

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET



Ivana D. Perić

**Proteomski i metabolomski uvid u  
biohemijske osnove depresije i delovanje  
antidepresiva na životinjskom modelu  
depresije**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY



Ivana D. Perić

**Proteomic and metabolomic insight into the  
biochemical background of depression and  
antidepressant action in an animal model of  
depression**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

MENTORI:

dr Dragana Filipović, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke „Vinča“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

dr Milan Nikolić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dragana Filipović, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke „Vinča“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

dr Milan Nikolić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Vladimir Beškoski, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu i na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se **dr Dragani Filipović**, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, pod čijim mentorstvom je urađena ova doktorska disertacija, na prilici da steknem značajno iskustvo, na savjetima, angažovanju i povjerenju koje mi je pružila u toku izrade ove doktorske disertacije.*

***Dr Milanu Nikoliću**, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na detaljnim korekcijama, korisnim sugestijama i pomoći pri pisanju ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se **dr Vladimiru Beškoskom**, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, čija podrška i povjerenje su doprinijeli da ova disertacija ovako izgleda..*

*Veliko hvala **dr Mariji Lješević**, naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, na novoj energiji, neprocjenjivoj drugarskoj pomoći kada je bila najpotrebnija, spremnosti i volji da uđe sa mnom u realizaciju novih ideja...*

*LC x MS/MS proteomsku analizu uzoraka uradili su **Victor Costina** i **dr Dragana Filipović** na Institutu za kliničku hemiju, Medicinskog fakulteta Manhajm, Univerziteta u Hajdelbergu, Univerzitetske bolnice Manhajm, uz odobrenje **dr Peter Findeisena**, i njima se ovim putem zahvaljujem.*

*Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, kolegama Laboratorije za atomsku fiziku, Insituta za nuklearne nauke „Vinča“, i kolegama sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, gdje su rađena snimanja proteinske ekspresije.*

*Hvala kolegama laboratorije 090, posebno **dr Neveni Todorović Vukotić**, i svima koji su pomogli i olakšali izradu ove disertacije.*

*Hvala mom drugu **Goranu** za dugogodišnju podršku...*

*Posebno hvala mojoj **Andrijani** na pozitivnoj energiji, nesebičnoj podršci i pomoći tokom svih ovih godina...*

*Hvala mojoj porodici koja mi je bila vjetar u leđa tokom cijelog školovanja...*

# **Proteomski i metabolomski uvid u biohemijske osnove depresije i delovanje antidepressiva na životinjskom modelu depresije**

## **SAŽETAK**

Poznato je da dugotrajna izloženost stresu uzrokuje strukturne i funkcionalne promene u mozgu koje vode nastanku depresije kod ljudi. Jedan od etiološki bitnih faktora je psihosocijalni stres, koji uključuje i hronični stres socijalne izolacije. Decenije istraživanja nisu dale odgovor na pitanje koje molekulske promene doprinose razvoju ovog tipa poremećaja ponašanja. Pored dijagnostifikovanja i lečenja depresije, veliki izazov predstavlja i praćenje terapije kod depresivnih pacijenata, s obzirom da nisu potpuno poznati mehanizmi antidepressivnog delovanja lekova, ni biomarkeri za praćenje njihovog delovanja. Odloženo dejstvo antidepressiva ukazuje na biohemijske promene koje su vremenski zahtevne i verovatno se zasnivaju na proteomskim promenama. Dosadašnja istraživanja su izdvojila hipokampus kao jedan od najpogođenijih moždanih regiona u depresiji. Iz svega navedenog, cilj ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje ukupnih biohemijskih promena u hipokampusu mužjaka pacova soja Wistar, koji usled hronične izloženosti stresu socijalne izolacije, u trajanju od 6 nedelja, pokazuju ponašanje nalik depresivnom. Takođe, cilj je bio da se identifikuju sveukupne, ali i ciljane, biohemijske promene koje su u osnovi efikasnog delovanja hroničnog tretmana antidepressivima (poslednje 3 nedelje od 6 nedelja izloženosti stresu socijalne izolacije), što je ostvareno ispitivanjem antidepressiva suprotnog osnovnog mehanizma delovanja, fluoksetina (15 mg/kg dnevno) ili tianeptina (10 mg/kg dnevno). Biohemijske promene su identifikovane pomoću metabolomske analize i obrade podataka komparativne proteomske analize celokupnog lizata/frakcija (citosola i nesinaptičkih mitohondrija (NSM)) hipokampusu pacova, gde je bioinformatička obrada rezultata ukazala na de-regulaciju biohemijskih puteva i važne ciljane molekulske promene u osnovi ponašanja nalik depresivnom i mehanizmu delovanju tianeptina ili fluoksetina.

Testovi ponašanja korišćeni su za određivanje parametara ponašanja nalik depresivnom. Na osnovu rezultata testova, odabrani su pacovi koji su nakon izlaganja stresu hronične socijalne izolacije ispoljili ponašanje nalik depresivnom, kao i pacovi kod kojih su hronični tretmani tianeptinom ili fluoksetinom normalizovali ovo ponašanje.

Obradom podataka komparativne proteomske analize, kod pacova sa ponašanjem nalik depresivnom, izazvanim hroničnim stresom socijalne izolacije, pokazano je narušeno funkcionisanje NSM, kroz smanjenje ekspresije proteina uključenih u energetski metabolizam, kao i narušenu komunikaciju sa citosolom, na osnovu smanjene ekspresije transportnih proteina. Suptilnije promene uočene u citosolnoj frakciji svedoče o deregulaciji inozitol-fosfatnog puta, enzima bitnih za sintezu neurotransmitera, kao i neuralnog ćelijskog molekula adhezije (engl. *neural cell adhesion molecul*, NCAM 1). Hroničnim tretmanom tianeptinom ili fluoksetinom, na sub-proteomskom nivou su uočene manje ekspresione promene u citosolu, dok su u NSM antidepresivi vratili ili povećali ekspresiju molekula uključenih u Krebsov ciklus, put oksidativne fosforilacije i transmembranske transportne proteine, stimulišući tako funkcionalnost i dinamiku NSM. Jedinstvene promene u delovanju oba antidepresiva, u odnosu na hronični stres socijalne izolacije, uočavaju se kroz povećanje ekspresije voltažno zavisnog jonskog kanala (engl. *voltage dependent anion chanel*, VDAC) 1 i 2, nosača fosfata, kao i ADP/ATP translokaze 2.

Metabolomska analiza lizata hipokampusa ukazala je na narušen metabolizam aminokiselina, nezasićenih masnih kiselina i inhibitornog neurotransmitera  $\gamma$ -aminobuterne kiseline (GABA) kod pacova koji su pokazali ponašanje nalik depresivnom. Klasifikator, baziran na mašinskom učenju, pokazao je klasne razlike između stresirane i kontrolne grupe životinja, i odredio GABA-u kao metabolit sa najvećim doprinosom pomenutim razlikama. Hronični tretman tianeptinom normalizovao je socijalnom izolacijom narušene biohemijske puteve i procese, među kojima GABA-u, piroglutamat, nezasićene masne kiseline, povećao nivoe treonina i aspartata, holesterola i njegovih metabolita, kao i delovao smanjenjem nivoa *mio*-inozitola. Kao ključni molekuli divergencije tianeptinom, tretirane grupe stresiranih životinja pokazani su *trans*-13-oktadecenska kiselina, *mio*-inozitol, holestan-3,5-diol, 5-acetat i pantotenska kiselina. Efikasan tretman fluoksetinom ukazao je na suptilnije izmene metaboloma, uz uočen trend rasta nivoa GABA-e, piroglutamata i značajan pad glicerola i L-norvalina. Klasifikator je prepoznao glicerol kao metabolit sa najvećim doprinosom klasnim razlikama. Ova disertacija je prvi put pokazala da hronični tretmani tianeptinom ili fluoksetinom povećavaju vezivanje ketamina i ksilazina u hipokampusu pacova, upućujući tako, indirektno, na povećanje broja vezivnih mesta pomenutih anestetika i analgetika/sedativa, a to su N-metil-D-aspartat receptor (NMDAR), tirozin receptor kinaza B (TrkB) i  $\alpha$ 2-adrenergički receptor (AR).

Rezultati ove doktorske disertacije potvrdili su relevantnost nekoliko hipoteza u definisanju ponašanja nalik depresivnom i antidepresivnom delovanju lekova. S tim u vezi, hronični stres socijalne izolacije uslovio je disfunkciju NSM u energetske smislu i na nivou razmene sa citosolom, kompromitovanost inhibitorne neurotransmisije, dok su, sa druge strane, antidepresivni tretmani stimulisali transport i energetske procese u NSM, inhibitornu signalizaciju i, moguće, delovali povećanjem brojnosti NMDAR, TrkB i  $\alpha$ 2-AR. Takođe, angažovanost inozitol-fosfatnog puta u patofiziološkoj osnovi depresije, mehanizmu antidepresivnog delovanja i korelaciji *mio*-inozitola sa imobilnim ponašanjem životinja, upućuju na signalne puteve koje je potrebno dodatno istražiti. Rezultati ove disertacije ukazuju na povezanost između imobilnog ponašanja životinja i nivoa određenih lipida, čime bliže ukazuju na značaj lipidnog statusa u patofiziologiji ponašanja nalik depresivnom kod socijalno izolovanih životinja. Deduktivnim putem identifikovane molekulske promene, od značaja u hroničnom stresu socijalne izolacije kao animalnom modelu depresije i delovanju antidepresiva suprotnog osnovnog mehanizma delovanja, predstavljaju korak bliže rasvetljavanju biohemijskih osnova depresije i ciljanih molekula koji bi pomogli u efikasnijem tretmanu bolesti.

**Ključne reči:** Hronični stres socijalne izolacije, Depresija, Hipokampus, Fluoksetin, Tianeptin, Metabolomiks.

**Naučna oblast:** Biohemija.

**Uža naučna oblast:** Neuronauke.

# **Proteomic and metabolomic insight into the biochemical background of depression and antidepressant action in an animal model of depression**

## **ABSTRACT**

Prolonged stress exposure evokes structural and functional brain changes leading to the development of depression. One of the most important etiological factors of depression is psychosocial stress, including chronic social isolation stress (CSIS). Decades of investigation failed to unravel molecular changes in the pathophysiology of this mood disorder. Besides diagnosing and treating depression, a substantial challenge represents monitoring the course of the illness, given that precise knowledge about the mechanism of antidepressant action and specific biomarkers of treatment is lacking. The late onset of action of antidepressants points to some time-consuming biochemical modulations, probably based on proteome changes. Until now, science highlighted the importance of the hippocampus as one of the most affected brain regions in depression. Based on the mentioned, the present thesis aimed to investigate total biochemical changes in the hippocampus of male Wistar rats exposed to CSIS (6 weeks) that led to the development of depressive-like behavior. Also, the aim was to identify total and targeted biochemical changes of the effective chronic antidepressant treatment (last 3 weeks of 6-week social isolation) by exploring the mechanism of two antidepressants with the opposite primary mechanism of action, fluoxetine (15 mg/kg/day) and tianeptine (10 mg/kg/day). Targeting biochemical changes was performed with the use of comparative omics approach, metabolomics analysis and analysis of proteomics data of the whole tissue lysate/fractions (cytosol and non-synaptic mitochondria (NSM)) of the rat hippocampus, and bioinformatic analysis pointed on down-regulated biochemical pathways and promising targeted molecular changes in the basis of depression and mechanism of action of tianeptine and fluoxetine.

Behavioral testing was used for the assessment of features representative of depressive-like behavior. Based on these results, rats were designated as responsive to stress and responsive to treatment with tianeptine or fluoxetine.

Based on the results of comparative proteomic analysis, depressive-like behavior was characterized by dysfunctional NSM and altered communication with cytosol due to the down-regulated expression of proteins involved in energy metabolism and transport. More subtle changes



were seen regarding cytosolic fraction, where the most prominent changes were deregulation of the inositol phosphate pathway, neurotransmitter synthesis related enzymes, and neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1). Chronic treatments of tianeptine or fluoxetine also induced more subtle sub-proteome changes of cytosol. However, in the NSM, the two antidepressants restored or increased the expression of the Krebs cycle enzymes, oxidative phosphorylation, and transmembrane transport proteins, thus favoring functionality and dynamics of the NSM. Specific changes in the two antidepressant actions regarding CSIS were the increase in expression of voltage-dependent anion channel (VDAC) 1/2, phosphate carrier, and ADP/ATP translocase 2.

Metabolomic analysis of the hippocampus showed altered metabolism of amino acids, unsaturated fatty acids, and the main inhibitory neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in stressed rats. Machine learning-based classifier separated CSIS from the control group and designated GABA as the most contributing variable to class separation. On the opposite, chronic tianeptine treatment normalized the CSIS-altered biochemical pathways, among which levels of GABA, pyroglutamate, unsaturated fatty acids; increased the levels of threonine and aspartate, cholesterol, together with its metabolites, and acted by decreasing the level of *myo*-inositol. The crucial molecules of divergence of the tianeptine-treated group exposed to stress conditions were trans-13-octadecenoic acid, *myo*-inositol, cholestane-3,5-diol, 5-acetate, and pantothenic acid. More subtle effects were seen upon chronic fluoxetine treatment with a trend towards an increase in GABA and pyroglutamate levels and a significant decrease in glycerol and L-norvaline. Glycerol was the most contributing metabolite to class separation. For the first time, it was shown that chronic treatment of both fluoxetine and tianeptine multiplies the amount of bound ketamine and xylazine in the rat hippocampus, pointing so indirectly to an increased number of their binding sites, N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), tyrosine receptor kinase B (TrkB) and  $\alpha$ 2-adrenergic receptor (AR).

The present results concluded several hypotheses relevant to depressive-like behavior and antidepressant mechanism of action. Thus, CSIS-induced depressive-like behavior relates with dysfunctional NSM in both energy view and terms of communication with the cytosol, compromised inhibitory neurotransmission; on the other side, antidepressants stimulated both transport and energy processes of the NSM, inhibitory signalization, and acted with the increased presence of the NMDAR, TrkB and  $\alpha$ 2-AR. Also, the engagement of inositol phosphate signal cascade in the pathophysiology of depression and antidepressant action, accompanied with the

observed negative correlation of immobility behavior with *myo*-inositol levels, point to signal pathways that require more profound investigation. This dissertation results showed a connection between immobility behavior in animals and the level of specific lipids, which pointed to altered lipid status in the pathophysiology of depressive-like behavior in socially isolated rats. Overall, deductively identified alterations of molecular changes in the CSIS as an animal model of depression and the action of antidepressants with the opposite primary mechanism of action represents a step closer toward highlighting the biochemistry of depression and promising target molecules for more effective treatment.

**Keywords:** Chronic social isolation stress, Depression, Hippocampus, Fluoxetine, Tianeptine, Proteomics, Metabolomics

**Research field:** Biochemistry

**Research subfield:** Neuroscience

## SPISAK SKRAĆENICA I AKRONIMA:

$\Delta G^{\circ}$  – Gibsova slobodna energija

5HT – 5-hidroksitriptamin, serotonin (engl. *5-hydroxytryptamine*)

Acetil-CoA – acetil koenzim A (engl. *acetyl coenzyme A*)

ACTH – adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*)

AMPA – receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (engl.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*)

ANOVA – analiza varijanse (engl. *analysis of variance*)

ARA – arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*)

ATP – adenzin-3-fosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

Bcl-2 – B-ćelijski limfom 2 (engl. *B cell lymphoma 2*)

BDNF – neurotrofni moždani faktor (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

BH4 – tetrahidrobiopterin (engl. *tetrahydrobiopterin*)

BSTFA – N, O-bis(trimetilsilil) trifluoracetamid (engl. *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*)

CA1 – *Cornu ammonis 1*

CA2 – *Cornu ammonis 2*

CA3 – *Cornu ammonis 3*

CaM – kalmodulin (engl. *calmodulin*)

CaMK –  $Ca^{2+}$ /kalmodulin zavisna protein kinaza (engl.  *$Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase*)

CoA – koenzim A (engl. *Coenzyme A*)

COX IV – subjedinica IV citohrom c oksidaze (engl. *cytochrome c oxidase subunit IV*)

CRE – element cAMP odgovora (engl. *cAMP response element*)

CREB – CRE vezujući protein (engl. *CRE-binding protein*)

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

CSIS – hronična socijalna izolacija (engl. *chronic social isolation*)

DAB – 3,3'-diaminobenzidin (engl. *3,3'-diaminobenzidine*)

DG – dentatni girus (engl. *dentate gyrus*)

DHPR – dihidropteridin reduktaza (engl. *dihydropteridine reductase*)

EC – entorinalni korteks (engl. *entorhinal cortex*)

EDTA – etilendiamin tetra sircetna kiselina (engl. *etylenediaminetetracetic acid*)

ERK – kinaza regulisana spoljašnjim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)  
ET – elektrokonvulzivna terapija (engl. *electroconvulsive therapy*)  
FAD – flavin adenin dinukleotid (engl. *flavin adenine dinucleotide*)  
G6P – glukoza 6-fosfat (engl. *glucose 6-phosphate*)  
GAD – glutamat dekarboksilaza (engl. *glutamate decarboxylase*)  
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)  
GC – gasna hromatografija (engl. *gas chromatography*)  
GDH – glutamat dehidrogenaza (engl. *glutamate dehydrogenase*)  
Glc – glukoza (engl. *glucose*)  
Gln – glutamin (engl. *glutamine*)  
GLR – glutation reduktaza (engl. *glutathione reductase*)  
GLS – glutaminaza (engl. *glutaminase*)  
Glu – glutamat (engl. *glutamate*)  
Glut – transporter glukoze (engl. *glucose transporter*)  
GPx – glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)  
GR – glukokortikoidni receptor (engl. *glucocorticoid receptor*)  
GS – glutamin sintetaza (engl. *glutamine synthetase*)  
GSH – glutation (engl. *glutathione*)  
GSHS – glutation sintetaza (engl. *glutathione synthetase*)  
h – hilus (engl. *hilus*)  
HPA – hipotalamus-hipofiza-adrenalna žlezda (engl. *hypothalamo-pituitary-adrenal gland*)  
HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom (engl. *high pressure liquid chromatography*)  
I3P – inozitol trifosfat (engl. *inositol trisphosphate*)  
LDH – laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*)  
L-DOPA – L-dopamin (engl. *L-dopamine*)  
LTD – dugotrajna depresija (engl. *long-term depression*)  
LTP – dugotrajna potencijacija (engl. *long-term potentiation*)  
MAO – monoamin oksidaza (engl. *monoamine oxidase*)  
MCT – monokarboksilatni transporter (engl. *monocarboxylate transporter*)  
mgl – molekularno-granularni sloj (engl. *molecular-granular layer*)

MOX – metoksiamin hidrohlorid (engl. *methoxyamine hydrochloride*)

MS – masena spektrometrija (engl. *mass spectrometry*)

NAD – nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NCAM – neuralni ćelijski adhezivni molekul (engl. *neural cell adhesion molecule*)

NMDAR – N-acetil-D-aspartat receptor (engl. *N-acetyl-D-aspartate receptor*)

NSM – nesinaptičke mitohondrije (engl. *non-synaptic mitochondria*)

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PBS – fosfatom puferisan fiziološki rastvor (engl. *phosphate-buffered saline*)

PCA – analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*)

Phe – fenilalanin (engl. *phenylalanine*)

PI3K – fosfatidil inozitol-3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PLC $\gamma$  – fosfolipaza C gama (engl. *phospholipase C gamma*)

PLS-DA – engl. *orthogonal - partial least square - discriminant analysis*

Psm $\alpha$ 3 – proteazomalna subjedinica  $\alpha$ , tip 3 (engl. *proteasome subunit  $\alpha$  type 3*)

RF – engl. *Random forest*

ROS – reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*)

SDS – natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SEM – standardna greška srednje vrednosti (engl. *standard error of the mean*)

SLASA – „Srpsko udruženje za upotrebu životinja u istraživanju i obrazovanju“ (engl. *Serbian Laboratory Animal Science Association*)

slm – *stratum lacunosum moleculare*

so – *stratum oriens*

sp – *stratum pyramidale*

sr – *stratum radiatum*

SSA – sukcinat semialdehid (engl. *succinic semialdehyde*)

SSADH – sukcinat semialdehid dehidrogenaza (engl. *succinic semialdehyde dehydrogenase*)

SYP – sinaptofizin (engl. *synaptophysin*)

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

TBP – TATA-vezujući protein (engl. *TATA-binding protein*)

TBST – Trisom puferisan fiziološki rastvor sa Tween-om (engl. *Tris-buffered saline with Tween*)

TCA – trikarboksilna kiselina (engl. *tricarboxylic acid*)

TH – tirozin hidroksilaza (engl. *tyrosine hydroxylase*)

THBP – tetrahidrobiopterina (engl. *tetrahydrobiopterin*)

TMCS – trimetil-hlorsilan (engl. *trimethylchlorosilane*)

TrkB – tirozin receptor kinaza B (engl. *tyrosine receptor kinase B*)

Trp – triptofan (engl. *tryptophan*)

Tyr – tirozin (engl. *tyrosine*)

VDAC – voltažno-zavisni anjonski kanal (engl. *voltage-dependent anion channel*)

vGLUT – vezikularni glutamatni transporter (engl. *vesicular glutamate transporter*)

VTA – engl. *ventral tegmental area*

$\alpha$ KGD – alfa-ketoglutarat dehidrogenaza (engl. *alpha-ketoglutarate dehydrogenase*)

$\gamma$ -GluCys – gama-glutamil cistein (engl. *gamma-glutamylcysteine*)

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO .....	4
2.1. Etiologija depresije.....	5
2.1.1. Genetski i epigenetski faktori .....	6
2.1.2. Sociološki faktori – stres, alostatski odgovor na stres i alostatsko opterećenje.....	6
2.1.3. Biološki faktori - teorije depresije .....	9
2.2. Hipokampus i depresija.....	15
2.3. Biohemija hipokampusa.....	19
2.4. Životinjski modeli depresije.....	23
2.4.1. Model hronične socijalne izolacije pacova .....	24
2.5. Tretman depresije.....	25
2.5.1. Psihoterapija.....	26
2.5.2. Farmakoterapija .....	26
2.6.2.1. Antidepresivi prve generacije .....	26
2.6.2.2. Antidepresivi druge generacije.....	27
2.6.2.2.1. Fluoksetin .....	27
2.6.2.2.2. Tianeptin.....	29
2.5.3. Drugi pristupi lečenju .....	31
2.6. „Omics“ u službi istraživanja bolesti .....	33
2.6.1. Proteomiks .....	34
2.6.2. Metabolomiks .....	36
2.6.2.3. Gasna hromatografija .....	38
2.6.3. Obrada „omics“ podataka .....	41
3. CILJEVI.....	43
4. MATERIJAL I METODE.....	45
4.1. Životinje .....	46
4.2. Životinjski model depresije.....	46
4.3. Priprema rastvora lekova i njihova aplikacija .....	47
4.4. Testovi ponašanja.....	48
4.4.1. Saharozni test .....	49
4.4.2. Test zakopavanja klikera.....	49

4.4.3.	Test prinudnog plivanja .....	49
4.5.	Žrtvovanje pacova i izolovanje tkiva .....	50
4.6.	Priprema uzoraka, molekulske analize i validacije rezultata proteomske analize .....	51
4.6.1.	Izolovanje frakcija hipokampusa za LC × MS analizu stresirane i/ili fluoksetinom tretirane grupe uzoraka .....	51
4.6.2.	Izolovanje frakcija hipokampusa za LC × MS analizu tianeptinom tretirane grupe uzoraka	51
4.6.3.	Određivanje koncentracije proteina u frakcijama hipokampusa.....	53
4.6.4.	Provera čistoće izolovanih frakcija hipokampusa „Western blot“ metodom .....	53
4.6.4.1.	Elektroforetsko razdvajanje proteina.....	54
4.6.4.2.	Imunoblot.....	55
4.6.5.	Elektroforeza, digestija proteina i masena spektrometrija (LTQ – Orbitrap).....	56
4.6.6.	Provera rezultata proteomske analize .....	56
2.6.2.4.	„Western blot“ .....	56
2.6.2.5.	Imunohistohemija .....	57
2.6.2.5.1.	Imunofluorescentna detekcija.....	57
2.6.2.5.2.	Imunohistohemijska detekcija pomoću 3, 3'-diaminobenzidin-a (DAB-a)	58
4.7.	Metabolomska analiza.....	59
4.7.1.	Izolovanje i derivatizacija metabolita iz hipokampusa pacova.....	59
4.7.2.	GC × GC – MS analiza .....	59
4.8.	Statistička obrada podataka .....	60
5.	REZULTATI .....	62
5.1.	Testovi ponašanja.....	63
5.1.1.	Saharozni test .....	63
5.1.2.	Test zakopavanja klikera.....	64
5.1.3.	Test prinudnog plivanja .....	65
5.2.	Provera čistoće frakcija hipokampusa.....	67
5.3.	Rezultati proteomske analiza hipokampusa .....	68
5.3.1.	Proteomska analiza citosolnih frakcija .....	68
5.3.2.	Proteomska analiza frakcija NSM .....	89
5.4.	Metabolomska analiza hipokampusa .....	102
5.4.1.	Obrazac metabolomskih promena.....	102



5.4.2.	Multivarijantna obrada podataka metabolomske analize.....	107
5.4.3.	Pearson-ova korelacija metabolita i vremena imobilnosti .....	109
6.	DISKUSIJA.....	111
6.1.	Molekulske promene u hipokampusu životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije .....	112
6.2.	Molekulske promene u hipokampusu životinja nakon tretmana fluoksetinom.....	120
6.3.	Molekulske promene u hipokampusu životinja nakon tretmana tianeptinom.....	125
6.4.	Uporedna analiza molekulskih promena u uslovima stresa i nakon tretmana antidepresivima .....	131
7.	ZAKLJUČCI .....	141
8.	LITERATURA .....	144
	Biografija .....	178

## ***1. UVOD***

---

Poremećaj ponašanja, izražen kroz pojavu dugoročnog osećaja tuge ili praznine, niskog samopouzdanja, bezvoljnosti, usamljenosti, često praćen poremećajem sna i apetita, gubitkom energije i slabljenjem kognitivnih sposobnosti, a u najtežem slučaju i suicidalnim mislima, neke su od glavnih odrednica depresivnog poremećaja, tj. depresije. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije („World Health Organization“) (<https://www.who.int/news/item/07-04-2017-world-health-day-2017-let-s-talk-about-depression-and-tb>), depresija je danas vodeći uzrok kod ljudi koji dovodi do nefunkcionalnosti za rad, sa više od 300 miliona obolelih, i sa tendencijom brzog rasta u narednim godinama.

Višedecenijska istraživanja doprinela su boljem razumevanju depresije, međutim, biohemijska osnova njenog nastanka nedovoljno je razjašnjena. U etiološkom smislu, poznato je da hronična izloženost stresu doprinosi razvoju ove bolesti, među kojima i hronična socijalna izolacija, kao vrsta psihosocijalnog stresa, još uvek nejasnim molekulskim procesima. Veliki broj izvedenih studija, na humanim i životinjskim uzorcima, pronašao je vezu između depresije i strukturno-funkcionalnih promena određenih regiona mozga, među kojima i hipokampusu.

Na molekulskom nivou, ustanovljeno je nekoliko različitih hipoteza depresije, koje su poslužile kao osnov za uvođenje farmakološke terapije. Prve klase antidepresiva bile su zasnovane na principu monoaminske teorije depresije, tj. bazirani su na povećanju (odnosno vraćanju), u depresiji inače sniženog, nivoa jednog ili više monoamina u mozgu. Otkriće atipičnih antidepresiva, čiji mehanizam delovanja je u osnovi suprotan mehanizmu delovanja klasičnih antidepresiva, uslovio je potrebu za detaljnijim ispitivanjem biohemijskih osnova depresije i delovanja antidepresiva nishodno od monoaminskih receptora.

Iako farmakološki tretman antidepresivima ima veliki značaj u tretmanu depresije, veliki broj pacijenata se suočava sa rezistentnošću na lek, ili sa rekurentnim oblikom depresije. Takođe, odloženo vreme delovanja antidepresiva otežava izbor prave terapije. Preciznije definisanje mehanizama koji uzrokuju promene ponašanja, a samim tim i mehanizama kojima akutna ili hronična farmakoterapija dovode do poboljšanja ovog stanja, ili potpunog izlečenja, dalo bi osnov za bolje (preciznije i brže) postavljanje dijagnoze i efikasnije lečenje.

Cilj ove doktorske disertacije je da se, kombinovanom primenom metabolomske analize i obradom podataka proteomske analize, pruži detaljniji i jedinstveni uvid u biohemijske promene/narušene biohemijske puteve koji su u osnovi ponašanja nalik depresivnom i kojima se ostvaruje antidepresivni efekat lekova. Kako bi se obuhvatio veći broj mogućih molekulskih promena u okviru više/različitih biohemijskih puteva, primenjeni su netargetovani pristupi proteomske i metabolomske analize hipokampusa mužjaka pacova soja Wistar, izloženih hroničnoj socijalnoj izolaciji (6 nedelja) i nakon hroničnog tretmana antidepresivima suprotnog osnovnog mehanizma delovanja, fluoksetina (15 mg/kg dnevno) ili tianeptina (10 mg/kg dnevno) (poslednje 3 od 6 nedelja socijalne izolacije). Dok se delovanje fluoksetina objašnjava pomoću monoaminske teorije depresije i povećanja nivoa serotonina na molekulskom nivou, kroz sprečavanje ponovnog preuzimanja iz sinaptičke pukotine, tianeptin (svojim suprotnim osnovnim mehanizmom delovanja) stimuliše preuzimanje serotonina, a pokazan je i afinitet tianeptina prema receptorima  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (engl.  *$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor*, AMPAR) i  $\mu$ -opioidnim receptorima, tako da funkcionalni aspekti njegovog antidepresivnog delovanja mogu biti vezani za signalne puteve nezavisne od serotonina. Činjenica da oba leka nakon hronične primene pokazuju uspešnost u lečenju depresije, ukazuje na mehanizam delovanja koji nije ostvaren direktno na nivou transportera (serotonina). Iz tog razloga bi pronalaženje zajedničkih biohemijskih puteva usmerilo dalja istraživanja ove bolesti i tretmana ka ciljanim molekulima, tzv. molekulskim metama, koji mogu objasniti efikasnost antidepresiva iz različitih klasa. Pronalaženje ciljanih molekula moglo bi imati i primenjeni značaj u terapijske svrhe, putem kreiranja i dizajniranja lekova poboljšane delotvornosti.

## ***2. TEORIJSKI DEO***

---

Depresija se definiše kao čest i ozbiljan mentalni poremećaj, najčešći u grupi poremećaja ponašanja, koji uzrokuje pojavu negativnih osećanja, misli, ponašanja, i koji ograničava psihosocijalno funkcionisanje i kvalitet života pojedinca (<https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>). Složena priroda na molekulskom, etiološkom i simptomatološkom nivou, značajno otežava razumevanje i lečenje. Kroz istoriju se depresija definisala i razumevala na razne načine, a višedecenijsko istraživanje depresije naučnici su sagledali kroz faze, na osnovu koncepta svojevremenog shvatanja ovog poremećaja. Još u XVII veku, u knjizi „Anatomy of Melancholy“, Robert Burton je istakao sociološku i psihološku osnovu melanholijske, kroz analizu uticaja samoće, siromaštva i straha. I dalje, sve do kasnog XVIII veka, istraživanja vezana za današnji moderni koncept depresije su se karakterisala kao stanje melanholijske. Do sredine i kraja XIX veka, melanholijska se primarno smatrala intelektualnim poremećajem, nakon čega se akcenat primarno stavlja na osećaj tuge, a melanholijska počinje da se posmatra kao poremećaj ponašanja koji može, ali ne mora, biti praćen poremećajem na intelektualnom nivou.<sup>1</sup>

Početak XX veka je bio obeležen pojavom psihoanalize kao tipa psihoterapije, koja može, prema Sigmundu Frojdu, biti od pomoći melanholijskoj osobi da neutrališe destruktivne misli i popravi ponašanje. Shvatanje depresije kao poremećaja mozga se javlja sa početkom XX veka, a u drugoj polovini se počinje vezivati za kognitivne procese, kao što je automatsko negativno procesuiranje događaja prema Aaron Beck-u, kasnije tvorcu kognitivno-bihevioralne terapije, i naučena bespomoćnost (engl. „learned helplessness“), kako je definisao Martin Seligman. Polovinom XX veka depresija kao stanje koje nastaje bez postojanja konkretnog događaja kao uzročnika, i s toga definisana kao endogena depresija, se karakteriše kao najbolniji ljudski doživljaj.<sup>2</sup> Sedamdesetih godina prošlog veka prvi put se uvodi termin veliki depresivni poremećaj (engl. *major depressive disorder*).

## 2.1. Etiologija depresije

Do nedavno se depresija posmatrala kao poremećaj kod kog se epizodično javlja narušen nivo hemijskih supstanci, ali bez dugotrajnijih promena u moždanim regionima.<sup>3</sup> Međutim, brojna istraživanja ukazala su na složenost promena koje se dešavaju na molekulskom i histološkom nivou kod depresivnih pacijenata, u nekim slučajevima nepovratnih, a koje prati kompleksan fenotip. Ovaj tip promena rezultat je dugotrajnog uticaja više faktora. Danas se zna da je depresija

rezultat kompleksnih interakcija biološke, psihološke i sociološke prirode. U etiološkom smislu, pokazan je uticaj genetskih, epigenetskih i sredinskih faktora, kao što je hronična izloženost stresu, koja bitno doprinosi nastanku i kompleksnosti razumevanja depresije.<sup>4</sup>

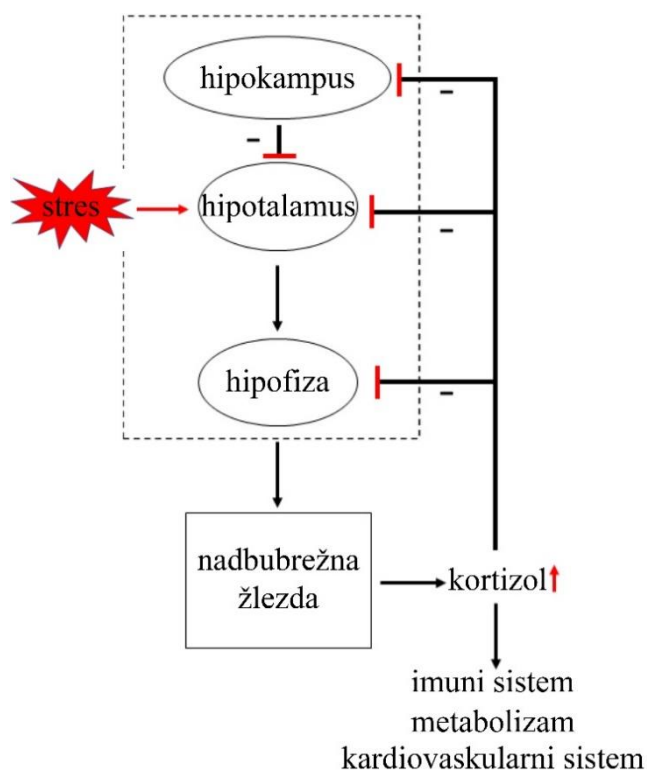
### 2.1.1. Genetski i epigenetski faktori

Brojne studije su pokazale povećanu verovatnoću obolevanja od depresije u porodicama sa istorijom dijagnostifikovane depresije, i za čak 40 % veću verovatnoću za pojavu depresije ukoliko je direktni srodnik bolovao od iste. Ta verovatnoća raste na 70 % kod jednojajčanih blizanaca, podjednako kod muškaraca i žena.<sup>5</sup> S tim u vezi, pokazalo se da genetske predispozicije imaju bitnu ulogu u etiologiji depresije. Takođe, istraživanja rađena na jednojajčanim blizancima, kod kojih jedan blizanac razvija, dok drugi ne razvija kliničku sliku depresije, dala su značajan doprinos razumevanju uticaja epigenetskih faktora na kontrolu ponašanja.<sup>6</sup> S obzirom na veliki broj neurohemijskih promena u mozgu depresivnih osoba, kao i značajnu kompleksnost simptomatologije, otkrivanje potencijalnih genetskih poremećaja je takođe zahtevan proces.<sup>7</sup> Do sada je identifikovano 44, odnosno, 102 moguće rizične varijante gena,<sup>8,9</sup> koje doprinose nastanku depresije. Neki od gena, čiji polimorfizmi su dovedeni u vezu sa podložnošću za razvoj depresije, su *CREB 1*, *SERT*<sup>10</sup>, triptofan hidrosilazu<sup>11</sup> i *CRHR1*.<sup>12</sup>

### 2.1.2. Sociološki faktori – stres, alostatski odgovor na stres i alostatsko opterećenje

Rano susretanje sa stresnim situacijama u životu, kao što je vršnjačko nasilje, upotreba nedozvoljenih supstanci, zlostavljanje i siromaštvo, doprinose pojavi depresije kod određenih osoba.<sup>13</sup> Na tip odgovora u susretu sa stresorom utiče više faktora, kao što su vrsta i trajanje stresora, biološki faktori pojedinca (pol, starost i genetika), istorija stresnih događaja, kao i rana životna iskustva osobe izložene stresu.<sup>14</sup>

Hans Selye je termin „stres“ definisao kao „nespecifični odgovor tela na bilo koji zahtev“,<sup>15</sup> a odgovor organizma na hronični stres nazvan je „opšti sindrom prilagođavanja“. <sup>16</sup> Stresni odgovor se odvija kroz nekoliko ključnih neurohemijskih koraka, preko aktivacije simpatomedularnog nervnog sistema i sekrecije kateholamina, i aktivacije adrenokortikalnog sistema i sekrecije glukokortikoida. Selye je prvi doveo u vezu stresni odgovor sa funkcionisanjem hipotalamo-hipofizno-adrenalne (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) ose (**Slika 1**).



U odgovoru na stres vrši se sinteza hormona u hipotalamusu (engl. *corticotropin realising hormone*, CRH), pod čijim uticajem se dalje, u prednjem režnju hipofize, sekretuje adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropin hormone*, ACTH). ACTH deluje na koru adrenalne, tj. nadbubrežne žlezde i sekreciju glukokortikoida kao krajnjeg koraka ove kaskade. Mehanizmom negativne povratne sprege, glukokortikoidi deluju za nekoliko regiona u mozgu (hipofiza, hipotalamus, hipokampus), uz mogućnost brzog ili sporog delovanja<sup>17</sup> i tako regulišu aktivnost i funkcionisanje HPA ose.

**Slika 1.** Šematski prikaz organizacije i regulacije HPA ose.

Stresni odgovor predstavlja adaptivnu i odbrambenu reakciju organizma na prisustvo spoljašnjeg ili unutrašnjeg nepovoljnog stimulusa, stresora, koji narušava stanje dinamične ravnoteže u organizmu. Postoje različiti mehanizmi za regulaciju unutrašnje ravnoteže organizma. Jedan od njih je homeostaza, koju je Walter Cannon, 1929. godine, definisao kao „stabilnost kroz konstantnost“ (engl. “stability through constancy”), gde se mehanizmima negativne povratne sprege ispravljaju uočene greške.<sup>18</sup> S obzirom da homeostaza nije mogla da objasni mnoge fiziološke promene, Sterling i Eyer uvode termin „alostaza“ i definišu je kao „stabilnost kroz promenu“ (engl. “stability through change”).<sup>19</sup> Alostaza podrazumeva aktivne regulacione mehanizme, u obliku fizioloških (neurohemijskih i imuloških) promena i promena ponašanja, koje imaju za cilj da adaptacijom održe stabilno stanje u promenljivim uslovima i tako ublaže uticaj stresora i obezbede ponovno uspostavljanje ravnoteže.<sup>20</sup> Alostaza je definisana kao mehanizam koji uzima u obzir normalne varijacije dinamičkog biološkog sistema i, (za razliku od homeostaze) na osnovu te varijabilnosti, koriguje kontrolne mehanizme na nivo koji je neophodan da se ispuni određeni fiziološki zahtev.<sup>18</sup>



Mozak, kao i mnogi drugi sistemi, poseduje alostazu, a poseban značaj u procesu adaptacije imaju simpatički nervni sistem, HPA osa, aktivacija nervnih ćelija i oslobađanje neurotransmitera.<sup>21</sup> Mehanizmima alostaze se, nakon izloženosti hroničnom stresu, povećava osetljivost na novi stimulus.<sup>22</sup> Međutim, u određenim situacijama, kao što je npr. ponovljena ili produžena izloženost stresorima, dolazi do slabljenja alostatskih mehanizama, što za posledicu ima nemogućnost adaptacije fiziološkog sistema.<sup>23</sup> Terminološki se ovaj fenomen prepoznaje kao „alostatsko opterećenje“ (engl. „alostatic load“) ili „cena adaptacije“, i nastaje na neki od sledećih mogućih načina: učestala aktivacija alostatskog sistema, nemogućnost postizanja adaptacije, nemogućnost isključivanja alostatskih mehanizama nakon stresa i neadekvatan odgovor alostatskih sistema, koji uslovljava aktivaciju drugih suprotno regulisanih alostatskih sistema nakon stresa.<sup>24</sup> Hroničnim stresom izazvano alostatsko opterećenje utiče na deregulaciju nekoliko bitnih fizioloških sistema, kao što su HPA osa, simpatički nervni sistem i imunološki sistem, što dalje povećava rizik za razvoj različitih patologija, odnosno psiholoških (psihijatrijskih) i poremećaja ponašanja.<sup>25</sup>

Uloga hormona je da posreduju u procesu adaptacije, ali takođe mogu biti uzrok patofizioloških promena. Dvostruka priroda izloženosti stresu objašnjava se kroz dvostrano delovanje kortizola, pod čijim uticajem se snažno oslobađaju neophodne energetske rezerve u stresnoj situaciji (engl. „fight-or-flight“ reakcija), ali i narušava normalno funkcionisanje imunog sistema.<sup>14</sup> Sapolsky je štetni uticaj preterane sekrecije glukokortikoida, usled izloženosti hroničnom stresu ili u starosti, objasnio kroz „glukokortikoidnu kaskadnu hipotezu“, gde preteranu aktivaciju HPA ose i prisustvo glukokortikoida vezuje za degeneraciju moždanih regiona bitnih za negativnu regulaciju aktivnosti HPA ose.<sup>26</sup> Posebnu ulogu regulatora nivoa glukokortikoida ima hipokampus, koji mehanizmima negativne povratne sprege reguliše nivo ekspresije hormona hipotalamusa i hipofize, time i aktivnost HPA ose. Kod hroničnog stresa, adaptivnim mehanizmima se održava nivo kortikosteroida, odnosno savladaju se mehanizmi negativne inhibicije, do čega verovatno dolazi smanjenjem broja glukokortikoidnih receptora (GR) i drugih srodnih receptora, posebno u hipokampusu.<sup>27,28</sup> Jedan od mehanizama delovanja GR-a je translokacija anti-apoptotskog proteina Bcl-2 u mitohondrije, čime se sprečava oslobađanje citohroma c, utiče na smanjenje proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika i povećava stvaranje ATP-a, tj. stimuliše celokupni aerobni energetski metabolizam u uslovima stresa.<sup>29</sup> Međutim, kontinuirana sekrecija glukokortikoida nadmašuje korist pojačane reaktivnosti na stres koji se

normalno dešava usled adaptacije i taj odgovor postaje maladaptivan.<sup>22</sup> Usled alostatskog opterećenja dolazi do atrofije ćelija hipokampusa.

Na osnovu svega navedenog, hronični stres smatra se jednim od glavnih etioloških faktora za nastanak brojnih psiholoških poremećaja, tako i depresije. Podaci pokazuju pozitivnu korelaciju između indeksa alosteričkog opterećenja sa kumulativnim hroničnim psihosocijalnim stresom,<sup>30</sup> kao i sa rizikom za razvoj psihijatrijskih poremećaja, uključujući depresiju.<sup>31</sup>

### 2.1.3. Biološki faktori - teorije depresije

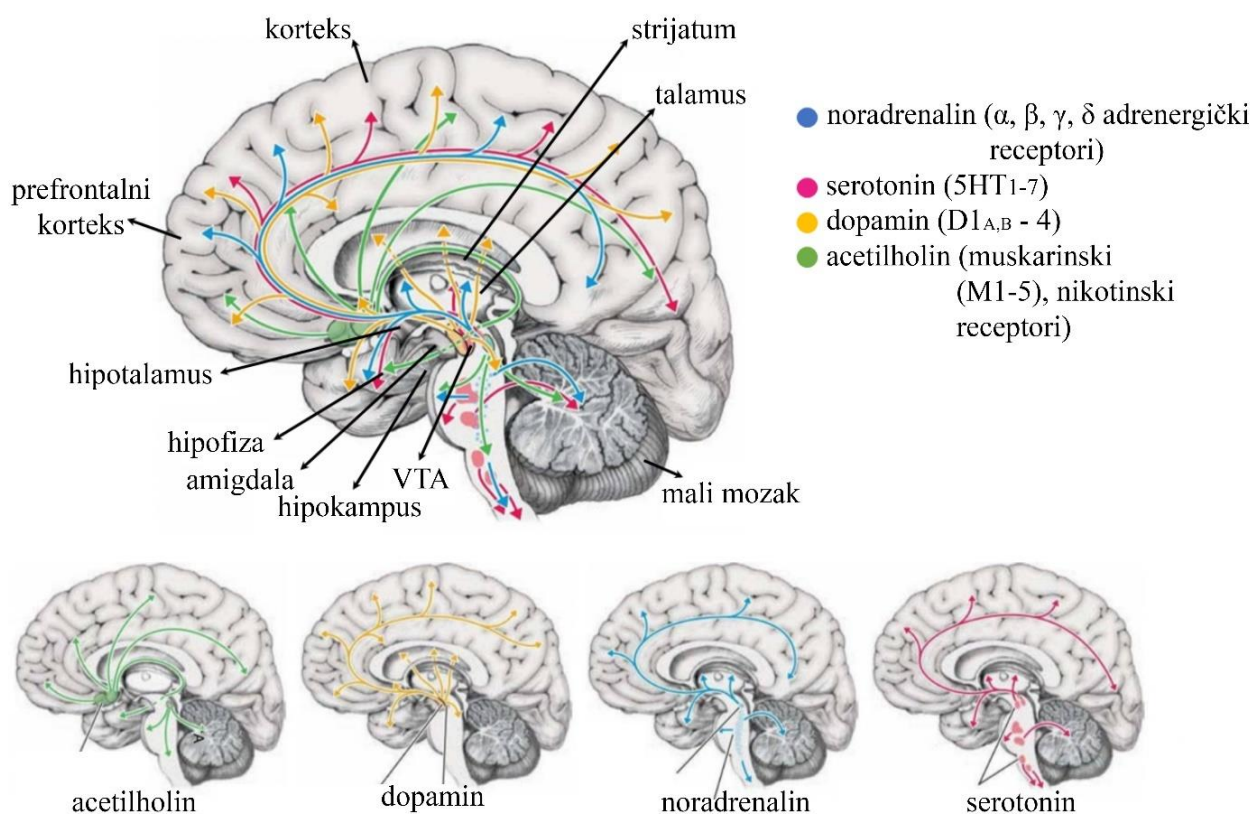
Nekoliko hipoteza objašnjavaju moguće patobiohemijske promene u osnovi depresije. Iako je svaka od njih dosta proučavana, ne postoji jasno definisana i jednoznačna uzročno-posledična veza uočenih promena na molekulskom nivou sa depresijom ili njenim lečenjem.

Promena „hemije u mozgu“, koja se odnosi na promene nivoa neurotransmitera, prati pojavu depresivnih epizoda kod pacijenata. Najčešće izučavana i prva hipoteza depresije vezana je za promene u nivou monoamina u mozgu depresivnih pacijenata, tzv. **monoaminska teorija**, koju je 1965. godine postulirao harvardski psihijatar Joseph Scildkraut.<sup>32</sup> Tadašnja istraživanja povezala su depresivno ponašanje sa sniženim nivoom kateholamina, najpre noradrenalina, na osnovu podataka prikupljenih delovanjem prvobitno otkrivenih antidepresiva (sa mehanizmom inhibicije monoaminooksidaza (engl. *monoamine oxidase*, MAO)), i uticaja koji lekovi, delujući na sniženje nivoa kateholamina (rezerpin), ali i njihovo povećanje (anfetamini), imaju na ponašanje.<sup>33</sup>

Monoamini se dele na derivate katehola (noradrenalin i dopamin) i indola (serotonin). Njihova osnovna uloga je da prenose signal kroz telo, ali i između nervih ćelija različitih moždanih regiona, specifičnim putevima zavisnim od prisustva odgovarajućih receptora (**Slika 2**). Upravo raznolikost signalizacije preko različitih neurotransmitera, monoaminskih, ali i drugih, uslovljava funkcionalnu složenost centralnog nervnog sistema.

Na bazi struktura monoamina urađena je sinteza velikog broja lekova.<sup>34</sup> Uvođenje suplementacije triptofana kod depresivnih pacijenata se objašnjava povećanjem nivoa prekursora za sintezu monoamina u mozgu.<sup>32</sup> Međutim, studije o uticaju suplementacije triptofana pokazale su da smanjenje nivoa serotonina ne mora jednoznačno uzrokovati nastanak depresije, već se radi o uključenosti više sistema, uključujući i genetske.<sup>35</sup> Zasnivanje biohemijske osnove depresije isključivo na nivou nedostatka monoamina pokazalo se nedovoljnim,<sup>36</sup> prvenstveno imajući u vidu da ublažavanje ili lečenje simptoma depresije značajno vremenski odstupa u odnosu na povećanje

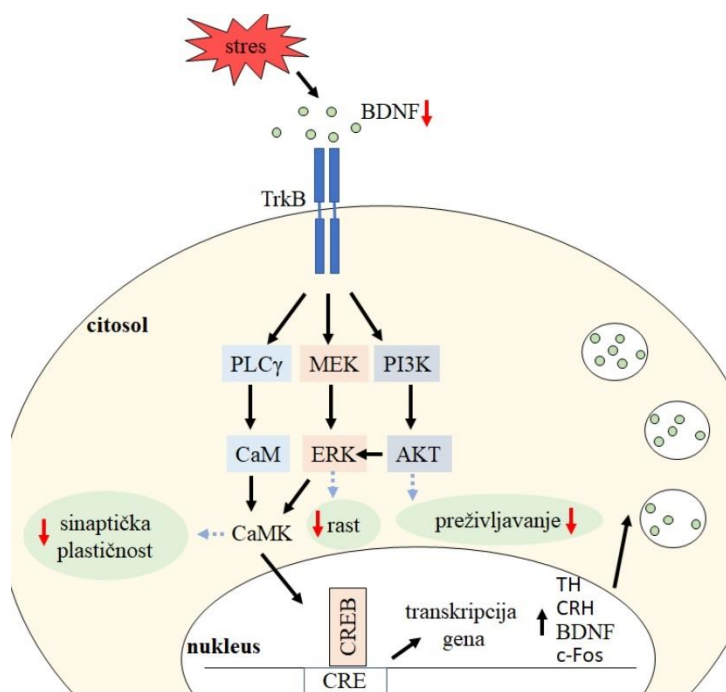
nivoa monoamina. Na osnovu poremećaja na nivou dopamina, kao jednog od neurotransmitera, sedamdesetih godina XX veka nastala je i **dopaminska teorija depresije**.<sup>37</sup> Motivacija, psihomotorna brzina, koncentracija, kao i sposobnost da se oseti zadovoljstvo, su procesi narušeni u stanju depresije, zasnovani na regulaciji dopaminske signalizacije.<sup>38</sup> Ova teorija se oslanja na dokazima povećanog nivoa tirozin-hidroksilaze, ili sniženog nivoa tirozina, prekursora u sintezi dopamina i noradrenalina, u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti depresivnih pacijenata.<sup>39,40</sup> Takođe, postoje dokazi koji ukazuju na poremećaj koncentracije dopamina u sinaptičkoj pukotini, poremećaj signalnih puteva u kojima on učestvuje, kao i broja i funkcije odgovarajućih receptora.<sup>41</sup> Pored toga, modulacija aktivnosti HPA ose, posredovana sintezom prolaktina i aktivnošću hipofize, pokazala se da zavisi od aktivnosti dopaminskih receptora.<sup>42</sup> Studije su takođe pokazale da se, u nekim slučajevima, delovanjem antidepresiva na bazi regulisanja nivoa adrenalina i serotonina popravljaju i dopaminska signalizacija.<sup>41</sup> U slučaju kada ne deluje nijedan od serotoninskih i adrenalinskih antidepresiva, govori se o dopaminskom podtipu depresije.



**Slika 2.** Signalni putevi u mozgu posredovani različitim monoaminima (adaptirano sa <https://www.teamstudy.com/>). VTA - engl. *ventral tagmental area*.

Neurobiologija depresije karakteriše se morfološkim/anatomskim promenama u određenim moždanim regionima, koje obuhvataju nekoliko limbičkih i nelimbičkih puteva u mozgu.<sup>43,44</sup> Magnetna rezonanca je dala prve dokaze atrofije hipokampusa (8 - 19 %) i smanjenja sive mase kod depresivnih pacijenata.<sup>45,46</sup> Ove promene vezuju se za poremećaj neuroplastičnosti, neuralne adaptacije,<sup>47</sup> i njenih glavnih medijatora, npr. neurotrofnog moždanog faktora (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF),<sup>48,49</sup> iz čega proističe **neuroplastična/neurotrofna teorija depresije**.

Pod terminom „neuralna plastičnost podrazumeva se niz mehanizama, od rođenja, opstanka, migracije, integracije neurona, do neurita, sinaptogeneze i modulacije sinapsi.<sup>50</sup>



**Slika 3.** Grafički prikaz BDNF - TrkB signalizacije.

Smanjenje nivoa BDNF-a, koje se uočava kod depresije, smanjuje prenos signala preko tirozin receptor kinaze B (engl. *tyrosine receptor kinase B*, TrkB), posredovanu aktivacijom fosfolipaze Cγ (engl. *phospholipase C gamma*, PLCγ) i Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin zavisnom kinazom (engl. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*, CaMK), ERK- i AKT - mTor signalnim kaskadama, koje obezbeđuju procese rasta, diferencijacije, preživljavanja neurona i sinaptičke

plastičnosti.<sup>29</sup> Pored narušene signalizacije preko BDNF - TrkB proteina, i brojnih signalnih puteva koje reguliše, stres dovodi do narušavanja interakcije između TrkB i N-metil-D-aspartat receptora (engl. *N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDAR).<sup>51</sup> Specifičnost interakcija između BDNF - TrkB i NMDAR vezuje se za procese učenja i kognitivne funkcije. Antidepresivi vraćaju nivo BDNF-a na kontrolni.<sup>52</sup> Aktivacijom elementa cAMP odgovora (eng. *cAMP response element*, CRE), preko translokacije CRE-vezujućeg proteina (eng. *CRE-binding protein*, CREB), reguliše se transkripcija proteina neophodnih za normalno funkcionisanje ćelija, poput tirozin-hidroksilaze (engl. *tyrosine hydroxylase*, TH), BDNF, c-Fos ranog gena i CRH. Pored smanjenja

broja nervnih ćelija, kod depresivnih pacijenata uočava se i poremećaj neurogeneze, te se, na osnovu istih, govori i o **neurogenoj teoriji depresije**.<sup>50,53</sup> Proces neurogeneze u hipokampusu je regulisan i zavisn od nivoa cirkulišućih steroidnih hormona, NMDAR signalizacije i serotonina,<sup>54-56</sup> što inhibira proces neurogeneze usled izloženosti stresu.<sup>57</sup> Hronični tretman antidepresivima, ali i nefarmakološki tretmani poput elektrokonvulzivne terapije, uspešno vraćaju ovaj proces u normalu, i povećavaju zapreminu hipokampusa.<sup>58,59</sup> S obzirom na veliki broj interakcija posredovanih serotoninom, vezano za elemente i medijatore neuroplastičnosti, preko interakcija BDNF-a i serotoninских receptora u procesu reorganizacije citoskeleta, interakcija serotonina i NMDAR i vezanosti serotonina za adhezivne molekule, pretpostavka je da antidepresivi vraćaju sposobnost serotonina da posreduje u neuralnoj plastičnosti ćelija.<sup>60</sup>

Posebno pogođeni delovi hipokampusa u depresiji su neurogeneza u DG subregionu, kao mestu ulaznog signala hipokampusa, i promene na nervnim ćelijama *Cornu ammonis* (CA) 1 i 3 subregiona. Na mikromorfološkom nivou, kao posledica plastičnosti hipokampusa, uočava se reverzibilno remodelovanje dendrita, kroz promene njihove dužine i razgranatosti, u CA3 subregionu.<sup>61</sup> CA3 subregion je mesto gde se intenzitet ulaznog ekscitatornog signala povećava do 600, a inhibitornog do 300 puta. Kao uzrok remodelovanja dendrita spominje se prekomerna signalizacija posredovana glavnim i najvažnijim ekscitatornim neurotransmiterom glutamatom,<sup>62</sup> aminokiselinom koja posreduje u skoro svim ekscitatornim sinapsama i čak polovinom svih neurona u mozgu.<sup>63</sup> Istraživanje signalizacije, ali i štetnog, tj. ekscitotoksičnog uticaja glutamata, poznato je kao **glutamatna teorija depresije**, koja se spominje od ranih 90-ih godina. Tada je uočeno da antagonisti NMDAR pokazuju antidepresivni efekat.<sup>64,65</sup> Hroničnom primenom antidepresiva vraća se proces remodelovanja CA3 dendrita.<sup>66</sup> Sa druge strane, brza atrofija dendrita u CA1 subregionu vezana je za aktivnost glutamatnog NMDAR. Antagonisti glutamatnog NMDAR, kao što je ketamin, pokazuju brzu antidepresivnu efikasnost, što se prema nedavnim podacima vezuje za ekscitatornu aktivnost i dugotrajnu ekscitaciju CA1 neurona.<sup>67</sup> Upravo je sinaptička plastičnost proces regulisan i signalizacijom posredovanom NMDAR, kroz regulaciju procesa dugoročne potencijacije (engl. *long-term potentiation*, LTP) i depresije (engl. *long-term depression*, LTD), pogotovo u CA1 subregionu hipokampusa.<sup>68</sup> Značajnu ulogu imaju i drugi glutamatni receptori, kao što su metabotropni (mGlu) receptori<sup>69,70</sup> i jonotropni AMPAR, koji je neophodan za modulisanje aktivnosti NMDAR i obrnuto,<sup>71</sup> kao i procesa sinaptičke plastičnosti.<sup>72</sup>

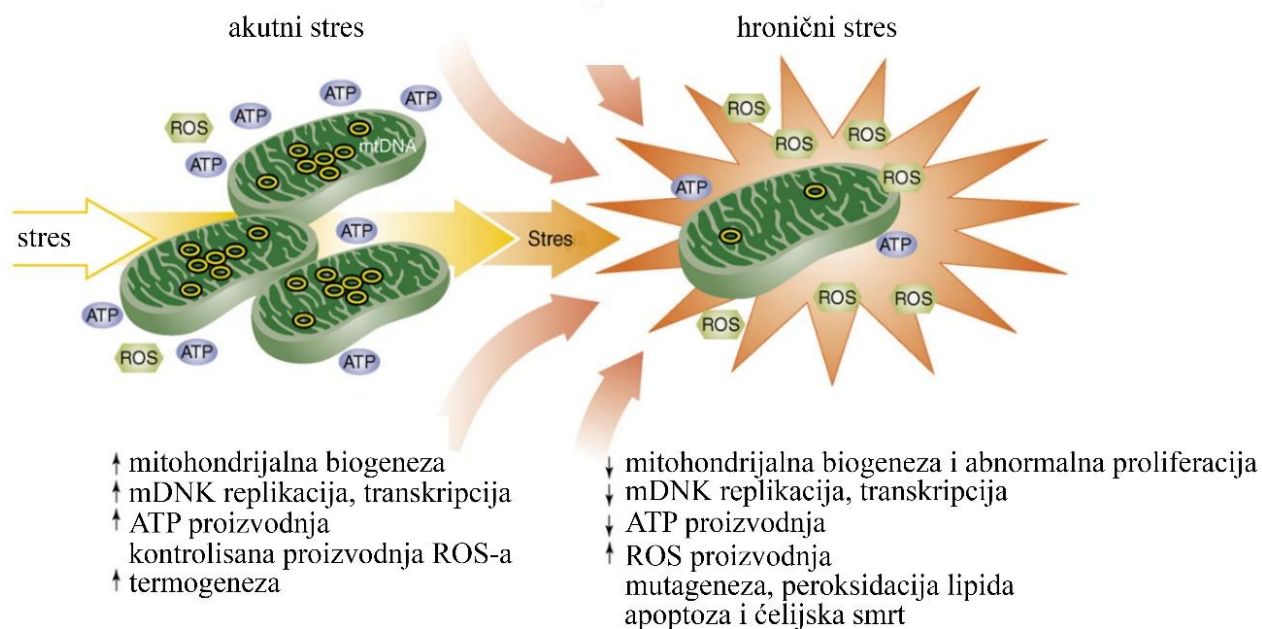
Normalno funkcionisanje nervnih procesa zasnovano je na finoj usklađenosti ekscitatornih i inhibitornih signala. Bilo koja neusaglašenost uzrokuje promene u funkcionisanju i komunikaciji između nervnih ćelija, što posleđično može biti uzrok nastanka različitih psihijatrijskih poremećaja. Iz tog razloga je istraživanje ekscitotoksičnog delovanja glutamata i signalizacije u bliskoj vezi sa ispitivanjem poremećaja inhibitornih signala u mozgu, posredovanih glavnim inhibitornim neurotransmiterom,  $\gamma$ -aminobutanskom kiselinom (engl.  *$\gamma$ -aminobutyric acid*, GABA), koji predstavlja glavni mehanizam kontrole ekscitatorne signalizacije. GABA inhibitorna signalizacija karakteristična je za trećinu inhibitornih sinapsi u mozgu, a svoje efekte ispoljava vezivanjem za neki od jonotropnih (GABA<sub>A</sub> ili GABA<sub>C</sub>) ili metabotropnih (GABA<sub>B</sub>) receptora.<sup>63</sup> Disfunkcija inhibitorne signalizacije ispituje se u domenu **GABA-ergičke teorije depresije**. Posebna pažnja u istraživanju depresije i delovanju antidepresiva je posvećena dinamici ekscitatorne i inhibitorne signalizacije posredovane glutamatom i GABA-om.<sup>73</sup>

Nekonzistentne rezultate vezane za atrofiiju hipokampusa neki naučnici vezuju sa podtipom depresije, odnosno sa prisustvom poremećaja HPA ose. Hipokampus, kao glavno mesto kontrole negativne povratne sprege HPA ose, je, kao što je navedeno, posebno osetljiv deo mozga na visoke koncentracije kortikosteroida, s obzirom na brojnost receptora koja se smanjuje u uslovima izloženosti stresu. Uticaj glukokortikoida na nastanak depresije poznat je kao **glukokortikoidna teorija depresije**. Mehanizam delovanja glukokortikoida detaljnije je objašnjen u podpoglavlju **2.1.2**. Specifične interakcije između neuroendokrinog i imunog sistema ukazuju na veću verovatnoću uključenosti oba sistema u etiologiju depresije.<sup>74</sup>

Iako sinteza glukokortikoida predstavlja najjači anti-inflamatorni odgovor organizma i raste tokom izloženosti stresu, povećan nivo pro-inflamatornih citokina i pojava inflamacije je stanje koje se vezuje za depresivni poremećaj.<sup>75</sup> Post-mortem studije su ukazale na gubitak glija ćelija u nekoliko moždanih regiona.<sup>76</sup> Glija ćelije imaju imunološku ulogu u mozgu, tako da poremećaj njihovog broja ili funkcije može značajno da poremeti funkcionisanje nervnog sistema. Primećen je porast medijatora inflamacije, kao što su proinflamatorni citokini ili proteini akutne faze, kod depresivnih pacijenata.<sup>77</sup> Takođe, primena interferona gama, kao i spoljašnja administracija interelukina, izaziva pojavu simptomatologije nalik depresiji.<sup>78,79</sup> Na osnovu ovih činjenica ustanovljena je **inflamatorna teorija depresije**. Bazirano na ovoj teoriji konstruisan je životinjski model depresije, kod koga se poremećaj izaziva injektovanjem lipopolisaharida (LPS). Uključenost astrocita ide dalje od inflamatorne teorije depresije, s obzirom da su astrociti ćelije

zadužene za uspostavljanje krvno-moždane barijere, kao i metabolizam glukoze kao glavnog izvora energije za sve nervne ćelije, ali i metabolisanje glutamata, tako da je regulacija metabolizma u mozgu pod direktnom kontrolom funkcije astrocита.<sup>80</sup>

Kako su pokazale *in vivo* studije, protok krvi i metabolizam glukoze, koje kontrolišu astrociti, izmenjen je kod depresivnih pacijenata. U stresnim uslovima, ćelije zahtevaju energiju kako bi se prilagodile na novonastale uslove,<sup>81</sup> a posebnu ulogu u smislu bioenergetske, termogene, oksidativne i reakcije u vidu apoptoze, ukoliko je potrebno, imaju mitohondrije, čime igraju važnu ulogu u odgovoru na stres.<sup>82</sup> Translokacija proteina B-ćelijski limfom 2 (engl. B-cell lymphoma 2, Bcl-2) u mitohondrije nakon vezivanja GR-a, s ciljem da se smanji stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i poveća sinteza ATP-a, ukazuje na značajnu zaštitnu ulogu glukokortikoida i mitohondrija u reakciji na stres.<sup>29</sup> Različitim stimulusima kortizol preko GR-a utiče na brojne genomske i ne-genomske efekte. Međutim, povećani nivoi glukokortikoida, prouzrokovani dužom izloženošću stresu, izazivaju suprotne, tj. štetne efekte. GR ima takođe sposobnost da se direktno veže za membranu mitohondrija, čiji potencijal menja i uslovljava prolazak citohoroma c, koji dalje pokreće proces apoptoze.<sup>83</sup> Iz navedenog se zaključuje da mitohondrijalne promene u uslovima stresa pod različitim stimulusima mogu biti zaštitne, ali i maladaptivne, u zavisnosti od otpornosti koju mitohondrije pokazuju (**Slika 4**).<sup>82</sup>



**Slika 4.** Promene na nivou funkcionisanja mitohondrija u uslovima akutne ili hronične izloženosti stresu.<sup>82</sup> ROS – reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*).

