

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**BIOLOŠKI FAKULTET**

**Jelena B. Đorđević**

**UTICAJ HRONIČNE SOCIJALNE  
IZOLACIJE NA MEHANIZAM  
ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U  
MOZGU I JETRI MUŽJAKA PACOVA  
WISTAR SOJA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF BIOLOGY**

**Jelena B. Dorđević**

**THE EFFECT OF CHRONIC SOCIAL  
ISOLATION ON ANTIOXIDANT  
DEFENSE MECHANISM IN BRAIN  
AND LIVER OF MALE WISTAR RATS**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2013**

Mentori: dr Marija Radojčić, naučni savetnik,  
Institut za nuklearne nauke „VINČA“, Beograd

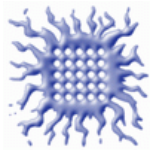
dr Gordana Matić, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije: dr Gordana Matić, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Marija Radojčić, naučni savetnik,  
Institut za nuklearne nauke „VINČA“, Beograd

dr Mihajlo Spasić, redovni profesor,  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:



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

*Zahvaljujem mentoru, dr Mariji Radojčić, na ukazanom poverenju i razumevanju, kao i na dragocenoj pomoći u eksperimentalnom radu, u diskusiji rezultata i u svim fazama izrade ove disertacije.*

*Zahvaljujem prof. dr Gordani Matić na svim korisnim sugestijama i podršci tokom pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem prof. dr Mihajlu Spasiću za stručnu pomoć iz oblasti oksidativnog stresa.*

*Dragoj prijateljici i kolegini dr Ani Đorđević želim da zahvalim na divnom prijateljstvu i neprocenjivoj pomoći u izradi ove disertacije i pisanju radova.*

*Svojim kolegama dr Miroslavu Adžiću, Ivi Lukić, Nataliji Božović i Milošu Mitiću dugujem zahvalnost za pomoć i podršku u svakodnevnom radu.*

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

*Mojim momcima, Vladanu i Petru, posvećujem ovu tezu.*

## Rezime

### Uticaj hronične socijalne izolacije na mehanizam antioksidativne zaštite u mozgu i jetri mužjaka pacova Wistar soja

Smatra se da je hronični stres jedan od glavnih etioloških faktora u razvoju psihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti, a mnogi naučnici tvrde da se u osnovi ovih bolesti nalazi i narušena redoks ravnoteža. Odgovor organizma na stres započinje aktivacijom i oslobađanjem glukokortikoidnih hormona koji deluju na limbičke strukture mozga neophodne za adaptaciju, hipokampus i prefrontalni korteks. Jedna od funkcija glukokortikoida jeste i da obezbedi brzu mobilizaciju energetske rezerve, jer organizam u stanju stresa ima neposrednu potrebu za energijom. Ovi hormoni povećavaju nivo šećera u krvi, dok u jetri indukuju glukoneogenezu i povećavaju količinu glikogena. U literaturi je poznato da glukokortikoidi povećavaju proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta i da mogu da naruše ravnotežu između nastanka oksidanata i antioksidativne zaštite, što može da dovede do stanja oksidativnog stresa. Za uspešnu adaptaciju na stres, između ostalog, neophodan je adekvatan antioksidativni odgovor, koji uključuje izmenjenu ekspresiju čitavog skupa gena i proteina.

Uzimajući u obzir navedene podatke, ispitivali smo promene u proteinskoj ekspresiji redoks senzitivnog transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora proteina Keap1, kao i promene na nivou ekspresije gena regulisanih Nrf2-om, u hipokampusu i prefrontalnom korteksu mužjaka stresiranih pacova Wistar soja. Takođe smo ispitivali promene u nivou proteina antioksidativne zaštite (superoksid dismutaza, katalaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze) i njihovoj enzimskoj aktivnosti u ovim moždanim strukturama. U jetri smo ispitivali da li relativni odnos između transkripcionih faktora osetljivih na stres, GR i NFκB, može uticati na odgovor antioksidativne zaštite u datim uslovima.

