}$  reagensa za precipitaciju i 20  $\mu\text{L}$  rastvora N-metilserotonina, koji je služio kao interni standard. Nakon centrifugiranja na 3.000×g tokom 10 min, po 20  $\mu\text{L}$  dobijenog supernatanta je injektovano u brizgalicu HPLC pumpe. Za separaciju i kvantifikaciju serotonina, korišćena je aparatura koja se sastojala od: HPLC pumpe (Bio-Rad, 1350 T, SAD), HPLC autosamplera (Bio-Rad, AS 100, SAD) i elektrohemijuskog detektora (Bio-Rad 1640, SAD). Protok mobilne faze podešavan je na 1 mL/min, napon elektrohemijuskog detektora na 0.75 V i njegova osetljivost na 20 nA/V. Koncentracije serotonina u uzorcima određivane su metodom

standardne krive i izračunavane korišćenjem kompjuterskog programa Chrom-Line 4.20 (Bio-Rad Software, SAD). Karakteristike metode bile su: linearnost do 1.000 µg/L i limit detekcije 0.5 µg/L. Intraesej koeficijent varijacije bio je 3%, dok je inter esej koeficijent varijacije bio 4%.

### **3.8. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi sistemom tečna hromatografija - elektrosprej jonizacija - tandem masena spektrometrija (Liquid chromatography – ElectrosprayIonisation - Tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS)**

Za određivanje koncentracije kortikosterona, korišćeni su uzorci plazme eksperimentalnih životinja, dobijeni i čuvani na isti način kao i za određivanje koncentracije kateholamina.

Nakon odmrzavanja i centrifugiranja uzoraka, u supernatante je dodat deksametazon kao interni standard. Ovako pripremljeni uzorci (250 µL) su nanošeni na prethodno kondicionirane kolone (SPE extraction column: SOLA 10 mg/mL, Thermo Scientific, kat. br. 60109-001, SAD) i postavljeni na vakuum. Kondicioniranje kolona vršeno je ispiranjem sa 1 mL metanola (Sigma Aldrich Co., kat. br. 34885, SAD) a zatim i sa 2 mL destilovane vode. Nakon nanošenja, analizirani uzorci su isprani sa 2 mL destilovane vode i eluirani sa 1 mL metanola. Radni rastvori kortikosterona i deksametazona su napravljeni rastvaranjem ovih supstanci u metanolu u koncentraciji 500 µg/mL za kortikosteron i 10 µg/mL za deksametazon, i čuvani na 4 °C. Kalibraciona kriva sa 6 tačaka je napravljena rastvaranjem radnog rastvora kortikosterona kako bi se dobile sledeće koncentracije: 50 ng/mL, 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL i 750 ng/mL i 1.000 ng/mL u plazmi bez kortikosterona pripremljenoj po metodi Wong-a i saradnika (1994).

Za kvantifikaciju kortikosterona korišćena je aparatura (Slika 14) koja se sastojala od HPLC pumpe (Accela 3000, Thermo Scientific, SAD) povezane sa

masenim detektorom (TQS Quantum Access Max, Thermo Scientific, SAD) u HESI pozitivnom režimu. Uslovi rada bili su sledeći: za kortikosteron 346.96→121.04; koliziona energija (CE) CE=22 V, 346.96→328.82; CE=15 V; za deksametazon 393.02→355.05; CE=10 V.



**Slika 14.** Aparatura za kvantifikaciju kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja. (preuzeto sa: <http://www.ultratrace.se/instrumentation/9-equipment/9-organic-lc-ms-2.html>)

Sistem za hromatografsko razdvajanje sastojao se od kolone (Xterra MS C<sub>18</sub> 3.5 μm, 2.1×150 mm, Waters S.A.S., kat. br. 186000408, SAD) i mobilne faze koja je sadržala acetonitril (Sigma Aldrich Co., kat. br. 34967, SAD) i 0.1% rastvor mravlje kiseline u destilovanoj vodi u odnosu 1:1. Temperatura kolone je održavana na 30 °C, autosamplera na 10 °C, a protok mobilne faze na 300 μL/min. Svi uzorci ubrizgavani su u količini od 10 μL. Za maseni detektor, radni parametri su bili redom: napon spreja 4.500 V, temperature uparivača 400 °C, pritisak nosećeg i pomoćnog gasa 50, odnosno 40 jedinica i kapilarna temperatura 300 °C.

### **3.9. Ispitivanje stepena oštećenja DNK limfocita periferne krvi komet testom**

U cilju ispitivanja efekta eksperimentalnih tretmana na stepen oštećenja DNK limfocita periferne krvi životinja, urađen je komet test, koji je jedan od najčešće korišćenih testova za ispitivanje oštećenja genetičkog materijala u različitim tipovima

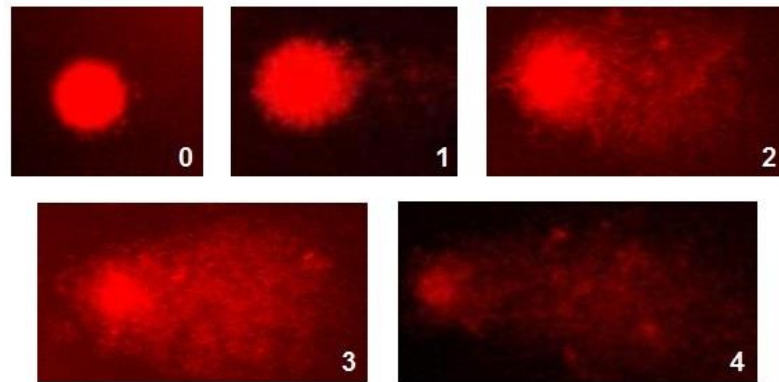
ćelija (Collins, 2004). Ovaj *in vitro* test je zbog svoje jednostavnosti, osetljivosti i brzine izvođenja postao jedna od standardnih metoda kvantifikacije lezija na DNK materijalu, kao i određivanja stepena osetljivosti i otpornosti ćelija na oštećenja izazvana delovanjem oksidativnih agenasa.

Eksperiment je podeljen u dva dela. U prvom delu, cilj je bio da se utvrdi da li eksperimentalni tretmani utiču na oštećenja DNK materijala perifernih limfocita. Cilj drugog dela eksperimenta je bio da se utvrdi osetljivost DNK limfocita svih eksperimentalnih grupa na oksidativni stres koji je izazvan inkubacijom sa 1.5 mM rastvorom vodonik peroksida *in vitro* u trajanju od 5 min.

Pre izvođenja komet testa, viabilnost ćelija je ispitivana tripan-plavo metodom (Anderson i sar., 1994). Za svaki analizirani uzorak krvi pokazana je viabilnost ćelija preko 90%. Komet test je izvođen po metodi Singh-a i saradnika (1988), uz određene modifikacije. Mešavina 6  $\mu$ L heparinizirane pune krvi i 100  $\mu$ L 0.67% rastvora agaroze niske tačke topljenja, (eng. low melting point, LMP) LMP agaroze, (Sigma Aldrich Co., kat. br. A9918, SAD) u fosfatnom puferu (eng. Phosphate buffered saline, PBS) (Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", Beograd, Srbija) je pipetirana na prethodno obeležene mikroskopske pločice obložene 1% rastvorom obične agaroze (Sigma Aldrich Co., kat. br. A9539, SAD). Nakon postavljanja pokrovne ljušpice, pločice su ostavljene 5 min na 4 °C da rastvor očvrsne. Nakon toga, pokrovne ljušpice su pažljivo skinute i pločice su tretirane sa 60  $\mu$ L PBS-a (prvi deo eksperimenta) ili sa 60  $\mu$ L 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u PBS-u (drugi deo eksperimenta) u trajanju od 5 min na 4 °C. Nakon ispiranja PBS-om, na pločice je nanoseno 100  $\mu$ L 0.5% rastvora LMP agaroze u PBS-u i ostavljeno 5 min na 4°C da očvrsne. Zatim su skinute pokrovne ljušpice, a pločice ostavljene preko noći u lizirajućem rastvoru (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA Sigma Aldrich Co., kat. br. E6758, SAD, 10 mM Tris Sigma Aldrich Co., kat. br. T1503, SAD, pH=10, podešen 10 M NaOH, uz dodatak *ex tempore* 1% Triton X-100, Sigma Aldrich, Co., kat. br. T8532, SAD i 10% DMSO, Sigma Aldrich Co., kat. br. 41639 SAD) na 4 °C. Sutradan su pločice prebačene u sveže pripremljen hladan pufer za elektroforezu (300 mM NaOH i 1 mM EDTA, Sigma Aldrich Co., kat. br. E6758, SAD, pH>13), a nakon 30 min izvedena je horizontalna elektroforeza na sistemu PerfectBlue Wide Gel System Maxi ExW (Peqlab, Life Science, Nemačka) u trajanju

od 30 min na temperaturi 4 °C i uslove 25 V i 215 mA. Nakon toga, pločice su ispirane 0.4 M rastvorom Trizma<sup>®</sup> baze (Sigma Aldrich Co., kat. br. T1503, SAD, pH=7.5, podešen sa conc. HCl) tri puta na svakih 5 min. Nakon neutralizacije, pločice su bojene rastvorom etidijum bromida (Sigma Aldrich Co., kat. br. E1385, SAD) koncentracije 20 µg/mL i, nakon 15 min, analizirane fluorescentnom mikroskopijom na uveličanju 100× (mikroskop Olympus BX 50, Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka, sa živinom lampom HBO, 100 W, 516-560 nm, Olympus, Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka) uz upotrebu softvera za obradu slike MicroImage, Ver. 4.0. (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemačka).

U odnosu na prisustvo i veličinu repa komete, analizirane su slike 100 nasumično odabranih ćelija (po 50 ćelija sa svake pločice, pločice su postavljane u duplikatu za svaki uzorak). Tokom analize, nije bilo poznato kojoj eksperimentalnoj grupi uzorak pripada, a korišćen je vizuelni metod analiziranja. Oštećenje DNK je kvantifikovano količinom DNK oslobođene iz jezgra ćelije i prema tome komete su klasifikovane u pet kategorija (0-4), kao što je i prikazano na Slici 15:



**Slika 15.** Pet klasa oštećenja DNK limfocita periferne krvi pacova Wistar soja u zavisnosti od dužine repa (klase kometa): (0) neoštećene ćelije; (1) ćelije niskog nivoa oštećenja; (2) ćelije srednjeg nivoa oštećenja; (3) ćelije visokog nivoa oštećenja i (4) maksimalno oštećene ćelije.

- Neoštećene ćelije (kategorija 0, oštećenje manje od 5%),
- Ćelije niskog nivoa oštećenja (kategorija 1, oštećenje 5-20%),
- Ćelije srednjeg nivoa oštećenja (kategorija 2, oštećenje 20-40%),
- Ćelije visokog nivoa oštećenja (kategorija 3, 40-95%),



- Maksimalno oštećene ćelije (kategorija 4, oštećenje preko 95%).

Rezultati komet testa su prikazani kao ukupan broj ćelija sa oštećenjem DNK (eng. Damaged nuclei, DN) od 100 analiziranih ćelija po uzorku (životinji) (Ukupan DN). Nakon toga, u odnosu na jačinu oštećenja DNK, ćelije su grupisane u dve grupe:

- ćelije niskog/umerenog nivoa oštećenja (Umereni DN),
- ćelije visokog/maksimalnog nivoa oštećenja (Maksimalni DN).

Grupa ćelija niskog/umerenog nivoa oštećenja (Umereni DN) podrazumevala je zbir ćelija kategorija 1 i 2, odnosno zbir ćelija sa oštećenjem DNK 5-40% u odnosu na broj neoštećenih ćelija (kategorije 0). Slično, grupa ćelija visokog/maksimalnog nivoa oštećenja (Maksimalni DN) predstavljala je zbir ćelija kategorija 3 i 4, što je oštećenje DNK preko 40% u odnosu na broj neoštećenih ćelija. Ćelije u apoptozi su isključene iz analize prema smernicama i fotomikrografijama da Silva-e i saradnika (2000) i Singh-a (2005). Takođe, množenjem broja ćelija date kategorije DNK oštećenja sa brojem odgovarajuće kategorije, izračunat je Totalni skor kometa (TSK). Vrednosti skora mogu varirati od 0 (potpuno neoštećene ćelije) do 400 (potpuno oštećene ćelije) arbitrarnih jedinica (Sopić i sar., 2014). Dodatno, izračunati su i skorovi za dve grupe DNK oštećenja, odnosno skorovi za ćelije sa niskim stepenom oštećenja (NOSK), kao i za ćelije sa visokim stepenom oštećenja DNK (VOSK).

### **3.10. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi eksperimentalnih životinja**

Kako bi se utvrdio efekat hronično povišenih vrednosti glukokortikoida i potencijalni zaštitni efekat oksitocina na parametre oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite eksperimentalnih životinja, u uzorcima plazme određivane su koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) i malondialdehida (MDA), kao i aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD).

### **3.10.1. Određivanje koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) i malondialdehida (MDA) u plazmi**

Kao markeri stepena lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa, u plazmi eksperimentalnih životinja određivane su koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) i malondialdehida (MDA) spektrofotometrijskom metodom. Za analizu korišćeni su uzorci plazme eksperimentalnih životinja, dobijeni centrifugiranjem pune krvi na  $30.000\times g$  tokom 15 min na  $4^{\circ}C$ . Uzorci plazme su čuvani na  $-80^{\circ}C$  do analiziranja.

Metoda određivanja koncentracije LOOH podrazumevala je oksidaciju  $Fe^{2+}$  jona u kiseloj sredini. U prisustvu ksilenol-oranža (o-krezosulfonftalein-3,3'-bismetilimino-bisirčetna kiselina), stvoreni  $Fe^{3+}$  jon formira kompleks (Gay i Gebicki, 2003). Intenzitet dobijene boje meren je bihromatskim merenjem na 540 nm (na kojoj apsorbuju uzorak i eventualno prisutne interferirajuće supstance) i na 670 nm (gde apsorbuju samo interferirajuće supstance), kako bi se efekat ovih supstanci anulirao. Analiza je izvođena uz proces deproteinizacije perhlornom kiselinom.

U ependorf epruvete zapremine 1.5 mL dodavani su uzorci plazme (25  $\mu L$  plazme razblažene u fiziološkom rastvoru u odnosu 1:10) i 180  $\mu L$  2.5 mM rastvora ksilenol-oranža. Nakon mešanja i inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min, dodato je 45  $\mu L$  2.5 mM rastvora Mohr-ove soli u 1.1 M rastvoru perhlorne kiseline, promešano i inkubirano još 30 min na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim centrifugirani 10 min na  $10.000\times g$  i merena je absorbanca 200  $\mu L$  supernatanta. Kao standard korišćen je terc-butilhidroperoksid. Za izradu standardne krive, štok-rastvor koncentracije 20 mM razblaživan je u fiziološkom rastvoru u rasponu koncentracija 3.125  $\mu M$  – 200  $\mu M$ . Absorbanca uzoraka, standarda i slepe probe određivana je na aparatu ELISA reader-LKB 5060-006 (SelectScience, Nemačka) korišćenjem adekvatnog programa.

Koncentracija malondialdehida u plazmi određivana je metodom sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (Akman i sar., 2015). Ova metoda podrazumeva spektrofotometrijsko određivanje apsorpcionog maksimuma kompleksa MDA i ostalih supstanci koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom na 535 nm.

U staklene epruvete dodavano je po 300  $\mu\text{L}$  uzoraka plazme i 600  $\mu\text{L}$  rastvora koji sadrži 15% trihlor-sirćetnu kiselinu, 0.375% tiobarbiturnu kiselinu i 0.25 M HCl. Uzorci su zatim promešani i inkubirani u vodenom kupatilu na 100 °C tokom 5 min. Nakon hlađenja na ledu, uzorci su centrifugirani na 10.000 $\times$ g 10 min na 4 °C i supernatant je korišćen za određivanje koncentracije MDA. Za izračunavanje koncentracije MDA korišćen je metod standardne krive, za koju su standardni rastvori koncentracija 1-10  $\mu\text{mol/L}$  napravljeni od osnovnog standarda MDA koncentracije 1 mmol/L.

### **3.10.2. Određivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze (SOD)**

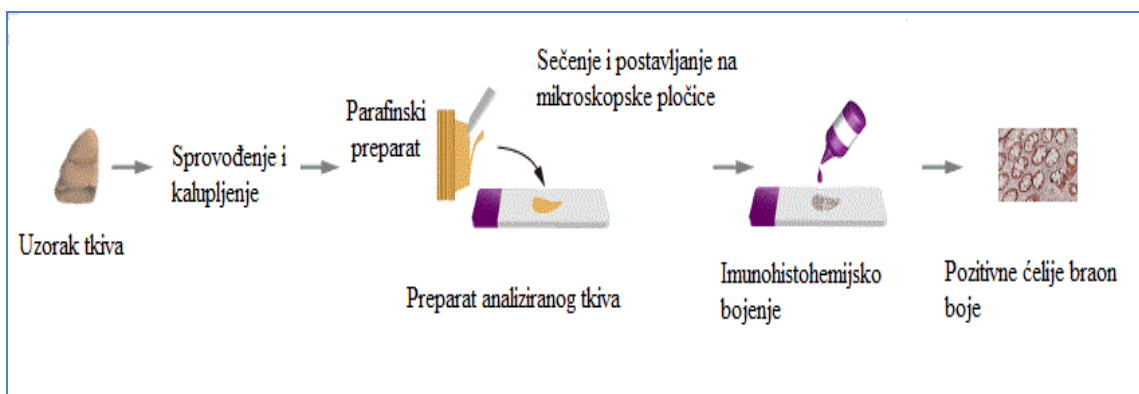
Aktivnost enzima SOD u plazmi određivana je po originalnoj metodi Misra-e i Fridovich-a (1972), uz određene modifikacije. Ova metoda je zasnovana na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH=10.2, koja je inicirana prisustvom teških metala u tragovima kao nečistoća u reagensima. Aktivnost enzima izražena je u relativnim jedinicama, dobijenim merenjem apsorbance nastalog proizvoda oksidacije adrenalina crvene boje na 480 nm bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analizirani uzorci), kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Relativna jedinica aktivnosti SOD je definisana kao ona aktivnost koja dovodi do inhibicije autooksidacije adrenalina od 50%.

U kivete je pipetirano 10  $\mu\text{L}$  uzorka, 690  $\mu\text{L}$  karbonatnog pufera koncentracije 0.05 mmol/L, pH=10.4, kome je dodat rastvor 1 mmol/L EDTA. Kontrolna kiveta je sadržala samo rastvor pufera. Zatim je u smešu dodavano 50  $\mu\text{L}$  10 mmol/L rastvora adrenalina u 20 mmol/L HCl. Nakon mešanja, kivete su ostavljene na tamnom mestu na sobnoj temperaturi tokom 3 min, a zatim je očitavana apsorbance na svaki minut u toku naredna 3 minuta. Za određivanje aktivnosti SOD izabrana je koncentracija adrenalina (počinje se od koncentracije 10 mmol/L) koja će u kontroli dati promenu apsorbance u minuti od 0.025 nm jer je utvrđeno da pri toj koncentraciji SOD postiže najviši procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Analiza je izvođena na aparatu ILAB 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy).

### 3.11. Imunohistohemijska analiza ekspresije Ki-67 i BDNF u neuronima hipokamusa

Za obeležavanje ćelija koje ispoljavaju proteine BDNF i Ki-67 primenjena su imunohistohemijska bojenja (Slike 16 i 17). Nakon žrtvovanja, moždano tkivo je stavljano u fiksativ, dehidratirano i kalupljeno u parafinu. Preseci su dobijeni serijskim sečenjem preparata na kriokatu Leica Cryocut 1800 Cryostat (Leica, Nemačka). U ovoj analizi korišćeni su parafinski koronalni preseci mozga sa celim rostrokaudalnim regionom hipokampusa, debljine 5  $\mu\text{m}$  i međusobno udaljeni 200  $\mu\text{m}$ .

Tkivni preseci su prvo deparafinisani u seriji ksilola, a zatim hidratirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%). Nakon toga, pločice sa presecima su isprane u destilovanoj vodi. Nakon ispiranja, demaskiranje antigena za BDNF i Ki-67 je vršeno inkubacijom u citratnom puferu (pH=6.0) u mikrotalasnoj pećnici (700 W) tokom 21 min. Zatim su preseci hlađeni pod vodom i ispirani u PBS-u (pH=7.4) tri puta u trajanju od 5 min i svaki sledeći korak praćen je ispiranjem preparata u PBS-u. Aktivnost endogenih peroksidaza je blokirana tretiranjem 3% rastvorom  $\text{H}_2\text{O}_2$  tokom 10 min, nakon čega su preseci inkubirani u vlažnoj komori sa serum blokom a potom i sa odgovarajućim primarnim antitelom preko noći. Sva korišćena primarna antitela prikazana su u Tabeli VI.

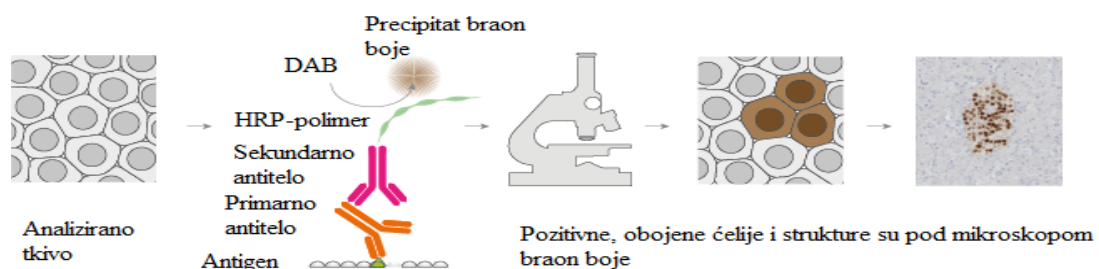


**Slika 16.** Šematski prikaz koraka u izvođenju imunohistohemijske analize: Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja i uzimanja uzoraka, vrši se dehidratacija tkiva i kalupljenje u parafin. Zatim se preparati seku i postavljaju na mikroskopske pločice. Nakon imunohistohemijske analize, dobijeni preparati se analiziraju pod mikroskopom. (preuzeto sa: <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7BF4AA1C9B-9EA1-4669-B9C2-305BDFB08F89%7D>)

**Tabela VI.** Karakteristike i razblaženja primarnih antitela korišćenih za imunohistohemijska bojenja.

Antitelo	Proizvođač	Kat. Br.	Karakteristike	Razblaženje
Anti-BDNF	Abcam, UK	ab72439	Primarno zečje poliklonalno antitelo	1:1300
Anti-Ki-67	Abcam, UK	ab15580	Primarno zečje poliklonalno antitelo	1:3500

Sutradan, nakon ispiranja, preparati su inkubirani sa univerzalnim biotinizovanim sekundarnim antitelom a zatim i sa streptavidin konjugovanom peroksidazom rena (HRP) na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori u trajanju od 1 h za svaku inkubaciju. Vizualizacija je vršena inkubacijom sa hromogenom 3,3'-diaminobenzidinom (DAB, Peroxidase Detection System, kat. br. RE 7120-K, Novocastra, Velika Britanija) na sobnoj temperaturi u trajanju od 1-10 min. Na kraju, preparati su kontrastirani Mayer-ovim hematoksilinom (Sigma Aldrich Co., kat. br. MHS1, SAD), dehidratirani u seriji alkohola rastuće koncentracije i ksilola, nakon čega je preko preparata postavljena pokrovna ljušpica uz korišćenje medijuma DPX Mountant for histology (Sigma Aldrich Co., kat. br. 06522, SAD). Svi potrebni reagensi za imunohistohemijsku detekciju BDNF i Ki-67 sadržani su u komercijalnom kitu Peroxidase Detection System, kat. br. RE 7120-K, Novocastra, Velika Britanija.

**Slika 17.** Ilustracija mehanizma detekcije prilikom izvođenja imunohistohemijskog bojenja. (preuzeto sa: <http://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>)

Dobijeni preparati analizirani su pod svetlosnim mikroskopom Olympus BX 50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka) koji je opremljen digitalnom

kamerom (SonyPower HAD 3CCD, Tokijo, Japan), uz korišćenje kompjuterskog programa za obradu slike MicroImage, Ver. 4.0. (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemačka). Imunoreaktivne ćelije kvantifikovane su pod uveličanjem 400× na šest isečaka moždanog tkiva svake eksperimentalne životinje. Broj BDNF pozitivnih ćelija određivan je u subgranularnom sloju dentatnog girusa (DG), CA1 i CA2+CA3 regionima hipokampusa na deset slučajno postavljenih vidnih polja po svakom navedenom regionu i izražen po mm<sup>2</sup>. Za određivanje Ki-67 imunoreaktivnih ćelija, brojane su ćelije u čitavom subgranularnom sloju dentatnog girusa i izražene po površini vidnog polja (0.07 mm<sup>2</sup>).

### 3.12. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati su obrađeni primenom odgovarajućih statističkih testova. Ispitivanje raspodele podataka i slaganje sa Gauss-ovom raspodelom procenjeno je primenom Shapiro-Wilkov testa. Ukoliko su ispitivani parametri odstupali od normalne raspodele, primenjivana je logaritamska transformacija, pa su za dalju proveru statistički značajnih razlika korišćeni parametarski testovi za ispitivanje statistički značajne razlike između dve grupe (Studentov t-test) i više grupa podataka (jednofaktorska i dvofaktorska ANOVA).

Studentov t-test korišćen je za:

- Utvrđivanje razlike između srednjih vrednosti koncentracija hormona kao i parametara ponašanja između kontrolnih grupa i akutnih/ili subhroničnih tretmana oksitocinom u prvoj eksperimentalnoj fazi,
- Poređenje koncentracija hormona u plazmi pre i posle akutnog stresa unutar svake eksperimentalne grupe u drugoj eksperimentalnoj fazi,
- Analiziranje razlika u stepenu bazalnog i oštećenja DNK limfocita periferne krvi nakon *in vitro* tretmana sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unutar svake eksperimentalne grupe u drugoj eksperimentalnoj fazi.

Jednofaktorska ANOVA korišćena je za:

- Analizu rezultata druge i treće eksperimentalne faze i utvrđivanje razlike dobijenih srednjih vrednosti između eksperimentalnih grupa.

Dvofaktorska ANOVA korišćena je za:

- Analizu razlika u stepenu oštećenja DNK limfocita periferne krvi između različitih eksperimentalnih grupa u drugoj eksperimentalnoj fazi sa tretmanima (CORT, OXY i CORT+OXY) i prisustvom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao fiksnim faktorima.

Prilikom primene ANOVA testova, za višestruka poređenja korišćen je Bonferroni *post hoc* test. Statistički značajnom smatrana je vrednost  $p < 0.05$ . Svi rezultati izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SEM). Za statističku obradu podataka korišćeni su programi PASW Statistics, verzija 18 (Čikago, SAD) i GraphPad Prism, verzija 5.0 (San Dijego, SAD).

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje i nivo hormona u plazmi eksperimentalnih životinja**

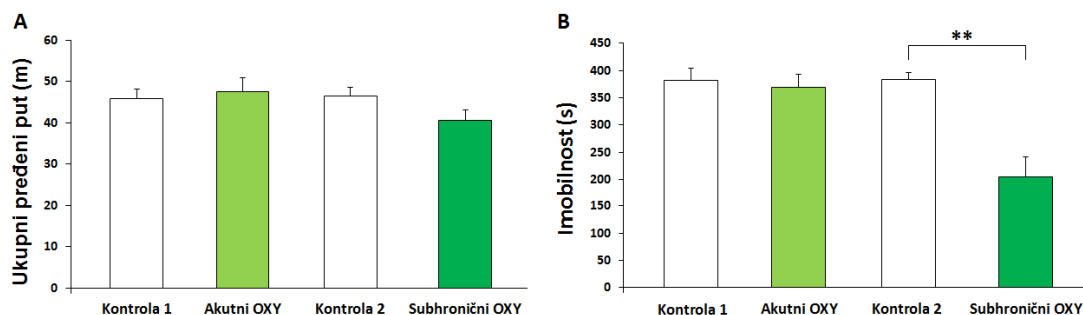
Tokom analize rezultata prve eksperimentalne faze ove doktorske disertacije, utvrđeno je da aplikacija manje doze oksitocina (0.25 IU/400 µL), bilo akutno ili subhronično, nije dovela do značajnih promena u ponašanju, niti u koncentracijama praćenih hormona nadbubrega u plazmi eksperimentalnih životinja.

#### **4.1.1. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje Wistar pacova**

##### **4.1.1.1. Ponašanje životinja u testu otvorenog polja (eng. Open field test, OFT)**

Kako bi se ispitala eksplorativna aktivnost životinja, izvođen je test otvorenog polja. Dobijeni rezultati su pokazali da akutni tretman većom dozom oksitocina (10 IU/400 µL) ne dovodi do značajnih promena u ponašanju eksperimentalnih životinja u testu otvorenog polja (Slika 18). S druge strane, aplikacija ove doze oksitocina tokom 14 dana dovela je do značajnog smanjenja vremena koje su životinje provodile u imobilnom položaju u poređenju sa životinjama odgovarajuće kontrolne grupe ( $p=0.001$ ).



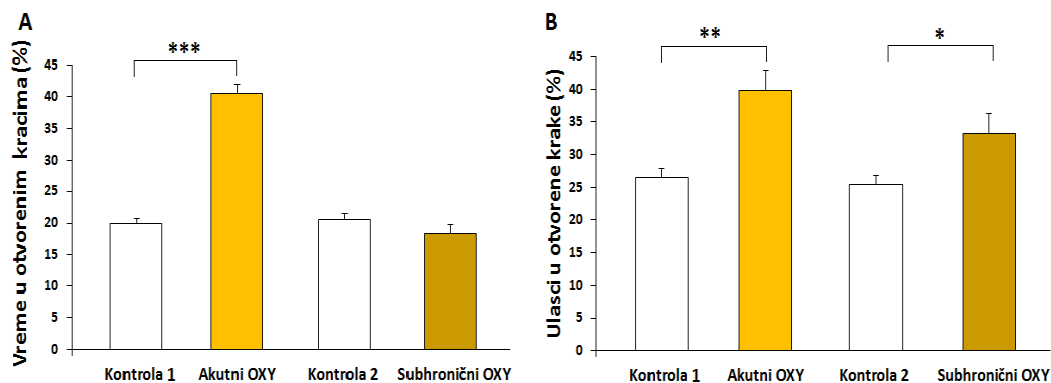


**Slika 18. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) na ponašanje životinja u testu otvorenog polja (OFT).** Ukupni pređeni put (m) (A) i ukupno vreme imobilnosti (s) (B) odraslih mužjaka pacova Wistar soja koji su primili fiziološki rastvor *s.c.* 30 min pre bihevioralnog testiranja (Kontrola 1) ili tokom 14 dana (Kontrola 2) i oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* 30 min pre bihevioralnog testiranja (Akutni OXY) ili tokom 14 dana (Subhronični OXY). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.1.2. Ponašanje životinja u uzdignutom plus lavirintu (eng. Elevated plus maze, EPM)

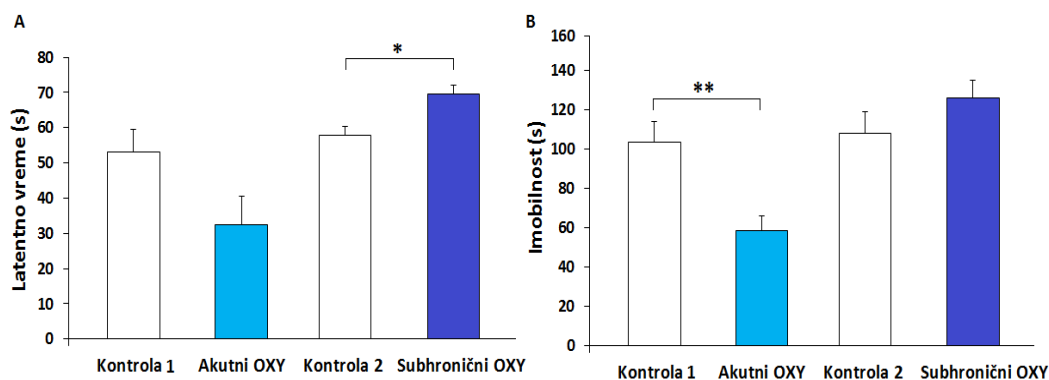
Kako bi se ispitaio potencijalni anksiolitički efekat oksitocina, izvođen je uzdignuti plus lavirint (EPM), a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 19.

Akutni tretman oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) doveo je do značajnog povećanja vremena koje su životinje provodile u otvorenim kracima EPM lavirinta izraženog u procentima ( $p < 0.001$ ), kao i broja ulazaka životinja u ove krake, takođe izraženog u procentima ( $p < 0.01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Subhronični tretman oksitocinom takođe je ublažio anksioznost eksperimentalnih životinja, što se moglo uočiti kao povećanje procenta broja ulazaka životinja u otvorene krake uzdignutog plus lavirinta ( $p < 0.05$ ) u odnosu na životinje kontrolne grupe tretirane fiziološkim rastvorom tokom 14 dana.



**Slika 19. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) na ponašanje životinja u uzdignutom plus lavirintu (EPM).** Vreme provedeno u otvorenim kracima (%) (A) i broj ulazaka u otvorene krake (%) (B) uzdignutog plus lavirinta odraslih mužjaka pacova Wistar soja koji su primili fiziološki rastvor *s.c.* 30 min pre bihejvioralnog testiranja (Kontrola 1) ili tokom 14 dana (Kontrola 2) i oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* 30 min pre bihejvioralnog testiranja (Akutni OXY) ili tokom 14 dana (Subhronični OXY). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $p$ <0.001; \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05.

#### 4.1.1.3. Ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST)



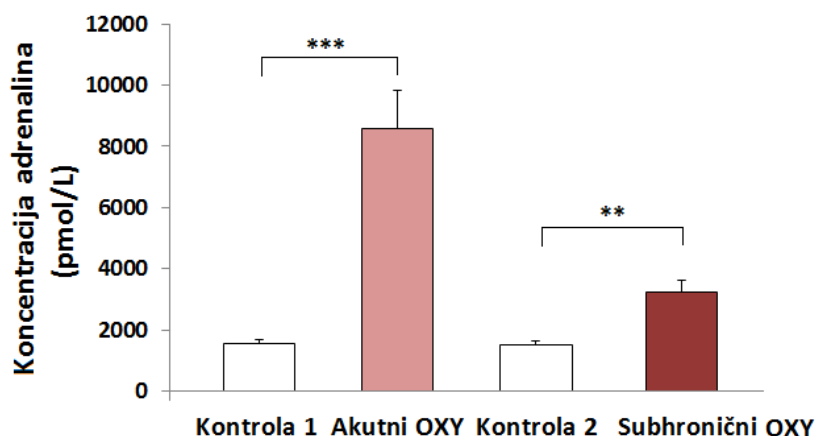
**Slika 20. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) na ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja (FST).** Vreme do prve imobilne epizode (latentno vreme) (s) (A) i vreme provedeno u imobilnom položaju (s) (B) odraslih mužjaka pacova Wistar soja koji su primili fiziološki rastvor *s.c.* 30 min pre bihejvioralnog testiranja (Kontrola 1) ili tokom 14 dana (Kontrola 2) i oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* 30 min pre bihejvioralnog testiranja (Akutni OXY) ili tokom 14 dana (Subhronični OXY). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05.

Kao što je prikazano na Slici 20, akutni tretman oksitocinom u dozi 10IU/400  $\mu$ L doveo je do značajnog smanjenja vremena koje su životinje provele u imobilnom položaju ( $p < 0.01$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom koja je primila fiziološki rastvor. Takođe, subhronični tretman oksitocinom u istoj dozi značajno je produžio vreme do prve imobilne epizode (latentno vreme) ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućom kontrolom, ukazujući na postojanje antidepresivnog potencijala ovog neuropeptida.