Teorija koja povezuje mitohondrijalnu disfunkciju sa patobiohemijskom osnovom depresije nazvana je **mitohondrijalna teorija depresije**.<sup>84</sup> Tome u prilog ide niz dokaza koji ukazuju na strukturna i funkcionalna oštećenja mitohondrija. Takođe, multifunkcionalnost glutamata usko se vezuje za mitohondrije. Kompleksnost mitohondrija i heterogenost njihove funkcije dodatno je uslovljena različitim lokalizacijama unutar ćelija.<sup>85</sup>

Posebna prodložnost hroničnom uticaju stresa očekuje se kod mitohondrija koje se nalaze u telu nervnih ćelija, tzv. somatskih ili nesinaptičkih mitohondrija. To su, u fizičkom smislu, mitohondrije većih dimenzija, vezane za post-sinaptičke kompartmane, podložnije promenama na nivou genske ekspresije i proteoma, što daje bolji uvid u dugoročne molekulske promene.<sup>86</sup> Heterogenost postoji i unutar grupe nesinaptičkih mitohondrija, koja može biti zavisna od tipa ćelije u kojoj se mitohondrije nalaze.<sup>87</sup> Za razliku od njih, mitohondrije locirane u sinaptičkim završecima vezane su za pre-sinaptičke kompartmane, bitne su za jonsku homeostazu i neurotransmisiju, što reflektuje dinamičku prirodu sinapsi, zavisnu od trenutnih ćelijskih potreba.<sup>88</sup> Ove mitohondrije su takođe osetljivije na oštećenja mozga i ulazak  $Ca^{2+}$ .<sup>86</sup> U zavisnosti od ćelijske lokalizacije i sredinskih faktora, uključujući stres, mitohondrije pokazuju promene na nivou broja, veličine, ekspresije i funkcionalnosti enzima oksidativne fosforilacije i signalne transdukcije.<sup>82</sup> S obzirom da je značaj ovih proteina u neutralisanju slobodnih radikala, i da njihova disfunkcija može značajno doprineti povećanju slobodnoradikalnih i drugih reaktivnih vrsta, ova teorija može da objasni oksidativni stres i promene u antioksidativnoj zaštiti tokom duže izloženosti stresu. Mitohondrijalna disfunkcija u depresiji se vezuje za poremećaje nivoa metabolita, kao i energetskeg metabolizma za koji je magnetnom rezonantnom spektroskopijom uočen pad od 26 % kod depresivnih subjekata.<sup>89</sup>

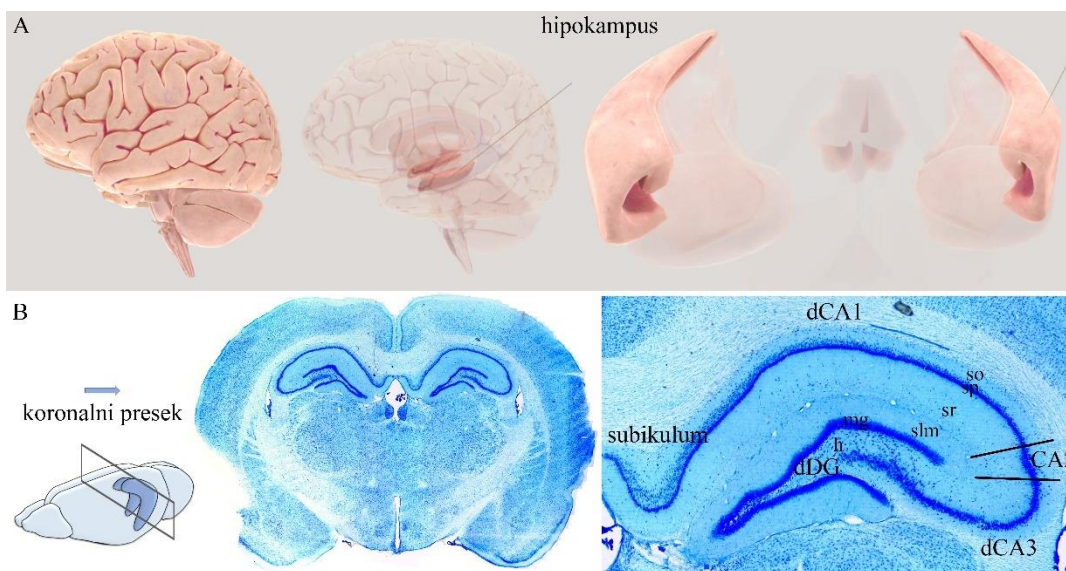
I pored velikog broja predloženih teorija, koje se najvećim delom preklapaju, etiologija depresije nije razjašnjena, a veliki broj otkrivenih morfoloških, funkcionalnih i biohemijskih promena pokazao je izuzetnu složenost i uključivanje većeg broja sistema u objašnjavanju poremećaja kao što je depresija. Još uvek nije poznato šta je inicijalni okidač koji pokreće niz navedenih biohemijskih promena u depresiji.

## 2.2. Hipokampus i depresija

Hipokampus je moždana struktura čija je osnovna uloga formiranje dugotrajne memorije, prostorne i neprostorne forme deklarativne i eksplicitne memorije.<sup>90-93</sup> Ćelije hipokampusa imaju



ulogu u integraciji prošlih događaja sa sadašnjom percepcijom budućnosti.<sup>94</sup> Ovi funkcionalni aspekti hipokampusa usko su vezani sa njegovom adaptivnom prirodom, tj. procesima neuroplastičnosti. Hipokampus je parna struktura smeštena u obe hemisfere, i prepoznaje se po gusto pakovanim neuronima, organizovanim u obliku latiničnog slova „C“. Smešten je na ivici temporalnog režnja, te je poznat i kao moždana struktura limbičkog režnja (**Slika 5**). Deo je tzv. hipokampusne formacije, a njegovu strukturu čine subikulum, CA i dentate girus (DG).

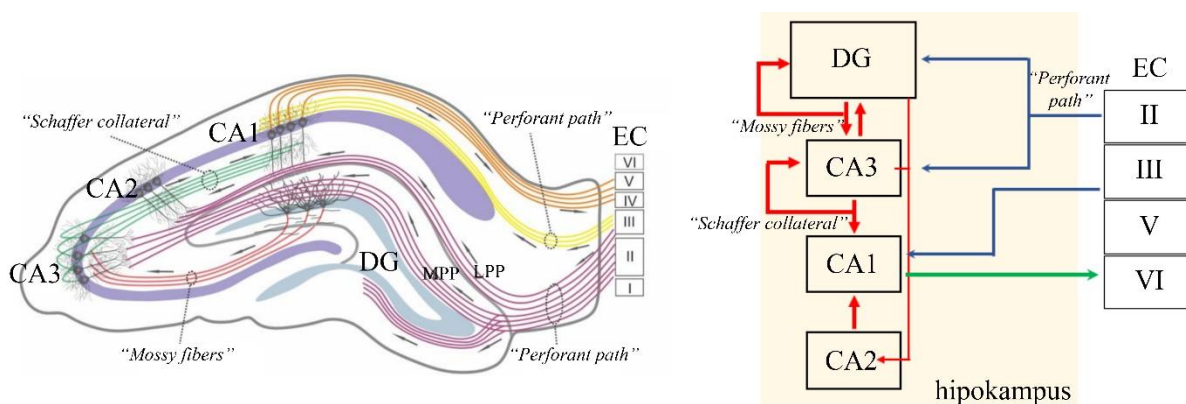


**Slika 5.** Slikovni prikaz hipokampusa u humanom (A) i mozgu pacova (B). 3D strukture humanog mozga su preuzete i modifikovane sa sajta <https://www.brainfacts.org/> (Society for Neuroscience (2017)).

CA je na osnovu morfoloških i funkcionalnih karakteristika ćelija podeljen na subregione nazvane CA1, CA2 i CA3. Subikulumom je CA1 subregion hipokampusa povezan sa entorinalnim korteksom. Takođe, struktura, morfologija i ćelijska organizacija su ono po čemu se hipokampus značajno razlikuje u odnosu na ostale moždane strukture. U hipokampusu su ćelije slojevito organizovane u „*stratum oriens*“ (so), „*stratum pyramidale*“ (sp), „*stratum radiatum*“ (sr) i „*stratum lacunosum moleculare*“ (slm) i dva sloja ćelija DG subregiona, a to su „*molecular-granular*“ (mg) sloj ćelija i „*hilus*“ (h). O složenosti hipokampusa govori i prisustvo više tipova ćelija, od kojih su najzastupljenije, i do sada najviše ispitane, piramidalne ćelije.

Različiti tipovi nervnih vlakana inervišu hipokampus, tako da ova struktura ispitivana u domenu različitih teorija depresije. Postoji nekoliko puteva kojima informacije stižu u hipokampus. Prikaz kretanja ekscitatornih signala u hipokampusu dat je na **Slici 6**. Jedan od

glavnih puteva primanja informacija je iz entorinalnog korteksa (engl. *entorhinal cortex*, EC) (engl. *perforant path*) do DG, granularnih i piramidalnih ćelija CA1 i CA3 subregiona, poznato kao trisinaptička petlja (engl. *trisynaptic loop*).<sup>95,96</sup> Posebna vrsta Šaferovih ćelija prenosi signal iz CA3 u CA1, čime obavlja važnu ulogu u procesu plastičnosti hipokampusa. DG obrađuje informacije iz EC, koje prosleđuje u CA3 subregion i, nešto manje, u CA2 subregion.<sup>97,98</sup> Sa druge strane, signali iz CA1, kao mesta najvećeg odašiljanja signala u hipokampusu, šalju se u retrosplenijalni korteks, subikulum i EC, dok se iz subikuluma vraća signal u EC. CA2 subregion prima slabe signale iz DG i CA3, a šalje ka CA1 subregionu.<sup>98</sup> Svi navedeni putevi svedoče o višesmernom prenosu informacija kroz hipokampus.



**Slika 6.** Putevi prenosa signala u hipokampusu.<sup>99,100</sup> EC – entorinalni korteks, MPP – engl. *medial perforant path*, LPP – engl. *lateral perforant path*.

Hipokampus je jedna od bitnih struktura limbičkog sistema, čija je uloga da posreduje između dobijenih informacija i procene odgovora na prisutni stresor.<sup>20</sup> Kao što je rečeno, hipokampus mehanizmom negativne povratne sprege reguliše nivo cirkulišućih glukokortikoida, s obzirom da je glavno mesto njihovog vezivanja zbog velike zastupljenosti GR i minerakortikoidnih receptora,<sup>101–103</sup> i učestvuje u alostatskom mehanizmu regulacije u odgovoru na stres, kontrolom aktivnosti HPA ose. Lezije na hipokampusu narušavaju kontrolu odgovora na stres.<sup>104</sup> Takođe, opadanje broja GR u toku života, što je proces anatomski specifičan za hipokampus, posebno u pogledu gubitka neurona u CA3 subregionu, menja ritam sekrecije glukokortikoida u odgovoru na stres u starosti.<sup>26</sup> Atrofija dendrita u CA3 subregionu nastaje i usled izloženosti psihosocijalnom stresu,<sup>105</sup> dok izloženost glukokortikoidima može izazvati i smrt piramidalnih ćelija.<sup>106</sup> Upravo je oštećenje celog hipokampusu, ili samo njegovog dorzalnog dela,

povezano sa hipersekrecijom glukokortikoida, čime je i dokazana njegova delimična, ali značajna uloga u realizaciji negativne povratne sprege.<sup>107,108</sup> Dakle, hipokampus je region koji, pored regulatorne funkcije, trpi posledice alostatskog opterećenja usled kumulativne izloženosti hroničnom stresu i povećanom nivou glukokortikoida, pri čemu dolazi do degeneracije neurona, poremećaja neurogeneze i neuralne plastičnosti i time posreduje u patološkim procesima izazvanim stresom. Neuralna plastičnost, tj. organizacija neuralnih puteva hipokampusa je važna u periodu adolescencije,<sup>109</sup> kada izloženost akutnom i hroničnom stresu uzrokuje promene na strukturnom i morfološkom nivou hipokampusa, tzv. remodelovanje, i na nivou komunikacije sa okolnim regionima.<sup>110</sup> Ove promene su vid različitih mehanizama adaptacije, tj. alostaze, ili posledica maladaptacije, tj. alostatskog opterećenja.<sup>111</sup>

Poremećaji kognitivnih procesa u depresiji su takođe ukazali na značaj hipokampusa kao regiona koji predstavlja centar zadužen za procese učenja, pamćenja i prostornog snalaženja.<sup>112,113</sup> Strukturne i funkcionalne „*neuroimaging*“ studije su pokazale posebnu osetljivost ovog moždanog regiona na stres,<sup>45</sup> kroz smanjenu zapreminu i promene oblika hipokampusa, što su potvrdile i meta-analize studija.<sup>113–115</sup> Manja zapremina hipokampusa vezuje se sa istorijom bolesti, ali i dužinom njenog trajanja, kao i kraćim vremenom ponovnog pojavljivanja bolesti.<sup>3,116</sup> Funkcionalne „*neuroimaging*“ studije su pokazale smanjen protok krvi i usporeniji metabolizam u mozgu obolelih od depresije,<sup>117,118</sup> što je takođe dovedeno u korelaciju sa nivoom kognitivnih poremećaja.<sup>119</sup> Takođe, iako postoje studije koje nisu pokazale promene u veličini hipokampusa, uočeno je da u grupi depresivnih muškaraca viši rezultati na Hamiltonovoj skali depresije pokazuju značajnu negativnu korelaciju sa zapreminom hipokampusa.<sup>120</sup> Oprečni rezultati dosadašnjih studija mogu biti posledica razlika u starosti ispitanika, polu i odgovoru na terapiju. Hipokampus je u uslovima stresa i povišenog nivoa glukokortikoida izložen poremećajima na nivou LTP-a i neurogeneze, što direkto utiče na sam proces neuroplastičnosti ovog regiona.<sup>21</sup> Sa druge strane, mehanizam delovanja antidepresiva se dovodi u vezu sa neurogenezom.<sup>121,122</sup> Sva dosadašnja znanja o uticaju stresa i promena nakon terapije antidepresivima idu u prilog značaju koji ima hipokampus u istraživanju depresije.

Strukturno-funkcionalne specifičnosti duž hipokampusa, koje su uočene ispitivanjem lezija, a potvrđene i razlikama u anatomskoj povezanosti i genskoj ekspresiji, dodatno su napravile podelu hipokampusa na dorzalni, inremedijalni i ventralni.<sup>123</sup> Prvi dokazi, koji su uputili na različite funkcionalne aspekte dorzalnog i ventralnog hipokampusa, bila je razlika u putevima

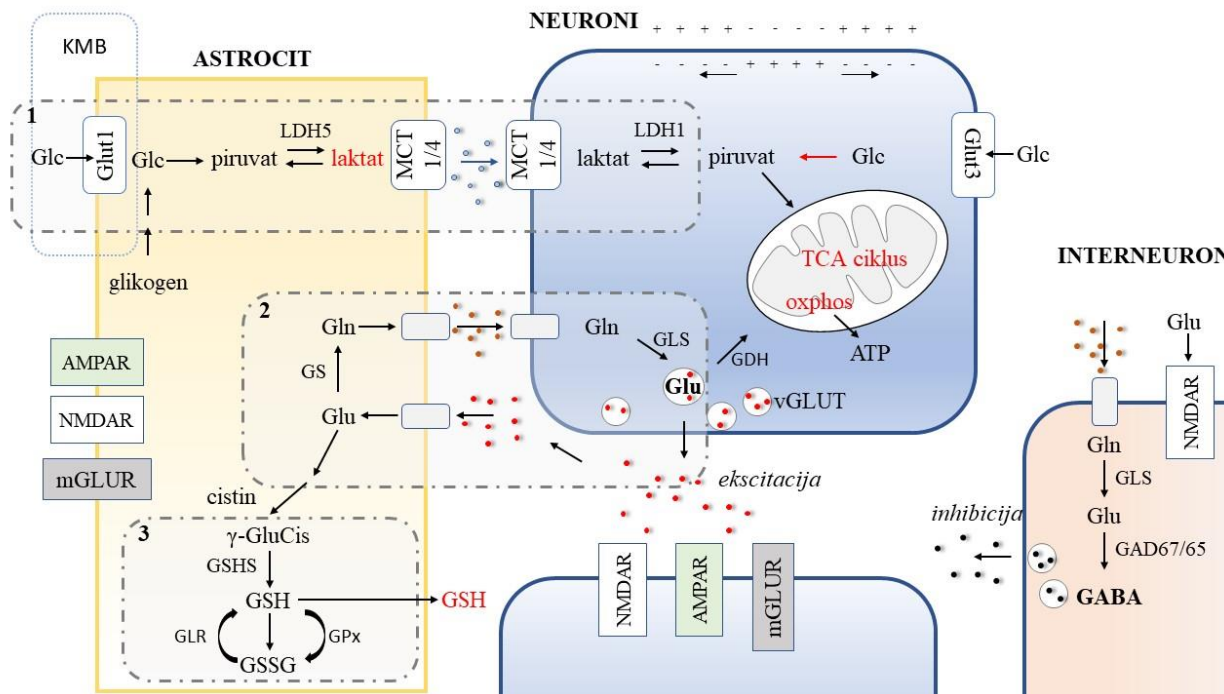
primanja i slanja signala.<sup>124</sup> Dok je dorzalni deo hipokampusa vezan za kognitivne procese, kao što su učenje i pamćenje u svrhu prostorne orijentacije, istraživanja i kretanja, ventralni deo se povezuje sa emocijama i motivacijom, i ima ulogu u procesima vezanim za anksiozno ponašanje.<sup>125,126</sup> Intermedijalna zona se vezuje za prevođenje kognitivne i prostorne spoznaje u motivaciju i akcije neophodne za preživljavanje.<sup>127,128</sup> Dorzalni hipokampus se vezuje za narušeno pamćenje nakon kraće izloženosti stresu.<sup>129</sup>

### 2.3. Biohemija hipokampusa

Promene na ćelijskom nivou i sinaptičkoj transmisiji, tj. aktivnosti ćelija, uzrokuju poremećaje sinaptičke plastičnosti, a samim tim obrade i prenosa informacija, što dovodi do morfoloških i funkcionalnih promena u hipokampusu. Skladištenje informacija se zasniva na promenama u jačini sinapsi između aktivnih neurona,<sup>130</sup> stoga je očuvanje i plastičnost međućelijskih interakcija neophodno za normalno funkcionisanje hipokampusa.

Funkcionalnost hipokampusa obezbeđuje nekoliko različitih tipova ćelija, koje se mogu podeliti na glija ćelije i neurone. Astrociti su najzastupljenije glija ćelije u centralnom nervnom sistemu. Primarna uloga im je antioksidativna i antiinflamatorna zaštita neurona. Takođe, astrociti proizvode faktore koji doprinose rastu i razvoju neurona u hipokampusu.<sup>131</sup> Uopšteno, metabolizam u mozgu je zasnovan na metaboličkoj sinergiji između glija ćelija i neurona, koja se odvija na nekoliko načina.<sup>132</sup>

Mozak čini 2 % telesne mase, a koristi čak 20 % energije u stanju mirovanja, što govori o značaju energetske procesa. Glavni izvor energije za mozak je glukoza, koju ćelije preuzimaju preko glukoznog transportera 3 (engl. *glucose transporter*, Glut3).<sup>133</sup> Pokazano je da pojačanu neuralnu aktivnost prati povećan protok krvi i upotreba glukoze, ali vrlo male promene u potrošnji kiseonika, što ukazuje da u određenim uslovima mozak koristi i neoksidativni metabolizam da zadovolji energetske potrebe.<sup>132</sup> Promene energetskeg metabolizma, sa oksidativnog ka produkciji ketonskih tela, uočene su u hipokampusu starijih pacova.<sup>134</sup> Takođe, smanjen protok krvi, praćen smanjenom potrošnjom glukoze, uočava se kod depresivnih osoba, što upućuje na kompromitovanost funkcionisanja mozga, kao i povećano angažovanje alternativnih energetskeg puteva. Na nivou među ćelijske komunikacije, jedna od osnovnih uloga astrocita je proizvodnja laktata iz glukoze preuzete iz cirkulacije, kao dopunskog/alternativnog izvora energije za neurone (**Slika 7** (1. deo)).



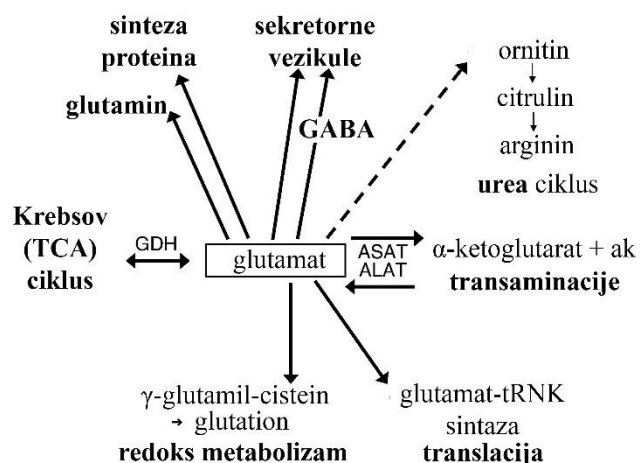
**Slika 7.** Slikovni prikaz metabolizma u mozgu baziran na interakciji astrocita i (inter)neurona. Glc – glukoza, Glut1 – glukozni transporter, MCT – monokarboksilatni transporter, LDH – laktat-dehidrogenaza, Glu – glutamat, Gln – glutamin, GAD – glutamat-dekarboksilaza, GABA –  $\gamma$ -aminobutanska kiselina, GS – glutamin-sintetaza, GLS – glutaminaza, GDH – glutamat-dehidrogenaza, GPx – glutation-peroksidaza, GLR – glutation-reduktaza, GS – glutation, oxphos – oksidativna fosforilacija, KMB – krvno-moždana barijera.

U mozgu je sinaptički potencijal energetske najzahtevniji proces.<sup>135</sup> S obzirom da je najveći broj sinapsi ekscitatoran, među kojima dominiraju glutamatne sinapse, pretpostavlja se da postoji bliska povezanost između moždane aktivnosti, glutamatne neurotransmisije, energetske potrebe i potrošnje glukoze.<sup>132</sup> U hipokampusu je komunikacija između neurona najvećim delom zavisna od glutamatne ekscitatorne i GABA inhibitorne signalizacije.<sup>97</sup> Dokazano je da su glutamatna neurotransmisija i potrošnja glukoze spregnuti procesi, a oko 80 % energetske potrošnje u mozgu ide na ovaj tip signalizacije.<sup>136</sup>

Astrociti kao i glutatomom posredovana signalizacija regulišu proces protoka krvi kroz mozak i na taj način kontrolišu nivoe dostupne glukoze.<sup>137</sup> Glutamat-glutamin ciklus (Slika 7 (2. deo)) je jedna od značajnih veza između astrocita i neurona. Astrociti održavaju homeostazu glutamata, tako što recikliraju/preuzimaju određenu količinu ove aminokiseline iz sinaptičkih pukotina, i prevode je, uz pomoć glutamin-sintetaze (engl. *glutamine synthetase*, GS), u glutamin,

tj. formu dostupnu za preuzimanje od strane neurona. U neuronima se glutamin konvertuje ponovo u glutamat, gde služi za biohemijske procese.

Zaštitna uloga astrocita oslikava se i kroz sintezu glutaciona (GSH), supstrata jednog od glavnih antioksidativnih sistema u ćelijama, GSH-zavisne antioksidativne zaštite (**Slika 7** (3. deo)). Metabolitski prekursori ove reakcije su cistein i glicin. GSH služi kao elektron donor u brojnim redoks reakcijama, i pomaže ćelijama da se izbore sa različitim reaktivnim vrstama.

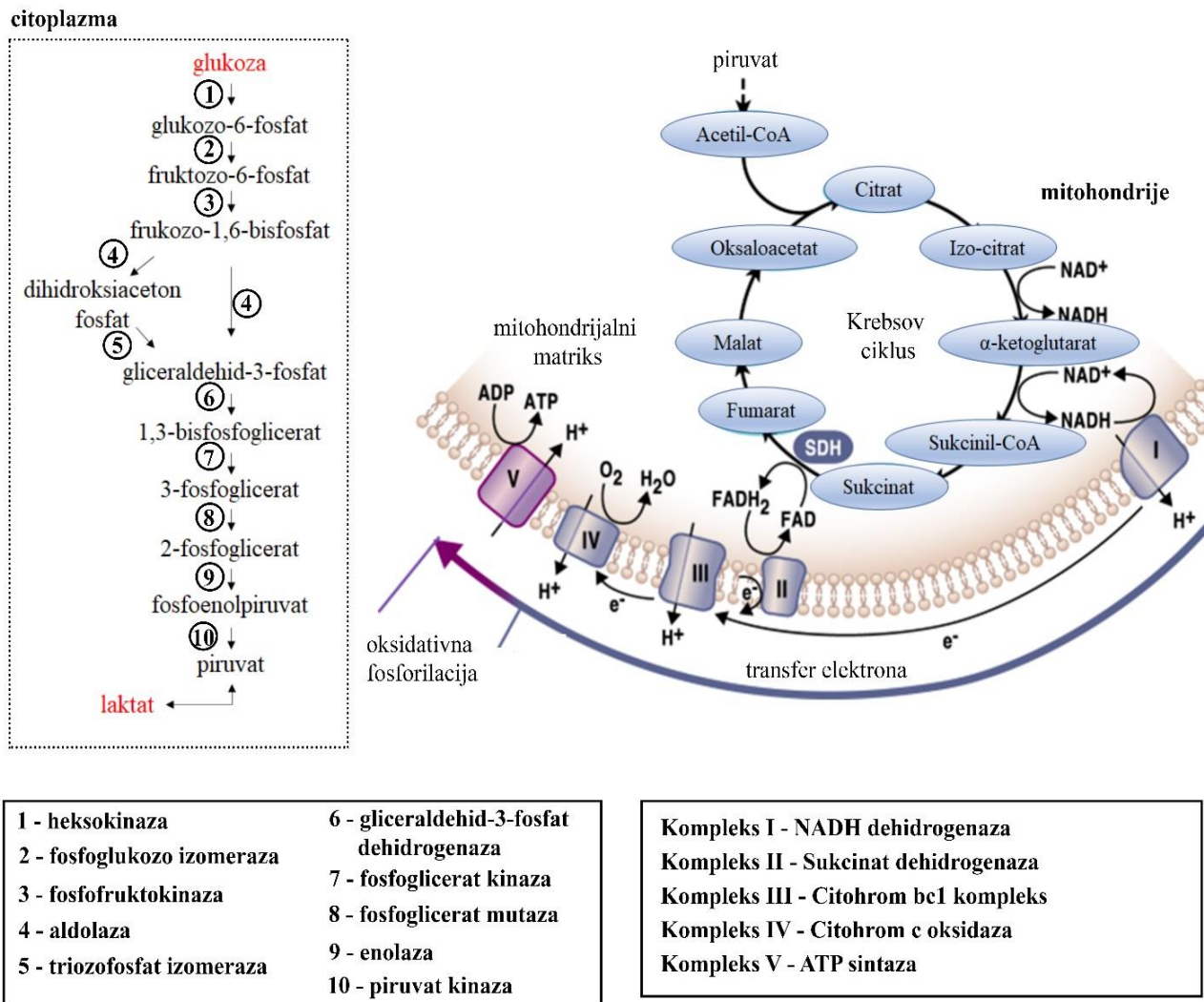


Pored neurotransmisije, glutamat je uključen u najvažnije strukturne i metaboličke procese u ćelijama, počev od sinteze proteina, do konverzije u druge metabolite neophodne za obavljanje energetskih procesa (**Slika 8**). Takođe, ključni je molekul u metabolizmu amonijaka.<sup>138</sup>

**Slika 8.** Pojednostavljena šema uloge glutamata u različitim ćelijskim procesima;<sup>138</sup> GDH - glutamat dehidrogenaza, ASAT/ALAT – aspartat/alanin aminotransferaze.

Glavni putevi metabolizma glukoze u ćeliji su glikolitički put, kojim nastaje manja količina energija (2 ATP molekula), ali i stvara piruvat i NADH/FADH<sub>2</sub>, kao ulazni supstrati za energetski produktivnije procese u mitohondrijama, Krebsov, tj. ciklus trikarboksilnih kiselina (engl. *tricarboxylic acid*, TCA) (2 ATP molekula) i oksidativna fosforilacija, energetski najisplativiji put sinteze energetski bogatih molekula (30-34 ATP molekula) (**Slika 9**).

Oksidacija glukoze, Krebsov ciklus i oksidativna fosforilacija su procesi karakteristični za sve tipove ćelija. Aktivnost uključenih enzima regulisana je koncentracijom prisutnih metabolita ciklusa, čime se dinamika samog proces usklađuje sa trenutnim potrebama ćelije. Pored toga, komunikacija mitohondrija sa ostalim ćelijskim kompartmanima i učešće u regulatornim mehanizmima se sve više pripisuje metabolitima Krebsovog ciklusa, koji regulišu različite signalne puteve i učestvuju u fiziologiji i bolesti, što može biti tkivno specifičan proces.<sup>139</sup>



**Slika 9.** Metabolizam glukoze u normalnim fiziološkim uslovima i energetske procesi Krebsovog ciklusa i oksidativne fosforilacije u mitohondrijama;<sup>139</sup> NAD – nikotinamid adenin dinukleotid, FAD – flavin adenin dinukleotid, SDH – sukcinat-dehidrogenaza.

Dinamika metaboličkih procesa u hipokampusu je od izuzetnog značaja za proces obrade informacija putem neuralne transmisije i sinaptičke plastičnosti. Sve veći broj studija ispituje ulogu metabolizma u regulaciji neuralne plastičnosti.<sup>140,141</sup> Poremećaj metabolizma i uslovljena stanja oksidativnog stresa mogu biti okidač za razvoj raznih patoloških stanja, što dobija sve veći značaj u oblasti neuronauka. Takođe, metaboliti Krebsovog ciklusa učestvuju u regulaciji dinamike mitohondrija i drugih biohemijskih procesa.<sup>142</sup> Pored značaja u energetskom metabolizmu, mitohondrije su važne u procesu biosinteze aminokiselina.

## 2.4. Životinjski modeli depresije

Uvođenje životinjskih modela u istraživanja omogućilo je da se premosti prelaz sa pre-kliničkih na klinička istraživanja, što je dalo veliki doprinos i u razumevanju depresije i mogućih mehanizama tretmana ove bolesti.

Procena valjanosti životinjskih modela zasniva se na kriterijumima kao što su: verodostojnost odraza (engl. *face validity*), valjanost konstrukta (engl. *construct validity*) i prediktivna valjanost (engl. *predictive validity*).<sup>143,144</sup> Odraz se odnosi na sličnost koja postoji između modela i modelovanog poremećaja, a koja podrazumeva sličnost na terapijskom nivou i na nivou simptomatologije. Ovo je kriterijum koji se najteže dostiže, posebno imajući u vidu nemogućnost modelovanja nekih simptoma kod životinja. Prediktivna valjanost odražava tačnost predviđanja dobijenih istraživanjem na modelu. Valjanost konstrukta je teorijsko objašnjenje upotrebe datog modela, koja podrazumeva postojanje istih molekulskih odnosa između životinjskog modela i subjekta modelovanja.

Poseban značaj dalo je istraživanje uzročno-posledične veze između stresa i socijalnog ponašanja, najviše kod glodara, i to pacova soja Wistar,<sup>145,146</sup> sa akcentom na mehanizam kojim ponovljeni stres izaziva različite fiziološke promene i promene ponašanja koje nalikuju depresiji, a koje su od značaja za istraživanje depresije kod ljudi.<sup>147</sup> Incidenca za razvoj depresije najveća je u periodu adolescencije i starijem dobu. Životni periodi pacova mogu da se koreliraju sa godinama kod ljudi, pri čemu pacovi starosti ispod 6 meseci odgovaraju periodu adolescencije kod ljudi, odnosno uzrastu ispod 18 godina.<sup>146</sup>

Životinjski modeli depresije najčešće su zasnovani na fenotipizaciji jednog ili više simptoma depresije, kao što su stanje očaja i anhedonije (smanjen interes ili uživanje), kao jedne od osnovnih karakteristika depresije. Životinje se u ponašanje nalik depresivnom najčešće uvode izlaganjem nekoj vrsti stresora, kao dobro poznatom etiološkom faktoru depresije, upotrebom hemijskog agensa, ili se koriste genetički modeli depresije.<sup>148</sup> Često korišćeni modeli su model izloženosti hroničnom stresu, model naučene bespomoćnosti, odvajanje od majke, uskraćivanje sna, poremećaj cirkadijalnog ritma. Takođe, modeli koji se dobijaju oštećenjem olfaktornih bulbosa, ili izazivanjem depresije usled indukovanja inflamacije, našli su primenu u istraživanjima. Životinjski model depresije se dobija i genetičkom manipulacijom određenih gena, kao što su homozigotni miševi sa deficijencijom gena za serotoninse receptore ili transportere,



noradrenalinske transportere, heterozigoti za vezikularni transporter 1, ili homozigoti za kanabinoidni receptor 1.<sup>148</sup>

#### 2.4.1. Model hronične socijalne izolacije pacova

Socijalne interakcije imaju uticaj na fiziološkom, psihološkom i na nivou ponašanja, a životinjske studije dale su veliki broj informacija o razumevanju mehanizma pomoću kojih socijalne interakcije utiču na zdravlje ili doprinose nastanku bolesti.<sup>149,150</sup>

Model socijalne izolacije glodara (pacova i miševa) zasnovan je na fizičkom razdvajanju životinja,<sup>151</sup> pri čemu životinje ne mogu da se dodirnu i vide, ali imaju normalna olfaktorna i auditorna iskustva.<sup>152</sup> Glodari su socijalna bića, zbog čega izlaganje uslovima hronične socijalne izolacije predstavlja tip stresa koji uzrokuje patofiziološke promene i ponašanje nalik depresivnom i anksioznom, a čiji mehanizam nastanka još uvek nije dovoljno razjašnjen.<sup>153,154</sup> Primećeno je da socijalna izolacija uzrokuje kvantitativno i kvalitativno drugačije patofiziološke odgovore u bolesti.<sup>149</sup> Prema zvaničnim podacima, žene su sklonije razvijanju depresije. Pokazano je da je kod žena, u odnosu na muškarce, povećana bazalna i stresom izazvana HPA ekscitacija.<sup>155</sup> Modulacija fiziološkog odgovora posredovanog kortikosteroidnim receptorima kod ženki, u odnosu na mužjake, pokazana je i na primeru hroničnog stresa socijalne izolacije.<sup>156</sup> Ove promene mogu biti rezultat smanjenog nivoa estradiola kod žena u stanju depresije.<sup>157</sup> Pored toga, pokazano je da postoji polno-uslovljena razlika u pogledu aktivacije signalnih puteva u odgovoru na antidepresive.<sup>158</sup> Dosadašnja iskustva pokazala su da model socijalne izolacije zadovoljava kriterijume za odabir modela, s obzirom da uzrokuje ponašanje nalik depresivnom i anksioznom, a pokazuje validnost konstrukta i dobru prediktivnu validnost na antidepresive.<sup>153,159–161</sup>

Promene koje se uočavaju na biohemijskom nivou kod glodara izloženih hroničnom psihosocijalnom stresu u saglasnosti su sa promenama uočenim kod ljudi.<sup>162,163</sup> Psihosocijalni stres hronične izolovanosti je pokazao jači efekat stresa u odnosu na stres izazvan smanjenjem životnog prostora (engl. *crowding*) kod pacova.<sup>152</sup> Gould i saradnici su pokazali da izloženost psihosocijalnom stresu narušava proces neurogeneze u DG subregionu hipokampusa.<sup>164</sup> Socijalna izolacija u različitim moždanim regionima menja nivoe dopamina, serotonina, GABA-e, glutamata i adrenalina,<sup>165,166</sup> kao i c-Fos-a, markera aktivnosti nervnih ćelija.<sup>167</sup> Na molekulskom nivou je pokazano da socijalna izolacija pojačava aktivnost i smanjuje broj mikroglija, menja njihovu morfologiju,<sup>168</sup> smanjuje nivo BDNF-a, medijatora neuralne plastičnosti u mozgu,<sup>169</sup> translocira

NF- $\kappa$ B u jedro i kompromituje glutation-zavisnu antioksidativnu zaštitu u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova.<sup>170,171</sup>

Rana istraživanja modela socijalne izolacije na pacovima, u trajanju od 3 nedelje, pokazala su neusaglašenost u pogledu uticaja na aktivnost HPA ose. Jedan broj eksperimenata pokazao je da na neuroendokrinom nivou izostaje povećanje kortikosterona, kao glavnog hormona stresa u serumu pacova odnosno glodara, kroz delimičnu deregulaciju HPA ose,<sup>172,173</sup> dok drugi ukazuju na hiperekscitaciju ose. Pokazano je da stres hronične izolacije narušava HPA sistem povećavajući bazalne nivoe relevantnih hormona u plazmi pacova (ACTH, CORT), kao i da ublažava dodatni stresni odgovor u hipokampusu, posredovan preko GR i HSP70 tokom izloženosti novom različitom akutnom stresu.<sup>152</sup> Oslabljena reakcija HPA ose na akutni stres nakon hronične socijalne izolacije pokazana je i u drugim studijama.<sup>174</sup> Neadekvatno reagovanje, u smislu porasta nivoa glukokortikoida na početku stresa, može biti štetno, s obzirom da glukokortikoidi imaju i jednu od glavnih uloga u preživljavanju u stresu.<sup>82</sup> Posebno značajni su negenomski efekti, posredovani GR-om i PI3K, ili translokacijom Bcl2 koji ima antiapoptotsku ulogu. Kako povećan, tako i smanjen, nivo glukokortikoida može biti razlog za nastanak patofizioloških stanja.<sup>26</sup> Iako su studije pokazale nekonzistentnost, vezano za promenu nivoa kortikosterona u plazmi pacova izloženih stresu socijalne izolacije, potvrđen je uticaj hronične izolacije u modifikovanju odgovora kortikosterona na novi različiti akutni stres, svedočeći tako o kompromitovanosti HPA ose.<sup>170</sup> S obzirom na zaštitni mehanizam kortikosteroida od prenaplašenog odgovora na stres,<sup>175</sup> deregulisana HPA osa je potencijalno odgovorna za razvoj neadekvatne reakcije organizma na hroničnu izloženost stresu socijalne izolacije, što je jedan od mogućih razloga za razvoj fizioloških promena koje dovode do nastanka ponašanja nalik depresivnom.

Za procenu uspešnosti životinjskog modela depresije, ili za ispitivanje antidepresivnog potencijala nekih supstanci, primenjuju se različiti testovi kojima se određuju parametri ponašanja analognog simptomima depresije kod ljudi.<sup>159</sup> S obzirom da se u životinjskim modelima prate simptomi koji odgovaraju, ali nisu istovetni simptomima depresije kod ljudi, koristi se odrednica „ponašanje nalik depresivnom“.

## 2.5. Tretman depresije

U kliničkoj praksi se pri lečenju depresije pristupa psihoterapiji, farmakoterapiji, primeni suplementacije, alternativnim pristupima poput fizičke aktivnosti, dok se kod težih i rezistentnih

formi depresije primenjuje invazivniji pristup lečenja u vidu elektrokonvulzivne terapije. Iako postoji nekoliko načina lečenja depresije, uspešnost izlečenja je još uvek na nezadovoljavajućem nivou. Veliki problem predstavlja nemogućnost praćenja uspešnosti terapije, u prvom redu prilikom izbora lekova ili odgovora na njih, s obzirom da ne postoje merljivi biohemijski parametri, specifični kako za sam nivo težine depresivnog poremećaja, tako ni uspešnosti odgovora na izabrani tretman.

### **2.5.1. Psihoterapija**

Psihoterapija, nekada dominirajući vid tretmana kod pacijenata,<sup>176</sup> podrazumeva različite vidove terapijskog pristupa, kao što su kognitivno-bihevioralna ili interpersonalna terapija. Razgovor sa psihologom ili psihoterapeutom omogućava pacijentu da se suoči sa stresovima i razvije mehanizme borbe protiv istih. Efikasnost psihoterapije su pokazale i meta-analize.<sup>177,178</sup>

### **2.5.2. Farmakoterapija**

Pedesete godine XX veka smatraju se početkom psihofarmakološke revolucije, vezana za slučajno otkriće delovanja leka protiv tuberkuloze („iproniazid“) u popravljanju raspoloženja i opšteg stanja organizma. Tadašnje otkriće pokazalo je značaj delovanja monoaminoooksidaza (MAO), odnosno nivoa monoamina u mozgu depresivnih pacijenata, što je dovelo do stvaranja MAO inhibitora kao prvog tipa antidepresiva. Pojava štetnih sporednih efekata uslovlila je intenzivniji razvoj novih bezbednijih alternativa. Do danas je razvijen značajan broj antidepresiva, koji se po mehanizmu svog delovanja svrstavaju u nekoliko klasa. Prema vremenu pojavljivanja i prisustva neželjenih efekata, mogu se podeliti na antidepresive prve i druge generacije.

Najveći broj lekova svoje delovanje ispoljava posle nekoliko nedelja upotrebe, a najčešće je potrebno tretman primenjivati nekoliko meseci, čak i nakon nestajanja simptoma depresije.

#### ***2.6.2.1. Antidepresivi prve generacije***

Prvootkriveni, danas poznati kao antidepresivi prve generacije, bili su lekovi koji su u svojoj strukturi imali tri prstena: triciklični antidepresivi. Među njima, prvi otkriven bio je imipramin, čija je terapijska primena odobrena 1959. godine.<sup>179</sup> To je bio prvi lek čiji mehanizam antidepresivnog delovanja nije bio vezan za inhibiciju MAO.<sup>180</sup> Triciklični antidepresivi efikasno ublažavaju simptome depresije, ali je pojava sporednih efekata, među kojima i veća verovatnoća

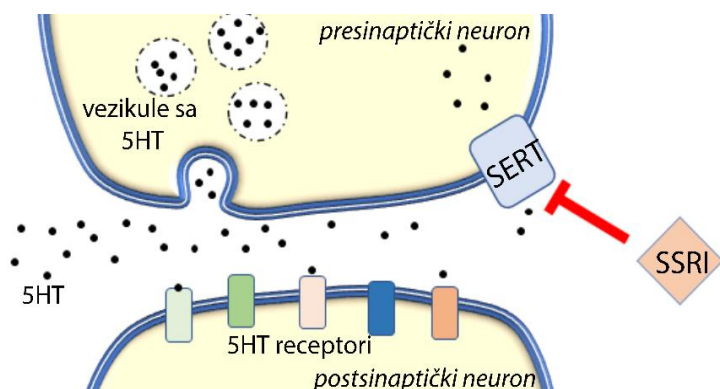
preoziranja, značajno ograničila njihovu primenu, uglavnom na pacijente koji pokazuju otpornost na ostale klase antidepresiva.

### 2.6.2.2. Antidepresivi druge generacije

Potreba da se umanje štetni efekti MAO inhibitora i tricikličnih antidepresiva, kao i novi dokazi o značaju serotonina u depresiji, doveli su do razvoja novih, bezbednijih antidepresiva sedamdesetih godina prošlog veka. Tradicionalno se verovalo da je hemijski disbalans, i posledično neadekvatna komunikacija na nivou sinapsi, glavni uzrok depresije. U skladu sa monoaminskom teorijom depresije, selektivni inhibitori preuzimanja monoamina teže vraćanju nivoa ovih molekula na normalan biohemijski nivo, ublažavajući ili neutrališući simptome depresije. Na ovom principu razvijeni su antidepresivi druge generacije. U zavisnosti od selektivnosti prema određenom neurotransmiteru, čiji nivo selektivno modulišu, razlikuju se nekoliko podklasa antidepresiva: selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) (fluoksetin, citalopram, escitalopram, paroksetin, sertralín i vilazodon) selektivni inhibitori serotonina i noradrenalina (npr. venlafaksin i nefazodon), noradrenalina (reboksetin), dopamina i noradrenalina (npr. bupropion),<sup>181</sup> kao i atipični antidepresivi (tianeptin).<sup>182</sup>

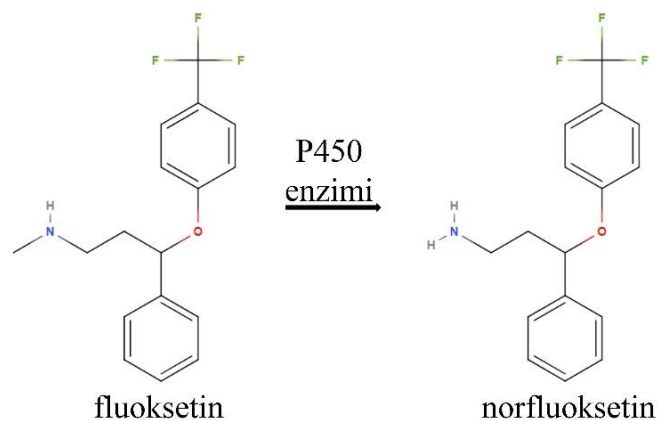
#### 2.6.2.2.1. Fluoksetin

Od pojave fluoksetina u kliničkoj praksi (1987. godine), do danas, SSRI su bile i ostale prvi izbor kod tretmana depresije. Prema osnovnom mehanizmu delovanja, SSRI lekovi sprečavaju ponovno preuzimanje serotonina, na način da blokiraju serotoninske transportere na postsinaptičkoj membrani nervnih ćelija (**Slika 10**). Indirektnim povećanjem koncentracije serotonina u sinaptičkoj pukotini, podstiče se aktivnost različitih postsinaptičkih serotoninskih receptora i nishodnih signalnih puteva.<sup>183</sup>



**Slika 10.** Shematski prikaz mehanizma delovanja SSRI antidepresiva; 5HT – serotonin, SERT – transporter serotonina.

Jedan od najčešće prepisivanih SSRI lekova je **fluoksetin** (Lilly, LY110140),<sup>184</sup> aktivna supstanca mnogo poznatijeg leka „Prozak“. Molekulska formula fluoksetina je  $C_{17}H_{18}F_3NO$ , a prema IUPAC nomenklaturi **N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluormetil)fenoksi]propan-1-amin**. Strukturno, fluoksetin je derivat difenhidramina sa dodata tri atoma fluora (**Slika 11**). Razvoj nove generacije antidepresiva i savremenijeg lečenja depresije započeo je upravo pronalaženjem novih lekova na bazi mehanizma delovanja i strukture fluoksetina.<sup>34</sup>



**Slika 11.** Hemijske strukture fluoksetina i norfluoksetina<sup>1</sup>.

Zbog lipofilnog karaktera, fluoksetin se zadržava u nekoliko tkiva, a njegova distribucija u mozgu se pokazala 2,6 puta većom u odnosu na koncentracije u plazmi.<sup>185</sup> Put razlaganja počinje u jetri, pomoću citohrom P450 enzimskog sistema, gde se racemska smeša *S/R* fluoksetina demetilacijom prevodi u racemsku smešu aktivnih metabolita *S/R*-norfluoksetina, čiji farmakološki efekat kao jedine aktivne supstance je takođe ispitan. Razlika u aktivnosti između *S*- i *R*-norfluoksetina je mnogo izraženija u odnosu na uočene razlike između enantiomera fluoksetina. *S*-norfluoksetin blokira duže, ali i dvadeset puta jače serotoninske transportere u odnosu na *R* enantiomer.<sup>186</sup> Fluoksetin i norfluoksetin, za razliku od nekih drugih SSRI lekova, blokiraju određene enzime P450 sistema i tako inhibiraju sopstveni metabolizam.<sup>187</sup> Upravo zbog nelinearne farmakokinetike,<sup>188</sup> upotreba ovog leka na duže vreme, ili u kombinaciji sa drugim lekovima, mora biti strogo kontrolisana. Fluoksetin se eliminiše iz organizma u roku od 1 do 4 dana, dok je taj period znatno duži kod njegovih aktivnih metabolita (između 7 i 14 dana). O stabilnosti *S*-enantiomera govori i podatak da je njihova koncentracija u plazmi dvostruko veća u odnosu na *R*-enantiomere posle nekoliko nedelja primene leka.<sup>189</sup>

<sup>1</sup> Strukture preuzete sa sajta MolView.

Pored toga što blokira serotoninske transportere, fluoksetin slabijim afinitetom inhibira noradrenalinske transportere i ima ulogu antagonistu serotoninskog 5-HT<sub>2C</sub> receptora.<sup>184</sup> Fluoksetin se dominantno vezuje za mitohondrije i sinaptosome.<sup>190</sup>

Veliki broj studija se bavio ispitivanjem fluoksetina i biohemijskih efekata koje njegova hronična primena izaziva u mozgu. Hronični tretman fluoksetinom normalizuje ponašanje nalik depresivnom,<sup>171</sup> modulišući neuralnu aktivnost u limbičkim delovima mozga vezanim za stresni odgovor kod hronično socijalno izolovanih životinja, posebno u dorzalnom delu hipokampusa.<sup>191</sup> Fluoksetin ponovo uspostavlja/vraća inhibitornu neurotransmisiju u dorzalnom hipokampusu, tako što sprečava smanjenja nivoa parvalbumina i GABA-sintetiškog proteina GAD67 u uslovima stresa.<sup>192–195</sup> Fluoksetin takođe pokazuje antiinflamatorna<sup>196</sup> i antioksidativna svojstva,<sup>197</sup> povećava ekspresiju sinaptičkih proteina u hipokampusu pacova,<sup>198</sup> kao i podstiče plastičnost stimulacijom BDNF ekspresije.<sup>199</sup> Fluoksetin stimuliše proces neurogeneze, čime doprinosi regulaciji odgovora na uslove hroničnog stresa, i vraćanju kontrole hipokampusa nad aktivnošću HPA ose.<sup>200</sup>

#### 2.6.2.2.2. **Tianeptin**

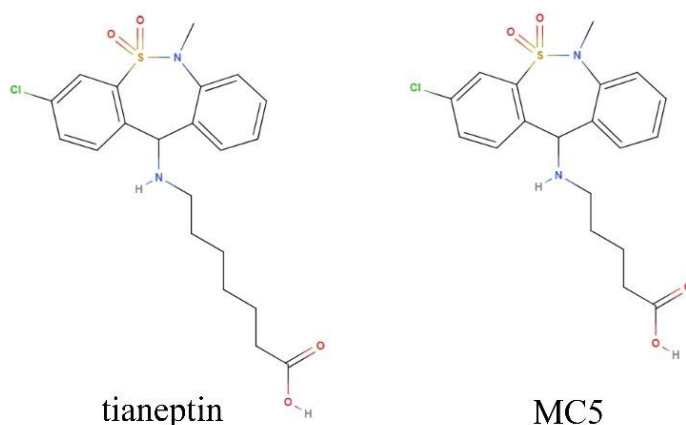
Pojavom novih dokaza o neočekivanom kretanju nivoa monoamina u mozgu depresivnih osoba, kao i dokaza o neočekivanom i neadekvatnom odgovoru na lečenje, nadmašilo je, već uveliko prihvaćenju, teoriju o hemijskom disbalansu monoamina. To je ukazalo na složeniju sliku biohemijske osnove depresije, kao i na potrebu za razmatranjem oblika tretmana zasnovanih na drugim mehanizmima.

Otkriće da lekovi, kako se prvobitno verovalo, suprotnog mehanizma delovanja u odnosu na tipične SSRI pokazuju antidepresivne osobine dodatno je zakomplikovalo istraživanja o depresiji. Prvobitno predloženo delovanje ovih antidepresiva vezivalo se za proces ponovnog preuzimanja serotonina u sinapsama od strane transportera na postsinaptičkoj membrani i tako na smanjenje nivoa ovog neurotransmitera dostupnog za prenos signala.<sup>201</sup>

Strukturno, tianeptin je **7-[(3-hloro-6-metil-5,5-diokso-11H-benzo[c][2,1]benzotiazepin-11-il)amino]heptanska kiselina**, i nalikuje strukturi tricikličnih antidepresiva (**Slika 12**).

Tianeptin su prvi put sintetisali 1981. godine Antoine Deslandes i Michael Spedding. Uporedne analize pokazale su da tianeptin poseduje efikasnost na nivou SSRI lekova, dok se terapijski efekti ispoljavaju kroz bolju toleranciju i manje sporednih efekata.<sup>202–204</sup> Tianeptin ispoljava antidepresivno dejstvo delujući na više različitih sistema.<sup>58,205</sup> Hronični tretman

tianeptinom moduliše efikasnost SERT-a, a utiče i na smanjeni kapacitet blokade SERT-a od strane SSRI antidepressiva.<sup>206</sup> Dalje, sprečava i vraća proces remodelovanja dendrita u hipokampusu,<sup>207–209</sup> podstiče GABA-ergičku signalizaciju,<sup>210</sup> povećava ekspresiju BDNF-a.<sup>211</sup> Novija istraživanja su pokazala da tianeptin nema uticaj na promene u nivoima serotonina i adrenalina. Mehanizam delovanja tianeptina se vezuje i za signalizaciju posredovanu AMPA receptorima<sup>212</sup>. Takođe, novije studije su pokazale afinitet tianeptina prema  $\mu$ -opioidnim receptorima i signalizaciji nalik kanabinoidima.<sup>213–215</sup>



**Slika 12.** Hemijske strukture tianeptina i glavnog metabolita MC5<sup>2</sup>.

Dodatno, uzimajući u obzir nootropna svojstva tianeptina, tj. sposobnost da pojača kognitivne performanse u roku od nekoliko sati, sve više nalazi primenu kod zdrave populacije.<sup>216</sup> Posledica toga je i sve veća zloupotreba leka.<sup>217</sup>

Najnoviji podaci iz humanih studija ukazuju da je nivo serotoninskih transportera snižen u toku trajanja depresivne epizode, a da sa oporavkom, ili ublažavanjem simptoma, raste i nivo ovih transportera.<sup>218</sup> To je potvrdila studija koja je pokazala uticaj kortikosteroida na smanjenje gustine, tj. ekspresije ovih transportera u hipokampusu.<sup>219</sup> Ovim mehanizmima bi ćelije obezbedile povišene koncentracije serotonina za međucelijsku komunikaciju. Mehanizam delovanja SSRI antidepressiva dodatno utiče na neufunkcionalnost ovih transportera, dok je oporavak, prema izvedenoj studiji, vezan za povećanje gustine transportera. Uočene promene u nivou transportera bi bile u saglasnosti sa mehanizmom delovanja tianeptina kojim on takođe podstiče funkcionalnost transportera i stimuliše preuzimanje serotonina.

<sup>2</sup> Strukture preuzete sa sajta MolView.

Svi antidepresivi druge generacije imaju približno istu efikasnost, ali i specifične obrasce antidepresivnog delovanja, kao što su drugačije vreme početka delovanja, kao i prisustvo sporednih efekata.<sup>220</sup> Nekada se u tretmanu kombinuju dva antidepresiva,<sup>221</sup> ili, češće, pojačava efikasnost primarno prepisanog antidepresiva dodatkom stabilizatora ponašanja,<sup>222,223</sup> anksiolitika ili antipsihotika.<sup>224,225</sup>

I pored ogromnog naučno-tehnološkog napretka, dijagnoza i lečenje depresije zahtevaju posebnu pažnju i strpljenje lekara i pacijenta, pošto se pronalaženje delotvornog tretmana zasniva na isprobavanju različitih lekova, što nekada može da potraje mesecima. Otežavajuća okolnost je i odloženi mehanizam delovanja dostupnih antidepresiva. Verovatno je iz tog razloga, prema poslednjim podacima, najveći broj antidepresiva koji su trenutno u različitim fazama istraživanja zasnovan je na potpuno drugačijem principu od monoaminskog, tj. na mehanizmu inhibicije NMDAR i brzom antidepresivnom delovanju.<sup>226,227</sup> Takođe, kreiranje više-targetnih antidepresiva, kao što su istovremeni inhibitori preuzimanja dopamina, serotonina i noradrenalina, ili kombinacija monoaminskih sa nemonoaminskim targetima, je ideja za noviji razvoj strategija tretmana bolesti.<sup>228</sup> Često izostaje adekvatan odgovor na bilo koji od tretmana, što je usko povezano sa nedovoljnim znanjem o molekulskim osnovama bolesti, i to sve zahteva mnogo veće naučno angažovanje, u smislu pronalaženja jednoznačnijih i bržih pokazatelja bolesti i bolje efikasnosti lekova. U tom smislu bi otkriće relevantnih ciljnih molekula i biomarkera bilo korak bliže ka personalizovanoj terapiji, kreiranju novih lekova sa ciljanim mestom delovanja, kao i podiglo efikasnost u borbi protiv rastućeg i nedovoljno prepoznatog problema depresije.

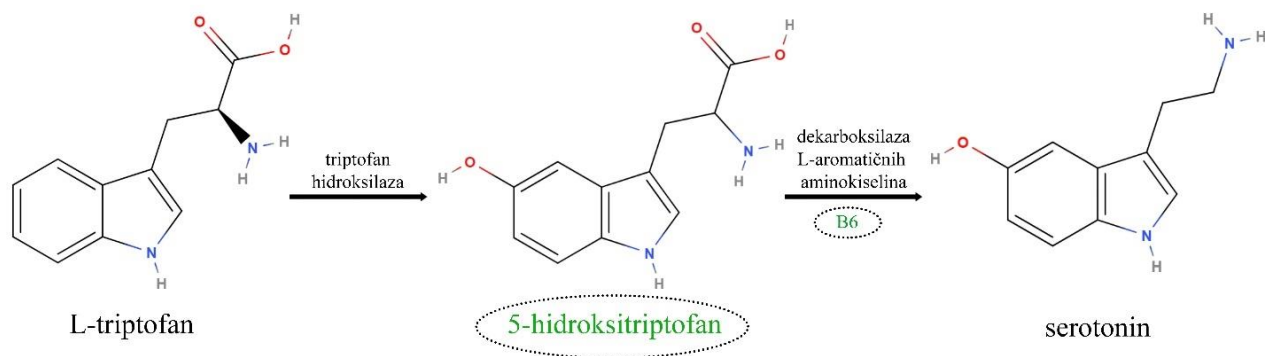
### **2.5.3. Drugi pristupi lečenju**

Uspešnost različitih vidova lečenja depresije svedoči o postojanju specifičnih mehanizama u osnovi antidepresivnog uticaja izazvanog različitim stimulusima, što ne zavisi samo od terapije lekovima. Elektrokonvulzivna terapija (ET) je najefikasniji tretman u lečenju depresije,<sup>229,230</sup> koji se zasniva na električnoj stimulaciji mozga pacijenta. Studije, urađene na istraživanju ET, su, između ostalog, dale i bitan akcenat na značaj hipokampusa kao jednog od ciljanih regiona za uočeni antidepresivni efekat. Ponovljene elektrokonvulzije doprinose povećanju zapremine nekoliko moždanih regiona, i to uglavnom hipokampusa,<sup>231,232</sup> dovode do trajnih ultrastrukturnih promena u hipokampusu, stimulisanjem procesa sinaptičke i neuralne plastičnosti, delujući posebno ciljano na nivou sr CA1 subregiona hipokampusa.<sup>233</sup> Takođe, neke studije povezuju mehanizam delovanja ET sa usporavanjem metabolizma preko uticaja na GABA-ergički sistem.<sup>234</sup>

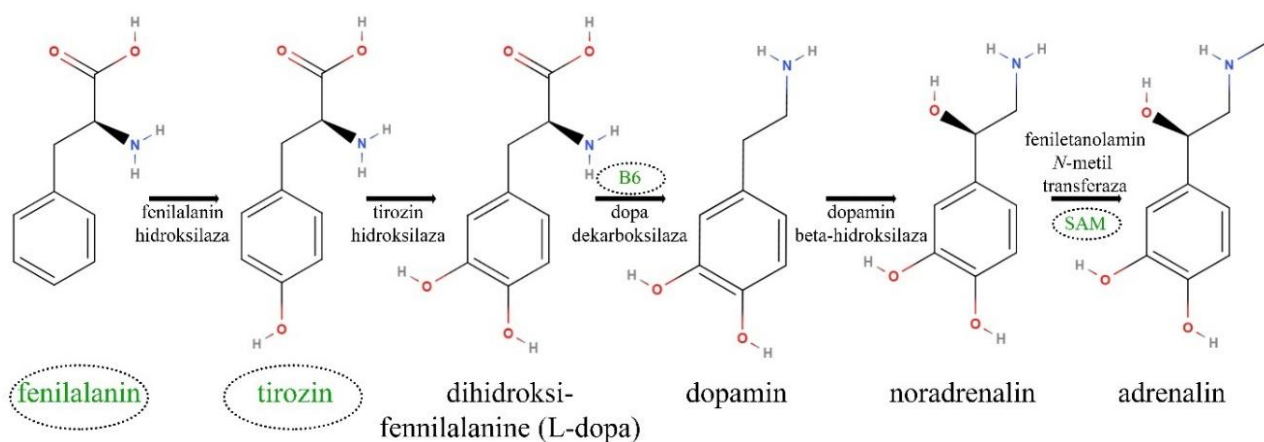


Alternativno, u lečenju depresije se mogu primeniti i metode koje se zasnivaju na uspostavljanju bolje veze između mozga i ostatka tela, što se smatra bitnim za očuvanje zdravlja: akupunktura, meditacija, masaže, terapije pomoću muzike ili umetnosti, kao i joga i fizička aktivnost,<sup>235–237</sup> koje utiču na smanjenje alostatskog opterećenja.<sup>238</sup>

Suplementacija, tj. dodatak određenih metabolita, kao što su omega-3 masne kiseline, vitamina D, jona poput  $Mg^{2+}$  ili  $Li^+$ ,<sup>239,240</sup> neke su od alternativa za pomoć u tretmanu depresivnih pacijenata. Takođe, suplementacija prekursorima sinteze neurotransmitera serotonina, metabolitima kao što su 5-hidroksitriptofan (Slika 13),<sup>241,242</sup> dopamin ili noradrenalin u formi esencijalnih aminokiselina (tirozin, fenilalanin),<sup>243</sup> ili neophodnih enzimskih kofaktora (vitamini B12 i B6, S-adenozilmetionin (SAM)),<sup>244</sup> pokazala se delotvornom u slučajevima blage ili umerene depresije (Slika 14).<sup>245</sup>



Slika 13. Hemijska reakcija prevođenja triptofana u serotonin<sup>3</sup>.