U uslovima snižene koncentracije glukokortikoida i snižene koncentracije glukoze u krvi, opisanim u hroničnoj socijalnoj izolaciji, u jetri je došlo do narušavanja ravnoteže u antioksidativnoj zaštiti, što za posledicu ima akumulaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i stvaranje prooksidativnog stanja. U hipokampusu je izmerena smanjena

aktivnost glutation peroksidaze, kao i smanjena jedarna aktivnost Nrf2, što znači da je hronični stres smanjio antioksidativni kapacitet ove moždane strukture i učinio je osetljivom na naknadna oksidativna oštećenja. U prefrontalnom korteksu je došlo do aktiviranja antioksidativne zaštite, usled povećanih energetske zahteva i povećane produkcije ROS-a u ovim uslovima. Adaptivni antioksidativni odgovor na naknadni akutni stresor izostao je u obe moždane strukture hronično stresiranih životinja. Različiti antioksidativni odgovori u hipokampusu i prefrontalnom korteksu u uslovima hroničnog stresa može biti jedna od funkcionalnih razlika između ove dve moždane strukture kao i pokazatelj njihove različite osetljivosti na oksidativni stres. Ovakvi uslovi mogu ugroziti mogućnost interakcije i uspešnog adaptivnog odgovora hipokampusa i prefrontalnog korteksa na stres, što se ogleda i u izmenjenom ponašanju životinja, a što preneto u oblast biomedicine može objasniti potencijalne uslove za razvoj psihijatrijskih oboljenja izazvanih stresom.

**Ključne reči:** hronični stres, hipokampus, prefrontalni korteks, jetra, oksidativni stres, antioksidativna zaštita, ponašanje

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Neurobiologija

**UDK broj:** 591.51:[57.048+57.043]:591.481:57.052(043.3)

## Abstract

### **The effect of chronic social isolation on antioxidant defense mechanism in brain and liver of male Wistar rats**

Chronic neuroendocrine stress has been considered as an etiological factor for the onset and exacerbation of many psychiatric and neurodegenerative disorders, with redox imbalance underlying pathogenic mechanisms for many of these disorders. Stress response begins with the activation and release of glucocorticoid hormones which affect limbic brain regions important for adaptation, such as hippocampus and prefrontal cortex. One of the functions of the glucocorticoids is to provide fast energy mobilization, because when in stress, organism has increased energy demands. These hormones increase blood sugar level, while in liver they induce gluconeogenesis and increase the level of glycogen. It is well known that glucocorticoids increase the production of reactive oxygen species, and they can also disturb the balance between the production of oxidants and the activity of antioxidant systems, leading to state of oxidative stress. Successful adaptation to stress requires adequate antioxidant response, which includes altered expression of whole array of genes and proteins.

Taking into account that chronic social isolation may compromise the redox balance, we measured cellular distribution of redox sensitive Nrf2/Keap1 system and the expression of genes regulated by Nrf2 in hippocampus and prefrontal cortex of chronically stressed male Wistar rats. We also measured protein level and enzymatic activity of antioxidant enzymes (SODs, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) in these brain structures. In liver, we wanted to determine whether alterations in protein level of transcription factors sensitive to stress, glucocorticoid receptor and nuclear factor kappa B, could affect protein level/activity of liver antioxidant enzymes.

When glucocorticoid levels were low, as found in chronic social isolation, the antioxidant defense system in the liver was not synchronized, leading to the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In hippocampus we detected decreased activity of GPx, while Nrf2 was not efficiently translocated to the nucleus, indicating poor antioxidant capacity of this brain region for the upcoming oxidative insults. In

prefrontal cortex antioxidant defense system was activated in response to chronic stress, implying high energy demands and increased ROS production. Adaptive antioxidant response to subsequent acute stress was missing in both brain structures of chronically stressed rats. Different antioxidant response of hippocampus and prefrontal cortex under chronic stress could be one of the functional differences between these two brain structures, and it can serve as an indicator of their different susceptibility to oxidative stress. Such conditions may compromise the interaction between hippocampus and prefrontal cortex, and successful adaptive stress response, leading to altered behavior, which in the field of biomedicine could explain possible development of psychiatric stress-related disorders.

Keywords: chronic stress, hippocampus, prefrontal cortex, liver, oxidative stress, antioxidant defense, behavior