#### 4.1.2. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na nivo biogenih amina u plazmi

Kako bi se ispitaio uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom, određivane su koncentracije biogenih amina (adrenalina, noradrenalina i serotonina) u plazmi eksperimentalnih životinja.

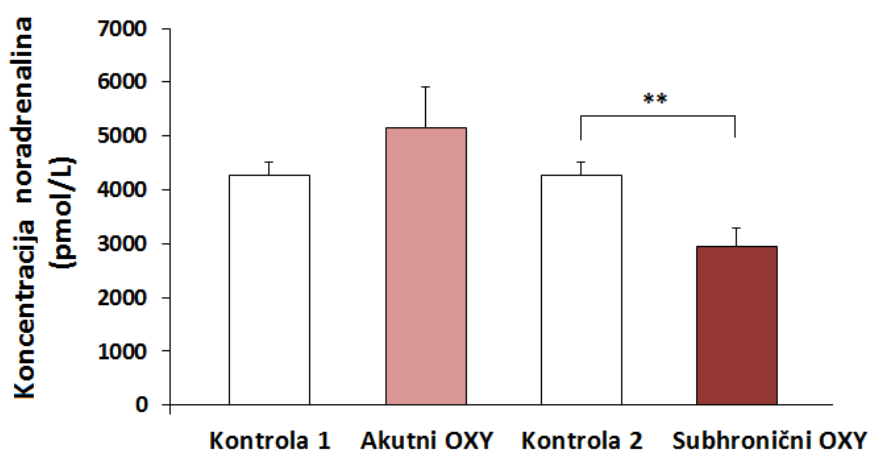
##### 4.1.2.1. Koncentracija adrenalina u plazmi



**Slika 21. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) na koncentraciju adrenalina u plazmi eksperimentalnih životinja.** Odrasli mužjaci pacova Wistar soja koji su primili jednokratno fiziološki rastvor *s.c.* (Kontrola 1) ili tokom 14 dana (Kontrola 2) i oksitocin jednokratno 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* (Akutni OXY) ili tokom 14 dana (Subhronični OXY). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

Kao što se može videti na Slici 21, tretman životinja većom dozom oksitocina (10 IU/400  $\mu$ L), bilo akutno ili subhronično, doveo je do značajnih promena koncentracija adrenalina u plazmi. Tačnije, nakon aplikacije oksitocina, došlo je do povećanja koncentracije adrenalina u plazmi ( $p < 0.001$  za Akutni i  $p < 0.01$  za Subhronični tretman) u poređenju sa životinjama odgovarajuće kontrolne grupe.

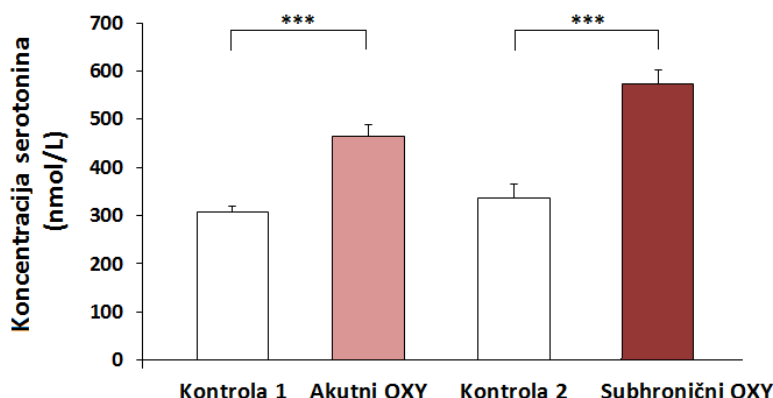
#### 4.1.2.2. Koncentracija noradrenalina u plazmi



**Slika 22. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) na koncentraciju noradrenalina u plazmi eksperimentalnih životinja.** Odrasli mužjaci pacova Wistar soja koji su primili jednokratno fiziološki rastvor *s.c.* (Kontrola 1) ili tokom 14 dana (Kontrola 2) i oksitocin jednokratno 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* (Akutni OXY) ili tokom 14 dana (Subhronični OXY). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$ .

Administracija oksitocina tokom 14 dana (10 IU/400  $\mu$ L, *s.c.*) dovela je do značajnog smanjenja koncentracije noradrenalina u plazmi eksperimentalnih životinja ( $p < 0.01$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom. S druge strane, akutna administracija iste doze oksitocina nije imala uticaja na koncentraciju navedenog hormona u plazmi, u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (Slika 22).

#### 4.1.2.3. Koncentracija serotonina u plazmi



**Slika 23. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) na koncentraciju serotonina u plazmi eksperimentalnih životinja.** Odrasli mužjaci pacova Wistar soja koji su primili jednokratno fiziološki rastvor *s.c.* (Kontrola 1) ili tokom 14 dana (Kontrola 2) i oksitocin jednokratno 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* (Akutni OXY) ili tokom 14 dana (Subhronični OXY). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $p$ <0.001

Rezultati prve faze ove doktorske disertacije ukazuju na generalni stimulatorni efekat oksitocina na nivo serotonina, tako da je i nakon akutnog i nakon subhroničnog tretmana oksitocinom (10 IU/400  $\mu$ L) došlo do značajnog povećanja koncentracije ovog biogenog amina u plazmi eksperimentalnih životinja ( $p$ <0.001 za Akutni i  $p$ <0.001 za Subhronični tretman), u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom (Slika 23).

## 4.2. Uticaj subhroničnog tretmana oksitocinom u kortikosteronom-indukovanom modelu hroničnog stresa i depresije

Kako su rezultati prve eksperimentalne faze ove doktorske disertacije pokazali da su efekti subhroničnog tretmana oksitocinom intenzivniji od efekata akutnog tretmana i da se ispoljavaju u sva tri izvođena testa ponašanja, u daljem eksperimentalnom radu opredelili smo se za subhronični tretman oksitocinom u dozi 10 IU/400  $\mu$ L (14 dana, *s.c.*).

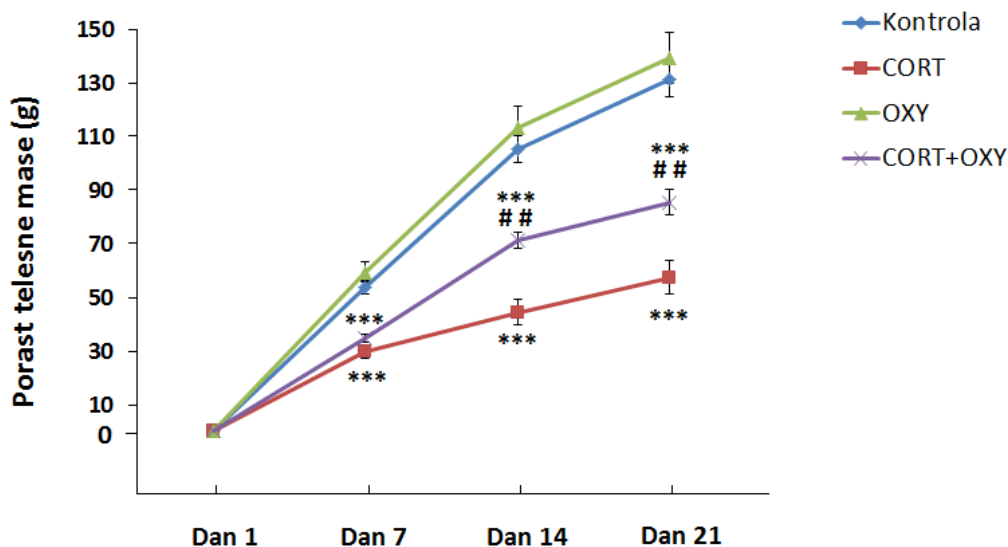
#### **4.2.1. Uticaj tretmana na promenu telesne mase i unos hrane i vode eksperimentalnih životinja**

Redukovano povećanje telesne mase eksperimentalnih životinja ustanovljeno je kao potvrda efikasnosti ponavljano ili hroničnog tretmana glukokortikoidima (Conrad i sar., 2007; Gourley i Taylor, 2009), te je stoga, tokom trajanja eksperimenta, praćeno povećanje telesne mase, kao i unos hrane i vode mužjaka Wistar pacova.

##### **4.2.1.1. Promena telesne mase**

Tokom tronedeljnog tretmana kortikosteronom, u grupama koje su primale samo kortikosteron (CORT), odnosno kortikosteron i oksitocin (CORT+OXY) porast telesne mase bio je značajno manji u poređenju sa životinjama kontrolne i grupe tretirane samo oksitocinom (OXY) (Slika 24). Tretman oksitocinom nije uticao na porast telesne mase životinja, tako da između kontrolne i OXY grupe nije pokazana statistički značajna razlika u ovom parametru tokom čitavog eksperimenta. Prosečan porast telesne mase od 1. do 21. eksperimentalnog dana iznosio je za životinje kontrolne grupe  $131.2 \text{ g} \pm 6.3 \text{ g}$ , a za životinje OXY grupe  $139.5 \pm 9.6 \text{ g}$ , dok su pacovi hronično tretirani kortikosteronom imali značajno manji porast telesne mase: prosečno  $57.5 \pm 6.1 \text{ g}$  za CORT, odnosno  $85.5 \pm 4.6 \text{ g}$  za CORT+OXY grupu nakon tri nedelje tretmana (Slika 24, dan 21).

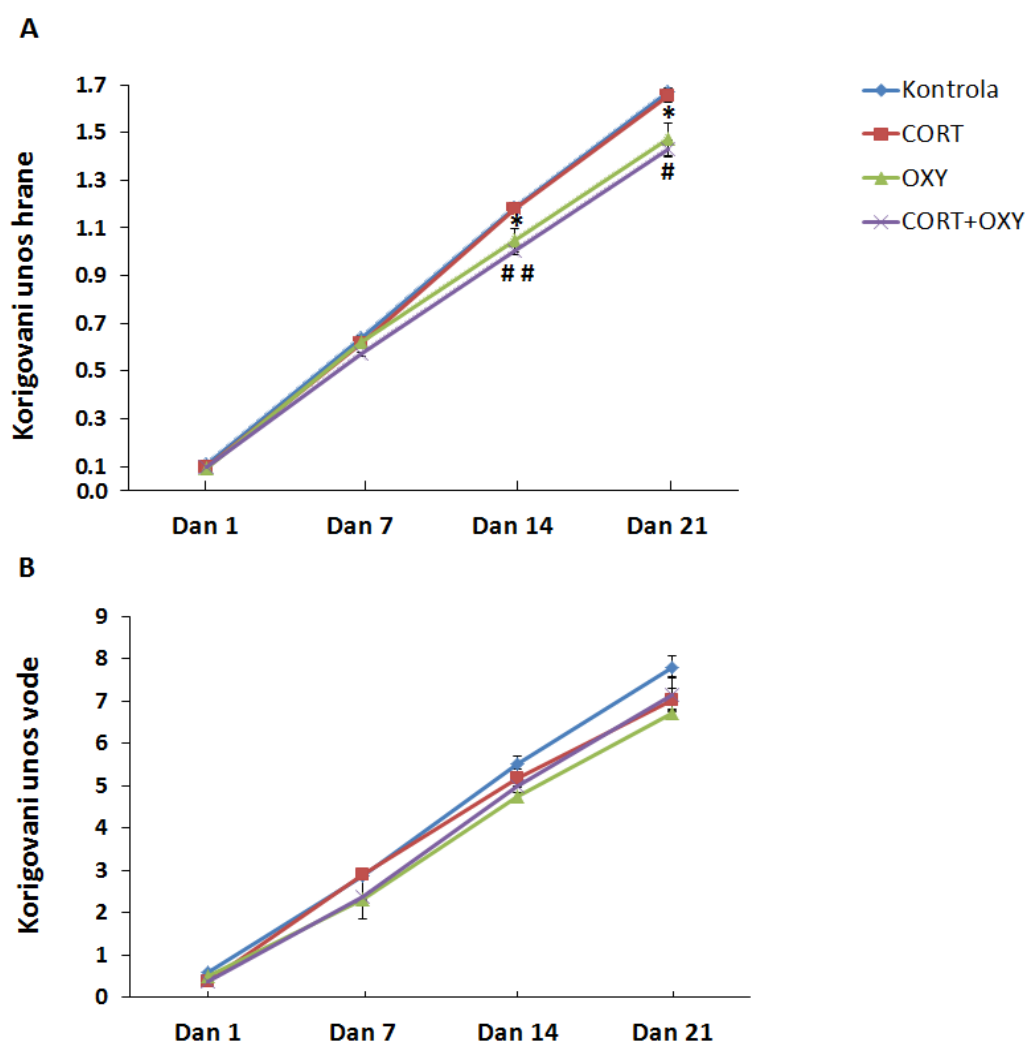
Počev od trećeg eksperimentalnog dana, pa sve do kraja eksperimenta, tretman kortikosteronom doveo je do značajno manjeg porasta telesne mase eksperimentalnih životinja ( $p < 0.001$  za 3., 7., 14. i 21. dan eksperimenta za CORT i CORT+OXY grupu). Aplikacija oksitocina tokom 14 dana umanjila je negativan uticaj kortikosterona na promene telesne mase u CORT+OXY grupi u odnosu na CORT grupu, tako da je porast mase životinja bio statistički značajno veći u CORT+OXY grupi u odnosu na CORT grupu ( $p < 0.01$  za 14. i 21. dan eksperimenta). Međutim, porast telesne mase životinja CORT+OXY grupe i dalje je bio značajno manji u odnosu na životinje kontrolne grupe ( $p < 0.001$  za 14. i 21. dan eksperimenta).



**Slika 24. Uticaj tretmana na porast telesne mase (g) eksperimentalnih životinja.** Porast telesne mase (g) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tokom trajanja eksperimenta. Životinje su tretirane rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* tokom 21 dana (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom dva hormona (CORT+OXY). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $p$ <0.001 u poređenju sa kontrolnom grupom, # $p$ <0.01 u poređenju sa CORT grupom.

#### 4.2.1.2. Unos hrane i vode

Kako je pokazano da eksperimentalni tretmani značajno utiču na porast telesne mase životinja, apsolutni unos hrane i vode nije bilo moguće porediti. Iz tog razloga su ove vrednosti korigovane u odnosu na telesnu masu eksperimentalnih životinja i prikazane su na Slici 25. S obzirom da su tokom eksperimenta životinje grupno čuvane, unos hrane i vode određivan je po kavezu. Korekcija je izvršena tako što je ukupan unos hrane odnosno vode (g) za dati eksperimentalni dan (Dan 1, Dan 7, Dan 14 i Dan 21) i određen kavez, podeljen srednjom vrednošću telesne mase životinja (g) iz tog kaveza konkretnog eksperimentalnog dana.



**Slika 25. Uticaj eksperimentalnih tretmana na unos hrane i vode eksperimentalnih životinja korigovan prema telesnoj masi.** Unos hrane korigovan u odnosu na telesnu masu (A) i unos vode korigovan u odnosu na telesnu masu (B) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tokom trajanja eksperimenta. Životinje su tretirane rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* tokom 21 dana (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Korekcija je izvršena tako što je ukupan unos hrane odnosno vode (g) za dati eksperimentalni dan (Dan 1, Dan 7, Dan 14 i Dan 21) i određen kavez, podeljen srednjom vrednosti telesne mase životinja (g) iz tog kaveza. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolnom grupom, ## $p < 0.01$  u poređenju sa CORT grupom.

Korigovani unos hrane životinja tretiranih kortikosteronom i kontrolnih životinja nije se značajno razlikovao tokom čitavog trajanja eksperimenta. S druge strane, počev od 14. dana eksperimenta, obe grupe životinja koje su primale oksitocin su unosile manje hrane u odnosu na odgovarajuću kontrolu ( $p < 0.05$  za 14. i 21. dan za



OXY grupu u poređenju sa kontrolom;  $p < 0.01$  za 14. dan i  $p < 0.05$  za 21. dan eksperimenta za CORT+OXY grupu u poređenju sa CORT grupom).

Jednofaktorska ANOVA nije pokazala statistički značajnu razliku u unosu vode između eksperimentalnih grupa, što može da ukaže na to da tretmani kortikosteronom i/ili oksitocinom nisu imali uticaja na unos tečnosti.

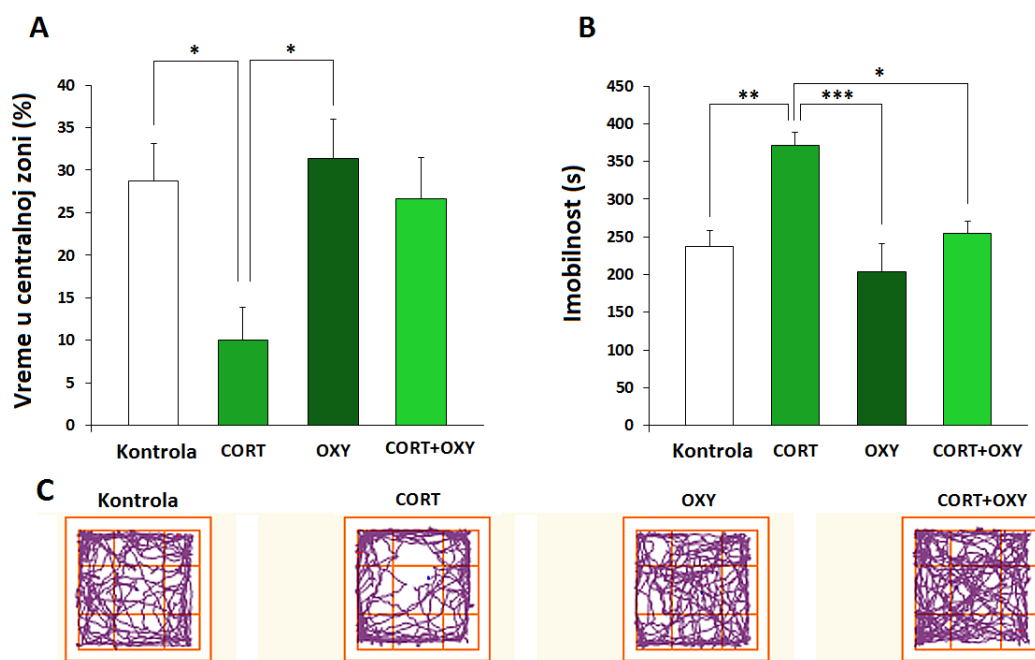
#### **4.2.2. Uticaj tretmana na ponašanje eksperimentalnih životinja**

Cilj izvođenja testova ponašanja bio je da se ispita eventualna povećana anksioznost, kao i ponašanje životinja koje može biti povezano sa depresivnom simptomatologijom. U tu svrhu korišćena je baterija testova ponašanja, koja je podrazumevala izvođenje testova sledećim redosledom: test otvorenog polja (OFT), uzdignuti plus lavirint (EPM) i test forsiranog plivanja (FST). Vremenski period između izvođenja testova bio je 24 časa. Testovi su izvođeni takvim redosledom da je prvo izvođen test koji predstavlja najmanji izvor stresa za eksperimentalne životinje, dok je za kraj ostavljan test forsiranog plivanja kao najviše stresan, sa ciljem da se izbegne uticaj izvođenog testa na ponašanje životinja tokom testiranja u sledećem testu ponašanja.

##### **4.2.2.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT)**

Hronični tretman kortikosteronom doveo je do povećane anksioznosti eksperimentalnih životinja, što se u testu otvorenog polja zapaža kao statistički značajno smanjenje vremena koje su životinje CORT grupe provele u centralnoj zoni OF arene u poređenju sa kontrolnom ( $p < 0.05$ ) i grupom životinja tretiranom samo oksitocinom ( $p < 0.05$ ) (Slika 26A). Takođe, kao što je prikazano na Slici 26B, životinje hronično tretirane kortikosteronom su značajno više vremena provele u stanju imobilnosti u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama ( $p < 0.01$  u odnosu na kontrolu;  $p < 0.001$  u odnosu na OXY i  $p < 0.05$  u odnosu na CORT+OXY grupu).

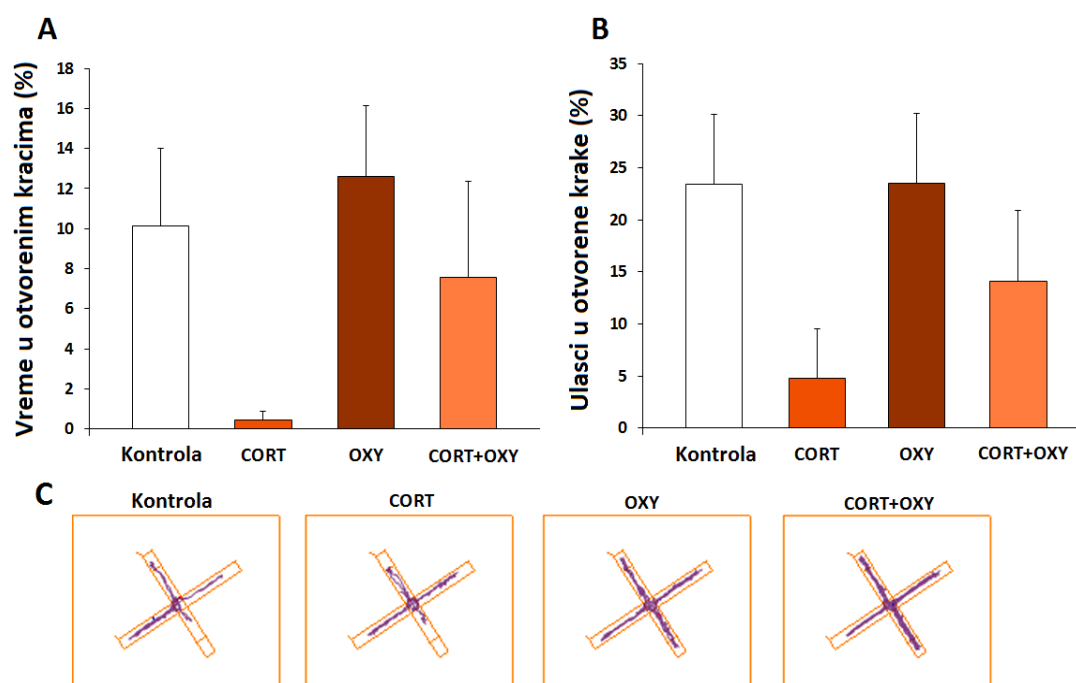
Aplikacija oksitocina uz tronedeljni tretman kortikosteronom značajno je smanjila ukupno vreme koje su životinje provele u stanju imobilnosti u poređenju sa grupom životinja tretiranom samo kortikosteronom ( $p < 0.05$ ) (Slika 26B), tako da se ovaj parametar kod CORT+OXY grupe praktično nije razlikovao od vrednosti zabeleženih kod kontrolne grupe životinja. S druge strane, tretman oksitocinom uz administraciju kortikosterona, uprkos višestruko produženog vremena provedenog u centralnoj zoni OF arene, nije doveo do statistički značajne razlike između CORT+OXY i CORT grupa (Slika 26A).



**Slika 26. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u testu otvorenog polja (OFT).** Procenat vremena provedenog u centralnoj zoni OF arene (A), ukupno vreme imobilnosti (B) i prikaz reprezentativnih rezultata putanja kretanja životinja iz svake eksperimentalne grupe zabeleženih korišćenjem AnyMaze<sup>®</sup> softvera (C) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* tokom 21 dana (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. OFT je izvođen 19. dana eksperimenta u trajanju od 10 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

#### 4.2.2.2. Uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM)

Na Slici 27 prikazani su rezultati testiranja pacova u uzdignutom plus lavirintu. Iako je tronedeljni tretman kortikosteronom doveo do drastičnog smanjenja procenta vremena koje su životinje provodile u otvorenim kracima (za 95.6% u odnosu na vrednosti kontrolne grupe, Slika 27A), kao i procenta ulazaka životinja u otvorene krake (za 79.6% u odnosu na kontrolnu grupu, Slika 27B), nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom parametru između grupa, verovatno zbog velike varijabilnosti odgovora životinja unutar grupa.

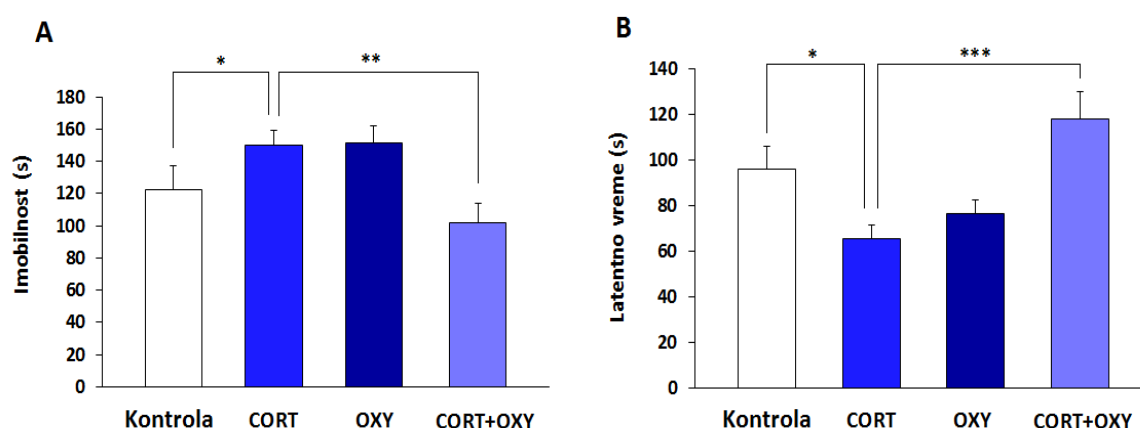


**Slika 27. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u uzdignutom plus lavirintu (EPM).** Procenat vremena provedenog u otvorenim kracima EPM arene (A), procenat ulazaka u otvorene krake (B) i prikaz reprezentativnih rezultata putanja kretanja životinja iz svake eksperimentalne grupe zabeleženih korišćenjem AnyMaze<sup>®</sup> softvera (C) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* tokom 21 dana (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. EPM je izvođen 20. dana eksperimenta u trajanju od 5 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.

Slično, aplikacija oksitocina nije pokazala statistički značajan efekat na ponašanje životinja hronično izloženih visokim nivoima kortikosterona u EPM testu.

Međutim, životinje CORT+OXY grupe su, u poređenju sa CORT grupom životinja, 16.9 puta više vremena provodile u otvorenim kracima EPM arene (izraženo u procentima, Slika 27A). Takođe, kod ove grupe životinja je i procenat ulazaka u otvorene krake bio 2.95 puta veći u odnosu na CORT grupu (Slika 27B).

#### 4.2.2.3. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST)



**Slika 28. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja (FST).** Vreme provedeno u stanju imobilnosti (A) i vreme od početka FST testa do prve epizode imobilnosti (latentno vreme) (B) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* tokom 21 dana (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Protokol FST testa podrazumevao je trening od 15 min 20. dana i test od 5 min 21. dana eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05.

Analizom FST testa, u trajanju od 5 min, izvođenog 21. eksperimentalnog dana, pokazano je da tretman kortikosteronom kod životinja dovodi do pojave ponašanja koje se može povezati sa depresivnom simptomatologijom (Slika 28). Tačnije, životinje CORT grupe provodile su značajno više vremena u imobilnom položaju (Slika 28A) u poređenju sa kontrolnom ( $p < 0.05$ ) i CORT+OXY grupom ( $p < 0.01$ ). Takođe, kod ovih životinja je zabeleženo značajno kraće latentno vreme (Slika 28B) u poređenju sa kontrolnim ( $p < 0.05$ ) i životinjama CORT+OXY grupe ( $p < 0.001$ ). Latentno vreme ili period predstavlja vreme od početka testa do prve epizode imobilnosti eksperimentalne životinje i u obrnutoj je korelaciji sa depresivnim ponašanjem.

Tretman oksitocinom poslednje dve nedelje *per os* administracije kortikosterona uspeo je da umanja promene u ponašanju životinja izazvane visokim nivoima kortikosterona, tako da su u poređenju sa CORT grupom i vreme imobilnosti (Slika 28A) i latentno vreme (Slika 28B) bili značajno kraći u CORT+OXY grupi ( $p < 0.01$  i  $p < 0.001$ ).

#### 4.2.3. Uticaj tretmana na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde eksperimentalnih životinja

Apsolutna masa leve nadbubrežne žlezde i morfometrijski parametri korteksa nadbubrežne žlezde eksperimentalnih životinja prikazani su u Tabeli VII.

**Tabela VII.** Uticaj hroničnog tretmana kortikosteronom, oksitocinom ili njihovom kombinacijom na masu i morfometrijske parametre nadbubrežne žlezde pacova Wistar soja.

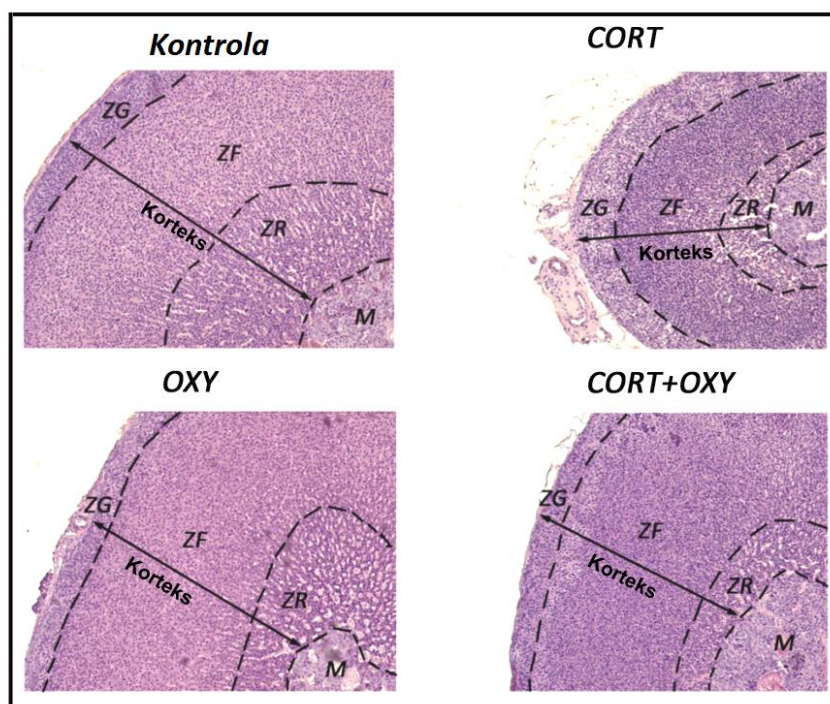
	Kontrola	CORT	OXY	CORT+OXY
Apsolutna masa leve nadbubrežne žlezde (mg)	31.0 ± 1.2	12.3 ± 0.4 <sup>***(a,c)</sup>	29.4 ± 0.8	16.6 ± 1.3 <sup>***(a), *(b)</sup>
Površina korteksa	4.80 ± 0.27	2.15 ± 0.14 <sup>***(a,c)</sup>	5.20 ± 0.23	3.15 ± 0.26 <sup>***(a,c), *(b)</sup>
Zona glomeruloza				
Površina (mm <sup>2</sup> )	0.74 ± 0.03	0.71 ± 0.05	0.81 ± 0.03	0.79 ± 0.05
Zona fascikulata				
Površina (mm <sup>2</sup> )	2.48 ± 0.10	0.82 ± 0.04 <sup>***(a,c)</sup>	2.33 ± 0.11	1.23 ± 0.14 <sup>***(a,c), *(b)</sup>
Zona reticularis				
Površina (mm <sup>2</sup> )	1.81 ± 0.16	0.68 ± 0.13 <sup>***(a,c)</sup>	2.04 ± 0.13	0.86 ± 0.09 <sup>***(a,c)</sup>

Životinje su tretirane rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400 µL *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. #Sve površine se odnose na ekvatorijalne preseke žlezde. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  u poređenju sa (a) Kontrolom, (b) CORT i (c) OXY grupom.

#### 4.2.3.1. Apsolutna masa i morfometrijska analiza nadbubrežne žlezde

Kod grupe pacova tretirane kortikosteronom tokom 21. dana, apsolutna masa leve nadbubrežne žlezde bila je vidno i statistički značajno manja u poređenju sa kontrolnom grupom (60%,  $p < 0.001$ ) i OXY grupom (49%,  $p < 0.001$ ). Dvonedeljna *s.c.* aplikacija oksitocina nije imala uticaja na masu žlezde, ali u kombinaciji sa kortikosteronom, isti tretman oksitocinom je doveo do povećanja mase nadbubrega za 35% ( $p < 0.05$ ) u odnosu na grupu koja je primala samo kortikosteron. Uprkos toga, masa nadbubrežne žlezde CORT+OXY životinja ipak je bila značajno manja od mase nadbubrežne žlezde kontrolnih životinja ( $p < 0.001$ ).

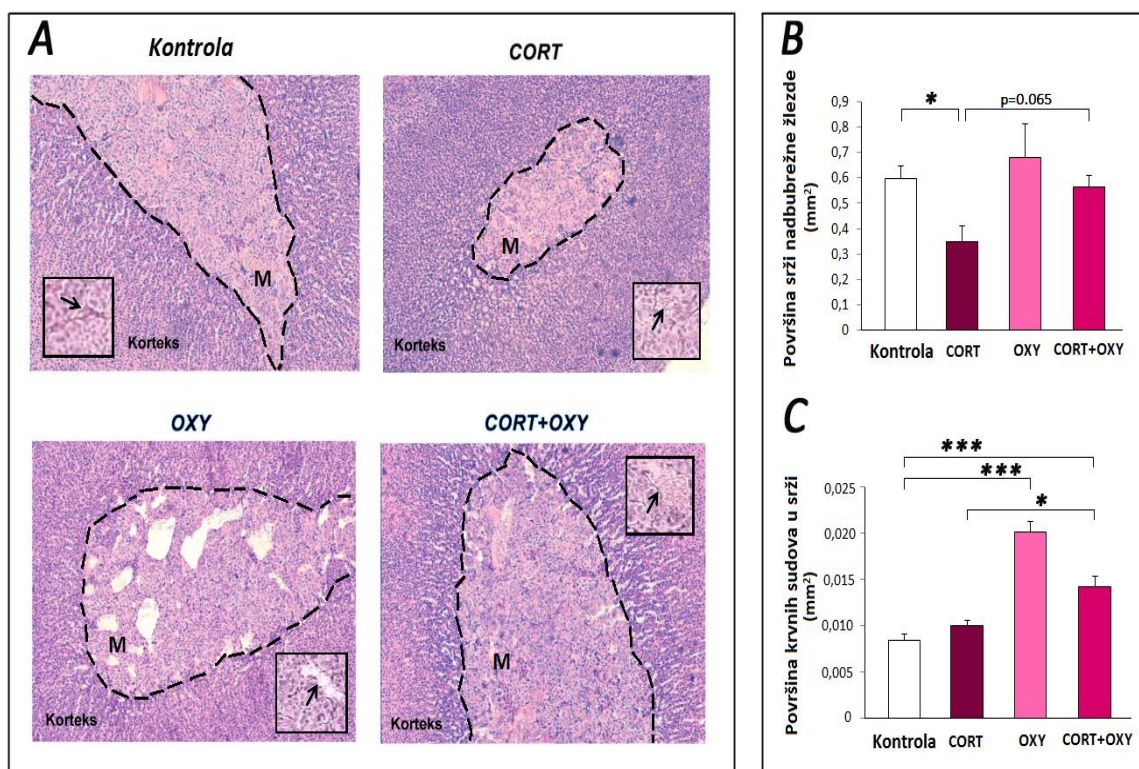
Rezultati morfometrijske analize ekvatorijalnih preseka nadbubrega prikazani su u Tabeli VII i na Slikama 30B i 30C, dok su fotomikrografije preseka žlezde prikazane na Slikama 29 i 30A.