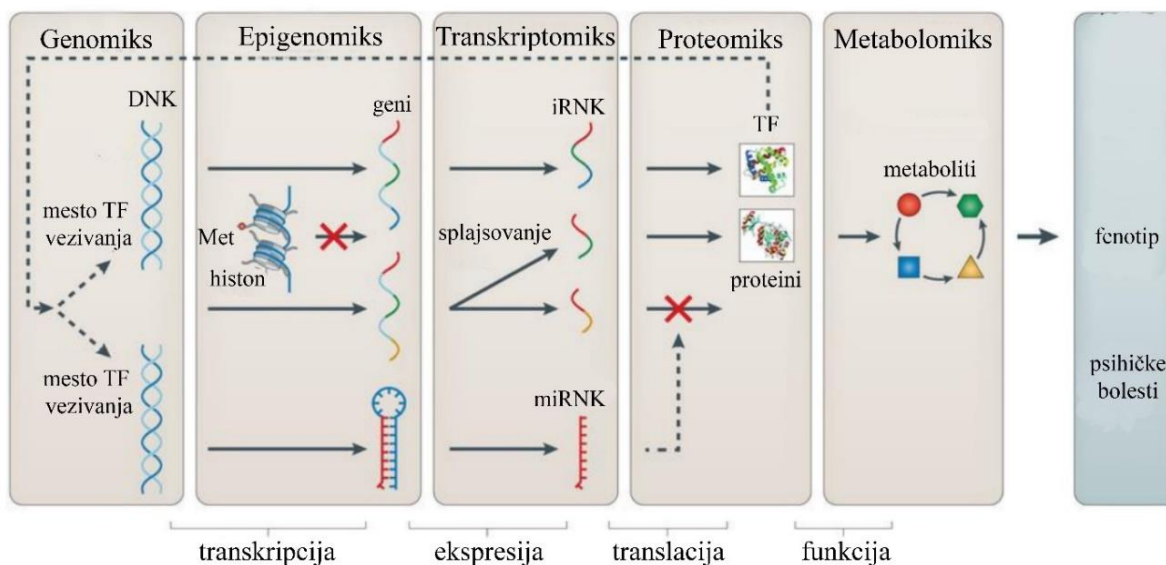
Slika 14. Put hemijskog prevođenja tirozina do neurotransmitera dopamina i nor/adrenalina<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Prikaz hemijskih struktura preuzet sa <https://molview.org/>.

## 2.6. „Omics“ u službi istraživanja bolesti

Primena „omics“-a doživela je vrhunac u poslednjoj deceniji, uglavnom zbog velike količine podataka koja se dobija, kao i sveobuhvatnijeg prikaza promena u ćelijama, tkivima ili organizmima. Sufiks „omics“ definiše primenu tehnika kao što su genomiks, epigenomiks, transkriptomiks, proteomiks ili metabolomiks, zasnovanih na analizi celokupnog skupa gena, informacione ribonukleinske kiseline, proteina ili metabolita, u uzorku u datom momentu.<sup>246</sup>

Kvantitativna „omics“ tehnologija pruža uvid u zastupljenost molekula od interesa, dajući mogućnost da se primenom adekvatnih bioinformatičkih rešenja identifikuju specifični molekulski odnosi, koji nisu uočljivi primenom metoda ciljane detekcije molekula. Pored ispitivanja promena na molekulskom nivou u uslovima bolesti ili tretmana, značaj podataka dobijenih „omics“-om je i u prepoznavanju specifičnih biomarkera, koji mogu poslužiti za rano dijagnostifikovanje bolesti i kao sredstvo za praćenje efikasnosti tretmana. U istraživačke svrhe su, do sada, uobičajeno korišćeni genomiks, transkriptomiks i proteomiks, dok je primena metabolomiksa doživela brzi skok poslednjih godina i još uvek je u razvoju (**Slika 15**). Iako je poslednja karika u nizu od svih „omics“ tehnika, metabolomiks je prvi u redu koji oslikava i direktno korelira sa fenotipom bolesti.



**Slika 15.** Hijerarhijski prikaz različitih „omics“ tehnologija u službi istraživanja bolesti i tretmana (adaptirano sa: <https://idearesourceproteomics.org/wp-content/uploads/2017/09/Basic-Proteomic-Workflow.pdf>).

Izazov za istraživače predstavlja otkrivanje kandidata biomarkera i njihovo uvođenje za ranu dijagnostiku, ili predviđanje predispozicija za nastanak neuropsihijatrijskih obolenja. Da bi se

razumela patologija depresije, važno je uočiti sve promene u biohemijskim putevima čija fenotipizacija uzrokuje depresivno ponašanje. Razvoj „omics“ tehnologija omogućio je dobijanje velikog broja podataka, čijom obradom je moguće identifikovati ciljane molekule ranog nastanka bolesti, razumeti predispozicije za razvoj neuropsihijatrijskih poremećaja, kao i praćenje toka uspešnosti lečenja.<sup>247</sup> Ovakav pristup bi omogućio „skrining“ pacijenata na biomarkere depresije, olakšavajući postavljanje dijagnoze i praćenje toka lečenja prema odgovoru pacijenta na tretman izabranim lekom.<sup>248</sup> Različite tehnike dale su moguće kandidate kao biomarkere depresije, u okviru neuroinflamacije, endokrinoloških promena, faktora rasta, neurotransmitera i metabolita, ali nijedan od navedenih nije zadovoljio kriterijume kao jednoznačni marker depresije.<sup>249</sup>

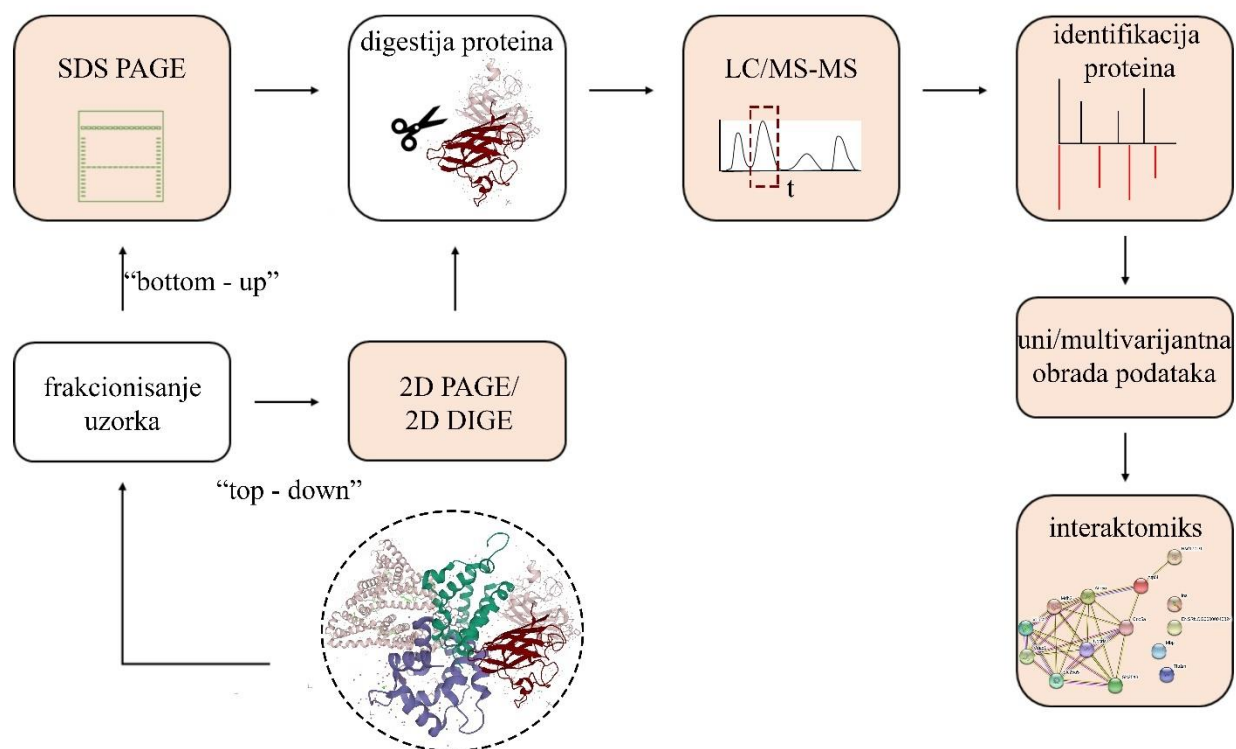
### 2.6.1. Proteomiks

Proteom predstavlja skup svih proteina u ćeliji, tkivu ili organizmu u datom trenutku. Proteomiks se kao instrumentalna metoda primenjuje za identifikovanje i/ili određivanje zastupljenosti proteina u uzorku. Ideja komparativnog proteomiksa je da se praćenjem promene nivoa proteina u uzorku, kao odgovor na neki stimulus (stres, lek), identifikuju određeni biohemijski putevi ili procesi od značaja za razvoj određene patologije ili odgovora na tretman.

U zavisnosti da li analiziramo poznate ili nepoznate proteine, proteomiks se izvodi targetovanim i netargetovanim pristupom. U zavisnosti od koraka u kom se vrši kvantifikacija proteina, razlikuju se „bottom-up“ i „top-down“ proteomiks kojim se smanjuje vreme i trošak metode, a daju informacije o proteinskoj degradaciji, izoformama i post-translacionim modifikacijama (**Slika 16**). Međutim, i danas „**top-down**“ pristup, iako noviji, ima ograničenja u poređenju sa „bottom-up“, posebno u pogledu broja proteina koje je moguće detektovati.<sup>250</sup>

„**Bottom-up**“ proteomska analiza se tradicionalno izvodila primenom elektroforetskog razdvajanja proteina, praćena digestijom proteina do peptida, razdvajanjem istih primenom tačne hromatografije sa visokim/ultra performansama (eng. *high-ultra performance liquid chromatography*, H(U)PLC), što smanjuje kompleksnost ispitivanog uzorka, i, na kraju, naknadna identifikacija proteina primenom masene spektrometrije (eng. *mass spectrometry*, MS).<sup>251</sup>

Netargetovani „bottom-up“ proteomiks omogućava identifikaciju na hiljade proteina u biološkom uzorku. Poslednji korak je kvantifikacija peptida, koja se može izvršiti pomoću izotopskog, izobarskog obeležavanja proteina ili peptida, kao i „label-free“ kvantifikacijom, koja odražava broj merenja prekursora ili tranzicionih jona na relativnom ili apsolutnom nivou, primenom obeleženog proteina ili peptida.<sup>252–254</sup>



**Slika 16.** Shematski prikaz proteomske analize uzorka; 3D strukture proteina preuzete sa: <https://www.rcsb.org/> (PDB: 1RWY, 2XYK, 6WUW, 6Z3V).

Postoje brojne komercijalne i „online“ dostupne platforme za obradu proteomiks podataka, kao što su STRING ili Blast2go. Pored statističke analize, one nude mogućnost olakšane interpretacije velikog broja podataka na osnovu interaktomiksa. Interaktomiks, zasnovan na targetovanju promjenjenih biohemijskih puteva na osnovu proteomske analize i specifičnih protein-protein interakcija dostupnih u bazama podataka, značajno doprinosi targetovanju jednog ili više relevantnih signalnih puteva u bolesti, kao i odgovoru na tretman.

Proteomska analiza je mnogo puta korišćena u karakterizaciji različitih patoloških stanja, a u slučaju depresije uočava se velika raznolikost puteva koji su označeni kao potencijalno nefunkcionalni, što je pokazatelj da smo još uvek daleko od jednoznačnog definisanja proteinskog targeta i biomarkera depresije. Specifičnost primene analize na humanim tkivima zahteva rad sa postmortem uzorcima pacijenata, što je svakako ograničavajući faktor koji utiče na oskudan broj radova na ovom polju.<sup>255</sup> Prve humane studije su urađene na frontalnom korteksu i hipotalamusu, a danas se moždani metabolizam na proteomskom nivou istražuje i pomoću cerebrospinalne tečnosti,<sup>256</sup> ili seruma pacijenata.<sup>257–259</sup> Iz navedenih razloga, proteomiks je u najvećoj meri bio

usmeren na studije sa animalnim modelima, koje su pokazale važnu ulogu sinaptičkih mitohondrija cingulatnog korteksa u osnovi anksioznog poremećaja,<sup>260</sup> energetske i sistema šaperona, neuroplastičnost i regulaciju oksidativnog stresa u ventralnom hipokampusu pacova,<sup>261</sup> neurogeneze i oksidativnog metabolizma u hipokampusu.<sup>262</sup>

Usavršavanje instrumentalnih tehnika, praćeno razvojem kompjuterskih sistema i bioinformatike, omogućilo je primenu proteomiksa za analizu mnogo složenijih bioloških sistema, od laboratorijskog istraživanja do kliničkih, u formi personalizovane medicine.<sup>250</sup>

### 2.6.2. Metabolomiks

Metaboliti su molekuli niskih molekularnih masa (< 1 kDa), koji se karakterišu različitim fizičko-hemijskim svojstvima, i koji predstavljaju supstrate i proizvode biohemijskih reakcija. Obuhvataju širok spektar klasa hemijskih jedinjenja, među kojima su šećeri, masne kiseline, aminokiseline i nukleotidi. Skup svih metabolita u ćeliji, tkivu, ili organizmu, u datom trenutku predstavlja metabolom. Metabolomskom analizom se istražuje uticaj određenog faktora na biološki sistem, tako što se određuje zastupljenost ciljanih, ili svih identifikovanih metabolita u uzorku u datom momentu. Iz navedenog proizilazi da je glavni cilj metabolomiksa istraživanje ciljanih biohemijskih puteva, ili pravljenje celokupnog metabolomskog profila biološkog sistema, nastalog kao odgovor na prisustvo nekog stimulusa.

Metabolomiks je jedno od najbrže razvijajućih istraživačkih polja, ali se u brojnim oblastima u kojima nalazi primenu tek očekuje napredak i odgovori na brojna važna pitanja. Metabolomiks je oblast koja objedinjuje instrumentalne tehnike, biohemiju i obradu podataka.<sup>263</sup> Iako je kao metoda prvobitno razvijan sa ciljem identifikovanja specifičnih biomarkera,<sup>264–266</sup> danas daje sve veći doprinos u konstruisanju biohemijskih mehanizama različitih procesa.<sup>267</sup>

Metabolomiks je već našao primenu u prekliničkim istraživanjima, za nekoliko bolesti centralnog nervnog sistema.<sup>268,269</sup> Uopšteno, metabolomiks pruža uvid u biohemijske procese i poremećaje na molekularskom nivou koji su u osnovi bolesti, pronalaženju biomarkera bolesti, i u otkrivanju dijagnostičkih biomarkera za lakše praćenje terapije, što je put ka individualnom pristupu lečenja.<sup>270–272</sup> Preplitanje znanja dobijenog metabolomiksom sa rezultatima genomiksa, transkriptomiksa i proteomiksa, igra sve veću ulogu u karakterizaciji biohemije ćelija i tkiva.<sup>273</sup>

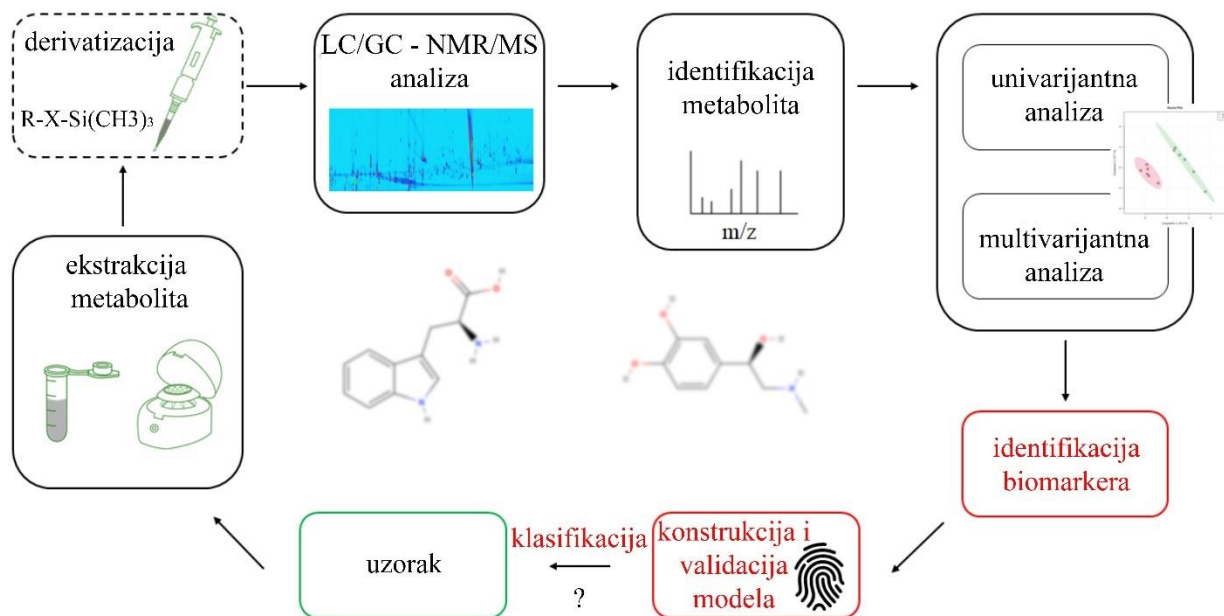
Uvođenje metabolomiksa u istraživačku praksu dopunilo je nedostatke drugih „omics“ tehnologija.<sup>274</sup> Metabolomiks ima blagu prednost, pošto sumira uticaje genomske i sredinske

faktora, i na taj način je najbolje merilo za procenu biohemijske aktivnosti u realnom vremenu. Metaboliti najpribližnije oslikavaju funkcionalnost i dinamiku biohemijskih procesa. Međutim, ovu vrstu analize potrebno je kontrolisati na više nivoa, s obzirom na osetljivost dinamike metabolita u biološkom sistemu, i njihovu podložnost modifikacijama shodno sredinskim faktorima, što se posebno odražava na varijacije unutar grupa. Korelacijom promena metabolita sa fenotipskim promenama otkrivaju se novi aspekti biohemijskih mehanizama, što daje nove alate i mogućnosti kontrole ćelijske regulacije.

Kao kod proteomiksa, i kod metabolomiksa se razlikuju netargetovani i targetovani pristup analize, što zavisi od postavljene hipoteze i zahteva istraživanja. Netargetovanim pristupom detektuju se svi joni u određenom opsegu masa.<sup>275</sup> Ovo je slabije primenjivana grana metabolomiksa, zbog niza ograničenja metoda i analize podataka koje su vremenom značajno prevaziđene. Prema dostupnim podacima u Pubmed bazi, do sada je objavljeno 1720 radova na temu netargetovanog metabolomiksa.

Koraci u izvođenju metabolomske analiza zavise od prirode analiziranih metabolita i dostupnih metoda za razdvajanje molekula (**Slika 17**). Na osnovu mehanizma razdvajanja metabolita, razlikuju se kapilarna elektroforeza, tečna ili gasna hromatografija (engl. *gass chromatography*, GC), koje su u sprezi sa MS, a svoju primenu nalazi i nedestruktivna metoda nuklearne magnetne rezonance (NMR). S obzirom da je GC metoda izbora analize metabolita u ovoj disertaciji, ona će biti detaljnije objašnjena.

Identifikacija molekula pomoću MS ima blagu prednost, u pogledu osetljivosti, u odnosu na NMR,<sup>276</sup> što je važno za detekciju umerenih promena u nivou metabolita u biološkim sistemima, a zasnovana je na detekciji jona molekula i jona raspada, merenjem odnosa mase i naelektrisanja ( $m/z$ ). Dobijene  $m/z$  vrednosti, retencionna vremena, kao i intenziteti jona, predstavljaju metabolomski „otisak prsta“ (engl. *metabolomic fingerprint*) uzorka.<sup>277</sup> Kao tehnike jonizacije, u metabolomiksu se najčešće koriste elektrojonizacija (engl. *electron impact ionisation*, EI) i elektrosprej jonizacija, dok kao analizator najčešću promenu nalaze ciklotron rezonantni, orbitrap i „time of flight“ (TOF), ali i analizatori manje rezolucijel kao što su jonske klopke, kvadrupolni ili tripl-kvadrupolni analizatori.<sup>276</sup> Generisani hromatogrami porede se sa dostupnim spektrima u bazama podataka, gde se na osnovu raspodele jonskih masa identifikuje jedinjenje.



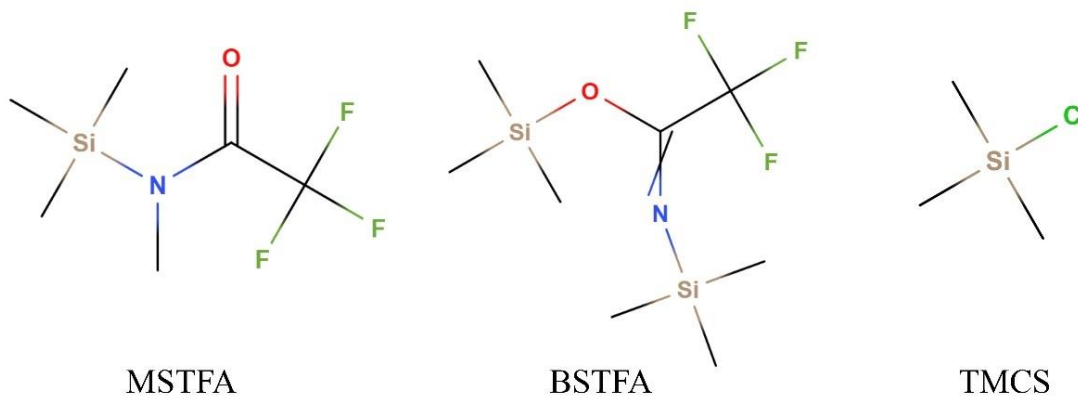
**Slika 17.** Šematski prikaz koraka metabolomske analize. Prikazi laboratorijskih instrumenata preuzeti su sa sajta <https://www.labicons.net/index.html>, a hemijske strukture metabolita su adaptirane sa sajta <https://molview.org/>.

### 2.6.2.3. Gasna hromatografija

Razvoj metoda za metabolomsko profilisanje, zasnovanih na GC razdvajanju metabolita, jedna je od ključnih prekretnica u razvoju moderne analitičke hemije.<sup>278</sup> Razdvajanje molekula GC metodom radi se na osnovu razlika u njihovoj isparljivosti, koja je definisana prisustvom određenih funkcionalnih grupa, odnosno fizičko-hemijskim karakteristikama metabolita. Zbog niže isparljivosti određenih klasa jedinjenja, i prisustva polarnih funkcionalnih grupa, kao što su hidroksilne, karboksile, tiolne, amino i imino grupe, potrebno je uraditi proces derivatizacije, kojim se povećava isparljivost tih jedinjenja, utiče na termostabilnost, time i proširuje opseg detektabilnih analita.<sup>279,280</sup> Izborom (smeše) rastvarača za izolaciju definišu se klase jedinjenja, tj. metabolita koji se izoluju iz uzorka.

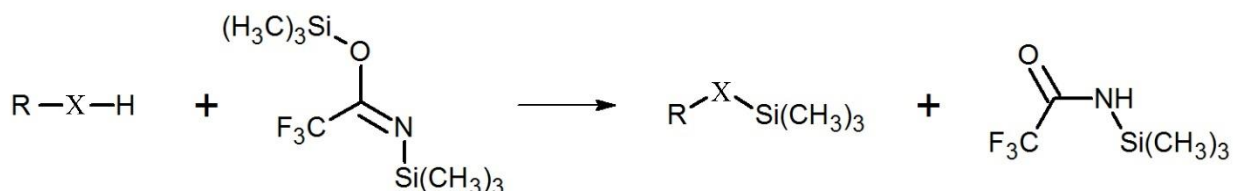
Postoji više načina derivatizacije jedinjenja za GC, kao što su: silanizacija, acilacija, alkilacija, esterifikacija i trans-esterifikacija.<sup>279,281</sup> Najčešći postupak derivatizacije baziran je na silanizaciji, gde su reagensi različiti derivati trimetilsilil-, butidildimetilsilil-, i drugih alkilsilil- i arilsilil- grupa. Najčešću primenu nalaze: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (engl. *N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*, MSTFA) i N,O-di(trimetilsilil)trifluoroacetamid

(engl. *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*, BSTFA) i, tradicionalno, trimetilhlorsilan (engl. *trimethylchlorosilane*, TMCS) (**Slika 18**), koji omogućavaju derivatizaciju i identifikaciju najvećeg broja jedinjenja sa različitim funkcionalnim grupama.<sup>282</sup>



**Slika 18.** Hemijske strukture najčešće korišćenih silanizacionih reagenasa.

Ovi reagensi prevode polarna jedinjenja, kao što su šećeri, alkoholi, fenoli, karboksilne kiseline, amidi i amini, u termostabilne i isparljive derivate, mehanizmom supstitucije vodonika u -OH, -NH ili -SH grupama, najčešće trimetilsilil (TMS) grupom (**Slika 19**).<sup>283</sup> U ovom slučaju se dobijaju joni, kao što su TMS estri, TMS etri, TMS amini i TMS amidi, čija je masa uvećana za 72, koliko iznosi masa trimetilsilil grupe, odnosno 144, u zavisnosti od broja supstituisanih atoma vodonika. Postoji veliki broj reagenasa za silanizaciju jedinjenja. U istraživanjima se najčešće primenjuju MSTFA i BSTFA,<sup>277</sup> uz dodatak TMCS, u srazmeri 99:1 % (w/w), koji povećava efikasnost procesa derivatizacije. Posebno značajan dodatak TMCS je kod derivatizacije amida i sekundarnih amina.



**Slika 19.** Hemijska reakcija derivatizacije jedinjenja pomoću BSTFA reagenasa.

Kako bi se sprečilo stvaranje višestrukih derivata, usled prisustva enola u uzorcima, radi se metoksilacija uzoraka. Metoksilacijom karbonilnih grupa postiže se bolja pokrivenost metabolita koji se detektuju GC-MS metodom. U te svrhe se najčešće koristi metoksiamin hidrohlorid (engl. *methoxyamine hydrochloride*, MOX) u piridinu, tj. anhidrovanoj sredini, dajući stabilne ciklične



forme ketale i acetale, koji mogu da se dalje derivatizuju.<sup>279</sup> Danas se uobičajeno derivatizacija izvodi kroz korake metoksilacije i derivatizacije bioloških uzoraka. Faktori kao što su dostupnost, pouzdanost, efikasnost i ekonomičnost su doprineli širokoj upotrebi GC analize kupolovane sa masenim spektrometrom i kvadrupolnim analizatorom.<sup>276</sup>

Kao kod proteomske analize, metabolomiks studije izvedene na postmortem tkivima su ograničenog broja, time i značaja. Analize urađene s ciljem identifikacije specifičnih biomarkera imaju manji značaj u karakterizaciji biohemijskih poremećaja i targetovanju molekula, a veći za primenu u kliničkoj praksi.<sup>284</sup> Međutim, i pored dosadašnjih napora, ne postoji klinički dostupan marker depresije i tretmana bolesti.

GC-MS analiza je, kao najčešće korišćena metoda u metabolomiksu, našla primenu u raznim istraživanjima na humanim uzorcima,<sup>285</sup> životinjama<sup>286–289</sup> i biljkama.<sup>290</sup> Veliki pomak je napravilo uvođenje druge dimenzije, odnosno pojava GC×GC tehnike 1990-ih godina, što je značilo napredak u kvalitetu razdvajanja metabolita, i mogućnost analize kompleksnijih bioloških sistema. Dosadašnja istraživanja su pokazala prednost primene GC×GC-MS u odnosu na GC-MS, u pogledu identifikacije i kvantifikacije metabolita.<sup>291,292</sup>

Sveobuhvatna GC×GC–MS analiza je mnogo manje korišćena tehnika, i smatra se relativno novim pristupom analize, koju naučnici karakterišu kao najmoćniju tehniku ispitivanja isparljivih i polu-isparljivih jedinjenja.<sup>293</sup> Do sada je davala rezultate u oblasti neuropsihijatrijskih istraživanja, kao targetovana analiza metabolita koji doprinose razvoju neurodegenerativnih bolesti.<sup>294</sup> Sa druge strane, netargetovani metabolomiks ima veliki potencijal za otkrivanje ne samo biohemije depresije, nego i signalnih puteva važnih za delovanje različitih klasa antidepresiva, zbog nekonzistentnosti njihovog delovanja na nivou receptora. Istraživanja pomoću GC×GC našla su primenu u humanim,<sup>295–297</sup> životinjskim<sup>291,298,299</sup> i istraživanjima na biljkama i mikro-organizmima. Metabolomiks daje potpuno novi značaj rezultatima proteomske i genomske analize, približavanjem fenotipskim promenama koje su zavisne od metabolomskog obrasca. Pored ove, prednost izvođenja je i ekonomičnost postupka u odnosu na druge „omics“ metode. Budućnost analize složenih bioloških sistema leži u integrisanju rezultata različitih „omics“ analiza, odnosno interaktomiksu,<sup>300</sup> s obzirom da svaka od „omics“ tehnika daje uvih u specifičnu listu promena vezanih za bolest i njen tretman.<sup>246</sup>

### 2.6.3. Obrada „omics“ podataka

Primena novorazvijenih instrumentalnih tehnika dostiže nove okvire zahvaljujući ubrzanom razvoju hemometrije, softverskih i bioinformatičkih rešenja. To je omogućilo da se velika količina podataka obrađuje na novi, smisleniji način, i da se svim tim rezultatima dodeli dimenzija biološkog značenja. Postoji nekoliko pristupa obrade podataka, koje se grubo grupišu na univarijantne i multivarijantne analize.

Pored uobičajenog pristupa univarijantnih testova, počev od *t*-testa ili ANOVA-e, postoje analize koje uzimaju u obzir širu sliku odnosa između varijabli, a koja uključuje ne samo međugrupne razlike određene promenljive, nego i specifične odnose i korelacije između različitih molekula. Globalizacija veštačke inteligencije, u formi mašinskog učenja, zauzima sve veće mesto u različitim granama nauke. Danas se različiti algoritmi mašinskog učenja koriste u obradi kompleksnih „omis“ podataka, a sve više i u metabolomskim studijama.<sup>301,302</sup> Cilj je konstruisanje modela na osnovu obučavajućeg skupa podataka.

Najčešće korišćene metode multivarijantne obrade su analiza glavnih komponenti (engl. *principle component analysis*, PCA) i (ortogonalna) metoda delimičnog najmanjeg kvadrata (engl. *partial least square*, PLS).<sup>303,304</sup> PCA je tzv. multivarijantna analiza bez nadzora (engl. *unsupervised*), koja se zasniva se na linearnoj transformaciji promenljivih u set linearnih promenljivih, poznatih kao glavne komponente, kojima se vrši pojednostavljivanje podataka kroz redukovanje dimenzije. PLS se svrstava u multivarijantne regresione analize sa nadzorom (engl. *supervised*) i primenjuje se za identifikovanje „omics“ obrazaca i pravljenje tzv. klasifikatora na osnovu konstruisanog „omics“ profila, odnosno za potrebe diskriminantske analize (engl. *discriminant analysis*, DA).<sup>305-307</sup> Kod ove metode se značaj svake promenljive interpretira direktno, na osnovu tzv. „loading“ vektora koji oslikavaju doprinos svakog molekula diskriminaciji između različitih grupa.<sup>308</sup> Takođe, multivarijantne analize pod nadzorom koriste se za identifikaciju biomarkera, što je jedna od osobina klasifikatora, koji mora da bude validiran i da zadovolji kriterijume prediktivnosti, osetljivosti i specifičnosti.<sup>308,309</sup> Takođe, neki od najčešće korišćenih alata mašinskog učenja za klasifikaciju su „Random forest“ (RF),<sup>310</sup> neuralne mreže i „Support vector machines“. RF je tzv. „tree-based“ klasifikator, koji omogućava regresiju i grupisanje podataka na osnovu vrednosti „out of bag“ (OOB) greške.<sup>311</sup> Iako ova vrsta identifikacije seta biomarkera još uvek nije našla primenu u kliničkoj praksi, dosadašnje studije su ukazale na značajan potencijal u budućnosti.<sup>312</sup>

„Online“ dostupne platforme za analizu metabolomskih podataka, kao što je „MetaboAnalyst 5.0“, nude „user-friendly“ pristup velikom broju korisnika.<sup>313</sup> Bioinformatički alati za obradu i umrežavanje velike količine podataka još uvek su u razvoju, tako da se najveći dometi primene „omics“ analiza tek očekuju.

### ***3. CILJEVI***

---

- Identifikacija subproteomskih promena u citosolu i nesinaptičkim mitohondrijama (NSM), i posredno identifikacija dereguliranih biohemijskih puteva u: (a) hipokampusu pacova koji pokazuju ponašanje nalik depresivnom, usled izloženosti stresu hronične socijalne izolacije, i (b) pacova podvrgnutih hroničnom tretmanu antidepresivima fluoksetinom ili tianeptinom (poslednje 3 nedelje izloženosti 6-nedeljnoj socijalnoj izolaciji).
- Određivanje metabolomskih obrazaca i biomarkera u hipokampusu pacova koji: (a) pokazuju ponašanje nalik depresivnom, indukovano stresom hronične socijalne izolacije i (b) nakon hroničnog delovanja (3 nedelje) antidepresiva fluoksetina ili tianeptina u hipokampusu kontrolnih pacova i pacova koji pokazuju ponašanje nalik depresivnom, uzrokovanih izlaganjem stresu hronične socijalne izolacije.
- Ispitivanje zavisnosti metabolomskih promena i promena ponašanja životinja korelacijom rezultata metabolomske studije i vremena imobilnosti u testu prinudnog plivanja, kao merila stanja očaja i jednog od aspekata ponašanja nalik depresivnom kod pacova.

## ***4. MATERIJAL I METODE***

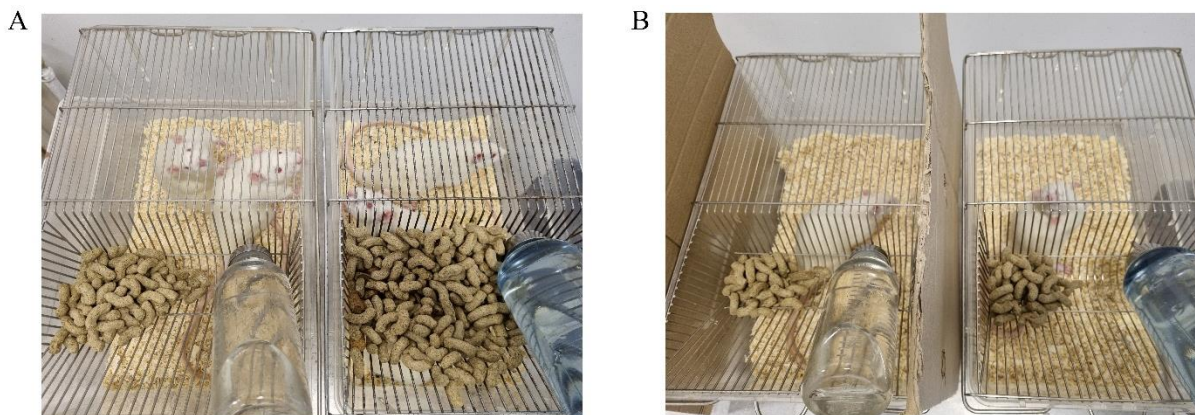
---

## 4.1. Životinje

Za potrebe ove disertacije korišćeni su mužjaci odraslih pacova (lat. *Ratus norvegicus*) soja Wistar, starosti 2 – 2,5 meseca i mase 250 - 300 g, uzgajani u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju (090). Životinje su uzgajane u standardnim uslovima ( $22 \pm 1$  °C; vlažnost  $55 \pm 10$  %) uz 12 h dan/noć svetlosni režim i stalnu dostupnost hrane i vode (komercijalna hrana za pacove). Rad sa laboratorijskim životinjama bio je u skladu sa etičkim normama i direktivama. Etičku dozvolu za rad sa životinjama izdala je Etička komisija za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, koja prati smernice „Srpskog udruženja za upotrebu životinja u istraživanju i obrazovanju“ (engl. *Serbian Laboratory Animal Science Association*, SLALA). Protokol studije odobren je od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu, Etički komitet (dozvole 323-07-01893/2015-05 i 323-07-02256/2019-05).

## 4.2. Životinjski model depresije

Za uvođenje životinja u ponašanje nalik depresivnom, korišćen je standardni model hronične socijalne izolacije. Na početku eksperimenta, pacovi su podeljeni u dve jednake eksperimentalne grupe: kontrolnu (K) i grupu životinja podvrgnutih hroničnoj socijalnoj izolaciji (IS). Kontrolna grupa životinja uzgajana je u standardnim uslovima, a životinje su bile raspoređene po kavezima u grupama od tri do četiri jedinke. U grupi socijalno izolovanih životinja, jedinke su pojedinačno smeštane u kaveze, bez vizuelnog i taktilnog kontakta sa drugim jedinkama, ali uz normalna auditorna i olfaktorna iskustva (**Slika 20**). Između kaveza pojedinačno raspoređenih životinja postavljane su kartonske pregrade.



**Slika 20.** Uzgajanje kontrolne (A) i socijalno izolovane (B) grupe životinja.

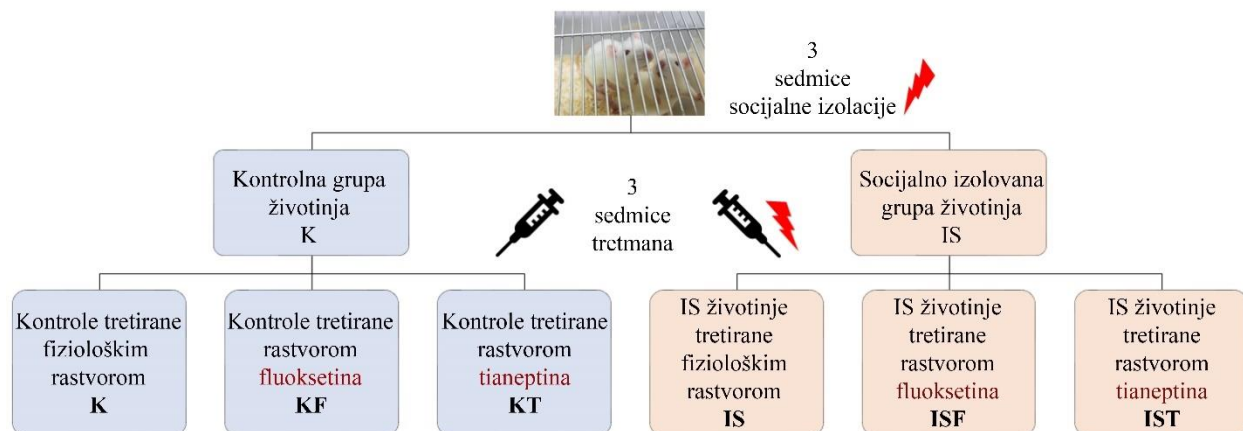
Za svaku proteomsku i metabolomsku analizu, kao i za validaciju uzoraka, pripremana je nova serija životinja prema navedenom protokolu.

### 4.3. Priprema rastvora lekova i njihova aplikacija

U eksperimentalnom radu korišćene su tablete Flunisan (Hemofarm, Vršac), koje sadrže 20 mg fluoksetin-hidrohlorida kao aktivne supstance, i tablete Coaxil (Servier d.o.o), koje sadrže 12,5 mg tianeptin-natrijuma kao aktivne supstance. Tablete lekova su smrvljene do praškaste forme u avanu, a zatim rastvorane u fiziološkom rastvoru (5 mg/mL) (1 tableta fluoksetina, odnosno tianeptina, u 4 mL, odnosno 2,5 mL fiziološkog rastvora), uz mešanje na magnetnoj mešalici (1 h). Rastvori su potom prebačeni u ultrazvučno kupatilo ( $2 \times 10$  min), i naknadno procedeni kroz filter papir (Whatman No. 42). Dodatnu sterilizaciju ekstrahovanog leka obezbedilo je ceđenje kroz Millex PES membranske filtere, veličine pora 0.22  $\mu$ m (Merck Millipore Ltd.). Rastvori lekova su istom procedurom pripremani na svaka dva dana. Koncentracije fluoksetina (4,20 mg/mL) i tianeptina (3,94 mg/mL) u rastvoru određene su primenom visoko efikasne tečne hromatografije (HPLC) sa UV skenirajućim detektorom (PDA).<sup>171,314</sup>

Šematski prikaz tretmana životinja dat je na **Slici 21**. Prve tri nedelje eksperimenta, životinje nisu bile podvrgavane nikakvim tretmanima, osim merenja mase, koje je ponavljano od početka do kraja eksperimenta na nedeljnom nivou. Druge tri nedelje eksperimenta, polovina životinja iz obe grupe je na dnevnom nivou dobijala intraperitonealne (i.p.) injekcije rastvora fluoksetina (15 mg/kg) ili tianeptina (10 mg/kg), dok je druga polovina bila tretirana injekcijama fiziološkog rastvora (0,9 % NaCl) u trajanju od 21 dan.





**Slika 21.** Šematski prikaz tretmana životinja; K - kontrola, IS – socijalno izolacija, T – tianeptin, F – fluoksetin.

Lekovi su ubrizgavani svakog dana od 09 - 12 h. Doze fluoksetina i tianeptina odabrane su na osnovu literaturno dostupnih podataka o koncentracijama lekova u serumu pacijenata, uspešno tretiranih lekovima koje sadrže fluoksetin i tianeptin kao aktivne supstance. Dobijena koncentracija fluoksetina u serumu, nakon tri nedelje administracije i 24 h nakon poslednje doze, određena UPLC-MS metodom, bila je  $280 \pm 29$  ng/mL kod kontrolne grupe životinja, i  $230 \pm 6$  ng/mL kod hronično socijalno izolovanih životinja.<sup>171</sup> Zbirna doza fluoksetina i norfluoksetina u plazmi, niža od 500  $\mu$ g/L, se vezuje za pozitivnije terapijske efekte leka, a pacijenti koji su tretirani terapijski delotvornim dozama Prozaka (20 - 80 mg dnevno) prema studijama su imali zbirne koncentracije metabolita ispod 500  $\mu$ g/L.<sup>188</sup> U serumu tretiranih životinja je LC-MS metodom, nakon tri nedelje administracije i 24 h nakon poslednje doze, određena koncentracija tianeptina od  $12 \pm 1,15$  ng/mL, kod kontrolne grupe, i  $13,40 \pm 0,81$  ng/mL kod hronično socijalno izolovanih životinja.<sup>315</sup> Koncentracije lekova su pripremane tako da ukupna zapremina ubrizganog rastvora bude oko 1 mL. Merenjem pacova na nedeljnom nivou rađeno je prilagođavanje količine apliciranog leka.

#### 4.4. Testovi ponašanja

Za određivanje uticaja hronične socijalne izolacije i hroničnog tretmana antidepresivima primenjeni su testovi kojima se procenjuje ponašanje pacova pre početka eksperimenta, na kraju 3. i 6. nedelje eksperimenta. Merenje anhedonije, stanja očaja i anksioznosti, su parametri ponašanja kod pacova koji ukazuju na ponašanje nalik depresivnom i anksioznom.

#### 4.4.1. Saharozni test

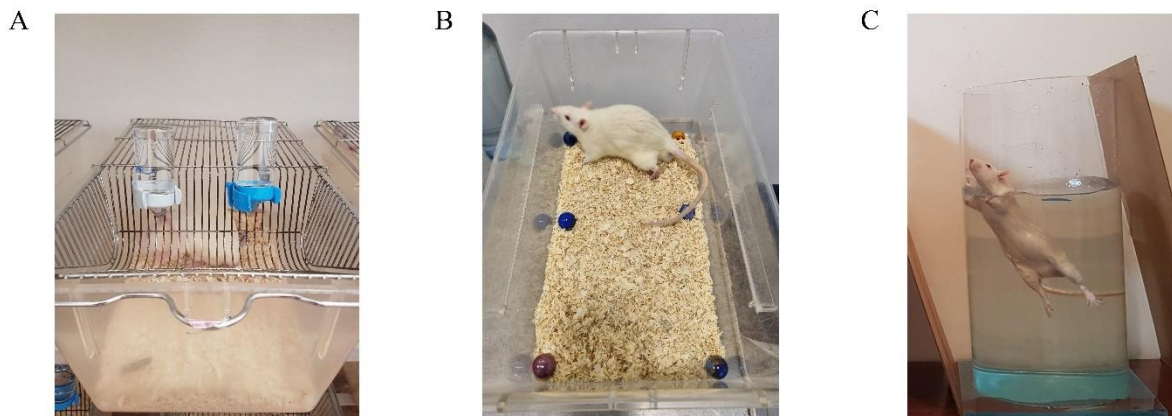
Saharozni test se u životinjskim modelima depresije koristi za određivanja anhedonije, jedne od ključnih karakteristika depresivnog ponašanja.<sup>316,317</sup> Anhedonija se definiše kao stanje smanjenja, ili odsustva uživanja i motivacije. Test se zasniva se na merenju zainteresovanosti pacova da piju zaslađen vodeni rastvor u jutarnjim časovima, u periodu između 10 - 11 h. Pojedinačno smeštenim pacovima, bez pristupa hrani, stavljaju se na raspolaganje dve jednake, prethodno izmerene, flašice tečnosti, od kojih jedna sadrži običnu vodu, a druga 2 % (w/v) rastvor saharoze (**Slika 22A**). Nakon sat vremena meri se zapremina popijenih tečnosti, na osnovu kojih se izračunava procenat popijene saharoze u odnosu na ukupnu zapreminu popijene tečnosti.

#### 4.4.2. Test zakopavanja klikera

Depresija je često praćena pojavom anksioznosti. Test zakopavanja klikera se koristi kao merilo anksioznog ponašanja kod pacova.<sup>318</sup> U kaveze sa pojedinačno smeštenim životinjama, bez pristupa hrani i vodi, duž ivica kaveza, po površini piljevine, poreda se šest staklenih klikera prečnika 2,5 cm (**Slika 22B**). Nakon pola sata, određuje se broj klikera koje je pacov sakrio ispod piljevine. Broj sakrivenih klikera korelira sa anksioznošću pacova. Testovi su izvođeni u jutarnjim časovima, u periodu između 9 - 10 h.

#### 4.4.3. Test prinudnog plivanja

Test prinudnog plivanja je jedan od najčešće korišćenih testova za određivanje ponašanja nalik depresiji, kojim se ispituje beznadežno ponašanje pacova, tj. stanje očaja, a posebno za ispitivanje antidepresivnih svojstava. Imobilnost koju pokazuju pacovi odražava stanje niskog raspoloženja i bespomoćnosti.<sup>319</sup> U providnom cilindru od pleksiglasa, napunjenom česmenskom vodom ( $24 \pm 1$  °C) do visine od 30 cm, kamerom je snimano ponašanje pacova tokom 5 min (**Slika 22C**). Određivano je vreme tokom plivanja, plutanja i penjanja. Imobilnost podrazumeva odsustvo bilo kakvog pokreta kod pacova, osim onog neophodnog za održavanje iznad nivoa vode. Plivanje predstavlja voljne pokrete pacova uz angažovanje sve četiri šape. Penjanje se karakteriše kao uzdizanje pacova uz zidove cilindra. S obzirom da predstavlja najinvazivniji od primenjenih testova ponašanja, test prinudnog plivanja je rađen poslednji, 24 h nakon saharoznog testa i testa zakopavanja klikera.



**Slika 22.** Testovi ponašanja, preferencija ka saharozi (A), test zakopavanja klikera (B) i test prinudnog plivanja (C), izvođeni za određivanje parametara koji ukazuju na ponašanje nalik depresivnom ili anksioznom.

Kvantifikovanje je urađeno od strane dva eksperimentatora, bez uvida u primenjeni tretman na ispitivanim pacovima. Rezultati su prikazani u sekundama i predstavljaju vreme koje je pacov, u toku 15 min, proveo u nekom od navedena tri ponašanja.

#### **4.5. Žrtvovanje pacova i izolovanje tkiva**

Životinje su žrtvovane 24 h nakon poslednjeg tretmana lekom ili fiziološkim rastvorom. Pacovi su prvobitno anestetizirani i.p. ubrizgavanjem smeše anestetika ketamina (100 mg/kg) i ksilazina (5 mg/kg) (Richter Pharma ag / Bioveta). Posle uzimanja krvi iz srca, pacovi su perfundovani ohlađenim fiziološkim rastvorom i dekapitovani pomoću giljotine (Harvard Apparatus, Holliston, MA, SAD). Za što kraće vreme, izolovani su celi mozgovi pacova i potom celi hipokampusi (obe hemisfere), koji su zamrznuti u tečnom azotu. Hipokampusi korišćeni za proteomsku analizu čuvani su smrznuti do upotrebe na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hipokampusi upotrebljeni u metabolomskoj analizi su, nakon zamrzavanja u tečnom azotu, smrvljeni u avanu na suvom ledu, i u praškastoj formi čuvani na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.

## 4.6. Priprema uzoraka, molekulske analize i validacije rezultata proteomske analize

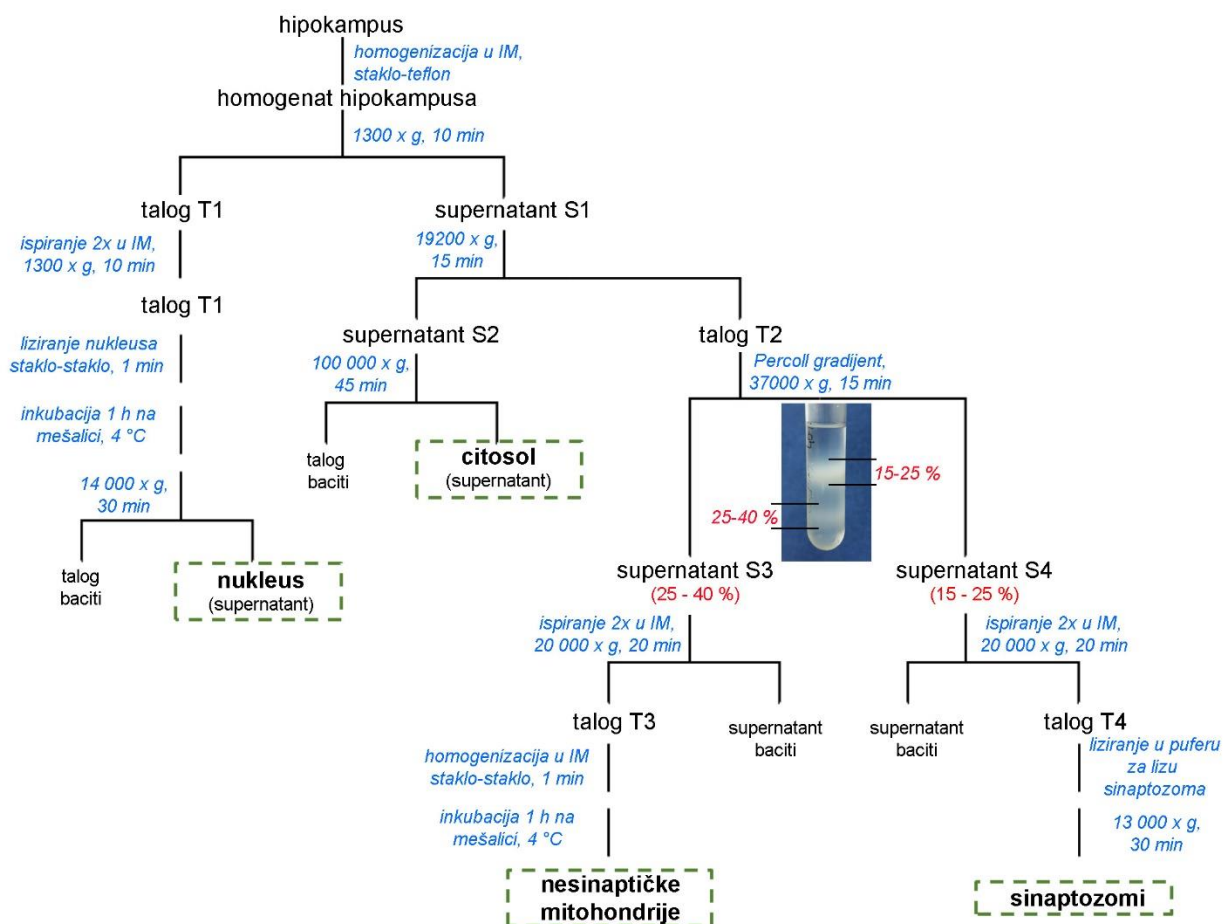
### 4.6.1. Izolovanje frakcija hipokampusa za LC × MS analizu stresirane i/ili fluoksetinom tretirane grupe uzoraka

Priprema citosolnih i frakcija obogaćenih NSM urađena je opisanom protokolu po Peter Dunkley-ju, uz male izmene.<sup>320</sup> Po tri pulovana hipokampusa blago su homogenizovana u puferu (5 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,25 M saharoza), koji je sadržao proteazne inhibitore (1 tableta na 50 mL rastvora) (cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche), sa 10 zaveslaja na 800 obrtaja/min, u Potter-Elvehjem staklo-teflon homogenizeru, na 4 °C. Centrifugiranjem na 1000 × g tokom 10 min, odvajena su jedara. Iz supernatanta su u formi taloga, dobijenog centrifugiranjem na 17 000 × g, tokom 15 min, odvajane frakcije mitohondrija, tj. frakcije koje sadrže sinaptosome i NSM. Preostali supernatant, koji predstavlja citosolnu frakciju, je centrifugiranjem na 100 000 × g, 60 min. (na 4 °C) prečišćen od prisustva peroksizoma. Za odvajanje frakcije sinaptosoma i NSM korišćen je Percoll gustinski gradijent (15 %, 24 % i 40 % (v/v)).<sup>321</sup> Gradijenti su centrifugirani na 30 700 × g, tokom 8 min, na 4 °C, a potom su sakupljane frakcije sinaptosoma, na granici između 15/25 %, i NSM, na granici između 25/40 % gradijenta. Da bi se uklonio Percoll iz prikupljenih frakcija, urađeno je ispiranje u deset zapremina homogenizacionog pufera, uz centrifugiranje na 14 000 × g, tokom 30 min, na 4 °C. Mitohondrije su resuspendovane u puferu (5 mM Tris-HCl pH 8,1; 0,5 mM EDTA) i lizirane u staklo-staklo homogenizeru. Procedura prečišćavanja frakcija jedara i sinaptosoma opisana je u narednom poglavlju.

### 4.6.2. Izolovanje frakcija hipokampusa za LC × MS analizu tianeptinom tretirane grupe uzoraka

Postupak izolovanja ćelijskih frakcija prikazan je na **Slici 23**. Za izolovanje ćelijskih frakcija, celi hipokampusi su homogenizovani u 5 mL hladnog (4 °C) homogenizacionog pufera (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,25 M saharoza), koji je sadržao proteazne inhibitore (1 tableta na 50 mL rastvora) (cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Roche), sa 10 zaveslaja na 800 obrtaja/min, u Potter-Elvehjem staklo-teflon homogenizeru. Centrifugiranjem homogenata na 1 300 × g, 10 min, u talogu ostaju jedra (T1), dok je preostali supernatant (S1) korišćen za izolovanje citosola i mitohondrijalnih frakcija. Talog T1 je dodatno ispran u homogenizacionom puferu, pri istim

uslovima. Isprani talog jedara je potom homogenizovan u puferu za lizu jedara (10 mM Tris -HCl, pH 7,4; 0,25 M saharoza; 0,5 M NaCl), koji je sadržao proteazne inhibitore, u staklo-staklo homogenizeru 1 min, na ledu, a potom i dodatno homogenizovan, provlačenjem homogenata kroz špric i sterilnu medicinsku iglu 26G. Posle 1 h mešanja na 4 °C, homogenati jedara su centrifugirani 30 min na 14 000 × g. Supernatanti predstavljaju jedarne frakcije.



**Slika 23.** Šematski prikaz izolovanja frakcija hipokampusa; IM – izolacioni medijum.

Supernatant S1 centrifugiran je na 19 200 × g, 15 min, kako bi se odvojio talog (T2), koji sadrži mitohondrijalnu i sinaptozomalnu frakciju. Dobijeni supernatant S2 je frakcija citosola, koja je dodatno centrifugirana na 100 000 × g, 45 min, prilikom čega su odvojeni peroksizomi, a preostali supernatant je prečišćena citosolna frakcija.

Mitohondrije i sinaptozomi, koji se nalaze u talogu T2, razdvojeni su na Percoll (GE Healthcare) gradijentu. Pripremani su gradijenti 40/25/15 %, koji su pažljivo nadslojavani u epruvete, tako da ostane uočljiv prsten između slojeva. Talog T2 je resuspendovan u 15 % Percoll-

u, pre nadslojavanja u epruveti. Gradijenti su centrifugirani na  $37\,000 \times g$ , 15 min. Skupljene su frakcije NSM (S3) na granici između 25 i 40 % Percoll-a, dok se na granici slojeva 15 i 25 % Percoll-a nalaze sinaptozomi (S4).

Supernatanti S3 i S4 su isprani 2 puta u homogenizacionom puferu, i centrifugirani na  $20\,000 \times g$ , 20 min, kako bi se uklonio Percoll. Dobijeni su talozi NSM (T3) i sinaptozoma (T4). Talog T3 je rastvoren u izolacionom medijumu sa proteaznim inhibitorima i homogenizovan u staklo-staklo homogenizeru, 1 min. Nakon 1 h inkubacije na mešalici na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , alikvoti su čuvani u zamrzivaču do upotrebe. Talog sinaptozoma (T4) liziran je u puferu za lizu sinaptozoma (6 mM Tris-HCl, pH 8,1), gde je pucanje membrana izvršeno osmozom. Nakon centrifugiranja, na  $13\,300 \times g$ , 30 min, izdvojeni su supernatanti, koji predstavljaju frakciju sinaptozoma.

#### 4.6.3. Određivanje koncentracije proteina u frakcijama hipokampusa

Koncentracije proteina u frakcijama hipokampusa određene su mikro Lowry metodom.<sup>322</sup> U

**Tabeli 1** je dat spisak rastvora korišćenih za određivanje koncentracije proteina.

**Tabela 1.** Spisak rastvora korišćenih za određivanje koncentracije proteina.

Rastvor A	2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ u 0,1 N NaOH (w/v)	2 g u 100 mL
Rastvor B	1 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u miliQ $\text{H}_2\text{O}$ (w/v)	1 g u 100 mL
Rastvor C	Na–K tartarat u miliQ $\text{H}_2\text{O}$	2 g u 100 mL
Rastvor D	Rastvor A : Rastvor B : Rastvor C = 1:1:50 (v/v/v)	

Za pravljenje standardne prave, raspona od 0 do 1 mg/mL, iskorišćen je goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (Sigma – Aldrich, A7638).

U mikrolejt sa 96 bunarčića, sipano je 250  $\mu\text{L}$  rastvora D i dodavano je po 25  $\mu\text{L}$  rastvora BSA (koncentracija od 0 do 1 mg/mL), ili uzorka. Razblaženja uzoraka su pravljenja u miliQ  $\text{H}_2\text{O}$ . Uzorci su inkubarani u mikrolejtu 15 min na mešalici, nakon čega je dodano po 25  $\mu\text{L}$  „Folin & Ciocalteu’s“ (Sigma-Aldrich, F9252) reagensa. Inkubacija je trajala od 30 - 45 min na šejkeru, u mraku, nakon čega je merena apsorbanacija na 650 nm, na VICTOR<sup>2</sup> WALLAC spektrofotometru.

#### 4.6.4. Provera čistoće izolovanih frakcija hipokampusa „Western blot“ metodom

Za ispitivanje čistoće izolovanih frakcija hipokampusa primenjena je „Western blot“ metoda. Cilj je bio da se, na osnovu specifično lokalizovanih proteina, odredi uspešnost frakcionisanja ćelija.

#### 4.6.4.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Za razdvajanje proteina iskorišćena je denaturišuća poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Koncentracije proteina u uzorcima su ujednačene pomoću pufera (10 mM Tris-HCl, pH 7,4). Za puštanje na elektroforezu, uzorci proteina jednakih koncentracija mešani su u srazmeri 1 : 5 (v/v) sa 5× koncentrovanim puferom za pripremu uzoraka za SDS PAGE (engl. *Laemmli Sample Buffer*, LSB) (60 mM Tris- HCl pH 6,8; 2 % SDS; 10 % glicerol; 5 % β-merkaptoetanol; 0,01 % bromfenol plavo). Uzorci su inkubirani u LSB (60 s) na 90 °C, nakon čega su ohlađeni do sobne temperature i nalivani (2 µg) u bunarčiče pripremljenih gelova. Na svakom gelu nalivan je i proteinski marker (5 µL) (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, 26619).

Za SDS-PAGE pripremljeni su 5 % gel za koncentrovanje uzoraka, kao i 10 ili 12 % gelovi za razdvajanje proteina (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Proračun za pripremu gelova za koncentrovanje i razdvajanje proteina.

	Rastvori	Zapremina
5 % gel za koncentrovanje	dH <sub>2</sub> O	2,7 mL
	1 M Tris pH 6,8	500 µL
	30 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid	670 µL
	10 % (w/v) SDS	40 µL
	10 % (w/v) amonijum-persulfat	40 µL
	Temed	4 µL
10/12 % gel za razdvajanje	dH <sub>2</sub> O	4,0 / 3,3 mL
	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 mL
	30 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid	3,3 / 4,0 mL
	10 % (w/v) SDS	100 µL
	10 % (w/v) amonijum-persulfat	100 µL
	TEMED	4 µL

Za elektroforetsko razdvajanje proteina korišćen je „Mini-Protean® II Tetra Cell“ sistem (Bio-Rad). U kadicu za elektroforezu sipan je pufer za elektroforezu (0,025 M Tris; 0,192 M glicin;

0,1 % SDS), pri čemu je do ulaska proteina u gel za razdvajanje primenjena struja konstantnog napona od 100 V, a potom 120 V, na sobnoj temperaturi.

#### 4.6.4.2. *Imunoblot*

Nakon elektroforeze, proteini sa gela su preneseni na poliviniliden difluorid (engl. *polyvinylidene fluoride*, PVDF) membranu. Primenjen je mokri transfer (Mini Trans-Blot<sup>®</sup>, Bio-Rad) za prenos proteina. U kadicu napunjenu puferom za transfer (0,025 M Tris pH 8,3; 0,129 M glicin; 20 % metanol) stavljeni su sendviči sa membranama; transfer proteina je trajao 80 – 90 min, pri struji konstantne jačine od 150 mA.

Po završenom transferu, membrane su blokirane 1 h na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje (5 % rastvor nemasnog mleka u prahu, ili 5 % BSA u TBST puferu (0,020 M Tris pH 7,6; 0,9 % NaCl; 0,1 % Tween-20)). Nakon blokiranja, membrane su isprane tri puta u TBST-u, a potom inkubirane tokom noći na 4 °C sa primarnim antitelima za detekciju proteina od interesa. U **Tabeli 3** dat je spisak korišćenih primarnih antitela za detekciju proteina.