**Research area:** Biology

**Research field:** Neurobiology

**UDC number:** 591.51:[57.048+57.043]:591.481:57.052(043.3)



## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Stres i reakcija organizma na stres .....	2
1.2. Tipovi stresora .....	5
1.2.1. Akutna imobilizacija – paradigma normalnog odgovora na stres .....	5
1.2.2. Hronična socijalna izolacija – model za proučavanje poremećaja raspoloženja .....	6
1.3. Stres i ponašanje .....	8
1.4. Centralni nervni sistem i stres .....	12
1.4.1. Hipokampus .....	13
1.4.2. Prefrontalni korteks .....	14
1.5. Hormoni i signalni putevi stresa .....	15
1.5.1. Hipotalamo-hipofizno-adrenalni sistem .....	16
1.5.2. Struktura i molekularni mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona .....	18
1.6. Izvori oksidativnog stresa tokom neuroendokrinog disbalansa u CNS-u .....	23
1.7. Jetra - glavni anabolički organ u stresu .....	25
1.8. Redoks ravnoteža i oksidativni stres .....	27
1.8.1. Reaktivne kiseonične vrste .....	27
1.8.2. Redoks senzitivni transkripcioni faktori .....	30
1.8.2.1. Nuklearni faktor kappa B u odgovoru na stres .....	31
1.8.2.2. Nrf2/Keap1 sistem u odgovoru na stres .....	34
1.8.3. Antioksidativna zaštita .....	41
1.8.3.1. Superoksid dismutaze .....	41
1.8.3.2. Katalaza .....	45
1.8.3.3. Glutation peroksidaza i glutacion reduktaza .....	46
2. Cilj rada .....	50
3. Materijal i metode .....	52
3.1. Materijal .....	53
3.2. Metode .....	54
3.2.1. Gajenje eksperimentalnih životinja .....	54
3.2.2. Tretman eksperimentalnih životinja .....	55
3.2.3. Testovi ponašanja .....	56

3.2.3.1. Test izdignutog plus lavirinta .....	56
3.2.3.2. Test forsiranog plivanja .....	57
3.2.4. Priprema tkiva i seruma .....	59
3.2.5. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu i glukoze u krvi .....	59
3.2.6. Izolovanje proteina i priprema citosolnih, jedarnih, mitohondrijalnih i peroksizomalnih frakcija moždanih struktura.....	60
3.2.7. Izolovanje proteina i priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta jetre.....	61
3.2.8. Određivanje koncentracije proteina .....	61
3.2.9. Elektroforeza na SDS poliakrilamidnom gelu .....	62
3.2.10. Detekcija proteina metodom „Western blot“-a .....	63
3.2.11. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza .....	65
3.2.12. Određivanje aktivnosti katalaze .....	66
3.2.13. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze .....	67
3.2.14. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze.....	67
3.2.15. Izolacija ukupne ćelijske RNK .....	68
3.2.16. Reverzna transkripcija .....	69
3.2.17. Kvantitativni PCR .....	69
3.2.18. Statistička obrada rezultata .....	70
4. Rezultati.....	72
4.1. Fiziološki parametri u krvi mužjaka Wistar pacova .....	73
4.1.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na koncentraciju kortikosterona u serumu.....	73
4.1.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na koncentraciju glukoze u krvi.....	74
4.2. Promene u ponašanju stresiranih mužjaka Wistar pacova .....	75
4.2.1. Efekat hronične socijalne izolacije na ponašanje životinja u testu izdignutog “plus” lavirinta.....	75
4.2.2. Efekat hronične socijalne izolacije na ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja .....	76
4.3. Promene u hipokampusu stresiranih mužjaka Wistar pacova.....	77
4.3.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo i aktivnost antioksidativnih enzima: MnSOD, CuZnSOD, katalaze, GPx i GLR .....	77
4.3.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na subćelijsku raspodelu transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i na njihov relativni odnos.....	81

4.3.3. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na ekspresiju gena za glutamat cistein ligazu, glutation S transferazu i glutation reduktazu .....	83
4.3.4. Subćelijska raspodela transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i njihov relativni odnos tokom trajanja akutnog stresa .....	85
4.4. Promene u prefrontalnom korteksu stresiranih mužjaka Wistar pacova .....	87
4.4.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo i aktivnost antioksidativnih enzima: MnSOD, CuZnSOD, katalaze, GPx i GLR .....	87
4.4.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na subćelijsku raspodelu transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i njihov relativni odnos.....	91
4.4.3. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na ekspresiju gena za glutamat cistein ligazu, glutation S transferazu i glutation reduktazu .....	93
4.4.4. Subćelijska raspodela transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i njihov relativni odnos tokom trajanja akutnog stresa .....	94
4.5. Promene u jetri stresiranih mužjaka Wistar pacova .....	97
4.5.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo transkripcionih faktora, NFkB i GR, i Hsp proteina.....	97
4.5.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo i aktivnost antioksidativnih enzima: MnSOD, CuZnSOD, katalaze, GPx i GLR .....	99
5. Diskusija.....	102
5.1. Hronična socijalna izolacija izaziva promene u ponašanju životinja u pravcu anksioznosti i depresije .....	105
5.2. Hronična socijalna izolacija smanjuje aktivnost peroksidaznih enzima u hipokampusu Wistar mužjaka .....	107
5.3. Hronična socijalna izolacija aktivira antioksidativnu zaštitu u prefrontalnom korteksu Wistar mužjaka.....	113
5.4. Hronična socijalna izolacija menja odgovor antioksidativne zaštite na naknadni akutni stresor u jetri Wistar mužjaka .....	117
6. Zaključci.....	121
7. Literatura.....	124
Biografija autora.....	147
Prilozi.....	148