**Slika 29. Histološka analiza nadbubrežne žlezde pacova Wistar soja.** Fotomikrografije ekvatorijalnih preseka nadbubrega odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY slikane na uveličanju 40 $\times$ . Preseci su bojani hematoksilinom i eozinom. Isprekidane linije ukazuju na granice između tri kortikalne zone i srži. Crna linija sa strelicama pokazuje dijametar korteksa. Skraćenice: M, medula; ZG, zona glomeruloza; ZF, zona fasciculata; ZR, zona retikularis.



Tretman kortikosteronom sam, kao i u kombinaciji sa oksitocinom, značajno je redukovao površinu korteksa nadbubrežne žlezde ( $p < 0.001$  i  $p < 0.001$  za CORT i CORT+OXY grupe) u poređenju sa kontrolom (Tabela VII). Tretman oksitocinom je delimično umanjio efekte hronično povišenih nivoa kortikosterona: u poređenju sa CORT grupom, pokazano je značajno povećanje površine korteksa ( $p < 0.05$ ) kod CORT+OXY grupe. Površina srži nadbubrežne žlezde bila je takođe statistički značajno smanjena kod pacova tretiranih kortikosteronom ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolnim životinjama, dok je kod CORT+OXY grupe primećen trend u povećanju površine ovog regiona nadbubrežne žlezde ( $p = 0.065$ ) u poređenju sa CORT grupom (Slika 30B).



**Slika 30. Uticaj eksperimentalnih tretmana na strukturu medule (M) nadbubrežne žlezde.** Fotomikrografije srži nadbubrežne žlezde slikane na uveličanju 40× (A), površina srži (B) i površina krvnih sudova u srži nadbubrežne žlezde (C) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80®) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400 μL *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ . Isprekidane linije ukazuju na granice između srži i korteksa, strelice pokazuju na krvne sudove u srži.

Detaljnou svetlosnom mikroskopijom kore nadbubrežne žlezde, uočene su sledeće promene pojedinih kortikalnih zona nakon eksperimentalnih tretmana i prikazane u Tabeli VII.

Hronični tretman kortikosteronom značajno je smanjio površinu zone fascikulate ( $p < 0.001$  za CORT i  $p < 0.001$  za CORT+OXY grupu) u poređenju sa kontrolom. Slično, pokazano je da je površina zone retikularis značajno manja nakon tretmana kortikosteronom ( $p < 0.001$  za CORT i  $p < 0.001$  za CORT+OXY grupu) u poređenju sa kontrolnim životinjama. S druge strane, eksperimentalni tretmani nisu imali uticaja na površinu zone glomeruloze. Sam tretman oksitocinom nije promenio površinu kortikalnih zona, ali je uz administraciju kortikosterona značajno povećao površinu zone fascikulate ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa CORT grupom. Međutim, površina zone fascikulate CORT+OXY grupe i dalje je bila značajno manja u poređenju sa kontrolnom grupom životinja ( $p < 0.05$ ).

#### **4.2.3.2. Svetlosna mikroskopija krvnih sudova srži nadbubrežne žlezde**

Analizom ekvatorijalnih preseka nadbubrega primećeno je da tretman oksitocinom značajno utiče na površinu krvnih sudova u srži žlezde, bez obzira na dodatni hronični tretman kortikosteronom (Slika 30C). Značajno povećanje površine krvnih sudova u srži uočeno je i kod OXY i kod CORT+OXY grupe ( $p < 0.001$  i  $p < 0.001$ , redom) u poređenju sa kontrolom, kao i sa CORT grupom ( $p < 0.001$  za OXY i  $p < 0.05$  za CORT+OXY grupu). S druge strane, hronični tretman kortikosteronom nije imao efekta na vaskulaturu srži nadbubrežne žlezde.

#### **4.2.3.3. Ekspresija gena Slc6a2 i Slc18a2 i količina proteina transportera za noradrenalin (eng. Noradrenaline transporter, NAT) i vezikularnog transportera za monoamine 2 (eng. Vesicular monoamine transporter 2, VMAT2) u tkivu srži nadbubrežne žlezde**

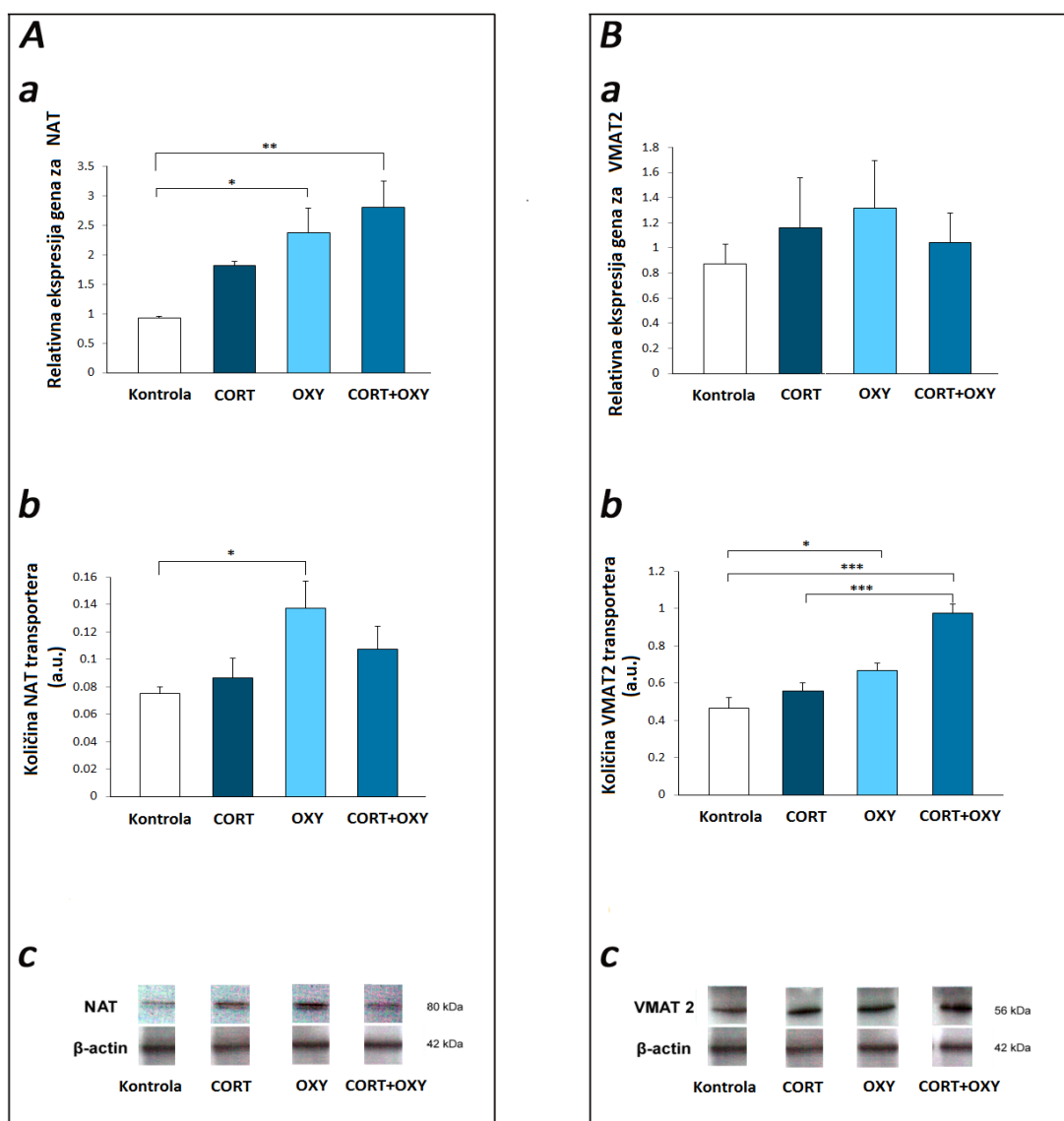
Kako se povećanje kapaciteta srži nadbubrežne žlezde za skladištenje kateholamina smatra jednim od mehanizama adaptacije organizma na uslove hroničnog



stresa (Eisenhofer i sar., 2004), u ovoj regiji žlezde eksperimentalnih životinja je određivana ekspresija iRNK dva najvažnija transportera za kateholamine, transportera za noradrenalin (NAT) i vezikularnog transportera za monoamine 2 (VMAT2), kao i same količine ova dva proteina, a rezultati su prikazani na Slici 31.

Ekspresija gena *Slc6a2* koji kodira NAT transporter u srži (Slika 31Aa) bila je izmenjena samim dvonedeljnim tretmanom oksitocinom, kao i u kombinaciji sa tronedeljnim tretmanom kortikosteronom, dok tretman kortikosteronom nije imao efekta na njegovu ekspresiju. Kao što se može videti na Slici 31Aa, u obe eksperimentalne grupe tretirane oksitocinom, OXY i CORT+OXY, pokazano je značajno povećanje količine iRNK za NAT ( $p < 0.05$  za OXY i  $p < 0.001$  za CORT+OXY grupu) u odnosu na životinje kontrolne grupe. Western blot analizom tkiva srži nadbubrežne žlezde eksperimentalnih životinja utvrđeno je da je količina proteina NAT statistički značajno povećana samo kod grupe životinja tretirane oksitocinom ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 31Ab).

Rezultati RT-PCR analize nisu pokazali postojanje razlike u ekspresiji gena *Slc18a2* koji kodira VMAT2 transporter u tkivu srži žlezde između eksperimentalnih grupa (Slika 31Ba), moguće i zbog velike varijabilnosti u dobijenim rezultatima. S druge strane, količina proteina VMAT2 značajno je povećana u OXY grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0.05$ ), dok su najveće količine ovog transportera zapažene u CORT+OXY grupi i one su bile značajno veće u poređenju sa kontrolom ( $p < 0.001$ ) i CORT grupom životinja ( $p < 0.001$ ) (Slika 31Bb).



**Slika 31. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ekspresiju gena *Slc6a2* i *Slc18a2* i količinu transportera za kateholamine u srži nadbubrežne žlezde.** Relativna ekspresija gena *Slc6a2* i *Slc18a2* koji kodiraju proteine NAT i VMAT2 (Aa i Ba), količina proteina NAT i VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde (Ab i Bb) kao i slike dobijenih Western blot filmova (Ac i Bc). Odrasli mužjaci pacova Wistar soja su tretirani rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80®) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400 μL *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . Rezultati za ekspresiju iRNK su prikazani kao promena u odnosu na vrednosti kalibratora i normalizovani u odnosu na ciklofilin A. Količina proteina je prikazana u arbitrarnim jedinicama (a.u.) i normalizovana u odnosu na β-aktin.

#### **4.2.3.4. Uticaj tretmana na bazalnu i stresom indukovanu aktivnost nadbubrežne žlezde: koncentracije hormona kortikosterona, adrenalina i noradrenalina u plazmi pre i nakon akutnog stresa**

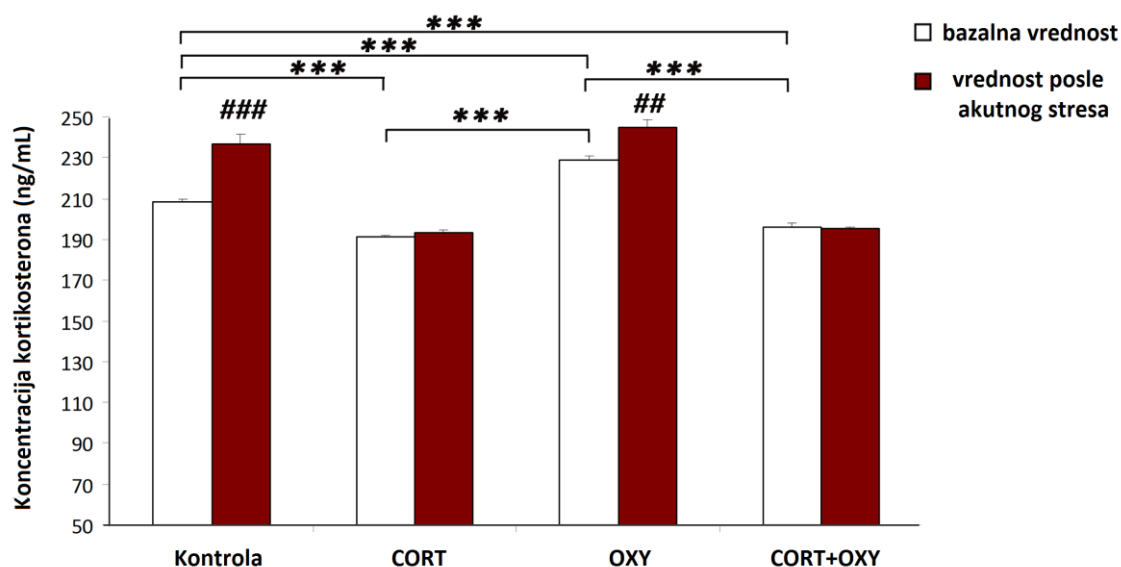
U cilju evaluacije efekta intenzivnog stresa kakav je forsirano plivanje, na parametre aktivnosti nadbubrežne žlezde, svaka eksperimentalna grupa životinja (n=15) je nasumično podeljena u dve podgrupe. Životinje jedne podgrupe (n=8) su podvrgnute akutnom stresu, koji je podrazumevao izvođenje testa forsiranog plivanja u trajanju od 15 min. Životinje druge podgrupe (n=7) nisu bile izložene akutnom stresu, u cilju određivanja bazalnih vrednosti analiziranih hormona u plazmi.

Koncentracije kortikosterona (Slika 32), adrenalina i noradrenalina (Slika 33) životinja CORT, OXY, CORT+OXY i kontrolne grupe određivane su pre i nakon akutnog stresa izazvanog izvođenjem testa forsiranog plivanja u trajanju od 15 min.

#### **4.2.3.5. Koncentracija kortikosterona u plazmi**

Tronedeljni tretman kortikosteronom doveo je do značajnog smanjenja bazalne koncentracije kortikosterona u plazmi ( $p < 0.001$  za CORT grupu i  $p < 0.001$  za CORT+OXY grupu) u poređenju sa kontrolom, kao i grupom životinja tretiranom samo oksitocinom ( $p < 0.001$  za CORT grupu i  $p < 0.001$  za CORT+OXY grupu) (Slika 32). S druge strane, aplikacija oksitocina dovela je do statistički značajnog povećanja bazalne koncentracije kortikosterona ( $p < 0.001$ ) kod OXY grupe u poređenju sa kontrolnim životinjama.

Izlaganje životinja kontrolne grupe akutnom stresu dovelo je do očekivanog porasta koncentracije kortikosterona u plazmi ( $p < 0.001$ ) u poređenju sa odgovarajućim bazalnim vrednostima. Porast koncentracija CORT u plazmi nakon akutnog stresa, primećen je i kod životinja OXY grupe ( $p < 0.01$ ). Međutim, hronični tretman kortikosteronom umanjio je odgovor nadbubrežne žlezde na akutni stres, tako da nije primećen uobičajeni porast koncentracije ovog hormona u plazmi životinja CORT i CORT+OXY grupe nakon FST testa u poređenju sa bazalnim vrednostima date eksperimentalne grupe.



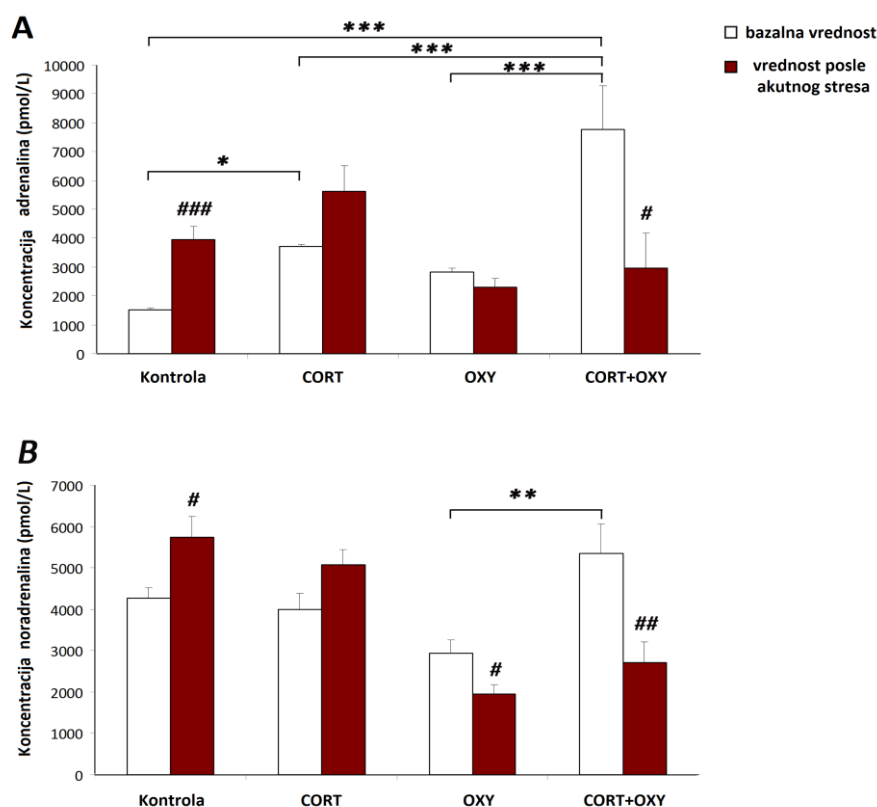
**Slika 32. Uticaj eksperimentalnih tretmana na bazalne i vrednosti kortikosterona u plazmi životinja nakon akutnog stresa.** Koncentracija kortikosterona u plazmi odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $p$ <0.001 poređenje bazalnih i vrednosti nakon akutnog stresa između različitih eksperimentalnih grupa, ### $p$ <0.001, ## $p$ <0.01 poređenje bazalnih i vrednosti nakon akutnog stresa unutar svake eksperimentalne grupe. Kao akutni stres izvođen je test forsiranog plivanja u trajanju od 15 minuta.

#### 4.2.3.6. Koncentracije kateholamina u plazmi

Svi eksperimentalni tretmani doveli su do porasta bazalnih koncentracija adrenalina u plazmi, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Slika 33A). Ovaj porast bio je statistički značajan u CORT ( $p$ <0.05) i CORT+OXY grupi ( $p$ <0.01). Međutim, u poređenju sa kontrolom, nije zapažena statistički značajna razlika u bazalnim vrednostima noradrenalina ni u jednoj eksperimentalnoj grupi (Slika 33B). Vrednosti ovog hormona u plazmi bile su značajno veće u CORT+OXY grupi ( $p$ <0.01) u poređenju sa životinjama tretiranim samo oksitocinom (OXY grupa).

Očekivano, nakon izlaganja akutnom stresu, koncentracije adrenalina u plazmi životinja kontrolne grupe bile su značajno veće u poređenju sa bazalnim vrednostima ( $p$ <0.001) (Slika 33A). Kod životinja CORT+OXY grupe, zapaženo je značajno smanjenje koncentracija adrenalina u plazmi nakon akutnog stresa, u poređenju sa izuzetno visokim bazalnim vrednostima ( $p$ <0.05). Promene koncentracija noradrenalina

nakon testa forsiranog plivanja bile su slične promenama koncentracija adrenalina (Slika 33B): kod kontrolnih životinja bile su značajno povećane ( $p < 0.05$ ), dok su u CORT+OXY grupi kao i u OXY grupi bile iznenađujuće i značajno smanjene ( $p < 0.01$ ), odnosno ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa odgovarajućim bazalnim vrednostima.



**Slika 33. Uticaj eksperimentalnih tretmana na bazalne i vrednosti kateholamina u plazmi životinja nakon akutnog stresa.** Koncentracija adrenalina (A) i koncentracija noradrenalina (B) u plazmi odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  poređenje bazalnih i vrednosti nakon akutnog stresa između različitih eksperimentalnih grupa, # # # $p < 0.001$ , # #  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  poređenje bazalnih i vrednosti nakon akutnog stresa unutar svake eksperimentalne grupe. Kao akutni stres izvođen je test forsiranog plivanja u trajanju od 15 minuta.

#### **4.2.4. Uticaj tretmana na parametre oksidativnog stresa u krvi Wistar pacova: stepen oštećenja DNK limfocita periferne krvi i koncentracije lipidnih hidroperoksida, malondialdehida i aktivnost superoksid dizmutaze u plazmi**

S obzirom da u uslovima hiperaktivnosti HPA osovine i sledstveno hronično povišenih vrednosti glukokortikoida, može doći do disbalansa u produkciji slobodnih radikala i efikasnosti antioksidativne zaštite organizma (Liu i sar., 1996; Consiglio i sar., 2010), praćen je eventualni uticaj eksperimentalnih tretmana na oštećenje DNK limfocita periferne krvi. Pored toga, određivani su i parametri oksidativnog stresa u krvi eksperimentalnih životinja: koncentracija produkata oksidacije lipida (lipidnih hidroperoksida i malondialdehida) i aktivnosti enzima superoksid dizmutaze, kao jednog od enzima antioksidativne zaštite.

##### **4.2.4.1. Oštećenje DNK limfocita periferne krvi Wistar pacova**

Komet testom određivan je ukupan broj ćelija sa oštećenjem DNK, kao i ukupan broj ćelija niskog i visokog stepena oštećenja, od 100 nasumično odabranih i analiziranih ćelija po uzorku. Oštećenja su određivana u limfocitima periferne krvi životinja tretiranih kortikosteronom, oksitocinom, njihovom kombinacijom, kao i kod kontrolne grupe životinja, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 34.

##### **4.2.4.2. Ukupan broj ćelija sa oštećenjem DNK**

Iako nije uočena značajna razlika u ukupnom broju ćelija sa oštećenjem DNK između eksperimentalnih grupa, nakon *in vitro* tretmana vodonik peroksidom, primećene su značajne razlike (Slika 34A). Kao što je bilo očekivano, inkubacija sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> drastično je povećala broj ćelija sa DNK oštećenjem u poređenju sa limfocitima inkubiranim sa PBS-om, i to je bilo vidljivo unutar svake eksperimentalne grupe. Dvofaktorskoim ANOVA testom potvrđen je značajan efekat eksperimentalnih tretmana [ $F_{(3,40)} = 44.18$ ;  $p < 0.0001$ ], prisustva H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [ $F_{(1,40)} = 1928.16$ ;  $p < 0.0001$ ] kao i postojanje interakcije između tretmana i prisustva H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [ $F_{(3,40)} = 35.76$ ;  $p < 0.0001$ ]. Nakon inkubacije sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ukupan broj ćelija sa oštećenjem DNK bio je za 42% i

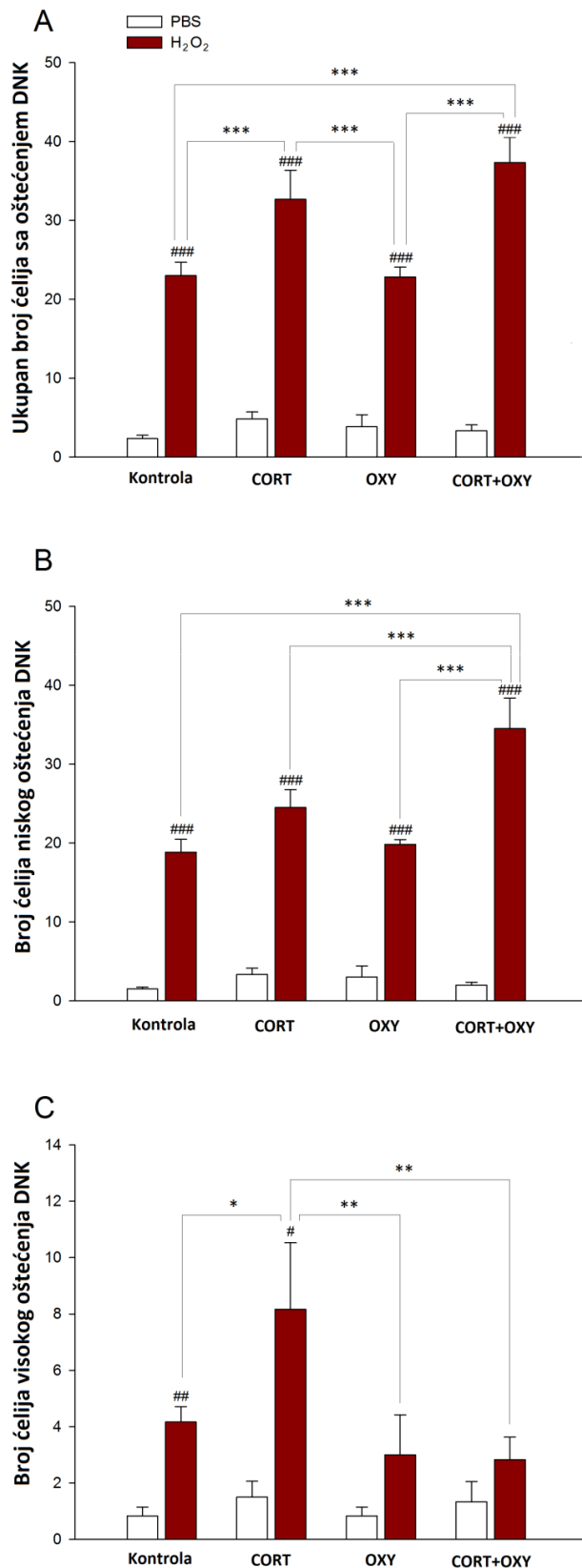
statistički značajno povećan u grupi životinja tretiranih kortikosteronom u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.001$ ) kao i u poređenju sa OXY grupom ( $p < 0.001$ , procenat uvećanja u odnosu na ovu grupu iznosio je 43%). Takođe, u grupi životinja tretiranoj kombinacijom kortikosterona i oksitocina, povećanje broja limfocita sa oštećenjem DNK je bilo značajno u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.001$ , uvećanje za 62%) i OXY grupom ( $p < 0.001$ , uvećanje za 65%).

#### **4.2.4.3. Različit stepen oštećenja DNK perifernih limfocita Wistar pacova: ćelije sa niskim i ćelije sa visokim stepenom oštećenja DNK**

Na Slikama 34B i 34C prikazan je broj ćelija niskog i visokog stepena oštećenja DNK bez i nakon *in vitro* tretmana sa  $H_2O_2$ .

Poređenjem broja ćelija sa niskim stepenom oštećenja DNK u krvi eksperimentalnih životinja tretiranih kortikosteronom i/ili oksitocinom, korišćenjem dvofaktorske ANOVA-e, pokazano je postojanje značajnog efekta eksperimentalnih tretmana [ $F_{(3,40)} = 7.90$ ;  $p = 0.0006$ ], prisustva  $H_2O_2$  [ $F_{(1,40)} = 283.41$ ;  $p < 0.0001$ ], kao i interakcije između ova dva faktora [ $F_{(3,40)} = 9.39$ ;  $p = 0.0003$ ]. Takođe, poređenjem broja limfocita periferne krvi sa visokim stepenom oštećenja DNK, pokazan je značajan efekat tretmana: [ $F_{(3,40)} = 3.10$ ;  $p = 0.00375$ ], prisustva  $H_2O_2$  [ $F_{(1,40)} = 19.67$ ;  $p < 0.0001$ ] ali ne i značajna interakcija ovih faktora [ $F_{(3,40)} = 2.22$ ;  $p = 0.1008$ ].

U našim eksperimentalnim uslovima, u prisustvu  $H_2O_2$ , broj ćelija sa niskim oštećenjem DNK bio je značajno povećan samo u grupi životinja tretiranoj kombinacijom kortikosterona i oksitocina u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe ( $p < 0.001$ ) (Slika 34B).



**Slika 34. Uticaj eksperimentalnih tretmana na stepen oštećenja DNK perifernih limfocita životinja.**

Ukupan broj ćelija sa oštećenjem DNK (A), broj ćelija sa niskim oštećenjem DNK (B) i broj ćelija sa visokim oštećenjem DNK (C) limfocita periferne krvi odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY i *in vitro* inkubiranih sa 60  $\mu$ L fosfatnog pufera (PBS) ili 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tokom 5 min na 4 °C. Analiza je vršena na ukupno 100 ćelija po svakom uzorku. Ćelije sa niskim stepenom oštećenja podrazumevaju zbir ćelija nivoa oštećenja 1 i 2 (5%-40% oštećenje) u odnosu na broj neoštećenih ćelija. Ćelije sa visokim stepenom oštećenja podrazumevaju zbir ćelija nivoa oštećenja 3 i 4 (oštećenje > 40%) u odnosu na broj neoštećenih ćelija. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 poređenje PBS ili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretiranih uzoraka između različitih eksperimentalnih grupa, ### p<0.001, ## p<0.01 PBS u poređenju sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tretiranim uzorcima u okviru svake eksperimentalne grupe.



Nakon inkubacije sa  $H_2O_2$ , kod kontrolne grupe životinja je bio povećan broj ćelija kako sa niskim, tako i sa visokim stepenom oštećenja DNK (Slika 34B i 34C), u poređenju sa ćelijama tretiranim PBS-om ( $p < 0.001$  za nisko i  $p < 0.01$  za visoko oštećene ćelije). U odnosu na kontrolnu grupu, kod životinja hronično tretiranih kortikosteronom, broj ćelija sa visokim stepenom oštećenja nakon inkubacije sa  $H_2O_2$  bio je povećan za 96% ( $p < 0.05$ ) (Slika 34C). S druge strane, tretman oksitocinom, sam, kao i u kombinaciji sa kortikosteronom, smanjio je skoro tri puta broj limfocita sa visokim stepenom oštećenja DNK nakon inkubacije sa  $H_2O_2$  u poređenju sa vrednostima dobijenim za CORT grupu ( $p < 0.01$  za OXY i  $p < 0.01$  za CORT+OXY grupu). Stoga, u obe eksperimentalne grupe koje su primale *s.c.* oksitocin tokom 14 dana, nije primećen očekivan porast visoko oštećenih ćelija nakon inkubacije sa  $H_2O_2$  u poređenju sa vrednostima dobijenim nakon inkubacije sa PBS-om, što može ukazivati na potencijalni protektivni efekat oksitocina.

#### 4.2.4.4. Vrednosti Totalnog skora kometa (eng. Total comet score, TCS)

Za svaku eksperimentalnu grupu je množenjem broja ćelija date kategorije oštećenja DNK sa brojem odgovarajuće kategorije izračunat Totalni skor kometa (TSK) (Sopić i sar., 2014), kao i skorovi za dve grupe oštećenja DNK, ćelije niskog (NOSK) i visokog stepena oštećenja (VOSK). Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli VIII.

Kao što je i bilo očekivano, TSK limfocita tretiranih *in vitro* vodonik peroksidom životinja CORT grupe, bio je značajno veći u poređenju sa odgovarajućim skorom kontrolnih životinja ( $p < 0.05$ ). Međutim, TSK nakon inkubacije sa  $H_2O_2$  kod životinja CORT+OXY grupe nije se značajno razlikovao od skora kontrolne grupe. Ovakavi rezultati ukazuju na to da je tretman oksitocinom kod životinja hronično izloženih povišenim nivoima kortikosterona, nakon *in vitro* inkubacije sa oksidujućim agensom kao što je  $H_2O_2$ , sprečio porast oštećenja perifernih limfocita. U prilog tome je i činjenica da je NOSK bio značajno povećan ( $p < 0.001$ ), a VOSK značajno smanjen ( $p < 0.01$ ) kod CORT+OXY grupe u poređenju sa životinjama CORT grupe, nakon inkubacije sa  $H_2O_2$  (Tabela VIII).

**Tabela VIII.** Totalni skor kometa (TSK) i skorovi za ćelije niskog (NOSK) i visokog stepena oštećenja DNK (VOSK) limfocita periferne krvi odraslih mužjaka pacova Wistar soja.

		TSK	NOSK	VOSK
<b>PBS</b>	<b>Kontrola</b>	5.17±1.09	2.50±0.57	2.67±1.05
	<b>CORT</b>	10.50±1.93	3.67±0.84	6.83±2.10
	<b>OXY</b>	9.33±3.64	5.00±1.81	4.33±2.14
	<b>CORT+OXY</b>	6.17±1.86	2.33±0.42	3.83±1.63
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Kontrola</b>	39.50±2.99	24.83±2.55	14.67±1.78
	<b>CORT</b>	57.00±9.87 <sup>*a</sup>	29.00±3.09	28.00±8.39 <sup>*a</sup>
	<b>OXY</b>	35.00±1.61 <sup>**b</sup>	25.50±1.63	9.50±2.58 <sup>**b</sup>
	<b>CORT+OXY</b>	53.17±8.70 <sup>*c</sup>	42.83±6.20 <sup>***a,c, **b</sup>	10.33±5.02 <sup>**b</sup>

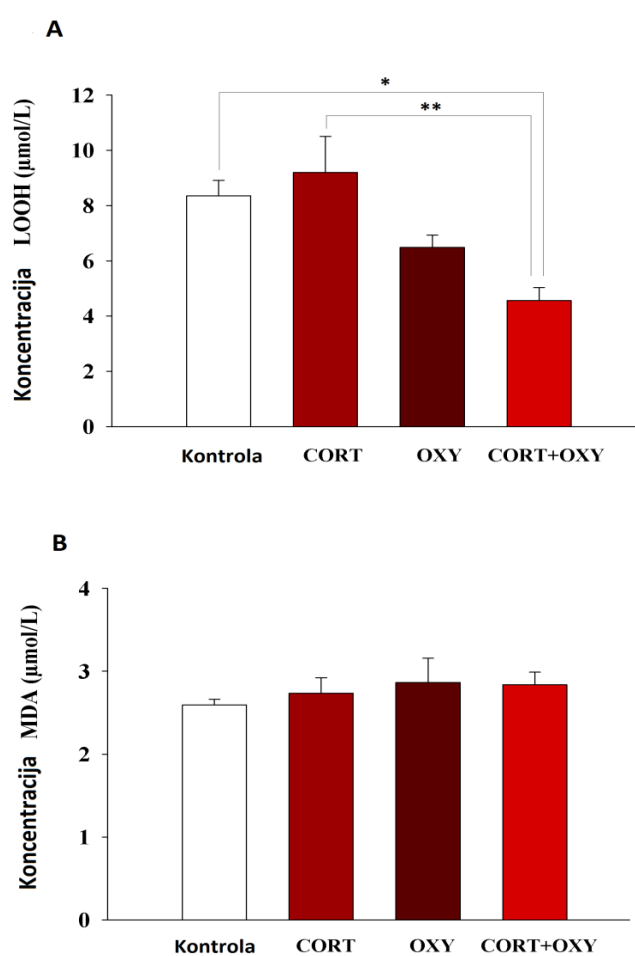
Životinje su tretirane rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400 µL *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY i *in vitro* inkubirane sa 60 µL fosfatnog pufera (PBS) ili 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tokom 5 min na 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 u poređenju sa (a) Kontrolom, (b) CORT i (c) OXY grupom.

#### 4.2.4.5. Uticaj tretmana na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi Wistar pacova

U uzorcima plazme eksperimentalnih životinja određivane su koncentracije parametara oksidacije lipida, lipidnih hidroperoksida (LOOH) i malondialdehida (MDA), kao i aktivnost superoksid dizmutaze (SOD), jednog od enzima antioksidativne zaštite.