**Tabela 3.** Primarna antitela korišćena u analizi čistoće frakcija Western blot metodom

Antitelo	Proizvođač	Kataloški br.	Razblaženje u TBST-u (v/v)
anti – TBP	Abcam	ab51841	1 : 1 000
anti – SYP	Santa Cruz	sc-9116	1 : 30 000
anti – COX-IV	Cell Signalling	4850	1 : 3 000
anti – $\alpha$ -tubulin	Santa Cruz	sc-8035	1 : 1 000
anti – $\beta$ -actin	Santa Cruz	sc-47778	1 : 3 000

Posle inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su isprane u TBST-u (3 × 15 min), a zatim inkubirane 1 - 2 h sa sekundarnim antitelima (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Sekundarna antitela korišćena za detekciju proteina od interesa

Antitelo	Proizvođač	Kataloški br.	Razblaženje u TBST-u (v/v)
anti – zečja HRP konjugovana antitela	Sigma-Aldrich	A5316, A9169	1 : 30 000
anti – zečja HRP konjugovana antitela	Santa Cruz	sc-2004	1 : 3 000
anti – mišja HRP konjugovana antitela	Sigma-Aldrich	A9917	1 : 30 000



Nakon finalnog ispiranja membrana u TBST-u ( $3 \times 15$  min), detektovani su antigen-antitelo kompleksi, uz pomoć hemiluminiscentnog supstrata konjugovanog za peroksidazu (Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP supstrate) (Millipore Corporation, U.S.A.), dok je vizualizacija i kvantifikacija proteinskih traka urađena na Chemidoc MP System-u (Bio-Rad), i uz pomoć propratnog Image Lab 5.0 softvera (Bio-Rad). Rezultati kvantifikacije traka normalizovani su prema kvantifikovanim trakama za  $\beta$ -aktin u istom bunarčiću.

#### **4.6.5. Elektroforeza, digestija proteina i masena spektrometrija (LTQ – Orbitrap)**

Proteomska analiza pripremljenih citosolnih frakcija i frakcija NSM urađeni su na Institutu za kliničku hemiju, Medicinskog fakulteta Manhajm, Univerziteta u Hajdelbergu, Univerzitetske klinike Manhajm, Nemačka, na osnovu naučne saradnje iz 2015. godine, između dr Dragane Filipović i prof. dr Peter Findeisen-a, a koja je finansirana tromesečnim boravkom dr Filipović u 2017. godini, od strane „Nemačke službe za akademsku razmenu“ (Deutscher Akademischer Austauschdienst, DAAD).

Objašnjenje protokola i parametara HPLC analize kupolovane sa LTQ-Orbitrap XL MS sistemom dato je u publikacijama.<sup>314,323,324</sup>

#### **4.6.6. Provera rezultata proteomske analize**

Validacija rezultata proteomske analize urađena je pomoću Western blot metode i imunohistohemijskom i imunofluorescentnom detekcijom proteina u dorzalnom delu hipokampusu.

##### **2.6.2.4., „Western blot“**

Procedura Western blot metode opisana je u poglavlju **4.6.4.** Za elektroforetsko razdvajanje proteina napravljeni su 10 ili 12 % gelovi za razdvajanje proteina, a količina nanošenih proteina na gelove je bila u opsegu 25 – 35  $\mu$ g. Odabir antitela za validaciju zavisio je od uočenih promena u ekspresiji proteina, značaja biohemijskog puta koji je narušen, kao i dostupnosti antitela. Spisak proteina koji su validirani dat je u **Tabeli 5.**

**Tabela 5.** Antitela za validaciju proteina Western blot metodom.

Antitelo	Proizvođač	Kataloški br.	Razblaženje u TBST-u (v/v)
anti - Calretinin	Swant	7697	1 : 2 000
anti - CuZn SOD	Enzo	ADI-SOD-100-D	1 : 1 000
anti – Calbindin	Sigma-Aldrich	C-9848	1 : 1 500
anti – GAPDH	Santa Cruz	sc-137179	1 : 500
anti – Proteasome $\alpha 3$	Santa Cruz	sc-166205	1 : 500
anti – ATP synthase 5 $\alpha$	Santa Cruz	sc-136178	1 : 500
anti – VDAC1	Santa Cruz	sc-390996	1 : 500
anti – $\beta$ -actin	Santa Cruz	sc-1616-R	1 : 3 000

Spisak sekundarnih antitela dat je u **Tabeli 4.**

#### 2.6.2.5. *Imunohistohemija*

Životinje korišćene za validaciju rezultata proteomske analize, metodom imunohistohemije, su pripremane na isti način koji je objašnjen u poglavljima **4.2.** i **4.3.** Nakon dekapitacije, celi mozgovi pacova su izolovani i fiksirani 24 h u 4 % paraformaldehidu (PFA) u 0,1M PBS-u.

##### 2.6.2.5.1. *Imunofluorescentna detekcija*

Za detekciju HSP 90 primenjena je „freeze section“ metoda imunodetekcije. Celi mozgovi su iz 4 % PFA, nakon 24 h, prebaćeni u rastvore saharoze (10, 20 i 30 % saharoza u 0,1M PBS-u, po 24 h u svakom rastvoru). Mozgovi su potom smrznuti u izopentanu ohlađenom u tečnom azotu i naknadno sećeni na kronalne preseke debljine 15  $\mu$ m, pomoću kriokata (Leica 1860, USA). Koronarni preseki dorzalnog hipokampusa su izabrani prema atlasu mozga pacova (Bregma 3,12 to 3,60 mm).<sup>325</sup> Preseci su isprani u PBS-u tri puta, blokirani 1 h u rastvoru 4 % NDS i 0,2 % Triton X-100 u TBS-u. Nakon toga, preseci su tokom noći na 4 °C inkubirani sa primarnim antitelima (anti-HSP 90 a/b, sc-13119, 1:200), pripremljenim u bloking rastvoru. Inkubacija sa sekundarnim antitelima (Alexa Fluor donkey anti mouse 555, Life Technologies, A-31570) (1:400 u 4 % NDS u Tris Triton) je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Bojenje jedara je urađeno pomoću 4'-6-diamidino-2-fenilindola (DAPI), nakon čega su preseci zalepljeni na pločice, pomoću „Dako Fluorescent Mounting Medium“ (Dako, USA). Slike su snimljene na Olympus BX51 fluorescentnom mikroskopu (Applied Imaging Corporation, USA). Kvantifikacija proteina je urađena denzitometrijskom metodom, uz pomoć ImageJ Software (verzija 1.51u). Za uvid u distribucija proteina prema subregionu, primenjeno je razgraničenje CA2 subregiona, pomoću

anti-Purkinje cell protein 4 (PCP-4) (Sigma, HPA005792) (1:200 in 4 % NDS u Tris-Triton), koje je detektovano Alexa Fluor donkey anti-rabbit 488 sekundarnim antitelom (Life Technologies, A-21206) (1:200 u 4 % NDS u Tris-Triton).

#### 2.6.2.5.2. Imunohistohemijska detekcija pomoću 3, 3'-diaminobenzidin-a (DAB-a)

Za DAB bojenje, mozgovi su, nakon 24 h inkubacije u 4 % PFA, prebačeni u 0,4 % rastvor PFA u PBS-u. Koronarni preseki debljine 40 µm su dobijeni sečenjem na vibratomu (VT 100 S; Leica Bensheim, Germany). Nakon tri ispiranja (0,05 % Triton X-100, pH 7,4 u PBS-u), preseki su tretirani 0,6 % rastvorom vodonik-peroksida (Sigma-Aldrich, H1009) 30 min, a nakon toga inkubirani 1 h u rastvoru za blokiranje (2 % NDS, 0,2 % Triton X-100 u PBS-u). Inkubacija sa primarnim antitelima (**Tabela 6**) trajala je tokom noći na 4 °C, nakon čega je praćena inkubacijom sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (goat anti-mouse biotinylated IgG, Jackson Immuno Research, BA9200) tokom 2 h na sobnoj temperaturi i, dodatno, inkubacijom 20 min u avidin-biotilizovana peroksidaza kompleksu (ABC kit, Vector Laboratories, PK-6101). Kompleksi su detektovani bojenjem pomoću DAB-a (Sigma-Aldrich, D5637), sa 0,01 % rastvorom-vodonik peroksida. Preseki su zalepljeni na želatinizirane pločice i prekrivene Eukit medijumom. Za razgraničavanje CA2 regiona je i ovde korišćen anti-PCP-4 (Sigma-Aldrich, HPA005792) (1:100 u 6 % NDS u Tris-Triton-u), detektovano pomoću goat anti-rabbit IgG biotinizovanog antitela (Vector Laboratories, 1:300 u 10 % NDS u PBS). Slike su snimljene pomoću Olympus BX53 mikroskopa opremljenog kamerom Olympus DP26.

**Tabela 6.** Spisak antitela validiranih primenom imunohistohemijske / imunofluorescentne detekcije proteina.

Antitelo	Proizvođač	Kataloški br.	Razblaženje (v/v)	Metoda
anti – HSP 90	Santa Cruz	sc-13119	1 : 50	IF
anti – HSP 60	Santa Cruz	sc-59567	1 : 50	IH
anti – MAOA	Santa Cruz	sc-271123	1 : 50	IH
anti – PDH E1a	Santa Cruz	sc-377092	1 : 50	IH
anti - Calbindin	Sigma-Aldrich	C9848	1 : 1000	IH
anti – PCP4	Sigma-Aldrich	HPA005792	1 : 200	IF/IH

## 4.7. Metabolomska analiza

### 4.7.1. Izolovanje i derivatizacija metabolita iz hipokampusa pacova

Tkivo hipokampusa je, nakon smrzavanja u tečnom azotu, sprášeno pomoću avana i tučka (CellCrusher tissue pulverizer, DD Biolab S.L, Spain) na 4 °C. Za izolovanje metabolita iz sprášenog tkiva hipokampusa, 40 mg tkiva je pomešano sa 1 mL ohlađene i degasirane smeše rastvarača hloroform: metanol: miliQ H<sub>2</sub>O, u odnosu 2:5:2 (v/v/v). Za potrebe normalizacije rezultata, u smešu je potom dodato po 5 µL (10 mg/mL) deuterisanog internog standarda L-alanina (L-alanin-d<sub>4</sub>, ChemCruz, sc-480386). Tkivo je potom inkubirano pola sata na sobnoj temperaturi, uz intenzivno vorteksovanje. Nakon 30 min, uzorci su centrifugirani u mikrocentrifugi (Sigma 1-14K) na 13 000 × g i 4 °C, 10 min. U talogu se nalaze odvojeni proteini, dok supernatant predstavlja izolat metabolita. Uzorkovano je po 900 µL supernatanta u staklene vijale sa zatvaračem, nakon čega je rastvor uparen do suva uz pomoć gasovitog azota.

Za razdvajanje metabolita gasnom hromatografijom, urađena je derivatizacija iz dva koraka. U prvom koraku metaboliti su metoksilovani pomoću 50 µL metoksiamin-hidrohlorida (Sigma-Aldrich, 226904), rastvorenog u piridinu (30 mg/mL) (Sigma-Aldrich, 270970), uz inkubaciju na 37 °C 1 h. U drugom koraku derivatizacije, metaboliti su silanizovani uz dodatak 200 µL reagensa za silanizaciju (BSTFA sa 1 % TMCS) (Sigma-Aldrich, 15238) i inkubaciju 2 h na 60 °C. Nakon hlađena do sobne temperature, uzorci su puštani na GC × GC – MS analizu.

### 4.7.2. GC × GC – MS analiza

Derivatizovani uzorci metabolita hipokampusa pacova analizirani su pomoću GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan) (**Slika 24**), sveobuhvatne dvodimenzionalne GC (GC × GC), uz detekciju kvadrupolnim masenim spektrometrom sa Zxa toplotnim sistemom modulacije (Zoex Corp.).

Kao prva kolona korišćena je RtxR-1 (RESTEK, CrossbondR 100 % dimetil-polisiloksan, 30 m, 0,25 mm ID, df = 0,25 µm), a kao druga BPX50 (SGE Analytical Science, 1 m, 0,1 mm ID, df = 0,1 µm). SilTite µUnions (SGE Analytical Science) su korišćene za povezivanje kolona. Uzorci su injektovani pri temperaturi od 280 °C u 1:10 split modu.



**Slika 24.** GC × GC – MS (GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan), korišćen za sveobuhvatnu metabolomsku analizu uzoraka hipokampusa (Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, lab. 637).

Rerna je programirana na 2 min početne temperature od 50 °C, uz postepeno dizanje temperature od 5 °C min<sup>-1</sup> do 300 °C, sa vremenom zadržke na maksimalnoj temperaturi u trajanju od 5 min. Modulacioni period je bio podešen na 6 s. Opseg skeniranja masa je bio podešen na 40 – 500 m/z. Primenjeni maseni opseg <500 Da pokriva lipide, aminokiseline, masne kiseline, amine, alkohole, šećere, šećerne alkohole, organske fosfate, aromatična jedinjenja, purine, sterole kao metoksime i silanizovane derivate.<sup>326</sup> Za određivanje retencionih vremena korišćena je smeša zasićenih alkana C<sub>10</sub> - C<sub>25</sub> u heksanu.

Dobijeni hromatogrami analizirani su u GCImage R2.8 (GCImage LLC) softveru, dok su komponente identifikovane poređenjem sa spektrima jedinjenja dostupnim u NIST bazi podataka.

#### **4.8. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada dobijenih podataka urađena je u programima Statistika 10/12 i SPSS. Testovi ponašanja dobijeni SP i FST testovima, koji su pokazali normalnu distribuciju podataka i jednake varijable, analizirani su pomoću analize varijanse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) sa ponovljenim merenjem (eng., *repeated-measures*, RM), za tri ponovljena merenja za tri vremenske tačke, i dva nezavisna parametra, stres i tretman lekom (fluoksetin ili tianeptin), praćena *Duncan post-hoc* testom za analizu statističke značajnosti između ispitivanih grupa. Za analizu rezultata koji nemaju normalnu distribuciju i/ili jednaku varijabilnost, rađen je neparametarski test *Kruskal-Wallis*. Za statističku analizu rezultata dobijenih Western blot i imunohistohemijskim metodama primenjena je jednofaktorska ili dvofaktorska ANOVA, praćena *Duncan post-hoc* testom. Statistička značajnost je indikovana za  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (engl. *standard error of the mean*, SEM).

Rezultati proteomske analize su obrađeni primenom „online“ dostupnih platformi Blast2go (<https://www.blast2go.com/>) i/ili „STRING“ (<https://string-db.org/>),<sup>327</sup> koje su deregulacije proteina analizirali na nivou interaktomiksa, odnosno, specifičnih interakcija između proteina, i ukazali na moguće značajne biološke procese. Bioinformatička obrada dereguliranih proteina rađena je na osnovu UniProt knowledgebase (KB) identifikacionih (ID) brojeva proteina i dostupnih fasta sekvenci proteina (<https://www.uniprot.org/>). Takođe, na osnovu KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes*) baze podataka, označeni su moguće izmenjeni biohemijski putevi. Proteini i peptidi identifikovani na osnovu samo jednog preklopljenog i/ili jedinstvenog peptida izbačeni su iz dalje analize.

Za analizu rezultata metabolomske studije primenjena je kombinacija univarijantne analize, tj. jednofaktorske ANOVA-e i multivarijantne analize PCA i PLS-DA. Statistička značajnost za univarijantnu analizu metabolomskih podataka je određena za  $p < 0,05$ . Metabolomski podaci analizirani su pomoću „online“ dostupnog softvera MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).<sup>313,328</sup> U analizu su bile uključene sve promenljive koje nisu imale više od jednog neidentifikovanog metabolita unutar poređenih grupa. Vrednosti koje nedostaju unutar grupe dodate su na osnovu srednje vrednosti unutar iste grupe. Logaritamskom transformacijom vrednosti su optimizovane za parametarske analize, dok je skaliranje izostavljeno, zbog male brojnosti obučavajućeg skupa. PCA i PLS-DA omogućavaju prepoznavanje klasnih razlika na osnovu multivarijantnog seta podataka, na način da identifikuju kombinaciju promenljivih koje omogućavaju klasno razdvajanje.<sup>304</sup> Za određivanje kvaliteta i pouzdanosti modela primenjena je unutrašnja ukrštena validacija (engl. *internal cross-validation*).<sup>304,329,330</sup> Dobijeni parametri,  $Q^2$  and  $R^2$ , su merilo kvaliteta fitovanja i prediktivnosti modela. Potencijalni biomarkeri detektovani su na osnovu „*Variable influence on the projection*“ (VIP) vrednosti, koja je zasnovana na prepoznavanju promenljivih koje najviše doprinose klasnom razdvajanju na osnovu izgrađenih metabolomskih profila poređenih grupa. Metabolomski podaci su, takođe, analizirani primenom algoritma klasifikovanja, zasnovanog na principu mašinskog učenja, „*Random forest*“ (RF),<sup>310</sup> gde se kao metabolit sa najvećim doprinosom grupisanju određuje na osnovu „Mean decrease accuracy“ vrednosti. Kvalitet algoritma za klasifikovanje izražava se na osnovu procenjene „out-of-bag“ (OOB) greške, koja je merilo snage i korelacije promenljivih.

## **5. REZULTATI**

---

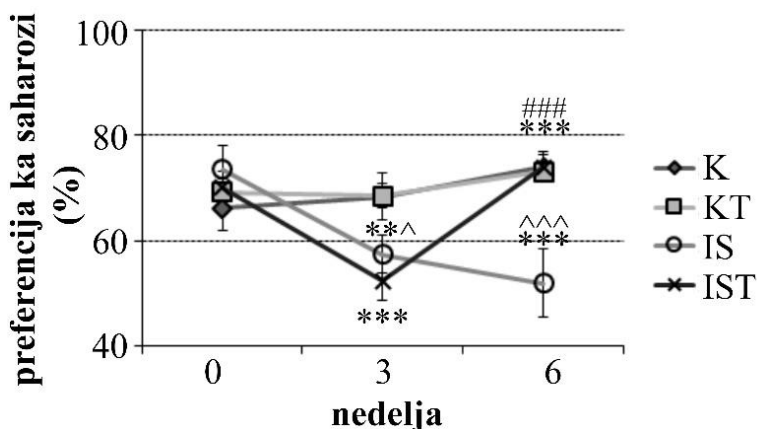
## 5.1. Testovi ponašanja

### 5.1.1. Saharozni test

Saharozni test je korišćen za ispitivanje anhedoničnog ponašanja (odrednica ponašanja nalik depresivnom) kod socijalno izolovanih životinja, kao i za proveru efikasnosti antidepresiva da neutrališu ovaj efekat, što je služilo kao parametar za grupisanje životinja i za proteomsku analizu. Pad preferencije ka saharozi korelira sa anhedonijom.

Rezultati saharoznog testa urađenog za odabir pacova iz grupe životinja tretiranih fluoksetinom dostupni su u radu Perić i sar.<sup>324</sup> Rezultati pokazuju da je socijalna izolacija, u trajanju od tri i šest nedelja, izazvala anhedoniju kod pacova, ukazujući na stanje nalik depresivnom, dok je fluoksetin uspešno obrnuo ovaj uticaj, pokazujući antidepresivnu efikasnost, bez uticaja na kontrolnu grupu životinja.

Rezultati saharoznog testa urađenog za odabir pacova iz grupe životinja tretiranih tianeptinom prikazani su na **Slici 25**.



**Slika 25.** Grafički prikaz rezultata saharoznog testa, kontrolni i hronično izolovani pacovi, nakon hroničnog tretmana fiziološkim rastvorom ili tianeptinom. Broj životinja po grupi n = 5 - 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

ANOVA sa ponovljenim merenjem je pokazala značajan efekat kombinovanog delovanja IS  $\times$  vreme ( $F_{2,36}=8,30$ ;  $p \leq 0,001$ ), tianeptin  $\times$  vreme ( $F_{2,36}=4,44$ ;  $p \leq 0,01$ ) i IS  $\times$  tianeptin  $\times$  vreme ( $F_{2,36}=6,35$ ;  $p < 0,01$ ).

„Post-hoc“ Duncan-ov test je pokazao značajne razlike između: IS (3. nedelje) vs. IS (0. nedelja), \*\*  $p < 0,01$ ; IS (6. nedelja) vs. IS (0. nedelja), \*\*\*  $p < 0,001$ ; IST (3. nedelja) vs. IST (0. nedelja), \*\*\*  $p < 0,001$ ; IST (6. nedelja) vs. IST (3. nedelja), \*\*\*  $p < 0,001$ ; IS (3. nedelja) vs. K (3.



nedelja),  $\hat{p}<0,05$ ; IS (6. nedelja) vs. K (6. nedelja),  $\hat{\hat{p}}<0,001$ ; IST (6. nedelja) vs. IS (6. nedelja),  $\hat{\hat{\hat{p}}}<0,001$ .

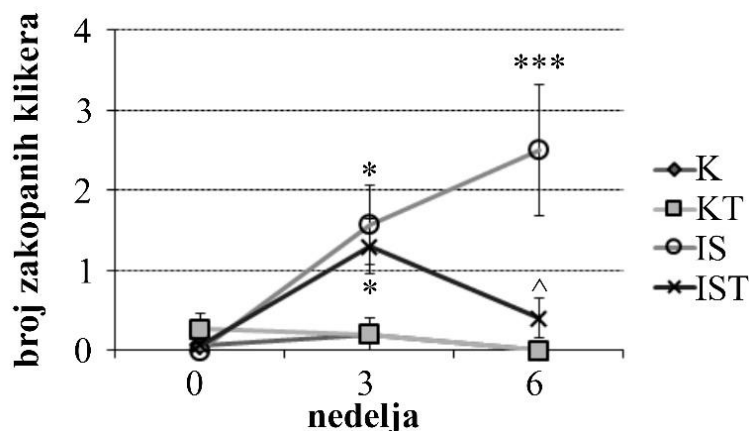
Smanjenje SP vrednosti, nakon tri nedelje socijalne izolacije, ukazalo je na prisustvo stanja anhedonije kod stresiranih pacova. Sa druge strane, tianeptin je vratio SP vrednosti kod stresiranih životinja, pokazujući antidepresivnu efikasnost, dok je kod kontrolnih životinja zadržao vrednosti na početnom nivou.

### 5.1.2. Test zakopavanja klikera

Porast broja zakopanih klikera korelirala sa anksioznim ponašanjem kod životinja.

Rezultati testa zakopavanja klikera urađenog za odabir pacova iz grupe životinja tretiranih fluoksetinom dostupni su u radu Perić i sar.<sup>324</sup> Tri nedelje socijalne izolacije je uticalo anksiogeno na pacove, pošto je došlo do povećanja broja zakopanih klikera ( $***p<0,001$ ), dok je tretman fluoksetin imao preventivni uticaj, odnosno obrnuo je efekat socijalne izolacije. Ujedno, sudeći prema broju zakopanih klikera, fluoksetin nije imao anksiozni uticaj na kontrolnu grupu životinja.

Rezultati testa zakopavanja klikera, urađenog za odabir pacova iz grupe životinja tretiranih tianeptinom, prikazani su na **Slici 26**.



**Slika 26.** Grafički prikaz rezultata testa zakopavanja klikera: kontrolna grupa i hronično izolovani pacovi nakon hroničnog tretmana fiziološkim rastvorom ili tianeptinom. Broj životinja po grupi  $n = 5 - 6$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

S obzirom da rezultati testa zakopavanja klikera nisu pokazali normalnu distribuciju prema Shapiro-Wilk testu, i jednake varijanse prema Levan testu, ovi podaci su statistički analizirani pomoću neparametarske analize varijanse, uz pomoć Kruskal-Wallis testa.

MB rezultati su analizirani pomoću neparametarske ANOVA metode (Kruskal-Wallis test), kojom je odbačena nulta hipoteza jednake raspodele podataka u trećoj ( $H(3)=10,31$ ;  $P=0,016$ ) i šestoj nedelji ( $H(3)=13,68$ ;  $P=0,003$ ). Tri i šest nedelja socijalne izolacije je statistički značajno povećalo broj zakopanih klikera (\* $p=0,022$  i \*\*\* $p=0,001$ , respektivno), u odnosu na kontrolne životinje. Sa druge strane, tretman tianeptinom je sprečio povećanje broja zakopanih klikera u poređenju sa grupom stresiranih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom ( $\hat{p}=0,045$ ).

### 5.1.3. Test prinudnog plivanja

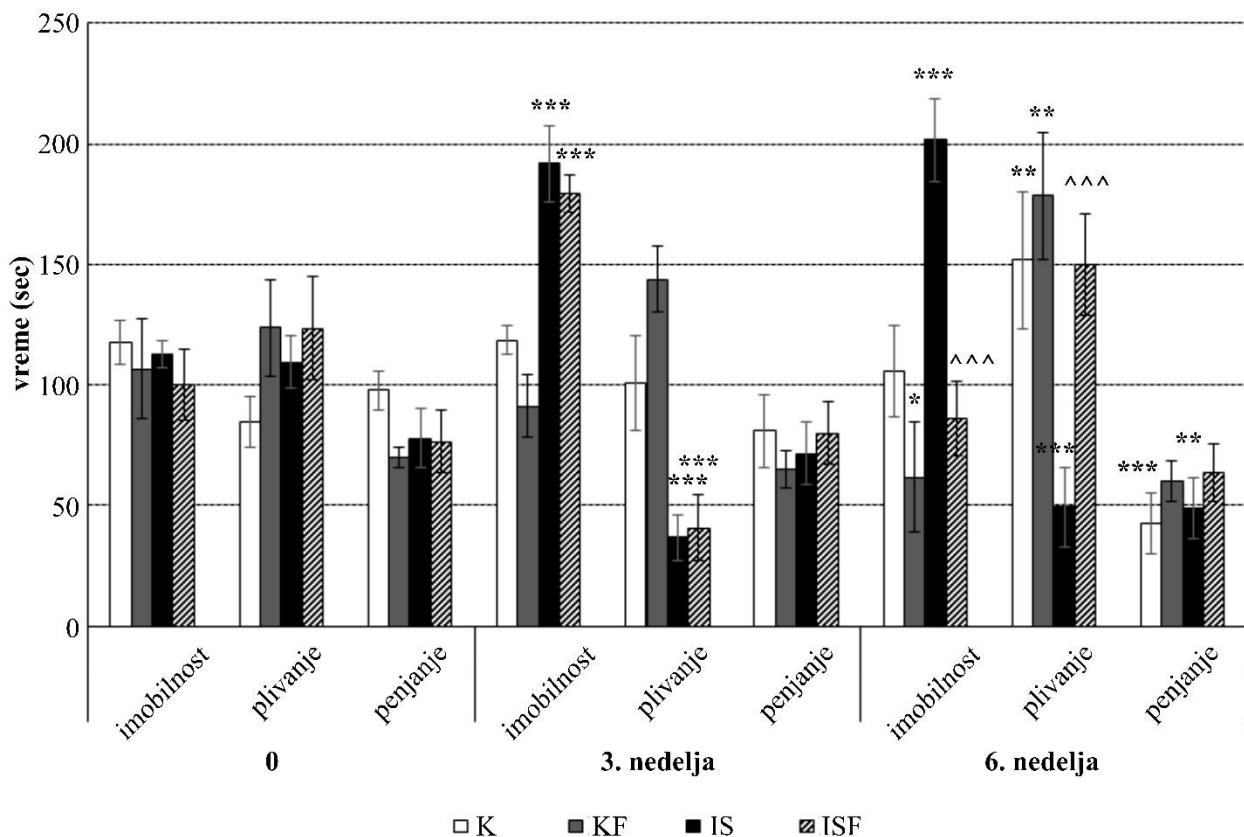
Test prinudnog plivanja je korišćen za selekciju životinja za metabolomsku analizu, koji su kasnije iskorišćeni za korelaciju sa rezultatima metabolomske analize. Praćenjem promene imobilnosti, pacovi su grupisani u šest različitih eksperimentalnih grupa: K, KT, KF, IS, IST i ISF.

Rezultati testa prinudnog plivanja za odabir pacova iz grupe životinja tretiranih fluoksetinom, namenjenih za metabolomsku analizu hipokampusa pacova prikazani su na **Slici 27**.

ANOVA sa ponovljenim merenjem je za rezultate imobilnosti pokazala značajne efekte vremena ( $F_{2,36}=11,79$ ;  $p<0,001$ ), kao i kombinovanog delovanja vreme  $\times$  IS ( $F_{2,36}=15,60$ ;  $p<0,001$ ), vreme  $\times$  Flu ( $F_{2,36}=10,53$ ;  $p<0,001$ ) i vreme  $\times$  IS  $\times$  fluoksetin ( $F_{2,36}=4,02$ ;  $p<0,05$ ). Tri i šest nedelja socijalne izolacije su statistički značajno povećali vreme imobilnosti kod pacova (\*\* $p<0,001$ ), dok je fluoksetin pokazao antidepresivni učinak, vrativši vreme ispod kontrolnog nivoa ( $\hat{\hat{p}}<0,001$ ). Fluoksetin je takođe smanjio imobilnost kontrolnih pacova (\* $p<0,05$ ).

ANOVA sa ponovljenim merenjem je za rezultate plivanja pokazala značajne efekte vremena ( $F_{2,36}=13,76$ ;  $p<0,001$ ), kao i kombinovanog delovanja vreme  $\times$  IS ( $F_{2,36}=13,10$ ;  $p<0,001$ ) i vreme  $\times$  IS  $\times$  fluoksetin ( $F_{2,36}=4,82$ ;  $p\leq 0,01$ ). Šest nedelja je kod obe grupe kontrolnih pacova rezultovalo povećanjem vremena plivanja (\*\* $p<0,01$ ), dok je socijalna izolacija imala uticaj na pad vremena plivanja (\*\* $p<0,001$ ), što je normalizovano tretmanom fluoksetina ( $\hat{\hat{p}}<0,001$ ).

Kod ponašanja penjanja, ANOVA je pokazala značajne glavne efekte vremena ( $F_{2,36}=14,21$ ;  $p<0,001$ ) i kombinovanog delovanja vreme  $\times$  fluoksetin ( $F_{2,36}=4,39$ ;  $p<0,05$ ). Grupe pacova tretirane fiziološkim rastvorom, K i IS, pokazale su pad u vremenu penjanja nakon tri nedelje tretmana (\*\* $p<0,001$  i \* $p<0,05$ , redom), što sugerise na zaštitni efekat fluoksetina vezan za mehanizme penjanja.



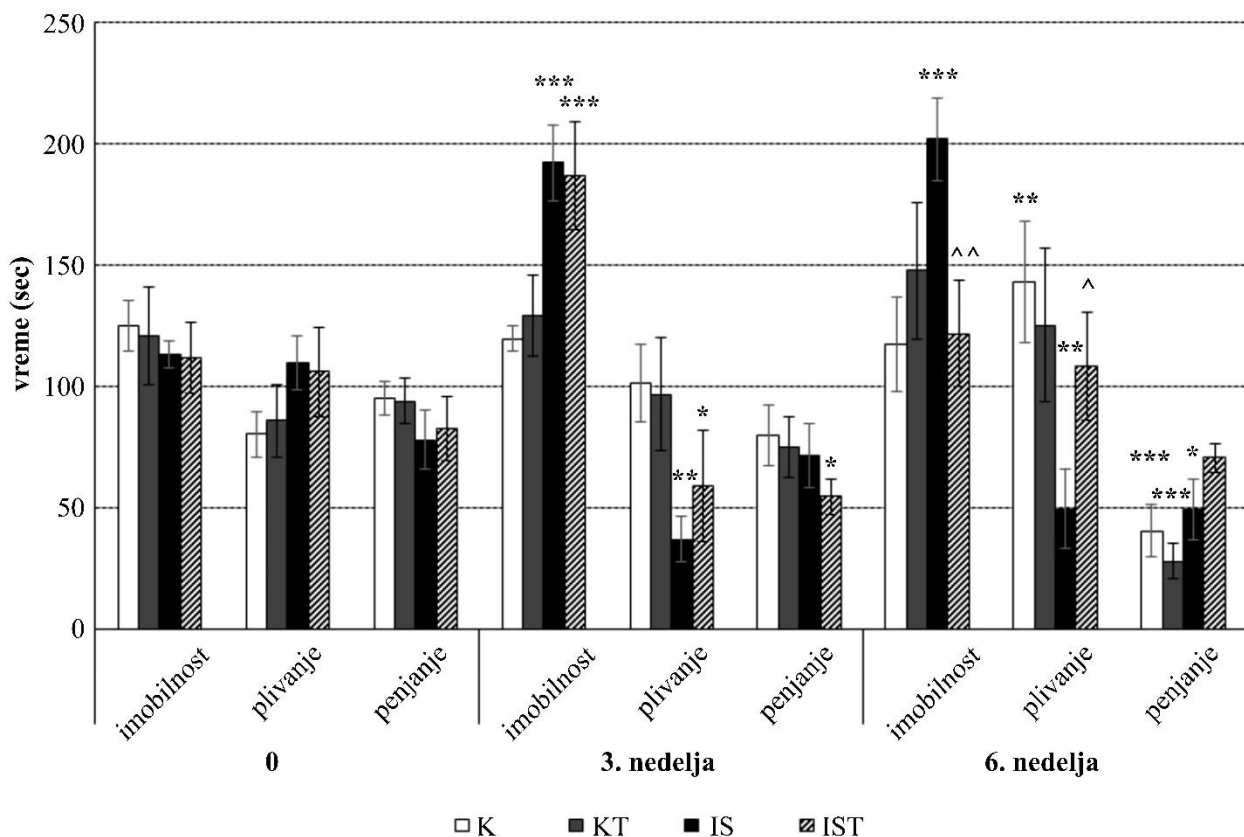
**Slika 27.** Grafički prikaz rezultata testa prinudnog plivanja, nakon hronične socijalne izolacije i/ili nakon hroničnog tretmana fluoksetinom. Broj životinja po grupi n = 5 - 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

Rezultati testa prinudnog plivanja, za odabir pacova iz grupe životinja tretiranih tianeptinom namenjenih za metabolomsku analizu hipokampusa pacova, prikazani su na **Slici 28**.

Analizom rezultata imobilnosti, ANOVA je pokazala značajan glavni efekat vremena ( $F_{2,40}=10,05$ ;  $p<0,001$ ), kombinovanog delovanja vreme  $\times$  IS ( $F_{2,40}=8,64$ ;  $p<0,001$ ) i vreme  $\times$  IS  $\times$  tianeptin ( $F_{2,40}=5,65$ ;  $p<0,01$ ). Imobilnost je statistički značajno porasla kod socijalno izolovanih životinja nakon treće i šeste nedelje (\*\* $p<0,001$ ), dok je tianeptin pokazao antidepresivni efekat, smanjenjem imobilnosti ( $^{\wedge}p<0,01$ ).

Takođe, ANOVA je pokazala značajne efekte vremena ( $F_{2,40}=5,89$ ;  $p<0,001$ ;  $F_{2,40}=27,55$ ;  $p<0,001$ ) i kombinovanog delovanja vreme  $\times$  IS ( $F_{2,40}=10,52$ ;  $p<0,001$ ;  $F_{2,40}=8,91$ ;  $p<0,001$ ) na ponašanje plivanja i penjanja, redom. Bez obzira na tretman, kontrolne grupe pacova pokazale su smanjenje vremena penjanja (\*\* $p<0,001$ ) na kraju eksperimenta, u poređenu sa početnim vrednostima. Sa druge strane, kontrolna grupa je povećala, a stresirana smanjila, vreme plivanja

posle šeste nedelja (\*\* $p < 0,01$ ). Pad vremena plivanja se uočava i kod stresiranih životinja nakon treće i šeste nedelje ( $\wedge p < 0,05$ ), a nakon šeste nedelja uočava se pad u vremenu penjanja (\* $p < 0,05$ ).

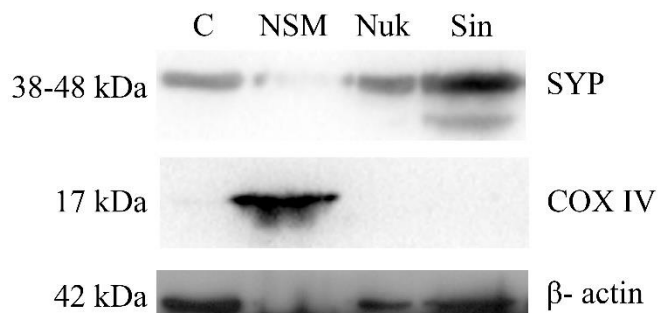


**Slika 28.** Grafički prikaz rezultata testa prinudnog plivanja, nakon hronične socijalne izolacije i/ili nakon hroničnog tretmana tianeptinom. Broj životinja po grupi  $n = 6$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

## 5.2. Provera čistoće frakcija hipokampusa

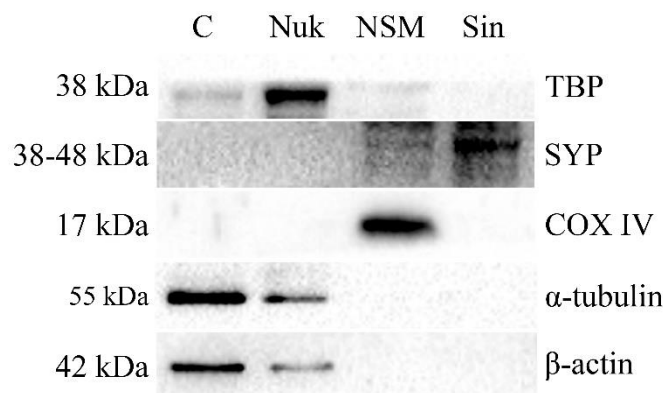
Western blot metoda je upotrebljena u svrhu provere relativne čistoće izolovanih ćelijskih frakcija hipokampusa. Urađena je imunoreaktivna detekcija specifično lokalizovanih proteina u citosolu, jedru (Nuk), NSM i sinaptozomalnoj frakciji (Sin).

Distribucija proteina pokazala je relativnu čistoću izolovanih frakcija. Specifično lokalizovana subjedinica IV citohrom c oksidaze (engl. *cytochrome c oxidase subunit 4*, COX IV) detektovana je samo u frakciji NSM, što je bilo dokaz očuvanosti ovog tipa mitohondrija u procesu izolovanja, u oba eksperimenta (Slike 29 i 30). Sinaptofizin (engl. *synaptophysin*, SYP) je, očekivano, uočen najvećim delom u frakciji sinaptozoma u oba eksperimenta.



**Slika 29.** Provera čistoće izolovanih frakcija hipokampusa pacova, namenjenih za proteomsku analizu uzoraka grupe životinja podvrgnutih tretmanu fluoksetinom.

U drugoj seriji pripreme uzoraka je, pored COX IV i SYP, korišćen TATA-vezujući protein (engl. *TATA-binding protein*, TBP) kao jedarni marker, koji je dokazao adekvatno odvajanje i ove frakcije, dok je  $\alpha$ -tubulin, marker citosolne frakcije, pokazao adekvatnu prečišćenost drugih frakcija od citosolnih proteina (**Slika 30**).



**Slika 30.** Provera čistoće izolovanih frakcija hipokampusa pacova, namenjenih za proteomsku analizu uzoraka grupe životinja podvrgnutih tretmanu tianeptinom.

Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da je procedura izolovanja rezultovala dobijanjem relativno čistih ćelijskih frakcija, pogodnih za dalji rad.

### 5.3. Rezultati proteomske analiza hipokampusa

#### 5.3.1. Proteomska analiza citosolnih frakcija

Rezultati proteomske analize prikazani su na osnovu ranije podešene vrednosti  $p < 0,01$  za identifikaciju peptida i  $p < 0,05$  za proteine. Samo proteini čiji je odnos promene, određen proteomskom analizom, bio veći od 1,5 ili manji od 0,8, bili su predmet dalje analize i diskusije.

Proteomska analiza hronično socijalno izolovanih životinja pokazala je deregulaciju citosolnih proteina, koji su najvećim delom imali smanjenu ekspresiju (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Lista dereguliranih citosolnih proteina kod hronično socijalno izolovanih životinja (IS vs. K).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
D3ZAN1	Type I inositol 3 4-bisphosphate 4-phosphatase	2	2	11,1
Q6IN22	Cathepsin B	3	3	3,6
Q9QVC8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	6	6	3,3
Q99JD4	CLIP-associating protein 2	6	6	2,5
Q6P6V0	Glucose-6-phosphate isomerase	34	34	2,5
P17425	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	5	5	2,3
Q1AAU6-2	Isoform 2 of Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	2	2	1,9
Q9JHL4-3	Isoform 3 of Drebrin-like protein	6	6	1,9
Q62634	Vesicular glutamate transporter 1	3	3	1,9
Q8CH85	Soluble guanylyl cyclase beta 1 subunit	2	2	1,9
A0A0G2JWE1	Myosin light polypeptide 6	2	2	1,8
Q80U96	Exportin-1	19	19	1,8
Q6PEC1	Tubulin-specific chaperone A	3	3	1,7
D3ZQG6	Tripartite motif-containing protein 2	3	3	1,7
D3ZX38	Prefoldin 1 (Predicted)	2	2	1,7
P62815	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	25	25	1,7
A1L1J8	Protein Rab5b	4	3	1,7
A0A0G2K542	Protein Ugp2	6	6	1,6
A0A0G2JWA3	Protein Xpo7	3	3	1,6
Q5XIM9	T-complex protein 1 subunit beta	13	13	1,6
P18420	Proteasome subunit alpha type-1	4	4	1,6
D3ZAI6	Protein Nt5dc3	5	5	1,6
P62198	26S protease regulatory subunit 8	2	2	1,5
G3V7U2	Microtubule-associated protein 1 A isoform CRA_c	20	18	1,5
Q5PPJ9	Endophilin-B2	2	2	1,5
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
A0A0G2K9L2	Protein Tom112	9	9	0,7
P11980	Pyruvate kinase PKM	52	4	0,7
D4A435	Protein Icam5	11	11	0,7
G3V758	Contactin 2	2	2	0,7
Q5BJU7	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1	5	5	0,7
P11348	Dihydropteridine reductase	10	10	0,6
A1L122	NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1	5	5	0,6
D3Z955	Protein Pgm211	11	11	0,6
D3ZHB7	Protein Ube3c	5	5	0,6
D4A3Z3	Protein Tbc1d24	7	7	0,6
D3ZDT1	Protein Epb4112	28	2	0,6

G3V928	Protein Lrp1	4	4	0,6
D3ZWA8	Protein Appl1	5	5	0,6
Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	47	32	0,6
O55173	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	4	4	0,6
H1UBN0	Copine 7 protein	15	14	0,6
Q8VHS9	L-type calcium channel alpha2/delta subunit	9	9	0,5
B0BN46	Grhpr protein	2	2	0,5
M0RC57	Protein unc-45 homolog A	3	3	0,5
Q80ZG1	Synembryn-A	2	2	0,5
P54313	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	4	2	0,5
F1LNY3	Neural cell adhesion molecule 1	11	2	0,5
B5DFE0	Mpp6 protein	3	3	0,5
Q5U2S7	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase 3	10	10	0,5
F1M6A8	RAC-gamma serine/threonine-protein kinase	3	3	0,5
Q5RKI0	WD repeat-containing protein 1	27	27	0,4
H1UBM8	Copine 4 protein	4	3	0,4
A0A096MJM1	Protein Rhog (Fragment)	2	2	0,4
F1M3P6	Protein Scai	3	3	0,4
P07722-2	Isoform S-MAG of Myelin-associated glycoprotein	2	2	0,4
Q3MHS9	Chaperonin containing Tcp1, subunit 6A (Zeta 1)	17	17	0,4
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	4	4	0,3
P11598	Protein disulfide-isomerase A3	18	18	0,3
D3ZFX4	Phosphoglucomutase 3 (Predicted), isoform CRA_a	13	13	0,3
F1LML2	Polyubiquitin-C	7	7	0,3
P04785	Protein disulfide-isomerase	16	16	0,3
Q4KMA2	UV excision repair protein RAD23 homolog B	7	7	0,2
D4ACB8	Chaperonin subunit 8 (Theta) (Predicted), isoform CRA_a	15	15	0,2
D3ZWG2	Regulator of G-protein-signaling 7	4	4	0,2
P20717	Protein-arginine deiminase type-2	3	3	0,2
Q8K1Q0	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	2	2	0,1
A0A0G2K7Q7	Insulin-degrading enzyme	4	4	0,1

Na osnovu dereguliranih proteina u citosolu IS životinja, konstruisan je grafik prema analizi pomoću Blast2GO softvera, sa prikazom moguće dereguliranih bioloških procesa na osnovu broja dereguliranih proteina (**Slika 31**).





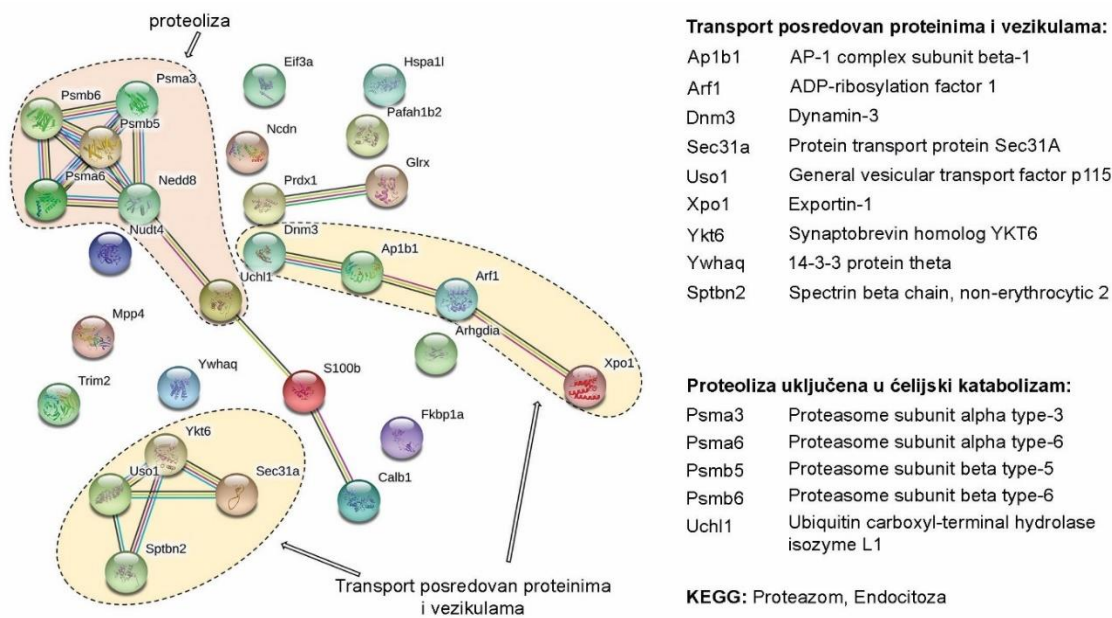
Hronični tretman kontrola tianeptinom rezultovao je većim brojem proteina povećane, u odnosu na broj proteina smanjene ekspresije. Lista dereguliranih proteina data je u **Tabeli 7**.

**Tabela 7.** Lista dereguliranih citosolnih proteina kod kontrolnih životinja nakon tretmana tianeptinom (KT vs. K).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
Q5EGY4	Synaptobrevin homolog YKT6	2	2	3,62
P84079	ADP-ribosylation factor 1	4	7	3,18
O35264	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit $\beta$	3	5	3,01
Q80U96	Exportin-1	3	3	2,68
Q63716	Peroxiredoxin-1	2	2	2,00
Q62658	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	4	5	1,96
E9PTV0	Guanylate kinase 1	2	2	1,95
Q9QWN8	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	8	8	1,93
Q1JU68	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	2	2	1,93
P55063	Heat shock 70 kDa protein 1-like	3	4	1,89
D3ZQG6	Tripartite motif-containing protein 2	3	3	1,87
P28073	Proteasome subunit beta type-6	2	4	1,81
P04631	Protein S100-B	2	4	1,81
Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	4	5	1,72
P28075	Proteasome subunit beta type-5	2	4	1,71
P0CG51	Polyubiquitin-B [Cleaved into: Ubiquitin]	3	7	1,68
Q71UE8	NEDD8	2	3	1,67
Q08877	Dynamin-3	2	2	1,67
P68255	14-3-3 protein theta	5	7	1,67
P18422	Proteasome subunit alpha type-3	4	7	1,66
P41542	General vesicular transport factor p115	3	4	1,61
P52303	AP-1 complex subunit beta-1	8	12	1,61
Q99MY2	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2	2	2	1,60
P60901	Proteasome subunit alpha type-6	3	5	1,59
Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	4	7	1,54
Q9ESH6	Glutaredoxin-1	3	5	1,53
P07171	Calbindin	2	3	1,53
O35095	Neurochondrin	3	7	1,51
Q9Z2Q1	Protein transport protein Sec31A	4	5	1,51
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
Q9QYU4	Ketimine reductase mu-crystallin	2	3	0,80

P58775	Tropomyosin beta chain	6	8	0,80
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	2	3	0,79
P06685	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	2	2	0,79
Q5HZV9	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	2	3	0,79
P13668	Stathmin	2	2	0,78
E9PSV5	Phosphoserine aminotransferase	3	3	0,77
Q62951	Dihydropyrimidinase-related protein 4	3	4	0,75
P07335	Creatine kinase B-type	3	10	0,74
P08592	Amyloid-beta A4 protein	2	3	0,72
Q64559	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	4	7	0,72
Q62829	Serine/threonine-protein kinase PAK 3	2	3	0,69
Q4V8B0	Oxidation resistance protein 1	3	4	0,69
Q4V8Q1	Calpain 11	2	2	0,69
B2RYW9	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	2	3	0,67
P24329	Thiosulfate sulfurtransferase	2	3	0,64
P14659	Heat shock-related 70 kDa protein 2	2	3	0,50

STRING analiza je ukazala na značajno više interakcija među proteinima povećane ekspresije, pri čemu su ovi proteini uključeni u transport posredovan proteinima i vezikulama, kao i u proces proteolize (**Slika 33**). Prema KEGG – zasnovanoj analizi bioloških puteva, takođe su proteazom i endocitoza označeni kao najviše pogodeni biohemijski putevi.



**Slika 33.** STRING grafički prikaz citosolnih proteina povećane ekspresije kod kontrolnih životinja tretiranih tianeptinom, na osnovu uočenog većeg broja interakcija od očekivanog.

Tretman tianeptinom je kod socijalno izolovanih životinja uglavnom uticao na smanjenje ekspresije citosolnih proteina, dok su samo četiri proteina rezultovala povećanom ekspresijom (**Tabela 8**).

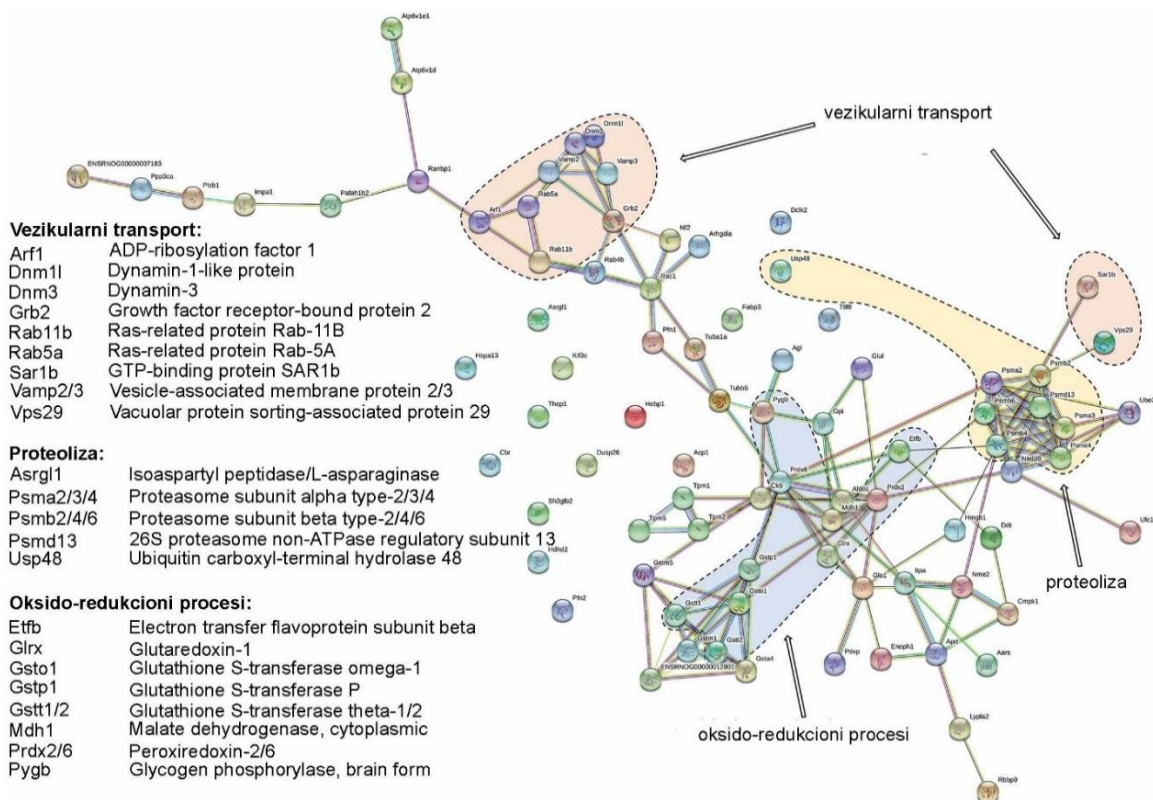
**Tabela 8.** Lista dereguliranih citosolnih proteina kod hronično socijalno izolovanih životinja nakon hroničnog tretmana tianeptinom (IST vs. IS).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	2	4	1,93
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2	3	1,79
D4A133	ATPase H <sup>+</sup> -transporting V1 subunit A	11	20	1,73
Q5HZA6	Prolyl endopeptidase-like	3	3	1,56
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
Q9Z1B2	Glutathione S-transferase Mu 5	4	5	0,80
P62963	Profilin-1	2	2	0,80
P85845	Fascin	2	5	0,80
D3ZW55	Inosine triphosphate pyrophosphatase	2	5	0,80
P62994	Growth factor receptor-bound protein 2	2	2	0,79
P36972	Adenine phosphoribosyltransferase	2	2	0,79
O35303	Dynamin-1-like protein	2	3	0,79
O35244	Peroxiredoxin-6	6	8	0,79
P18422	Proteasome subunit alpha type-3	3	4	0,79
Q68FU3	Electron transfer flavoprotein subunit beta	2	4	0,79
Q71SY3	Translin	3	5	0,78
P0CG51	Polyubiquitin-B [Cleaved into: Ubiquitin]	3	6	0,77
P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	2	4	0,77
P51146	Ras-related protein Rab-4B	2	3	0,77
Q641W7	Probable tubulin polyglutamylase TTL9	2	3	0,77
Q6P7Q4	Lactoylglutathione lyase	3	7	0,77
Q9Z339	Glutathione S-transferase omega-1	3	3	0,76
P53534	Glycogen phosphorylase, brain form	5	8	0,76
P30713	Glutathione S-transferase theta-2	2	2	0,76
B2RZ78	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	2	2	0,76
P50475	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2	2	0,75
P35704	Peroxiredoxin-2	6	14	0,75
P10687	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	4	5	0,75
Q9ESH6	Glutaredoxin-1	2	4	0,75
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain	2	2	0,75
P14942	Glutathione S-transferase alpha-4	2	2	0,75
D4AEH9	Amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	2	2	0,75
P17220	Proteasome subunit alpha type-2	4	8	0,75
O35509	Ras-related protein Rab-11B	2	3	0,74

P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C	2	6	0,74
P41498	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	4	7	0,73
Q8VI04	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	2	3	0,73
O35162	Heat shock 70 kDa protein 13	7	9	0,73
P24155	Thimet oligopeptidase	2	2	0,73
P63025	Vesicle-associated membrane protein 3	3	5	0,73
Q71UE8	NEDD8	2	2	0,72
Q7M767	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	3	6	0,72
Q6BBI8	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	2	3	0,72
P84079	ADP-ribosylation factor 1	4	8	0,72
P09606	Glutamine synthetase	2	6	0,71
Q5PPH0	Enolase-phosphatase E1	2	3	0,71
P40307	Proteasome subunit beta type-2	2	4	0,71
Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	7	12	0,71
B4F7C7	Hebp1 protein	5	9	0,71
Q5HZY2	GTP-binding protein SAR1b	2	2	0,71
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain	2	4	0,70
P07483	Fatty acid-binding protein, heart	2	4	0,70
P58775	Tropomyosin beta chain	5	8	0,70
Q4KM73	UMP-CMP kinase	3	4	0,69
P34067	Proteasome subunit beta type-4	2	2	0,69
Q9QYL8	Acyl-protein thioesterase 2	2	4	0,69
Q6P6V0	Glucose-6-phosphate isomerase	10	20	0,69
P80254	D-dopachrome decarboxylase	2	3	0,68
Q63648	Merlin	3	3	0,68
Q9EPC6	Profilin-2	2	3	0,67
Q6AXV9	Glutathione S-transferase omega-2	2	6	0,67
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2	7	0,67
P63329	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	6	10	0,67
P19804	Nucleoside diphosphate kinase B	4	7	0,66
P68370	Tubulin alpha-1A chain	4	14	0,66
O35264	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	3	5	0,66
P07335	Creatine kinase B-type	2	3	0,66
Q5MPA9	Serine/threonine-protein kinase DCLK2	2	2	0,65
O88350	Putative hydrolase RBBP9	2	2	0,65
Q5PPJ9	Endophilin-B2	2	2	0,65
P21670	Proteasome subunit alpha type-4	2	4	0,64
P63159	High mobility group protein B1	2	3	0,64
Q6P503	ATPase H <sup>+</sup> -transporting V1 subunit D	3	4	0,64
P63045	Vesicle-associated membrane protein 2	2	5	0,64
P69897	Tubulin beta-5 chain	2	3	0,63
Q5FVI9	Dual specificity protein phosphatase 26	2	5	0,62
O55165	Kinesin-like protein KIF3C	2	2	0,62
M0RC99	Ras-related protein Rab-5A	2	2	0,61
Q01579	Glutathione S-transferase theta-1	2	4	0,61

B0BN93	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	2	3	0,61
Q76LT8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	2	4	0,60
P04906	Glutathione S-transferase P	4	5	0,60
D4A2G9	RAN-binding protein 1	2	3	0,60
Q08877	Dynamin-3	3	3	0,59
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4	8	0,58
Q6RUV5	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	2	4	0,57
Q6PCU2	V-type proton ATPase subunit E 1	3	6	0,56
Q8VD52	Pyridoxal phosphate phosphatase	4	7	0,55
P97697	Inositol monophosphatase 1	6	9	0,54
Q6AYR6	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	3	4	0,53
P28073	Proteasome subunit beta type-6	2	4	0,53
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1	2	3	0,38

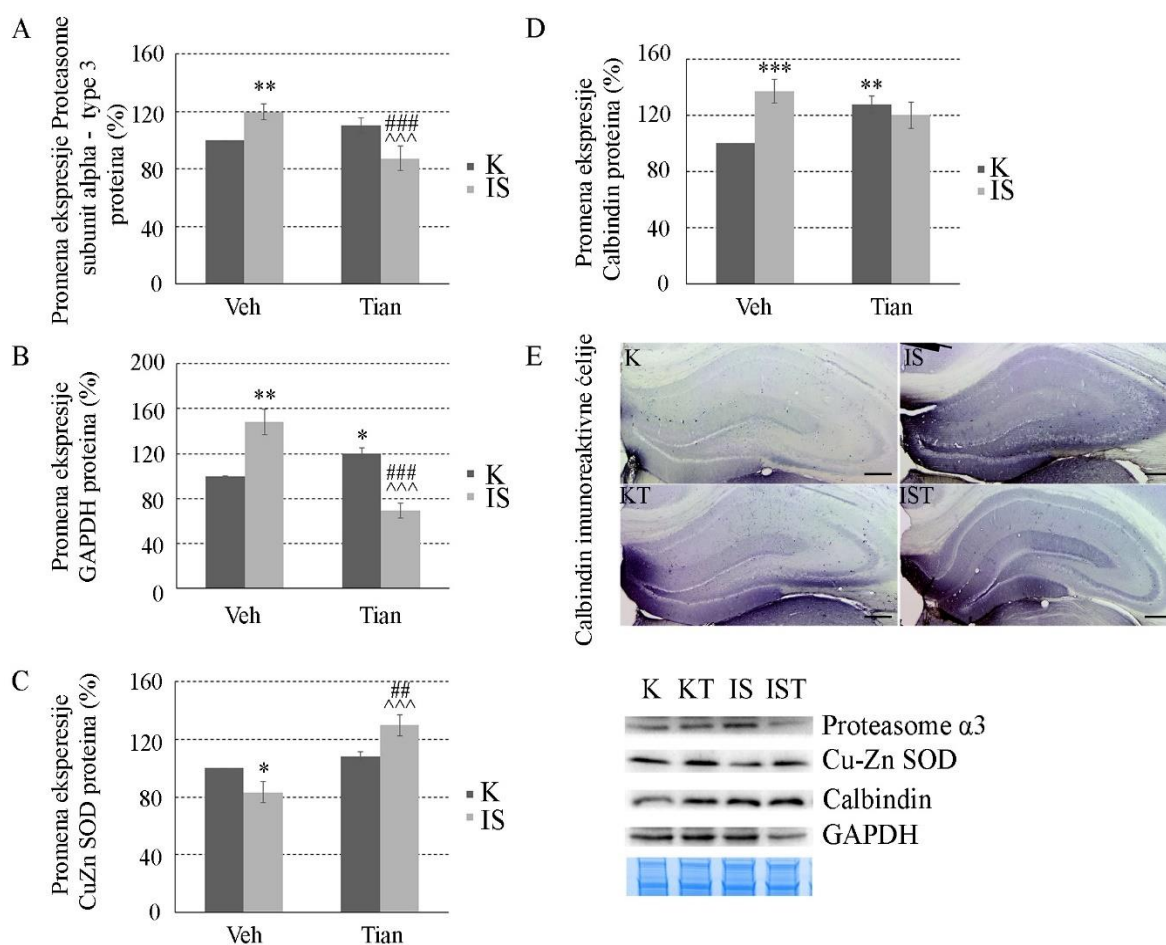
STRING pristup je ukazao na značajno veći broj interakcija između proteina snižene ekspresije kod socijalno izolovanih životinja nakon tretmana tianeptinom. Najviše pogođeni procesi, usled proteinske deregulacije, su vezikularni transport, proteoliza i oksido-redukциони procesi (Slika 34).



**Slika 34.** STRING grafički prikaz interakcija između citosolnih proteina smanjene ekspresije, nakon tretmana tianeptinom kod socijalno izolovanih pacova.

Za odabrane promene u proteinskoj ekspresiji urađena je kvantitativna validacija, pomoću Western blot analize, kao i kvalitativna validacija, primenom imunohistohemijske metode.

Za kvantitativnu validaciju izabrana su četiri proteina citosolne frakcije:  $\alpha$  subjednica, tip 3, proteazoma, (engl. *proteasome subunit  $\alpha$  type 3*, Psma3), CuZn SOD, kalbindin (engl. *calbindin*) i gliceralhid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH). Za promenu ekspresije Psma3 proteina, dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat Tian ( $F_{1,19}=7,06$ ;  $p<0,001$ ) i kombinovanog delovanja Tian  $\times$  IS ( $F_{1,19}=27,69$ ;  $p<0,001$ ) (**Slika 35A**). Post-hoc analiza je pokazala statistički značajno povećanje ekspresije proteina nakon socijalne izolacije (\*\* $p<0,01$ ), dok Tian značajno vraća nivo ekspresije ( $^{\wedge\wedge}p<0,001$ ). Takođe, nivo ekspresije je značajno niži u odnosu na kontrole tretirane Tian ( $^{\#\#\#}p<0,001$ ).



**Slika 35.** Validacija rezultata proteomske analize primenom Western blot i imunohistohemijske metode. Broj životinja po grupi  $n = 5 - 6$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

ANOVA je, za promenu ekspresije GAPDH proteina, pokazala značaj efekat Tian ( $F_{1.20}=19,93$ ;  $p<0,001$ ) i kombinovanog delovanja Tian  $\times$  IS ( $F_{1.20}=57,56$ ;  $p<0,001$ ) (**Slika 35B**).

Kod promene u ekspresiji CuZn SOD, ANOVA je ukazala na značajan efekat Tian ( $F_{1.20}=25,59$ ;  $p<0,001$ ) i kombinovanog delovanja IS  $\times$  Tian ( $F_{1.20}=12,56$ ;  $p<0,01$ ) (**Slika 35C**). Socijalna izolacija je značajno smanjila ekspresiju CuZn SOD ( $*p<0,05$ ), dok je tretman Tian obrnuo ovaj efekat i dodatno podigao nivo ekspresije proteina, u odnosu na socijalno izolovane životinje ( $^{^^}p<0,001$ ), ali i kontrole tretirane Tian ( $^{##}p<0,01$ ).