#### 4.2.4.6. Parametri lipidne peroksidacije u plazmi

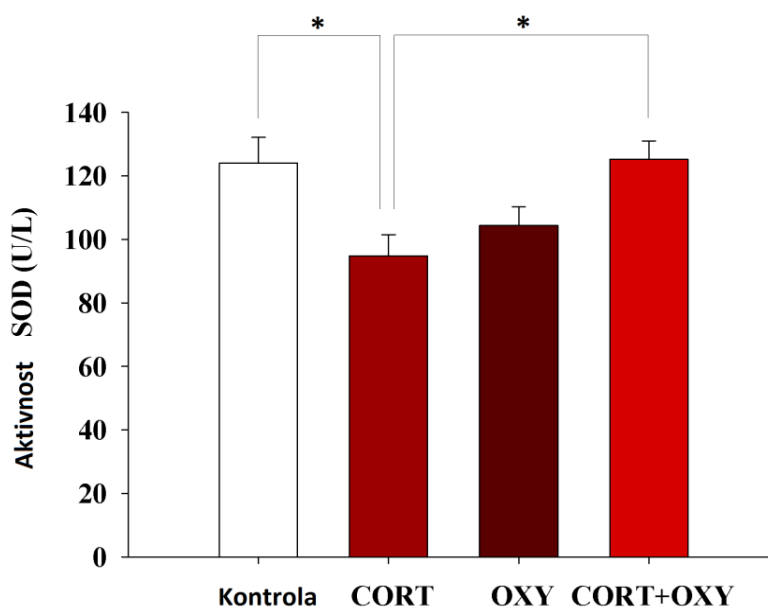
Na Slici 35 prikazane su koncentracije LOOH i MDA u plazmi životinja tretiranih kortikosteronom, oksitocinom, njihovom kombinacijom, kao i životinja kontrolne grupe. Aplikacija oksitocina poslednjih 14 dana tretmana kortikosteronom dovela je do značajnog smanjenja koncentracije LOOH u plazmi pacova u poređenju sa vrednostima dobijenim kod životinja koje su primale samo kortikosteron ( $p < 0.01$ ) i životinjama kontrolne grupe ( $p < 0.05$ ). S druge strane, nije pokazana statistički značajna razlika u koncentracijama MDA u plazmi između eksperimentalnih grupa.



**Slika 35. Uticaj eksperimentalnih tretmana na koncentraciju parametara lipidne peroksidacije u plazmi životinja.** Koncentracija lipidnih hidroperoksida (LOOH) (A) i koncentracija malondialdehida (MDA) (B) u plazmi odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400 µL *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

#### 4.2.4.7. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid dizmutaze (SOD) u plazmi

Kao što je prikazano na Slici 36, tronedeljni tretman kortikosteronom doveo je do značajnog smanjenja aktivnosti enzima SOD u plazmi eksperimentalnih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.05$ ). Takođe, primećeno je da je koadministracija oksitocina uz hroničan tretman kortikosteronom značajno povećala aktivnost ovog enzima kod životinja CORT+OXY grupe, u poređenju sa CORT grupom životinja ( $p < 0.05$ ) (Slika 36).

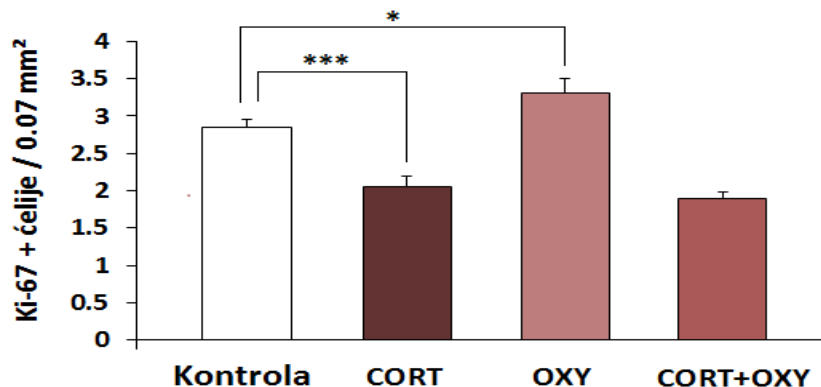


**Slika 36. Uticaj eksperimentalnih tretmana na aktivnost enzima superoksid dizmutaze u plazmi životinja.** Aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) u plazmi odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ .

#### 4.2.5. Uticaj tretmana na ekspresiju parametara neurogeneze u hipokampusu Wistar pacova

Kako je pokazano da kod depresivnih poremećaja dolazi do značajne redukcije volumena hipokampusa (Persson i sar., 2014), a da je s druge strane hipokampus struktura u kojoj se u adultnoj dobi odvija proces neurogeneze (Besnard i Sahay, 2016), bilo je značajno odrediti parametre koji ukazuju na proces neurogeneze u hipokampusu eksperimentalnih životinja. Analizirana je gustina i distribucija ćelija koje eksprimiraju nuklearni faktor Ki-67 i neurotrofični faktor poreklom iz mozga (BDNF), kao i količina proteina BDNF u hipokampusu. Reprezentativni prikazi preparata moždanog tkiva dobijenih tokom imunohistohemijskog bojenja BDNF i Ki-67 proteina prikazani su na Slikama 38 i 40.

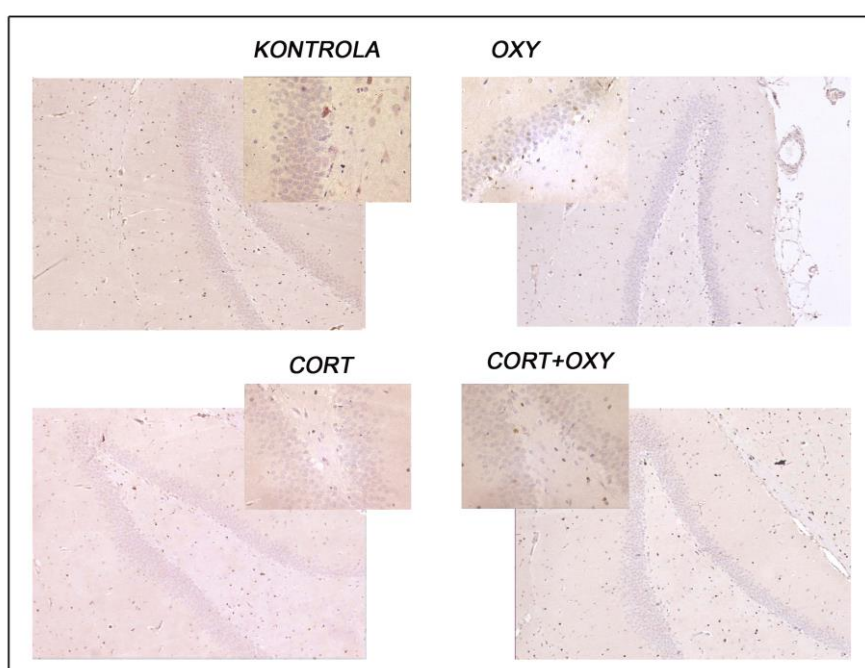
##### 4.2.5.1. Ekspresija nuklearnog faktora Ki-67 u hipokampusu



**Slika 37. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ekspresiju nuklearnog faktora Ki-67 u hipokampusu životinja.** Gustina Ki-67 pozitivnih ćelija u dentatnom girusu odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. Broj pozitivnih ćelija izražen je po vidnom polju (0.07 mm<sup>2</sup>), posmatrano na uveličanju 400 $\times$ . \*\*\* $p$ <0.001, \* $p$ <0.05.

U dentatnom girusu određena je gustina ćelija koje eksprimiraju nuklearni faktor Ki-67, protein koji se ispoljava u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa i čije je prisustvo u ćelijskom nukleusu povezano sa proliferacijom ćelija (Slika 37).

Na Slici 37 može se uočiti da hronični tretman kortikosteronom dovodi do značajnog smanjenja ekspresije nuklearnog proteina Ki-67. Sam tretman oksitocinom pokazao je povoljan uticaj na adultnu neurogenezu u hipokampusu, s obzirom da je broj Ki-67+ neurona bio značajno povećan ( $p < 0.05$ ) u dentatnom girusu hipokampusa životinja OXY grupe, u poređenju sa kontrolnom grupom. Razlika u ekspresiji Ki-67 proteina u dentatnom girusu nakon dvonedeljnog tretmana oksitocinom kod pacova hronično izloženih visokim koncentracijama glukokortikoida nije zapažena.



**Slika 38. Imunohistohemijska analiza moždanog tkiva eksperimentalnih životinja.** Fotomikrografije preparata dobijenih imunohistohemijskim obeležavanjem nuklearnog proteina Ki-67 u hipokampusu odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY slikane na uveličanju 100 $\times$  (velike slike) i 400 $\times$  (male slike).

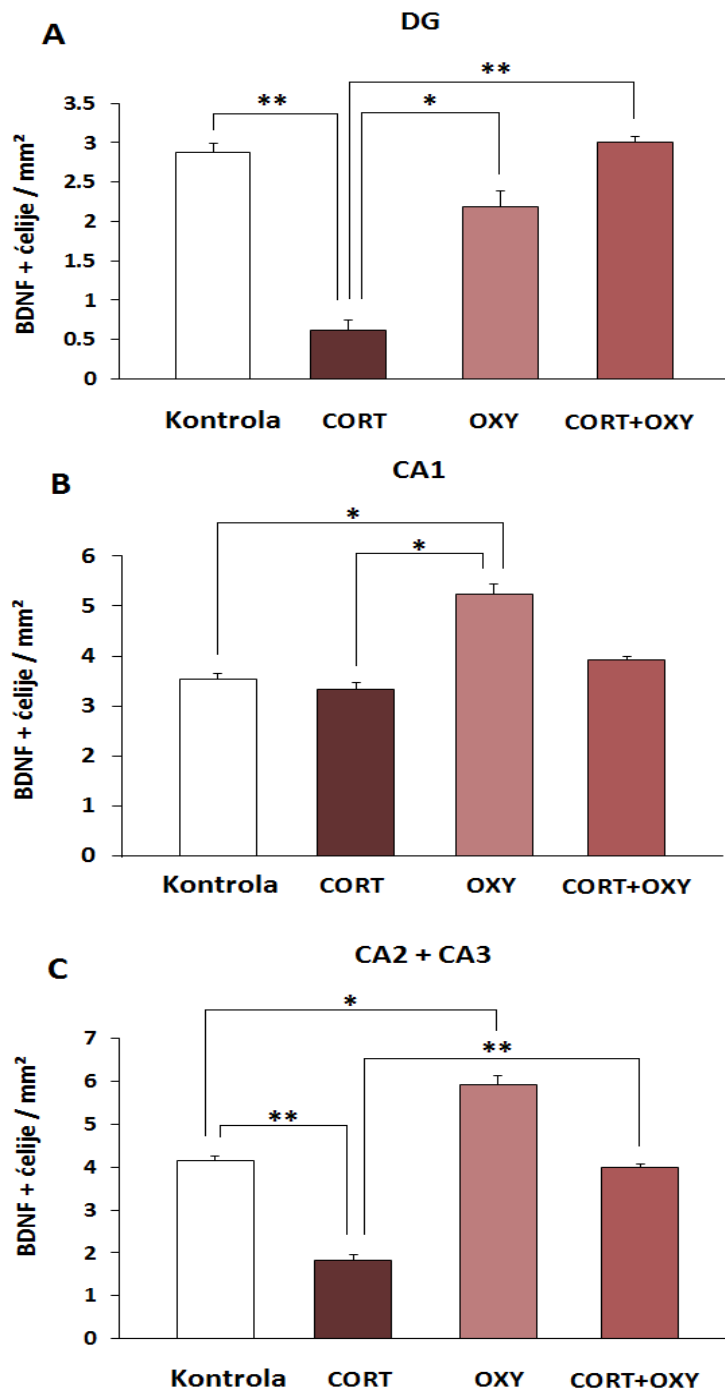
#### **4.2.5.2. Ekspresija neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (BDNF) u hipokampusu**

Na Slici 39, prikazan je uticaj tretmana kortikosteronom i/ili oksitocinom na ekspresiju BDNF+ neurona u različitim regijama hipokampusa eksperimentalnih životinja.

Imunohistohemijskom analizom preseka moždanog tkiva utvrđeno je da je efekat eksperimentalnih tretmana na ekspresiju BDNF u hipokampusu regionalno specifičan. Tačnije, najintenzivniji, negativan efekat na ekspresiju BDNF+ neurona hronični tretman kortikosteronom izazvao je u dentatnom girusu (Slika 39A) i CA2+CA3 regionima hipokampusa (Slika 39C), dok ovakav efekat nije bio vidljiv u CA1 regionu (Slika 39B). U DG i CA2+CA3 regionima pokazano je značajno smanjenje BDNF pozitivnih ćelija u CORT grupi životinja u odnosu na kontrolu ( $p < 0.01$  za DG i  $p < 0.01$  za CA2+CA3 region) i OXY grupu životinja ( $p < 0.05$  za DG).

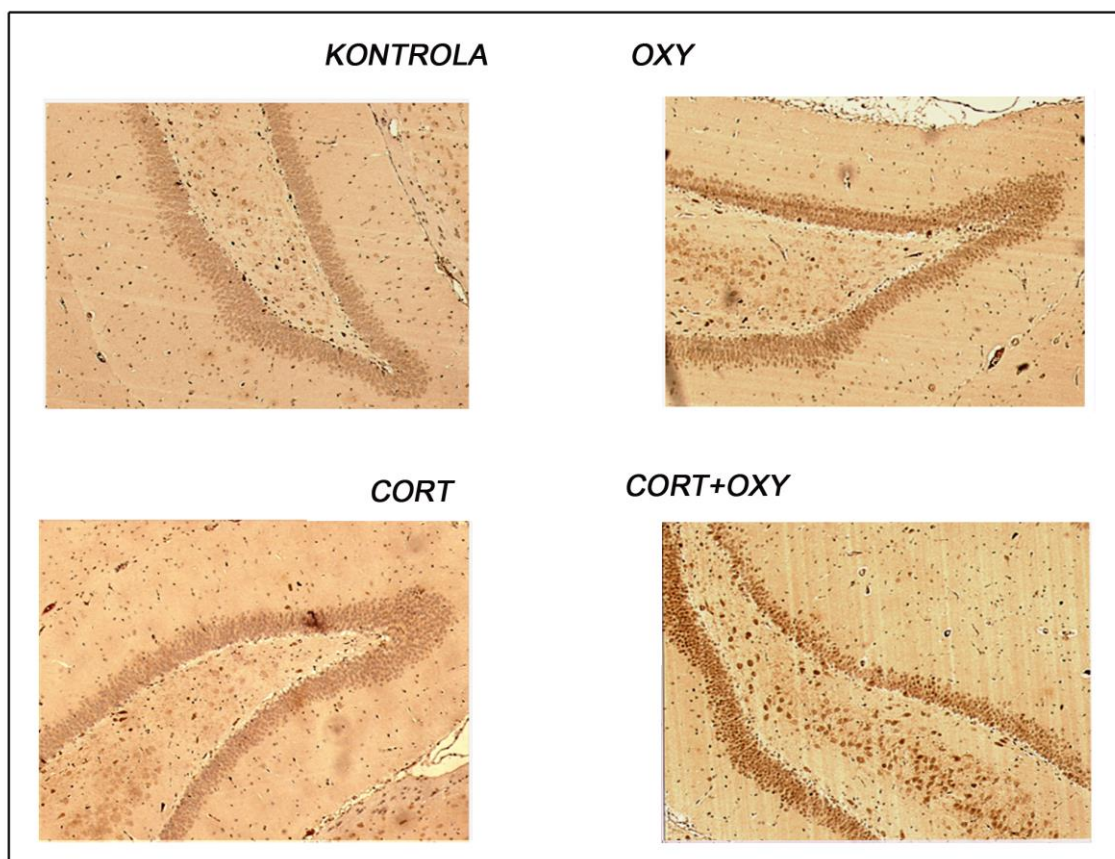
Tretman oksitocinom tokom poslednje dve nedelje administracije kortikosterona uspeo je da ublaži negativne efekte hronično visokih nivoa glukokortikoida na ekspresiju BDNF+ neurona, tako da je u CORT+OXY grupi ekspresija BDNF+ neurona bila statistički značajno veća u DG ( $p < 0.01$ ) i CA2+CA3 regiji ( $p < 0.01$ ) u odnosu na identične regione hipokampusa pacova tretiranih samo kortikosteronom (Slika 39A i 39B).

Sam tretman oksitocinom značajno je povećao gustinu neurona koji ekspresiraju BDNF u regionima CA1 ( $p < 0.005$ ) i CA2+CA3 ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja, dok u DG ovakav pozitivan efekat tretmana oksitocinom na hipokampalnu neurogenezu nije zapažen.



**Slika 39.** Uticaj eksperimentalnih tretmana na ekspresiju neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (BDNF) u različitim regijama hipokampusa životinja. Broj BDNF pozitivnih neurona u dentatnom girusu (A), regionu CA1 (B) i regionima CA2+CA3 (C) hipokampusa odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. Broj pozitivnih ćelija izražen po 1 mm<sup>2</sup>, posmatrano na uveličanju 400 $\times$ . \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

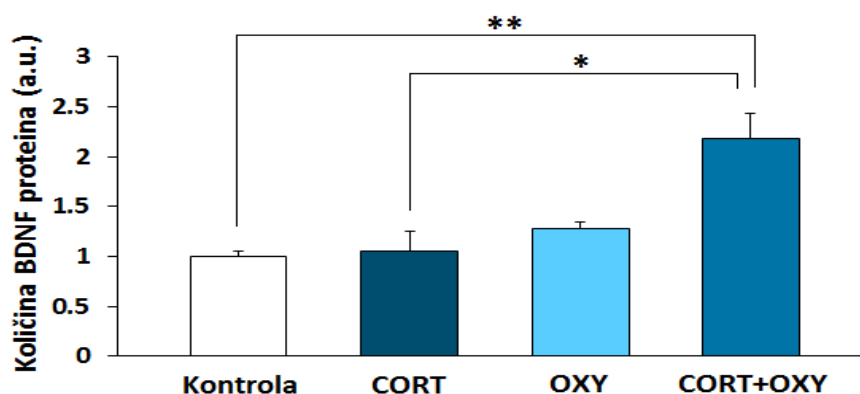




**Slika 40. Imunohistohemijska analiza moždanog tkiva eksperimentalnih životinja.** Fotomikrografije preparata dobijenih imunohistohemijskim obeležavanjem proteina BDNF u hipokampusu odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY slikane na uveličanju 100 $\times$ .

#### 4.2.5.3. Količina proteina BDNF u hipokampusu Wistar pacova

Western blot analizom određena je ukupna količina proteina BDNF u tkivu hipokampusu eksperimentalnih životinja, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 41.



**Slika 41. Uticaj eksperimentalnih tretmana na količinu proteina neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (BDNF) u hipokampusu životinja.** Količina proteina BDNF u tkivu odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), kortikosteronom 100 mg/L *per os* 21 dan (CORT), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i kombinacijom CORT+OXY. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . Količina proteina je prikazana u arbitrarnim jedinicama (a.u.) i normalizovana u odnosu na  $\beta$ -aktin.

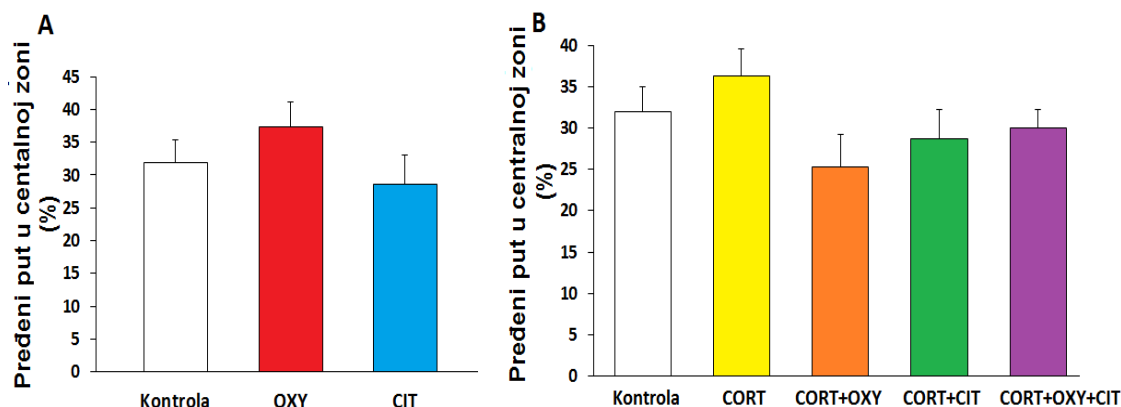
Tronedeljni tretman kortikosteronom, kao ni sam tretman oksitocinom, nisu doveli do značajnih promena u količini BDNF proteina u hipokampusu eksperimentalnih životinja u poređenju sa životinjama kontrolne grupe (Slika 41). S druge strane, najveća količina BDNF proteina u hipokampusu, zapažena je u grupi životinja tretiranoj kombinacijom oksitocina i kortikosterona, i bila je statistički značajno veća u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.01$ ) kao i CORT grupom životinja ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Uticaj dodatnog tretmana oksitocinom uz tretman citalopramom na ponašanje i ekspresiju gena *Itgb3* i *Chl1* u prefrontalnom korteksu Wistar pacova u modelu hroničnog stresa i depresije

#### 4.3.1. Testovi ponašanja

Kako bi se ispitaio uticaj eksperimentalnih tretmana treće faze na ponašanje životinja, izvođena je baterija bihevioralnih testova na isti način kao i tokom izrade druge eksperimentalne faze ove disertacije.

##### 4.3.1.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT)

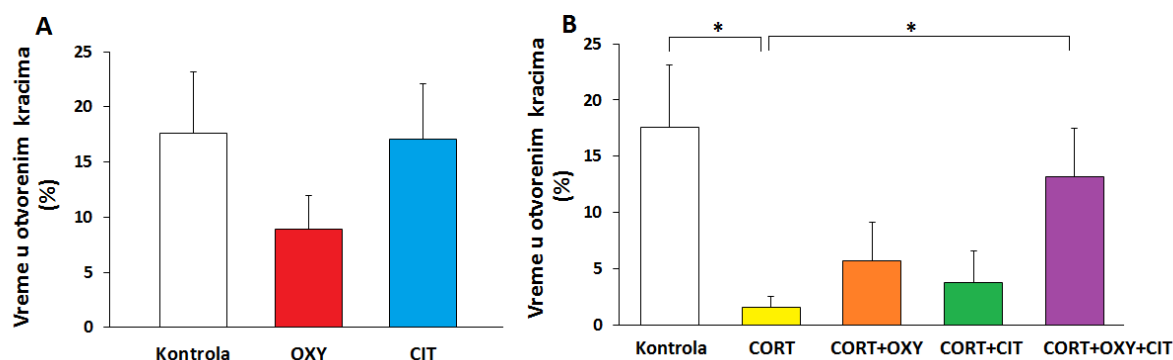


**Slika 42. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u testu otvorenog polja (OFT).** Procenat pređenog puta u centralnoj zoni OF arene odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L s.c. poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i citalopramom 10 mg/kg TM s.c. poslednjih 14 dana eksperimenta (A) kao i Kontrolnih i životinja tretiranih odgovarajućim kombinacijama CORT+OXY, CORT+CIT i CORT+OXY+CIT (B). OFT je izvođen 19. dana eksperimenta u trajanju od 10 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.

U testu otvorenog polja (Slika 42) eksperimentalni tretmani nisu pokazali značajan efekat na ponašanje eksperimentalnih životinja, poređenjem pređenog puta

životinja izraženog u procentima (A), kao i procenta vremena provedenog u centralnoj zoni (B) OF arene.

#### 4.3.1.2. Uzdignuti plus lavirint (eng. Elevated plus maze, EPM)

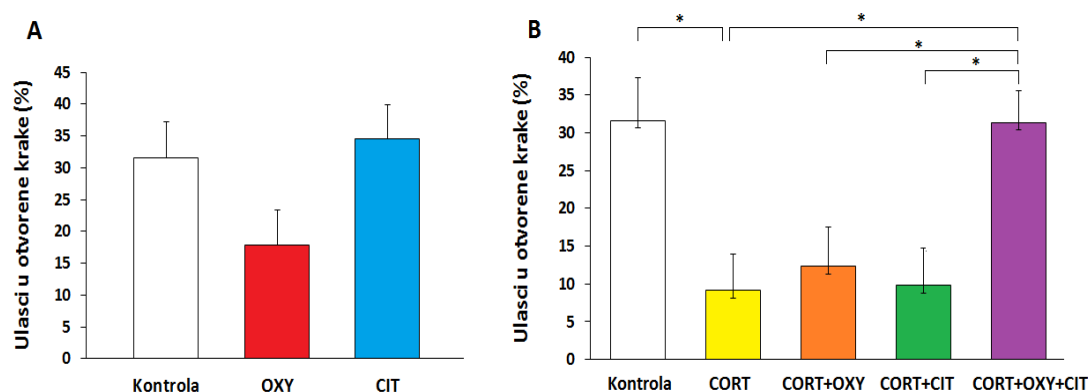


**Slika 43. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u uzdignutom plus lavirintu (EPM).** Procenat vremena provedenog u otvorenim kracima uzdignutog plus lavirinta odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80®) (Kontrola), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i citalopramom 10 mg/kg TM *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (A) kao i Kontrolnih i životinja tretiranih odgovarajućim kombinacijama CORT+OXY, CORT+CIT i CORT+OXY+CIT (B). EPM je izvođen 20. dana eksperimenta u trajanju od 5 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ .

Slično kao i u drugoj fazi eksperimenta, rezultati treće faze ukazuju na zaključak da životinje hronično tretirane kortikosteronom u uzdignutom plus lavirintu pokazuju određene znakove anksioznosti, što se prvenstveno ogleda kao značajno smanjenje procenta vremena provedenog u otvorenim kracima ( $p < 0.05$ , Slika 43B) i smanjenje procenta ulazaka u otvorene krake ( $p < 0.05$ , Slika 44B) ovih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom.

Koadministracija citaloprama i oksitocina u navedenom modelu hroničnog stresa pokazala je određeni anksiolitički potencijal, koji se ogledao u povećanju procenta ulazaka životinja u otvorene krake uzdignutog plus lavirinta u CORT+OXY+CIT grupi ( $p < 0.05$ , Slika 44B) u poređenju sa grupom životinja tretiranom samo kortikosteronom, ali i u poređenju sa CORT+OXY i CORT+CIT eksperimentalnom grupom ( $p < 0.05$  i  $p < 0.05$ , redom, Slika 44B). Takođe, ovaj

kombinovani tretman doveo je i do povećanja procenta vremena provedenog u otvorenim kracima EPM lavirinta ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa CORT grupom životinja (Slika 43B).

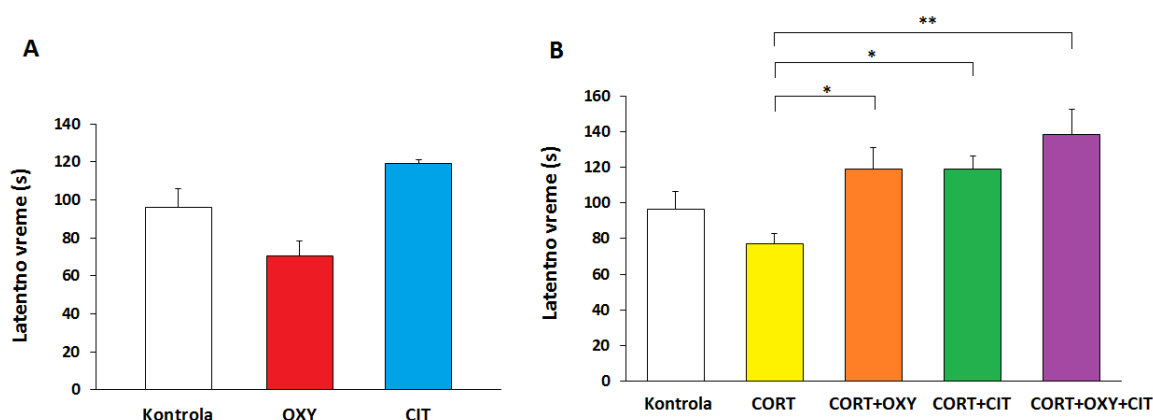


**Slika 44. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u uzdignutom plus lavirintu (EPM).** Procenat ulazaka životinja u otvorene krake uzdignutog plus lavirinta. Odrasli mužjaci pacova Wistar soja tretirani su rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i citalopramom 10 mg/kg TM *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (A) kao i Kontrolnih i životinja tretiranih odgovarajućim kombinacijama CORT+OXY, CORT+CIT i CORT+OXY+CIT (B). EPM je izvođen 20. dana eksperimenta u trajanju od 5 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ .

#### 4.3.1.3. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST)

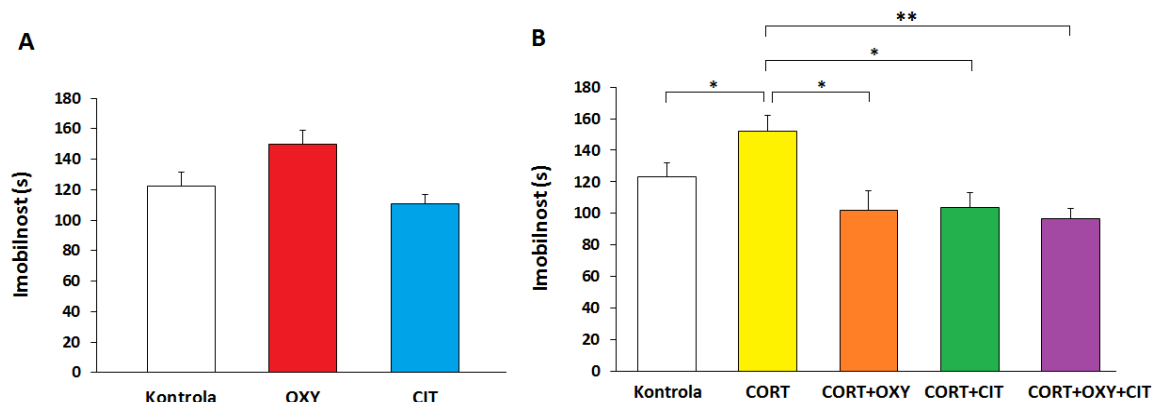
Rezultati testa forsiranog plivanja prikazani su na Slikama 45 i 46.

Tretman kortikosteronom tokom tri nedelje bio je dovoljan da kod eksperimentalnih životinja dovede do promena u ponašanju koje se mogu povezati sa depresivnom simptomatologijom. Tako je kod životinja CORT grupe vreme provedeno u imobilnom položaju bilo statistički značajno duže ( $p < 0.05$ , Slika 46B) u poređenju sa kontrolnom grupom. Sam tretman citalopramom u navedenom modelu hroničnog stresa značajno je produžio latentno vreme (vreme do prve epizode imobilnosti) ( $p < 0.05$ , Slika 45B) i skratio vreme imobilnosti ( $p < 0.05$ , Slika 46B) u poređenju sa životinjama CORT grupe, čime je potvrđen njegov antidepresivni efekat i u navedenom animalnom modelu.



**Slika 45. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja (FST).** Vreme (s) do prvog perioda imobilnosti životinja (latentno vreme) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i citalopramom 10 mg/kg TM *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (A) kao i Kontrolnih i životinja tretiranih odgovarajućim kombinacijama CORT+OXY, CORT+CIT i CORT+OXY+CIT (B). Protokol FST testa podrazumevao je trening od 15 min 20. dana i test od 5 min 21. dana eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Koadministracija oksitocina tokom poslednje dve nedelje hroničnog *per os* tretmana kortikosteronom, značajno je produžila latentno vreme ( $p < 0.05$ , Slika 45B) i smanjila vreme koje su životinje provodile u imobilnom položaju ( $p < 0.05$ , Slika 46B) u odnosu na grupu životinja tretiranu samo kortikosteronom. Kombinovani tretman CORT+OXY+CIT doveo je do značajnog povećanja vremena do prve epizode imobilnosti ( $p < 0.01$ , Slika 45B) i smanjenja vremena imobilnosti ( $p < 0.01$ , Slika 46B) u poređenju sa CORT grupom životinja.



**Slika 46. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja (FST).** Vreme provedeno u imobilnom položaju (s) odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i citalopramom 10 mg/kg TM *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (A) kao i Kontrolnih i životinja tretiranih odgovarajućim kombinacijama CORT+OXY, CORT+CIT i CORT+OXY+CIT (B). Protokol FST testa podrazumevao je trening od 15 min 20. dana i test od 5 min 21.dana eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05.

#### 4.3.2. Ekspresija gena koji kodira integrin beta 3 (ITGB3) i adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1) u prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja

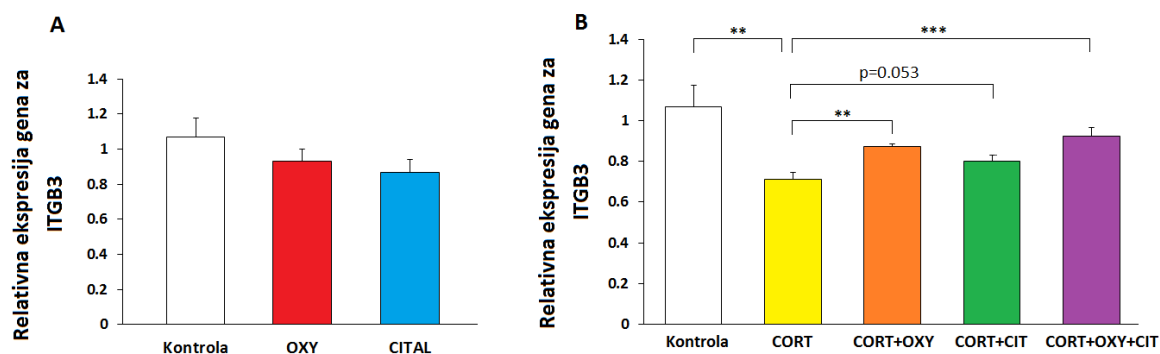
U prefrontalnom korteksu analizirana je promena u ekspresiji gena za integrin beta-3 (ITGB3) i adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1), koji se smatraju dobrim kandidatima za biomarkere povoljnog odgovora pacijenata na terapiju antidepresivima iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (SSRI), kojima pripada i citalopram.

##### 4.3.2.1. Ekspresija Itgb3 iRNK u prefrontalnom korteksu

RT-PCR analizom utvrđeno je da hronični tretman kortikosteronom dovodi do značajne redukcije u ekspresiji gena za ITGB3 u tkivu prefrontalnog korteksa eksperimentalnih životinja ( $p$ <0.01, Slika 47A) u poređenju sa životinjama kontrolne grupe. Nakon tretmana oksitocinom i citalopramom nije došlo do promena u ekspresiji navedenog gena.

Kada su analizirani efekti dodatnih tretmana oksitocinom i citalopramom u animalnom modelu hroničnog stresa i depresije indukovane tronedeljnom primenom kortikosterona, pokazano je da je kod CORT+OXY grupe ekspresija ITGB3 bila značajno povećana ( $p < 0.01$ , Slika 47B), dok je kod CORT+CIT grupe zapažen trend ( $p < 0.053$ , Slika 47B) u poređenju sa CORT grupom.

Kod grupe životinja koja je primala kombinaciju oksitocina i citaloprama i bila izložena hroničnom tretmanu kortikosteronom (CORT+OXY+CIT grupa), zapažen je najintenzivniji efekat na ekspresiju gena za ITGB3 u prefrontalnom korteksu životinja. Ekspresija ovog biomarkera povoljnog odgovora na terapiju lekovima iz grupe SSRI kod CORT+OXY+CIT grupe bila je najveća ( $p < 0.001$  u poređenju sa CORT grupom, Slika 47B), što može ukazivati na povoljne efekte kombinovanog tretmana oksitocinom i citalopramom na ekspresiju gena koji kodira ITGB3.