Statističkom analizom Western blot podataka za kalbindin otkriven je značajan efekat Tian ( $F_{1.18}=8,18$ ;  $p<0,01$ ), dok je post-hoc test pokazao da i IS ( $^{***}p<0,001$ ) i Tian tretman kod kontrolnih životinja ( $^{**}p<0,01$ ) podiže nivo proteina (**Slika 35D**). Trend se uočava i kod Tian tretiranih izolovanih životinja, ali bez statističke značajnosti. Imunohistohemijska analiza je potvrdila rezultate Western blot analize, s obzirom da se uočava intenzivnije bojenje ćelija i vlakana kod svih tretiranih grupa, u odnosu na kontrolnu (**Slika 35E**).

Fluoksetin je najvećim delom uticao na deregulaciju proteina smanjenjem njihove ekspresije u kontrolnoj grupi životinja. Međutim, značajan broj proteina imao je višestruko povećanje ekspresije. Spisak deregulisanih proteina dat je u **Tabeli 9**.

**Tabela 9.** Lista deregulisanih citosolnih proteina u kontrolnim životinjama nakon hroničnog tretmana fluoksetinom (KF vs. K).

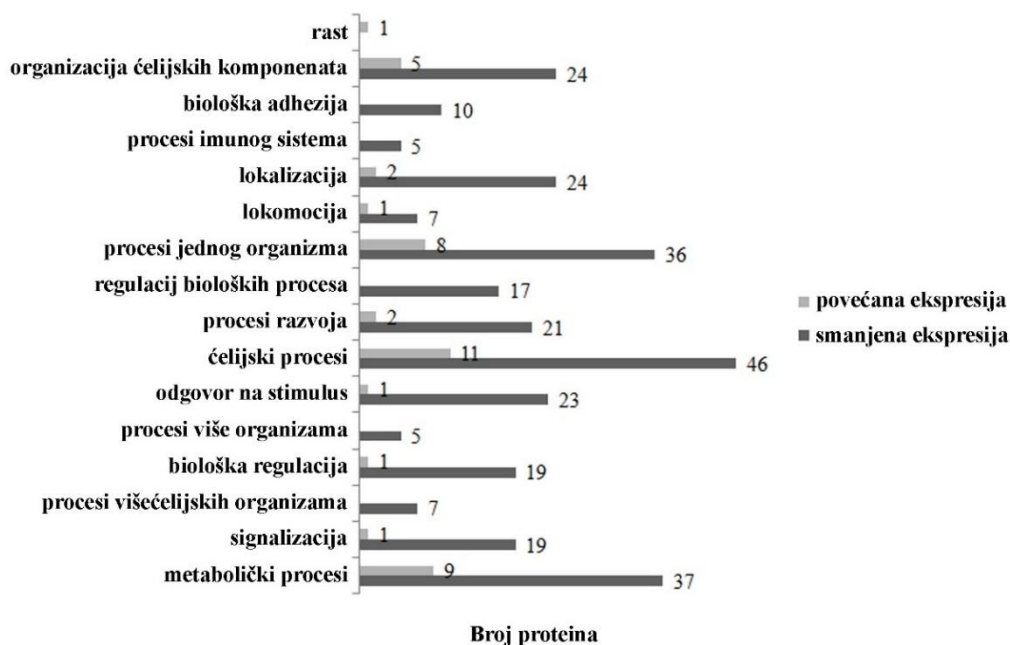
UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
Q5RKI0	WD repeat-containing protein 1	7	7	2,99
Q63537-2	Isoform IIb of Synapsin-2	6	5	2,58
P52481	Adenylyl cyclase-associated protein 2	6	4	2,42
P47819-2	Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein	10	9	2,20
P02625	Parvalbumin alpha	1	1	2,06
F8WFH8	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	5	4	1,86
P47728	Calretinin	3	2	1,86
P02688-3	Isoform 3 of Myelin basic protein	9	1	1,77
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	16	16	1,75
D3ZGN2	Copine 5 protein	3	2	1,74
P69897	Tubulin beta-5 chain	70	8	1,74
P45479	Palmitoyl-protein thioesterase 1	5	5	1,73
P47942	Dihydropyrimidinase-related protein 2	16	14	1,68

M0RDC5	Acyl-CoA-binding protein	5	5	1,66
P04631	Protein S100-B	4	3	1,57
P62246	40S ribosomal protein S15a	3	3	1,55
A0A0G2JZF2	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	6	3	1,53
Q05683	Glutamate decarboxylase 2	12	12	1,53
Q9WTP0	Band 4.1-like protein 1	13	10	1,53
P26772	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	6	5	1,52
B0BN63	LOC681996 protein	6	6	1,50
I7FKL4	Myelin basic protein transcript variant 1	10	2	1,50
P62161	Calmodulin	9	6	1,50
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
B2LYI9	Tenascin C	4	3	0,80
D4A435	Protein Icam5	14	14	0,80
Q566C7	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	6	6	0,80
Q9R085	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	6	5	0,80
A0A0G2K261	Protein Iars2	2	2	0,79
F1LRI7	AP2-associated protein kinase 1	23	23	0,79
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	3	3	0,79
D3Z9N6	Versican core protein	7	1	0,78
G3V8G4	Brevican core protein	38	36	0,78
D4A8H3	Protein Uba6	8	8	0,77
O88339	Epsin-1	8	7	0,77
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta	11	6	0,77
P55067	Neurocan core protein	33	32	0,77
Q62656	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	20	18	0,77
A0A096MJZ0	Protein Dnal1	5	2	0,76
P46462	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	15	13	0,76
Q4VSI4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	23	21	0,76
Q9WVB1	Ras-related protein Rab-6A	16	7	0,76
D4A2D7	Importin 4 (Predicted), isoform CRA_b	6	6	0,75
D4A781	Protein Ipo5	36	35	0,75
P63012	Ras-related protein Rab-3A	8	6	0,75
Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	84	79	0,75
Q6PEC0	Bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase [asymmetrical]	2	2	0,75
D4AAX6	Phosphoinositide phospholipase C	3	2	0,74
F1LRV4	Heat shock 70 kDa protein 4	20	15	0,74
F1M775	Protein Diaph1	3	3	0,74
G3V758	Contactin 2	7	5	0,74
D3ZXJ5	Protein Eftud1	3	3	0,73
F1LMT8	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	18	2	0,73



G3V918	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, isoform CRA_a	6	5	0,73
Q5SGE0	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	22	18	0,72
Q6P9V6	Proteasome subunit alpha type	2	2	0,72
D4A857	Importin 9 (Predicted)	10	10	0,71
D4AD89	Protein Sez6l	5	5	0,71
P10687	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	41	35	0,71
P30009	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	2	2	0,71
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	17	15	0,71
B2RYN0	Pgm3 protein	7	6	0,69
D3ZWG2	Regulator of G-protein-signaling 7	4	3	0,69
P05197	Elongation factor 2	7	7	0,69
A0A0G2JZS2	Polyadenylate-binding protein 1	5	5	0,67
P11980	Pyruvate kinase PKM	20	2	0,67
F1LNY3	Neural cell adhesion molecule 1	4	1	0,66
Q05140-2	Isoform 2 of Clathrin coat assembly protein AP180	28	1	0,66
E9PTB2	Transcription elongation factor SPT5	2	2	0,64
Q8VHS9	L-type calcium channel alpha2/delta subunit	5	5	0,63
Q80U96	Exportin-1	13	11	0,62
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	2	2	0,60
Q4FZU8	Protein FAM65A	3	3	0,58
Q8K1Q0	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	2	2	0,58
Q4KMA2	UV excision repair protein RAD23 homolog B	6	5	0,57
P50475	Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic	13	12	0,55
P63329	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	23	11	0,55
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	3	3	0,54
D3Z955	Protein Pgm2l1	11	9	0,46
Q64538	Serine/threonine-protein phosphatase (Fragment)	6	4	0,46
A0A0G2K7Q7	Insulin-degrading enzyme	2	1	0,45
Q63654	Polyubiquitin (Fragment)	12	11	0,40
Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	8	6	0,39
F1LP05	ATP synthase subunit alpha	2	1	0,34

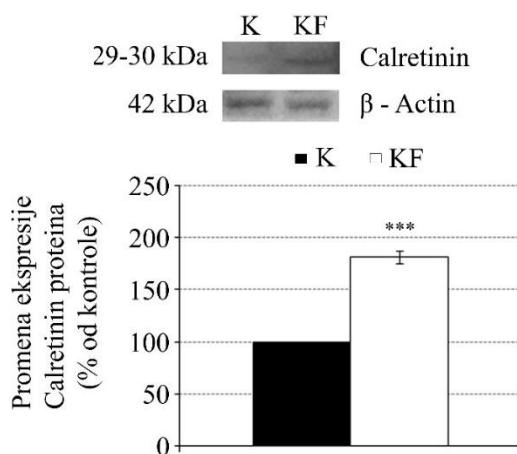
Bioinformatičkom analizom kao glavni biološki procesi, moguće izmenjeni povećanom ekspresijom proteina, izdvojeni su organizacija ćelijskih komponenata, lokalizacija, odgovor na stimulus i signalizacija (**Slika 36**).



**Slika 36.** Grafički prikaz moguće izmenjenih bioloških procesa u citosolu nakon tretmana fluoksetinom na osnovu broja dereguliranih proteina.

Prema STRING-u, kod proteina povećane ekspresije uočeno je više interakcija od očekivanog broja, a kao najviše izmenjeni označeni su procesi LTP i sinaptičke plastičnosti, kao i biološki procesi regulacije nivoa neurotransmitera (**Slika 37**).

WB je potvrdio rezultate proteomske analize za kalretinin (engl. *Calretinin*) (**Slika 38**). Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat fluoksetina ( $F_{1,4}=173,60$ ;  $p<0,001$ ), dok je post-hoc analiza pokazala statistički značajno povećanje ekspresije u kontrolnim životinjama nakon tretmana fluoksetinom (\*\* $p<0.001$ ).



**Slika 38.** Validacija ekspresije za kalretinin u KF grupi. Broj životinja po grupi  $n = 3$  (pulovano, po tri životinje). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

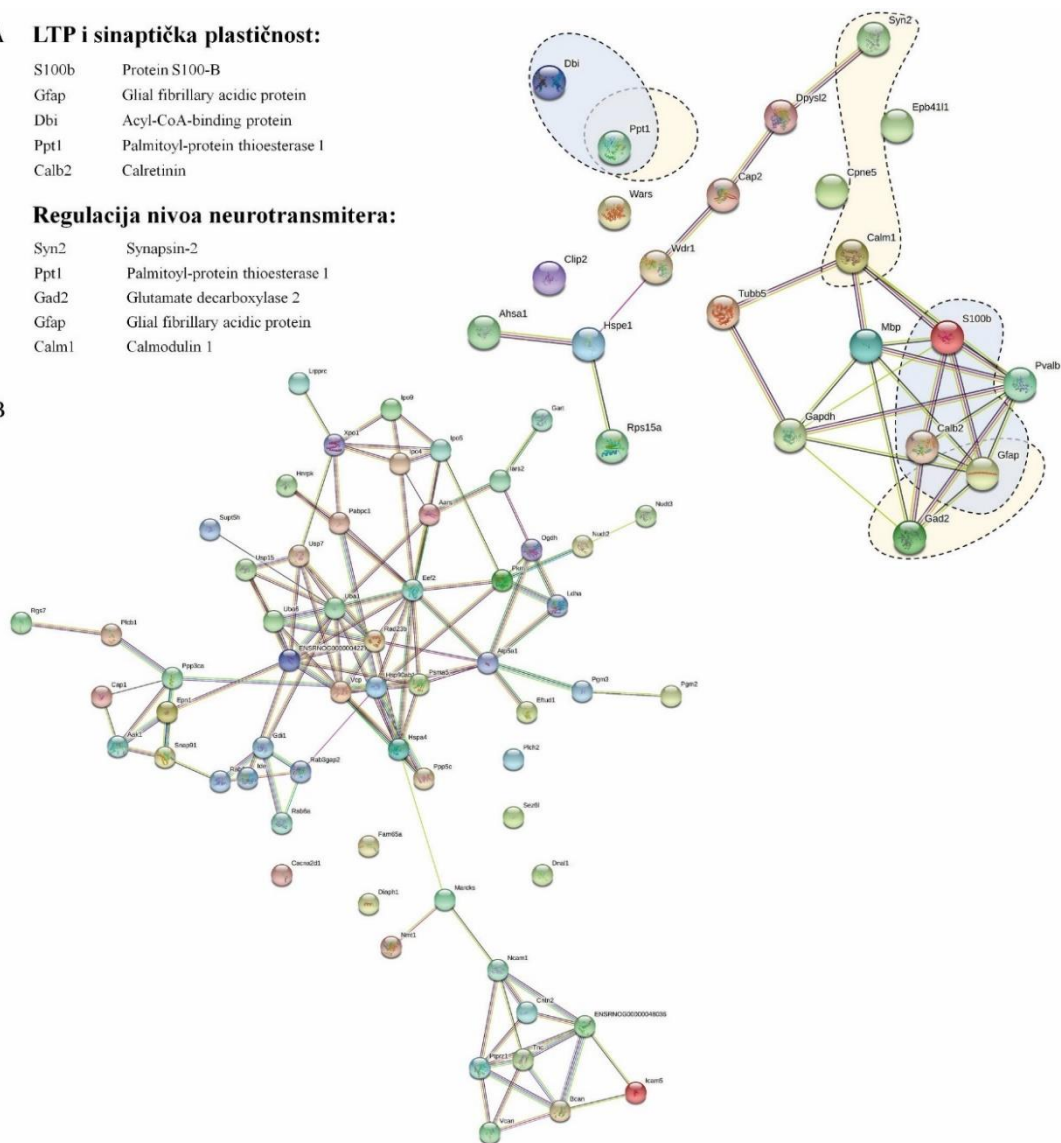
**A LTP i sinaptička plastičnost:**

S100b	Protein S100-B
Gfap	Glial fibrillary acidic protein
Dbi	Acyl-CoA-binding protein
Ppt1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
Calb2	Calretinin

**Regulacija nivoa neurotransmitera:**

Syn2	Synapsin-2
Ppt1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
Gad2	Glutamate decarboxylase 2
Gfap	Glial fibrillary acidic protein
Calm1	Calmodulin 1

**B**



**Slika 37.** STRING grafički prikaz interakcija između proteina povećane (A) i smanjene (B) ekspresije u kontrolnim životinjama nakon tretmana fluoksetinom.

Kao i kod kontrolnih životinja, u grupi socijalno izolovanih pacova fluoksetin je uglavnom deregulisao proteine, smanjujući njihovu ekspresiju (**Tabela 10**). Ukupno 14 proteina je pokazalo povećanu ekspresiju nakon tretmana fluoksetinom.

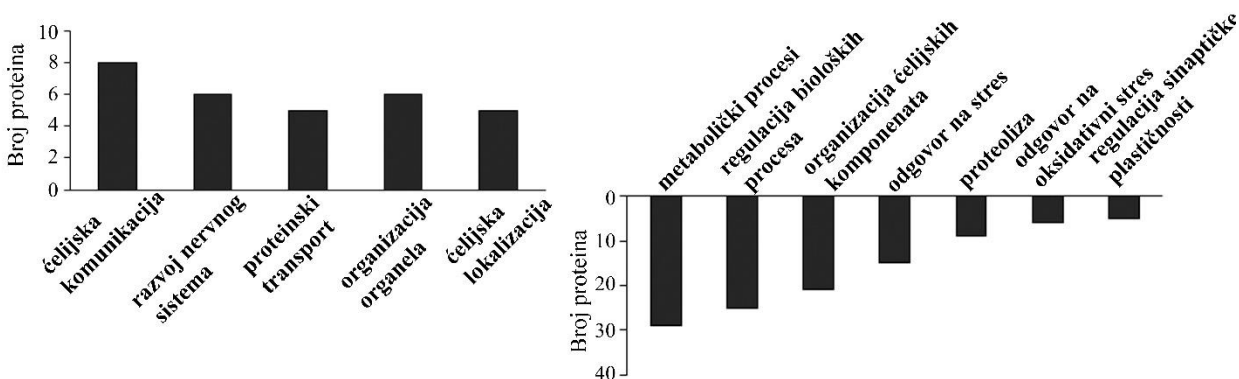
**Tabela 10.** Lista dereguliranih citosolnih proteina u socijalno izolovanim životinjama nakon hroničnog tretmana fluoksetinom (ISF vs. IS).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
P55067	Neurocan core protein	3	3	2,84
P62828	GTP-binding nuclear protein Ran	8	8	2,52
Q499Q4	Phosphoglucomutase 1	2	2	2,52
Q05982	Nucleoside diphosphate kinase A	29	17	2,21
F1M1D5	Protein Tbcd	14	13	2,15
B3VPA7	Cysteine-sulfinate decarboxylase	2	2	1,98
P45479	Palmitoyl-protein thioesterase 1	4	4	1,96
B5DF65	Biliverdin reductase B (Flavin reductase (NADPH))	15	14	1,81
Q5EB77	Ras-related protein Rab-18	7	6	1,77
Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	6	4	1,74
Q62625-2	Isoform 2 of Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	3	2	1,7
P84079	ADP-ribosylation factor 1	40	7	1,69
P63102	14-3-3 protein zeta/delta	12	11	1,52
Q9EQX9	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	12	11	1,51
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
D4A6C5	Protein Arhgap1	3	2	0,8
F1LPP0	Amphiphysin	17	15	0,8
F1M951	Protein-tyrosine-phosphatase	5	5	0,8
Q3MID5	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	10	7	0,8
Q52KS1	ATP-dependent 6-phosphofruktokinase	37	26	0,8
Q8CF97	Deubiquitinating protein VCIP135	9	9	0,8
B2RYG6	Ubiquitin thioesterase	12	8	0,78
O35331	Pyridoxal kinase	11	11	0,78
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	59	42	0,78
Q3ZAU6	Protein Rnf14	4	3	0,78
O35095	Neurochondrin	8	7	0,77
Q6P4Z9	COP9 signalosome complex subunit 8	7	7	0,77
B4F772	Heat shock 70 kDa protein 4L	29	25	0,76
D4AA63	Protein Ubqln2	6	5	0,76
F1LMZ8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	2	2	0,76
G3V6L4	Kinesin-like protein	28	18	0,76
M0R919	Prefoldin subunit 3	2	2	0,76
P18420	Proteasome subunit alpha type-1	3	2	0,76
P22734-2	Isoform 2 of Catechol O-methyltransferase	5	4	0,76
P39069	Adenylate kinase isoenzyme 1	23	21	0,76
Q4G017	Nischarin	2	2	0,76
R9PXW7	Stress-induced phosphoprotein 1, isoform CRA_a	23	20	0,76

A0A0G2K9L2	Protein Tom112	5	5	0,75
G3V8B6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	8	8	0,75
I7FKL4	Myelin basic protein transcript variant 1	13	3	0,75
P37377	Alpha-synuclein	8	7	0,75
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	9	6	0,75
Q08602	Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha	9	9	0,75
Q91Z79	Liprin-alpha-3	13	11	0,75
A0A0G2JW38	Protein Rpe	2	2	0,74
A0A0G2K1Q9	Erythrocyte protein band 4.1-like 3, isoform CRA_e	8	6	0,74
Q5U318	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	7	7	0,74
Q80Z30	Protein phosphatase 1E	14	13	0,74
D3ZXS8	Huntingtin interacting protein 2 (Predicted), isoform CRA_a	12	10	0,73
P19468	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	5	5	0,73
Q9ERB4	Versican core protein (Fragments)	11	3	0,73
D4AC23	Protein Cct7	9	8	0,72
D4AEH3	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 (Predicted)	2	2	0,72
P47819-2	Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein	6	6	0,72
P85108	Tubulin beta-2A chain	23	3	0,72
Q6P799	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	10	10	0,72
D4A4U3	Protein Mdp1	3	3	0,69
O08557	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	6	4	0,69
P22062	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	16	16	0,69
P41562	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	8	7	0,69
D3Z955	Protein Pgm211	7	5	0,68
P62959	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	23	21	0,68
Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	45	44	0,68
B4F7C2	Tubulin beta chain	59	11	0,67
B5DFN2	Adenosylhomocysteinase 2	12	5	0,67
O88767	Protein deglycase DJ-1	32	30	0,67
Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	67	64	0,66
P69897	Tubulin beta-5 chain	22	2	0,65
A0A0G2JT00	Divalent cation tolerant protein CUTA, isoform CRA_c	2	2	0,64
D3ZDT1	Protein Epb4112	18	16	0,64
Q4FZU8	Protein FAM65A	2	2	0,64
P11980-2	Isoform M2 of Pyruvate kinase PKM	88	3	0,63
Q05683	Glutamate decarboxylase 2	12	11	0,63
Q7TPB1	T-complex protein 1 subunit delta	8	7	0,63
G3V7C6	Tubulin beta-4B chain	75	3	0,6
P04631	Protein S100-B	3	2	0,59
P70470	Acyl-protein thioesterase 1	4	4	0,59

Q5RKI0	WD repeat-containing protein 1	21	17	0,59
A0A0G2K0F3	Band 4.1-like protein 1	11	7	0,58
G3V7G9	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	3	2	0,56
A0A0G2JSQ1	Beta-synuclein	11	9	0,55
Q3MHS9	Chaperonin containing Tcp1, subunit 6A (Zeta 1)	9	9	0,54
P11980	Pyruvate kinase PKM	93	6	0,53
Q6LDS4	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	13	13	0,52
D3ZHB7	Protein Ube3c	3	3	0,51
A0A0G2KAT4	Spliceosome RNA helicase Ddx39b	2	2	0,47
Q5U2S7	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	2	2	0,47
Q6IE67	Proteasome subunit alpha type	2	2	0,45
Q6AYD5	G1 to S phase transition 1	7	5	0,41
P30904	Macrophage migration inhibitory factor	5	5	0,29
P61212	ADP-ribosylation factor-like protein 1	2	2	0,19
P84087	Complexin-2	6	3	0,14

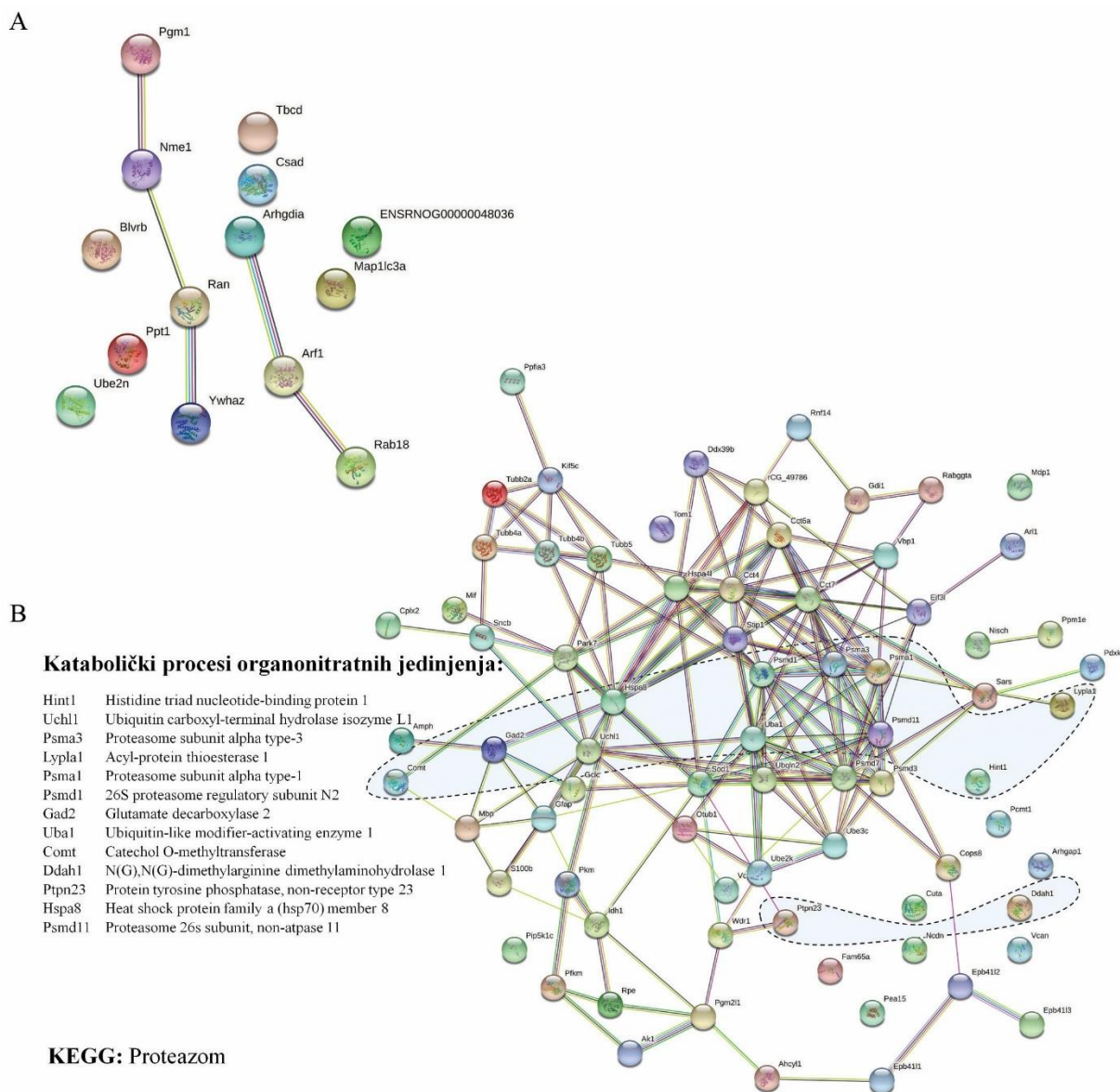
Prema rezultatima Blast2GO analize, proteini povećane ekspresije kod socijalno izolovanih životinja nakon tretmana fluoksetinom su uglavnom ukazali na promene u ćelijskoj komunikaciji i organizaciji organela, dok su proteini smanjene ekspresije vezani za metaboličke procese i regulaciju istih, kao i organizaciju ćelijskih komponenata (**Slika 39**).



**Slika 39.** Grafički prikaz izmenjenih bioloških procesa socijalno izolovanih životinja nakon tretmana fluoksetinom.

STRING interaktomiks je pokazao da postoji značajno više interakcija između proteina povećane ekspresije, bez izdavanja bioloških procesa kao posebno izmenjenih (**Slika 40**). Sa druge strane, kod proteina smanjene ekspresije je dominantno smanjena ekspresija proteina koji

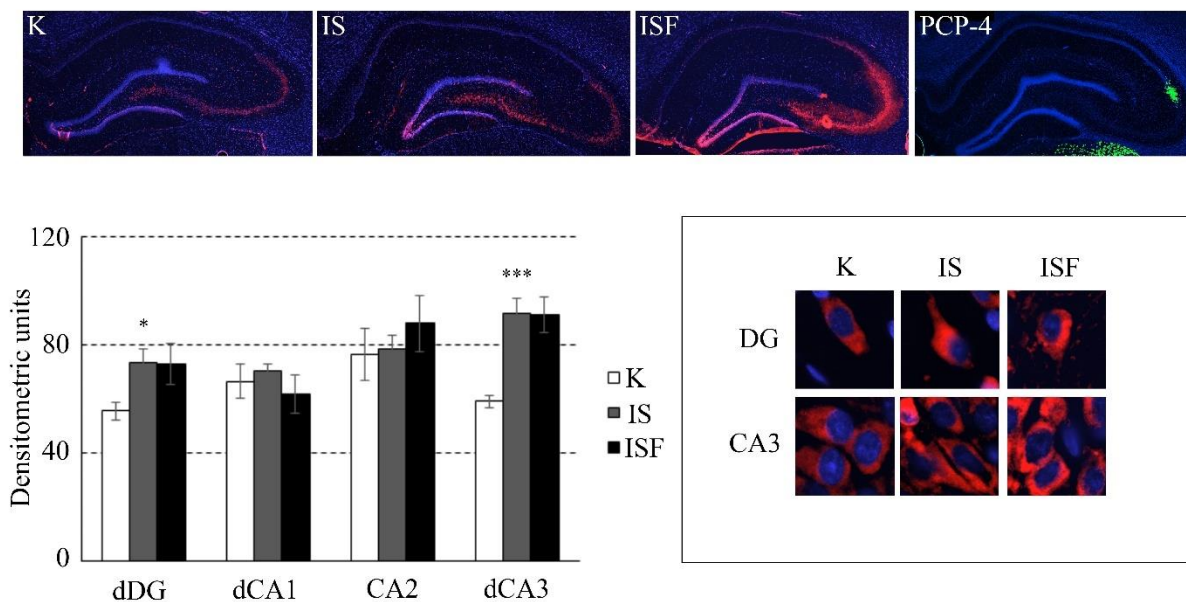
učestvuju u kataboličkom procesu organo-nitratnih jedinjenja. Međutim, heterogenost izmenjenih proteina je verovatno rezultat istovremenog uticaja socijalne izolacije i tretmana fluoksetinom.



**Slika 40.** STRING prikaz interakcija između proteina povećane (A) i smanjene (B) ekspresije u citosolu IS životinja tretiranih fluoksetinom.

HSP 90 proteinska ekspresija validirana je primenom imunofluorescentne metode na presecima dorzalnog hipokampusa, sa fokusom na distribuciju u različitim subregionima (dCA1, CA2, dCA3 i dDG) (**Slika 41**). Kvantifikacija je urađena denzitometrijski, na osnovu meranja ekspresije deset neurona po preseku subregiona. ANOVA je pokazala značajne efekte samo za IS

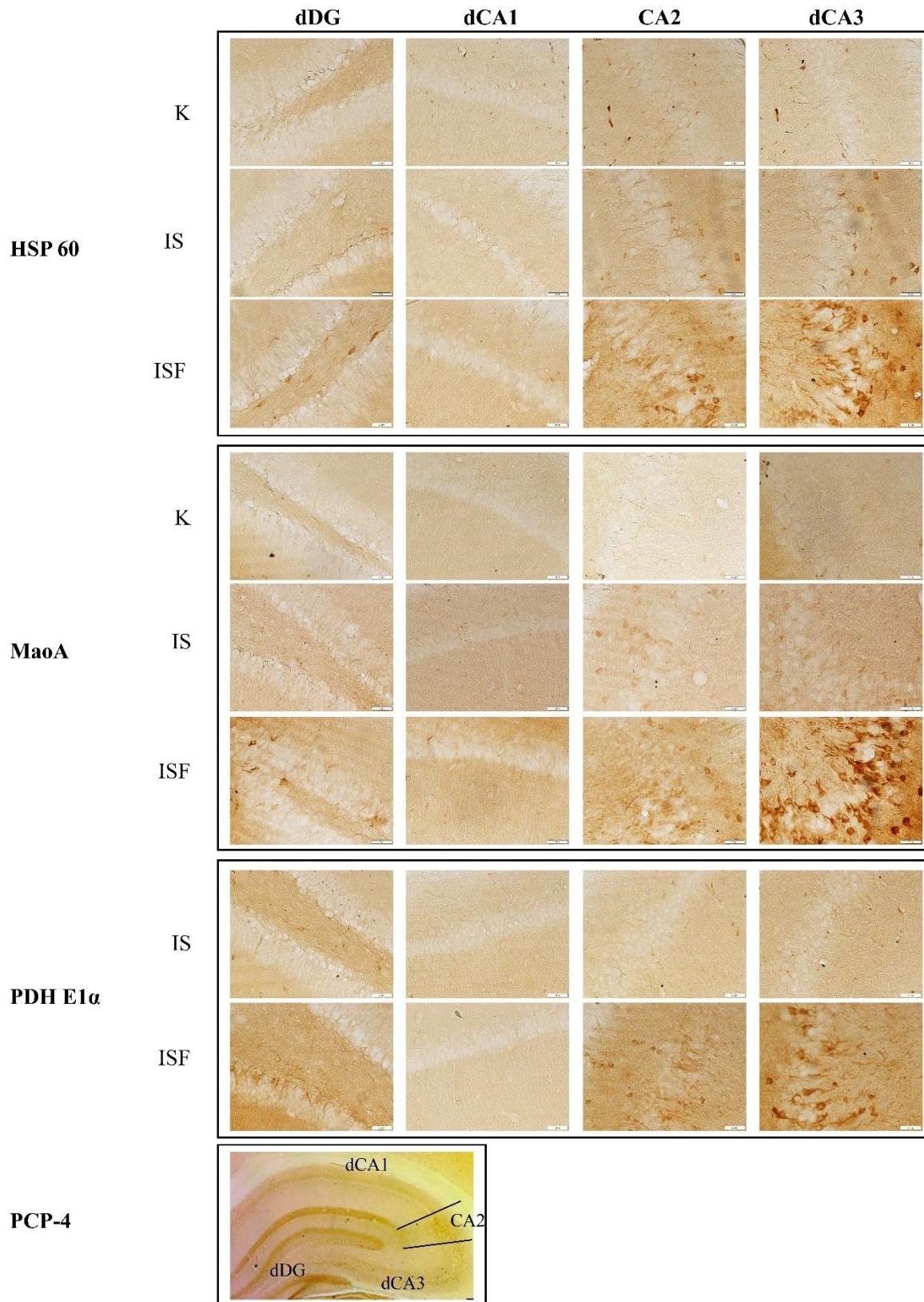
( $F_{1,10}=8,61$ ;  $p<0,05$ ) u dDG kao i u dCA3 subregionu ( $F_{1,10}=29,29$ ;  $p<0,001$ ). Post-hoc test je pokazao da socijalna izolacija značajno povećava ekspresiju HSP 90 u dDG (\* $p<0,05$ ) i dCA3 (\*\* $p<0,01$ ) subregionima. Efekat fluoksetina je na nivou oba subregiona izostao.



**Slika 41.** IF validacija ekspresije HSP 90 proteina u dorzalnom hipokampusu na nivou različitih subregiona. Broj preseka po grupi  $n = 6$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. PCP-4 je korišćen kao marker CA2 subregiona.

Kvalitativna imunohistohemijska metoda (bojenje DAB-om), izvedena na presecima dorzalnog hipokampusa ukazala je na subregion-specifične promene u ekspresiji nekoliko proteina (**Slika 42**). Posebnu podložnost promeni ekspresije HSP 60 i MaoA pokazali su CA2 i dCA3 subregioni u IS i, posebno, ISF grupi u poređenju sa kontrolnim životinjama, kao i kod PDH E1 $\alpha$  u ISF, u poređenju sa IS grupom, dok u ostalim subregiona, posebno u dCA1, nije bilo značajnih promena.





Slika 42. Validacija rezultata proteomske analize.

### 5.3.2. Proteomska analiza frakcija NSM

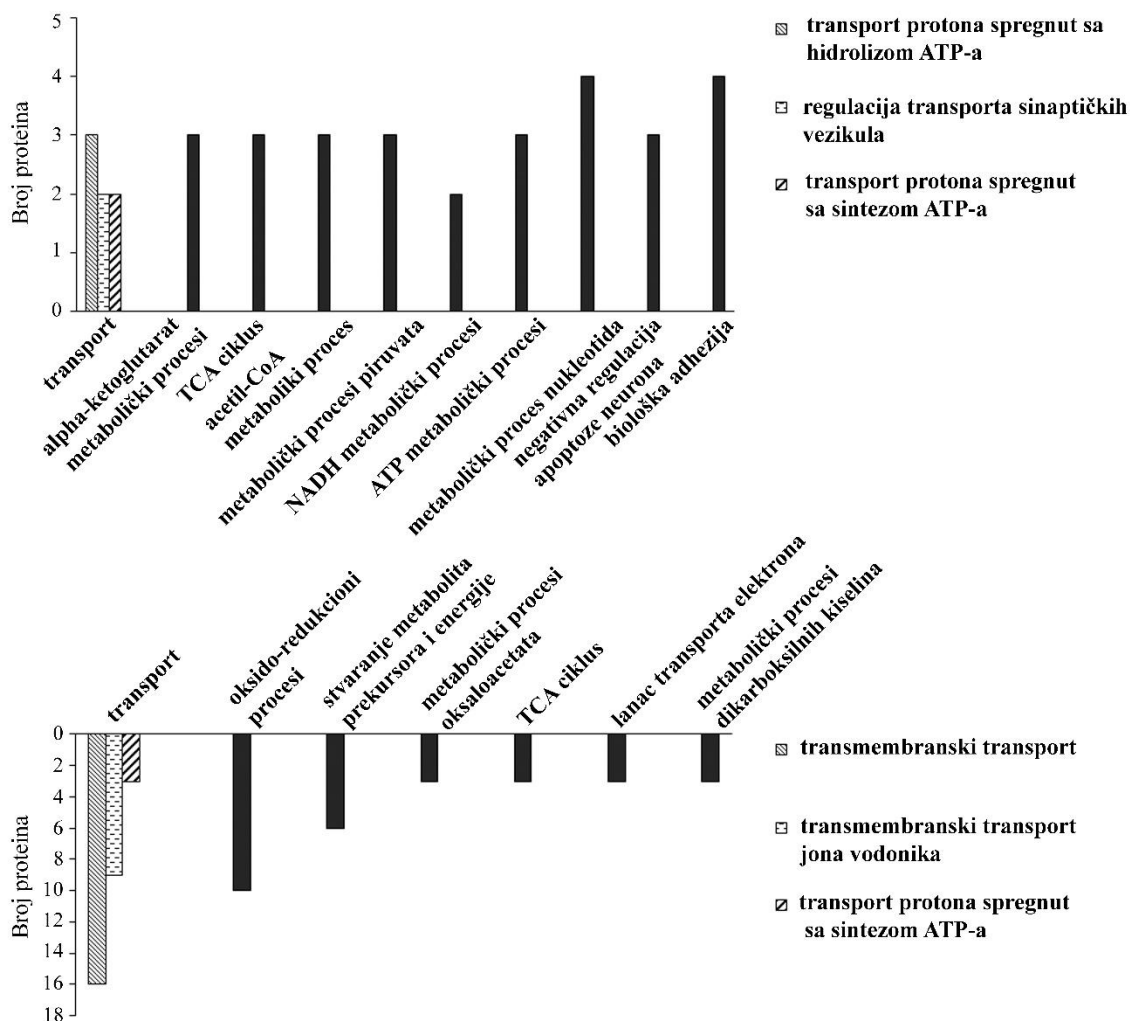
U NSM IS grupe životinja je, uglavnom, došlo do smanjenja ekspresije proteina, dok je manji broj proteina rezultovao povećanom ekspresijom. Lista dereguliranih proteina data je u **Tabeli 12**.

**Tabela 12.** Lista dereguliranih proteina u NSM hronično socijalno izolovanih životinja (IS vs. K).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
A0A0G2K013	Alpha-actinin-4	3	3	18,5
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	16	16	5,9
A0A0G2JZH8	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	3	3	4,3
P62815	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	5	5	3,9
G3V6P2	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex), isoform CRA_a	5	5	3,1
B2GV33	Maoa protein (Fragment)	2	2	2,8
F1LNY3	Neural cell adhesion molecule 1	5	5	2,6
P85834	Elongation factor Tu, mitochondrial	3	3	2,5
D4A133	Protein Atp6v1a	6	6	2,3
P21575-2	Isoform 2 of Dynamin-1	10	10	2,2
P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	12	12	2,0
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta	9	5	2,0
F1LP05	ATP synthase subunit alpha	22	21	1,8
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	17	17	1,8
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	9	5	1,7
P61765	Syntaxin-binding protein 1	10	10	1,7
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	3	2	1,7
R9PXR4	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	3	3	1,7
F1M779	Clathrin heavy chain	13	13	1,7
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	5	5	1,5
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
P81155	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	7	6	0,7
P35435	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	4	4	0,7
D3ZWT8	ATP synthase subunit d, mitochondrial	2	2	0,7
G3V936	Citrate synthase	11	11	0,6
P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	12	12	0,6
Q9Z2L0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	7	2	0,6
D3ZD09	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	3	3	0,6
G3V741	Phosphate carrier protein, mitochondrial	9	9	0,6
P00507	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	10	10	0,6
D4A0T0	Protein Ndubf10	5	5	0,5

Q641Y2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	3	3	0,5
M0R7G4	MICOS complex subunit	2	2	0,5
P62260	14-3-3 protein epsilon	4	3	0,5
D3ZE15	Protein LOC100911483	3	3	0,5
Q6AYS2	Sideroflexin	9	8	0,5
Q05962	ADP/ATP translocase 1	11	7	0,5
P19511	ATP synthase F(0) complex subunit B1 mitochondrial	6	6	0,5
P10888	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	12	11	0,5
P21913	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	3	3	0,5
A0A0G2K5L2	Protein LOC100911440	5	5	0,5
Q5BJT9	Creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	11	9	0,5
Q09073	ADP/ATP translocase 2	8	4	0,4
P67779	Prohibitin	6	6	0,4
P12075	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	4	4	0,4
G3V804	Sideroflexin	6	5	0,4
D4A565	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5 (Predicted), isoform CRA_b	2	2	0,4
D3ZS58	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	2	2	0,3
P29419	ATP synthase subunit e, mitochondrial	2	2	0,3
P19234	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	2	2	0,3
D3ZFQ8	Cytochrome c-1 (Predicted), isoform CRA_c	4	4	0,3
Q8SEZ5	Cytochrome c oxidase subunit 2	3	3	0,2
P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	4	4	0,2
P26772	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	3	3	0,2
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	3	3	0,2
G3V6H5	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	4	4	0,2
D3ZG43	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	4	4	0,1

Blast2GO analizom je pokazano više bioloških procesa, kao moguće izmenjenih usled deregulacije sub-proteoma u NSM (**Slika 43**). U slučajevima smanjene i povećane ekspresije, dominantno izmenjen je proces transporta. Biološki procesi vezani specifično za povećanje ekspresije proteina su metabolički procesi  $\alpha$ -ketoglutarata, acetil-CoA, piruvata, kao i ATP metabolički procesi. Sa druge strane, smanjenje ekspresije proteina specifično se vezuje za oksido-redukcijske procese, kao i procese transporta elektrona u NSM.



**Slika 43.** Grafički prikaz moguće izmenjenih bioloških procesa na osnovu broja proteina povećane, odnosno smanjene ekspresije, u NSM socijalno izolovanih životinja.

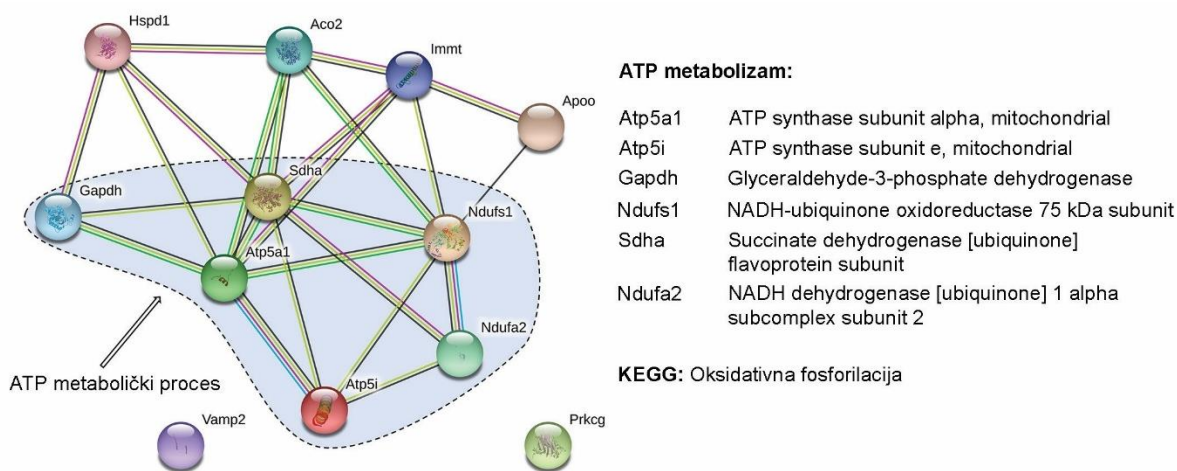
STRING analiza je ukazala na veći broj interakcija između proteina povećane, ali i snižene ekspresije. Interakcije između proteina povećane ekspresije ukazuju na selektivnu stimulaciju mitohondrijalnog transporta na nivou ATP sinteze, dok proteini smanjene ekspresije ukazuju na poremećaje procesa oksidativne fosforilacije i mitohondrijalnog transporta (**Slika 44**). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim Blast2GO analizom.



**Tabela 11.** Lista dereguliranih proteina u NSM kontrolnih životinja nakon hroničnog tretmana tianeptinom (KT vs. K).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
P29419	ATP synthase subunit e, mitochondrial	3	5	10,29
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	2	5,89
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2	2	5,87
M0R7G4	MICOS complex subunit	2	3	5,26
Q920L2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	2	3	4,38
P63319	Protein kinase C gamma type	2	2	4,22
D3ZS58	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	3	4	2,63
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4	5	2,32
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	4	4	2,24
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	2	3	2,06
Q3KR86	MICOS complex subunit Mic60	2	2	1,77
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
Q63965	Sideroflexin-1	3	5	0,36
P32551	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	5	6	0,31

Prema STRING bazi, proteini povećane ekspresije su pokazali značajno više interakcija od očekivanog, sa ATP metabolizmom kao najznačajnije pogođenom procesu, dok je KEGG pokazao značaj puta oksidativne fosforilacije (Slika 45).

**Slika 45.** STRING grafički prikaz interakcija između proteina povećane ekspresije nakon tretmana tianeptinom u kontrolnim životinjama.

U NSM IS životinja, tianeptin je, kao i u kontrolnoj grupi, uslovio višestruko povećanje ekspresije najvećeg broja dereguliranih proteina (**Tabela 13**).

**Tabela 13.** Lista dereguliranih proteina u NSM hronično socijalno izolovanih životinja nakon hroničnog tretmana tianeptinom (IST vs. IS).

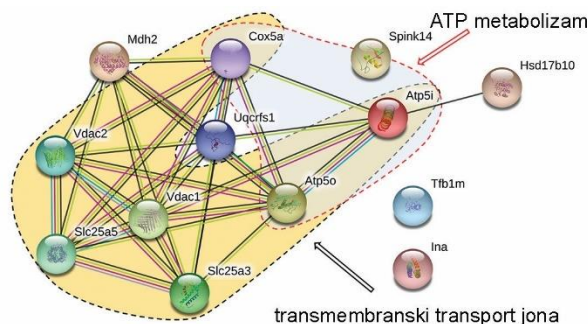
UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	2	5	4,56
P16036	Phosphate carrier protein, mitochondrial	2	5	4,19
Q6IE46	Serine protease inhibitor Kazal-type 14	2	8	3,67
O70351	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	2	2	3,56
Q9Z2L0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	2	4	2,78
P81155	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	2	2	2,70
P29419	ATP synthase subunit e, mitochondrial	2	9	2,59
P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	3	6	2,58
P23565	Alpha-internexin	2	2	2,55
Q811P6	Dimethyladenosine transferase 1, mitochondrial	5	7	2,44
Q06647	ATP synthase subunit O, mitochondrial	3	7	1,93
P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	5	6	1,92
Q09073	ADP/ATP translocase 2	3	4	1,67
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
P26284	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	5	8	0,45
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	2	3	0,22

Proteini povećane ekspresije pokazali su značajno više interakcija u domenu procesa transmembranskog transporta jona i/ili ATP metabolizma (**Slika 46**).

**Transmembranski transport jona i ATP metabolizam:**

- Atp5i      ATP synthase subunit e
- Atp5o      ATP synthase subunit O
- Cox5a      Cytochrome c oxidase subunit 5A
- Slc25a3    Phosphate carrier protein
- Slc25a5    ADP/ATP translocase 2
- Vdac1      Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
- Vdac2      Voltage-dependent anion-selective channel protein 2

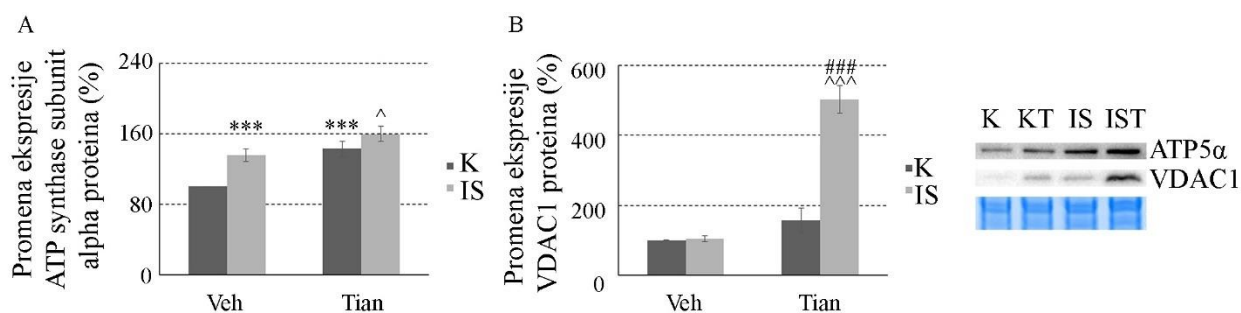
**KEGG:** Oksidativna fosforilacija



**Slika 46.** STRING grafički prikaz interakcija proteina povećane ekspresije u NSM socijalno izolovanih životinja nakon tretmana tianeptinom.

Western blot analizom su validirane promene ekspresije ATP5a i VDAC1 u frakcijama NSM. ANOVA je pokazala značajne efekte IS ( $F_{1,18}=15,33$ ;  $p<0,001$ ) i tianeptin ( $F_{1,18}=25,08$ ;  $p<0,001$ ) na promene ekspresije ATP5a proteina (**Slika 47A**). IS i tianeptin su značajno povećali ekspresiju proteina (\*\* $p<0,001$ ), a kod IST grupe uočava se i kumulativni efekat ( $\wedge p<0,05$ ).

Za promene ekspresije VDAC1 ANOVA je pokazala značajan efekat IS ( $F_{1,15}=49,22$ ;  $p<0,001$ ), tianeptin ( $F_{1,15}=83,89$ ;  $p<0,001$ ) i kombinovanog delovanja IS  $\times$  tianeptin ( $F_{1,15}=47,09$ ;  $p<0,001$ ) (**Slika 47B**). Statistički značajno povećanje je uočeno samo u IST grupi, u poređenju sa IS ( $\wedge\wedge p<0,001$ ) i sa KT grupom ( $\#\#\# p<0,001$ ).



**Slika 47.** Validacija rezultata izmenjene ekspresije ATP5 $\alpha$  (A) i VDAC1 (B). Broj životinja po grupi n = 4 - 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

Hronični tretman fluoksetinom je, kao i u slučaju tianeptina, uglavnom uticao na povećanje ekspresije proteina NSM kontrolnih životinja (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Lista deregulisanih proteina u NSM kontrolnih životinja nakon hroničnog tretmana fluoksetinom (KF vs. K).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklapljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
B7X6I3	C38 protein	4	4	8,49
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	33	32	4,63
G3V733	Synapsin II, isoform CRA_a	7	3	3,97
R9PXR4	Mitochondrial import receptor subunit T	7	6	3,78
Q794F9	4F2 cell-surface antigen heavy chain	3	3	3,49
Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain	17	1	3,19
G3V936	Citrate synthase	8	7	3,09
Q5XIN6	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	5	5	3,09
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2	19	13	3,06

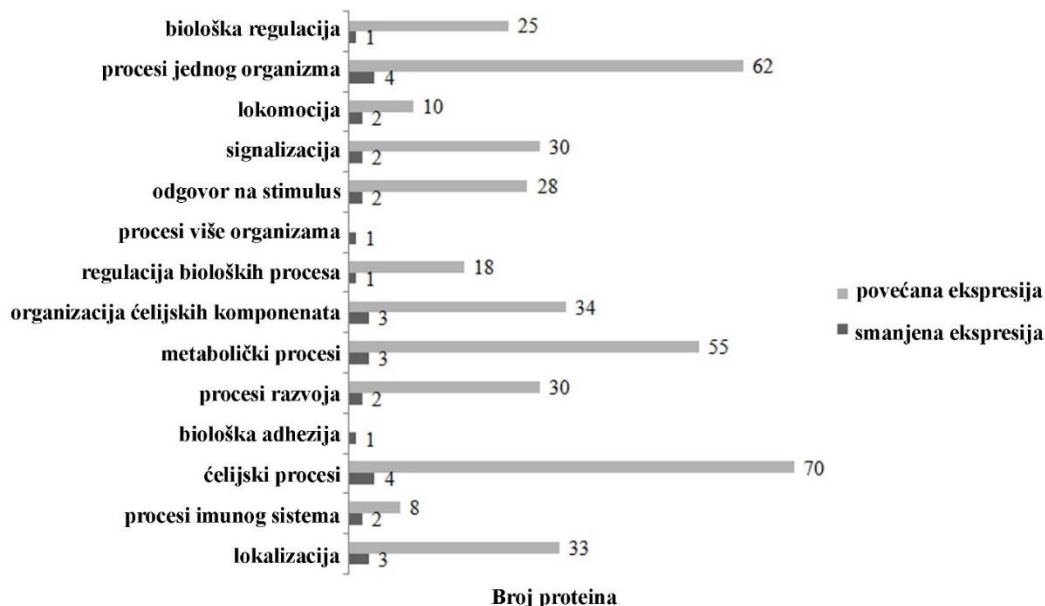


Q2TA68	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	11	8	3,02
P53534	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	3	1	3,00
Q9QUL6	Vesicle-fusing ATPase	12	12	2,99
P09951	Synapsin-1	10	7	2,96
P61765	Syntaxin-binding protein 1	3	2	2,91
D4A133	Protein Atp6v1a	8	7	2,90
Q09073	ADP/ATP translocase 2	5	2	2,84
P32736	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	2	2	2,80
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	22	22	2,74
P14882	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	3	3	2,60
G3V6P2	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex), isoform CRA_a	5	4	2,59
Q52KS1	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	2	2	2,58
P60203	Myelin proteolipid protein	4	4	2,52
F7FKI5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	3	3	2,45
P21707	Synaptotagmin-1	6	6	2,40
P07323	Gamma-enolase	4	3	2,27
G3V741	Phosphate carrier protein, mitochondrial	7	6	2,26
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	22	18	2,12
P11884	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	2	2	2,11
F1LX07	Protein Slc25a12	14	12	2,08
A0A0G2K943	AP-2 complex subunit alpha-2	6	6	2,04
Q99NA5	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	7	7	2,03
A0A097BVJ5	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase transcript variant 1	5	4	2,01
A0A0G2KAN7	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	3	3	1,98
P32551	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	8	7	1,97
P07335	Creatine kinase B-type	3	3	1,96
P14408-2	Isoform Cytoplasmic of Fumarate hydratase, mitochondrial	3	3	1,95
P21575-3	Isoform 3 of Dynamin-1	13	13	1,95
P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	14	14	1,94
B2GV33	Maoa protein (Fragment)	7	6	1,91
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	30	28	1,91
P05708	Hexokinase-1	27	4	1,89
P48721	Stress-70 protein, mitochondrial	16	16	1,89
P51650	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	8	7	1,89
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	9	5	1,89
P11442	Clathrin heavy chain 1	11	10	1,88

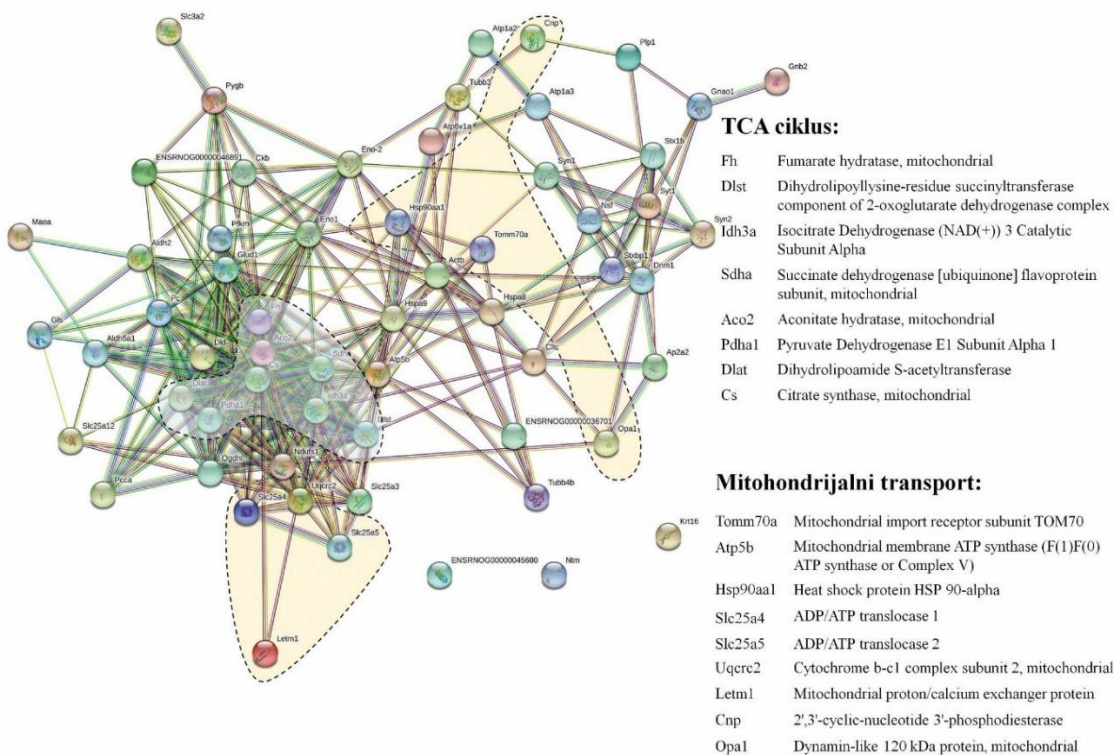
P06686	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	28	11	1,80
Q45QL6	Guanine nucleotide binding protein beta 2 (Fragment)	4	2	1,80
D3ZQD3	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	5	3	1,78
Q920L2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	16	14	1,75
Q4QRB4	Tubulin beta-3 chain	15	1	1,73
P06687	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	26	8	1,72
P61265	Syntaxin-1B	8	7	1,71
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	14	13	1,64
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	28	26	1,60
Q5EB49	Enolase 1, (Alpha)	8	7	1,59
P07323	Gamma-enolase	7	5	1,56
P52873	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	9	9	1,53
Q05962	ADP/ATP translocase 1	4	1	1,53
Q6IFU9	Protein Krt16	6	2	1,51
P59215	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	11	8	1,49
<b>Proteini smanjene ekspresije</b>				
P01830	Thy-1 membrane glycoprotein	3	2	0,79
Q6P9V9	Tubulin alpha-1B chain	3	3	0,40
Q01205	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	5	4	0,19

Bioinformatička analiza izmenjenih proteina u NSM nakon tretmana fluoksetinom pokazala je da su biološke funkcije dominantno promenjene usled povećanja ekspresije proteina vezane za signalizaciju kao i organizaciju ćelijskih komponenata (**Slika 48**). Sa druge strane, smanjenje ekspresije proteina utiče jednako na veći broj bioloških procesa, posebno lokalizacije i organizacije ćelijskih komponenata.

U ovim uzorcima uočen je veći broj interakcija od očekivanog među proteinima povećane ekspresije, a posebno pogođenim su Krebsov ciklus i mitohondrijalni transport (**Slika 49**).



**Slika 48.** Grafički prikaz moguće izmenjenih bioloških procesa na osnovu broja proteina povećane, odnosno smanjene ekspresije nakon tretmana fluoksetinom.



**KEGG:** TCA ciklus, metabolizam Glu/Gln

**Slika 49.** STRING grafički prikaz interakcija između proteina povećane ekspresije u kontrolnoj grupi životinja nakon tretmana fluoksetinom.

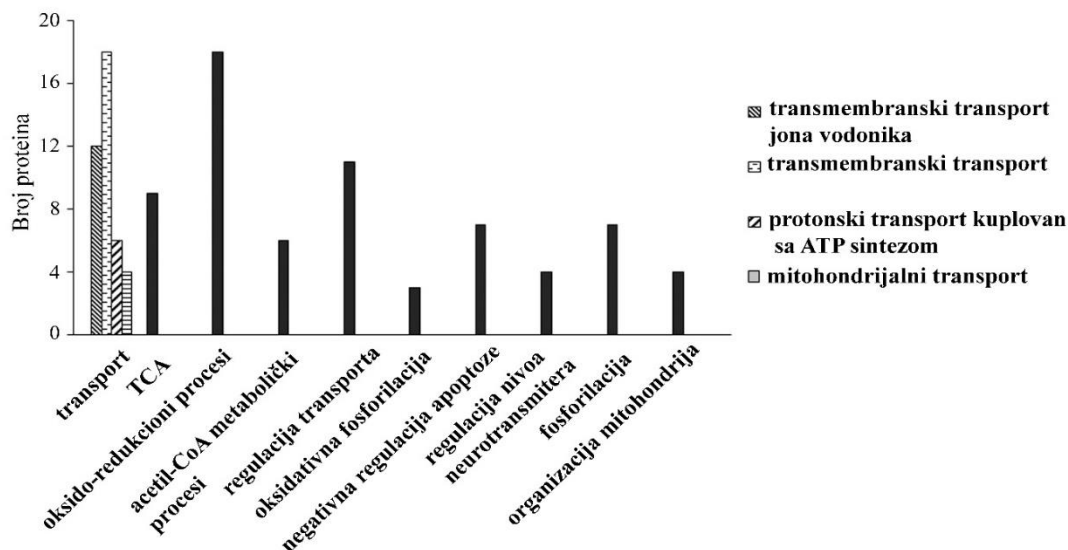
Fluoksetin je kod socijalno izolovanih životinja delovao isključivo povećavajući ekspresiju proteina (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Lista dereguliranih proteina u NSM hronično socijalno izolovanih životinja nakon hroničnog tretmana fluoksetinom (ISF vs. IS).