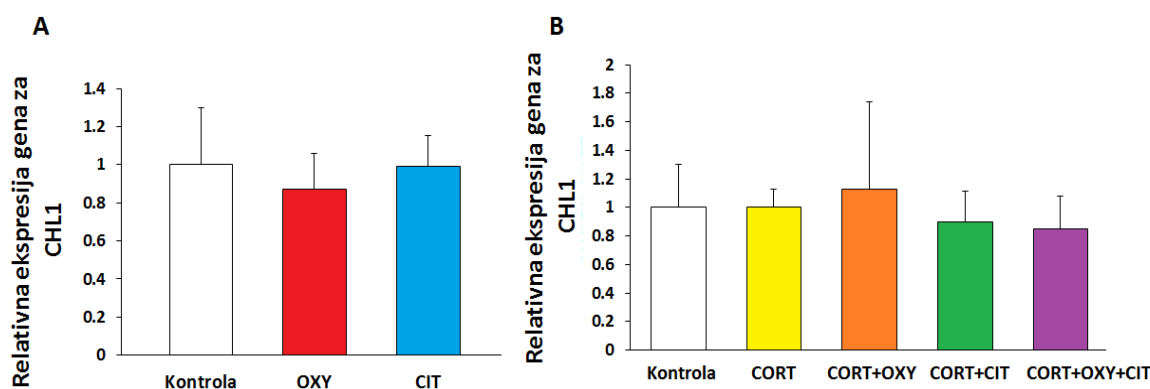


**Slika 47. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ekspresiju gena za integrin beta-3 (ITGB3) u tkivu prefrontalnog korteksa životinja.** Promena ekspresije gena za ITGB3 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80<sup>®</sup>) (Kontrola), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i citalopramom 10 mg/kg TM *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (A) kao i Kontrolnih i životinja tretiranih odgovarajućim kombinacijama CORT+OXY, CORT+CIT i CORT+OXY+CIT (B). Svi transkripti su normalizovani u odnosu na ekspresiju gena za Gusb koji je korišćen kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .



#### 4.3.2.2. Ekspresija Chl1 iRNK u prefrontalnom korteksu

Poređenjem srednjih vrednosti relativne ekspresije gena za CHL1 protein pokazano je da ni jedan tretman korišćen tokom izrade treće faze ove doktorske disertacije nije doveo do značajnih promena ovog parametra u tkivu prefrontalnog korteksa eksperimentalnih životinja (Slika 48).



**Slika 48. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ekspresiju gena za adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1) u tkivu prefrontalnog korteksa.** Promena ekspresije gena za CHL1 u prefrontalnom korteksu odraslih mužjaka pacova Wistar soja tretiranih rastvaračem (2% rastvor Tween-a 80®) (Kontrola), oksitocinom 10 IU/400  $\mu$ L *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (OXY) i citalopramom 10 mg/kg TM *s.c.* poslednjih 14 dana eksperimenta (A) kao i Kontrolnih i životinja tretiranih odgovarajućim kombinacijama CORT+OXY, CORT+CIT i CORT+OXY+CIT (B). Svi transkripti su normalizovani u odnosu na ekspresiju gena za Gusb koji je korišćen kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.M.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje i nivo hormona u plazmi Wistar pacova

Rezultati prve faze ove doktorske disertacije sugeriraju da administracija veće primenjene doze oksitocina (10 IU/400 µL) eksperimentalnim životinjama tokom 14 dana, može imati ulogu u modulaciji ponašanja i ispoljava anksiolitički i antidepresivni potencijal. Ovakav zaključak podržan je i nalazom da subhronična administracija ove doze oksitocina dovodi do značajnih promena nivoa biogenih amina u plazmi, pre svega povećanja bazalnih koncentracija adrenalina i serotonina, što je od značaja u svetlu činjenice da je prema važećim biološkim teorijama o nastanku depresije, funkcionalni deficit biogenih amina uzrok manifestacije depresivnih poremećaja.

#### 5.1.1. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na ponašanje

Poslednjih decenija znatno se povećao broj studija u kojima je ispitivan uticaj oksitocina na ponašanje. Naime, u periodu od 2002-2012 godine, taj broj bio je četiri puta veći u odnosu na prethodnu deceniju (Markin i Froemke, 2017), a ovaj trend je nastavljen i tokom poslednjih pet godina. Prva indikacija o potencijalnom uticaju oksitocina na ponašanje životinja koje se može povezati sa depresivnom simptomatologijom proizašla je iz podataka Meisenberg-a (1981) koji potvrđuju da, kao i tretman poznatim antidepresivima, intracerebroventrikularna (*i.c.v.*) administracija oksitocina kod miševa skraćuje vreme koje životinje provedu u imobilnom položaju u testu forsiranog plivanja. Kasnije, ovi rezultati Meisenberg-a potvrđeni su i nakon parenteralne aplikacije oksitocina (Arletti i Bertolini, 1987). U skladu sa ovim rezultatima, kod pacova subhronično tretiranih oksitocinom *i.p.*, zapažen je manji broj uspešnih izbegavanja električnog stimulusa, kao i kraće latentno

vreme do izbegavanja stimulusa u testu naučene bespomoćnosti (Arletti i Bertolini, 1987). Rezultati predkliničkih, ali takođe i kliničkih studija, sugerišu postojanje antidepressivnog potencijala egzogenog oksitocina, mada jasna veza ovog neuropeptida i načina na koji on utiče na depresivnu simptomatologiju još uvek nije razjašnjena (Scantamburlo i sar., 2015).

S druge strane, postoji značajan broj studija u kojima je ispitivan anksiolitički potencijal oksitocina, prvenstveno njegov uticaj na društveno ponašanje i regulaciju socijalnih strahova. U ovim studijama, pokazano je da oksitocin menja reakciju organizma na stresne stimulse (Svanidze i sar., 2012; Jovanović i sar., 2014), učestvuje u adaptaciji na hronični stres (Zheng i sar., 2009), ispoljava antinociceptivni efekat (Rash i Campbell 2014), poboljšava socijalno prepoznavanje (Lieberwirth i Wang, 2014) i reguliše društvene strahove (Guzman i sar., 2014).

Generalno, smatra se da oksitocin ispoljava anksiolitički efekat, pri čemu ovaj efekat u mnogome može biti zavisian od postojećih promena u socijalnom ponašanju jedinke. Tako, na primer, promene u socijalnom ponašanju pacova hronično tretiranih fenciklidinom, što predstavlja validirani model šizofrenije, normalizovane su nakon centralne bilateralne aplikacije oksitocina u amigdale (Lee i sar., 2005). S druge strane, ovaj tretman oksitocinom nije pokazao efekat na ponašanje životinja u testu otvorenog polja (Lee i sar., 2005). U kasnijim studijama Lee i saradnika (2007) slični efekat oksitocina na socijalno ponašanje potvrđen je i kod životinja prenatalno izloženih stresu. Dalje, trodnevna *i.p.* aplikacija oksitocina pacovima hronično izloženim stresu imobilizacije dovela je do poboljšanja lokomotorne aktivnosti u OFT testu (Klenerova i sar., 2009). Međutim, pozitivan efekat oksitocina na lokomotornu aktivnost u ovoj studiji zapažen je samo kod niže primenjene doze, dok je viša doza dodatno potencirala deficite u eksplorativnoj aktivnosti indukovane hroničnim stresom (Klenerova i sar., 2009). Centralna infuzija des Gly-NH<sub>2</sub> d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> [Tyr(Me)<sub>2</sub>, Thr<sub>4</sub>] OVT, antagoniste oksitocina, dovela je do povećanja koncentracija ACTH i kortikosterona u plazmi pacova, ali nije pokazala uticaj na ponašanje životinja u EPM testu (Neumann i sar., 2000a), dok je u drugoj studiji Neumann i saradnika (2000b) isti tretman antagonistom oksitocina ispoljio anksiolitički efekat samo kod gravidnih ženki. Takođe, Svanidze i saradnici (2012) pokazali su da *i.p.* aplikacija ovog hormona dovodi do povećanja

eksplorativne aktivnosti pacova u OFT testu, što ide u prilog hipotezi o njegovom anksiolitičkom efektu. Kako je potvrđeno da je 30-60 min nakon intranazalne i *i.p.* administracije oksitocina povećana njegova koncentracija u mikrodializatima hipokampusa i amigdala (Neumann i sar., 2013), strukturama mozga uključenim u regulaciju emocija, može se pretpostaviti da, tokom periferne administracije, oksitocin prolazi krvno-moždanu barijeru i ispoljava centralne efekte na ponašanje.

Ono što se jasno da zaključiti je da, slično drugim neuropeptidima, efekat tretmana oksitocinom zavisi od primenjene doze, dužine trajanja samog tretmana, načina administracije, ali i postavljenih eksperimentalnih uslova. Na primer, rezultati EPM testa u kom su pacovi čuvani i testirani u istoj prostoriji, pokazali su da tretman oksitocinom nije imao uticaja na ponašanje životinja (Windle i sar., 1997). Međutim, kada su životinje testirane u nepoznatoj, a samim tim i anksioznoj sredini, kod pacova tretiranih oksitocinom primećen je značajno manji stepen anksioznosti u poređenju sa životinjama kontrolne grupe. Dodatno, u studiji McCarthy i saradnika (1996) potvrđen je anksiolitički efekat oksitocina u EPM testu, ali ne i u paradigmi platforme sa rupama, direktno ukazujući na specifičnost ovakvog delovanja oksitocina u zavisnosti od postavljenih zadataka i eksperimentalnih uslova tokom samog testiranja.

Rezultati testova ponašanja prve faze ove doktorske disertacije, koji ukazuju da su životinje tretirane oksitocinom tokom 14 dana u OFT testu značajno manje vremena provodile u imobilnom položaju, i da su više ulazile u otvorene krake EPM arene, idu u prilog dosadašnjim podacima koji upućuju na postojanje anksiolitičkog potencijala oksitocina. Uz to, produženo latentno vreme u FST testu nakon subhronične administracije oksitocina potvrđuje postojanje antidepresivnog potencijala ovog hormona. Takođe, dobijeni rezultati upućuju na zaključak da subhronična administracija oksitocina u dozi 10 IU/400  $\mu$ L pokazuje intenzivnije efekte na ponašanje životinja, koji se ispoljavaju u sva tri izvođena testa (OFT, EPM i FST), za razliku od akutnog tretmana koji je pokazao efekat u EPM i FST testu, ali ne i u OFT testu.

### 5.1.2. Uticaj akutnog i subhroničnog tretmana oksitocinom na nivo biogenih amina u plazmi

Kako je poznato da značajan broj hormona, pre svega biogenih amina i glukokortikoida, ima ulogu u regulaciji odgovora organizma na stres, dok je s druge strane pokazano da oksitocin ima modulatornu ulogu u regulaciji ponašanja, razumno je bilo pretpostaviti da oksitocin može uticati i na nivo pojedinih hormona uključenih u fiziološki odgovor na stres.

Do sada je pokazano ne samo da noradrenalin ima ulogu u regulaciji sekrecije oksitocina, već i obrnuto, na šta ukazuju i neuroanatomske veze odgovarajućih moždanih jedara. Nervna vlakna koja potiču iz *locus ceruleus*-a i sintetišu i oslobađaju NA, a imaju ulogu u povećanju budnosti tokom delovanja različitih stresora, inervišu oksitocinergičke neurone u paraventrikularnom i supraoptičkom jedru hipotalamusa (Cunningham i Sawchenko, 1988) i olakšavaju oslobađanje oksitocina (Bealer i Crowley, 2000). Zatim, oslobađanje NA u *N. supraopticusu* olakšano je u toku porođaja (Herbison i sar., 1997) i laktacije (Crowley i Armstrong, 1992). Takođe, poremećaj noradrenergičke transmisije u hipotalamusu može imati negativan uticaj na sekreciju oksitocina tokom laktacije (Bealer i Crowley, 1998). Slično, blokada oksitocinskih receptora umanjuje oslobađanje NA u toku fiziološkog odgovora organizma na stres (Onaka i sar., 2003). Sledstveni slabiji uticaj NA u supraoptičkom jedru umanjuje oslobađanje oksitocina prvobitno pojačano delovanjem stresnog stimulusa (Zhu i Onaka, 2002). Poznata je uloga serotonina i oksitocina u regulaciji afekta, društvenosti, a samim tim i u poremećajima kao što su depresija i autizam (Lucki, 1998; Bartz i Hollandrer, 2006). U studiji Mottolese i saradnika (2014) na zdravim dobrovoljcima, pokazano je da ova dva neuromodulatorska sistema interaguju baš u strukturama mozga koje imaju ulogu u definisanju ponašanja povezanim sa emocijama.

Nadalje, kako je potvrđena uloga oksitocina u regulaciji serotoninergičke signalizacije, otvoren je put pronalaženju novih terapijskih strategija u tretmanu mentalnih poremećaja, kao što su socijalna anksioznost, depresija i autizam. Ispitivan je uticaj polimorfizma oksitocinskih receptora (OxtR) na intenzitet odgovora organizma na dejstvo različitih stresora. Na primer, kod osoba nosilaca AA/AG genotipa OxtR

rs53576, tokom testa iščekivanja stresnog stimulusa, dolazi do značajnog povećanja frekvencije srčanog rada u poređenju sa osobama homozigotnim za G alel (Rodrigues i sar., 2009). Takođe, kod muškaraca nosilaca A genotipa ovih receptora, potvrđen je viši nivo simpatikusne kontrole srčane funkcije u stanju mirovanja, za razliku od nosilaca GG fenotipa. Suprotno, nakon dejstva psihološkog stresora, aktivacija simpatikusa bila je značajno veća kod GG nosilaca (Norman i sar., 2012).

Rezultati prve faze ove disertacije pokazali su da tretmani oksitocinom u dozi od 10 IU/400  $\mu$ L, bilo akutno ili subhronično, dovode do promena nivoa biogenih amina u plazmi pacova. Kada su nivoi kateholamina u pitanju, efekat oksitocina uočava se pre svega kao povećanje bazalnih vrednosti adrenalina u plazmi eksperimentalnih životinja. Povećanje koncentracije adrenalina u plazmi životinja nakon aplikacije oksitocina ukazuje na stimulatorni uticaj ovog hormona na aktivnost simpatoadrenalnog sistema, koji predstavlja deo složenog odbrambenog mehanizma koji se aktivira tokom fiziološkog odgovora organizma na stres. Poznato je da oksitocin promoviše afilijativno ponašanje, i upravo ovaj efekat oksitocina mogao bi biti direktna posledica uticaja ovog neuropeptida u modulaciji aktivnosti HPA osovine, pogotovo tokom izloženosti jedinke hroničnom stresu. (Parker i sar., 2005; Neumann i sar., 2000a). Konačno, povećanje koncentracije serotonina u plazmi pacova nakon akutne i subhronične administracije oksitocina, upućuje na zaključak da bi tretman oksitocinom mogao biti od koristi u patološkim stanjima koja su povezana sa poremećajima u aktivnosti serotoninergičkog sistema transmisije, kao što su poremećaji raspoloženja uključujući socijalno povlačenje i izolaciju, anksioznost i depresiju (McQuaid i sar., 2014).

Kako su dobijeni rezultati prve faze ove disertacije pokazali da su intenzivniji efekti na ponašanje i nivo biogenih amina u plazmi dobijeni nakon subhroničnog tretmana oksitocinom, i da se, za razliku od akutnog tretmana, ispoljavaju u sva tri izvođena testa ponašanja, moglo se zaključiti da bi dugotrajni tretman oksitocinom mogao pokazati efekte na ponašanje i parametre aktivnosti HPA osovine pacova u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane hroničnom prtimenom kortikosterona, koji je ispitivan u daljem radu.

## **5.2. Uticaj dvonedeljnog tretmana oksitocinom na ponašanje i parametre aktivnosti HPA osovine pacova u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane hroničnom primenom kortikosterona**

Rezultati druge faze ove disertacije pokazali su da tretman oksitocinom u trajanju od 14 dana, u modelu kortikosteronom indukovano hroničnog stresa i depresije, ispoljava anksiolitički i antidepresivni potencijal. Tretman oksitocinom je protektivno delovao na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde sprečavajući atrofiju žlezde izazvanu kortikosteronom a u tkivu srži nadbubrega, oksitocin je povećao ekspresiju gena i/ili količinu proteina kateholaminskih transportera NAT i VMAT2, povećavajući na taj način kapacitet za skladištenje kateholamina u samoj žlezdi. Tretman oksitocinom doveo je do upadljive vazodilatacije u adrenalnoj meduli a uticao je i na odgovor hormona nadbubrežne žlezde na akutni stres izazvan petnaestominutnim testom forsiranog plivanja. Takođe, tretman oksitocinom je umanjio stepen oštećenja DNK limfocita periferne krvi i povoljno uticao na koncentracije parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite u plazmi pacova hronično tretiranih kortikosteronom, time ispoljavajući antioksidativni potencijal. Konačno, tretman oksitocinom, povećavajući broj BDNF+ neurona, pozitivno je uticao na proces adultne neurogeneze u hipokampusu životinja.

### **5.2.1. Uticaj tretmana kortikosteronom i oksitocinom na porast telesne mase i unos hrane i vode eksperimentalnih životinja**

U našoj studiji, potvrđen je rezultat studije Donner i sar. (2012) da hronični tretman kortikosteronom ima negativan uticaj na porast telesne mase pacova tokom vremena. U navedenoj studiji (Donner i sar., 2012) najveća korišćena doza kortikosterona (400 mg/L) je kod životinja dovela čak i do značajnog i drastičnog smanjenja mase tokom tronedeljnog tretmana, potvrđujući izuzetno štetne efekte hiperkortizolizma. Kod mužjaka pacova, redukovano povećanje telesne mase uobičajeno se koristi kao parametar efikasnosti hroničnog tretmana glukokortikoidima

(Conrad i sar., 2007; Gourley i Taylor, 2009). Poznato je da ponavljani tretman niskim dozama glukokortikoida ispoljava anabolički efekat, dok hronična primena umerenih i visokih doza ovih hormona dovodi do povećanja kataboličkih procesa, kao što su lipoliza i proteoliza u mišićima (Santana i sar., 1995). Rezultati ove disertacije ukazuju da je kod životinja tretiranih kortikosteronom tokom tri nedelje, iako nije bilo razlika u unosu hrane i vode u poređenju sa kontrolnom grupom, porast telesne mase bio značajno manji, što potvrđuje postojanje kataboličkih efekata ovog hormona. Međutim, metaboličke, biohemijske, kao i endokrinološke promene koje se dešavaju tokom hronične primene glukokortikoida su izrazito kompleksne, i zavise od primenjene doze i dužine trajanja tretmana, životinjske vrste, kao i navika u ishrani (Donner i sar., 2012). Tako je, suprotno od kataboličkih efekata, u studiji Karatsoreos-a i saradnika (2010), hronični tretman kortikosteronom doveo do rapidnog povećanja telesne mase i koncentracije leptina, insulina i triglicerida u plazmi miševa. Kompleksnim metaboličkim efektima glukokortikoida ide u prilog i dobro poznata činjenica da pacijenti oboleli od depresivnih poremećaja i sa visokim koncentracijama kortizola u plazmi imaju veću šansu za razvoj gojaznosti, dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma (Roberge i sar., 2007; Anagnostis i sar., 2009).

U animalnom modelu hroničnog stresa/depresije izazvane hroničnom primenom kortikosterona, koji je korišćen u eksperimentalnom radu ove disertacije, tretman oksitocinom tokom 14 dana umanjio je negativan efekat glukokortikoida na promene u masi životinja, tako da je porast telesne mase životinja CORT+OXY grupe bio značajno veći u poređenju sa životinjama tretiranim samo kortikosteronom. S druge strane, kod kontrolnih životinja tretman oksitocinom nije pokazao uticaj na telesnu masu, što je u saglasnosti sa rezultatima Bjorkstrand i Uvnas-Moberg-a (1996) da kod mužjaka pacova *i.c.v.* i *s.c.* tretman oksitocinom ne dovodi do promena u dnevnom porastu telesne mase. Međutim, rezultati ove disertacije ukazuju na značajan uticaj oksitocina na unos hrane eksperimentalnih životinja. Tako, korigovano u odnosu na telesnu masu, životinje obe eksperimentalne grupe tretirane oksitocinom unosile su značajno manje hrane u poređenju sa reprezentativnom kontrolnom grupom. Dobro su poznati efekti oksitocina na energetski metabolizam, kao i to da ovaj neuropeptid favorizuje prestanak unošenja hrane kao odgovor na povećanu osmolalnost plazme i distenziju gastrointestinalnog trakta kada dolazi do pojačanog oslobađanja oksitocina i



sledstveno pojačane aktivnosti oksitocinergičkih neurona (Herisson i sar., 2016). U studiji Arletti-ja i sar. (1990) pokazano je da *i.c.v.* administracija oksitocina dovodi do značajnog smanjenja unosa hrane, dok je u studiji Herisson-a i sar. (2016) utvrđeno da mehanizam anoreksigenog efekta ovog hormona podrazumeva aktivaciju *nukleusa acumbensa*. Rezultati ove disertacije, koji ukazuju da su životinje tretirane oksitocinom tokom dve nedelje unosile značajno manje hrane u odnosu na kontrolnu grupu, u skladu su sa navedenim literaturnim podacima o anoreksigenom efektu oksitocina. Međutim, kako je i pored smanjenog unosa hrane koadministracija oksitocina poslednje dve nedelje tretmana kortikosteronom značajno umanjila negativne efekte glukokortikoida na porast telesne mase životinja, može se pretpostaviti da je oksitocin ispoljio kompleksne metaboličke efekte i uspeo da održi metabolizam u fiziološkim granicama i na taj način se suprotstavi štetnim efektima glukokortikoida.

### **5.2.2. Uticaj oksitocina na ponašanje životinja u modelu hroničnog stresa/depresije**

Dobijeni rezultati testova ponašanja potvrđuju dosadašnja saznanja da hronična izloženost visokim koncentracijama glukokortikoida dovodi do promena u ponašanju pacova, koje se mogu povezati sa povišenom anksioznošću, kao i razvojem depresivne simptomatologije. S druge strane, administracija oksitocina u postavljenim eksperimentalnim uslovima ublažila je negativne efekte hronično visokih nivoa glukokortikoida na ponašanje životinja. Koadministracija oksitocina tokom poslednje dve nedelje tretmana kortikosteronom kod eksperimentalnih životinja je u testu otvorenog polja pokazala anksiolitički efekat, kao i antidepresivni potencijal u testu forsiranog plivanja.

Veliki broj studija potvrđuje činjenicu da ponavljana administracija kortikosterona eksperimentalnim životinjama može dovesti do pojave stanja sličnog depresiji, što se jasno vidi kao povećano vreme imobilnosti i smanjenje vremena koje životinje provode aktivno plivajući i pronalazeći izlaz u testu forsiranog plivanja (FST) (Hill i sar., 2003; Kalynchuk i sar., 2004; Gregus i sar., 2005). Takođe, smatra se da su efekti hronično povišenih nivoa glukokortikoida na ponašanje zavisni od primenjene

doze, kao i dužine trajanja samog tretmana. Tako, ponavljana aplikacija 20 mg/kg kortikosterona tokom 20 dana kod životinja dovodi do značajnih promena u ponašanju koje se mogu povezati sa razvojem depresivnog fenotipa i produžava vreme imobilnosti u FST testu (Hill i sar., 2003), dok tretman istom dozom, ali tokom 10 uzastopnih dana nije uspeo da kod eksperimentalnih životinja izazove navedene promene (Brotto i sar., 2001). Rezultati FST testa ove doktorske disertacije daju potvrdu dosadašnjim saznanjima da se tronedeljna aplikacija kortikosterona, u ovom slučaju *per os*, može smatrati animalnim modelom depresivnog ponašanja. Tačnije, nakon tronedeljne administracije kortikosterona, kod eksperimentalnih životinja su u testu forsiranog plivanja, najpoznatijem i dobro validiranom testu za određivanje antidepresivnog potencijala ispitivanih supstanci (Porsolt i sar., 2001), indukovane promene u ponašanju koje se mogu povezati sa pojavom depresivne simptomatologije. Dobijeni rezultati ukazuju na to da su životinje CORT grupe značajno više vremena provodile u imobilnom položaju, kao i da je vreme od početka testa do prve imobilne epizode bilo značajno kraće, u poređenju sa životinjama kontrolne grupe. Ovakvi rezultati jasno upućuju na zaključak da je kod pacova koji su bili izloženi povišenim nivoima glukokortikoida tokom tri nedelje došlo do razvoja depresivnog fenotipa (Porsolt i sar., 2001; Johnson i sar., 2006). Pored toga, u skladu sa dosadašnjim podacima (Ardayfio i Kim, 2006; Murray i sar., 2008; Lee i sar., 2010; Donner i sar., 2012), rezultati ove disertacije ukazuju da je hronični tretman kortikosteronom kod životinja izazvao pojavu pojačane anksioznosti. Ovaj efekat glukokortikoida bio je evidentan u testu otvorenog polja (OFT), pa su životinje CORT grupe značajno više vremena provodile u imobilnom položaju i manje boravile u centralnoj zoni OF arene, što jasno ukazuje na smanjenu eksplorativnu aktivnost ove grupe životinja. U studiji Nine Donner i saradnika (2012), *per os* tretman kortikosteronom u najvećoj korišćenoj dozi (400 mg/L) pokazao je izrazit anksiogeni efekat u svim izvođenim testovima ponašanja (OFT, EPM i test socijalne interakcije), dok je srednja doza kortikosterona, 100 mg/L, imala efekta samo u EPM testu. U našoj studiji, međutim, ova doza kortikosterona (100 mg/L) nije pokazala efekat u EPM testu, tako da nije bilo razlike u broju ulazaka, kao ni vremenu provedenom u otvorenim kracima lavirinta, iako su životinje tretirane kortikosteronom manje vremena provodile u ovim kracima u odnosu na kontrolnu grupu. Svakako da jedan od razloga ovakvog rezultata može biti i velika standardna

devijacija unutar eksperimentalnih grupa. Bez obzira na rezultate EPM testa, koji se smatra specifičnijim testom anksioznosti od OFT (Pellow i sar., 1985), jak anksiogeni efekat kortikosterona ne može se negirati, s obzirom na pokazane rezultate OFT. Smanjenje vremena koje su životinje CORT grupe provodile u centralnoj zoni OF arene može se smatrati smanjenjem istraživačke aktivnosti životinja i povlačenjem u periferne, mračne delove arene, što je jasan znak njihove povećane anksioznosti.

Poslednjih decenija, sve je više studija koje izveštavaju o antidepresivnom i anksiolitičkom potencijalu oksitocina. Ovakvi podaci dobijeni su u istraživanjima na životinjama, ali i na humanoj populaciji. U studijama koje su istraživale efekte oksitocina, pokazano je da ovaj neuropeptid povećava eksplorativnu aktivnost pacova u OFT testu, kao i da ubrzava i olakšava normalizaciju emocionalnog stanja životinja nakon izvođenja prokonflikt testa (Svanidze i sar., 2012). U studiji Grippo i sar. (2009), pokazano je da u uslovima delovanja različitih socijalnih stresora, kao što je na primer stres socijalne izolacije, oksitocinergički mehanizmi mogu imati zaštitnu ulogu i ublažavati sledstvene promene u ponašanju i aktivnosti kardiovaskularnog sistema kod glodara. U ovoj studiji je socijalna izolacija tokom 4 nedelje kod životinja dovela do razvoja anhedonije i smanjenja unosa zaslađenog rastvora, kao i depresivnog fenotipa produžavajući vreme imobilnosti u FST testu. Takođe, kod životinja koje su bile izolovane tokom 4 nedelje, došlo je i do redukcije regulacije srčane aktivnosti od strane *n. vagusa*. U istoj studiji, administracija oksitocina tokom poslednjih 14 dana eksperimentalnog protokola, ublažila je pokazane neželjene efekte socijalnog stresa na ponašanje životinja, ali i na parasimpatikusnu regulaciju aktivnosti kardiovaskularnog sistema. Dalje, intranazalna administracija oksitocina adultnim pacovima rano odvojenim od majke pokazala je antidepresivni potencijal (Ji i sar., 2016), dok je kod životinja koje su bile izložene mirisu predatora, što je služilo kao izvor stresa, infuzija oksitocina u hipokampus redukovala anksioznost tokom sledećeg izlaganja životinja istim stresnim stimulusima 7 dana kasnije (Cohen i sar., 2010). Antidepresivni potencijal oksitocina potvrđen je i u studijama na humanoj populaciji, gde je, kod pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja rezistentnih na terapiju, dodatni intranazalni tretman oksitocinom tokom 4 nedelje uz već postojeću terapiju escitalopramom ublažio depresivne simptome i značajno smanjio skorove na Hamiltonovoj skali za procenu nivoa jačine simptoma (Scantamburlo i sar., 2015).

Rezultati dobijeni u eksperimentalnom radu ove disertacije daju dopunu dosadašnjim nalazima o anksiolitičkom i antidepresivnom potencijalu oksitocina, u ovom slučaju u animalnom modelu hroničnog stresa/depresije indukovane hroničnom primenom kortikosterona. Tačnije, u OFT testu, administracija oksitocina uz tretman kortikosteronom povećala je istraživačku aktivnost životinja i skratila vreme koje su one provodile u stanju imobilnosti, dok je u FST testu produžila latentno vreme kao i vreme koje su životinje provodile aktivno se boreći da nađu izlaz iz cilindra. Međutim, tačan mehanizam kojim oksitocin ostvaruje ovakve efekte na ponašanje nije poznat. Pretpostavlja se da oksitocin može uticati na konsolidaciju memorije vezane za traumatsko iskustvo i na taj način ublažiti anksioznost u sličnim negativnim situacijama kojima jedinka može biti izložena u budućnosti (Cohen i sar., 2010). Za sada, potvrđeno je prisustvo neurona koji sintetišu i oslobađaju oksitocin u regionima CNS koja imaju ulogu u regulaciji odgovora organizma na stres, kao što su amigdale, hipotalamus, septum, prefrontalni korteks i hipokampus (Zheng i sar., 2009; Svanidze i sar., 2012; Nakajima i sar., 2014). Takođe, tokom delovanja različitih stresora, oksitocin se pojačano oslobađa u ovim strukturama (Neumann, 2002), što upućuje na njegovu direktnu ulogu u regulaciji ponašanja. Veoma dobro je poznato i to da ovaj hormon ima značajnu ulogu u, kao i da podstiče afilijativno ponašanje i socijalizaciju (McQuaid i sar., 2014). Kako se asocijalnost može dovesti u vezu sa razvojem nekoliko različitih psihičkih poremećaja, uključujući i depresiju (Insel i Young, 2001; Neumann, 2008), činjenica da oksitocin podstiče društvene kontakte, može biti jedno objašnjenje korisnih efekata oksitocina u navedenim patološkim stanjima. Visoki nivoi oksitocina mogu podsticati socijalizaciju i pretpostavlja se da ovaj efekat oksitocin ostvaruje kroz inhibitorni uticaj na aktivnost amigdala (Kirsch i sar., 2005) i sledstveno smanjenje straha i anksioznosti, koji bi u suprotnom doveli do smanjenja socijalne interakcije što bi moglo da prouzrokuje razvoj bolesti.

### **5.2.3. Uticaj oksitocina na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde u modelu hroničnog stresa/depresije**

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je tretman oksitocinom tokom poslednje dve nedelje hronične administracije kortikosterona uticao na morfologiju i

funkciju nadbubrežne žlezde i uspeo da ublaži karakteristične negativne efekte hronično povišenih vrednosti glukokortikoida, koji su potvrđeni i u navedenom animalnom modelu hroničnog stresa/depresije. Povoljni efekti oksitocina u modelu hroničnog stresa izazvanog tronedeljnom administracijom kortikosterona ispoljeni su kao smanjenje atrofije nadbubrežne žlezde, prvenstveno korteksa, ali i adrenalne srži, kao i ublažavanje hormonskog odgovora eksperimentalnih životinja na akutni stres, uz povećanje kapaciteta skladištenja kateholamina u adrenalnoj meduli.

Kao što je i bilo očekivano, nakon tretmana kortikosteronom, kod eksperimentalnih životinja došlo je do atrofije nadbubrežne žlezde, kao i do promena u odgovoru hormona na akutni stres, koji je podrazumevao izvođenje testa forsiranog plivanja u trajanju od 15 min. Kod životinja CORT eksperimentalne grupe, primećeno je i blago, ali ipak statistički značajno, smanjenje koncentracije kortikosterona u plazmi u odnosu na životinje kontrolne grupe. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa morfološkim podacima, kao i sa atrofijom nadbubrežne žlezde zapaženom kod životinja nakon hroničnog tretmana ovim hormonom. Na taj način, rezultati ove disertacije su još jednom potvrdili dobro poznatu činjenicu da, u uslovima hronične izloženosti egzogenim glukokortikoidima, dolazi do supresije aktivnosti HPA osovine (Johnson i sar., 2006; Karatsoreos i sar., 2010; Donner i sar., 2012; Gold, 2015).

Prevenција atrofije nadbubrežne žlezde kod pacova izazvana administracijom oksitocina uz hronični tretman kortikosteronom, pokazana je uticajem na apsolutnu masu žlezde koja je bila značajno povećana. Povećanje apsolutne mase nadbubrega, prvenstveno je posledica značajno povećane mase korteksa žlezde kod navedene eksperimentalne grupe životinja. U strukturama adrenalnog korteksa, posmatrajući površinu ekvatorijalnog preseka, najupečatljiviji efekat oksitocina u navedenom animalnom modelu uočen je u zoni fascikulati, čija je površina kod CORT+OXY grupe bila značajno povećana. Međutim, i pored povoljnog uticaja na morfologiju žlezde, u uslovima hroničnog hiperkortizolizma, administracija oksitocina nije uspela da spreči smanjenje bazalne koncentracije kortikosterona u plazmi. S druge strane, koncentracija kortikosterona u plazmi je bila povećana kod životinja tretiranih samo oksitocinom, ukazujući na stimulatorni efekat oksitocina na sekreciju ovog hormona. U studiji Cohen-a i saradnika (2010) takođe je utvrđeno da nakon *i.p.* administracije oksitocina

dolazi do povećanja koncentracije kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja. Ovakav efekat oksitocina mogao bi biti posledica stimulacije ekspresije Fos proteina u ćelijama korteksa nadbubrežne žlezde, što za rezultat ima i povećanje sekrecije kortikosterona (Shepherd i sar., 2001). Osim toga, pokazano je da u situacijama dugotrajne supresije aktivnosti HPA osovine, egzogeni glukokortikoidi blokiraju ovaj stimulatorni uticaj oksitocina na oslobađanje ACTH iz izolovanih ćelija prednjeg režnja hipofize (Viero i sar., 2010).

Pozitivan uticaj oksitocina na sekreciju kortikosterona delom može biti objašnjen njegovim direktnim efektom na žlezdu, s obzirom da je prisustvo ovog hormona, kao i njegovih funkcionalnih receptora odavno potvrđeno u humanim, goveđim, kao i nadbubrežnim žlezdama pacova (Ang i Jenkins, 1984; Nussey i sar., 1987). Međutim, kako je pokazano da oksitocin stimuliše oslobađanje ACTH iz izolovanih ćelija prednjeg režnja hipofize pacova (Viero i sar., 2010), ne može se isključiti ni postojanje njegovog indirektnog efekta. Tokom delovanja različitih vrsta stresora, pojačano je oslobađanje oksitocina centralno, u moždanim strukturama, ali takođe i periferno, iz neurohipofiznih terminala u krvotok (Neumann, 2002). I pored brojnih istraživanja izvođenih poslednjih decenija, fiziološka uloga periferno oslobođenog oksitocina kod oba pola, izvan porođaja i perioda laktacije kod žena, i dalje je većim delom nepoznata, ali se pretpostavlja da bi mogla da podrazumeva i regulaciju aktivnosti nadbubrežne žlezde, prvenstveno kroz modulaciju oslobađanja glukokortikoida (Legros i Annsseau, 1992). Rezultati velikog broja studija na eksperimentalnim životinjama koje su ispitivale uticaj egzogenog oksitocina na sekreciju kortikosterona i morfologiju kore nadbubrežne žlezde prilično su neujednačeni, i pokazuju kako stimulatorni, tako i inhibitorni efekat ovog hormona na žlezdu. Svakako se može izvesti zaključak da dobijeni rezultati u mnogome zavise od upotrebljene doze i samog načina aplikacije oksitocina, trajanja eksperimentalnog tretmana, uslova kojima su životinje izložene tokom eksperimenta (prisustvo ili odsustvo stresa) i od toga da li su u pitanju *in vivo* ili *in vitro* ispitivanja (Plećaš i sar., 1990; Stachowiak i sar., 1995; Shepherd i sar., 2001; Cohen i sar., 2010; Viero i sar., 2010).

Mehanizam kojim oksitocin ispoljava protektivni efekat na atrofiju nadbubrežne žlezde kod životinja hronično tretiranih kortikosteronom za sada ostaje nepoznat i zahteva dalja istraživanja u ovoj oblasti. Poznati, antioksidativni potencijal ovog neuropeptida mogao bi biti jedno od objašnjenja. Rezultati ove disertacije pokazali su da je kod životinja tretiranih kortikosteronom, administracija oksitocina dovela do smanjenja koncentracije biomarkera oksidativnog stresa u plazmi. Takođe, antioksidativni i radioprotektivni efekat ovog peptida potvrđen je u nekoliko različitih patoloških stanja uključujući ishemiju, sepsu i opekotine (Iseri i sar., 2005; Szeto i sar., 2008; Aljanabi i sar., 2013; Gonzales-Reyes i sar., 2015). S druge strane, dobro je poznato da su štetni efekti hroničnog tretmana, kao i visokih koncentracija endogenih glukokortikoida, delom rezultat i povećanog oksidativnog stresa (Zafir i Banu, 2009; Spiers i sar., 2014; Gupta i sar., 2015).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je hronična administracija glukokortikoida uticala i na srž nadbubrežne žlezde, deo sistema uključenog u regulaciju fiziološkog odgovora organizma na stres. Nakon tronedeljnog tretmana kortikosteronom, kod eksperimentalnih životinja došlo je do smanjenja srži nadbubrežne žlezde, što je zaključeno na osnovu smanjenja površine ekvatorijalnih preseka, dok je koadministracija oksitocina ublažila ovaj negativan efekat glukokortikoida. Povećanje površine srži zapaženo u obe grupe životinja koje su bile tretirane oksitocinom najverovatnije je uzrokovano veoma приметnim povećanjem površine krvnih sudova u ovoj regiji žlezde. Vazodilatacija krvnih sudova naročito je bila izražena u grupi životinja tretiranih samo oksitocinom. Funkcionalni značaji pokazane vazodilatacije u adrenalnoj meduli nakon periferne administracije oksitocina zavređuje pažnju, imajući u vidu da se ovaj peptid takođe sintetiše u srcu i krvnim sudovima, kao i da u ovim organima postoje funkcionalni oksitocinergički receptori (Jankowski i sar., 1998). Na primer, utvrđena je direktna veza koncentracije oksitocina u krvi, vazodilatacije i sistolnog volumena *post partum*, što upućuje na njegov mogući kardioprotektivni efekat (Grewen i Light, 2011). Otuda, rezultati ove doktorske disertacije daju potvrdu da vazodilatacija u nadbubrežnoj žlezdi može doprineti ukupnom dejstvu oksitocina i njegovoj ulozi u regulaciji odgovora kardiovaskularnog sistema prilikom delovanja različitih stresora.

Dobijeni rezultati takođe su pokazali da su eksperimentalni tretmani doveli do značajnih promena sekretne aktivnosti, kao i kapaciteta za skladištenje kateholamina u hromafinim ćelijama srži nadbubrežne žlezde. Literaturni podaci opisuju različite i oprečne uticaje egzogenih glukokortikoida na količinu kateholamina u srži, kao i njihovu koncentraciju u tkivu žlezde i plazmi. Tako, u zavisnosti od eksperimentalnih uslova, rezultati različitih studija na glodarima potvrdili su povećanje količine kateholamina u srži praćeno povećanjem njihove koncentracije u plazmi (Kumai i sar., 2000), zatim supresiju adrenomedularne sekrecije (Szemeredi i sar., 1998), kao i povećanje količine kateholamina u tkivu srži žlezde, ali koje nije bilo praćeno povećanjem koncentracije ovih hormona u plazmi (Sharara-Chami i sar., 2010). U eksperimentalnim uslovima ove doktorske disertacije, nakon tronedeljne administracije kortikosterona došlo je do povećanja koncentracije adrenalina u plazmi, dok je koncentracija noradrenalina ostala nepromenjena. Takođe, koadministracija oksitocina i kortikosterona dodatno je povećala koncentraciju adrenalina u plazmi eksperimentalnih životinja. Imajući ovo u vidu, može se pretpostaviti da je oksitocin doveo do povećanja osetljivosti hromafinih ćelija srži nadbubrežne žlezde na dejstvo egzogenog kortikosterona, povećavajući prvenstveno njihovu sekretornu aktivnost. Ranije studije Plećaš i saradnika (1989) pokazale su da tretman ovim neuropeptidom dovodi do povećanja količine adrenalina, noradrenalina i dopamina u nadbubrežnoj žlezdi pacova. Kako je potvrđeno prisustvo oksitocina u srži žlezde većeg broja životinjskih vrsta (Ang i Jenkins, 1984; Nussey i sar., 1987), značajna parakrina uloga ovog hormona u regulaciji sekrecije kateholamina mogla se i očekivati.

Nakon izlaganja akutnom stresu, kod obe grupe životinja, CORT i CORT+OXY grupe, koje su hronično tretirane kortikosteronom, nije uočen uobičajeni porast koncentracije ovog hormona u plazmi, tako da se koncentracija kortikosterona nakon 15-minutnog testa forsiranog plivanja nije statistički razlikovala od bazalnih vrednosti za datu eksperimentalnu grupu životinja. S druge strane, odgovor hromafinih ćelija, a samim tim i promene koncentracija kateholamina u plazmi, nakon akutnog stresa su pomalo iznenađujuće. Naime, za razliku od očekivanog povećanja koncentracija kateholamina u plazmi nakon izlaganja akutnom stresu, a koje je uočeno kod životinja kontrolne grupe, kod pacova tretiranih oksitocinom zapaženo je značajno smanjenje koncentracije ovih hormona u plazmi. Ovaj trend je takođe postojao i kod životinja koje



su bile tretirane kombinacijom kortikosterona i oksitocina. Objašnjenje ovakvog odgovora na akutni stres se može, barem delimično, pripisati promenama ekspresije gena *Slc6a2* i *Slc18a2* koji kodiraju transportere NAT i VMAT2 u meduli pacova tretiranih oksitocinom. Kako je ekspresija gena za transportere i/ili njihova količina u tkivu srži žlezde povećana nakon aplikacije oksitocina, bilo u kombinaciji sa kortikosteronom ili ne, čini se da je oksitocin uticao stimulatorno na skladištenje kateholamina u žlezdi, što je za posledicu imalo smanjenje njihovih nivoa u plazmi nakon testa forsiranog plivanja. Slični rezultati dobijeni su u studiji Jovanovića i saradnika (2014) gde je pokazano da *s.c.* administracija oksitocina mužjacima pacova tokom 14 dana dovodi do povećanja količine kateholamina u srži menjajući ekspresiju gena za VMAT2. Na taj način, može se pretpostaviti da povećanje koncentracija kateholamina u plazmi koje traje duži vremenski period, na primer, tokom izloženosti hroničnom stresu, dovodi do pražnjenja depoa ovih hormona u samoj žlezdi. Pražnjenje depoa kateholamina zatim može prouzrokovati kompenzatorno povećanje ekspresije gena koji kodiraju njihova dva najznačajnija transportera, NAT i VMAT2. Ovakvi rezultati idu u prilog pretpostavci da porast koncentracije oksitocina na periferiji u uslovima stresa pojačava preuzimanje i skladištenje kateholamina u srži nadbubrežne žlezde, što može imati ulogu u zaštiti nekih sistema organa, pre svega kardiovaskularnog sistema, od izrazitog povećanja nivoa kateholamina.

#### **5.2.4. Uticaj oksitocina na parametre oksidativnog stresa u krvi eksperimentalnih životinja u modelu hroničnog stresa/depresije**

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da administracija oksitocina u animalnom modelu hroničnog stresa/depresije izazvane *per os* primenom kortikosterona ublažava oštećenja DNK limfocita periferne krvi nastala usled *in vitro* tretmana vodonik peroksidom kao jakim oksidativnim agensom. Ovakvi protektivni efekti oksitocina mogu se pripisati njegovom antioksidativnom potencijalu, pre svega zbog pokazanog uticaja na supresiju lipidne peroksidacije i povećanje antioksidativne zaštite.

Naime, iako oksitocin nije uticao na ukupna oštećenja DNK limfocita periferne krvi pacova nakon tretmana peroksidom, kod životinja CORT+OXY eksperimentalne

grupe evidentan je uticaj oksitocina na intenzitet oštećenja DNK. Tretman oksitocinom značajno je smanjio procenat ćelija visokog nivoa oštećenja DNK i istovremeno značajno povećao procenat ćelija sa niskim stepenom oštećenja. Ovakav rezultat ukazuje da tretman oksitocinom u određenim uslovima može sprečiti ireparabilno oštećenje DNK i ćelijsku smrt, zadržavanjem oštećenja na niskom nivou. Osim toga, tretman oksitocinom je doveo do smanjenja koncentracije lipidnih hidroperoksida, koji se smatraju biomarkerom oksidativnog stresa, kao i do povećanja aktivnosti enzima antioksidantne zaštite, superoksid dizmutaze, u plazmi pacova hronično tretiranih kortikosteronom.

Poznato je da je genotoksični efekat koji glukokortikoidi ispoljavaju kako *in vivo* (Bali i sar., 1990), tako i *in vitro*, uglavnom posledica indukcije oksidativnih oštećenja molekula lipida, proteina i DNK (Liu i sar., 1996; McIntosh i Sapolsky, 1996; Zafir i Banu, 2009). Kod eksperimentalnih životinja, visoki nivoi glukokortikoida, bilo kao posledica izloženosti različitim tipovima stresora, ili usled njihove egzogene administracije, mogu dovesti do oštećenja DNK ćelija u različitim tkivima, kao što su mozak, jetra, srce i ćelije krvi (Singh i sar., 1994; Liu i sar., 1996; Ashok i sar., 1997; Zafir i Banu, 2009). U skladu sa navedenim, rezultati ove disertacije su pokazali da je tronedeljna administracija kortikosterona pacovima bila dovoljna da dovede do smanjenja antioksidativnog zaštitnog kapaciteta limfocita periferne krvi, s obzirom da je ukupan broj oštećenih ćelija nakon tretmana sa  $H_2O_2$  bio značajno povećan kod CORT grupe životinja, u poređenju sa kontrolom. U situacijama suprimirane reparacije DNK materijala, kao i dodatnog jakog oksidativnog napada usled delovanja  $H_2O_2$  (Hu i sar., 1995; Torbergesen i sar., 2000), u limfocitima životinja hronično tretiranih kortikosteronom došlo je do primetnog oštećenja DNK. Uz to, iako korišćena doza kortikosterona nije imala uticaja na proces lipidne peroksidacije, dovela je do značajnog smanjenja aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi eksperimentalnih životinja. Kako ovaj enzim pripada grupi enzima koji povećavaju antioksidativnu zaštitu, ovakav nalaz može objasniti povećano oštećenje DNK kod životinja hronično tretiranih kortikosteronom nakon *in vitro* tretmana sa  $H_2O_2$ .

Smatra se da hormon oksitocin može delovati kao svojevrsni "pufer stresa", a rezultati velikog broja studija na eksperimentalnim životinjama izvedenih u poslednjih

desetak godina ukazuju na antioksidativni, antiinflamatorni i antiproliferativni efekat ovog neuropeptida (Iseri i sar., 2005; Vargas-Martinez i sar., 2014; Koroglu i sar., 2015; Gonzalez-Reyes i sar., 2015; Houshmand i sar., 2015). U osnovi patoloških promena povezanih sa delovanjem kako fizioloških tako i fizičkih stresora, postoji i povećanje oksidativnog stresa i procesa inflamacije (Mastaloudis i sar., 2004). Pozitivan efekat oksitocina u ovakvim stanjima bi upravo mogao biti i rezultat uticaja na proces inflamacije i oksidativna oštećenja, na taj način umajujući efekat koji hronični stres ispoljava na organizam. Veliki broj studija ukazuje na činjenicu da tretman oksitocinom dovodi do smanjenja ekspresije biomarkera oksidativnog stresa u različitim tkivima i ćelijama (Iseri i sar., 2005; Vargas-Martinez i sar., 2014; Gonzalez-Reyes i sar., 2015; Houshmand i sar., 2015). S druge strane, veoma je malo podataka o direktnom uticaju oksitocina na genetički materijal. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da dvonedeljni tretman oksitocinom kod životinja izloženih visokom nivou kortikosterona i nakon inkubacije vodonik peroksidom, sprečava porast totalnog skora kometa (TSK) limfocita periferne krvi, koji je jasno vidljiv kod životinja CORT grupe. Iako nakon tretmana oksitocinom nije došlo do promene ukupnog broja oštećenih ćelija posle tretmana sa  $H_2O_2$ , kod životinja CORT+OXY grupe značajno je izmenjena distribucija limfocita različitog stepena oštećenja: broj ćelija sa visokim stepenom oštećenja DNK je redukovan do vrednosti kontrolne grupe, dok je broj ćelija sa niskim stepenom oštećenja bio značajno veći u odnosu na druge eksperimentalne grupe životinja. Ovakvi rezultati mogu biti od značaja pošto ukazuju na to da je oksitocin uspeo da spreči razvoj ozbiljnih oštećenja DNK limfocita periferne krvi, indukovanih endogenim kortikosteronom i egzogenim  $H_2O_2$ . Poznato je da ćelije sa visokooštećenim DNK, zbog nemogućnosti reparacije molekula, ulaze u proces apoptoze, dok niska oštećenja genetskog materijala mogu uspešno da se isprave. Ovakva različita "sudbina" ćelija, u zavisnosti od jačine oštećenja genetskog materijala, moguća je usled bimodalne aktivacije p53 metaboličkog puta, koji je od ključnog značaja u kontroli procesa reparacije sa jedne i ćelijske smrti sa druge strane (Roy, 2007; Chen i sar., 2013). Tačnije, jaka oštećenja DNK koja se ne mogu ispraviti dovode do drastičnog povećanja aktivnosti p53 signalnog puta, što rezultuje ćelijskom smrću aktivacijom procesa apoptoze. Umerena indukcija p53 signalnog puta, koja se javlja u situacijama umerenog oštećenja DNK, ograničava i usporava aktivnosti povezane sa apoptozom i dovodi do

kratkotrajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa, što omogućava popravku postojećeg oštećenja.

Rezultati ove disertacije idu u prilog hipotezi o antioksidativnom, zaštitnom efektu oksitocina, pošto upućuju na zaključak da oksitocin sprečava razvoj izrazitog oštećenja DNK u limfocitima periferne krvi, iniciranog hroničnim tretmanom kortikosteronom i egzogenim  $H_2O_2$  kao jakim oksidativnim agensom. Slično prikazanim rezultatima, studija Iseri-ja i saradnika (2008) je pokazala da administracija oksitocina životinjama odmah, kao i 24 časa nakon termalne traume značajno smanjuje koncentraciju malondialdehida i aktivnost mijeloperoksidaze u želudačnom tkivu, a takođe i značajno smanjuje oštećenje DNK i procese apoptoze u ćelijama gastrične mukoze. U našoj studiji, može se pretpostaviti i postojanje direktnog uticaja oksitocina na limfocite periferne krvi, pošto je potvrđeno prisustvo oksitocinergičkih receptora na zrelim, citotoksičnim  $CD8^+$  ćelijama (Gimpl i Fahrenholz, 2001).

Komet test, izvođen u eksperimentalnom radu tokom izrade ove doktorske disertacije, je izuzetno često korišćeni test koji detektuje oštećenja na genetičkom materijalu ćelija koja ne moraju biti isključivo posledica oksidativnog udara. Međutim, štetni efekti hronično visokih nivoa glukokortikoida svakako su, barem delom, uzrokovani pojačanim oksidativnim stresom, pa se antioksidativno dejstvo oksitocina mora uzeti u obzir. Osim toga, zbog svoje visoke reaktivnosti, vodonik peroksid se svrstava u reaktivne kiseonične radikale, tako da odsustvo porasta visokooštećenih ćelija nakon *in vitro* inkubacije sa  $H_2O_2$  kod životinja tretiranih oksitocinom dodatno potvrđuje ovu pretpostavku. Uz to, rezultati ukazuju i na činjenicu da tretman oksitocinom kod životinja hronično izloženih povišenim vrednostima glukokortikoida dovodi do redukcije koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) u plazmi, markera oksidativnog stresa, čija je koncentracija direktno proporcionalna oksidativnim oštećenjima. Takođe, kako je aplikacija oksitocina tokom 14 dana dovela do smanjenja koncentracije LOOH i u plazmi kontrolnih životinja, ovakav nalaz upućuje na zaključak da ovaj hormon poseduje antioksidativni potencijal koji nije zavisao od tretmana kortikosteronom.

U nekoliko studija u kojima je ispitivan efekat oksitocina, pokazano je da ovaj hormon dovodi do smanjenja koncentracije malondialdehida (MDA), još jednog biomarkera oksidativnog stresa, u plazmi i različitim vrstama tkiva eksperimentalnih životinja (Iseri i sar., 2008; Akman i sar., 2015; Imani i sar., 2015). Iako u našem eksperimentu nije uočena promena koncentracije MDA u plazmi između eksperimentalnih grupa, nivoi LOOH, koji predstavljaju rane intermedijere u procesu peroksidacije lipida (Ayala i sar., 2014) su bili značajno manji u CORT+OXY grupi životinja u poređenju sa CORT grupom. Imajući u vidu da je MDA produkt dekompozicije LOOH (Ayala i sar., 2014) može se pretpostaviti da u datim eksperimentalnim uslovima, tretman oksitocinom ima uticaja na rane faze peroksidacije lipidnih čestica. Iz tog razloga svakako je verovatno da bi, u nekom dužem vremenskom intervalu, došlo do promena i u plazma koncentraciji MDA nakon tretmana oksitocinom. Drugo objašnjenje ovakvog nalaza bilo bi da su ispitivani LOOH nastali od lipida koji ne degradiraju do MDA, pa iako tretman oksitocinom značajno smanjuje plazma koncentraciju LOOH, nije imao efekta na nivoe MDA.

Još jedan nalaz koji ide u prilog antioksidativnom efektu oksitocina je značajno povećanje aktivnosti enzima superoksid dizmutaze (SOD) u plazmi pacova nakon dvonedeljne aplikacije oksitocina uz hroničnu administraciju kortikosterona, u poređenju sa životinjama tretiranim samo kortikosteronom. Kako je SOD jedan od značajnih enzima antioksidativne zaštite, povećanje njegove aktivnosti zapaženo kod CORT+OXY grupe može ukazivati da je administracija oksitocina dovela do povećanja aktivnosti mehanizama zaštite organizma od potencijalnog oksidativnog oštećenja u situacijama dodatnog oksidativnog stresa, kao što je *in vitro* tretman vodonik peroksidom.

### **5.2.5. Uticaj oksitocina na proces adultne neurogeneze u hipokampusu eksperimentalnih životinja u modelu hroničnog stresa/depresije**

Rezultati imunohistohemijske analize moždanog tkiva pokazali su da tretman oksitocinom ima pozitivan uticaj na proces adultne neurogeneze u hipokampusu, povećavajući gustinu ćelija koje ekspimiraju BDNF i nuklearni faktor Ki-67 u ovoj strukturi, kao i to da je ovakav efekat oksitocina regionalno specifičan. Takođe,

stimulatorni efekat na neurogenezu, oksitocin je ispoljio i u primenjenom modelu hroničnog stresa/depresije izazvane hroničnim tretmanom kortikosteronom. Tačnije, koadministracija oksitocina poslednje dve nedelje tretmana kortikosteronom sprečila je gubitak BDNF+ ćelija u dentatnom girusu i CA2+CA3 regiji. Sa druge strane, administracija oksitocina u navedenom modelu depresije nije uspela da spreči gubitak Ki-67+ ćelija, indukovani hroničnim hiperkortizolizmom. Ovakvi rezultati daju doprinos dosadašnjim istraživanjima i idu u korist hipotezi da oksitocin svoj pozitivan efekat u poremećajima ponašanja ispoljava jednim delom i kroz pozitivnu modulaciju procesa adultne neurogeneze u hipokampusu.

Do sada je pokazano da je proces adultne neurogeneze u hipokampusu značajno izmenjen u uslovima izloženosti jedinke hroničnom stresu, ali i obrnuto, da adultna neurogeneza u mnogome reguliše odgovor organizma na stres (Egeland i sar., 2015). Nedavne studije na kulturama nervnih ćelija potvrdile su da molekularni mehanizmi uključeni u regulaciju adultne neurogeneze u uslovima povišenih nivoa glukokortikoida podrazumevaju aktivaciju i drugih molekula i signalnih puteva, kao što su, na primer, medijatori inflamatornog odgovora i neurotrofični faktori (Egeland i sar., 2015). Hipokampus je struktura mozga koja ima značajnu ulogu u regulaciji raspoloženja i odgovora organizma na stres, a takođe pokazuje visoku osetljivost na uticaj glukokortikoidnih hormona, s obzirom da je u ovoj strukturi detektovana velika gustina glukokortikoidnih receptora (Sapolsky i sar., 1983; Workman i sar., 2014). Pretpostavlja se da bi upravo proces adultne neurogeneze mogao biti ključan u ulozi koju hipokampus ima u regulaciji odgovora organizma na stres (Egeland i sar., 2015). U ispitivanju ove pretpostavke početne studije na glodarima su pokazale da izloženost stresu značajno menja i umanjuje adultnu neurogenezu, pre svega u subgranularnom sloju dentatnog girusa (DG) hipokampusa (Cameron i Gould, 1994). Kasnijim studijama je potvrđeno i da proces adultne hipokampalne neurogeneze može u mnogome modulirati odgovor organizma na stres i olakšati adaptaciju jedinke na novonastale uslove. Ovi rezultati dobijeni su prvenstveno u studijama na animalnim modelima hroničnog stresa i depresije (Cameron i Gould, 1994; Gould i sar., 1997). Identifikacija molekularnih mehanizama koji leže u osnovi karakterističnih promena u hipokampusu može poslužiti u razvoju novih tretmana u terapiji oboljenja povezanih sa hroničnom izloženosti stresu, kao što su anksioznost i depresija (Egeland i sar., 2015).

Nadalje, u studijama na različitim životinjskim vrstama pokazano je da izloženost stresu utiče na proces neurogeneze, pre svega smanjujući ćelijsku proliferaciju (Tanapat i sar., 2001; Czeh i Lucassen, 2007; Schoenfeld i Gould, 2012). Naime, akutni stres koji je podrazumevao izloženost jedinki nepoznatom mužjaku iste vrste (Gould i sar., 1997) ili samo mirisu životinje koja predstavlja pretnju (Tanapat i sar., 2001), umanjio je proliferaciju ćelija u hipokampusu eksperimentalnih životinja. Kod glodara izloženih nepredvidivom blagom stresu, često korišćenom animalnom modelu depresivnog ponašanja, neurogeneza je bila značajno smanjena, a pokazane su i karakteristične promene u ponašanju koje podrazumevaju nemogućnost životinje da adekvatno odgovori u stresnoj situaciji. Ukoliko izloženost stresu traje duži vremenski period, karakteristične promene procesa neurogeneze kod životinja mogu rezultovati razvojem fenotipa sličnog onom koji se zapaža kod pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja (Wong i Herbert, 2004; Mirescu i Gould, 2006).

Kortikosteroidi, bilo egzogeni ili endogeno sintetisani i oslobođeni u većoj meri, što se može javiti u situacijama hiperaktivacije HPA osovine tokom odgovora organizma na stres, dovode do velikog broja funkcionalnih promena u nervnim ćelijama, kao što su: gubitak neurona, redukcija remodelovanja dendrita i ćelijske diferencijacije, smanjenje neurogeneze i neuronske plastičnosti (Sheline i sar; 1999, 2003; Campbell i sar., 2004; Workman i sar., 2013). Rezultati ove disertacije potvrdili su postojanje štetnih efekata glukokortikoida na proces hipokampalne neurogeneze, a pretpostavljeni mehanizam navedenog dejstva mogao bi uključivati i smanjenje ekspresije BDNF, faktora koji je od značaja za preživljavanje postojećih i rast i diferencijaciju novih neurona i sinapsi, kao i nuklearnog faktora Ki-67, markera ćelijske proliferacije. Smanjenje ekspresije ovih proteina u hipokampusu nakon tronedelnog tretmana životinja kortikosteronom, dobijeno u ovom istraživanju, ide u prilog rezultatima dosadašnjih studija, koje ukazuju da kod životinja izloženih akutnom stresu imobilizacije dolazi do smanjenja ekspresije iRNK za BDNF koje je najintenzivnije u dentatnom girusu hipokampusa (Smith i sar., 1995; Nibuya i sar., 1995; Vaidya i sar., 1997). Slično, delovanje drugih vrsta stresora, uključujući nepredvidivi blagi stres (Nibuya i sar., 1999), socijalnu izolaciju (Barrientos i sar., 2003), aplikovanje električnih stimulusa (Rasmussen i sar., 2002) ili odvajanje mladunaca od majke (Roceri i sar., 2002), kod eksperimentalnih životinja dovelo je do

zmanjenja ekspresije glavnog neurotrofičnog faktora, BDNF, u hipokampusu, a ovakvi rezultati potvrđeni su i u studijama na humanoj populaciji. Kod pacijenata obolelih od nekog oblika depresivnih poremećaja, uočeno je smanjenje koncentracije BDNF u plazmi u odnosu na zdrave ispitanike (Dwivedi i sar., 2006; Kocabas i sar., 2011). Pored efekta na ekspresiju BDNF, negativni efekti koje hroničan stres ispoljava na strukturu hipokampusa podrazumevaju i smanjenje ekspresije drugih faktora koji su potrebni za normalno preživljavanje i razvoj ćelija. U studiji Bath-a i saradnika (2016), izloženost stresu mladunaca pacova dovela je do smanjenja ekspresije nuklearnog faktora Ki-67, koji se smatra markerom ćelijske proliferacije, i Doublecortin-a, markera ćelijske diferencijacije. Slično, u studiji na transgenim miševima, potencijalnom animalnom modelu depresivnog ponašanja, pokazano je da ove životinje imaju manji volumen hipokampusa, izmenjenu strukturu dentatnog girusa, smanjenu ekspresiju Doublecortin-a u ovoj moždanoj regiji, kao i da su pojačano anksiozne u odnosu na kontrolne životinje (Persson i sar., 2014). Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da štetni efekti hroničnog tretmana kortikosteronom podrazumevaju i inhibiciju adultne neurogeneze u hipokampusu eksperimentalnih životinja. Ovakav efekat tretman kortikosteronom ispoljio je negativnim uticajem na ekspresiju BDNF i Ki-67, što se uočava i kod pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja i može doprineti razvoju depresivne simptomatologije. Na taj način, podaci dobijeni tokom izrade ove disertacije idu u prilog skorašnjoj hipotezi o tome da bi pozitivna modulacija ekspresije ovih faktora u karakteristično izmenjenim moždanim strukturama mogla poslužiti u razvoju novih strategija terapije depresivnih poremećaja (Dwivedi i sar., 2006, Duman i Monteggia, 2006).

Novija istraživanja ukazuju na činjenicu da kompleksni mehanizam dejstva antidepresiva podrazumeva i stimulaciju adultne neurogeneze hipokampusa, procesa koji je značajno narušen kod depresivnih pacijenata (Dwivedi i sar., 2006). Tretman lekovima iz grupe antidepresiva kod pacova dovodi do povećanja ekspresije BDNF u mozgu (Nibuya i sar., 1995), a takođe i kod pacijenata do povećanja njegove koncentracije u plazmi i moždanom tkivu (Dwivedi i sar., 2006; Karege i sar., 2005). Sa druge strane, poslednjih godina povećan je broj studija koje ispituju uticaj oksitocina na ponašanje i koje su potvrdile hipotezu da ovaj neuropeptid poseduje određeni anksiolitički i antidepresivni potencijal (Svanidze i sar., 2012; Guzman i sar., 2013;



Jovanović i sar., 2014). Međutim, tačan mehanizam ovakvog efekta oksitocina za sada nije poznat.

U studiji Ji i saradnika (2016) intranazalna aplikacija oksitocina mladuncima rano odvojenim od majke ublažila je depresivnu simptomatologiju i stimulisala neurogenezu i plastičnost neurona hipokampusa. Takođe, aplikacija ovog hormona povećala je broj oksitocinergičkih neurona u jedrima hipotalamusa (Yamamoto i sar., 2004) i povoljno uticala na organizaciju moždanih struktura tokom ranog razvoja (Kramer i sar., 2006). Smatra se da neuropeptidi, uključujući i oksitocin, imaju trofičku ulogu, kao i ulogu faktora diferencijacije neurona, i u studiji Bakos-a i saradnika (2014), neonatalna administracija oksitocina ženkama pacova ublažila je negativne efekte lipopolisaharida na ekspresiju gena za nestin, faktor rasta neurona (eng. Neuron growth factor, NGF), zatim protein povezan sa mikrotubulama 2 (eng. Microtubule-associated protein 2, MAP-2), kao i BDNF. Poznato je da se kod ljudi oksitocin pojačano oslobađa u situacijama prijatnih socijalnih interakcija, olakšava socijalno povezivanje, ima anksiolitički potencijal i moguće da na taj način štiti jedinku od negativnih posledica izloženosti stresu (Landgraf i Neumann, 2004; Bakos i sar., 2014). Bez obzira na dobro poznate efekte ovog neuropeptida na emocije i ponašanje, biološki mehanizmi njegovog delovanja ostaju nepoznanica. Jedno od objašnjenja ovakvog delovanja oksitocina svakako bi mogao biti i njegov uticaj na povećanje gustine BDNF i Ki-67 pozitivnih ćelija u hipokampusu, što je pokazano u rezultatima ove disertacije. Na taj način oksitocin ne samo da poboljšava ćelijsku proliferaciju, već promoviše i razvoj novih i preživljavanje starih neurona, što za posledicu može imati i njegove povoljne uticaje na ponašanje eksperimentalnih životinja (Sanchez-Vidana i sar., 2016). Dobijeni rezultati, koji upućuju na zaključak da oksitocin ispoljava pozitivne efekte na proces adultne neurogeneze u hipokampusu, daju dobru osnovu za dalja ispitivanja njegove upotrebe kao potencijalnog terapijskog agensa u različitim populacijama psihijatrijskih pacijenata koji pate od nekog oblika poremećaja raspoloženja, kao što su anksioznost i depresija.

Na osnovu rezultata druge faze ove disertacije može se zaključiti da u animalnom modelu hroničnog stresa i depresije indukovane tronedeljnom primenom kortikosterona, tretman oksitocinom ispoljava anksiolitički i antidepresivni potencijal.

Ovaj efekat oksitocina mogao bi biti posledica njegovog efekta na periferiji, pre svega na nadbubrežnu žlezdu, sprečavajući njenu atrofiju, modulišući odgovor hormona žlezde na akutni stres i povećavajući kapacitet srži za skladištenje kateholamina, što se smatra jednim od glavnih mehanizama adaptacije i zaštite organizma u uslovima izloženosti hroničnom stresu. Takođe, pokazane promene u ponašanju mogu biti i posledica centralnih efekata oksitocina, stimulacijom procesa adultne neurogeneze u hipokampusu koja je značajno umanjena u uslovima hronične izloženosti stresu i kod pacijenata obolelih od depresivnih poremećaja, a za koju se smatra da je od velikog značaja za adekvatno snalaženje pojedinca u stresnim situacijama. Takođe, u prilog povoljnim efektima oksitocina u situacijama hiperaktivnosti HPA osovine govori i pokazani antioksidativni potencijal ovog hormona, pošto je poznato da su štetni efekti glukokortikoida delom i posledica povećanog oksidativnog stresa i sledstvenih oštećenja ćelija u velikom broju tkiva.

### **5.3. Uticaj dodatnog tretmana oksitocinom uz tretman citalopramom na ponašanje i ekspresiju *Itgb3* i *Ch1* iRNK u prefrontalnom korteksu pacova u modelu hroničnog stresa/depresije**

Rezultati treće faze ove doktorske disertacije pokazali su i još jednom potvrdili rezultate dobijene tokom izrade druge faze, da tretman oksitocinom tokom 14 dana u animalnom modelu hroničnog stresa i depresije indukovane kortikosteronom ispoljava antidepresivni potencijal. Tako je u FST testu koadministracija oksitocina značajno produžila latentno vreme i skratila vreme koje su životinje provodile u imobilnom položaju u poređenju sa CORT eksperimentalnom grupom. Takođe, potvrđen je dobro poznati antidepresivni efekat citaloprama, pa je u FST testu latentno vreme bilo značajno duže, a period imobilnosti značajno kraći u CORT+CIT grupi u poređenju sa CORT grupom, dok je najintenzivniji antidepresivni efekat zapažen kod grupe životinja tretirane kombinacijom oksitocina i citaloprama, uz hronični tretman kortikosteronom. Slično, prilikom istovremene administracije oksitocina i citaloprama pacovima

hronično tretiranim kortikosteronom, ekspresija gena koji kodira ITGB3 protein, potencijalni biomarker povoljnog odgovora na terapiju lekovima SSRI grupe u prefrontalnom korteksu životinja bila je najveća.

### 5.3.1. Uticaj tretmana oksitocinom uz citalopram na ponašanje Wistar pacova

U testovima ponašanja izvođenim tokom izrade treće faze ove disertacije (OFT, EPM i FST), još jednom su potvrđeni rezultati druge faze, da se hronična primena kortikosterona u dozi 100 mg/L *per os* tokom 21. dana može smatrati animalnim modelom depresije, pošto kod životinja dovodi do promena u ponašanju koje se mogu povezati sa povećanom anksioznošću i depresivnom simptomatologijom. Takođe, tretman oksitocinom poslednih 14 dana administracije kortikosterona, ponovo je pokazao anksiolitički i antidepresivni potencijal u izvođenim testovima. Dodatno, u FST testu, često korišćenom i validiranom testu za ispitivanje antidepresivnog potencijala supstanci, potvrđen je dobro poznati efekat citaloprama, antidepresiva iz grupe SSRI (Jukić i sar., 2016).