UniProtKB pristupni br.	Proteini	Br. preklopljenih peptida	Br. jedinstvenih peptida	Nivo promene
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	6	4	6,14
P09606	Glutamine synthetase	1	1	5,36
D3ZG43	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	4	4	5,14
G3V6H5	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	4	4	4,16
P13086	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial (mit)	3	3	3,44
Q06647	ATP synthase subunit	13	13	3,41
A0A0G2K5L2	Protein LOC100911440	6	5	3,3
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	22	10	3,29
P32551	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	12	11	2,93
P00507	Aspartate aminotransferase, mit	13	12	2,74
D4A5L9	Protein LOC679794	4	4	2,64
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	7	3	2,6
G3V936	Citrate synthase	11	11	2,59
B2RZ24	Succinyl-CoA ligase subunit beta (Fragment)	4	4	2,58
P67779	Prohibitin	3	3	2,39
A0A0G2KB63	Prohibitin-2	8	8	2,37
P19511	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mit	8	8	2,36
D3ZE15	Protein LOC100911483	4	4	2,3
B2GUZ3	Mthfd11 protein	3	2	2,22
Q5RK08	Glioblastoma amplified sequence	4	4	2,22
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	14	14	2,21
D3ZWT8	ATP synthase subunit d, mitochondrial	2	2	2,2
P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	3	3	2,2
A0A0G2JVH4	MICOS complex subunit MIC60	14	14	2,19
G3V741	Phosphate carrier protein, mitochondrial	10	10	2,17
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	22	22	2,16
Q2I6B2	V-type proton ATPase subunit a	11	10	2,11
F1LX07	Protein Slc25a12	15	14	2,06
G3V945	Aldehyde dehydrogenase family 5, subfamily A1	6	6	2,03
P35435	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	5	5	2,03
Q6P9Y4	ADP/ATP translocase 1	9	6	2,03
P10888	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	10	9	2
Q8CFD0	Sideroflexin-5	3	2	1,93

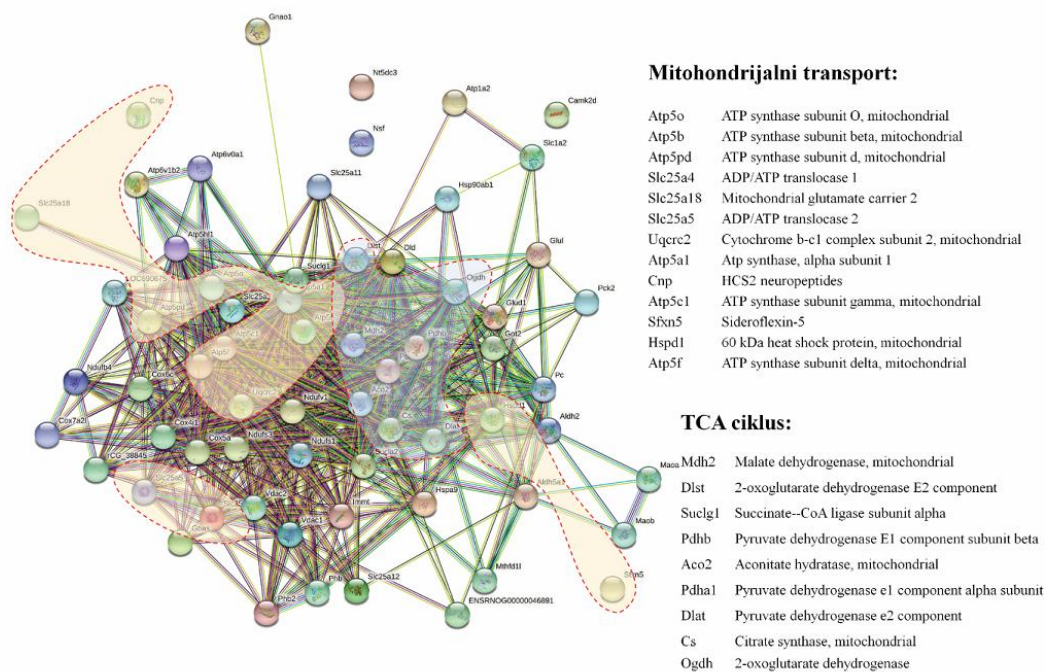
F1LPG5	Protein Ndufb4	3	2	1,91
F1LPM4	Amine oxidase [flavin-containing] B	5	3	1,91
P11275	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit $\alpha$	7	2	1,91
I1T7F1	Amino acid transporter	4	4	1,9
A0A0G2JTL5	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	7	7	1,89
Q09073	ADP/ATP translocase 2	5	3	1,89
F1LQJ7	Protein Pck2	3	3	1,84
Q9Z2L0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	9	9	1,83
P81155	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	7	6	1,82
B2RYT5	Cox7a2l protein	2	2	1,81
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	30	25	1,81
B2GV33	Amine oxidase [flavin-containing]	7	6	1,8
F1M953	Stress-70 protein, mitochondrial	16	15	1,72
G3V6P2	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex), isoform CRA_a	8	8	1,71
P06686	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit $\alpha$ -2	29	15	1,7
P59215	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit $\alpha$	9	8	1,69
F7FKI5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit $\alpha$	13	10	1,66
A0A097BVJ5	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase transcript variant 1	5	4	1,65
P05708	Hexokinase-1	30	7	1,64
Q5XIH3	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	10	9	1,64
P11951	Cytochrome c oxidase subunit 6C-2	4	4	1,6
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta	10	6	1,59
F1LN88	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	3	3	1,57
P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	18	16	1,56
F1LQ81	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein, isoform CRA_b	10	9	1,55
P62815	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	7	7	1,55
P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	15	15	1,54
D3ZAI6	Protein Nt5dc3	7	7	1,53
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	39	37	1,52
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	28	27	1,51
P49432	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit $\beta$ , mit	7	7	1,5

Povećanjem ekspresije proteina u NSM, fluoksetin je delovao mogućom stimulacijom nekoliko bioloških procesa, kao što su transportni procesi, oksido-redukциони procesi, regulacija transporta, kao i stimulacija energetske važnih procesa, poput TCA ciklusa i oksidativne fosforilacije (**Slika 50**).



**Slika 50.** Grafički prikaz moguće dereguliranih bioloških procesa na osnovu broja dereguliranih proteina u NSM kod socijalno izolovanih životinja nakon tretmana fluoksetinom.

Između dereguliranih proteina uočeno je značajno više interakcija, a najviše izmenjeni procesi su mitohondrijalni transport i Krevsov ciklus (**Slika 51**).



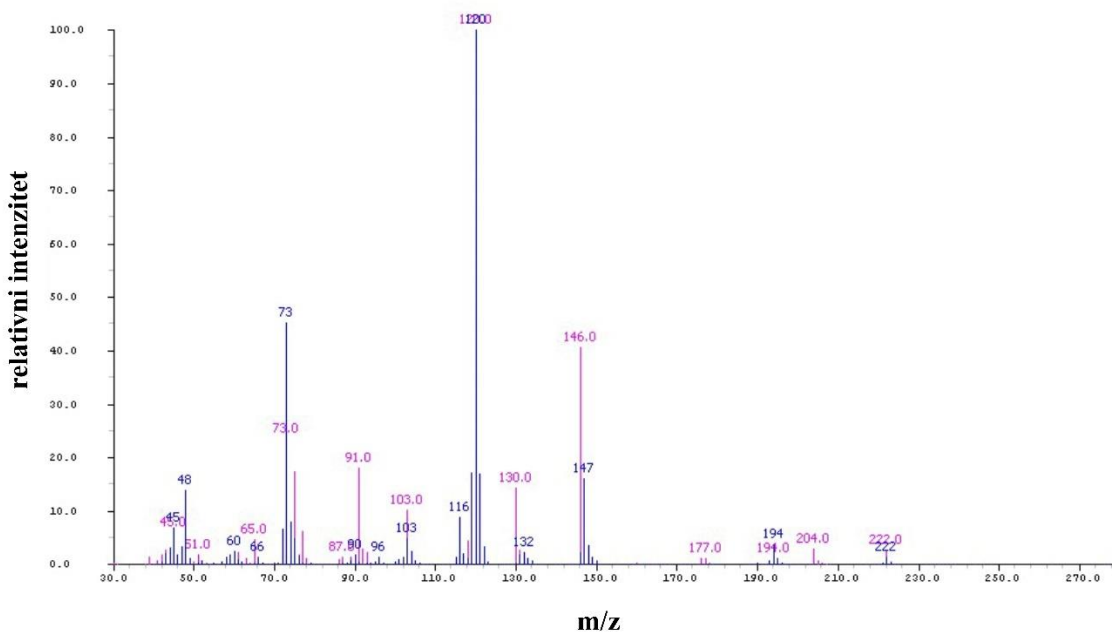
KEGG: Oksidativna fosforilacija, TCA ciklus

**Slika 51.** STRING grafički prikaz interakcija između proteina povećane ekspresije u NSM socijalno izolovanih životinja nakon tretmana fluoksetinom.

## 5.4. Metabolomska analiza hipokampusa

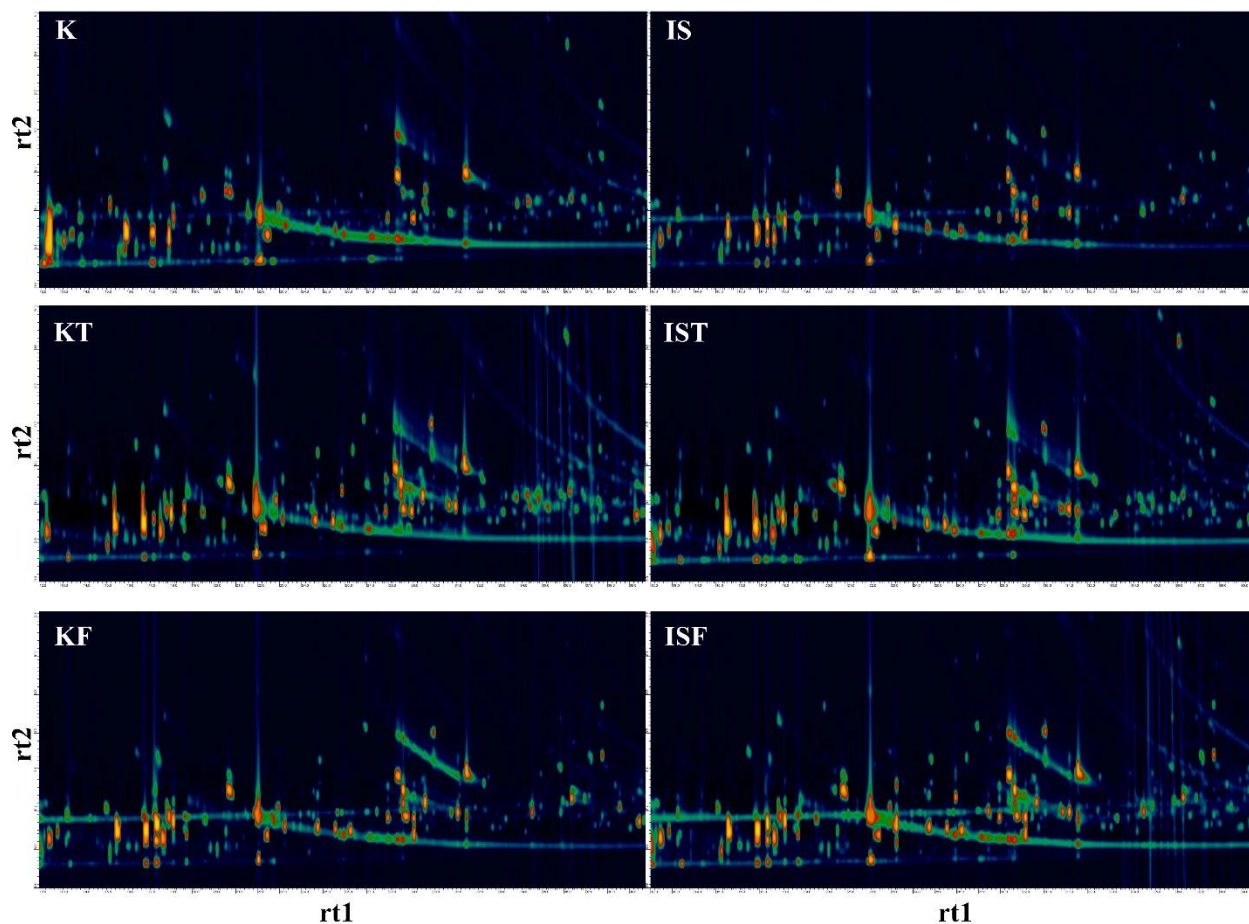
### 5.4.1. Obrazac metabolomskih promena

Kao interna kontrola u metabolomskoj analizi korišćen je deuterisani standard alanina ( $d^4$  – alanin). Saglasno sa dostupnim podacima u NIST bazi podataka, GC×GC-MS spektrom je potvrđeno prisustvo korišćenog internog standarda na retencionom vremenu (rt)  $rt_1 = 16,8$  s i  $rt_2 = 0,66$  s, sa osnovnim jonom na 120 m/z (**Slika 52**).



**Slika 52.** Preklapljeni maseni spektar  $d^4$  – alanina, dobijen GC×GC-MS analizom (plavi signal), sa spektrom  $d^4$  – alanina, dostupnim u NIST biblioteci (ljubičasti signal).

Prikaz reprezentativnih GC×GC spektara svih grupa uzoraka dat je na **Slici 53**.



**Slika 53.** Prikaz reprezentativnih GC×GC spektara analiziranih uzoraka hipokampusa iz svake eksperimentalne grupe.

Na osnovu visine pika dobijenog spektra za interni standard u svakom od uzoraka, koja predstavlja merilo intenziteta, tj. koncentracije internog standarda, urađena je relativna kvantifikacija metabolita detektovanih u vidu blobova. Za međugrupna poređenja, prikazan je odnos srednjih vrednosti pojedinačnih metabolita između grupa. Rezultati poređenja prikazani su u **Tabeli 16**.



**Tabela 16.** Lista izmenjenih metabolita u hipokampusu pacova, nakon izloženosti stresu hronične socijalne izolacije i/ili nakon hronične primene tianeptina ili fluoksetina, statistički obrađeni primenom *t*-testa.

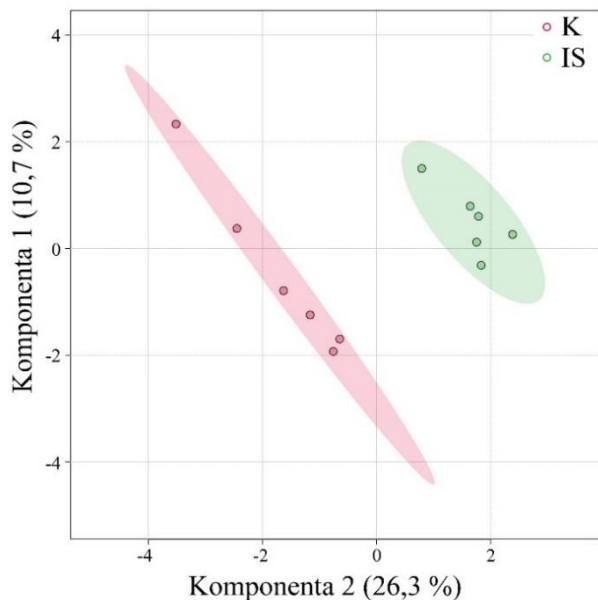
Metabolit	IS vs. K		KT vs. K		IST vs. IS		KF vs. K		ISF vs. IS	
	promena	<i>p</i>	promena	<i>p</i>	promena	<i>p</i>	promena	<i>p</i>	promena	<i>p</i>
Glycine, trimethylsilyl ester	<b>0,10</b>	<i>0,041</i>	<b>0,19</b>	<i>0,088</i>	<b>1,29</b>	<i>0,344</i>	<b>1,00</b>	<i>0,988</i>		
Glycine, N-[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-24-oxo-3,7,12-tris[(trimethylsilyloxy)cholan-24-yl]-, methyl ester, Methyl glycocholate	<b>0,22</b>	<i>0,074</i>	<b>1,47</b>	<i>0,880</i>	<b>2,40</b>	<i>0,060</i>	<b>1,30</b>	<i>0,709</i>	<b>1,03</b>	<i>0,948</i>
L-Valine, N-[N,O-bis(2,4-dinitrophenyl)-L-tyrosyl]-, methyl ester	<b>0,24</b>	<i>0,042</i>	<b>0,50</b>	<i>0,122</i>	<b>0,69</b>	<i>0,088</i>	<b>0,75</b>	<i>0,414</i>	<b>1,21</b>	<i>0,539</i>
Hematoporphyrin	<b>0,29</b>	<i>0,014</i>					<b>0,56</b>	<i>0,088</i>	<b>0,93</b>	<i>0,862</i>
6-Methyl-2-oxo-4-(3-trifluoromethylphenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylic acid 2-methylsulfanyl-ethyl ester	<b>0,38</b>	<i>0,049</i>	<b>0,40</b>	<i>0,046</i>	<b>1,44</b>	<i>0,282</i>	<b>0,96</b>	<i>0,922</i>	<b>0,57</b>	<i>0,262</i>
D-Allofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether	<b>0,39</b>	<i>0,048</i>	<b>0,92</b>	<i>0,819</i>	<b>1,48</b>	<i>0,297</i>	<b>0,57</b>	<i>0,496</i>		
Silane, (2-furanylmethoxy)trimethyl-	<b>0,43</b>	<i>0,006</i>	<b>0,95</b>	<i>0,900</i>	<b>1,10</b>	<i>0,120</i>	<b>1,14</b>	<i>0,448</i>		
D-Glucopyranose, 2-(acetylamino)-2-deoxy-1,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	<b>0,46</b>	<i>0,051</i>	<b>0,78</b>	<i>0,380</i>	<b>1,32</b>	<i>0,206</i>	<b>1,37</b>	<i>0,064</i>		
Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl)monomethyl ester	<b>0,46</b>	<i>0,042</i>	<b>0,87</b>	<i>0,615</i>	<b>1,23</b>	<i>0,370</i>	<b>1,22</b>	<i>0,370</i>		
17-(1,5-Dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	<b>0,48</b>	<i>0,479</i>	<b>2,20</b>	<i>0,560</i>	<b>1,77</b>	<i>0,024</i>				
Silane, trimethylphenoxy-	<b>0,48</b>	<i>0,058</i>	<b>0,83</b>	<i>0,662</i>	<b>1,11</b>	<i>0,688</i>	<b>0,99</b>	<i>0,970</i>		
2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid, trimethylsilyl ester, Pyroglutamic acid	<b>0,52</b>	<i>0,131</i>	<b>1,03</b>	<i>0,922</i>	<b>1,60</b>	<i>0,024</i>	<b>1,19</b>	<i>0,455</i>	<b>1,24</b>	<i>0,348</i>
$\alpha$ -D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate	<b>0,53</b>	<i>0,221</i>	<b>1,65</b>	<i>0,177</i>	<b>2,15</b>	<i>0,014</i>	<b>1,25</b>	<i>0,221</i>	<b>0,55</b>	<i>0,004</i>

Butanoic acid, 4-[bis(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester, GABA	<b>0,54</b>	<i>0,012</i>	<b>0,83</b>	<i>0,420</i>	<b>1,32</b>	<i>0,044</i>	<b>0,89</b>	<i>0,712</i>	<b>1,16</b>	<i>0,204</i>
N-Trimethylsilyl-2-pyrrolidinone	<b>0,69</b>	<i>0,093</i>	<b>1,22</b>	<i>0,447</i>	<b>1,45</b>	<i>0,101</i>	<b>1,04</b>	<i>0,885</i>	<b>0,65</b>	<i>0,054</i>
2-Butenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester, 2-Ketobutyric acid, enol, di-TMS	<b>0,71</b>	<i>0,015</i>	<b>1,07</b>	<i>0,759</i>	<b>1,21</b>	<i>0,071</i>	<b>1,02</b>	<i>0,904</i>	<b>1,12</b>	<i>0,242</i>
10,12-Docosadienedioic acid ditms	<b>0,74</b>	<i>0,329</i>	<b>1,85</b>	<i>0,041</i>	<b>1,51</b>	<i>0,283</i>	<b>0,91</b>	<i>0,766</i>	<b>2,00</b>	<i>0,166</i>
Butanedioic acid, [(trimethylsilyl)oxy], bis(trimethylsilyl) ester, Malic acid (tms)	<b>0,80</b>	<i>0,203</i>	<b>0,94</b>	<i>0,626</i>	<b>1,35</b>	<i>0,099</i>	<b>1,06</b>	<i>0,740</i>	<b>0,72</b>	<i>0,012</i>
Xylazine	<b>0,82</b>	<i>0,332</i>	<b>2,39</b>	<i>0,000</i>	<b>2,32</b>	<i>0,020</i>	<b>2,04</b>	<i>0,069</i>	<b>1,98</b>	<i>0,008</i>
Cholesterol trimethylsilyl ether	<b>0,83</b>	<i>0,373</i>	<b>1,44</b>	<i>0,400</i>	<b>1,27</b>	<i>0,005</i>				
Norketamine	<b>0,84</b>	<i>0,725</i>	<b>1,60</b>	<i>0,200</i>	<b>3,54</b>	<i>0,005</i>	<b>0,31</b>	<i>0,018</i>		
1,5-Anhydro-D-sorbitol, tetrakis(trimethylsilyl) ether	<b>0,84</b>	<i>0,630</i>	<b>1,38</b>	<i>0,318</i>	<b>1,51</b>	<i>0,021</i>	<b>0,87</b>	<i>0,689</i>		
Glycerol, tris(trimethylsilyl) ether	<b>0,85</b>	<i>0,340</i>	<b>1,07</b>	<i>0,763</i>	<b>1,04</b>	<i>0,626</i>	<b>0,91</b>	<i>0,363</i>	<b>0,44</b>	<i>0,000</i>
3-Oxaoct-4-en-2-imine, N-trimethylsilyl-4-trimethylsilyloxy-	<b>0,86</b>	<i>0,412</i>	<b>1,23</b>	<i>0,322</i>	<b>1,31</b>	<i>0,018</i>	<b>1,19</b>	<i>0,348</i>	<b>1,12</b>	<i>0,083</i>
1-Methyl-N,N-bis(trimethylsilyl)-4-[(trimethylsilyl)oxy]-1H-imidazol-2-amine, Creatinine, N,N,O-tris(trimethylsilyl)-	<b>0,86</b>	<i>0,458</i>	<b>1,24</b>	<i>0,389</i>	<b>1,41</b>	<i>0,052</i>	<b>1,12</b>	<i>0,416</i>	<b>0,87</b>	<i>0,243</i>
N,O,O-Tris(trimethylsilyl)-L-threonine	<b>0,89</b>	<i>0,521</i>	<b>1,31</b>	<i>0,222</i>	<b>1,37</b>	<i>0,055</i>	<b>0,85</b>	<i>0,337</i>	<b>0,96</b>	<i>0,555</i>
Arachidonic acid, trimethylsilyl ester	<b>0,92</b>	<i>0,661</i>	<b>1,37</b>	<i>0,042</i>	<b>1,27</b>	<i>0,109</i>	<b>1,02</b>	<i>0,930</i>	<b>0,60</b>	<i>0,002</i>
Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-	<b>1,06</b>	<i>0,767</i>	<b>0,93</b>	<i>0,444</i>	<b>0,41</b>	<i>0,016</i>	<b>0,21</b>	<i>0,007</i>	<b>1,04</b>	<i>0,694</i>
Cholestane-3,5-diol, 5-acetate, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-	<b>1,12</b>	<i>0,809</i>	<b>3,27</b>	<i>0,061</i>	<b>2,07</b>	<i>0,016</i>				
Ketamine	<b>1,13</b>	<i>0,770</i>	<b>2,45</b>	<i>0,044</i>	<b>2,56</b>	<i>0,009</i>	<b>1,08</b>	<i>0,850</i>	<b>2,33</b>	<i>0,012</i>
N-Acetyl glucosamine methoxime, tetrakis(trimethylsilyl)	<b>1,20</b>	<i>0,653</i>	<b>3,57</b>	<i>0,047</i>	<b>1,63</b>	<i>0,173</i>	<b>0,68</b>	<i>0,462</i>	<b>1,02</b>	<i>0,962</i>
Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester, Succinic acid, di-TMS	<b>1,58</b>	<i>0,116</i>	<b>1,81</b>	<i>0,047</i>	<b>0,82</b>	<i>0,291</i>	<b>1,10</b>	<i>0,585</i>		
9-Octadecenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[trimethylsilyl]oxy]methyl]ethyl ester	<b>2,12</b>	<i>0,016</i>	<b>1,47</b>	<i>0,268</i>	<b>0,73</b>	<i>0,130</i>	<b>1,10</b>	<i>0,838</i>		

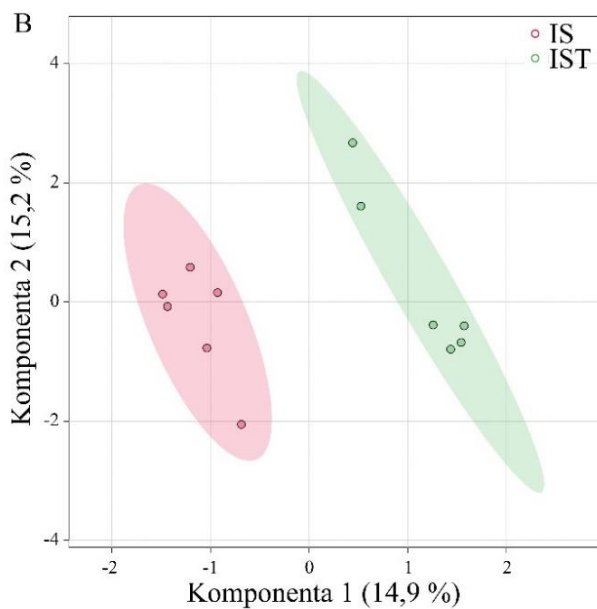
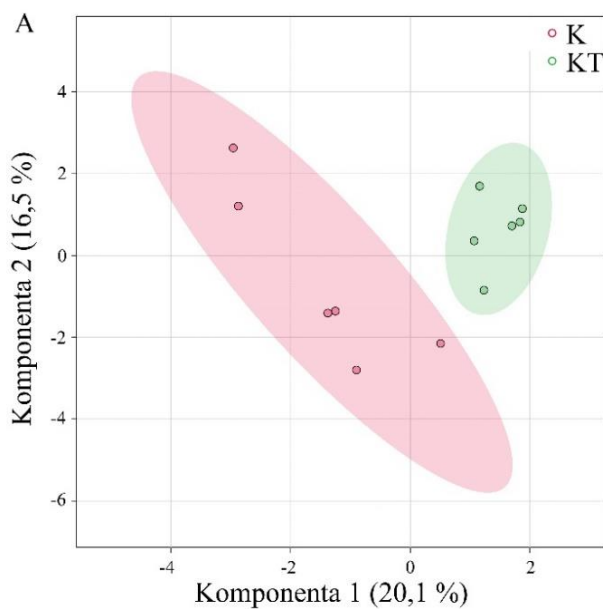
trans-13-Octadecenoic acid, trimethylsilyl ester	<b>2,22</b>	<i>0,047</i>	<b>0,76</b>	<i>0,503</i>	<b>0,48</b>	<i>0,030</i>	<b>0,88</b>	<i>0,852</i>	<b>1,63</b>	<i>0,633</i>
Ethyl iso-allocholate	<b>7,84</b>	<i>0,002</i>	<b>1,02</b>	<i>0,982</i>	<b>0,72</b>	<i>0,355</i>	<b>2,46</b>	<i>0,102</i>	<b>0,83</b>	<i>0,744</i>
Stearic acid, 2-(1-octadecenyloxy)ethyl ester, (Z)-	<b>12,81</b>	<i>0,031</i>			<b>0,65</b>	<i>0,142</i>				
l-Aspartic acid, bis(trimethylsilyl) ester			<b>3,62</b>	<i>0,024</i>	<b>0,59</b>	<i>0,349</i>	<b>1,16</b>	<i>0,870</i>		
2-Pyrrolidinone, 1-(9-octadecenyl)-			<b>1,52</b>	<i>0,050</i>			<b>1,16</b>	<i>0,528</i>		
Pantothenic acid tritms			<b>1,11</b>	<i>0,575</i>	<b>1,34</b>	<i>0,039</i>				
D-(+)-Arabitol, pentakis(trimethylsilyl) ether			<b>0,76</b>	<i>0,245</i>	<b>1,45</b>	<i>0,046</i>				
trans-9-Octadecenoic acid, trimethylsilyl ester			<b>0,22</b>	<i>0,045</i>	<b>0,63</b>	<i>0,643</i>	<b>0,68</b>	<i>0,552</i>	<b>0,91</b>	<i>0,872</i>
$\alpha$ -D-Glucopyranosiduronic acid, 3-(5-ethylhexahydro-2,4,6-trioxo-5-pyrimidinyl)-1,1-dimethylpropyl 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-, methyl ester					<b>2,42</b>	<i>0,048</i>			<b>0,66</b>	<i>0,430</i>
N-Trimethylsilyl-methyl(n-butyl)amine					<b>1,72</b>	<i>0,030</i>				
1,2,3-Propanetricarboxylic acid, 2-[(trimethylsilyloxy]-, tris(trimethylsilyl) ester, Citric acid, tetrakis-TMS					<b>1,37</b>	<i>0,013</i>	<b>1,16</b>	<i>0,564</i>		
n-Heptadecan-1,2-diol,bis-(trimethylsilyl)ether					<b>1,32</b>	<i>0,027</i>				
2-Monostearin trimethylsilyl ether					<b>1,28</b>	<i>0,007</i>				
2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -Diacetoxy-2-methoxy-2,3-dihydrobiphenylene					<b>1,21</b>	<i>0,033</i>				
L-Norvaline, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester									<b>1,13</b>	<i>0,051</i>

### 5.4.2. Multivarijantna obrada podataka metabolomske analize

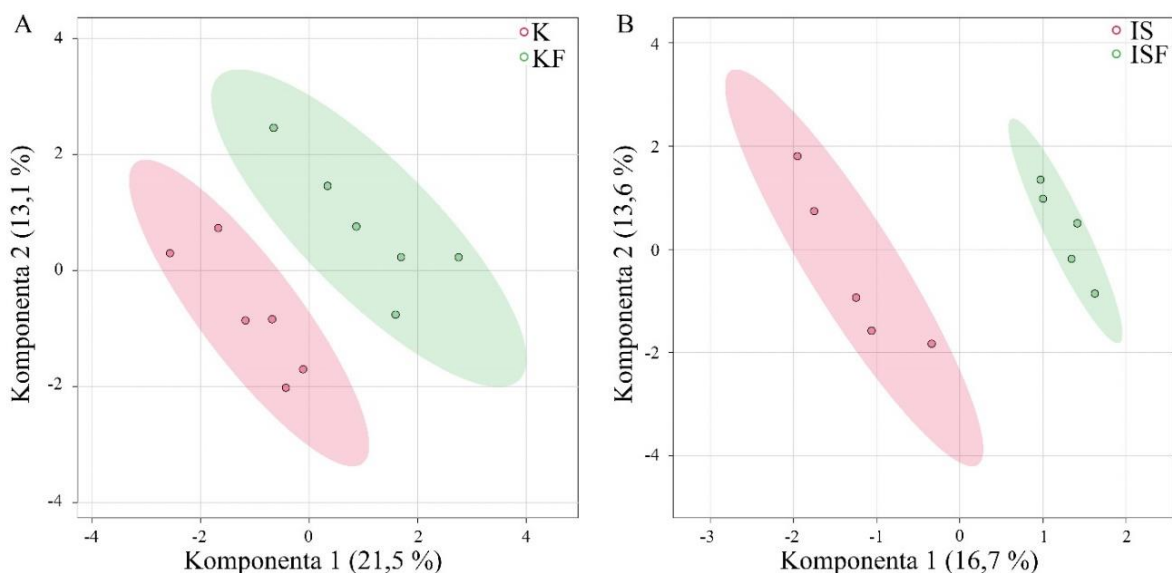
Na Slikama 54, 55 i 56 dati su grafički prikazi rezultata PLS-DA analiza, gde svaka tačka predstavlja funkciju celog spektra za svaki biološki replikat u ispitivanoj grupi.



**Slika 54.** Grafički prikaz PLS-DA između metabolomskih promena kontrolne i socijalno izolovane grupe životinja.



**Slika 55.** PLS-DA grafički prikaz između KT i K (A) i IST i IS (B) grupa životinja.



**Slika 56.** PLS-DA grafički prikaz između KF i K (A) i ISF i IS (B) grupa životinja.

Pojedinačni doprinos svake promenljive, metabolomskom profilu razlika između grupa, baziran je na VIP vrednostima ( $VIP > 1$ ). Rezultati pokazuju najveće razlike između grupe životinja izloženih stresu hronične socijalne izolacije i kontrolne grupe, što je potvrđeno i najvećom tačnošću modela na osnovu validacije „cros validation“ pristupom (**Tabela 17**). Postoji i jasna razlika između grupa tretiranih lekovima. Međutim, validacijom modela za razdvajanje KF grupe u odnosu na K, dobijaju se najmanje dobri rezultati, što ukazuje na postojanje nedovoljno jasnih metabolomskih razlika da bi nastao specifičan metabolomski profil razlika.

**Tabela 17.** PLS-DA ukrštena validacija podataka za izbor najboljeg klasifikatora.

Poređenje između grupa	Br. komponentata	$R^2$ <sup>a</sup>	$Q^2$ <sup>b</sup>	Tačnost
IS vs. K	5	0,99975	0,71242	0,91667
KT vs. K	3	0,98729	0,18832	0,66667
IST vs. IS	4	0,99944	0,43703	0,83333
KF vs. K <sup>c</sup>	/	/	/	/
ISF vs. IS	4	0,99948	0,4464	0,9

<sup>a</sup> Valjanost fitovanja modela

<sup>b</sup> Prediktivna vrednost modela.

<sup>c</sup> Tačnost negativna.

Kao najbolji algoritam za klasifikaciju uzoraka u okviru MetaboAnalyst platforme pokazao se RF. Performanse RF-bazirane klasifikacije između eksperimentalnih grupa date su u **Tabeli 18**. Na

osnovu procenjene greške klasifikacije, OOB greške, najtačnije grupisanje je moguće uraditi između IS i K grupe uzoraka, potom fluoksetinom ili tianeptinom tretiranih IS životinja. Kod IS grupe, najvažnije prediktivne promenljive su GABA, etil izo-aloholat, 2-butenoična kiselina ( $\alpha$ -ketobuterna kiselina) i oktadecenska kiselina. Klasifikaciji između IST i IS grupe najviše doprinose *trans*-13-oktadecenska kiselina, *mio*-inozitol, holestan-3,5-diol, 5-acetat i pantotenska kiselina. U razlikovanju ISF od IS grupe, na osnovu RF klasifikatora, najveći značaj pokazuju glicerol, glukopiranozid i malat. Sa druge strane, najslabije razdvajanje uočava se kod kontrola tretiranih antidepresivima, posebno fluoksetinom. Razlike kod ovih grupa su male da bi bilo moguće na osnovu njih uraditi klasifikaciju.

**Tabela 18.** Osobine klasifikatora zasnovanih na RF-u.

<b>IS vs. K</b>				
	IS	K	greška grupisanja	OOB greška
IS	6	0	0,00	0,0833
K	1	5	0,17	
<b>KT vs. K</b>				
	KT	K	greška grupisanja	OOB greška
KT	3	3	0,50	0,50
K	3	3	0,50	
<b>IST vs. IS</b>				
	IST	IS	greška grupisanja	OOB greška
IST	5	1	0,17	0,167
IS	1	5	0,17	
<b>KF vs. K</b>				
	KF	K	greška grupisanja	OOB greška
KF	0	6	1,00	0,917
K	5	1	0,83	
<b>ISF vs. IS</b>				
	ISF	IS	greška grupisanja	OOB greška
ISF	5	0	0,00	0,10
IS	1	4	0,20	

#### 5.4.3. Pearson-ova korelacija metabolita i vremena imobilnosti

Između svih identifikovanih metabolita urađena je Pearson-ova korelacija u odnosu na vreme imobilnosti u testu prinudnog plivanja. Nekoliko jakih pozitivnih i negativnih korelacija je uočeno,

čak i sa metabolitima koji nisu pokazali značajnu deregulaciju između grupa. Među najjačim značajnim korelacijama su pozitivna korelacija sa *mio*-inozitolom i negativna sa dokozaheksaenskom kiselinom (**Tabela 19**).

**Tabela 19.** Tabelarni prikaz statistički značajnih ( $p < 0,05$ ) Pirsonovih korelacija u opsegu Pirsonovog koeficijenta  $0,4 < r < -0,4$  između nivoa metabolita i vremena imobilnosti, određenog u testu prinudnog plivanja.

Nivo metabolita vs. vreme imobilnosti	r koeficijent	p vrednost
Doconexent, Docosaehaenoic acid	-0,706	0,003
Pentasiloxane, dodecamethyl-	-0,653	0,002
$\alpha$ -D-Galactopyranose, 6-O-(trimethylsilyl)-, cyclic 1,2:3,4-bis(butylboronate)	-0,653	0,004
Pidolic acid	-0,611	0,005
Prostaglandin D(2), O,O-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	-0,588	0,004
Hematoporphyrin	-0,574	0,005
Methyltris(trimethylsiloxy)silane	-0,569	0,006
Niacinamide	-0,555	0,002
D-Glucopyranose, 2-(acetylamino)-2-deoxy-1,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	-0,553	0,002
2-Monopalmitoylglycerol trimethylsilyl ether	-0,549	0,012
Palmitelaidic acid, trimethylsilyl ester	-0,545	0,005
Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl)monomethyl ester	-0,543	0,002
$\alpha$ -D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate	-0,541	0,002
2,2-Bipyridine	-0,531	0,006
5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid, tert-butyldimethylsilyl ester	-0,515	0,050
GABA, Butanoic acid, 4-[bis(trimethylsilyl)amino]-	-0,507	0,005
Benzene, 1,2,3-tris[(trimethylsilyl)oxy]-	-0,506	0,006
D-(+)-Glucuronic acid $\tau$ -lactone, tris(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti)	-0,501	0,013
Silane, trimethyl(3-methylphenoxy)-	-0,499	0,021
3-(2-Hydroxyethyl)imidazole-2-thione	-0,483	0,014
Arachidonic acid, trimethylsilyl ester	-0,479	0,009
3-Oxaoct-4-en-2-imine, N-trimethylsilyl-4-trimethylsilyloxy-	-0,464	0,022
9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[trimethylsilyl]oxy]methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-	-0,447	0,025
Silane, trimethylphenoxy-	-0,446	0,023
$\alpha$ -D-Galactopyranose, 1,2,3-tris-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate	-0,442	0,031
5-Methyluridine, tris(trimethylsilyl) deriv.	-0,435	0,018
Arachidonoyl ethanolamide	-0,416	0,025
Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	0,478	0,021
O-Ethyl-N,N-bis(trimethylsilyl)hydroxylamine	0,513	0,021
Pyrazine, 2,5-bis(trimethylsilyloxy)-	0,525	0,021
Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-	0,579	0,001
Stearic acid, 2-(1-octadecenyloxy)ethyl ester, (Z)-	0,579	0,019

## ***6. DISKUSIJA***

---



Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje proteomskih i metabolomskih promena u osnovi ponašanja nalik depresivnom, kod pacova izazvanog hroničnim stresom socijalne izolacije i delovanja antidepresiva fluoksetina i tianeptina. Iako su ova dva antidepresiva suprotnog mehanizma delovanja, kliničke studije su pokazale približno jednaku uspešnost lečenja depresije i fluoksetinom (67 %) i tianeptinom (75 %), mehanizmom koji nije razjašnjen.<sup>331</sup> S obzirom da lekovi deluju na veoma specifičan i lokalizovan način, putem specijalizovanih receptora, istraživanje smo uradili na hipokampusu, moždanom regionu bogatim serotoninским receptorima.<sup>332</sup> Pored toga, regulatorna uloga hipokampusa u funkcionisanju HPA ose u odgovoru na stres, kao i morfološke i funkcionalne promene kroz koje prolazi usled izloženosti hroničnom stresu, izdvojile su hipokampus kao region mozga od posebnog značaja za istraživanje depresije.

Izloženost blagom hroničnom stresu i efikasno delovanje antidepresiva, čiji uticaj na promene u ponašanju je vremenski odložen u odnosu na porast nivoa neurotransmitera u mozgu, sugerišu na vremenski zahtevne ćelijske promene, među kojima je i de/re-regulacija na nivou proteoma. Mnogi dokazi svedoče o mitohondrijalnoj disfunkciji, ili poremećaju njihovog transporta, kod različitih poremećaja ponašanja, tako i depresije.<sup>84,333</sup> Određivanjem Gibsove slobodne energije ( $\Delta G^{\circ}$ ) mitohondrija, pokazano je da je  $\Delta G^{\circ}$  NSM, koje su smeštene u telu nervnih ćelija i vezuju se za post sinaptičke kompartamane, direktno vezana za sintezu proteina, i da NSM, za razliku od sinaptičkih mitohondrija, nisu u toj meri zavisne od dinamike svojstvene sinapsama.<sup>88</sup> U prethodnim studijama je pokazan selektivni uticaj fluoksetina na energetski metabolizam somatskih i sinaptičkih mitohondrija u korteksu, kroz promene u aktivnosti uključenih enzima.<sup>334</sup> Iz tog razloga je proteomska analiza urađena u izolovanim i prečišćenim frakcijama citosola i NSM hipokampusa, čija relativna čistoća je dokazana Western blot metodom.

## **6.1. Molekulske promene u hipokampusu životinja izlaganih hroničnom stresu socijalne izolacije**

Rezultati testova ponašanja korišćeni su kao parametar za grupisanje životinja. Smanjenje preferencije ka saharozi, kao i povećanje imobilnosti pacova u testu prinudnog plivanja, ukazali su na uspešnost tri i šest nedelja socijalne izolacije u izazivanje anhedonije i stanja očaja kod pacova, što je iskorišćeno kao merilo ponašanja nalik depresivnom.<sup>335</sup> Takođe, anksiozni efekat socijalne izolacije pokazan je povećanjem broja zakopanih klikera. Vraćanje ponašanja kod

socijalno izolovanih životinja upotrebljeno je kao kriterijum antidepresivne uspešnosti tianeptina i fluoksetina nakon hronične primene.

Bioinformatička obrada rezultata proteomske analize pokazala je da je hronična socijalna izolacija uticala na deregulaciju nekoliko bitnih biohemijskih puteva.

### ***Citosol***

Stres hronične socijalne izolacije je u citosolu deregulisao organizaciju mikrotubula citoskeleta i proces sklapanja proteinskih kompleksa. U prilog narušene plastičnosti govori i dvostruko smanjena ekspresija ključnog proteina u ovom procesu i proteina neophodnog za međucelijsku komunikaciju i ćelijski rast: neuralni adhezioni molekul 1 (NCAM1). NCAM je jedan od najzastupljenijih adhezivnih molekula u ekscitatornim sinapsama hipokampusa. Studije su pokazale da deficijencija ovog proteina uzrokuje ponašanje nalik depresivnom, i narušava specijalno učenje i istraživačko ponašanje kod miševa.<sup>336,337</sup> Narušeno pamćenje kod depresivnog poremećaja vezuje se za ulogu NCAM1 proteina, za koji je pokazana evolutivna konzerviranost u pogledu značaja za proces pamćenja.<sup>338</sup> S obzirom da je citoskeletna organizacija proces usko vezan sa plastičnošću mozga, kao i da je ekspresija NCAM proteina pod kontrolom HPA osa, ovaj vid deregulacije ukazuje na poremećaj neuplastičnosti u hipokampusu, usled alosteričkog opterećenja zbog produžene izloženosti stresu.

Jedna od izoformi NCAM proteina usidrava se u membranu preko glikozil-fosfatidil inozitola, pri čemu je jedan od delova te kompleksne strukture i fosfoetanolamin.<sup>339–341</sup> Najizraženija proteinska promena je višestruko povećanje ekspresije proteina uključenog u metabolizam inozitola: inozitol 3,4-bifosfat 4-fosfataza. Ovaj enzim katalizuje reakciju nastajanja inositol-3-fosfata. Sa druge strane, metabolomska analiza je pokazala da nema promena u nivou *mio*-inozitola u hipokampusu socijalno izolovanih životinja. Proizvod delovanja ove fosfataze je stvaranje fosfatnih grupa, ali je u IS grupi uočeno dvostruko smanjenje fosforne kiseline u odnosu na kontrolu.

Monoaminska teorija je najduže istraživana patobiohemijska osnova depresije, a smanjena koncentracija monoamina njeno je obeležje. Sinteza monoamina zavisi ne samo od ekspresije ključnih enzima, nego i prisustva kofaktora koji regulišu njihovu aktivnost. Dihidrobioplerin reduktaza je enzim sa ključnom ulogom u procesu regeneracije tetrahidrobiopterina (THBP), kofaktora hidrosilaza aromatičnih aminokiselina, enzima važnih za sintezu tirozina, dopamina,

adrenalina, noradrenalina i serotonina, kao i za aktivnost azot(II)-oksid sintaze (NOS).<sup>342</sup> Činjenica da je socijalna izolacija gotovo dvostruko smanjila nivo ekspresije ovog enzima, govori o poremećajima puta u sintezi glavnih medijatora informacija u mozgu i ide u prilog monoaminskoj teoriji depresije. Postoje dokazi koji ukazuju na smanjen nivo THBP u cerebrospinalnoj tečnosti kod depresivnog pacijenta.<sup>343</sup> Suplementacija ovim kofaktorom, ili analognom supstancom (sapropterin), mogla bi doprineti olakšavanju simptoma depresije, što je u nekim slučajevima i potvrđeno.<sup>344</sup> Na nivo monoamina u mozgu utiče i monoaminooksidaza (MAO), čije povećanje od 30 % je pozitron emisionom tomografijom pokazano kod depresivnih pacijenata.<sup>345</sup> Saglasno ovim rezultatima, pokazali smo da socijalna izolacija skoro trostruko povećava ekspresiju MAO-A u NSM, čijom aktivnošću se predviđa pad u nivou monoamina, što je jedno od obeležja monoaminske teorije depresije.

Hronični psihosocijalni stres utiče na veze u mozgu i metabolomske promene koje su upoređljive sa onima kod ljudi,<sup>162</sup> a među njima i na veću potrebu za glukozom, ali manju iskoristivost iste.<sup>346</sup> Usled uzloženosti hroničnom stresu, citosolni glikolitički put je deregulisan. Drugi enzim glikolitičkog puta, ali i glukoneogeneze, glukozo-6-fosfat izomeraza je dvostruko više eksprimiran, dok je nivo enzima glukozo-1,6-bifosfat sintaze smanjen, čime se smanjuje potrošnja 1,3-difosfoglicerata, supstrata glavnog glikolitičkog puta, kao i piruvat kinaza, poslednji enzim glikolitičkog puta koji katalizuje ireverzibilnu reakciju stvaranja piruvata. U prilog tome govori i deregulacija insulin degradirajućeg enzima (IDE), što ukazuje na hiperinsulinemiju i povećanu potrošnju glukoze. Međutim, ceo proces pojačane signalizacije insulina praćen je smanjenjem ekspresije 3-fosfoinozimid-zavisne protein kinaze 1, enzima značajnog u nishodnoj signalizaciji insulina, puta kojim se stimuliše preuzimanje glukoze i aminokiselina, kao i preživljavanje ćelija. Na smanjenje ekspresije ovog enzima može uticati i povećano nastajanje, time i hipersignalizacija, inositol-3-fosfata, kao posledica višestrukog povećanja ekspresije fosfatidil-3,4-bisfosfat 4-fosfataze. Glikoliza je jedan od dva ključna metabolička procesa za proizvodnju energije u organizmu. Stimulisanjem ovog procesa troši se dostupna glukoza, ali i energetske rezerve poput masnih kiselina, ili proteina.

Rezultati metabolomske analize socijalno izolovanih životinja svedoče o povećanoj potrošnji, ili smanjenoj produkciji metabolita, s obzirom na njihovu deregulaciju. Pošto je proteomskom analizom uočeno da je uglavnom došlo do smanjenja ekspresije, ona je verovatno bila praćena i smanjenom aktivnošću proteina, čime je i deregulisan nivo određenog broja

metabolita. Samo 4 metabolita su bila statistički značajno povećana: stearinska kiselina, etil izoaloholat i dva izomera oktadecenske kiseline. Metabolomska analiza je posebno ukazala na deregulaciju metabolizma lipida. Smanjen nivo acetatoacetata, koji je proizvod 3-hidroksi-3-metilglutarne kiseline, uočen GC analizom,<sup>347</sup> ukazao je na deregulaciju nivoa ovog metabolita. Na njegovu povećanu potrošnju utiče povećana ekspresija HMG-CoA sintaze, enzima koji koristi acetoacetat kao supstrat. Ovaj metabolit ima značajnu ulogu u homeostazi i sintezi holesterola, kao i ubihinona neophodnog za transport i eliminaciju elektrona u lancu oksidativne fosforilacije.<sup>348</sup>

Za energetske metabolizam ćelije, fosfokreatin ima posebno mesto, s obzirom da, uz ATP, ima ulogu skladištenja, tj. čuvanja energetskih rezervi. Dvostruko smanjena ekspresija kreatinkinaze ukazuje na poremećaj u sintezi ovog metabolita, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima.<sup>262</sup> Metabolomska analiza je uočila trend pada kreatinina, ali bez značajnosti, a detektovana je i dvostruko manja koncentracija fosfata, supstrata u pomenutoj reakciji.

Aminokiseline imaju važnu ulogu u obavljanju kognitivnih procesa. Zato se za kognitivne poremećaje uočene u depresiji vezuje poremećaj i ovih metabolita.<sup>349</sup> Izolacija je smanjila nivo glicina, jednog od lokalnih inhibitornih neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu, i kofaktora NMDAR,<sup>63</sup> a takođe je pokazala trend dvostrukog smanjenja piroglutamata, bez značajnosti razlika. Piroglutamat predstavlja depo rezerve glutamata. Ova vrsta smanjenja može da ukaže na povećanu potrošnju glutamata u signalnoj transdukciji. U prilog tome ide i uočena dvostruko veća ekspresija vezikularnog transportera glutamata 1 (VGLUT1). Nivo ekspresije VGLUT1 određuje količinu glutamata koji se eksportuje vezikulama, kao i nivo neurotransmisije.<sup>350</sup> Glutamat je kao ekscitatorna aminokiselina, ključni igrač u procesu atrofije hipokampusa, usled ekscitotoksičnog efekta, posredovanog putem NMDAR.<sup>21</sup> Povećan nivo transportera za glutamat može ukazati na povećanu signalizaciju, koja rezultuje nakupljanjem glutamata u ekstraćelijskom prostoru hipokampusa, što je pokazano i na primeru drugih stresora.<sup>351</sup> Takođe, kliničke manifestacije smanjenog aminokiselinskog statusa i nivoa glicina su vezane za ovaj metabolit.<sup>348</sup> Takođe, glicin igra ulogu u potencijaciji ekscitatornog delovanja glutamata na nivou NMDAR. Njegov nedostatak bi mogao reflektovati promene u glutamatnoj neuralnoj transmisiji putem ovih receptora. Uzimajući u obzir da su i glicin i piroglutamat uključeni u sintezu glutationa, njihov nedostatak može da ukaže na kompromitovanu glutation-zavisnu antidoksidativnu zaštitu, nastalu uled hronične izloženosti stresu. Sveukupno, disfunkcija mitohondrija na nivou transporta, Krebsovog ciklusa, oksidativne fosforilacije, ali i šaperonske

kontrole, rezultuje povećanim i nekontrolisanim nastajanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta i, posledično, neuroinflamacijom, koja može biti uzrok nastanka ponašanja nalik depresivnom usled izloženosti hroničnoj socijalnoj izolaciji.<sup>82,171</sup>

Tradicionalno se osećaj zadovoljstva vezivao za nivoe dopamina i njegovu neurotransmisiju. Najnoviji podaci ukazuju da GABA, zajedno sa dopaminom, ima važnu ulogu u ovom procesu.<sup>352</sup> S obzirom da se anhedonija karakteriše kao nedostatak uživanja i osećaja nagrađivanja, poremećena GABA signalizacija, koja je metabolomskom studijom uočena kod socijalno izolovanih životinja, može biti molekularni mehanizam u osnovi ove patobiohemije. Ovaj rezultat potvrđuje ranije uočena neravnoteža između povećanog nivoa ekscitatornog neurotransmitera glutamata i smanjenog nivoa GABA-e u animalnim modelima depresije i kod ljudi sa dijagnostifikovanim bolešću.<sup>353</sup> Neravnoteža inhibitornih i ekscitatornih signala dovodi do disfunkcije u nervnom sistemu i uzrok je patobiohemijskih promena u mozgu, a smanjena ekspresija GABA-e ukazuje na kompromitovanost ravnoteže ovog sistema. Takođe, GABA ima važnu ulogu kao spoljašnji faktor koji doprinosi sazrevanju i diferencijaciji neuronskih stem ćelija.<sup>354</sup> Samim tim, narušena signalizacija posredovana GABA neurotransmiterom može biti jedan od uzroka narušavanja procesa neurogeneze, karakteristične za depresivni poremećaj. Ranije studije su postavile hipotezu smanjene GABA-e koje nije praćeno promenama u nivou glutamata, kao indirektni dokaz disfunkcije astrocita u metabolisanju glutamata u depresiji.<sup>355</sup> O značaju ove metabolitske promene govori i da je GABA, prema PLS-DA, najznačajnija promenljiva koja doprinosi diferencijaciji metaboloma IS i K grupe životinja. Pored GABA-e, sedam puta povećani anjon žučne kiseline, izo-aloholat, takođe doprinosi metabolomskom profilu IS, moduliše potencijal okidanja u neuronima, verovatno preko antagonizma NMDAR i GABA<sub>A</sub> receptora.<sup>356</sup>

Pored aminokiselina, deregulacija nivoa masnih kiselina i lipida jedna je od najizraženijih promena nastalih nakon izloženosti stresu hronične socijalne izolacije. Povećana incidenca za razvoj depresivnog poremećaja vezuje se za više nivoe nezasićenih masnih kiselina, a nedostatak holesterola se vezuje sa nastankom raznih neurodegenerativnih poremećaja i slabljenje kognitivnih osobina.<sup>357,358</sup> Povećan nivo mono-nezasićenih masnih kiselina ide u prilog smanjenoj energetske produkciji u ćelijama, što je i uočeno na proteinskom nivou i nivou ostalih metabolita. Višak akumuliranog, ili ćeliji u datom momentu nepotrebnog, acetyl-CoA prevodi se u lance masnih kiselina. Trend pada holesterola može se dovesti u vezu sa funkcionalnim poremećajima astrocita, glavnih proizvođača ovog metabolita u mozgu. Nivo holesterola regulisan je i preko nivoa



## NSM

Uticaoj socijalne izolacije ogleda se i na nivou somatskih, tj. NSM, gde se na osnovu smanjene ekspresije transportnih proteina, proteina uključenih u Krebsov ciklus i put oksidativne fosforilacije, dovodi u pitanje funkcionalnost ovog tipa mitohondrija. Veći broj transportnih proteina, među kojima VDAC1, VDAC2, ADP/ATP translokaze 1 i 2, protein nosač fosfata, dva proteina iz familije siderofleksina za transport jona, kao i petostruko smanjenje ekspresije alfa-ketoglutarat/malat nosača, ukazuju na poremećaj komunikacije između unutarćelijskih kompartmana, prvenstveno NSM i citosola. U prilog tome ide i činjenica da je enzim aspartat aminotransferaza, koji je ključni deo malat-aspartat petlje i te vrste transporta, pokazao smanjenu ekspresiju. Ranije studije su takođe ukazale na disfunkciju mitohondrija, usled deregulacije ADP/ATP translokaze 2 i VDAC3 proteina u stresnim uslovima.<sup>361</sup> S obzirom da se najveći broj dereguliranih proteina, sa izuzetkom COX2, sintetiše u jedru, odakle se transportuju do mitohondrija, na uočene promene, pored deregulacije ekspresije, utiče i disfunkcionalna mašinerija za unos proteina u mitohondrije. Značaj multiproteinskih kompleksa je i kao potencijalna meta za istraživanje mehanizma depresivnog poremećaja.<sup>362</sup> Jedini vid povećane komunikacije između citosola i mitohondrija je na nivou ulaska piruvata, s obzirom da su sve komponente kompleksa piruvat-dehidrogenaze (PDH) bile višestruko povećane kod socijalne izolacije. Ova promena može biti rezultat adaptivne prirode ćelija na povećane energetske zahteve, u cilju borbe protiv stresa.

Na narušen strukturni i funkcionalni integritet NSM kod socijalne izolacije, pored deregulacije transporta, ukazuje i smanjena ekspresija velikog broja proteina Krebsovog ciklusa i oksidativne fosforilacije. Četiri kompleksa lanca oksidativne fosforilacije (I-IV) pokazala su smanjenu ekspresiju na nivou bar jedne komponente, ukazujući na smanjenje produkcije ATP-a i neefikasno uklanjanje reaktivnih kiseoničnih vrsta. Deregulacija ovih proteina vezana je za oksidativni stres. Izuzetak su dve subjedinice ATP sintaze (kompleksa V), koje su skoro dvostruko povećale nivo ekspresije, što može biti adaptivna reakcija usled smanjene produkcije ATP-a i/ili njegovog transporta u citosol. Deregulacija COX2, subjedinice kompleksa III, proteina koji se kodira na osnovu mitohondrijalne DNK, ukazuje da se deregulacija ne odvija samo na nivou jedra i/ili transporta u metabolita u mitohondrije, nego i na nivou mitohondrijalne translacije.<sup>363</sup> Stabilnost ovih kompleksa je regulisana mitohondrijalnim šaperonima. Među njima, značajnu ulogu ima prohibin,<sup>364</sup> koji obezbeđuje integritet i funkcionalnost unutrašnje membrane mitohondrija,<sup>365</sup> a čija ekspresija je snižena kod socijalne izolacije. Ovaj rezultat je u saglasnosti

sa ranije objavljenim.<sup>366</sup> U prilog šaperonskoj deregulaciji mitohondrija ide i smanjena ekspresije HSP10 proteina. Sa druge strane, u citosolu povećana ekspresija HSP60 i HSP90 ukazuju na povećanu potrebu za regulacijom toka biosinteze proteina, koja uključuje i sklapanje proteinskih kompleksa, što je energetski zahtevan proces, uz utrošak ATP-a.

Uočeno je da akutni stres povećava aktivnost enzima važnih za energetske procese, u pokušaju povećanja sinteze ATP-a, za odbranu ćelija od stresa.<sup>82</sup> U ovoj studiji je, kao posledica hronične izloženosti stresu, deregulisana sinteza proteina energetskih procesa u mitohondrijama, što je razlog, ili posledica utroška ATP molekula, ili poremećaja sintetske mašinerije.

Smanjena efikasnost Krebsovog ciklusa se oslikava kroz smanjenu ekspresiju citrat sintaze, sukcinat i malat dehidrogenaze. Iako je PDH kompleks povećane ekspresije i, verovatno, podstiče ulazak piruvata i nastajanje acetil-koenzima A, smanjena ekspresija proteina Krebsovog ciklusa, već na samom početku, sugeriše na nefunkcionalnost i ograničavanje dinamike ciklusa. Jedini proteini Krebsovog ciklusa povećane ekspresije su subjedinice alfa-ketoglutarat dehidrogenaze, proteina koji, prema novim podacima, predstavlja i mesto modulacije fluksa alfa-ketoglutarata u metabolizam aminokiselina.<sup>367</sup>

Uopšteno govoreći, kod socijalno izolovanih životinja uočavaju se promene na nivou citoskeletne organizacije, na strukturnom i funkcionalnom nivou NSM. Dok podaci ukazuju da je proces glikolize stimulisan, kao i usmeravanje piruvata u Krebsov ciklus, komponente ovog ciklusa i, posebno, lanca oksidativne fosforilacije su smanjene ekspresije, što ukazuje na narušene energetske procese i ukupno funkcionisanje NSM u hipokampusu, usled izloženosti stresu socijalne izolacije. Ovi rezultati potvrđuju rezultate post mortem studija,<sup>368</sup> kao i studija na drugim životinjskim modelima depresije.<sup>260,366</sup>

Ako bismo rezultate ovih analiza analizirali u svetlu različitih teorija depresije, videli bismo da su biohemijski procesi, ili delovi istih, karakteristični za većinu ovih hipoteza deregulisani u uslovima izloženosti socijalnoj izolaciji. Međutim, ako bismo težinu deregulacije procesa korelirali sa brojem dereguliranih proteina, mitohondrijalna hipoteza depresije bi bila najzapaženija. Podaci pokazuju na istovetnost ćelijskih promena, po pitanju citoskeletne dinamike i energetskih promena, sa najizraženijim promenama uzrokovanim kod glodara usled izloženosti prenatalnom stresu.<sup>366</sup> Ostaje pitanje da li su promene mitohondrijalne disfunkcije posledica drugih poremećaja ili energetski zahtevnih procesa, kao i da li narušena translokacija, tj. mitohondrijalni transport, posledica mitohondrijalne energetske disfunkcije ili obrnuto.



## 6.2. Molekulske promene u hipokampusu životinja nakon tretmana fluoksetinom

Tretman fluoksetinom uspešno je normalizovao ponašanje kod životinja izloženih hroničnom stresu socijalne izolacije. U testovima ponašanja fluoksetin je povećao preferenciju ka saharozi, smanjio broj zakopanih klikera i vreme imobilnosti u testu prinudnog plivanja. Time je pokazana uspešnost antidepresivnog i anksiolitičkog dejstva fluoksetina.

### *Citosol*

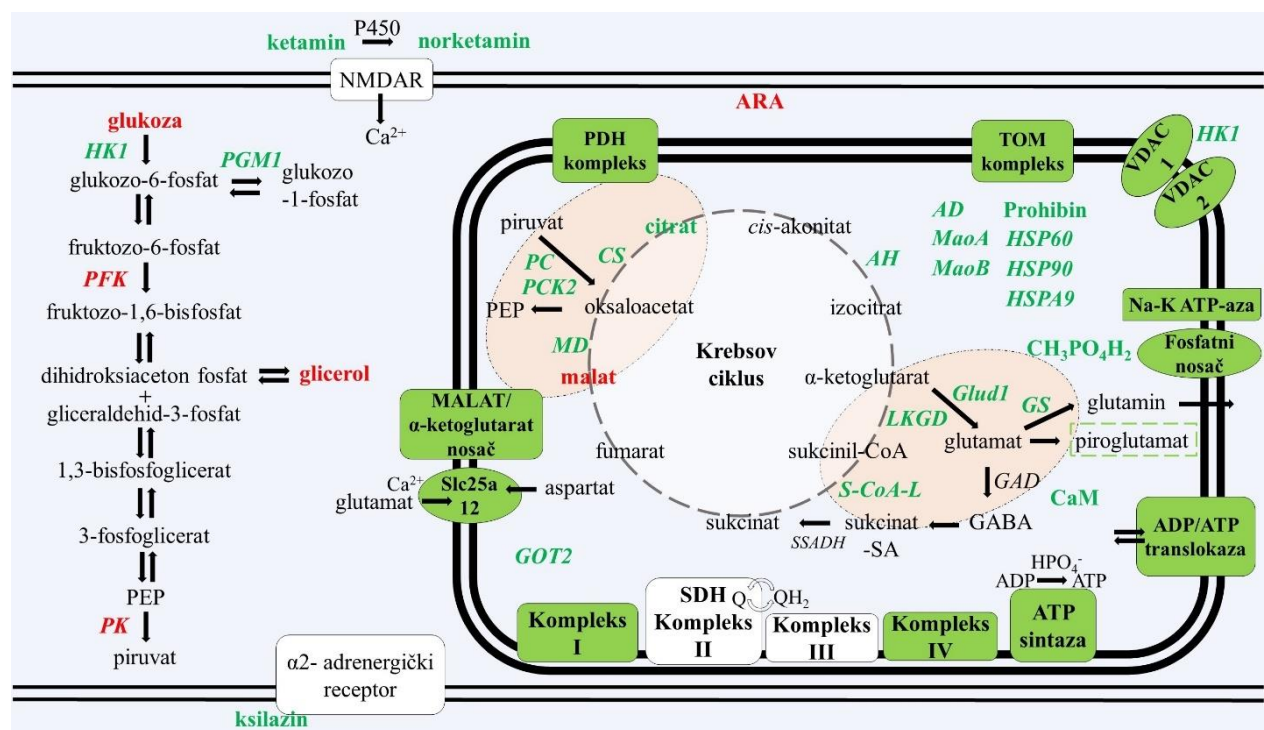
Fluoksetin je deregulisao nivo citosolnih proteina, uglavnom smanjujući njihovu ekspresiju. Analiza interakcija je pokazala značaj kataboličkih procesa organonitritnih jedinjenja, dok se kao glavni deregulisan put prema KEGG-u izdvaja proteazom, pri čemu su i neke od najizraženijih promena u ekspresiji uočene za komponente proteazomalnog sistema i procesa ubikvitinacije.

Promene u ekspresiji neurofilamenata vezuju se za proces sinaptičkog remodelovanja u mozgu,<sup>369</sup> a proces povećanja sinaptičke plastičnosti za mehanizam delovanja antidepresiva.<sup>370</sup> Hronični tretman fluoksetinom uticao je na dinamiku citoskeleta, menjajući ekspresiju nekoliko lanaca tubulina, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenom studijom.<sup>371</sup> U degradaciji komponenata citoskeleta, u prvom redu beta-tubulina, ulogu ima inicijator procesa polimerizacije tubulina, tubulin-specifični šaperon d, a čije dvostruko povećanje je uočeno nakon hroničnog tretmana fluoksetinom. Plastičnost počiva i na remodelovanju ćelijskih sinapsi i komunikacije, a fluoksetin je, pored izmenjene dinamike proteina citoskeleta, izazvao višestruko povećanje Neurocan core proteina kod stresiranih životinja, koji vezivanjem za adhezione molekule, među kojima i u stresu izrazito smanjen NCAM, moduliše proces neuralne adhezije i neuralnog rasta.

Promenom u nivou ekspresije nekoliko regulatornih proteina, fluoksetin je pokazao uticaj na modulaciju signalnih puteva ćelije. Povećanjem ekspresije Ras-related protein Rab-18, Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Rho GDI1) i ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) proteina, stimulisao je proces neuralnog razvoja. Rho GDI1 sprečava GDP/GTP izmenu kod Rho familije GTP-aza, održavajući tako protein u njegovoj inaktivnoj formi. Rho GDI1 direktno prenose signal od T1 izoforme TrkB, a BDNF-TrkB signalizacijom indukovana disocijacija Rho GDI1 od TrkB je odgovorna za regulaciju morfologije glija ćelija i influks kalcijuma.<sup>372</sup> Postoje dokazi koji ukazuju da im upravo ovaj protein, iako reguliše nivo njihove aktivnosti, omogućava da dostignu potpuni kapacitet delovanja u pravo vreme i na pravom mestu u ćeliji. GDI izvlače GTP-aze iz membrane

i solubilizuju ih u citosolu.<sup>373</sup> Smanjenjem nivoa arahidonske kiseline, koja ima kapacitet da se veže za GDI1, fluoksetin verovatno smanjuje inhibicioni uticaj na Rho proteine. TrkB posreduje i u signalizaciji Ras proteina. Kroz stimulisanu ekspresiju Rab-18 i ARF1, fluoksetin povećava kontrolu vezikularnog transporta u ćelijama.<sup>374</sup> ARF1 je takođe vezan za kretanje AMPAR i regulaciju sinaptičke plastičnosti.<sup>375</sup>

Glikoliza je manje energetski produktivan put u ćeliji. Kao i kod stresiranih životinja, fluoksetin je pokazao umeren uticaj na ekspresiju proteina glikolitičkog puta. Poseban značaj ima to što sva tri deregulisana proteina katalizuju ireverzibilne reakcije, tj. predstavljaju kontrolne tačke glikolitičkog puta. Obe grupe tretirane fluoksetinom su pokazale povećanu ekspresiju heksokinaze 1 (HK1) (Slika 58). S obzirom da je ova forma vezana za mitohondrije, njena deregulacija je uočena u frakciji NSM. Povećanjem ekspresije ove forme enzima, fluoksetin usmerava enzimsko delovanje ka glikolizi, s ciljem produkcije energije, i omogućava adaptaciju ćelije na novo metaboličko stanje, u cilju održanja energetskog balansa i izbegavanja oštećenja.<sup>376</sup> Kliničke studije su pokazale smanjen nivo HK u mitohondrijalnoj frakciji kod pacijenata obolelih od različitih psihijatrijskih i poremećaja ponašanja, kao i unipolarnu depresiju.<sup>377</sup>



**Slika 58.** Slikovni prikaz molekularnih promena nakon tretmana fluoksetinom u hipokampusu pacova izloženih hroničnom stresu socijalne izolacije. Proteini i metaboliti povećane odnosno snižene ekspresije istaknuti su zelenom odnosno crvenom bojom.

Smanjena ekspresija proteina druga dva ključna enzima, piruvat kinaze i 6-fosfofrukto kinaze, ograničava brzinu glikolitičkog puta. Dodatno, aktivnost enzima utiče na kinetiku reakcija. Metabolomskom analizom, u okviru ove disertacije, pokazano je značajno smanjenje u nivou glukoze, što ukazuje na povećanu potrošnju ovog metabolita, što zavisi od nivoa aktivnosti pomenutih enzima. Na osnovu svega, može se zaključiti da su ekspresione promene verovatno posledica regulatornih adaptivnih promena ćelija, kojim bi se regulisala dinamika glikolitičkog puta nakon tretmana fluoksetinom.

### ***NSM***

Fluoksetin i njegov glavni metabolit norfluoksetin imaju sposobnost da se vežu za mitohondrije i izmene funkciju i ekspresiju energetski važnih proteina.<sup>378</sup> Zato je postavljena hipoteza da je sposobnost fluoksetina da veže i moduliše funkciju i dinamiku mitohondrija vezana za njegov uticaj na bioenergetske procese i redoks stanje ćelija.<sup>379</sup> Ranije studije su ukazale na uticaj antidepresiva u modulaciji energetskog metabolizma, na osnovu promene u aktivnosti relevantnih proteina u hipokampusu, s ciljem normalizacije narušene metaboličke aktivnosti.<sup>380,381</sup> Modulacija aktivnosti se odnosi na proteine glikolitičkog puta, TCA ciklusa i puta oksidativne fosforilacije.

Fluoksetin je u NSM kontrolnih i stresiranih životinja delovao stimulatивно u pogledu povećanja ekspresije proteina, tj. njihovih subjedinića (**Slika 58**). Delujući suprotno u odnosu na stres socijalne izolacije, fluoksetin je normalizovao ekspresiju transmembranskih mitohondrijalnih transportera, ukazujući na promenu same dinamike, odnosno funkcionalnosti mitohondrija. Interakcijom koju uspostavlja sa VDAC proteinima, fluoksetin povećava njihovu naponsku osetljivost i štiti ćeliju od apoptoze.<sup>382</sup> Suprotno stresu socijalne izolacije, fluoksetin je vratio i povećao nivo VDAC1 i VDAC2 proteina iznad kontrolnog, sudeći po rezultatima western blot analize. Na osnovu kontrolnih mehanizama VDAC proteina, pretpostavka je da fluoksetin stimuliše razmenu, ali i kontrolu transporta, tj. ulaza i izlaza metabolita u mitohondrije, kao i niz bitnih funkcija za opstanak ćelija, koje se vezuju za VDAC proteine, kao što su antioksidativna zaštita, homeostaza  $Ca^{2+}$  jona i kontrola nivoa ATP-a.<sup>383</sup> Dodatni dokaz povećanja dinamike NSM je i vraćanje ekspresije membranskih transportnih proteina, kao što su ADP/ATP translokaza 2, transporter fosfata i  $\alpha$ -ketoglutarat/malat transporter.

Povećana konzumacija glukoze kroz glikolitički put je zanemarljiv izvor energije u poređenju sa promenama u ekspresiji proteina Krebsovog ciklusa i puta oksidativne fosforilacije

kao puta za sintezu ATP-a. Piruvat se, kao proizvod glikolitičkog puta, uvodi u mitohondrije prolazeći kroz piruvat-dehidrogenazni (PDH) kompleks, čije su subjedinice fluoksetinom povećano eksprimirane. Drugi način je direktna konverzija u oksaloacetat, delovanjem piruvat-karboksilaze, koja je takođe pokazala povećanu ekspresiju nakon tretmana fluoksetinom. Posebno osetljiva zona je dCA3 subregion, koji je pokazao najveće ekspresione promene prema imunohistohemijskoj validaciji promene za PDH E1 $\alpha$  subjedinicu kompleksa. Kroz povećanje ekspresije pet od devet enzima Krebsovog ciklusa: citrat-sintaze, akonitat-hidrataze, subjedinice  $\alpha$ -ketoglutaratnog kompleksa, sukcinil-CoA ligaze i malat-dehidrogenaze, fluoksetin je stimulisao tok energetskih procesa ka produkciji metabolita, odnosno supstrata energetski zahtevnih reakcija. Metabolomskom analizom uočeno smanjenje nivoa malata nije nužno rezultat smanjene produkcije metabolita, već zavisi i od brzine njegovog metabolizma. Uočeno smanjenje verovatno je posledica povećane ekspresije malat-dehidrogenaze, enzima koji katalizuje reakciju u kojoj je malat supstrat, a koja nije praćena povećanjem ekspresije fumaraze, enzima čijim katalitičkim delovanjem nastaje malat. Takođe, ranije studije su pokazale da akutna primena fluoksetina povećava aktivnost citrat sintaze.<sup>384</sup>

Povećanje ekspresije glutamat-dehidrogenaze 1 (Glud1), koje je, verovatno, praćeno i povećanjem aktivnosti ovog enzima,<sup>381</sup> dovodi do izvlačenja  $\alpha$ -ketoglutarata iz Krebsovog ciklusa i sinteze glutamata. Promene u nivou ekspresije Ca<sup>2+</sup>-zavisne kalmodulin kinaze, bi ovu reakciju mogle pomeriti u stranu formiranja GABA-e. Metabolomska analiza je pokazala trend rasta GABA-e kod socijalno izolovanih životinja nakon tretmana fluoksetinom, ali bez statističke značajnosti. S obzirom da normalno funkcionisanje mozga počiva na finoj usklađenosti inhibitornih i ekscitatornih signala, uz GABA-ergičku signalizaciju se često podrazumeva karakterisanje glutamatergičke. Implikacija NMDAR u antidepresivnom delovanju ketamina je bila prekretnica za istraživanje glutamatne signalizacije u depresiji, nakon čega je niz kliničkih studija ukazao na patofiziološku osnovu depresije na nivou nefunkcionalnosti glutamatnog sistema, ili klirensa i metabolizma ovog neurotransmitera.<sup>64</sup> Ovaj put je smatran kao zajednički za mehanizam delovanja antidepresiva različitih klasa. Pored rasta Glud1, rast nivoa glutaminsintetaze (GS) ukazuje na povećan klirens glutamata u ćelijama zasnovanog na aktivnosti astrocita. Prethodne studije su ukazale na pad oba pomenuta enzima kod depresije,<sup>385,386</sup> dok je proteomska analiza, u okviru ove disertacije, potvrdila smanjenje ekspresije GS proteina. Dodatno, kod kontrolne grupe životinja, povećan nivo sukcinat semialdehid-dehidrogenaze (SSADH) preko

GABA-e sintetisan sukcinat semialdehid prevodi u sukcinat, što može biti razlog blagog trenda pada GABA-e u kontrolnim životinjama. Druge metabolomske studije su dale podatke vezane za normalizaciju nivoa glutamata na životinjskom modelu depresije od strane fluoksetina,<sup>387</sup> što nije uočeno u stresu socijalne izolacije i/ili tretmanu fluoksetinom.

Monoaminska teorija depresije, na kojoj je baziran mehanizam delovanja SSRI, je najčešće istraživana teorija depresije. Iako se ekspresija MAO-A kod socijalno izolovanih životinja vezala za smanjenje nivoa monoamina, u prvom redu serotonina, dodatni uticaj fluoksetina na povećanje nivoa MAO-A i MAO-B enzima kod tretiranih grupa životinja nije u skladu sa monoaminskom teorijom depresije. Imonihistohemijska analiza je kvalitativno pokazala subregion specifične promene, sa najvećom ekspresijom u CA2 i dCA3 subregionima hipokampusu. U prilog ravnoteže reakcije, ka degradaciji monoamina, ide i povećana ekspresija aldehid-dehidrogenaze (AD). S obzirom da fluoksetin pokazuje inhibitorski efekat na MAO-A, to bi najpre ukazivalo na povećanje nivoa serotonina. Međutim, neke studije ukazuju na normalizaciju nivoa serotonina do kontrolnog nivoa nakon hronične primene leka,<sup>388</sup> što bi se moglo objasniti povećanjem ekspresije MAO-A i MAO-B proteina. Takođe, inicijalno povećanje nivoa serotonina ne odražava mehanizam antidepressivnog delovanja fluoksetina, s obzirom da je za ispoljavanje antidepressivnog efekta leka na ponašanje potrebno da prođe bar tri nedelje, što ukazuje na ne-monoaminske procese u biohemijskoj osnovi terapijskog delovanja leka. Ostaje nejasno koji signali, osim inicijalnog rasta nivoa serotonina, usled inhibicije i posledično disfunkcije enzima posredovane fluoksetinom, signaliziraju na povećanje nivoa pomenutih monoamin-oksidaza.

Povećanjem proteina iz porodice šaperona, HSP60 i HSP90, kao i HSPA9 kod kontrola, reguliše se proces pravilnog uvijanja proteina, transporta i sklapanja proteinskih kompleksa. Povećanje ekspresije šaperona se ogleda kroz popravljavanje štete na proteinima u uslovima oksidativnog stresa, u smislu razvijanja i ponovnog uvijanja proteina, što je verovatno slučaj u uslovima izloženosti stresu socijalne izolacije i štiti NSM od oštećenja. Ovim povećanjem nakon tretmana fluoksetinom, može se opisati stanje povećane dinamike i ekspresije proteina u NSM. Imunohistohemijskim analizama potvrđena je razlika u ekspresiji HSP 90 (kvantitativno) (**Slika 41**) i HSP 60 (kvalitativno) (**Slika 42**) u dorzalnom hipokampusu, pri čemu je najveće povećanje u ekspresiji uočeno u dCA3 subregionu. Kao region koji u najvećoj meri u uslovima stresa trpi promene na nivou morfologije dendrita neurona, koje mogu biti neutralisane delovanjem antidepressiva, povećana ekspresija HSP ukazuje na prateću metaboličku de/regulaciju.

Subregion dDG je, uz dCA3, pokazao osetljivost na stres, kroz promene nivoa HSP 90, kao i na delovanje fluoksetina u smislu HSP 60 ekspresije. Dodatnu osetljivost na delovanje fluoksetina pokazao je i CA2 subregion, dok je dCA1 bez uočenih promena u nivou šaperona pokazao najveću otpornost na uslove stresa i tretmana. Ovi rezultati ukazuju na subregion-specifično delovanje stresa socijalne izolacije i fluoksetina. Denzitometrijom je samo u CA2 subregionu pokazan trend rasta HSP 90 nakon tretmana fluoksetinom, bez statističke značajnosti. Uočeno neslaganje imunohistohemijske analize sa proteomskom može biti rezultat toga što proteomiksom nisu obuhvaćane samo ekspresione promene na nivou pojedinačnih ćelija, nego i promene nastale kao rezultat povećanja broja ćelija nakon tretmana antidepresivom, kao što je slučaj kod fluoksetinom izazvane neurogeneze u DG subregionu.<sup>122</sup>

### **6.3. Molekulske promene u hipokampusu životinja nakon tretmana tianeptinom**

Hronična primena tianeptina, na životinjskom modelu depresije, pokazala je antidepresivno i anksiolitičko dejstvo, povećavajući preferenciju ka saharozi, i smanjujući vreme imobilnosti i broj zakopanih klikera u testovima ponašanja.

#### ***Citosol***

U citosolu tianeptinom tretiranih životinja, uočeno je nekoliko izraženijih promena u nivou ekspresije proteina, dok je većina proteina bila blago izmenjene ekspresije. Uočene deregulacije kod IS životinja bile su osnov za interpretaciju molekulskih promena uočenih nakon primene leka. Za razliku od socijalne izolacije, tianeptin je delovao uglavnom smanjujući ekspresiju proteina, utičući tako na citoarhitekturu, vezikularni transport, proteazomalne i oksidoredukционе procese.

Deregulacija mitohondrija je proces koji rezultuje povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta. Tianeptin je značajno povećao ekspresiju Cu Zn - superoksid dizmutaze (SOD), signalizirajući tako pojačanje antioksidativne zaštite. Ova promena je validirana i Western blot analizom, pri čemu je kod IS životinja uočen blagi pad u odnosu na kontrolne životinje. SOD je prva linija odbrane u neutralisanju nivoa superoksidnih radikala. Poremećaj u funkciji mitohondrija, uočen kod socijalno izolovanih životinja, može biti uzrok pojačane produkcije slobodnih radikala, i prouzrokovati štetan efekat na funkcionisanje ćelija, čija se produkcija efikasno neutrališe povećanjem ekspresije SOD-a. Sa druge strane, drugi antioksidativni enzimi:

peroksiredoksin 6, različite klase glutation-S-transferaze (alpha, theta, mu, pi i omega) i glutaredoksin 1 pokazali su blagi pad u ekspresiji nakon tretmana tianeptinom. Depresiju karakteriše povećano nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, ali i poremećaj funkcionisanja glutacion-zavisne antioksidativne zaštite, na osnovu promene aktivnosti uključenih enzima.<sup>171</sup> Na osnovu rezultata, pretpostavlja se da dvostruko povećanje SOD-a u najvećoj meri doprinosi borbi protiv slobodnih radikala, tj. tianeptin antioksidativno deluje na enzim odgovoran za prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa. Da li su promene u ekspresiji antioksidativnih enzima praćene i promenama u aktivnosti istih, kao što je to slučaj kod fluoksetina, ostaje da se dodatno ispita.<sup>171</sup>

Rezultati proteomske i metabolomske analize ukazuju na promene u inozitol-zavisnoj signalnoj transdukciji posle hroničnog tretmana tianeptinom (**Slika 59**). Dok je proteomska analiza pokazala da je među izraženijim deregulacijama smanjenje ekspresije inozitol-monofosfataze, metabolomska analiza je pokazala značajno smanjen nivo mio-inozitola, supstrata reakcije koju deregulisani enzim katalizuje. Pored toga, i drugi deregulisani enzimi inozitol-signalnog puta, inozin trifosfat-pirofosfataza i 1-fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat fosfodiesteraza beta-1, ukazuju na promene u ovom signalnom putu. Sa druge strane, pokazano je da kod životinja rezistentnih na delovanje tianeptina, značajno raste mio-inozitol.<sup>389</sup> Ova otkrića ukazuju na uključenost inozitolom-posredovanog signalnog puta u antidepresivnom efektu tianeptina. U prilog pomenutoj pretpostavci ide i činjenica da nivo mio-inozitola negativno korelira sa imobilnim ponašanjem u testu prinudnog plivanja, što implicira značaj ovog signalnog puta u ovom tipu ponašanja. Takođe PI3K je jedan od signalnih puteva BDNF-TrkB interakcije, što je u skladu sa studijama koje su pokazale uticaj tianeptina na rast BDNF u hipokampusu pacova.<sup>390</sup> U prilog signalizaciji preko TrkB ide i povećanje regulatornog proteina Rho GDI 1, što je viđeno i kod tretmana fluoksetinom. Rezultati ukazuju na aktivaciju TrkB signalizacije, kojom se aktiviraju mnogi sekundarni signalni putevi, ali i utiče na aktivnost i morfologiju glija ćelija. Takođe, inozitol-3-fosfat je jedan od ključnih molekula signalizacije između glija ćelija, te antidepresivni efekat i aktivirana inozitolom-posredovana signalizacija ukazuje na moguću aktivaciju astrocita.

Kroz deregulaciju enzima glikolitičkog puta, fruktozo-bifosfat aldolaze C i glukozo-6-fosfat izomeraze, kao i metabolizma glikogena, glikogen-fosforilaze i amilo-1,6-glukozidaza-4-alfa-glukanotransferaze, svojstvenog astrocitima, tianeptin dovodi do promena u energetske metabolizmu. Deregulacijom pomenutih enzima tianeptin bi ukazivao na smanjenu mobilizaciju energetske rezervi, ali i normalizaciju glikolitičkog puta, koja je verovatno stimulirana u uslovima

izloženosti stresu. Jedna od osobina glukokortikoida, po kojoj su i dobili naziv, je mobilizacija rezervi ugljenih hidrata sa ciljem produkcije energetski relevantnih molekula neophodnih za brzu reakciju organizma. Pod uticajem tianeptina, dolazi do normalizacije glikolitičkog puta, a povećana aktivnost laktat-dehidrogenaze verovatno predstavlja vid dodatne energetske opskrbljenosti neurona pomoću laktata, što može biti znak aktivacije astrocita. Povećanje koncentracije metabolita sorbitola, d-arabitola i d-glukouronske kiseline su pokazatelji aktivacije alternativnih puteva metabolizma glukoze. Takođe, značajno povećanje nivoa kreatinina ukazuje na uticaj tianeptina u pogledu stimulacije energetskih procesa u ćelijama. Ovaj rezultata je u saglasnosti sa ranije objavljenim literaturnim podacima.<sup>391</sup>

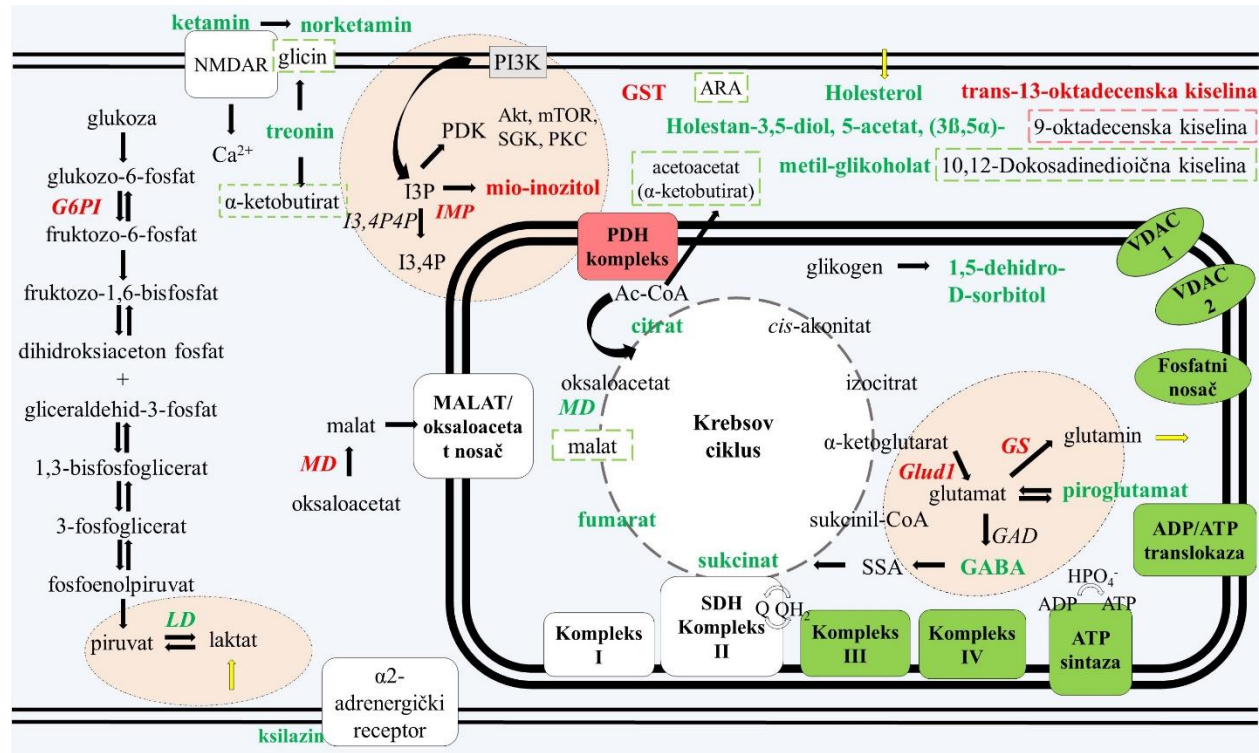
Smanjena ekspresija proteina, na koju je ukazala proteomska analiza, uglavnom je praćena povećanjem nivoa metabolita. Međutim, od svega nekoliko metabolita čiji nivo je smanjen tretmanom tianeptina, pored *mio*-inozitola, uočavaju se masne kiseline, trans-13-oktadecenska kiselina, metabolit značajno povećan kod stresiranih životinja, dok je uočen i trend porasta polinezasićene masne kiseline, 9,12,15-oktadekatrienske kiseline i 10,12-dokozadinedioične kiseline. Sa druge strane, deregulacija metabolizma lipida je praćena značajnim povećanjem holesterola i njegovih derivata. Holesterol igra važnu ulogu u razvoju i funkcionisanju mozga, preko regulacije sinaptičke transmisije, transkripcije gena i sinteze bioaktivnih sterola,<sup>392,393</sup> a njegov nedostatak se vezuje za neurodegenerativne promene i slabljenje kognitivnih funkcija tokom starenja.<sup>358</sup> Povećan nivo holesterola, njegovih metabolita i žučnih kiselina, koji su označeni i kao metaboliti koji najviše doprinose razlikovanju tianeptinom tretirane grupe pacova u stresu, ukazuje na zaštitnu ulogu tianeptina koja može biti ostvarena i anti-inflamatornim dejstvom pomenutih sterola, kao i pojačanu aktivnost astrocita, glavnih producenata holesterola. Sa druge strane, pokazali smo da kod životinja rezistentnih na tretman tianeptinom ne dolazi do povećanja nivoa holesterola, štaviše, uočava se pad kod životinja rezistentnih na tretman lekom u uslovima stresa.<sup>389</sup> Ovi podaci ukazuju na značaj holesterola u posredovanju antidepresivne aktivnosti tianeptina. Takođe, poznato je da se 90 % holesterola u ćelijama nalazi u ćelijskim membranama, između kojih se lako distribuira.<sup>394</sup> Uočene promene u nivou holesterola mogu biti pokazatelj povećanog otpuštanja holesterola nakon tretmana tianeptinom. Metabolizam holesterola, u ovom slučaju, može biti vezan i sa specifičnim promenama nivoa *mio*-inozitola, s obzirom da je uočena obrnuto proporcionalna zavisnost ova dva metabolita.<sup>395</sup> Pokazano je i da metabolit holesterola, *holestan-3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol*, ispoljava neuroprotektivna svojstva, putem inhibicije NMDAR, čime se



suzbija ekscitotoksičnost prekomerne glutamatne signalizacije.<sup>396</sup> S obzirom da su promene u nivou holesterola i njegovih metabolita uočene i kod kontrolne i kod stresirane grupe životinja, ovo ukazuje na značaj holesterola u posredovanju nootropne efikasnosti tianeptina. I drugi glutamatni receptor, kao što je metabotropni receptor, nalazi se pod kontrolom holesterola.<sup>397</sup> Nivo holesterola u mozgu zavisi od njegove proizvodnje u astrocitima.<sup>358</sup> Jedna od najizraženijih ekspresionih promena nakon tretmana tianeptinom je povećana ekspresija laktat-dehidrogenaze, markera aktivnosti astrocita. Proizvedeni laktat služi kao izvor energije za neurone.<sup>398</sup> Navedene proteomske i metabolomske promene svedoče o povećanoj metabolomskoj aktivnosti ovog tipa ćelija. Prethodna istraživanja su pokazala da poremećaj funkcionalnosti glija ćelija doprinosi patobiohemiji depresije.<sup>399</sup> Astroцити su ćelije koje u većoj meri eksprimiraju glutamatne transportere i značajno posreduju u glutamatoj neurotransmisiji, tako da njihova aktivnost može biti vođena potencijalno višim nivoima ovog neurotransmitera u vanćelijskom prostoru tokom izloženosti stresu.

Kao što je rečeno, poremećaj inhibitorne signalizacije jedna je od mogućih hipoteza depresije. Metabolomiks (GC-MS) antidepresiva paroksetina u hipokampusu i plazmi miševa ukazao je na mehanizme delovanja izvan monoaminske teorije depresije i, između ostalog, označio GABA-u kao jedan od biomarkera antidepresivnog delovanja leka.<sup>400</sup> Metabolomska studija u okviru ove disertacije je takođe naglasila značaj GABA-e kao biomarkera depresivnog ponašanja uzrokovanog hroničnim stresom socijalne izolacije. Mehanizam suprostavljenog delovanja tianeptina na nivo GABA-e u stresiranim životinjama, slično delovanju fluoksetina, stavlja akcenat na normalizaciju inhibitorne signalizacije. Dodatni značaj vraćanja GABA-e u posredovanju antidepresivnog delovanja tianeptina se pokazao kroz statistički značajno smanjenje koncentracije ovog metabolita kod životinja koje su pokazale rezistenciju na delovanje leka.<sup>389</sup> Propratno, nivelisanje glutamata tianeptin verovatno obavlja kroz značajno povećanje rezervi u vidu piroglutamata. Pored rasta dve pomenute aminokiseline, tianeptin je uticao i na nivo treonina. S obzirom da je treonin supstrat za sintezu glicina i  $\alpha$ -ketobutirata, koje usmerava u Krebsov ciklus, ovo opravdava trend rasta i ova dva metabolita.

Pantotenska kiselina, označena kao jedan od ključnih molekula divergencije između stresiranih i tianeptinom lečenih životinja, sastavni je deo strukture i polazni supstrat za sintezu koenzima A (engl. *Coenzyme A*, CoA). Povećana koncentracija ovog metabolita, kao i fosfata, verovatno potiče od povećanih koncentracija CoA, ulaznog metabolita Krebsovog ciklusa.



**Slika 59.** Slikovni prikaz molekulskih promena nakon tretmana tianeptinom u hipokampusu pacova izloženih hroničnom stresu socijalne izolacije. Proteini i metaboliti povećane, odnosno snižene ekspresije istaknuti su, redom, zelenom, odnosno crvenom bojom.

Posebno značajno bi bilo delovanje tianeptina putem signalne transdukcije preko NMDAR i  $\alpha 2$ -adrenergičkog receptora. Kao kod fluoksetina, statistički značajno veće koncentracije ketamina, ali i ksilazina, indirektno upućuje na povećan broj vezivnih mesta. Značajan nivo i norketamina, glavnog metabolita ketamina, prati trend povećanog vezivanja i ukazuje na metabolizam ketamina u većim količinama u odnosu na kontrolne, ali i stresirane životinje. Međutim, dodatni razlog ovog povećanja mogu biti i promene na nivou selektivne propustljivosti krvno moždane barijere, što je potrebno dodatno istražiti.

Uopšteno govoreći, nekoliko ključnih promena u nivou metabolita je suprotno regulisano kod životinja rezistentnih na tretman tianeptinom.<sup>389</sup> Neke od njih su i promene u koncentracijama GABA-e, *mio*-inozitola, holesterol, arahidonske kiseline, pantotenske kiseline, N-acetil glukozaamina,  $\alpha$ -d-glukopiranozida i d-arabitol. Takođe, uočavaju se niži nivoi ketamina i norketamina, kao i smanjenje nivoa određenog broja metabolita, čija deregulacija nije uočena u uslovima stresa ili efikasnog tretmana tianeptinom.

## **NSM**

Za razliku od nedefinisanih promena u citosolu, u NSM je uticaj tianeptina ispoljen kroz izraženije povećanje ekspresije proteina NSM, čime se ukazuje na obrnut tok energetskih procesa u odnosu na životinje koje pokazuju ponašanje nalik depresivnom. Metabolomska analiza svedoči o značajnom povećanju nekoliko supstrata Krebsovog ciklusa: citrat, sukcinat i fumarat, što je praćeno i povećanom ekspresijom proteina (**Slika 59**).

Smanjena ekspresija Glud1 i GS svedoči o promenama na nivou ekscitatorne signalizacije posredovane glutatomom. Smanjenje Glud1 uočeno je u ventralnom hipokampusu nakon tretmana stresiranih pacova escitalopramom.<sup>261</sup>

S obzirom da je najveći broj proteina uključen u oksidativnu fosforilaciju, tj. subjedinice kompleksa III, IV i V, može se diskutovati o stimulaciji energetskih procesa u ćelijama i sintezi ATP-a posle hroničnog tretmana tianeptinom. Povećanje toka elektrona u putu oksidativne fosforilacije može biti uzrok stvaranja slobodnih radikala, neželjenih proizvoda elektronske kaskade. Među prvima nastaje superoksidni anjon radikal, tako da je uočena povećana ekspresija CuZn SOD, kao vid zaštite ćelija od prekomerne produkcije ove reaktivne vrste.

Normalizacija funkcionalnosti mitohondrija se ne ogleda samo kroz kontrolu energetskih puteva, već i razmenu metabolita sa citosolom i drugim ćelijskim kompartmanima, posredovanu specifičnim transporterima. Povećanjem nivoa transportera VDAC1 i VDAC2 i ADP/ATP translokaze 2, tianeptin obrće uticaj stresa socijalne izolacije. Jedan od vezivnih supstrata za VDAC1 protein je i holesterol, čiji nivo je takođe povišen tretmanom tianeptinom. Sa ovog stanovišta, antidepresivni efekat tianeptina je popravio izolacijom narušen energetski metabolizam u ćelijama, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama.<sup>380</sup>

Na osnovu promena uočenih kod kontrolne i stresirane grupe životinja, vidi se da biohemijska podloga u stresu modifikuje reakciju na tretman tianeptinom, tako da su subproteomske promene prilično drugačije između dve tretirane grupe. Jedinствен efekat tianeptina viđen je kod ekspresije subjedinice „e“ ATP sintaze. Razlog mogu biti i razlike u osetljivosti hipokampusa, koji u uslovima stresa prolazi kroz strukturne i funkcionalne promene. Na osnovu uočenih promena, pretpostavka je da je nootropni efekat tianeptina uslovljen ekspresijom citosolnih i proteina NSM, aktivirajući energetske procese i kalbindinom-posredovanu neurotransmisiju, dok sintetska mašinerija posledično aktivira i komponente proteazomalnog i sistema antioksidativne zaštite. Rezultati ove disertacije ukazuju na značaj

aktivacije energetskih procesa nakon tretmana tianeptinom, sugerišući na promene vezane za mitohondrijalnu teoriju depresije.

#### 6.4. Uporedna analiza molekulskih promena u uslovima stresa i nakon tretmana antidepresivima

Rezultati ove disertacije ukazuju na kompleksnost biohemijskih promena koje uzrokuje hronična izloženost stresu, a koja je u osnovi ponašanja nalik depresivnom. Analizom na proteinskom nivou, uočeno je nekoliko narušenih biohemijskih procesa u hipokampusu, koji su delovanjem lekova normalizovani. Iako je gruba identifikacija biohemijskih puteva prepoznata, ciljane molekulske promene su teže uočljive. Identifikovano je nekoliko proteina koji su jednoznačno promenjeni delovanjem lekova; spisak svih istovetnih promena između grupa prikazan je u **Tabeli 20**.

Proteomska analiza hroničnog delovanja fluoksetina i tianeptina dala je različite obrasce promena kod kontrolnih i stresiranih životinja, tako da je za interpretaciju učinka leka potrebno analizirati dvojako ove efekte, s obzirom da neke promene mogu biti maskirane heterogenom prirodom odgovora na stres, ali i tretman životinja.

**Tabela 20.** Uporedni prikaz citosolnih subproteomskih promena u uslovima stresa, i/ili nakon hroničnog tretmana antidepresivima.

UniProtKB Accession No.	Protein	IS	KT	IST	KF	ISF
Q6P6V0	Glucose-6-phosphate isomerase	2,47		0,69		
Q80U96	Exportin-1	1,76	2,68		0,62	
P18420	Proteasome subunit alpha type-1	1,57				0,76
Q5PPJ9	Endophilin-B2	1,5		0,65		
A0A0G2K9L2	Protein Tom112	0,67				0,75
P11980	Pyruvate kinase PKM	0,66			0,67	0,53
D3Z955	Protein Pgm211	0,64			0,46	0,68
D3ZHB7	Protein Ube3c	0,64				0,51
D3ZDT1	Protein Epb4112	0,63				0,64
Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	0,59			0,75	0,66
Q5U2S7	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	0,47				0,47
Q5RKI0	WD repeat-containing protein 1	0,43			2,99	0,59
Q3MHS9	Chaperonin containing Tcp1, subunit 6A (Zeta 1)	0,35				0,54
P04631	Protein S100-B		1,81		1,57	0,59

Q05683	Glutamate decarboxylase 2				1,53	0,63
Q4FZU8	Protein FAM65A				0,58	0,64
P69897	<b>Tubulin beta-5 chain</b>			<b>0,63</b>	1,74	<b>0,65</b>
Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1		1,72			0,68
P47819-2	Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein				2,2	0,72
I7FKL4	Myelin basic protein transcript variant 1				1,5	0,75
P50398	<b>Rab GDP dissociation inhibitor alpha</b>		<b>0,79</b>		<b>0,71</b>	0,75
O35095	Neurochondrin		1,51			0,77
P84079	<b>ADP-ribosylation factor 1</b>		<b>3,18</b>	0,72		<b>1,69</b>
Q5XI73	<b>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</b>		<b>1,54</b>	0,71		<b>1,74</b>
P45479	Palmitoyl-protein thioesterase 1				1,73	1,96
P55067	Neurocan core protein				0,77	2,84

Delimično preklapanje u mehanizmima delovanja tianeptina i fluoksetina uočeno je samo za promene proteinske ekspresije za tubulin beta lanac 5 i Rab GDI1, u smislu smanjene ekspresije, kao i povećanje nivoa ARF1 i Rho GDI1. Na osnovu navedenog, može se pretpostaviti da je delovanje na citosolne regulatorne proteine razvoja nervnih ćelija mesto preklapanja antidepressivnog dejstva oba leka. Kao što je rečeno, Rho GDI1 direktno ispoljava značaj u procesu regulacije signala posredovanih TrkB proteinima, podstičući procese regulacije morfologije glija ćelija i ulaska jona kalcijuma. Promene, tj. smanjenje nivoa tubulin beta lanca 5, kao jedne od komponenti citoskeleta, ide u prilog datom objašnjenju. S obzirom na literaturno dostupne podatke o povećanju BDNF nakon tretmana antidepressivima, kao i rezultate preklapanja proteomske analize hroničnih tretmana tianeptinom ili fluoksetinom, akcent antidepressivnog delovanja oba leka stavlja se na BDNF-TrkB signalni put, kao i na morfološke procese astrocita u hipokampusu.<sup>401</sup> Nekoliko proteinskih deregulacija ukazalo je na izmenjenu aktivnost astrocita nakon tretmana tianeptinom ili fluoksetinom, kao što su protein S100B, GFAP i glutaminsintetaza. Nekonzistentnost uočenih promena između kontrolnih i stresiranih životinja je potrebno dublje ispitati.

Znatno veća konzistentnost delovanja antidepressiva uočava se u subproteomskim promena u NSM, gde su i fluoksetin i tianeptin neutralisali deregulacije istovetnih proteina uzrokovane stresom socijalne izolacije (**Tabela 21**). U NSM su tianeptin i fluoksetin, za razliku od citosolne frakcije, stimulisali ekspresiju proteina.

**Tabela 21.** Uporedni prikaz subproteomskih promena u NSM u uslovima stresa i/ili nakon hroničnog tretmana antidepresivima.

UniProtKB Accession No.	Protein	IS	KT	IST	KF	ISF
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,91	2,32			6,14
P62815	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	3,92				1,55
G3V6P2	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex), isoform CRA_a	3,06			2,59	1,71
B2GV33	Amine oxidase [flavin-containing]	2,81			1,91	1,8
D4A133	Protein Atp6v1a	2,27			2,9	
P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	2,01			1,94	1,54
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta	1,96				1,59
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	1,77			4,63	3,29
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	1,74			1,89	
P61765	Syntaxin-binding protein 1	1,72			2,91	
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	1,7				2,6
R9PXR4	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	1,67			3,78	
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1,5			1,64	2,21
P81155	<b>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</b>	0,65		<b>2,7</b>		<b>1,82</b>
P35435	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0,65				2,03
D3ZWT8	ATP synthase subunit d, mitochondrial	0,65				2,2
G3V936	Citrate synthase	0,64			3,09	2,59
P04636	<b>Malate dehydrogenase, mitochondrial</b>	0,58		<b>1,92</b>		<b>1,56</b>
Q9Z2L0	<b>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</b>	0,57		<b>2,78</b>		<b>1,83</b>
G3V741/P16036	<b>Phosphate carrier protein, mitochondrial</b>	0,55		<b>4,19</b>	2,26	<b>2,17</b>
P00507	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	0,55				2,74
M0R7G4	MICOS complex subunit	0,5	5,26			
D3ZE15	Protein LOC100911483	0,49				2,3
Q05962	ADP/ATP translocase 1	0,48			1,53	
P19511	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	0,48				2,36
P10888	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	0,47				2

A0A0G2K5L2	Protein LOC100911440	0,46				3,3
Q09073	<b>ADP/ATP translocase 2</b>	0,42		<b>1,67</b>	2,84	<b>1,89</b>
P67779	Prohibitin	0,41				2,39
D3ZS58	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	0,33	2,63			
P29419	ATP synthase subunit e mitochondrial	0,32	10,29	2,59		
P11240	<b>Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial</b>	0,22		<b>2,58</b>		<b>2,2</b>
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske mitochondrial	0,16		4,56		
G3V6H5	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	0,16				4,16
D3ZG43	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	0,13				5,14
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial		5,87			1,52
Q920L2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial		4,38		1,75	
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial		2,24		1,6	1,81
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial		2,06		2,74	2,16
P32551	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial		0,31		1,97	2,93
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial			0,22	1,91	1,51
P59215	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha				1,49	1,69
P06686	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2				1,8	1,7
P05708	Hexokinase-1				1,89	1,64
A0A097BVJ5	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase transcript variant 1				2,01	1,65
F1LX07	Protein Slc25a12				2,08	2,06
F7FKI5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha				2,45	1,66

Dok je hronična socijalna izolacija deregulisala ekspresiju citrat-sintaze, subjedinice 5A citohrom c-oksidge, transportera VDAC1, VDAC2, transportera fosfata i ADP/ATP translokaze, antidepresivi su ove promene normalizovali. Promene u ekspresiji uočene samo od strane jednog antidepresiva verovatno su specifičnost njegovog delovanja, tj. ne oslikavaju mehanizam antidepresivnog delovanja. Oba antidepresiva su uticala na promene u metabolizmu NSM i unutarćelijsku dinamiku, s obzirom da su VDAC proteini najvažniji kontrolni proteini ulaska i izlaska metabolita iz mitohondrija, čime se kontroliše unutarćelijska komunikacija.<sup>383</sup>

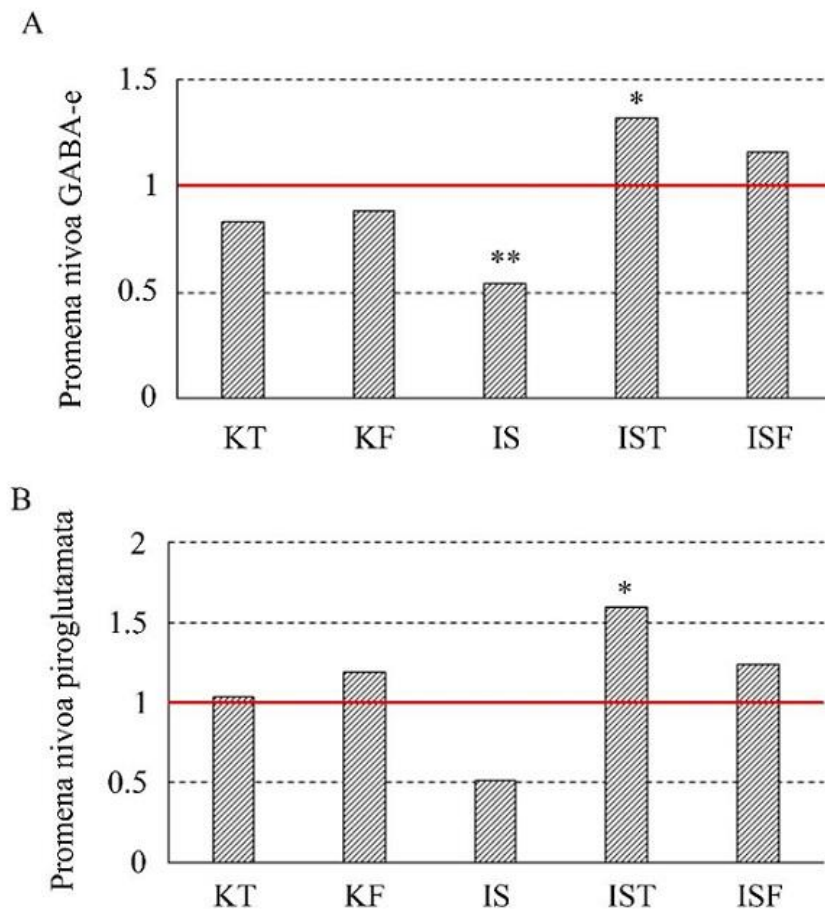
Suprotno od proteomske, metabolomskom analizom dobijeni su prilično ujednačeni obrasci promena u kontrolnim i stresiranim životinjama, s tim da je tianeptin izazvao brojnije i značajnije

metabolomske promene. Na metabolomskom nivou je stres hronične socijalne izolacije uglavnom delovao statistički značajnim smanjenjem metabolita ispod kontrolnog nivoa, dok je kod lekova obrnut uticaj.

Deregulacija nivoa aminokiselina je otkriće većeg broja studija koje su se bavile depresijom. U modelu hronične socijalne izolacije pokazalo se značajnim višestruko smanjenje glicina, koji igra važnu ulogu kofaktora u signalizaciji posredovanoj preko NMDAR, što upućuje na moguću izmenjenost ovog signalnog puta. Međutim, izostaje značajan efekat antidepresiva. Sa druge strane, GABA, koja je značajno smanjena u uslovima izloženosti stresu hronične socijalne izolacije, i prema RF klasifikatoru najznačajnija promenljiva za razlikovanje između stresirane i kontrolne grupe životinja, ukazuje na narušenu inhibitornu signalizaciju u hipokampusu. U slučaju GABA-e, oba antidepresiva su pokazala efekat vraćanja nivoa, ukazujući na značaj ovog vida signalizacije kod efikasnog tretmana antidepresivima (**Slika 60**). Prethodne studije su ukazale na narušeno funkcionisanje parvalbumin eksprimirajućih GABA interneurona kod životinja izloženih stresu socijalne izolacije, koje se normalizuje tretmanom tianeptina i fluoksetina.<sup>194,210</sup> Takođe, u nedavnim studijama je pokazana narušena GABA signalizacija u hipokampusu na drugom animalnog modelu depresije, kao i značaj ponovnog uspostavljanja GABA signalizacije u antidepresivnom delovanju vežbanja.<sup>402,403</sup> Ove aminokiselinske izmene mogu biti znak da hronična socijalna izolacija narušava NMDAR signalizaciju na GABA-ergičkim interneuronima, što rezultira narušavanjem inhibitorne signalizacije u hipokampusu pacova. Promene u aktivnosti NMDAR mogu biti rezultat narušenih interakcija sa TrkB i dovesti do poremećaja kognitivnih funkcija u depresiji.<sup>404</sup> Jedan od vidova regulacije aktivnosti NMDAR preko TrkB je pomoću Ras proteina.<sup>405</sup> Proteinske promene Ras related Rab 18 proteina, kao i Rho GDI1, koji je u direktnoj interakciji sa TrkB, još jedan su od dokaza o promenama na nivou TrkB funkcionalnosti. Oba antidepresiva su ispoljila svoje delovanje smanjenjem nivoa Rab GDI $\alpha$ , što je ranije dovedeno u vezu sa stresnim odgovorom, ali i delovanjem antidepresiva escitaloprama i sertralina.<sup>406</sup>

Vraćanje nivoa piroglutamata na nivo kontrolnog je dokaz promena u ekscitatornoj signalizaciji, gde je snižen nivo ovog metabolita, koji služi kao rezerva glutamata u ćelijama,<sup>407</sup> verovatno je posledica povećane glutamatne neurotransmisije. Promena piroglutamata takođe ide u prilog inhibitornoj, tj. ekscitotoksičnoj teoriji depresije. Normalizacija delovanjem antidepresiva suprotnog osnovnog mehanizma delovanja svedoči o tome da je reparacija GABA signalizacije verovatno osnov njihovog zajedničkog mehanizma delovanja.





**Slika 60.** Grafički prikaz promena GABA-e (A) i piroglutamata (B) u grupama životinja izloženih hroničnom stresu i/ili nakon hroničnog tretmana antidepresivima.

Vraćanje nivoa piroglutamata na nivo kontrolnog je dokaz promena u ekscitatornoj signalizaciji, gde je snižen nivo ovog metabolita, koji služi kao rezerva glutamata u ćelijama,<sup>407</sup> verovatno je posledica povećane glutamatne neurotransmisije. Promena piroglutamata takođe ide u prilog inhibitornoj, tj. ekscitotoksičnoj teoriji depresije. Normalizacija delovanjem antidepresiva suprotnog osnovnog mehanizma delovanja svedoči o tome da je reparacija GABA signalizacije verovatno osnov njihovog zajedničkog mehanizma delovanja.

Kako se nivo aminokiselina vezuje za kognitivne performanse,<sup>408</sup> značajno povećanje nivoa treonina i aspartata, koje je uočeno samo nakon tretmana tianeptinom, može biti osnov nootropnog efekta ovog leka. Međutim, ove promene je potrebno dodatno ispitati nakon akutne primene leka.

Posebno zanimljivu činjenicu predstavlja da su u hipokampusu životinja tretiranih fluoksetinom i tianeptinom pronađeni značajno viši nivoi ketamina, njegovog metabolita norketamina i ksilazina (**Slika 61**). Ovo se može objasniti samo pojačanim afinitetom vezivanja,

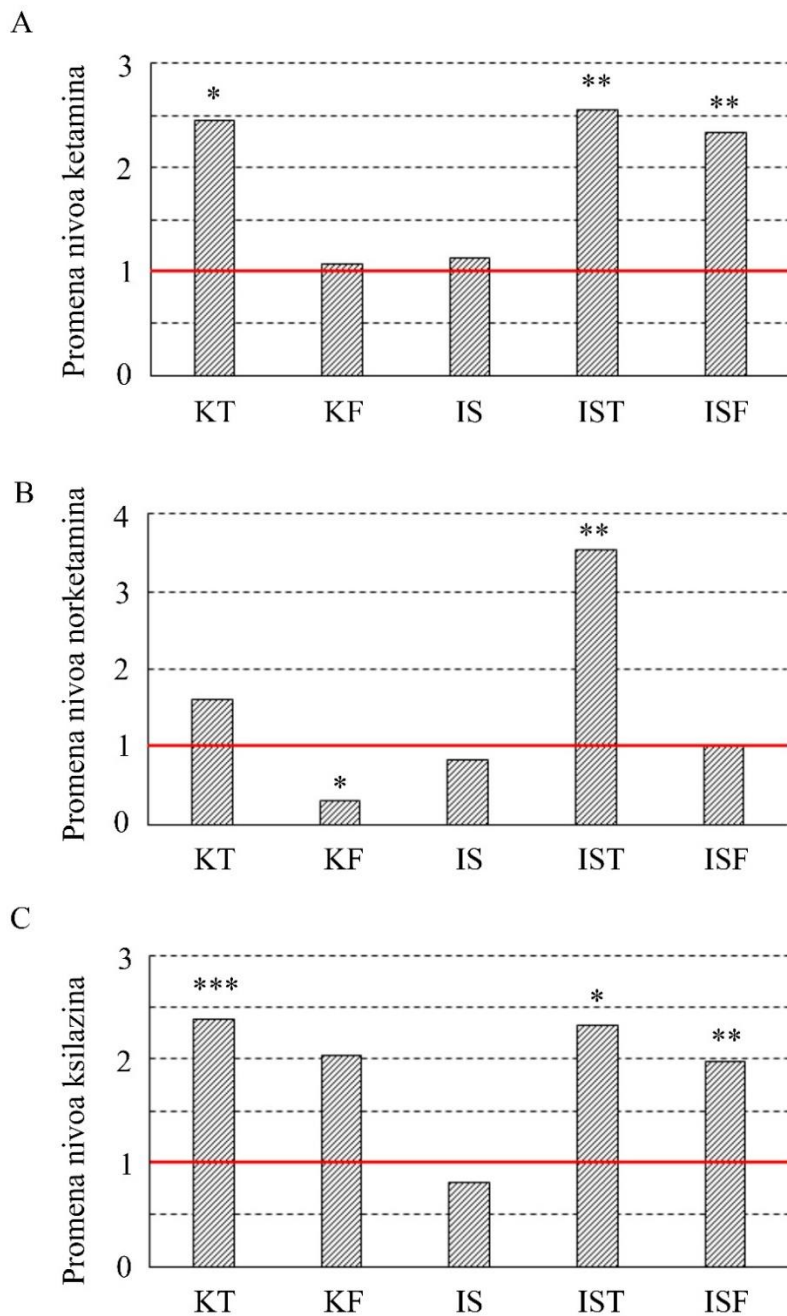
tj. povećanjem broja vezivnih mesta. Poznato je da se ketamin veže za NMDAR i TrkB, dok ksilazin ima afinitet prema  $\alpha$ 2-adrenergičkim receptorima (AR). Međutim, ovo povećanje može nastati i kao posledica promena u propustljivosti krvno moždane barijere, usled tretmana antidepresivima, što je potrebno dodatno ispitati.

Brzo-delujući antidepresivni efekat ketamina objašnjava se kroz antagonizam NMDAR. Ova disertacija je pokazala da tianeptin i fluoksetin, nakon hronične primene, verovatno povećavaju broj NMDAR na površini ćelija što, ukoliko postoji njihov inhibitorni efekat na nivou ovog receptora, može biti rezultat desenzitizacije i pokušaja ćelija da normalizuju ovaj vid prenosa signala.<sup>122</sup> S obzirom na varijacije u sastavu NMDAR na različitim ćelijama, potrebno je lokalizovati moguće promene na nivou ovih receptora. Smanjena signalizacija preko NMDAR, ili čak pojačana AMPAR signalizacija na GABA interneuronima, bi kod određenog tipa ćelija uslovlila pad u nivou GABA-e,<sup>73,409</sup> što je suprotno uočenim promenama nakon tretmana antidepresivima. S obzirom da je neurogeneza proces stimulisan delovanjem antagonista na NMDAR,<sup>164</sup> povećan broj NMDAR može biti rezultat inhibitornog delovanja antidepresiva na ove receptore. Upravo promene u ekspresiji NMDAR, praćene promenama u nivou GABA-e, mogu biti veza koja ukazuje na ulogu spomenute signalizacije GABA interneurona hipokampusa u depresiji i delovanju antidepresiva. Regulacija aktivnosti NMDAR takođe može biti rezultat stimulisane TrkB signalizacije ili mogućeg direktnog vezivanja ketamina za TrkB.<sup>393</sup> Nedavno je predložen mehanizam kojim stimulacija TrkB suprimira LTD posredovanu NMDAR, odvajanjem Ras Grf1 proteina, čime se takođe stimuliše zadržavanje NMDAR na površini ćelija.<sup>405</sup> Povećan nivo vezivanja ksilazina, koji se može vezati za povišene nivoe  $\alpha$ 2-AR, ide u prilog stimulacije noradrenalinske signalizacije podstaknute tretmanom dva suprotno delujuća antidepresiva.

Povećano vezivanje ketamina, praćeno je i ubrzanim metabolisanjem u norketamin, ali samo kod tretmana tianeptinom. S obzirom da se metabolizam ketamina obavlja preko P450 sistema, okupacija ovog sistema fluoksetinom je verovatno razlog zašto je metabolizam ketamina smanjen kod fluoksetinom tretiranih životinja, čak i ispod nivoa kontrolnih životinja. Za razliku od fluoksetina, ovo nije osnovni put metabolizma tianeptina.

Efekat hroničnog delovanja fluoksetina i tianeptina se ogleda i kroz normalizaciju lipidnog statusa u ćeliji, pri čemu su oba leka pokazala trend normalizacije u stresu povećanih nivoa mononezasićenih masnih kiselina, sa izuzetkom 10,12-dokozadinedinoične kiseline, čiji nivo je delovanjem antidepresiva porastao. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa ranijim studijama, koje su

pokazale ulogu polinezasićenih masnih kiselina u ublažavanju simptoma depresije.<sup>410</sup> Fizičko-hemijska svojstva ove masne kiseline su osnov za moguću ulogu u anti-inflamatornim i oksidoredukcionim procesima u ćeliji.



**Slika 61.** Grafički prikaz promena ketamina (A), norketamina (B) i ksilazina (C) u grupama životinja izloženih hroničnom stresu i/ili nakon hroničnog tretmana antidepresivima.

Depresija se, na osnovu dokaza većeg broja istraživanja, vezuje za postojanje metaboličkog sindroma kod pacijenata. Štaviše, smatra se nekom vrstom biomarkera za ranu dijagnostiku, i obrnuto.<sup>411</sup> Bolesti koje često prati stanje depresije, kao kardiomiopatije, ukazuju na mitohondrijalnu disfunkciju.<sup>412</sup> Integrativna studija proteomiksa i metabolomiksa malog mozga na CUMS modelu, i nakon tretmana kortikosteroidima, pokazala je deregulaciju energetske procesa.<sup>413,414</sup> Rezultati ove disertacije pokazuju da, saglasno navedenim studijama, u uslovima izloženosti stresu hronične socijalne izolacije dolazi do deregulacije energetske metabolizma, dok antidepresivi tianeptin i fluoksetin normalizuju ove procese, na šta ukazuju povećana ekspresija proteina i metabolita Krebsovog ciklusa, puta oksidativne fosforilacije, ali i transportera neophodnih za obavljanje normalnih biohemijskih procesa između mitohondrija i citosola.

Integracijom rezultata omics studija pokazan je i mogući doprinos inozitol-posredovane signalizacije u efikasnosti antidepresivnog delovanja tianeptina. Ova činjenica je dodatno potkrepljena time što tianeptin, kod životinja koje su pokazale normalizaciju imobilnog ponašanja u testu prinudnog plivanja, izaziva smanjenje nivoa *mio-inozitola*, što nije slučaj u grupi životinja rezistentnih na tianeptin.<sup>389</sup> Nepromenjen nivo *mio-inozitola*, nakon tretmana fluoksetina kod socijalno izolovanih životinja, može biti rezultat specifične dinamike stvaranja i trošenja ovog molekula. Rezultat ove disertacije ukazuje na uključenost ovog signalnog puta u antidepresivnom delovanju tianeptina, dok je njegov značaj u antidepresivnom delovanju fluoksetina potrebno dodatno istražiti. Dokazano je da  $Li^+$ , neuromodulator koji je pokazao rezultate u lečenju depresivnog ponašanja, snižava nivo inozitola u mozgu, inhibirajući inozitol-monofosfatazu.<sup>415</sup> Značaj *mio-inozitola* nagoveštava i pozitivna korelacija sa vremenom imobilnosti u testu prinudnog plivanja.<sup>389</sup> Ovi rezultati su poslednji dokaz u nizu rezultata koji ukazuju na verovatno pojačanu signalizaciju posredovanu preko TrkB. Takođe, ovaj rezultat ukazuje na moguće delovanje antidepresiva preko ograničavanja aktivnosti ovog signalnog puta kod astrocita, kao glavnih producenata *myo-inozitola* u mozgu. Pored toga, oba antidepresiva su u kontrolnim grupama životinja povećala nivo S100B proteina, takođe markera aktivnosti astrocita. Studije rađene na kulturi astrocita su pokazale značaj promene u ekspresiji proteina astrocita, vezanih za metabolizam glikogena, glukoze, kao i promene na nivou glutamata i GABA-e.<sup>416</sup>

Prednost ovog tipa studija, a to je količina dobijenih podataka, ujedno je i otežavajuća okolnost, s obzirom da su rezultati potvrdili nekoliko mogućih hipoteza depresije. Ograničenje ove disertacije bila je nemogućnost statističke međugrupne analize podataka kod proteomske studije,

kao rezultat pulovanja uzoraka, što je onemogućilo uvid u unutar-grupnu varijabilnost proteina i statističku procenu značajnosti razlika. Sa druge strane, metabolomska analiza je, kao poslednja u nizu karika biohemijskih procesa, a prva do fenotipskih promena, ukazala na funkcionalne aspekte proteinskih promena i tako, deduktivnim pristupom, akcentovala najznačajnije (de)aktivirane puteve, kao odgovor izloženosti stresu i/ili hroničnom delovanju suprotno delujućih antidepresiva. Rezultati ove disertacije stavljaju akcenat na promene u energetsom metabolizmu u hipokampusu, što je saglasno sa rezultatima kombinovane studije metabolomiksa i proteomiksa na životinjskom modelu blagog hroničnog stresa.<sup>413</sup> Promene u ekspresiji relevantnih proteina i nivoa metabolita, kao što su GABA, glicin, piroglutamat i holesterol, kao i povećano vezivanje ketamina, koje je ukazalo na rast broja ili dostupnosti NMDAR, ukazali su na vezu ponašanja nalik depresivnom i antidepresivnog delovanja lekova sa inhibitornom signalizacijom GABA interneurona, ili specifičnom modulacijom NMDAR kod određenih tipova ćelija, kao što su astrociti.<sup>417-419</sup> Preklapanje puteva izmenjenih delovanjem oba antidepresiva dalo je uvid u biohemijske puteve koji su ne samo deregulisani, već moguće odgovorni za antidepresivni mehanizam na nivou hipokampusa.

## **7. ZAKLJUČCI**

---

- Hronični stres socijalne izolacije je deregulisao ekspresiju energetski bitnih molekula, kao i transportnih proteina u frakciji NSM hipokampusa pacova, ukazujući na narušenu funkcionalnost i dinamiku ovih organela.
- Hronični stres socijalne izolacije je izmenio metabolom hipokampusa pacova, značajnim smanjenjem nivoa aminokiselina glicina i GABA-e, a povećanjem nivoa mononezasićenih masnih kiselina.
- Metabolomske profile stresirane i kontrolne grupe životinja je moguće razlikovati sa zadovoljavajućom tačnošću pomoću RF klasifikatora.
- Prema RF klasifikatoru, GABA je glavni metabolit divergencije/razlikovanja između stresirane i kontrolne grupe životinja.
- Hronični tretman fluoksetinom je, prema subproteomskim izmenama, normalizovao narušene energetske procese stresiranih životinja.
- Klasifikatorom na osnovu metabolomskih profila nije moguće razlikovanje grupe životinja tretiranih fluoksetinom, u odnosu na životinje tretirane fiziološkim rastvorom.
- Antidepresivni efekat tianeptina je uzrokovao povećanje ekspresije energetski važnih proteina u frakciji NSM.
- Hronični tretman tianeptinom je izmenio metabolomski profil hipokampusa pacova, tako što je uglavnom povećao nivo metabolita bitnih za energetske važne procese, Krebsov ciklus i put oksidativne fosforilacije.
- Najznačajniji metaboliti divergencije između stresiranih životinja tretiranih tianeptinom i životinja tretiranih fiziološkim rastvorom su holesterol, *mio*-inozitol i pantotenska kiselina. Ovo upućuje na ulogu astrocita kao glavnih mesta stvaranja ovih metabolita u mozgu, što potvrđuje i značajna pozitivna korelacija *mio*-inozitola sa imobilnošću kod pacova.
- Pored promena u nivou *mio*-inozitola, povećanje nivoa S100B proteina, markera aktivnosti astrocita, ukazuje na ulogu astrocita u antidepresivnom delovanju tianeptina i fluoksetina.
- Hronični tretmani fluoksetinom i tianeptinom uticali su na veće vezivanje anestetika i analgetika, ketamina i ksilazina, u hipokampusu pacova u stresiranim i nestresiranim grupama životinja, ukazujući na verovatno povećano vezivanje za NMDAR, TrkB i  $\alpha$ 2-AR,

i, posredno, promene u signalnim putevima regulisanim glutamatom, BDNF i noradrenalinom.

- Pearson-ova korelaciona analiza ukazala je na moguću povezanost ponašanja nalik depresivnom sa poremećajem lipidnog statusa, prvenstveno masnih kiselina, u hipokampusu pacova.



## **8. LITERATURA**

---

1. Kendler, K. S. The origin of our modern concept of depression - The history of melancholia from 1780-1880: A review. *JAMA Psychiatry* **77**, 863–868 (2020).
2. MacCalman, D. R. Recognising depression. *Health Educ. J.* **5**, 169–173 (1947).
3. Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G. & Vannier, M. W. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3908–3913 (1996).
4. Kim, Y. K. *Understanding Depression. Harvard Health Publications* vol. 1 (2018).
5. Kendler, K. S. & Prescott, C. A. A population-based twin study of lifetime major depression in men and women. *Arch. Gen. Psychiatry* **56**, 39–44 (1999).
6. Petronis, A. *et al.* Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr. Bull.* **29**, 169–178 (2003).
7. Hasler, G., Drevets, W. C., Manji, H. K. & Charney, D. S. Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1765–1781 (2004).
8. Wray, N. R. *et al.* Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat. Genet.* **50**, 668–681 (2018).
9. Howard, D. M. *et al.* Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nat. Neurosci.* **22**, 343 (2019).
10. Risch, N. *et al.* Interaction Between the Serotonin Transporter Gene (5-HTTLPR), Stressful Life Events, and Risk of Depression: A Meta-analysis. *JAMA* **301**, 2462–2471 (2009).
11. Zill, P. *et al.* SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol. Psychiatry* **9**, 1030–1036 (2004).
12. Polanczyk, G. *et al.* Protective Effect of CRHR1 Gene Variants on the Development of Adult Depression Following Childhood Maltreatment: Replication and Extension. *Arch. Gen. Psychiatry* **66**, 978–985 (2009).
13. Saluja, G. *et al.* Prevalence of and Risk Factors for Depressive Symptoms Among Young Adolescents. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **158**, 760–765 (2004).
14. Anisman, H. & Merali, Z. Understanding Stress: Characteristics and Caveats. *Alcohol Res. Heal.* **23**, 241–249 (1999).
15. Selye, H. Stress and the General Adaptation Syndrome. *Br. Med. J.* **1**, 1383–1392 (1950).
16. Selye, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* **138**, 32–32 (1936).