Veoma je dobro poznato da hronična administracija kortikosterona, bilo putem injekcija, ili kroz hranu i vodu za piće, može dovesti do karakterističnih promena u ponašanju životinja i pojave stanja sličnog depresiji (Hill i sar., 2003; Gregus i sar., 2005; Donner i sar., 2012), kao i do pojačane anksioznosti (Murray i sar., Lee i sar., 2010; Donner i sar., 2012). Rezultati treće faze ove disertacije, koji su pokazali da su životinje CORT grupe u EPM testu značajno manje ulazile u i provodile vremena u otvorenim kracima, kao i da su u FST testu značajno više vremena provodile u imobilnom položaju u odnosu na kontrolnu grupu životinja, još jednom potvrđuju dosadašnje nalaze. S druge strane, rezultati koji ukazuju da je kod životinja CORT+OXY grupe značajno produženo latentno vreme i skraćen period imobilnosti u FST testu, upućuju na postojanje antidepresivnog potencijala ovog hormona (Grippeo i sar., 2009; Svanidze i sar., 2012). Takođe, koadministracija citaloprama, poznatog antidepresiva iz SSRI grupe, poslednje dve nedelje tretmana kortikosteronom u FST testu pokazala je antidepresivni efekat, produžavajući latentno i skraćujući vreme imobilnosti u poređenju sa životinjama tretiranim samo kortikosteronom. Interesantan

je podatak da je u eksperimentalnoj grupi životinja tretiranoj kombinacijom oksitocina i citaloprama poslednje dve nedelje *per os* tretmana kortikosteronom (CORT+OXY+CIT grupi) primećen najintenzivniji efekat na ponašanje. Tačnije kod životinja CORT+OXY+CIT grupe je u FST testu primećeno najznačajnije povećanje latentnog vremena i skraćenje vremena imobilnosti, u poređenju sa CORT grupom životinja. Takođe, u EPM testu, kod životinja CORT+OXY+CIT grupe zabeležen je najveći procenat ulazaka u otvorene krake, upućujući na postojanje najintenzivnijeg anksiolitičkog efekta. Ovakvi rezultati idu u prilog hipotezi da bi dodatni tretman oksitocinom, uz već postojeću terapiju određenim antidepresivom iz SSRI grupe, omogućio bolji odgovor na osnovnu terapiju kod pacijenata obolelih od nekog poremećaja raspoloženja.

### **5.3.2. Uticaj tretmana oksitocinom uz citalopram na ekspresiju gena za integrin beta 3 (ITGB3) i adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1) u prefrontalnom korteksu Wistar pacova**

U okviru ove doktorske disertacije pokazalo se da ekspresija gena za integrin beta 3 (ITGB3), potencijalni biomarker povoljnog odgovora na terapiju antidepresivima iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, u prefrontalnom korteksu pacova podleže promenama u zavisnosti od primenjenog tretmana. Naime u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane hroničnom primenom kortikosterona, ekspresija *Itgb3* iRNK u prefrontalnom korteksu životinja bila je značajno smanjena, dok je koadministracija oksitocina, kao i citaloprama, dovela do povećanja ekspresije navedene iRNK. Najintenzivniji uticaj na povećanje ekspresije *Itgb3* u prefrontalnom korteksu zapažen je u grupi životinja koje su primale kombinaciju oksitocina i citaloprama, tokom poslednjih 14 dana tronedelnog tretmana kortikosteronom. S druge strane, ni jedan eksperimentalni tretman nije uticao na ekspresiju gena koji kodira adhezioni molekul nervnih ćelija sličan proteinu L1 (CHL1) u uzorcima tkiva prefrontalnog korteksa pacova.

Identifikacija potencijalnih biomarkera povoljnog odgovora na terapiju antidepresivima je od velikog kliničkog značaja iz nekoliko razloga. Jedan od najvećih

problema farmakoterapije depresije je prilično niska stopa povoljnog odgovora na terapiju. Smatra se da preko 30% pacijenata na terapiji lekovima iz grupe SSRI, koji su lekovi prvog izbora i najčešće propisivani od strane psihijatarata, ne odgovori adekvatno na ovu terapiju (Kirchheiner i sar., 2004). Takođe, potrebno je da prođe nekoliko nedelja od početka primene antidepresiva kako bi se pojavili prvi znaci remisije bolesti i ublažavanje početnih simptoma, i tek tada je poznato da li je pacijent odgovorio dobro na terapiju ili ne. Krajnji cilj farmakoterapije depresivnih poremećaja, koji podrazumeva dostizanje potpune remisije pratećih simptoma, postiže se kod manje od 40% pacijenata na terapiji SSRI pre isteka 8 nedelje primene lekova (Probst-Schendzielorz i sar., 2015). Smatra se da bi fenotip odgovora svakog pojedinačnog pacijenta na terapiju antidepresivima mogao pre biti pod uticajem različitih biomolekula koji imaju ulogu u procesima regulacije genske ekspresije, nego same genetske predispozicije kao takve (Cattaneo i sar., 2013). U studiji Morag i saradnika (2011) prikazani su preliminarni podaci o mogućim kandidatima za biomarkere povoljnog odgovora na terapiju lekovima iz grupe SSRI. Ovi rezultati dobijeni su iz farmakogenomskih studija izvođenih na kulturama humanih limfoblasta zdravih donora koje su pokazale relativno nisku ili visoku osetljivost na inhibiciju rasta nakon tretmana paroksetinom, antidepresivom iz grupe SSRI. Za lekove ove farmakološke grupe, kao i triciklične antidepresive, potvrđeno je da stepen inhibicije ćelijskog rasta koji proizvode pokazuje doznu zavisnost (Morag i sar., 2010). Dobijeni rezultati ukazali su da ćelijske linije sa niskom osetljivošću na SSRI lekove *in vitro* imaju značajno veću ekspresiju CHL1 proteina, uključenog u procese embrionalne migracije neurona posredovane integrinom (Andreyeva i sar., 2010). Ulogu CHL1 proteina u funkcionisanju CNS-a potvrdili su i bihejvioralni testovi izvođeni na CHL1 *knockout* miševima u kojima je pokazana smanjena istraživačka aktivnost i neadekvatno socijalno ponašanje ovih životinja (Morellini i sar., 2007). Dalja istraživanja u ovoj oblasti Oved i saradnika (2013) ukazala su da hronični tretman paroksetinom tokom tri nedelje u limfoblastima zdravih donora povećava ekspresiju ITGB3 proteina, adhezionog proteina neophodnog za optimalnu funkciju serotoninskog transportera (Cingolani i sar., 2008; Whyte i sar., 2014), dok ekspresija CHL1 proteina nije bila izmenjena. Takođe, potvrđeno je da je u mozgu *Itgb3 knockout* miševa značajno smanjeno preuzimanje serotonina u neurone (Whyte i sar., 2014), što upućuje na

mogućnost postojanja povezanosti ovog proteina i aktivnosti antidepresiva iz grupe SSRI, čije je ciljno mesto delovanja upravo serotoninski transporter. Značaj ITGB3 proteina za aktivnost serotoninskog transportera (SLC6A4) pokazan je i u studijama u kojima je kod *Itgb3 knockout* miševa značajno smanjena aktivnost ovog transportera u trombocitima i strukturama srednjeg mozga (Carneiro i sar., 2008; Whyte i sar., 2014). Uz to, potvrđeno je postojanje promena u ekspresiji integrin  $\alpha$  subjedinice u medijalnom prefrontalnom korteksu pacova nakon izloženosti stresu (Li i sar., 2015). Nakon tretmana lekovima iz SSRI grupe, povećana je ekspresija *Itgb3* iRNK. U tim uslovima, veća količina ITGB3 vezujućeg proteina (eng. ITGB3 binding protein, ITGB3BP), vezuje se za ITGB3, što povećava aktivnost NF- $\kappa$ B signalnog puta, čiji je ITGB3BP korepresor (Besta i sar., 2002). Veća aktivnost NF- $\kappa$ B signalnog puta podrazumeva stimulaciju procesa hipokampalne neurogeneze, što za posledicu može imati remisiju depresivnih simptoma (Besta i sar., 2002; Bortolotto i sar., 2014). Takođe, Whyte i saradnici (2014) su utvrdili da genska interakcija ITGB3 i SLC6A4 gena, koji kodira serotoninski transporter, u mozgu miševa ima ulogu u regulaciji homeostaze serotonina. Regulacija homeostaze serotonina podrazumeva i regionalno specifičnu modulaciju aktivnosti serotoninskog transportera (Whyte i sar., 2014). Pored transportera za serotonin, integrini, pogotovo oni eksprimirani u moždanom tkivu, mogu da interaguju sa adhezionim molekulima nervnih ćelija, uključujući i CHL1 protein (Felding-Habermann i sar., 1997; Buhusi i sar., 2003). Stoga, postavljena je hipoteza o postojanju interakcije ova dva proteina, CHL1 i ITGB3, u ćelijskoj membrani, koja može biti od značaja za aktivnost serotoninskog transportera, kao i ta da nivoi ekspresije oba navedena proteina mogu poslužiti kao potencijalni biomarkeri povoljnog odgovora na terapiju lekovima SSRI grupe (Oved i sar., 2013; Fabbri i sar., 2015). Tačnije, smatra se da postoji kompeticija membranskih proteina, CHL1 i SLC6A4, oko ograničenog pula ITGB3. Pri niskim koncentracijama CHL1 proteina, više ITGB3 je na raspolaganju serotoninskom transporteru, povećavajući mu aktivnost i, shodno tome, verovatnoću povoljnog terapijskog odgovora na tretman antidepresivima iz SSRI grupe. Ovakvu hipotezu potvrdili su i rezultati kliničkih studija na tri nezavisne grupe pacijenata obolelih od velikog depresivnog poremećaja (eng. Major depressive disorder, MDD) koji ukazuju da se na osnovu postojanja određenog genotipa za CHL1 i ITGB3 proteine može predvideti neadekvatan odgovor

pacijenata na terapiju antidepresivima (Fabbri i sar., 2015). Tome u prilog ide i podatak da je kod pacijenata obolelih od depresije na terapiji paroksetinom povećana ekspresija ITGB3 u kulturama limfoblasta (Oved i sar., 2013), kao i činjenica da je kod pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja povećana ekspresija CHL1 proteina u krvi (Wakabayashi i sar., 2008), u poređenju sa zdravim dobrovoljcima.

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju dopunu i potvrdu rezultata dosadašnjih studija, i ukazuju da, slično kao kod depresivnih pacijenata, i u korišćenom animalnom modelu depresije, dolazi do smanjenja ekspresije gena koji kodira ITGB3 protein. Ovo je prva studija u kojoj je ispitivan uticaj tretmana oksitocinom na ekspresiju potencijalnih biomarkera povoljnog odgovora na terapiju SSRI lekovima u animalnom modelu. Dosada je pokazano da postoji pozitivna korelacija nivoa oksitocina u plazmi i količine SERT transportera u trombocitima zdravih dobrovoljaca (Marazziti i sar., 2012). Rezultati ove disertacije ukazuju na mogućnost stimulatornog uticaja oksitocina na ekspresiju gena za ITGB3. Moglo bi se pretpostaviti da ovaj molekularni mehanizam u određenoj meri doprinosi antidepresivnom potencijalu oksitocina. Ova pretpostavka je podržana činjenicom da korišćeni eksperimentalni tretmani nisu imali uticaja na ekspresiju CHL1 proteina, što bi za posledicu moglo imati okolnost u kojoj bi veća količina proteina ITGB3 bila direktno raspoloživa serotoninском transporeteru, na taj način povećavajući mu aktivnost. U ovakvim okolnostima, u slučaju ekstrapolacije dobijenih rezultata na MDD pacijente, mogla bi se očekivati povećana osetljivost na lekove iz grupe SSRI i sledstveno bolji terapijski odgovor. Činjenica da je u grupi životinja koje su bile tretirane oksitocinom i citalopramom u korišćenom modelu depresije zapažen najveći porast u ekspresiji ITGB3 upućuje na mogućnost da bi dodatni tretman oksitocinom uz već postojeću terapiju antidepresivima iz grupe SSRI mogao povećati verovatnoću dobrog odgovora na terapiju antidepresivima, što svakako otvara put daljim istraživanjima u ovoj oblasti.

Iz rezultata dobijenih tokom izrade treće faze ove disertacije može se zaključiti da dodatni tretman oksitocinom uz citalopram, antidepresiv iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, u modelu kortikosteronom indukovanoг hroničnog stresa i depresije, dovodi do povećanja ekspresije gena za ITGB3 u tkivu prefrontalnog korteksa pacova. ITGB3 protein smatra se biomarkerom povoljnog odgovora na

terapiju antidepresivima iz grupe SSRI. Iz tog razloga, može se zaključiti da bi tretman oksitocinom mogao povećati verovatnoću adekvatnog odgovora pacijenata na lekove prvog izbora u terapiji depresivnih poremećaja, kao i da povećanje ekspresije ITGB3 proteina nakon tretmana oksitocinom može biti jedan od mehanizama antidepresivnog dejstva ovog hormona, pokazanog takođe tokom izrade ove disertacije.



## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu iznetih rezultata i diskusije doktorske disertacije, doneti su sledeći zaključci:

- Dvonedeljni tretman oksitocinom u modelu hroničnog stresa i depresije pokazuje anksiolitički i antidepresivni potencijal što je procenjeno primenom odgovarajućih testova ponašanja (test otvorenog polja, uzdignuti plus lavirint i test forsiranog plivanja).
- Oksitocin pokazuje zaštitni efekat na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde u modelu kortikosteronom indukovano hroničnog stresa i depresije. Ovaj efekat ogleda se u:
  - prevenciji atrofije žlezde indukovane hronično povišenim nivoom glukokortikoida. Oksitocin prvenstveno dovodi do povećanja površine ekvatorijalnog preseka korteksa žlezde, odnosno mase korteksa, što se odrazilo i na apsolutnu masu organa,
  - upadljivoj vazodilataciji u srži nadbubrežne žlezde,
  - pozitivnoj modulaciji ekspresije gena Slc6a2 i Slc18a2 koji kodiraju dva najznačajnija transportera za kateholamine, noradrenalinskog transportera (NAT) i vezikularnog transportera za monoamine 2 (VMAT2). Na ovaj način, oksitocin povećava kapacitet srži za skladištenje kateholamina, što se smatra jednim od glavnih mehanizama adaptacije i zaštite organizma u uslovima izloženosti hroničnom stresu.
  - dvosmernom uticaju na nivo hormona nadbubrežne žlezde u plazmi, pre i nakon akutnog stresa.
- Oksitocin ispoljava antioksidativni potencijal i povoljno utiče na procese regulacije oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite kod životinja hronično tretiranih kortikosteronom. Ovaj efekat se ogleda u:

- smanjenju stepena oštećenja DNK limfocita periferne krvi pacova nakon *in vitro* inkubacije sa vodonik peroksidom, što najverovatnije omogućava adekvatno odvijanje procesa reparacije DNK,
  - smanjenju koncentracije lipidnih hidroperoksida u plazmi, karakterističnih markera oksidativnog oštećenja,
  - povećanju aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, superoksid dizmutaze.
- Tretman oksitocinom u značajnoj meri umanjuje negativan efekat kortikosterona na proces adultne neurogeneze u hipokampusu, a što se ogledalo u:
- povećanoj gustini BDNF+ neurona u dentatnom girusu i CA2+CA3 regionu hipokampusa kao i količini BDNF proteina u tkivu hipokampusa,
  - povećanju gustine Ki-67+ neurona u dentatnom girusu, mada ovaj efekat nije zapažen u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane kortikosteronom, već kod pacova tretiranih samo oksitocinom.
- Dodatni tretman oksitocinom uz citalopram, antidepresiv iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, u modelu kortikosteronom indukovano hroničnog stresa i depresije, dovodi do povećanja ekspresije gena za ITGB3 u tkivu prefrontalnog korteksa. Kako se ITGB3 protein može smatrati biomarkerom povoljnog odgovora na terapiju antidepresivima iz grupe SSRI i neophodan je za funkcionisanje transportera za serotonin, može se pretpostaviti da bi tretman oksitocinom mogao povećati verovatnoću adekvatnog odgovora pacijenata na lekove prvog izbora u terapiji depresivnih poremećaja.

Konačno, može se zaključiti da rezultati ove doktorske disertacije promovišu oksitocin kao potencijalni dodatni tretman uz antidepresivnu terapiju kod pacijenata koji pate od nekog od depresivnih poremećaja praćenog hronično povišenim nivoom glukokortikoida.

## **7. LITERATURA**

- Akman, T., Akman, L., Erbas, O., Terek, M.C., Taskiran, D., Ozsaran, A., 2015. The preventive effect of oxytocin to cisplatin-induced neurotoxicity: An experimental rat model. *BioMed. Res. Internat.* 2015, 1-5.
- Aljanabi, S., Al-Laham, S., Ekhtiar, A., 2013. Radioprotective effect of oxytocin pretreatment in rats. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6, 82-86.
- Amara, S.G., Sonders, M.S., Zahniser, N.R., Povlock, S.L., Daniels G.M., 1998. Molecular physiology and regulation of catecholamine transporters. *Adv. Pharmacol.* 42, 164-168.
- Amir, R.E., Van den Veyer, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y., 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188.
- Amri, E.Z., Pisani, D.F., 2016. Control of bone and fat mass by oxytocin. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 28, 95-104.
- Anagnostis, P., Athyros, V., Tziomalos, K., Karagiannis, A., Mikhailidis, D., 2009. Clinical review: the pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2692-2701.
- Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P., 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat. Res.* 307, 261-271.
- Andreyeva, A., Leshchyn'ska, I., Knepper, M., Betzel, C., Redecke, L., Sytnyk, V. et al., 2010. CHL1 is a selective organizer of the presynaptic machinery chaperoning the SNARE complex *PLoS One.* 5, 12018.
- Ang, V.T., Jenkins, J.S., 1984. Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58, 688-691.

- Ardayfio, P., Kim, K., 2006. Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light—dark emergence task in mice. *Behav. Neurosci.* 120, 249—256.
- Arletti, R., Benelli, A., Bertolini, A., 1990. Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol. Behav.* 48, 825–830.
- Arletti, R., Bertolini, A., 1987. Oxytocin acts as an antidepressant in two animals models of depression. *Life Sci.* 41, 1725–173.
- Arnsten, A.F., 2009. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 410–422.
- Ashok, B.T., Ahmad, J., Qadri, A., Ali, R., 1997. Anti-ROS-DNA monoclonal antibody as molecular probe for oxidative DNA damage, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43, 1219-1229.
- Aspe-Sanchez, M., Moreno, M., Rivera, M.I., Rossi, A., Ewer, J., 2016. Oxytocin and vasopressin receptor gene polymorphisms: role in social and psychiatric traits. *Front. In Neurosci.* 9, 510.
- Ayala, A., Munoz, M.F., Arguelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014, 360438.
- Bakos, J., Lestanova, Z., Strbak, V., Havranek, T., Bacova, Z., 2014. Neonatal manipulation of oxytocin prevents lipopolysaccharide-induced decrease in gene expression of growth factors in two developmental stages of the female rat. *Neuropept.* 48, 281-286.
- Bali, D., Singh, J.R., Singh, H., Sandhu, D., 1990. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. I. Hydrocortisone. *Environ. Mol. Mutagen* 16, 250-254.
- Barrientos, R., Sprunger, D.B., Campeau, S., Higgins, E.A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., et al., 2003. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation induced by

- social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neurosci.* 121, 847–853.
- Bartz, J.A., Hollander, E., 2006. The neuroscience of affiliation: Forging links between basic and clinical research on neuropeptides and social behavior. *Horm. Behav.* 50, 518-528.
- Bath, K.G., Manzano-Nieves, G., Goodwill, H., 2016. Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice. *Horm. Behav.* 82, 64-71.
- Bealer, S.L., Crowley, W.R., 1998. Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am. J. Physiol.* 274, 453-458.
- Bealer, S.L., Crowley, W.R., 2000. Neurotransmitter interaction in release of intranuclear oxytocin in magnocellular nuclei of the hypothalamus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 897, 182–191.
- Besnard, A., Sahay, A., 2016. Adult hippocampal neurogenesis, fear generalization and stress. *Neuropsychopharmacol.* 41, 24-44.
- Bessa, J.M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J.J., Palha, J.A., Almeida, O.F., Sousa, N., 2009. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol. Psych.* 14, 764-773.
- Besta, F., Massberg, S., Brand, K., Müller, E., Page, S., Grüner, S., et al., 2002. Role of  $\beta$ 3-endonexin in the regulation of NF- $\kappa$ B-dependent expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *J. Cell Sci.* 115, 3879–3888.
- Bethlehem, R.A.I., Lombardo, M.V., Lai, M.C., Auyeung, B., Crockford, S.K., Deakin, J., Soubramanian, S., et al., 2017. Intranasal oxytocin enhances intrinsic corticostriatal functional connectivity in women. *Transl. psych.* doi:10.1038/tp.2017.72.
- Bjorkstrand E., Uvnas-Moberg K., 1996. Central oxytocin increases food intake and daily weight gain in rats. *Physiol. Behav.* 59, 947-952.

- Bodanszky, M., Sharaf, H., Roy, J.B., Said, S.I., 1992. Contractile activity of vasotocin, oxytocin, and vasopressin on mammalian prostate. *Eur. J. Pharmacol.* 2016, 311-313.
- Bortolotto, V., Cuccurazzu, B., Canonico, P.L., Grilli, M., 2014. NF- $\kappa$ B Mediated Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis: Relevance to Mood Disorders and Antidepressant Activity. *BioMed. Res. Int.* ID 612798.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., Soulimani, R., 2009. The antioxidant effect of plums and polyphenolic compounds against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in mouse blood granulocytes. *J. Med. Food* 12, 861-868.
- Brotto, L.A., Gorzalka, B.B., Barr, A.M., 2001. Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *Eur. J. Pharmacol.* 424, 203–209.
- Buhusi, M., Midkiff, B.R., Gates, A.M., Richter, M., Schachner, M., Maness, P.F., 2003. Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* 278, 25024–25031.
- Bullwinkel, J., Baron-Luhr, B., Ludemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., Scholzen, T., 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell Physiol.* 206, 624-635.
- Caldwell, H.K., Young, W.S., 3rd., 2006. Oxytocin and Vasopressin: Genetics and Behavioral Implications. In: Lim, R., 2006. *Neuroactive Proteins and Peptides*. Springer, New York, 573-607.
- Cameron, H.A., Gould, E., 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neurosci.* 61, 203–209.
- Campbell, A., 2010. Oxytocin and human social behavior. *Pers. Soc. Psychol. Rev.* 14, 281–295.
- Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., MacQueen, G.M., 2004. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am. J. Psych.* 161,

- 598-607.
- Carneiro, A.M., Cook, E.H., Murphy, D.L., Blakely, R.D., 2008. Interactions between integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 118, 1544–1552.
- Cattaneo, A., Gennarelli, M., Uher, R. et al., 2013. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline ‘predictors’ and longitudinal ‘targets’. *Neuropsychopharmacol.* 2013. 377–385.
- Cerqueira, J.J., Taipa, R., Uylings, H.B., Almeida, O.F., Sousa, N., 2007. Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cereb. Cortex* 17, 1998-2006.
- Chen, X., Chen, J., Gan, S., Guan, H., Zhou, Y., Ouyang, Q., Shi, J., 2013. DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control, *BMC Biol.* 11, 73.
- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 267, 1244-1252.
- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 2009. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267, 1244–1252.
- Cingolani, L.A., Goda, Y., 2008. Differential involvement of  $\beta$ 3 integrin in pre- and postsynaptic forms of adaptation to chronic activity deprivation. *Neuron. Glia Biol.* 4, 179–187.
- Ciufolini, S., Dazzan, P., Kempton, M.J., Pariante, C., Mondelli, V., 2014. HPA axis response to social stress is attenuated in schizophrenia but normal in depression: evidence from a meta-analysis of existing studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 47, 359-368.

- Claessens, S.E., Belanoff, J.K., Kanatsou, S., Lucassen, P.J., Champagne, D.L., de Kloet, E.R., 2012. Acute effects of neonatal dexamethasone treatment on proliferation and astrocyte immunoreactivity in hippocampus and corpus callosum: towards a rescue strategy. *Brain Res.* 1482, 1-12.
- Clark, S.L., Adkins, D.E., Aberg, K., Hetteema, J.M., McClay, J.L., Souza, R.P., van den Oord, E.J., 2012. Pharmacogenomic study of side-effects for antidepressant treatment options in STAR\*D. *Psychol. Med.* 42, 1151–1162.
- Coentre, R., Talina, M.C., Gois, C., Figueira, M.L., 2017. Depressive symptoms and suicidal behavior after first-episode psychosis: A comprehensive systematic review. *Psych. Res.* 253, 240-248.
- Cohen, H., Kaplan, Z., Kozlovsky, N., Gidron, Y., Matar, M.A., Zohar, J., 2010. Hippocampal microinfusion of oxytocin attenuates the behavioural response to stress by means of dynamic interplay with the glucocorticoid-catecholamine responses. *J. Neuroendocrinol.* 22, 889-904.
- Collins, A.R., 2004. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 794-800.
- Conrad, C.D., LeDoux, J.E., Magariños, A.M., McEwen, B.S., 1999. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci.* 113, 902-913.
- Conrad, C.D., McLaughlin, K.J., Harman, J.S., Foltz, C., Wiczorek, L., Lightner, E., Wright, R.L., 2007. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J. Neurosci.* 27, 8278—8285.
- Consiglio, A.R., Ramos, A.L., Henriques, J.A., Picada, J.N., 2010. DNA brain damage after stress in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 34, 652-656.
- Crowley, J.J., Lipski, R.H., Lucki, I., Berrettini, W.H., 2008. Variation in the genes encoding vesicular monoamine transporter 2 and beta-1 adrenergic receptor and antidepressant treatment outcome. *Psychiatr. Genet.* 18, 248-251.



- Crowley, W.R., Armstrong, W.E., 1992. Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocr. Rev.* 13, 33–65.
- Cubells, J.F., Kim, K.S., Baker, H., Volpe, B.T., Chung, Y., Houpt, T.A., Wessel, T.C., Joh, T.H. 1995. Differential in vivo regulation of mRNA encoding the norepinephrine transporter and tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla and locus ceruleus. *J. Neurochem.* 65, 502-509.
- Cunningham, E.T., Sawchenko, P.E., 1988. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 274, 60–76.
- Czéh, B., Lucassen, P.J., 2007. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur. Arch. Psych. Clin. Neurosci.* 257, 250–260.
- Da Silva, J., de Freitas, T.R.O., Marinho, J.R., Speit, G., Erdtmann, B., 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.* 23, 241-245.
- Demyanenko, G.P., Schachner, M., Anton, E., Schmid, R., Feng, G., Sanes, J., Maness, P.F., 2004. Close homolog of L1 modulates area-specific neuronal positioning and dendrite orientation in the cerebral cortex. *Neuron.* 44, 423–437.
- Domes, G., Heinrichs, M., Michel, A., et al., 2007. Oxytocin improves mind-reading in humans. *Biol. Psych.* 61, 731–733.
- Donner, N.C., Montoya, C.D., Lukkes, J.L., Lowry, C.A., 2012. Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology* 37, 645-661.
- Dronjak, S., Gavrilović, Lj., 2005. Activity of pituitary-adrenal axis in rats chronically exposed to different stressors. *Acta Vet. (Bel)* 55, 121-129.

- du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, C.J.M., Roberts, C.W., Katsoyannis, P.G., Gordon, S., 1953b. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4879–4880.
- du Vigneaud, V., Ressler, C., Trippett, S., 1953a. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J. Biol. Chem.* 205, 949–957.
- Duman, C.H., Duman, R.S., 2015. Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci. Lett.* 601, 20-29.
- Duman, R.S., Li, N., 2012. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 2475–2484.
- Duman, R.S., Monteggia, L.M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psych.* 59, 1116-1127.
- Dunning, B.E., Moltz, J.H., Fawcett, C.P., 1984. Modulation of insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas by the neurohypophysial hormones and by desamino-D-arginine vasopressin (DDAVP). *Peptides* 5, 871–875.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Pandey, G.N., 2006. Antidepressants reverse corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. *Neurosci.* 139, 1017-1029.
- Egeland, M., Zunszain, P.A., Pariante, C.M., 2015. Molecular mechanisms in the regulation of adult neurogenesis during stress. *Nature Rev. Neurosci.* 16, 189-200.
- Eisch, A.J., Petrik, D., 2012. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Sci.* 338, 72–75.
- Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 2004. Leaky catecholamine stores: undue waste or a stress response coping mechanism? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1018, 224-230.

- Fabbri, C., Crisafulli, C., Gurwitz, D., Stingl, J., Calati, R., Albani, D., Forloni, G., Calabro, M., et al., 2015. Neuronal cell adhesion genes and antidepressant response in three independent samples. *Pharmacogenom. J.* 15, 538-548.
- Fan, Y., Chen, P., Li, Y., Cui, K., Noel, D.M., Cummins, E.D., Brown, R.W., Zhu, M., 2014. Corticosterone administration upregulated expression of norepinephrine transporter and dopamine  $\beta$ -hydroxylase in rat locus coeruleus and its terminal regions. *J. Neurochem.* 128, 445-458.
- Febo, M., Shields, J., Ferris, C., King, J., 2009. Oxytocin modulates unconditioned fear response in lactating dams: An fMRI study. *Brain Res.* 1302, 183–193.
- Felding-Habermann, B., Silletti, S., Mei, F. et al., 1997. A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J. Cell Biol.* 139, 1567–1581.
- Fitzsimons, C.P., Herbert, J., Schouten, M., Meijer, O.C., Lucassen, P.J., Lightman, S., 2016. Circadian and ultradian glucocorticoid rhythmicity: Implications for the effects of glucocorticoids on neural stem cells and adult hippocampal neurogenesis. *Front. Neuroendocrinol.* 41, 44-58.
- Flint, M.S., Baum, A., Chambers, W.H., Jenkins, F.J., 2007. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinol.* 32, 470-479.
- Gay, C.A., Gebicki, J.M., 2003. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylene orange method. *Analytical Biochem.* 315, 29-35.
- Geenen, V., Legros, J.J., Franchimont, P., Baudrihaye, M., Defresne, M.P., Boniver, J., 1986. The neuroendocrine thymus: coexistence of oxytocin and neurophysin in the human thymus. *Science* 232, 508–511.
- Gelenberg, A.J., 2010. A review of the current guidelines for depression treatment. *J. Clin. Psych.* 71, 15.

- Gimpl, G., 2008. Oxytocin receptor ligands: a survey of the patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 18, 1239–1251.
- Gimpl, G., Fahrenholz, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation, *Physiol. Rev.* 81, 629-683.
- Gold, P.W., 2014. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol. Psych.* 20, 32-47.
- Gold, P.W., Goodwin, F.K., Chrousos, G.P., 1988. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). *N. Engl. J. Med.* 31, 348–353.
- Golimbet, V., Alfimova, M., Abramova, L., Kaleda, V., Gritsenko, I., 2015. Arginine vasopressin 1a receptor RS3 promoter microsatellites in schizophrenia: a study of the effect of the “risk” allele on clinical symptoms and facial affect recognition. *Psych. Res.* 225, 739–740.
- Gonzales-Reyes, A., Menaouar, A., Yip, D., Danalache, B., Plante, E., Noiseux, N., Gutkowska, J., Jankowski, M., 2015. Molecular mechanisms underlying oxytocin-induced cardiomyocyte protection from stimulated ischemia-reperfusion. *Mol. Cell Endocrinol.* 412, 170-181.
- Gordon, I., Zagoory-Sharon, O., Schneiderman, I., et al., 2008. Oxytocin and cortisol in romantically unattached young adults: associations with bonding and psychological distress. *Psychophysiol.* 45, 349–352.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A., Fuchs, E., 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17, 2492–2498.
- Gourley, S.L., Taylor, J.R., 2009. *Recapitulation and Reversal of a Persistent Depression-like Syndrome in Rodents*. John Wiley & Sons, Inc..
- Graeff, F.G., 2007. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 29, 3-6.

- Gray, J.D., Milner, T.A., McEwen, B.S., 2013. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neurosci.* 239, 214–227.
- Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., Kalynchuk, L.E., 2005. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain res.* 156, 105-114.
- Grewen, K.M., Light, K.C., 2011. Plasma oxytocin is related to lower cardiovascular and sympathetic reactivity to stress. *Biol. Psychol.* 87, 340-349.
- Grippe, A.J., Trahanas, D.M., Zimmerman II, R.R., Porges, S.W., Carter, C.S., 2009. Oxytocin protects against negative behavioral and autonomic consequences of long-term social isolation. *Psychoneuroendocrinol.* 34, 1542-1553.
- Gupta, D., Radhakrishnan, M., Kurhe, Y., 2015. Effect of a novel 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist 4i, in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. *Steroids* 96, 95-102.
- Guzman, Y.F., Tronson, N.C., Sato, K., Mesic, I., Guedea, A.L., Nishimori, K., Radulovic, J., 2014. Role of oxytocin receptors in modulation of fear by social memory. *Psychopharmacol.* 231, 2097-2105.
- Hanson, N.D., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2011. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacol.* 36, 2589–2602.
- Heinrichs, M., Domes, G., 2008. Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. *Prog. Brain Res.* 170, 337–350.
- Henry, J.P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M.F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie, J., Gasnier, B., 1994. Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J. Exp. Biol.* 196, 251–262.

- Herbison, A.E., Voisin, D.L., Douglas, A.J., Chapman, C., 1997. Profile of monoamine and excitatory amino acid release in rat supraoptic nucleus over parturition. *Endocrinol.* 138, 33-40.
- Herisson, F.M., Waas, J.R., Fredriksson, R., Schioth, H.B., Levine, A.S., Olszewski, P.K., 2016. Oxytocin Acting in the Nucleus Accumbens Core Decreases Food Intake. *J. Neuroendocrinol.* 28, 3-12.
- Hill, M.N., Brotto, L.A., Lee, T.T., Gorzalka, B.B., 2003. Corticosterone attenuates the antidepressant-like effects elicited by melatonin in the forced swim test in both male and female rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 27, 905–911.
- Hoffman, B.J., Hansson, S.R., Mezey, E., Palkovits, M., 1998. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front. Neuroendocrinol.* 19, 187-231.
- Houshmand, F., Faghihi, M., Zahediasl, S., 2015. Role of atrial natriuretic Peptide in oxytocin induced cardioprotection, *Heart Lung Circ.* 24, 86-93.
- Hu, J.J., Dubin, N., Kurland, D., Ma, B.L., Roush, G.C., 1995. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities, *Mutat. Res.* 336, 193-201.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677-736.
- Huot, R.L., Thirivikraman, K.V., Meaney, M.J., Plotsky, P.M., 2001. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacol.* 158, 366-373.
- Imani, A., Khansari, M., Azizi, Y., Rakhshan, K., Faghihi, M., 2015. Stimulation of oxytocin receptor during early reperfusion period protects the heart against ischemia/reperfusion injury: the role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, nitric oxide, and prostaglandins, *Acta Med. Iran.* 53, 491-500.