17. Keller-Wood, M. E. & Dallman, M. F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* **5**, 1–24 (1984).
18. Sterling, P. Principles of Allostasis: Optimal Design, Predictive Regulation, Pathophysiology, and Rational Therapeutics. in *Allostasis, homeostasis, and the costs of physiological adaptation* 17–64 (Cambridge University Press, 2004). doi:10.1017/CBO9781316257081.004.
19. Sterling, P. & Eyer, J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. in *Handbook of life stress, cognition and health* 629–649 (1988).
20. de Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 463–75 (2005).
21. McEwen, B. S. Allostasis, Allostatic Load, and the Aging Nervous System: Role of Excitatory Amino Acids and Excitotoxicity. *Neurochem. Res.* **25**, 1219–1231 (2000).
22. Herman, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. *Front. Behav. Neurosci.* **7**, 1–12 (2013).
23. McEwen, B. S. & Stellar, E. Stress and individual. *Arch Intern Med.* **153**, 2093–2101 (1993).
24. McEwen, B. S. Allostasis and Allostatic Load: Implications for Neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* **22**, 108–124 (2000).
25. Brown, G. W. Life events and affective disorder: Replications and limitations. *Psychosom. Med.* **55**, 248–259 (1993).
26. Sapolsky, R. M., Krey, L. C. & McEwen, B. S. The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis. *Endocr. Rev.* **7**, 284–301 (1986).
27. Checkley, S. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br. Med. Bull.* **52**, 597–617 (1996).
28. Herman, J., Adams, D. & Prewitt, C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* **61**, 180–190 (1995).
29. Licznarski, P. & Jonas, E. A. BDNF signaling: Harnessing stress to battle mood disorder. *PNAS* **115**, 3742–3744 (2018).
30. Seeman, T., Epel, E., Gruenewald, T., Karlamangla, A. & McEwen, B. S. Socio-economic differentials in peripheral biology: Cumulative allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1186**,

- 223–239 (2010).
31. McEwen, B. S. Mood disorders and allostatic load. *Biol. Psychiatry* **54**, 200–207 (2003).
  32. Schildkraut, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry* **122**, 509–522 (1965).
  33. Glowinski, J., Iversen, L. L. & Axelrod, J. Storage and synthesis of norepinephrine in the reserpine-treated rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **151**, 385–399 (1966).
  34. Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J. A. & Berrocoso, E. Fluoxetine: A case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 567–578 (2014).
  35. Jenkins, T. A., Nguyen, J. C. D. D., Polglaze, K. E. & Bertrand, P. P. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. *Nutrients* **8**, 1–15 (2016).
  36. Delgado, P. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry* **61**, 7–11 (2000).
  37. Willner, P. Dopamine and depression: A review of recent evidence. II. Theoretical approaches. *Brain Res. Rev.* **6**, 225–236 (1983).
  38. Delva, N. C. & Stanwood, G. D. Dysregulation of brain dopamine systems in major depressive disorder. *Exp. Biol. Med.* **246**, 1084–1093 (2021).
  39. Zhu, M. Y. *et al.* Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol. Psychiatry* **46**, 1275–1286 (1999).
  40. Sharman, R., Sullivan, K., Young, R. M. D. & McGill, J. Depressive symptoms in adolescents with early and continuously treated phenylketonuria: Associations with phenylalanine and tyrosine levels. *Gene* **504**, 288–291 (2012).
  41. Dunlop, B. W. & Nemeroff, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* **64**, 327–337 (2007).
  42. Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.* **22**, 724–763 (2001).
  43. Fuchs, E., Czéh, B., Kole, M. H. P., Michaelis, T. & Lucassen, P. J. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **14**, 481–490 (2004).
  44. Drevets, W. C., Price, J. L. & Furey, M. L. Brain structural and functional abnormalities in

- mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* **213**, 93–118 (2008).
45. Sheline, Y. I., Mittler, B. L. & Mintun, M. A. The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry* **17**, 300–5 (2002).
  46. Van Tol, M. J. *et al.* Regional Brain Volume in Depression and Anxiety Disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* **67**, 1002–1011 (2010).
  47. Pittenger, C. & Duman, R. S. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 88–109 (2008).
  48. Larsen, M. H., Mikkelsen, J. D., Hay-Schmidt, A. & Sandi, C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J. Psychiatr. Res.* **44**, 808–816 (2010).
  49. Poo, M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 24–32 (2001).
  50. Wainwright, S. R. & Galea, L. A. M. The neural plasticity theory of depression: Assessing the roles of adult neurogenesis and psc-nca within the hippocampus. *Neural Plast.* **2013**, 805497 (2013).
  51. Robinson, S. *et al.* Stress Diminishes BDNF-stimulated TrkB Signaling, TrkB-NMDA Receptor Linkage and Neuronal Activity in the Rat Brain. *Neuroscience* **473**, 142–158 (2021).
  52. Björkholm, C. & Monteggia, L. M. BDNF — a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology* **102**, 72–79 (2016).
  53. Jacobs, B. L., Van Praag, H. & Gage, F. H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: A novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* **5**, 262–269 (2000).
  54. Gould, E., Cameron, H. A. & McEwen, B. S. Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **340**, 551–565 (1994).
  55. Cameron, H. A. & Gould, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* **61**, 203–209 (1994).
  56. Brezun, J. M. & Daszuta, A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* **89**, 999–1002 (1999).
  57. Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S. & McEwen, B. S. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* **12**, 3642–3650 (1992).

58. McEwen, B. S., Chattarji Harold, S. & Milliken, M. Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **14**, 497–502 (2004).
59. Hellsten, J. *et al.* Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 283–290 (2002).
60. Kraus, C., Castrén, E., Kasper, S. & Lanzenberger, R. Serotonin and neuroplasticity – Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **77**, 317–326 (2017).
61. McEwen, B. S. Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 105–122 (1999).
62. Bliss, T. V. P. & Cooke, S. F. Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics* **66**, 3–17 (2011).
63. Purves, D. *et al.* *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc. (2004). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.62132-3.
64. Sanacora, G., Treccani, G. & Popoli, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* **62**, 63–77 (2012).
65. Trullas, R. & Skolnick, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur. J. Pharmacol.* **185**, 1–10 (1990).
66. Conrad, C. D., LeDoux, J. E., Magariños, A. M. & McEwen, B. S. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci.* **113**, 902–913 (1999).
67. Jang, G. & Maciver, M. B. Ketamine produces a long-lasting enhancement of ca1 neuron excitability. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–14 (2021).
68. Malenka, R. C. & Bear, M. F. LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. *Neuron* **44**, 5–21 (2004).
69. Witkin, J., Marek, G., Johnson, B. & Schoepp, D. Metabotropic Glutamate Receptors in the Control of Mood Disorders. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **6**, 87–100 (2008).
70. Chaki, S., Koike, H. & Fukumoto, K. Targeting of Metabotropic Glutamate Receptors for the Development of Novel Antidepressants. *Chronic Stress* **3**, (2019).
71. Beattie, E. C. *et al.* Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism

- shared with LTD. *Nat. Neurosci.* **3**, 1291–1300 (2000).
72. Brecht, D. S. & Nicoll, R. A. AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron* **40**, 361–379 (2003).
73. Lener, M. S. *et al.* Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. *Biol. Psychiatry* **81**, 886–897 (2017).
74. Zunszain, P. A., Anacker, C., Cattaneo, A., Carvalho, L. A. & Pariante, C. M. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **35**, 722–729 (2011).
75. Reichenberg, A. *et al.* Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch. Gen. Psychiatry* **58**, 445–452 (2001).
76. Bowley, M., Drevets, W., Ongür, D. & Price, J. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry* **52**, 404–412 (2002).
77. Berk, M. *et al.* So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC Med.* **11**, 1–16 (2013).
78. Connor, T. J. & Leonard, B. E. Depression, stress and immunological activation: The role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci.* **62**, 583–606 (1998).
79. Asnis, G. M. & De La Garza, R. Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: A review of its prevalence, risk factors, biology, and treatment approaches. *J. Clin. Gastroenterol.* **40**, 322–335 (2006).
80. Rajkowska, G. & Miguel-Hidalgo, J. Gliogenesis and Glial Pathology in Depression. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **6**, 219–233 (2008).
81. Picard, M., McEwen, B. S., Epel, E. S. & Sandi, C. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front. Neuroendocrinol.* **49**, 72–85 (2018).
82. Manoli, I. *et al.* Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 190–198 (2007).
83. Zhang, L., Zhou, R., Li, X., Ursano, R. J. & Li, H. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: A possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. *Med. Hypotheses* **66**, 1205–1208 (2006).
84. Bansal, Y. & Kuhad, A. Mitochondrial Dysfunction in Depression. *Curr. Neuropharmacol.* **14**, 610–618 (2016).

85. Kuznetsov, A. V. & Margreiter, R. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1911–1929 (2009).
86. Stauch, K. L., Purnell, P. R. & Fox, H. S. Quantitative proteomics of synaptic and nonsynaptic mitochondria: Insights for synaptic mitochondrial vulnerability. *J. Proteome Res.* **13**, 2620–2636 (2014).
87. Kristián, T., Weatherby, T. M., Bates, T. E. & Fiskum, G. Heterogeneity of the calcium-induced permeability transition in isolated non-synaptic brain mitochondria. *J. Neurochem.* **83**, 1297–1308 (2002).
88. Villa, R. F., Gorini, A., Ferrari, F. & Hoyer, S. Energy metabolism of cerebral mitochondria during aging, ischemia and post-ischemic recovery assessed by functional proteomics of enzymes. *Neurochem. Int.* **63**, 765–781 (2013).
89. Abdallah, C. G. *et al.* Glutamate Metabolism in Major Depressive Disorder. *Am J Psychiatry* **171**, 1320–1327 (2014).
90. Scoville, W. B. & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **20**, 11–21 (1957).
91. Olton, D. S., Becker, J. T. & Handelmann, G. E. Hippocampus, space, and memory. *Behav. Brain Sci.* **2**, 313–322 (1979).
92. Squire, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* **82**, 171–177 (2004).
93. Morris, R. G. M. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* **84**, 87–136 (2004).
94. Yang, C. & Naya, Y. Hippocampal cells integrate past memory and present perception for the future. *PLOS Biol.* **18**, e3000876 (2020).
95. Andersen, P., Bliss, T. V. P. & Skrede, K. K. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.* **13**, 222–238 (1971).
96. Anand, K. & Dhikav, V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann. Indian Acad. Neurol.* **15**, 239–246 (2012).
97. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. & O’Keefe, J. *The Hippocampus Book.* (2007).
98. Basu, J. & Siegelbaum, S. A. The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a021733 (2015).



99. Lavenex, P. & Amaral, D. G. Hippocampal-Neocortical Interaction: A Hierarchy of Associativity. *Hippocampus* **10**, 420–430 (2000).
100. Augusto Cepeda-Prado, E. Mechanisms of spike timing-dependent LTP in CA1 region of the hippocampus induced with a low repeat of coincident pre-and postsynaptic spiking. (2019).
101. Reul, J. M. H. M. & De Kloet, E. R. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J. Steroid Biochem.* **24**, 269–272 (1986).
102. Herman, J. P., Patel, P. D., Akil, H. & Watson, S. J. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1886–1894 (1989).
103. Aronsson, M. *et al.* Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9331–9335 (1988).
104. Jacobson, L. & Sapolsky, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* **12**, 118–134 (1991).
105. Mckittrick, C. R. *et al.* Chronic Social Stress Reduces Dendritic Arbors in CA3 Of Hippocampus and Decreases Binding to Serotonin Transporter Sites. *Synapse* **36**, 85–94 (2000).
106. Sapolsky, R. M., Krey, L. C. & McEwen, B. S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. *J. Neurosci.* **5**, 1222–1227 (1985).
107. Kim, C. & Chang, K. U. Effect of partial hippocampal resection on stress mechanism in rats. *Am. J. Physiol.* **201**, 337–340 (1961).
108. Feldman, S. & Conforti, N. Participation of the dorsal hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity. *Neuroendocrinology* **30**, 52–55 (1980).
109. Selemon, L. D. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Transl. Psychiatry* **3**, e238 (2013).
110. Rocher, C., Spedding, M., Munoz, C. & Jay, T. M. Acute Stress-induced Changes in Hippocampal/Prefrontal Circuits in Rats: Effects of Antidepressants. *Cereb. Cortex* **14**, 224–229 (2004).
111. McEwen, B. S. & Gianaros, P. J. Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity. *Annu. Rev. Med.* **62**, 431–445 (2011).

112. McEwen, B. S. & Sapolsky, R. M. Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 205–216 (1995).
113. Videbech, P. & Ravnkilde, B. Hippocampal volume and depression: A meta-analysis of MRI studies. *Am. J. Psychiatry* **161**, 1957–1966 (2004).
114. Posener, J. *et al.* High-dimensional mapping of the hippocampus in depression. *Am. J. Psychiatry* **160**, 83–89 (2003).
115. Sawyer, K., Corsentino, E., Sachs-Ericsson, N. & Steffens, D. C. Depression, Hippocampal Volume Changes, and Cognitive Decline in a Clinical Sample of Older Depressed Outpatients and Non-depressed Controls. *Aging Ment Heal.* **16**, 753–762 (2012).
116. Bell-McGinty, S. *et al.* Brain morphometric abnormalities in geriatric depression: Long-term neurobiological effects of illness duration. *Am. J. Psychiatry* **159**, 1424–1427 (2002).
117. Bench, C. J. *et al.* The anatomy of melancholia — focal abnormalities of cerebral blood flow in major depression. *Psychol. Med.* **22**, 607–615 (1992).
118. Videbech, P. PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: A critical review. *Acta Psychiatr. Scand.* **101**, 11–20 (2000).
119. Bench, C. J., Brown, R. G., Scott, L. C. & Frackowiak, R. S. J. Neuropsychological Dysfunction in Depression: The Relationship to Regional Cerebral Blood Flow. *Psychol. Med.* **24**, 849–857 (1994).
120. Vakili, K. *et al.* Hippocampal volume in primary unipolar major depression: a magnetic resonance imaging study. *Biol. Psychiatry* **47**, 1087–1090 (2000).
121. Duman, R. S., Nakagawa, S. & Malberg, J. Regulation of Adult Neurogenesis by Antidepressant Treatment. *Neuropsychopharmacology* **25**, 836–844 (2001).
122. Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J. & Duman, R. S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **20**, 9104–9110 (2000).
123. Kheirbek, M. A. Dorsal vs Ventral Hippocampal Neurogenesis: Implications for Cognition and Mood. *Neuropsychopharmacol. Rev.* **36**, 373–374 (2011).
124. Swanson, L. W. & Cowan, W. M. An Autoradiographic Study of the Organization of the Efferent Connections of the Hippocampal Formation in the Rat. *J. Comp. Neur* **172**, 49–84.
125. Fanselow, M. S. & Dong, H.-W. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**, 7 (2010).
126. Bannerman, D. M. *et al.* Regional dissociations within the hippocampus-memory and

- anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**, 273–83 (2004).
127. Jin, S. W. & Lee, I. Differential encoding of place value between the dorsal and intermediate hippocampus. *Curr. Biol.* **31**, 3053-3072.e5 (2021).
128. Bast, T., Wilson, L. A., Witter, M. P. & Morris, R. G. M. From Rapid Place Learning to Behavioral Performance: A Key Role for the Intermediate Hippocampus. *PLOS Biol.* **7**, 0730–0746 (2009).
129. Maras, P. M. *et al.* Preferential loss of dorsal-hippocampus synapses underlies memory impairments provoked by short, multimodal stress. *Mol. Psychiatry* **19**, 811–822 (2014).
130. Cajal, S. R. y & Ramón y Cajal, S. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés. Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés.* (Maloine, 1909). doi:10.5962/bhl.title.48637.
131. Banker, G. A. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* **209**, 809–810 (1980).
132. Bélanger, M., Allaman, I. & Magistretti, P. J. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* **14**, 724–738 (2011).
133. Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A. & Meisel, A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* **36**, 587–597 (2013).
134. Ge, I., Kirschen, G. W. & Wang, X. Shifted Dynamics of Glucose Metabolism in the Hippocampus During Aging. *Front. Aging Neurosci.* **13**, 700306 (2021).
135. Harris, J. J., Jolivet, R. & Attwell, D. Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron* **75**, 762–777 (2012).
136. Sibson, N. R., Mason, G. F. & Shulman, R. G. Functional Energy Metabolism: In vivo <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy Evidence for Coupling of Cerebral Glucose Consumption and Glutamatergic Neuronal Activity. **20**, 321–330 (1998).
137. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–243 (2010).
138. Frigerio, F., Casimir, M., Carobbio, S. & Maechler, P. Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1777**, 965–972 (2008).
139. Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control

- physiology and disease. *Nat. Commun.* **11**, 1–11 (2020).
140. Watts, M. E., Pocock, R. & Claudianos, C. Brain energy and oxygen metabolism: Emerging role in normal function and disease. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–13 (2018).
  141. Hwang, Y. H. *et al.* Dynamic Variation in Hippocampal Metabolism after Acute Stress Exposure: An In Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study at 9.4 T. *J. Spectrosc.* **11** (2021) doi:10.1155/2021/6533727.
  142. Mishra, P. & Chan, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* **212**, 379–387 (2016).
  143. Willner, P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. **83**, 1–16 (1984).
  144. Belzung, C. & Lemoine, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* **1**, 1–14 (2011).
  145. Beery, A. K. & Kaufer, D. Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. *Neurobiol. Stress* **1**, 116–127 (2015).
  146. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *Int. J. Prev. Med.* **4**, 624–630 (2013).
  147. McEwen, B. S., Harold, T. & Milliken, M. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metab. Clin. Exp.* **54**, 20–23 (2005).
  148. Abelaira, H. M., Ré, G. Z. & Quevedo, J. O. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **35**, S112–S120 (2013).
  149. Karelina, K. & Devries, A. C. Modeling social influences on human health. *Psychosom. Med.* **73**, 67–74 (2011).
  150. Elmer, T. & Stadtfeld, C. Depressive symptoms are associated with social isolation in face-to-face interaction networks. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).
  151. Garzón, J. & Del Río, J. Hyperactivity induced in rats by long-term isolation: further studies on a new animal model for the detection of antidepressants. *Eur. J. Pharmacol.* **74**, 287–94 (1981).
  152. Dronjak, S., Gavrilović, L., Filipović, D. & Radojčić, M. Immobilization and cold stress affect sympatho–adrenomedullary system and pituitary–adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiol. Behav.* **81**, 409–415 (2004).
  153. Martin, A. L. & Brown, R. E. The lonely mouse: verification of a separation-induced model

- of depression in female mice. *Behav Brain Res.* **207**, 196–207 (2010).
154. Grippo, A. J. *et al.* Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. *Psychoneuroendocrinology* **32**, 966–980 (2007).
155. Seale, J. V. *et al.* Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* **16**, 516–524 (2004).
156. Elaković, I. *et al.* Gender-specific response of brain corticosteroid receptors to stress and fluoxetine. *Brain Res.* **1384**, 61–68 (2011).
157. Young, E. A., Midgley, A. R., Carlson, N. E. & Brown, M. B. Alteration the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in depressed women. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 1157–1162 (2000).
158. Mitic, M., Lukic, I., Bozovic, N., Djordjevic, J. & Adzic, M. Fluoxetine Signature on Hippocampal MAPK Signalling in Sex-Dependent Manner. *J. Mol. Neurosci.* **55**, 335–346 (2015).
159. Becker, M., Pinhasov, A. & Ornoy, A. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? *Diagnostics* **11**, 1–31 (2021).
160. Wallace, D. L. *et al.* CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat. Neurosci.* **12**, 200–209 (2009).
161. Lee, J. S., Kang, J. Y. & Son, C. G. A Comparison of Isolation Stress and Unpredictable Chronic Mild Stress for the Establishment of Mouse Models of Depressive Disorder. *Front. Behav. Neurosci.* **14**, 10–15 (2021).
162. Grandjean, J. *et al.* Chronic psychosocial stress in mice leads to changes in brain functional connectivity and metabolite levels comparable to human depression. *Neuroimage* **142**, 544–552 (2016).
163. Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M. & Radojcic, M. B. Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology* **66**, 112–119 (2012).
164. Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. M. & Fuchs, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* **17**, 2492–2498 (1997).
165. Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M. & Dehpour, A. R. Neurobiology and consequences of

- social isolation stress in animal model—A comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* **105**, 1205–1222 (2018).
166. Miachon, S., Rochet, T., Mathian, B., Barbagli, B. & Claustrat, B. Long-term isolation of Wistar rats alters brain monoamine turnover, blood corticosterone, and ACTH. *Brain Res. Bull.* **32**, 611–614 (1993).
167. Stanisavljević, A. *et al.* Brain Sub/Region-Specific Effects of Olanzapine on c-Fos Expression of Chronically Socially Isolated Rats. *Neuroscience* **396**, 46–65 (2019).
168. Al Omran, A. J. *et al.* Social isolation induces neuroinflammation and microglia overactivation, while dihydromyricetin prevents and improves them. *J. Neuroinflammation* **19**, 12 (2022).
169. Berry, A. *et al.* Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 762–772 (2012).
170. Zlatković, J. *et al.* Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol. Cell. Biochem.* **393**, 43–57 (2014).
171. Perić, I., Stanisavljević, A., Gass, P. & Filipović, D. Fluoxetine reverses behavior changes in socially isolated rats: role of the hippocampal GSH-dependent defense system and proinflammatory cytokines. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **267**, 737–749 (2017).
172. Filipović, D. & Pajović, S. B. Differential regulation of CuZnSOD expression in rat brain by acute and/or chronic stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* **29**, 673–681 (2009).
173. Stowe, J. R., Liu, Y., Curtis, J. T., Freeman, M. E. & Wang, Z. Species differences in anxiety-related responses in male prairie and meadow voles: The effects of social isolation. *Physiol. Behav.* **86**, 369–378 (2005).
174. Sanchez, M. M. Neuroendocrine and Immunocytochemical Demonstrations of Decreased Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Responsiveness to Restraint Stress after Long-Term Social Isolation. *Endocrinology* **139**, 579–587 (1998).
175. Munckt, A., Guyre, P. M. & Holbrooke, N. J. Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions. *Endocr. Rev.* **5**, 25–44 (1984).
176. Chilvers, C., Dewey, M., Duggan, C. & Lee, A. *Treating depression in general practice: factors affecting patients' treatment preferences.* *British Journal of General Practice* vol. 50 (2000).

177. Driessen, E. & Hollon, S. D. Cognitive Behavioral Therapy for Mood Disorders: Efficacy, Moderators and Mediators. *Psychiatr. Clin. North Am.* **33**, 537–555 (2010).
178. Asay, T. I. & Larnbert, M. J. The Empirical Case for the Common factors om Therapy. in *The heart and Soul of Change: What Works in Therapy* (eds. Humble, M. A., Duncan, B. L. & Miller, S. D.) 23–55 (Washington D.C.:American Psychological Association, 1999).
179. Kuhn, R. Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355). *Schweiz Med Wochenschr.* **87**, 1135–40 (1957).
180. Glowinski, J. & Axelrod, J. Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. *Nature* **204**, 1318–1319 (1964).
181. Kent, J. M. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: New agents for the treatment of depression. *Lancet* **355**, 911–918 (2000).
182. Mocaër, E., Rettori, M. C. & Kamoun, A. Pharmacological antidepressive effects and tianeptine-induced 5-HT uptake increase. *Clin Neuropharmacol.* **11**, 32–42 (1988).
183. Berger, M., Gray, J. & Roth, B. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* **60**, 355–366 (2009).
184. Wong, D. T., Horng, J. S., Bymaster, F. P., Hauser, K. L. & Molloy, B. B. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-Trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci.* **15**, 471–479 (1974).
185. Renshaw, P. F. *et al.* Accumulation of fluoxetine and norfluoxetine in human brain during therapeutic administration. *Am. J. Psychiatry* **149**, 1592–1594 (1992).
186. Wong, D. T. *et al.* Norfluoxetine Enantiomers as Inhibitors of Serotonin Uptake in Rat Brain. *Neuropsychopharmacology* **8**, 337–344 (1993).
187. Preskorn, S. Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* **32**, 1–21 (1997).
188. Altamura, A. C., Moro, A. R. & Percudani, M. Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine. *Clin. Pharmacokinet.* **26**, 201–214 (1994).
189. Gram, L. Fluoxetine. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1354–61 (1994).
190. Mukherjee, J., Das, M. K., Yang, Z.-Y. & Lew, R. Evaluation of the Binding of the Radiolabeled Antidepressant Drug, 18F-Fluoxetine in the Rodent Brain: An In Vitro and In Vivo Study. *Nucl. Med. Biol.* **25**, 605–610 (1998).
191. Stanisavljević, A. *et al.* Fluoxetine modulates neuronal activity in stress-related limbic areas

- of adult rats subjected to the chronic social isolation. *Brain Res. Bull.* **163**, 95–108 (2020).
192. Filipović, D. *et al.* Chronic Treatment with Fluoxetine or Clozapine of Socially Isolated Rats Prevents Subsector-Specific Reduction of Parvalbumin Immunoreactive Cells in the Hippocampus. *Neuroscience* **371**, 384–394 (2018).
  193. Godavarthi, S. K., Sharma, A. & Jana, N. R. Reversal of reduced parvalbumin neurons in hippocampus and amygdala of Angelman syndrome model mice by chronic treatment of fluoxetine. *J. Neurochem.* **130**, 444–454 (2014).
  194. Perić, I., Stanisavljević, A., Gass, P. & Filipović, D. Fluoxetine exerts subregion/layer specific effects on parvalbumin/GAD67 protein expression in the dorsal hippocampus of male rats showing social isolation-induced depressive-like behaviour. *Brain Res. Bull.* **173**, 174–183 (2021).
  195. Walia, V. & Gilhotra, N. GABAergic Influence in the Antidepressant Effect of Fluoxetine in Unstressed and Stressed Mice. *J. Appl. Pharm. Sci.* **7**, 141–147 (2017).
  196. Chung, E. S. *et al.* Fluoxetine prevents LPS-induced degeneration of nigral dopaminergic neurons by inhibiting microglia-mediated oxidative stress. *Brain Res.* **1363**, 143–150 (2010).
  197. Zafir, A. & Banu, N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. *Eur. J. Pharmacol.* **572**, 23–31 (2007).
  198. O’Leary, O. F., Wu, X. & Castren, E. Chronic fluoxetine treatment increases expression of synaptic proteins in the hippocampus of the ovariectomized rat: Role of BDNF signalling. *Psychoneuroendocrinology* **34**, 367–381 (2009).
  199. Mendez-David, I. *et al.* Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. *Neurosci. Lett.* **597**, 121–6 (2015).
  200. Surget, A. *et al.* Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol. Psychiatry* **16**, 1177–88 (2011).
  201. Fattaccini, C. M., Bolaños-Jimenez, F., Gozlan, H. & Hamon, M. Tianeptine stimulates uptake of 5-hydroxytryptamine in vivo in the rat brain. *Neuropharmacology* **29**, 1–8 (1990).
  202. Guelfi, J. D. Efficacy of tianeptine in comparative trials versus reference antidepressants. An overview. *Br. J. Psychiatry. Suppl.* **160**, 72–75 (1992).
  203. Kasper, S. & Olié, J. P. A meta-analysis of randomized controlled trials of tianeptine versus



- SSRI in the short-term treatment of depression. *Eur. Psychiatry* **17**, 331–340 (2002).
204. Mutlu, O. *et al.* Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. *Life Sci.* **91**, 1252–1262 (2012).
205. McEwen, B. S. *et al.* Structural plasticity and tianeptine: cellular and molecular targets. *Eur. Psychiatry* **17**, 318–330 (2002).
206. Pifeyro, G., Deveault, L., Blier, P., Dennis, T. & Montigny, C. De. Effect of acute and prolonged tianeptine administration on the 5-HT transporter: electrophysiological, biochemical and radioligand binding studies in the rat brain. (1995).
207. Magariños, A. M., Deslandes, A. & McEwen, B. S. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur. J. Pharmacol.* **371**, 113–122 (1999).
208. Watanabe, Y., Gould, E., Daniels, D. C., Cameron, H. & McEwen, B. S. Tianeptine attenuates stress-induced morphological-changes in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **222**, 157–162 (1992).
209. Czéh, B. R. *et al.* Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *PNAS* **98**, 12796–12801 (2001).
210. Perić, I. *et al.* Tianeptine antagonizes the reduction of PV+ and GAD67 cells number in dorsal hippocampus of socially isolated rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **89**, 386–399 (2019).
211. Reagan, L. P. *et al.* Tianeptine increases brain-derived neurotrophic factor expression in the rat amygdala. *Eur. J. Pharmacol.* **565**, 68–75 (2007).
212. Szegedi, V. *et al.* Tianeptine potentiates AMPA receptors by activating CaMKII and PKA via the p38, p42/44 MAPK and JNK pathways. *Neurochem. Int.* **59**, 1109–1122 (2011).
213. Samuels, B. A. *et al.* The Behavioral Effects of the Antidepressant Tianeptine Require the Mu-Opioid Receptor. *Neuropsychopharmacology* 2052–2063 (2017) doi:10.1038/npp.2017.60.
214. Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Tränkle, C. & Schlicker, E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **372**, 354–361 (2006).
215. Kano, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* **89**,

- 309–380 (2009).
216. Lanni, C. *et al.* Cognition enhancers between treating and doping the mind. *Pharmacol. Res.* **57**, 196–213 (2008).
217. Lucaj, S. & Leo, R. J. *Tianeptine Sodium: A Nootropic With Potentially Lethal Consequences. The primary care companion for CNS disorders* vol. 20 17102205 (NLM (Medline), 2018).
218. Svensson, J. E. *et al.* Serotonin transporter availability increases in patients recovering from a depressive episode. *Transl. Psychiatry* **11**, 10 (2021).
219. Reisinger, S. N., Wanek, T., Langer, O. & Pollak, D. D. PET imaging of the mouse brain reveals a dynamic regulation of SERT density in a chronic stress model. *Transl. Psychiatry* **9**, 1–11 (2019).
220. Gartlehner, G. *et al.* Comparative benefits and harms of second-generation antidepressants for treating major depressive disorder: An updated meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **155**, 772–785 (2011).
221. Dunner, D. L. Combining antidepressants. *Shanghai Arch. Psychiatry* **26**, 363–364 (2014).
222. Moret, C. Combination/augmentation strategies for improving the treatment of depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **1**, 301–9 (2005).
223. Bauer, M. *et al.* Lithium augmentation therapy in refractory depression: clinical evidence and neurobiological mechanisms. *Can. J. Psychiatry.* **48**, 440–448 (2003).
224. Dimitriou, E. C. & Dimitriou, C. E. Bupirone augmentation of antidepressant therapy. *J. Clin. Psychopharmacol.* **18**, 465–469 (1998).
225. Barbee, J. G., Conrad, E. J. & Jamhour, N. J. The effectiveness of olanzapine, risperidone, quetiapine, and ziprasidone as augmentation agents in treatment-resistant major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry* **65**, 975–981 (2004).
226. Li, Z., Ruan, M., Chen, J. & Yiru, F. Major Depressive Disorder: Advances in Neuroscience Research and Translational Applications. *Neurosci. Bull.* **37**, 863–880 (2021).
227. Ates-Alagoz, Z. & Adejare, A. NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression. *Pharmaceuticals* **6**, 480–499 (2013).
228. Millan, M. J. Dual- and Triple-Acting Agents for Treating Core and Co-morbid Symptoms of Major Depression: Novel Concepts, New Drugs. *Neurotherapeutics* **6**, 53–77 (2009).
229. Payne, N. & Prudic, J. Electroconvulsive therapy: Part I. A perspective on the evolution and

- current practice of ECT. *J. Psychiatr. Pract.* **15**, 346–368 (2009).
230. Schoeyen, H. *et al.* Treatment-resistant bipolar depression: a randomized controlled trial of electroconvulsive therapy versus algorithm-based pharmacological treatment. *Am. J. Psychiatry* **172**, 41–51 (2015).
231. Gbyl, K. & Videbech, P. Electroconvulsive therapy increases brain volume in major depression: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr. Scand.* **138**, 180–195 (2018).
232. Takamiya, A., Kishimoto, T. & Mimura, M. What Can We Tell About the Effect of Electroconvulsive Therapy on the Human Hippocampus? *Clin. EEG Neurosci.* 1–10 (2021) doi:10.1177/15500594211044066.
233. Chen, F., Danladi, J., Wegener, G., Madsen, T. M. & Nyengaard, J. R. Sustained Ultrastructural Changes in Rat Hippocampal Formation After Repeated Electroconvulsive Seizures. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **23**, 446–458 (2020).
234. Esel, E. *et al.* The effects of electroconvulsive therapy on GABAergic function in major depressive patients. *J. ECT* **24**, 224–228 (2008).
235. Prathikanti, S. *et al.* Treating major depression with yoga: A prospective, randomized, controlled pilot trial. *PLoS One* **12**, e0173869 (2017).
236. Nyström, M. B. T., Neely, G., Hassmén, P. & Carlbring, P. Treating Major Depression with Physical Activity: A Systematic Overview with Recommendations. *Cogn. Behav. Ther.* **44**, 341–352 (2015).
237. Pollock, K. M. Exercise in treating depression: Broadening the psychotherapist’s role. *J. Clin. Psychol.* **57**, 1289–1300 (2001).
238. D’Alessio, L. *et al.* Reducing Allostatic Load in Depression and Anxiety Disorders: Physical Activity and Yoga Practice as Add-On Therapies. *Front. Psychiatry* **11**, 501 (2020).
239. Eby, G. A. & Eby, K. L. Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Med. Hypotheses* **67**, 362–370 (2006).
240. Lewitzka, U. *et al.* The suicide prevention effect of lithium: more than 20 years of evidence—a narrative review. *Int. J. Bipolar Disord.* **3**, 16 (2015).
241. Turner, E. H., Loftis, J. M. & Blackwell, A. D. Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol. Ther.* **109**, 325–338 (2006).

242. Birdsall, T. C. 5-Hydroxytryptophan: A Clinically-Effective Serotonin Precursor. *Altern. Med. Rev.* **3**, 271–280 (1998).
243. Alabsi, A., Khoudary, A. C. & Abdelwahed, W. The antidepressant effect of L-tyrosine-loaded nanoparticles: Behavioral aspects. *Ann. Neurosci.* **23**, 89–99 (2016).
244. Papakostas, G. I., Mischoulon, D., Shyu, I., Alpert, J. E. & Fava, M. S-adenosyl methionine (SAME) augmentation of serotonin reuptake inhibitors for antidepressant nonresponders with major depressive disorder: a double-blind, randomized clinical trial. *Am. J. Psychiatry* **167**, 942–948 (2010).
245. Meyers, S. Use of neurotransmitter precursors for treatment of depression. *Altern. Med. Rev.* **5**, 64–71 (2000).
246. Hasin, Y., Seldin, M. & Lusis, A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* **18**, 1–15 (2017).
247. Sethi, S. & Brietzke, E. Omics-based biomarkers: Application of metabolomics in neuropsychiatric disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, 1–13 (2016).
248. Yan, S.-K. *et al.* “Omics” in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. *Chin. J. Nat. Med.* **13**, 3–21 (2015).
249. Malik, S., Singh, R., Arora, G., Dangol, A. & Goyal, S. Biomarkers of major depressive disorder: Knowing is half the battle. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **19**, 12–25 (2021).
250. Smith, B. J. & Martins-de-Souza, D. Biological Applications for LC-MS-Based Proteomics. *Adv Exp Med Biol.* **1336**, 17–29 (2021).
251. Wilkins, M. *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology. (N. Y.)* **14**, 61–65 (1996).
252. Zecha, J. *et al.* TMT labeling for the masses: A robust and cost-efficient, in-solution labeling approach. *Mol. Cell. Proteomics* **18**, 1468–1478 (2019).
253. Cox, J. *et al.* Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2513–2526 (2014).
254. Griffin, N. M. *et al.* Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomics analysis. *Nat Biotechnol* **28**, 83–89 (2010).
255. Martins-De-Souza, D., Harris, L. W., Guest, P. C., Turck, C. W. & Bahn, S. The role of

- proteomics in depression research. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **260**, 499–506 (2010).
256. Franzen, A. D. *et al.* Cerebrospinal fluid proteome evaluation in major depressive disorder by mass spectrometry. *BMC Psychiatry* **20**, 1–12 (2020).
257. Lee, J. *et al.* Proteomic analysis of serum from patients with major depressive disorder to compare their depressive and remission statuses. *Psychiatry Investig.* **12**, 249–259 (2015).
258. Girard, M. *et al.* A Serum Analysis before and after Antidepressant Treatment in Major Depression: A Pilot Study. *Clin. Med. Insights Psychiatry* **6**, 1–12 (2015).
259. Bot, M. *et al.* Serum proteomic profiling of major depressive disorder. *Transl Psychiatry* **5**, e599 (2015).
260. Filiou, M. D. *et al.* Proteomics and Metabolomics Analysis of a Trait Anxiety Mouse Model Reveals Divergent Mitochondrial Pathways. *Biol. Psychiatry* **70**, 1074–1082 (2011).
261. Marais, L., Hattingh, S., Stein, D. & Daniels, W. A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. *Metab. Brain Dis.* **24**, 569–586 (2009).
262. Mu, J. *et al.* Neurogenesis and major depression: implications from proteomic analyses of hippocampal proteins in a rat depression model. *Neurosci. Lett.* **416**, 252–256 (2007).
263. Jiang, L., Sullivan, H. & Wang, B. Principal Component Analysis (PCA) Loading and Statistical Tests for Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Metabolomics Involving Multiple Study Groups. *Anal. Lett.* (2022) doi:10.1080/00032719.2021.2019758.
264. Johnson, C. H. *et al.* Radiation Metabolomics. 5. Identification of Urinary Biomarkers of Ionizing Radiation Exposure in Nonhuman Primates by Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Radiat Res* **178**, 328–340 (2012).
265. Paris, L. *et al.* Global metabolomics reveals metabolic dysregulation in ischemic retinopathy. *Metabolomics* **12**, 1–10 (2016).
266. Janeiro, M. H., Ramírez, M. J., Milagro, F. I., Martínez, J. A. & Solas, M. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. *Nutrients* **10**, 1398 (2018).
267. Johnson, C. H. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **17**, 451–459 (2016).
268. Dumas, M. E. & Davidovic, L. Metabolic Profiling and Phenotyping of Central Nervous

- System Diseases: Metabolites Bring Insights into Brain Dysfunctions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **10**, 402–424 (2015).
269. Turck, C. W. & Filiou, M. D. What Have Mass Spectrometry-Based Proteomics and Metabolomics (Not) Taught Us about Psychiatric Disorders? *Mol Neuropsychiatry* **1**, 69–75 (2015).
270. Holmes, E., Wilson, I. D. & Nicholson, J. K. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell* **134**, 714–717 (2008).
271. Vinayavekhin, N., Homan, E. A. & Saghatelian, A. Exploring disease through metabolomics. *ACS Chem. Biol.* **5**, 91–103 (2010).
272. Clayton, T. A. *et al.* Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* **440**, 1073–1077 (2006).
273. Patti, G. J., Yanes, O., Siuzdak, G. & Manuscript, A. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**, 263–269 (2013).
274. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E. ‘Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* **29**, 1181–1189 (1999).
275. Vinayavekhin, N. & Saghatelian, A. *Untargeted metabolomics. Current Protocols in Molecular Biology* (2010) doi:10.1002/0471142727.mb3001s90.
276. Lei, Z., Huhman, D. V & Sumner, L. W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *J. Biol. Chem.* **286**, 25435–25442 (2011).
277. Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* **26**, 51–78 (2007).
278. Paiva, A. C., de Oliveira, A. M., Crucello, J., Facanali, R. & Hantao, L. W. Practical Considerations in Method Development for Gas Chromatography-Based Metabolomic Profiling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1336**, 139–157 (2021).
279. C. Moldoveanu, S. & David, V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. in *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application* 1–33 (IntechOpen, 2019). doi:10.5772/intechopen.81954.
280. Bruno, L. GC Derivatization Reagents. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2019).
281. Drozd, J. Chemical derivatization in gas chromatography. in *Journal of Chromatography Library* vol. 19 1–223 (Elsevier Sevier Science Publishing Company Inc., 1981).

282. Poole, C. F. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1296**, 2–14 (2013).
283. Halket, J. M. & Zaikin, V. G. Derivatization in Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **9**, 1–21 (2003).
284. Papadopoulou, Z. *et al.* Unraveling the serum metabolomic profile of post-partum depression. *Front. Neurosci.* **13**, 1–9 (2019).
285. Begley, P. *et al.* Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum. *Anal. Chem.* **81**, 7038–7046 (2009).
286. Shao, W.-H. *et al.* Metabolomic identification of molecular changes associated with stress resilience in the chronic mild stress rat model of depression. *Metabolomics* **9**, 433–443 (2013).
287. Chen, J. *et al.* Metabolomic analysis reveals altered metabolic pathways in a rat model of gastric carcinogenesis. *Oncotarget* **7**, 60053–60073 (2016).
288. Zhao, J. *et al.* Metabolomic identification of biochemical changes induced by fluoxetine and imipramine in a chronic mild stress mouse model of depression. *Sci. Rep.* **5**, 1–8 (2015).
289. Ni, Y. *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. *FEBS Lett.* **582**, 2627–2636 (2008).
290. Wang, Y. *et al.* Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & Cd stress response of radish roots. *Sci. Rep.* **5**, 1–13 (2015).
291. Koek, M. M. *et al.* Semi-automated non-target processing in GC x GC-MS metabolomics analysis: Applicability for biomedical studies. *Metabolomics* **7**, 1–14 (2011).
292. Winnike, J. H. *et al.* Comparison of GC-MS and GC×GC-MS in the Analysis of Human Serum Samples for Biomarker Discovery. *J. Proteome Res* **14**, 1810–1817 (2015).
293. Mondello, L., Tranchida, P. Q., Dugo, P. & Dugo, G. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review. *Mass Spectrom. Rev.* **27**, 101–124 (2008).
294. Snyder, L. R., Hoggard, J. C., Montine, T. J. & Synovec, R. E. Development and application of a comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry method for the analysis of L-beta-methylamino-alanine in human tissue. *J.*

- Chromatogr. A* **1217**, 4639–47 (2010).
295. Hartonen, M., Mattila, I., Ruskeepää, A.-L., Orešič, M. & Hyötyläinen, T. Characterization of cerebrospinal fluid by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1293**, 142–149 (2013).
296. Orešič, M. *et al.* Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders: a general population-based study. *Genome Med.* **3**, 1–14 (2011).
297. Li, X. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabonomics: Biomarker discovery for diabetes mellitus. *Anal. Chim. Acta* **633**, 257–262 (2009).
298. Welthagen, W. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC × GC-TOF) for high resolution metabolomics: biomarker discovery on spleen tissue extracts of obese NZO compared to lean C57BL/6 mice. *Metabolomics* **1**, 65–73 (2005).
299. Shellie, R. A. *et al.* Statistical methods for comparing comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry results: Metabolomic analysis of mouse tissue extracts. *J. Chromatogr. A* **1086**, 83–90 (2005).
300. Manzoni, C. *et al.* Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief. Bioinform.* **19**, 286–302 (2018).
301. Heinemann, J. Machine learning in untargeted metabolomics experiments. in *Microbial Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (ed. Baidoo, E. E. K.) vol. 1859 287–299 (Springer Nature, 2019).
302. Ghaffari, M. H. *et al.* Metabolomics meets machine learning: Longitudinal metabolite profiling in serum of normal versus overconditioned cows and pathway analysis. *J. Dairy Sci.* **102**, 11561–11585 (2019).
303. Wold, S., Esbensen, K. & Geladi, P. Principal Component Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2**, 37–52 (1987).
304. Worley, B. & Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics* **1**, 92–107 (2013).
305. Trygg, J. & Wold, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* **16**, 119–128 (2002).
306. Barker, M. & Rayens, W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* **17**, 166–173



- (2003).
307. Alonso, A., Marsal, S. & Julià, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 1–20 (2015).
308. Xia, J. *et al.* Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* **9**, 280–299 (2013).
309. Westerhuis, J. A. *et al.* Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics* **4**, 81–89 (2008).
310. Breiman, L. Random forests. *Mach. Learn.* **45**, 5–32 (2001).
311. Liaw, A. & Wiener, M. *Classification and Regression by randomForest*. vol. 2/3 <http://www.stat.berkeley.edu/> (2002).
312. Athreya, A. P. *et al.* Pharmacogenomics-Driven Prediction of Antidepressant Treatment Outcomes: A Machine-Learning Approach With Multi-trial Replication. *Clin. Pharmacol. Ther.* **106**, 855–865 (2019).
313. Chong, J., Wishart, D. S. & Xia, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **68**, 1–128 (2019).
314. Perić, I., Costina, V., Findeisen, P., Gass, P. & Filipović, D. Tianeptine Enhances Energy-related Processes in the Hippocampal Non-synaptic Mitochondria in a Rat Model of Depression. *Neuroscience* **451**, 111–125 (2020).
315. Perić, I. *et al.* Tianeptine modulates synaptic vesicle dynamics and favors synaptic mitochondria processes in socially isolated rats. *Sci. Rep.* **11**, 1–15 (2021).
316. Willner, P., Muscat, R. & Papp, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **16**, 525–34 (1992).
317. Treadway, M. T. & Zald, D. H. Reconsidering anhedonia in depression: Lessons from translational neuroscience. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **35**, 537–555 (2011).
318. Ho, Y.-J., Eichendorff, J. & Schwarting, R. K. W. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behav. Brain Res.* **136**, 1–12 (2002).
319. Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N. & Jalfre, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* **47**, 379–91 (1978).
320. Dunkley, P. R., Jarvie, P. E. & Robinson, P. J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat. Protoc.* **3**, 1718–1728 (2008).

321. Tibor, K. Isolation of mitochondria from the CNS. *Curr. Protoc. Neurosci.* 1–16 (2010) doi:10.1002/0471142301.ns0722s52.
322. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT\*. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
323. Filipović, D., Costina, V., Perić, I., Stanisavljević, A. & Findeisen, P. Chronic fluoxetine treatment directs energy metabolism towards the citric acid cycle and oxidative phosphorylation in rat hippocampal nonsynaptic mitochondria. *Brain Res.* **1659**, 41–54 (2017).
324. Perić, I., Costina, V., Stanisavljević, A., Findeisen, P. & Filipović, D. Proteomic characterization of hippocampus of chronically socially isolated rats treated with fluoxetine: Depression-like behaviour and fluoxetine mechanism of action. *Neuropharmacology* **135**, 268–283 (2018).
325. Paxinos, G. & Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* (New York: Academic Press, 2005).
326. Kind, T. *et al.* FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 10038–10048 (2009).
327. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
328. Li, C. *et al.* MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, W486–W494 (2018).
329. Szymanska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K. & Westerhuis, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* **8**, S3–S16 (2012).
330. Triba, M. N. *et al.* PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Mol. Biosyst.* **11**, 13–19 (2015).
331. Novotny, V. & Faltus, F. Tianeptine and fluoxetine in major depression: A 6-week randomised double-blind study. *Hum. Psychopharmacol.* **17**, 299–303 (2002).
332. Villa, R. F., Gorini, A., Lo Faro, A. & Dell’Orbo, C. A critique on the preparation and

- enzymatic characterization of synaptic and nonsynaptic mitochondria from hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* **9**, 247–62 (1989).
333. Sheng, Z. H. & Cai, Q. Mitochondrial transport in neurons: Impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 77–93 (2012).
334. Villa, R. F., Ferrari, F., Gorini, A., Brunello, N. & Tascetta, F. Effect of desipramine and fluoxetine on energy metabolism of cerebral mitochondria. *Neuroscience* **330**, 326–334 (2016).
335. Cryan, J. F., Markou, a & Lucki, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 238–245 (2002).
336. Aonurm-Helm, A. *et al.* Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 1618–1628 (2008).
337. Cremer, H. *et al.* Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* **367**, 455–459 (1994).
338. Vukojevic, V. *et al.* Evolutionary conserved role of neural cell adhesion molecule-1 in memory. *Transl. Psychiatry* **10**, 1–13 (2020).
339. Rønn, L. C. B., Hartz, B. P. & Bock, E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp. Gerontol.* **33**, 853–864 (1998).
340. Paulick, M. G. & Bertozzi, C. R. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry* **47**, 6991–7000 (2008).
341. Brown, D. & Waneck, G. L. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 895–906 (1992).
342. Altmann, P. Aluminium Induced Disease in Subjects with and without Renal Failure—Does It Help Us Understand the Role of Aluminium in Alzheimer’s Disease? in *Aluminium and Alzheimer’s Disease* 1–36 (2001). doi:10.1016/b978-044450811-9/50026-4.
343. Pan, L. *et al.* *GTP-cyclohydrolase deficiency responsive to sapropterin and 5-HTP supplementation: relief of treatment-refractory depression and suicidal behaviour.* *BMJ Case Reports* vol. 2011 1–3 (BMJ Publishing Group, 2011).
344. Pan, L. A. *et al.* Neurometabolic Disorders: Potentially Treatable Abnormalities in Patients With Treatment-Refractory Depression and Suicidal Behavior. *Am. J. Psychiatry* **174**, 42–50 (2017).

345. Meyer, J. H. *et al.* Elevated monoamine oxidase levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **63**, 1209–1216 (2006).
346. Carneiro-Nascimento, S. *et al.* Chronic social stress in mice alters energy status including higher glucose need but lower brain utilization. *Psychoneuroendocrinology* **119**, (2020).
347. Rn, J., Sass, O. N., Fernando, M. N. & Behringer, S. Mimicking Ketonuria in the Ketogenesis Defect 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Lyase Deficiency: An Artefact in the Analysis of Urinary Organic Acids. *J. Inborn Errors Metab. Screen.* **6**, 1–4 (2018).
348. Chapman, M. J., Wallace, E. C. & Pollock, T. A. Organic Acid Profiling. in *Textbook of Natural Medicine* 236-244.e6 (Elsevier Inc., 2020). doi:10.1016/b978-0-323-43044-9.00029-7.
349. Lieberman, H. R. Amino Acid and Protein Requirements: Cognitive Performance, Stress, and Brain Function. in *The Role of Protein and Amino Acids in Sustaining and Enhancing Performance*. (National Academies Press (US), 1999).
350. Wojcik, S. M. *et al.* An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *PNAS* **101**, 7158–7163 (2004).
351. Lowy, M. T., Gault, L. & Yamamoto, B. K. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J. Neurochem.* **61**, 1957–1960 (1993).
352. Al-Hasani, R. *et al.* Ventral tegmental area GABAergic inhibition of cholinergic interneurons in the ventral nucleus accumbens shell promotes reward reinforcement. *Nat. Neurosci.* **24**, 1414–1428 (2021).
353. Sharpley, C. F. Malfunction in GABA and Glutamate as pathways to Depression: A Review of the evidence. *Clin. Med. Ther.* **1**, 1511–1519 (2009).
354. Quiroz, E. N. *et al.* Cell signaling in neuronal stem cells. *Cells* **7**, 1–26 (2018).
355. Arnone, D., Mumuni, A. N., Jauhar, S., Condon, B. & Cavanagh, J. Indirect evidence of selective glial involvement in glutamate-based mechanisms of mood regulation in depression: Meta-analysis of absolute prefrontal neuro-metabolic concentrations. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **25**, 1109–1117 (2015).
356. Schubring, S. R., Fleischer, W., Lin, J. S., Haas, H. L. & Sergeeva, O. A. The bile steroid chenodeoxycholate is a potent antagonist at NMDA and GABA A receptors. *Neurosci. Lett.*

- 506**, 322–326 (2012).
357. Fernandes, M. F., Mutch, D. M. & Leri, F. The Relationship between Fatty Acids and Different Depression-Related Brain Regions, and Their Potential Role as Biomarkers of Response to Antidepressants. *Nutrients* **9**, 1–19 (2017).
358. Zhang, J. & Liu, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* **6**, 254–264 (2015).
359. Feldman, E. B., Russell, B. S. & Schnare, F. H. Effects of diets of homogenous saturated triglycerides on cholesterol balance in rats. *J. Nutr.* **109**, 2237–2246 (1979).
360. Zhao, J. *et al.* A comprehensive metabolomics investigation of hippocampus, serum, and feces affected by chronic fluoxetine treatment using the chronic unpredictable mild stress mouse model of depression. *Sci. Rep.* **9**, 11 (2019).
361. Chakravarty, S. *et al.* Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. *PLoS One* **8**, e63302 (2013).
362. Billelo, J. A. Seeking an objective diagnosis of depression. *Biomark. Med.* **10**, 861–875 (2016).
363. Fox, T. D. Mitochondrial Protein Synthesis, Import, and Assembly. *Genetics* **192**, 1203–1234 (2012).
364. Nijtmans, L. G. *et al.* Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* **19**, 2444–51 (2000).
365. Osman, C., Merkwirth, C. & Langer, T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J. Cell Sci.* **122**, 3823–3830 (2009).
366. Mairesse, J. *et al.* Proteomic characterization in the hippocampus of prenatally stressed rats. *J. Proteomics* **75**, 1764–1770 (2012).
367. Araújo, W. L., Martins, A. O., Fernie, A. R. & Tohge, T. 2-oxoglutarate: Linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Front. Plant Sci.* **5**, 1–6 (2014).
368. Martins-de-Souza, D. *et al.* Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in post-mortem brains from major depression patients. *Transl. Psychiatry* **2**, e87 (2012).
369. Carboni, L. *et al.* Proteomic analysis of rat hippocampus and frontal cortex after chronic

- treatment with fluoxetine or putative novel antidepressants: CRF1 and NK1 receptor antagonists. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **16**, 521–537 (2006).
370. Castré, E. & Hen, R. Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci.* **36**, 259–267 (2013).
371. Bianchi, M. *et al.* Fluoxetine administration modulates the cytoskeletal microtubular system in the rat hippocampus. *Synapse* **63**, 359–364 (2009).
372. Ohira, K. *et al.* A truncated tropo-myosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor. *J. Neurosci.* **25**, 1343–1353 (2005).
373. Dovas, A. & Couchman, J. R. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* **390**, 1–9 (2005).
374. Bem, D. *et al.* Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 499–507 (2011).
375. Rocca, D. L. *et al.* The Small GTPase Arf1 Modulates Arp2/3-Mediated Actin Polymerization via PICK1 to Regulate Synaptic Plasticity. *Neuron* **79**, 293–307 (2013).
376. John, S., Weiss, J. N. & Ribalet, B. Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS One* **6**, e17674 (2011).
377. Regenold, W. T. *et al.* Mitochondrial detachment of hexokinase 1 in mood and psychotic disorders: Implications for brain energy metabolism and neurotrophic signaling. *J. Psychiatr. Res.* **46**, 95–104 (2012).
378. Khawaja, X., Xu, J., Liang, J.-J. & Barrett, J. E. Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: Implications for depressive disorders and future therapies. *J. Neurosci. Res.* **75**, 451–460 (2004).
379. de Oliveira, M. R. Fluoxetine and the mitochondria: A review of the toxicological aspects. *Toxicol. Lett.* **258**, 185–191 (2016).
380. Scaini, G. *et al.* Activity of mitochondrial respiratory chain is increased by chronic administration of antidepressants. *Acta Neuropsychiatr.* **23**, 112–118 (2011).
381. Villa, R. F. *et al.* Mitochondrial energy metabolism of rat hippocampus after treatment with the antidepressants desipramine and fluoxetine. *Neuropharmacology* **121**, 30–38 (2017).
382. Nahon, E., Israelson, A., Abu-Hamad, S. & Shoshan-Barmatz, V. Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death. *FEBS Lett.* **579**, 5105–5110 (2005).

383. Shoshan-Barmatz, V. *et al.* VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects Med.* **31**, 227–285 (2010).
384. Agostinho, F. R. *et al.* Treatment with olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in rat brain. *Neurosci. Lett.* **487**, 278–281 (2011).
385. Block, W. *et al.* Proton MR spectroscopy of the hippocampus at 3 T in patients with unipolar major depressive disorder: correlates and predictors of treatment response. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **12**, 415–422 (2009).
386. Grønli, J. *et al.* Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. *Behav. Brain Res.* **181**, 42–51 (2007).
387. Zhao, L. *et al.* Metabonomic evaluation of chronic unpredictable mild stress-induced changes in rats by intervention of fluoxetine by HILIC-UHPLC/MS. *PLoS One* **10**, 1–13 (2015).
388. Trouvin, J. H., Gardier, A. M., Chanut, E., Pages, N. & Jacquot, C. Time course of brain serotonin metabolism after cessation of long-term fluoxetine treatment in the rat. *Life Sci.* **52**, PL187-92 (1993).
389. Perić, I., Lješević, M., Beškoski, V., Nikolić, M. & Filipović, D. Metabolomic profiling relates tianeptine effectiveness with hippocampal GABA, myo-inositol, cholesterol, and fatty acid metabolism restoration in socially isolated rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **Accepted for publication**, (2022).
390. Della, F. P. *et al.* Tianeptine treatment induces antidepressive-like effects and alters BDNF and energy metabolism in the brain of rats. *Behav. Brain Res.* **233**, 526–535 (2012).
391. Czéh, B. *et al.* Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12796–801 (2001).
392. Björkhem, I. Crossing the barrier: Oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* **260**, 493–508 (2006).
393. Casarotto, P. C. *et al.* Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell* **184**, 1299–1313 (2021).
394. Ikonen, E. Mechanisms of cellular cholesterol compartmentalization: recent insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* **53**, 77–83 (2018).

395. Tabrizi, R. *et al.* The effects of inositol supplementation on lipid profiles among patients with metabolic diseases: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis.* **17**, 1–11 (2018).
396. Hu, H. *et al.* The major cholesterol metabolite cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol functions as an endogenous neuroprotectant. *J. Neurosci.* **34**, 11426–11438 (2014).
397. Kurth, M. *et al.* Cholesterol Localization around the Metabotropic Glutamate Receptor 2. *J. Phys. Chem. B* **124**, 9061–9078 (2020).
398. Riske, L., Thomas, R. K., Baker, G. B. & Dursun, S. M. Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **7**, 85–89 (2017).
399. Banasr, M. *et al.* Glial pathology in an animal model of depression: Reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol. Psychiatry* **15**, 501–511 (2010).
400. Webhofer, C. *et al.* Metabolite profiling of antidepressant drug action reveals novel drug targets beyond monoamine elevation. *Transl. Psychiatry* **1**, e58 (2011).
401. Eroglu, C. *et al.* Astrocyte morphogenesis is dependent on BDNF signaling via astrocytic TrkB.T1. *Elife* **8**, 1–27 (2019).
402. Akimoto, H., Oshima, S., Sugiyama, T., Negishi, A. & Nemoto, T. Changes in brain metabolites related to stress resilience : Metabolomic analysis of the hippocampus in a rat model of depression. *Behav. Brain Res.* **359**, 342–352 (2019).
403. Wang, J. *et al.* Hippocampal PGC-1 $\alpha$ -mediated positive effects on parvalbumin interneurons are required for the antidepressant effects of running exercise. *Transl. Psychiatry* **11**, 1–11 (2021).
404. Zhou, J. *et al.* The interplay of BDNF-TrkB with NMDA receptor in propofol-induced cognition dysfunction. *BMC Anesthesiol.* **18**, 1–8 (2018).
405. Talebian, A., Robinson-Brookes, K. & Meakin, S. O. TrkB Regulates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling by Uncoupling and Recruiting the Brain-Specific Guanine Nucleotide Exchange Factor, RasGrf1. *J. Mol. Neurosci.* **67**, 97–110 (2019).
406. Bisgaard, C. F. *et al.* Vesicular signalling and immune modulation as hedonic fingerprints: Proteomic profiling in the chronic mild stress depression model. *J. Psychopharmacol.* **26**, 1569–1583 (2012).



407. Kumar, A. & Bachhawat, A. K. Pyroglutamic acid: Throwing light on a lightly studied metabolite. *Curr. Sci.* **102**, 288–297 (2012).
408. Suzuki, H. *et al.* Intake of Seven Essential Amino Acids Improves Cognitive Function and Psychological and Social Function in Middle-Aged and Older Adults: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Front. Nutr.* **7**, (2020).
409. Satake, S., Saitow, F., Rusakov, D. & Konishi, S. AMPA receptor-mediated presynaptic inhibition at cerebellar GABAergic synapses: A characterization of molecular mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2464–2474 (2004).
410. Liao, Y. *et al.* Efficacy of omega-3 PUFAs in depression: A meta-analysis. *Transl. Psychiatry* **9**, 1–9 (2019).
411. Pan, A. N. *et al.* Bidirectional Association Between Depression and Metabolic Syndrome A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Diabetes Care* **35**, 1171–1180 (2012).
412. Sonei, N. *et al.* Mitochondrial dysfunction bridges negative affective disorders and cardiomyopathy in socially isolated rats: Pros and cons of fluoxetine. *World J. Biol. Psychiatry* 1–15 (2016) doi:10.3109/15622975.2016.1149218.
413. Shao, W. *et al.* Combined Metabolomics and Proteomics Analysis of Major Depression in an Animal Model: Perturbed Energy Metabolism in the Chronic Mild Stressed Rat Cerebellum. *OMICS* **19**, 383–92 (2015).
414. Skynner, H. A. *et al.* Proteomic analysis identifies alterations in cellular morphology and cell death pathways in mouse brain after chronic corticosterone treatment. *Brain Res.* **1102**, 12–26 (2006).
415. Harwood, A. J. Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol. Psychiatry* **10**, 117–126 (2005).
416. Hertz, L., Rothman, D. L., Li, B. & Peng, L. Chronic SSRI stimulation of astrocytic 5-HT<sub>2B</sub> receptors change multiple gene expressions/editings and metabolism of glutamate, glucose and glycogen: a potential paradigm shift. *Front. Behav. Neurosci.* **9**, 1–17 (2015).
417. Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Zielińska, M. & Albrecht, J. NMDA receptors in astrocytes: In search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 309 (2019).
418. Letellier, M. *et al.* Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in

- hippocampal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E2685–E2694 (2016).
419. Banasr, M. *et al.* Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry.* **15**, 501–511 (2010).

Ivana Perić je rođena 5. jula 1989. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu „Vuk Karadžić“ i gimnaziju „Filip Višnjić“ završila je u Bijeljini. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, odsek Biohemija, upisala je 2007. godine. Diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,52. Iste godine upisuje master studije na studijskom programu Biohemija, koje završava odbranom master rada 2014. godine sa prosečnom ocenom 10. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu upisuje školske 2014/15. godine na studijskom programu Biohemija.

Od jula 2015. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, u okviru projekta: „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara“ (broj projekta 173044), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Decembra 2017. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik. Od januara 2020. godine angažovana je u okviru programa „Životna sredina i zdravlje“ Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, na temi: „Stres, mentalni poremećaji i efekat farmakoloških supstanci“ (0902103). Član je „Biohemijskog društva Srbije“ od 2014. godine, kao i „Društva za neuronauke Srbije“.

Ivana Perić je koautor petnaest naučnih radova publikovanih u međunarodnim časopisima kategorija M21a, M21 i M22, od čega na osam kao prvi autor, kao i koautor tri saopštenja štampana u celini i sedam saopštenja štampanih u izvodima na skupovima međunarodnog značaja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ивана Перић  
Број индекса ДБ07/2014

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Протеомски и метаболомски увид у биохемијске основе депресије и деловање антидепресива на животињском моделу депресије

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

У Београду, 19.08.2022. god.

Потпис аутора



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

Име и презиме аутора: Ивана Перић

Број индекса: ДБ07/2014

Студијски програм: доктор биохемијских наука

Наслов рада: Протеомски и метаболомски увид у биохемијске основе депресије и деловање антидепресина на животињском моделу

Ментори: др Милан Николић, др Драгана Филиповић

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 19.08.2022. год.

**Потпис аутора**



### Изјава о коришћењу

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

Протеомски и метаболомски увид у биохемијске основе депресије и деловање антидепресива на животињском моделу депресије

која је моје ауторско дело.

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

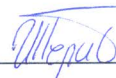
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 19.08.2022. год.

**Потпис аутора**



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