- Insel, T.R., Young, I.S., 2001. The neurobiology of attachment. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 129-136.
- Iseri, S.O., Gedik, I.E., Erzik, C., Uslu, B., Arbak, S., Gedik, N., Yegen, B.C., 2008. Oxytocin ameliorates skin damage and oxidant gastric injury in rats with thermal trauma, *Burns* 34, 361-369.
- Iseri, S.O., Sener, G., Saglam, B., Gedik, N., Ercan, F., Yegen, B.C., 2005. Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils, *J. Surg. Res.* 126, 73-81.
- Ivell, R., Richter, D., 1984a. Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 2006–2010.
- Ivell, R., Richter, D., 1984b. The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. *EMBO J.* 3, 2351–2354.
- Jacob, S., Brune, C.W., Carter, C.S., Leventhal, B.L., Lord, C., Cook, E.H.J., 2007. Association of the oxytocin receptor gene (OXTR) in Caucasian children and adolescents with autism. *Neurosci. Lett.* 417, 6–9.
- Jankowski M., Hajjar F., Kawas S.A., Mukaddam-Daher S., Hoffman G., McCann S.M., Gutkowska J., 1998. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14558-14563.
- Ji, H., Su, W., Zhou, R., Feng, J., Lin, Y., Zhang, Y., et al., 2016. Intranasal oxytocin administration improves depression-like behaviors in adult rats that experienced neonatal maternal deprivation. *Behav. Pharmacol.* 27, 689-696.
- Johnson, S.A., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E., 2006. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav. Brain Res.* 168, 280-288.
- Jovanović, P., Spasojević, N., Stefanović, B., Božović, N., Jasnić, N., Djordjević, J., Dronjak, S., 2014. Peripheral oxytocin treatment affects the rat adreno-medullary

- catecholamine content modulating expression of vesicular monoamine transporter 2. *Peptides* 51, 110-114.
- Jovanović, P., Stefanović, B., Spasojević, N., Puškaš, N., Dronjak, S., 2016. Effects of oxytocin on adreno-medullary catecholamine synthesis, uptake and storage in rats exposed to chronic isolation stress. *Endocr. Res.* 41, 124-131.
- Jukić, M.M., Opel, N., Storm, J., Carrillo-Roa, T., Miksys, S., Novalen, M., et al., 2016. Elevated CYP2C19 expression is associated with depressive symptoms and hippocampal homeostasis impairment. *Mol. Psych.* doi: 10.1038/mp.2016.204.
- Kalynchuk, L.E., Gregus, A., Boudreau, D., Perrot-Sinal, T.S., 2004. Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor- induced defensive behavior, in male and female rats. *Behav. Neurosci.* 118, 1365–1377.
- Kanner, B.I., Schuldiner, S., 1987. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 1–38.
- Karatsoreos, I.N., Bhagat, S.M., Bowles, N.P., Weil, Z.M., Pfaff, D.W., McEwen, B.S., 2010. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinol.* 151, 2117-2127.
- Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., La Harpe, R., 2005. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of ante- mortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 136, 29–37.
- Kempermann, G., 2012. New neurons for ‘survival of the fittest’. *Nature Rev. Neurosci.* 13, 727–736.
- Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M.J., Okayama, H., 1992. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature.* 356, 526–529.
- Kippenberger, A.G., palmer, D.J., Comer, A.M., Lipski, J., Burton, L.D., Christie, D.L., 1999. Localization of the noradrenaline transporter in rat adrenal medulla and PC12 cells: evidence for its association with secretory granules in PC12 cells. *J. Neurochem.* 73, 1024-1032.



- Kirchheiner, J., Nickchen, K., Bauer, M. et al., 2004. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol. Psych.* 9, 442–473.
- Kirsh, P., Esslinger, C., Chen, Q., Mier, D., Lis, S., Siddhanti, S., et al., 2005. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J. Neurosci.* 7, 11489-11493.
- Klenerova, V., Krejci, I., Sida, P., Hlinak, Z., Hynie, S., 2009. Modulatory effects of oxytocin and carbetocin on stress-induced changes in rat behavior in the open-field. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 57–62.
- Knafo, A., Israel, S., Darvasi, A., Bachner-Melman, R., Uzefovsky, F., Cohen, L., et al., 2008. Individual differences in allocation of funds in the dictator game associated with length of the arginine vasopressin 1a receptor RS3 promoter region and correlation between RS3 length and hippocampal mRNA. *Genes Brain Behav.* 7, 266–275.
- Kocabas, N.A., Antonijević, I., Faghel, C., Forray, C., Kasper, S., Lecrubier, Y., Linotte, S., Massat, I., Mendlewicz, J., Noro, M., et al., 2011. Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms: influence on treatment response phenotypes of major depressive disorder. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 26, 1-10.
- Koroglu, P., Erkanli Senturk, G., Yucel, D., Bingol Ozakpinar, O., Uras, F., Arbak, S., 2015. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes, *Peptides.* 63, 47-54.
- Kramer, K.M., Choe, C., Carter, C.S., Cushing, B.S., 2006. Developmental effects of oxytocin on neural activation and neuropeptide release in response to social stimuli. *Horm. Behav.*, 49, 206-214.
- Kumai, T., Asoh, K., Tateishi, T., Tanaka, M., Watanabe, M, Shimizu, H., Kobavashi, S., 2000. Involvement of tyrosine hydroxylase up regulation in dexamethasone-induced hypertension of rats. *Life Sci.* 67, 1993-1999.
- Kumamaru, E., Numakawa, T., Adachi, N., Yagasaki, Y., Izumi, A., Niyaz, M., Kudo, M.,

- Kunugi, H., 2008. Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. *Mol. Endocrinol.* 22, 546–558.
- Kushwah, N., Jain, V., Deep, S., Prasad, D., Singh, S.B., Khan, N., 2016. Neuroprotective Role of Intermittent Hypobaric Hypoxia in Unpredictable Chronic Mild Stress Induced Depression in Rats. *PLoS One.* 11, e0149309.
- Kvetnansky, R., Mikulaj, L., 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinol.* 87, 738-743.
- Kvetnansky, R., Novak, P., Vargovic, P., Lejavova, K., Horvathova, L., Ondicova, K., Manz, G., Filipcik, P., Novak, M., Mravec, B., 2016. Exaggerated phosphorylation of brain tau protein in CRH KO mice exposed to repeated immobilization stress. *Stress.* 19, 395-405.
- Landgraf, R., Neumann, I.D., 2004. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front. Neuroendocrinol.* 25, 150–176.
- Lee, H.J., Macbeth, A.H., Pagani, J., Young, W.S., 2009. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog. Neurobiol.* 88, 127-151.
- Lee, P.R., Brady, D.L., Shapiro, R.A., Dorsa, D.M., Koenig, J.I., 2005. Social interaction deficits caused by chronic phencyclidine administration are reversed by oxytocin. *Neuropsychopharmacol.* 30, 1883–1894.
- Lee, P.R., Brady, D.L., Shapiro, R.A., Dorsa, D.M., Koenig, J.I., 2007. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res.* 1156, 152–167.
- Lee, R.S., Tamashiro, K.L.K., Yang, X., Purcell, R.H., Harvey, A., Willour, V.L., Huo, Y., Rongione, M., Wand, G.S., Potash, J.B., 2010. Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinol.* 151, 4332—4343.

- Legros, J.J., and Ansseau, M., 1992. Neurohypophyseal peptides and psychopathology, in: Swaab D.E., Hofman, M.A., Mir-miran, M., Ravid, R., van Leuven, K.W. (Eds.), Prog. Brain Res. Vol. 93. Elsevier. Amsterdam. 455-461.
- Levine, A., Zagoory-Sharon, O., Feldman, R., et al., 2007. Oxytocin during pregnancy and early postpartum: individual patterns and maternal-fetal attachment. *Peptides* 28, 1162–1169.
- Li, X., Schwartz, P., Rissman, E., 1997. Distribution of estrogen receptor-beta-like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinol.* 66, 63–67.
- Li, Y., Han, F., Shi, Y., 2015. Changes in integrin  $\alpha$ v, vinculin and connexin43 in the medial prefrontal cortex in rats under single-prolonged stress. *Mol. Med. Rep.* 11, 2520–2526.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E., 2004 .Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 21, 991–1007.
- Lieberwirth, C., Wang, Z., 2014. Social bonding: regulation by neuropeptides. *Front. Neurosci.* 8, 171.
- Lingen, B., Bruss, m., Bonisch, H., 1994. Cloning and expression of the bovine sodium- and chloride-dependent noradrenaline transporter. *FEBS Lett.* 342, 235-238.
- Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M.K., Yeo, H.C., Mori, A., Ames, B.N., 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *Faseb. J.* 10, 1532-1538.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorang, D., Amara, S.G., Simerly, R.B., 1994. Cell-type-specific expression of catecholamine transporters in the rat brain. *J. Neurosci.* 14, 4903-4914.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- Lucki, I., 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psych.* 44, 151-162.
- Ludwig, M., Leng, G., 2006. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 126–136.
- Magariños, A.M., McEwen, B.S., 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neurosci.* 69, 89-98.
- Mahar, I., Bambico, F.R., Mechawar, N., Nobrega, J.N., 2013. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 38, 173–192.
- Manning, M., Cheng, L.L., Klis, W.A., Stoev, S., Przybzliski, J., Bankowski, K., Sawyer, W.H., Barberis, C., Chan, W.Y., 1995. Advances in the design of selective antagonists, potential tocolytics, and radioiodinated ligands for oxytocin receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 395, 559-583.
- Marazziti, D., Baroni, S., Giannaccini, G., Betti, L., Massimetti, G., Carmassi, C., CatenadellOrso, M., 2012. A link between oxytocin and serotonin in humans: supporting evidence from peripheral markers. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 22, 578-583.
- Markin, B., Froemke, R., 2017. Oxytocin modulation of neural circuits for social behavior. *Dev. Neurobiol.* 77, 169-189.
- Mastaloudis, A., Yu, T.W., O'Donnell, R.P., Frei, B., Dashwood, R.H., Traber, M.G., 2004. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 966-975.
- Mastorakos, G., Chrousos, G.P., Weber, J.S., 1993. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1690-1694.
- Matrisciano, F., Busceti, C.L., Bucci, D., Caruso, A., Molinaro, G., Cappuccio, I., Rizzo, B., Gradini, R., et al., 2011. Induction of the Wnt antagonist Dickkopf-1 is involved

- in stress-induced hippocampal damage. *PLoS ONE*. 6, 16447.
- McCarthy, M.M., McDonald, C.h., Brooks, P.J., Goldman, D., 1996. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol. Behav.*, 60, 1209-1215.
- McEwen B.S., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 87, 873-904.
- McGaugh, J.L., 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 1–28.
- McIntosh, L.J., Sapolsky, R.M., 1996. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture, *Exp. Neurol.* 141, 201-206.
- McNeilly, A.S., 1972. The blood levels of oxytocin during suckling and hand-milking in the goat with some observations on the pattern of hormone release. *J. Endocrinol.* 52, 177-188.
- McQuaid, R.J., McInnis, O.A., Abizad, A., Anisman, H., 2014. Making room for oxytocin in understanding depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 45, 305-322.
- Meisenberg, G., 1981. Short-term behavioral effects of neurohypophyseal peptides in mice. *Peptides*, 2, 1-8.
- Meyer-Lindenberg, A., Domes, G., Kirsch, P., et al., 2011. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 524–538.
- Michelsen, K.A., van den Hove, D.L., Schmitz, C., Segers, O., Prickaerts, J., Steinbusch, H.W., 2007. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex. *BMC Neurosci.* 8, 107.
- Mirescu, C., Gould, E., 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16, 233–238.

- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
- Morag, A., Kirchheiner, J., Rehavi, M., Gurwitz, D., 2010. Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenom.* 11, 327-340.
- Morag, A., Pasmanik-Chor, M., Oron-Karni, V., Rehavi, M., Stingl, J.C., Gurwitz, D., 2011. Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies CHL1 as a putative SSRI antidepressant response biomarker. *Pharmacogenom.* 12, 171-184.
- Morellini, F., Lepsveridze, E., Kahler, B., Dityatev, A., Schachner, M., 2007. Reduced reactivity to novelty, impaired social behavior, and enhanced basal synaptic excitatory activity in perforant path projections to the dentate gyrus in young adult mice deficient in the neural cell adhesion molecule CHL1. *Mol. Cell Neurosci.* 34, 121-136.
- Mottolese, R., Redoute, J., Costes, N., Le Bars, D., Sirigu, A., 2014. Switching brain serotonin with oxytocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8637-8642.
- Murray, F., Smith, D.W., Hutson, P.H., 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 115-127.
- Myers, A.J., Williams, L., Gatt, J.M., McAuley-Clark, E.Z., Dobson-Stone, C., Schofield, P.R., Nemeroff, C.B., 2014. Variation in the oxytocin receptor gene is associated with increased risk for anxiety, stress and depression in individuals with a history of exposure to early life stress. *J. Psych. Res.* 59, 93-100.
- Nakajima, M., Gorlich, A., Heintz, N., 2014. Oxytocin modulates female sociosexual behavior through a specific class of prefrontal cortical interneurons. *Cell* 159, 295-305.
- Naughton, M., Dinan, T.G., Scott, L.V., 2014. Corticotropin-releasing hormone and the

- hypothalamic-pituitary-adrenal axis in psychiatric disease. *Handb. Clin. Neurol.* 124, 69-91.
- Neumann, I.D., 2002. Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog. Brain Res.* 139, 147-162.
- Neumann, I.D., 2008. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J. Neuroendocrinol.* 20, 858-865.
- Neumann, I.D., Maloumy, R., Beiderbeck, D.I., Lucas, M., Landgraf, R., 2013. Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice. *Psychoneuroendocrinol.* 38, 1985-1993.
- Neumann, I.D., Torner, L., Wigger, A., 2000b. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neurosci.* 95, 567–575.
- Neumann, I.D., Wigger, A., Torner, L., Holsboer, F., Landgraf, R., 2000a. Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitaryadrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12, 235–243.
- Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R.S., 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.* 15, 7539–7547.
- Nibuya, M., Takahashi, M., Russel, D.S., Duman, R.S., 1999. Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 267, 81–84.
- Noorlander, C.W., Tijsseling, D., Hessel, E.V., de Vries, W.B., Derks, J.B., Visser, G.H., de Graan, P.N., 2014. Antenatal glucocorticoid treatment affects hippocampal development in mice. *PLoS One.* 9, 85671.
- Norman, G.J., Hawkey, L., Luhmann, M., Ball, A.B., Cole, S.W., Berntson, G.C., et al., 2012. Variation in the oxytocin receptor gene influences neurocardiac reactivity to

- social stress and HPA function: a population based study. *Horm. Behav.* 61, 134-139.
- Nussey, S.S., Prysor-Jones, R.A., Taylor, A., Ang, V.T., Jenkins, J.S., 1987. Arginine vasopressin and oxytocin in the bovine adrenal gland. *J. Endocrinol.* 115, 141-149.
- Onaka, T., Ikeda, K., Yamashita, T., Honda, K., 2003. Facilitative role of endogenous oxytocin in noradrenaline release in the rat supraoptic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3018-3026.
- Orzechowski, A., Ostaszewski, P., Wilczak, J., Jank, M., Balasinska, B., Wareski, P., Fuller Jr., J., 2002. Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 49, 256-263.
- Ostrowski, N.L., 1998. Oxytocin receptor mRNA expression in rat brain: implications for behavioral integration and reproductive success. *Psychoneuroendocrinol.* 23, 989-1004.
- Ott, I., Scott, J.C., 1910. The Action of Infundibulum upon Mammary Secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 8, 48-49.
- Oved, K., Morag, A., Pasmanik-Chor, M., Oron-Karni, V., Shomron, N., Rehavi, M., Stingl, J.C., Gurwitz, D., 2012. Genome-wide miRNA expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies tentative SSRI antidepressant response biomarkers. *Pharmacogenom.* 13, 1129-1139.
- Oved, K., Morag, A., Pasmanik-Chor, M., Rehavi, M., Shomron, N., Gurwitz, D., 2013. Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines implicates integrin beta-3 in the mode of action of antidepressants. *Transl. Psych.* 3, 313.
- Paczkowski, F.A., Bryan-Lluka, L.J., Porzgen, P., Bruss, M., Bonisch, H., 1999. Comparison of the pharmacological properties of cloned rat, human, and bovine norepinephrine transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290, 761-767.



- Pariante, C.M., Lightman, S.L., 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.* 31, 464-468.
- Parker, K.J., Buckmaster, C.L., Schatzberg, A.F., Lyons, D.M., 2005. Intranasal oxytocin administration attenuates the ACTH stress response in monkeys. *Psychoneuroendocrinol.* 30, 924–929.
- Pau, K.Y., Ma, Y.J., Yu, J.H., Yang, S.P., Airhart, N., Spies, H.G., 1997. Topographic comparison of the expression of norepinephrine transporter, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y mRNA in association with dopamine beta-hydroxylase neurons in the rabbit brainstem. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48, 367-381.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149—167.
- Perry, A., Bentin, S., Shalev, I., Israel, S., Uzefovsky, F., Bar-on, D., Ebstein, R.P., 2010. Intranasal oxytocin modulates EEG mu/alpha and beta rhythms during perception of biological motion. *Psychoneuroendocrinol.* 35, 1446-1453.
- Persson, A., Sim, S.C., Viriding, S., Onishchenko, N., Schulte, G., Ingelman-Sundberg, M., 2014. Decreased hippocampal volume and increased anxiety in a transgenic mouse model expressing the human CYP2C19 gene. *Molec. Psych.* 19, 733-741.
- Petty, M.A., Lang, R.E., Unger, T., Ganten, D., 1985. The cardiovascular effects of oxytocin in conscious male rats. *Eur. J. Pharmacol.* 112, 203–210.
- Phillips, J.K., Dubey, R., Sesiashvilvi, E., Takeda, M., Christie, D.L., Lipsli, J., 2001. Differential expression of the noradrenaline transporter in adrenergic chromaffin cells, ganglion cells and nerve fibers of the rat adrenal medulla. *J. Chem. Neuroan.* 21, 95-104.
- Pickering, B.T., Birkett, S.D., Guldenaar, S.E., Nicholson, H.D., Worley, R.T., Yavachev, L., 1989. Oxytocin in the testis: what, where, and why? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 564, 198-209.

- Pittenger, C., Duman, R.S., 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacol.* 33, 88–109.
- Plećaš, B., Hristić, M., Jovović, D., Popović, A., 1990. The response of rat adrenal zona fasciculate and reticularis to oxytocin treatment. *Exp. Clin. Endocrinol.* 95, 192-196.
- Plećaš, B., Ugrešić N., Hristić, M., Popović A., Jovović D., 1989. The response of rat adrenal medulla to oxytocin. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 97, 303-308.
- Plomin, R., DeFries, J.C., Knopik, V.S., Neiderhiser, J.M., 2008. *Behavioral Genetics*, 5th Edn. New York, N.Y., Worth Publishers.
- Porsolt, R.D., Brossard, G., Hautbois, C., Roux, S., 2001. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 8:Unit 8 10A.
- Powell, S.B., Zhou, X., Geyer, M.A., 2009. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Brain.* 204, 282–294.
- Pozo, K., Cingolani, L.A., Bassani, S., Laurent, F., Passafaro, M., Goda, Y., 2012.  $\beta 3$  integrin interacts directly with GluA2 AMPA receptor subunit and regulates AMPA receptor expression in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1323–1328.
- Price, L.H., Charney, D.S., Delgado, P.L., Heninger, G.R., 1990. Lithium and serotonin function: implications for the serotonin hypothesis of depression. *Psychopharmacol. (Berl)* 100, 3–12.
- Probst-Schendzielorz, K., Scholl, C., Efimkina, O., Ersfeld, E., Viviani, R., Serreti, A., Fabbri, C., Gurwitz, D., Lucae, S., et al., 2015. CHL1, ITGB3 and SLC6A4 gene expression and antidepressant drug response: results from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) study. *Pharmacogenom.* 16, 689-701.

- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. pharmacol.* 463, 3-33.
- Radley, J.J., Rocher, A.B., Janssen, W.G., Hof, P.R., McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2005. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp. Neurol.* 196, 199-203.
- Rash, J.A., Campbell, T.S., 2014. The effect of intranasal oxytocin administration on acute cold pressor pain: a placebo-controlled, double-blind, within-participants crossover investigation. *Psychosom. Med.* 76, 422-429.
- Rasmussen, A., Shi, L., Duman, R.S., 2002. Down-regulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacol.* 27, 133-142.
- Ratajczak, P., WoŹniak, A., Nowakowska, E., 2013. Animal models of schizophrenia: developmental preparation i nrats. *Acta Neurobiol. Exp.* 73, 472-484.
- Roberge, C., Carpentier, A.C., Langlois, M.F., Baillargeon, J.P., Ardilouze, J.L., Maheux, P., Gallo-Payet, N., 2007. Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, 1465-1478-
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Elenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psych.* 7, 609-616.
- Rodgers, R.J., 1997. Animal models of "anxiety": where next? *Behav. Pharmacol.* 8, 477-504.
- Rodrigues, S.M., Saslow, L.R., Garcia, N., John, O.P., Keltner, D., 2009. Oxytocin receptor genetic variation relates to empathy and stress reactivity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21437-21441.
- Roy, M.D., 2007. Approach for assessing total cellular DNA damage, *Biotechniq.* 42, 425-429.

- Rubin, R.T., Poland, R.E., Lesser, I.M., Martin, D.J., 1987. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression--IV. Pituitary-thyroid axis activity in patients and matched control subjects. *Psychoneuroendocrinol.* 12, 333-347.
- Sala, M., Braidà, D., Lentini, D., Busnelli, M., Bulgheroni, E., Capurro, V., et al., 2015. Pharmacologic rescue of impaired cognitive flexibility, social deficits, increased aggression, and seizure susceptibility in oxytocin receptor null mice: a neurobehavioral model of autism. *Biol. Psych.* 69, 875–882.
- Sánchez-Vidaña, D.I., Chan, N.M., Chan, A.H., Hui, K.K., Lee, S., Chan, H.Y., Law, Y.S., Sze, M.Y., Tsui, W.C., Fung, T.K., Lau, B.W., Lai, C.Y., 2016. Repeated treatment with oxytocin promotes hippocampal cell proliferation, dendritic maturation and affects socio-emotional behavior. *Neurosci.* 333, 65-77.
- Santana, M.M., Rosmaninho-Salgado, J., Cortez, V., Pereira, F.C., Kaster, M.P., Aveleira, C.A., Ferreira, M., Rita Alvaro, A., Cavadas, C., 2015. Impaired adrenal medullary function in a mouse model of depression induced by unpredictable chronic stress. *Eur. Neuropsychopharm.* 25, 1753-1766.
- Santana, P., Akana, S.F., Hanson, E.S., Strack, A.M., Sebastian, R.J., Dallman, M.F., 1995. Aldosterone and dexamethasone both stimulate energy acquisition whereas only the glucocorticoid alters energy storage. *Endocrinol.* 136, 2214-2222.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1983. Corticosterone receptors decline in a site-specific manner in the aged rat brain. *Brain Res.* 289, 235-240.
- Scantamburlo, G., Hansenne, M., Geenen, V., Legros, J.J., Anseau, M., 2015. Additional intranasal oxytocin to escitalopram improves depressive symptoms in resistant depression: an open trial. *Eur. Psych.* 30, 65-68.
- Schafer, E.A., Mackenzie, K., 1911. The action of animal extracts on milk secretion. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Containing Papers of a Biological Character* 84, 16–22.

- Schlatter, M.C., Buhusi, M., Wright, A.G., Maness, P.F., 2008. CHL1 promotes Sema3A-induced growth cone collapse and neurite elaboration through a motif required for recruitment of ERM proteins to the plasma membrane. *J. Neurochem.* 104, 731–744.
- Schmidt, H.D., Duman, R.S., 2007. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav. Pharmacol.* 18, 391–418.
- Schoenfeld, T.J., Gould, E., 2012. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp. Neurol.* 233, 12–21.
- Scholzen T, Gerdes J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* 182, 311-322.
- Scordalakes, E.M., Yue, C., Gainer, H., 2008. Experimental approaches for the study of oxytocin and vasopressin gene expression in the central nervous system. *Prog. Brain Res.* 170, 43-51.
- Sharara-Chami, R.I., Joachim, M., Pacak, K., Majzoub, J.A., 2010. Glucocorticoid treatment – effect on adrenal medullary catecholamine production. *Shock.* 33, 213-217.
- Sheline, Y.I., 1996. Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol. Psych.* 1, 298-2999.
- Sheline, Y.I., Gado, M.H., Kraemer, H.C., 2003. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am. J. Psych.* 160, 1516-1518.
- Sheline, Y.I., Sanghavi, M., Mintun, M.A., Gado, M.H., 1999. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J. Neurosci.* 19, 5034-5043.
- Shepherd, S.P., Holzwarth, M.A., 2001. Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, 61-71.

- Silverman, M.N., Pearce, B.D., Biron, C.A., Miller, A.H., 2005. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol.* 18, 41-78.
- Singh N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Singh, H., Singh, J.R., Dhillon, V.S., Bali, D., Paul, H., 1994. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. II. Dexamethasone. *Mutat. Res.* 308, 89-97.
- Singh, N.P., 2005. Apoptosis assessment by the DNA diffusion assay. *Methods Mol. Med.* 111, 55-67.
- Smith, M.A., Makino, S., Kventnansky, R., Post, R.M., 1995. Stress alters the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA in the hippocampus. *J. Neurosci.* 15, 1768-1777.
- Snyder, J.S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., Cameron, H.A., 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476, 458–461.
- Sopić, M., Bogavac-Stanojević, N., Baralić, I., Kotur-Stevuljević, J., Đorđević, B., Stefanović, A., Jelić-Ivanović, Z., 2014. Effects of short- and long-term physical activity on DNA stability and oxidative stress status in young soccer players. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 54, 354-361.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vila, C., et al., 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.* 153, 1219-1227.
- Spiers, G., Chen, H.J., Sernia, C., Lavidis, N.A., 2014. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Front. Neuro-sci.* 8, 456.

- Stachowiak, A., Macchi, C., Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K., 1995. Effects of oxytocin on the function and morphology of the rat adrenal cortex: in vitro and in vivo investigations. *Res. Exp. Med. (Berl)*. 195, 265-274.
- Stephoe, A., Hamer, M., Chida, Y., 2007. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun*. 21, 901–912.
- Stern Y., Kalynchuk, L.E., 2010. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. *Progr. Neuro-Psychopharm. Biol. Psych*. 34, 777-790.
- Surget, A., Tanti, A., Leonardo, E.D., Laugeray, A., Rainer, Q., Touma, C., Griebel, G., Ibarguen-Vaegas, Y., et al., 2011. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol. Psych*. 16, 1177–1188.
- Suri, D., Vaidya, V.A., 2013. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neurosci*. 239, 196–213.
- Svanidze, M., Bukiya, N., Butskhrikidze, M., 2012. Effect of oxytocin on the emotional state and behavior of rats under stress conditions. *Neurophysiol*. 43, 422-425.
- Szemerédi, K., Bagdy, G., Stull, R., Calogero, A.E., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 1988. Sympathoadrenomedullary inhibition by chronic glucocorticoid treatment in conscious rats. *Endocrinol*. 123, 2585-2590.
- Szeto, A., Nation, D.A., Mendez, A.J., Dominguez-Bendala, J., Brooks, L.G., Schneiderman, N., McCabe P.M., 2008. Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 295, 1495-1501.
- Tanapat, P., Hastings, N.B., Rydel, T.A., Galea, L.A.M., Gould, E., 2001. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J. Comp. Neurol*. 437, 496–504.

- Theodoridou, A., Rowe, A.C., Penton-Voak, I.S., et al., 2009. Oxytocin and social perception: oxytocin increases perceived facial trustworthiness and attractiveness. *Horm. Behav.* 56, 128–132.
- Thomas, R.M., Peterson, D.A., 2008. Even neural stem cells get the blues: evidence for a molecular link between modulation of adult neurogenesis and depression. *Gene Expr.* 14, 183–193.
- Thompson, R.J., Parker, K.J., Hallmayer, J.F., Waugh, C.E., Gotlib, I.H., 2011. Oxytocin receptor gene polymorphism (rs2254298) interacts with familial risk for psychopathology to predict symptoms of depression and anxiety in adolescent girls. *Psychoneuroendocrinol.* 36, 144–147.
- Tillinger, A., Sollas, A., Serova, L.I., Kventansky, R., Sabban, E.L., 2010. Vesicular monoamine transporters (VMATs) in adrenal chromaffin cells: stress-triggered induction of VMAT2 and expression in epinephrine synthesizing cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1459-1465.
- Torbergesen, A.C., Collins, A.R., 2000. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect, *Eur. J. Nutr.* 39, 80-85.
- Tsigos, C., Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 865-871.
- Uchida, Y., Takeshita, K., Yamamoto, K., Kikuchi, R., Nakayama, T., Nomura, M., et al., 2012. Stress augments insulin resistance and prothrombotic state: role of visceral adiposederived monocyte chemoattractant protein-1. *Diabetes.* 61, 1552–1561.
- Ulrich-Lai, Y.M., Figueiredo, H.F., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Engeland, W.C., Herman, J.P., 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, 965-973.
- Uvans-Moberg, K., 1998. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotion. *Psychoneuroendocrin.* 23, 819-835.



- Vaidya, V., Marek, G.J., Aghajanian, G.A., Duman, R.S., 1997. 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated regulation of BDNF mRNA in the hippocampus and the neo-cortex. *J. Neurosci.* 17, 2785–2795.
- van Praag, H.M., Kahn, R., Asnis, G.M., Lemus, C.Z., Brown, S.L., 1987. Therapeutic indications for serotonin-potentiating compounds: a hypothesis. *Biol. Psych.* 22, 205–212.
- Vargas-Martinez, F., Uvnas-Moberg, K., Petersson, M., Agustin Olausson, H., Jimenes-Estrada, I., 2014. Neuropeptides as neuroprotective agents: oxytocin a forefront developmental player in the mammalian brain, *Prog. Neurobiol.* 123, 37-78.
- Verbalis, J.G., Dohanics, J., 1991. Vasopressin and oxytocin secretion in chronically hyposmolar rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 261, 1028–1038.
- Viero, C., Shibuya, I., Kitamura, N., Verkhatsky, A., Fujihara, H., Katoh, A., Ueta, Y., Zingg, H.H., Chvatal, A., Sykova, E. and others. 2010. REVIEW: Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci. Ther.* 16, 138-156.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J. Neurosci.* 22, 6810-6818.
- Vyas, A., Pillai, A.G., Chattarji, S., 2004. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neurosci.* 128, 667-673.
- Wakabayashi, Y., Uchida, S., Funato, H. et al., 2008. State-dependent changes in the expression levels of NCAM-140 and L1 in the peripheral blood cells of bipolar disorders, but not in the major depressive disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 32, 1199–1205.

- Walker, E., Mittal, V., Tessner, K., 2008. Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 4, 189-216.
- Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 588, 341-345.
- Waterhouse, E.G., An, J.J., Orefice, L.L., Baydyuk, M., Liao, G.Y., Zheng, K., Lu, B., Xu, B., 2012. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J. Neurosci.* 32, 14318–14330.
- Weihe, E., Schafer, M.K., Erickson, J.D., Eiden, L.E., 1994. Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. *J. Mol. Neurosci.* 5, 149-164.
- Welberg, L.A., 2013. A bombshell of a finding. *Nature Rev. Neurosci.* 14, 522.
- Whyte, A., Jessen, T., Varney, S., carneiro, A.M.D., 2014. Serotonin transporter and integrin beta 3 genes interact to modulate serotonin uptake in mouse brain. *Neurochem. Int.* 73, 122-126.
- Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behaviouralneurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52, 90-110.
- Windle, R.J., Kershaw, Y.M., Shanks, N., Wood, S.A., Lightman, S.L., Ingram, C.D., 2004. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. *J. Neurosci.* 24, 2974-2982.
- Windle, R.J., Shanks, N., Lightman, S.L., Ingram, C.D., 1997. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 138, 2829-2834.
- Wong, E.Y.H., Herbert, J., 2004. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2491–

- 2498.
- Wong, Y.N., Chien, B.M., D'Mello, A.P., 1994. Analysis of corticosterone in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 661, 211-218.
- Workman, J.L., Brummelte, S., Galea, L.A., 2013. Postpartum corticosterone administration reduces dendritic complexity and increases the density of mushroom spines of hippocampal CA3 arbours in dams. *J. Neuroendocrinol.* 25, 119-130.
- Workman, J.L., Chan, M.Y., Galea, L.A., 2014. Prior high corticosterone exposure reduces activation of immature neurons in the ventral hippocampus in response to spatial and nonspatial memory. *Hippocampus* 25, 329-344.
- Wu, S., Jia, M., Ruan, Y., Liu, J., Guo, Y., Shuang, M., et al., 2005. Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population. *Biol. Psych.* 58, 74–77.
- Yamamoto, Y., Cushing, B.S., Kramer, K.M., Epperson, P.D., Hoffman, G.E., Carter, C.S., 2004. Neonatal manipulation of oxytocin alter expression of oxytocin and vasopressin immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in a gender-specific manner. *Neurosci.* 125, 947-955.
- Yan, Y., Wang, Y.L., Su, Z., Zhang, Y., Guo, S.X., Liu, A.J., et al., 2015. Effect of oxytocin on the behavioral activity in the behavioral despair depression rat model. *Neuropeptides.* 48, 83–89.
- Yin, X., Guven, N., Dietis, N., 2016. Stress-based animal models of depression: Do we actually know what we are doing? *Brain Res.* 1652, 30-42.
- Young, E.A., Lopez, J.F., Murphy-Weinberg, V., Watson, S.J., Akil, H., 2000. Hormonal evidence for altered responsiveness to social stress in major depression. *Neuropsychopharmacol.* 23, 411-418.
- Young, L., Nilsen, R., Waymire, K., MacGregor, G., 1999. Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole. *Nature.*

400, 1998–2000.

- Young, W.S. 3<sup>rd</sup>, Gainer, H., 2003. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinol.* 78, 185-203.
- Zafir, A., Banu, N., 2009. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress.* 12, 167-177.
- Zhao, Y., Ma, R., Shen, J., Su, H., Xing, D., Du, L., 2008. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur. J. Pharmacol.* 58, 113-120.
- Zheng, J., Babygirija, R., Bulbul, M., Cerjak, D., Ludwig, K., Takahashi, T., 2009. Hypothalamic oxytocin mediates adaptation mechanism against chronic stress in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, 946-953.
- Zhu, L., Onaka, T., 2002. Involvement of medullary A2 noradrenergic neurons in the activation of oxytocin neurons after conditioned fear stimuli. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2186-2198.

## **8. BIOGRAFIJA**

Diplomirani farmaceut Dušanka Stanić rođ. Zogović, rođena je 9.9.1983. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Nosioc je diplome "Vuk Stefanović Karadžić". Školske 2002/2003. godine upisala je integrisane akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu koje je završila 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.29 i time stekla zvanje diplomiranog farmaceuta. Državni ispit položila je u aprilu 2010. godine. Doktorske akademske studije, modul Farmakologija, upisala je školske 2010/2011. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu zaposlena je od 2010. godine, najpre kao stručni saradnik na Katedri za fiziologiju, a od aprila 2012. godine i kao asistent. Učestvuje u izvođenju praktične nastave iz predmeta Fiziologija 1, Fiziologija 2 i Odabrana poglavlja fiziologije. Bila je član komisije za odbranu desetak završnih radova studenata integrisanih akademskih i diplomskih osnovnih studija. Komentor je tri studentska naučno-istraživačka rada. Do sada je objavila pet radova u međunarodnim časopisima, jedan rad u domaćem naučnom časopisu (M53) i ima jedanaest saopštenja sa međunarodnih skupova, štampanih u celini. Tokom 2015. godine, boravila je u Izraelu kod prof. dr Davida Gurwitz-a na Sackler Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Tel-Avivu na stručnom usavršavanju, učenju RT-PCR metode i analiziranju dela uzoraka doktorske disertacije. Takođe je u više navrata boravila u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju dr Slađane Dronjak, Institut za nuklearne nauke "Vinča", Univerzitet u Beogradu, gde je savladala Western blot metodu, kao i kod prof. dr Nele Puškaš, Katedra za histologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na obuci za izvođenje imunohistohemijskog bojenja moždanog tkiva.

## **9. PRILOZI**

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora \_\_\_\_\_ Dušanka Stanić \_\_\_\_\_

Broj indeksa \_\_\_\_\_ 32/10 \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Uticaj oksitocina na aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg i ponašanje pacova**

- 
- 
- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
  - da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
  - da su rezultati korektno navedeni i
  - da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora \_\_\_\_\_ Dušanka  
Stanić \_\_\_\_\_

Broj indeksa \_\_\_\_\_ 32/10 \_\_\_\_\_

Studijski program Doktorske akademske studije modul farmakologija

Naslov rada **Uticaaj oksitocina na aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg i  
ponašanje pacova**

Mentor \_\_\_\_\_ Dr Vesna Pešić \_\_\_\_\_

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### **Uticaj oksitocina na aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg i ponašanje pacova**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.  
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.