## SKRAĆENICE:

ACTH	- adrenokortikotropni hormon (eng. <i>adrenocorticotropic hormone</i> )
ALT	- alanin aminotransferaza
ANOVA	- analiza varijanse (eng. <i>analysis of variance</i> )
AOS	- antioksidativni zaštitni sistem (eng. <i>antioxidant system</i> )
AP-1	- aktivacioni protein-1
ARE	- cis-vezana sekvenca DNK regulisana antioksidantima (eng. <i>antioxidant response element</i> )
ATP	- adenzin tri fosfat
BSA	- goveđi serum albumin (eng. <i>bovine serum albumin</i> )
BTB	- domen „cigla na ciglu“ (eng. <i>bric-a-brac</i> )
CNS	- centralni nervni sistem
CRF	- kortikotropin oslobađajući faktor (eng. <i>corticotropin releasing factor</i> )
CuZnSOD	- bakar cink superoksid dismutaza
DBD	- DNK vezujući domen (eng. <i>DNA binding domain</i> )
DEPC	- dietilpirokarbonat
DGR	- poznatiji kao Kelch domen
DLG	- vezujuće mesto slabog afiniteta
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTT	-ditiotreitol
EAAC1	- ekscitatorni aminokiselinski nosač 1 (eng. <i>excitatory amino acid carrier 1</i> )
ECL	- pojačana hemiluminescencija (eng. <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	- etilendiaminotetrasirćetna kiselina
ELISA	- enzimski imuno esej (eng. <i>enzyme-linked immunoadsorbent assay</i> )
EPM	- test izdignutog plus lavirinta (eng. <i>elevated plus maze</i> )
ETGE	- vezujuće mesto visokog afiniteta
FAD	- flavin adenin dinukleotid
FST	- test forsiranog plivanja (eng. <i>forced swimming test</i> )
GCL	- g-glutamilcistein sintaza

Gclm	- gen za glutamat cistein ligazu
GLR	- glutation reduktaza ( <i>glucocorticoid responsive element</i> )
GPx	- glutation peroksidaza
GR	- glukokortikoidni receptor
GRE	- regulatorna sekvenca DNK regulisana glukokortikoidima (eng.
GS	- glutation sintaza
GSH	- redukovani glutation
Gsr	- gen za glutation reduktazu
GSSG	- oksidovani glutation
GST	- glutation S-transferaza
Gsta 3	- gen za glutation S transferazu
Hif-1	-faktor indukovan hipoksijom ( <i>eng. hypoxia-inducibile factor</i> )
HNE	- 4-hidroksi-2,3-nonenal
HPA	- hipotalamo-hipofizno-adrenalni( <i>eng. hypotalamic-pituitary-adrenal</i> )
HRP	- peroksidaza iz rena ( <i>eng. horseradosh peroxidase</i> )
HSP	- proteini toplotnog šoka ( <i>eng. heat shock proteins</i> )
IL-1	- interleukin-1
iRNK	- informativna RNK
IVR	- <i>eng. intervening region</i>
JNK	- c-Jun-N-terminalna kinaza
Keap1	- Kelch ECH vezani protein 1 ( <i>eng. Kelch ECH associated protein 1</i> )
LBD	- ligand vezujući domen ( <i>eng. ligand binding domain</i> )
MAO	- monoamino-oksidaza
MAP kinaza	- mitogen-aktivirana protein kinaza
MnSOD	- mangan superoksid dismutaza
NADPH	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
Neh	- Nrf2-ECH homolozi
NES	- jedarni eksportni signal ( <i>nuclear export signal, NES</i> )
NFκB	- nuklearni faktor <i>kappa B</i>
NKT	-prirodne ćelije ubice ( <i>eng. natural killer cells</i> )
NLS	- signal za jedarnu lokalizaciju ( <i>eng. nuclear localization signal</i> )

Nrf2	- nuklearni faktor eritroid 2 vezani faktor 2 (engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
OD	- optička gustina (eng. <i>optical density</i> )
PAG	- poliakrilamid gel
PCR	- lančana reakcija polimeraze (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
PFC	- prefrontalni korteks
PI3K	- fosfatidilinizitol 3 kinaza
PKB	- protein kinaza B
PMSF	- fenilmetilsulfonil fluorid
PVDF	- poliviniliden fluorid
RNK	- ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	- reaktivne vrste kiseonika (eng. <i>reactive oxygen species</i> )
RTqPCR	- kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. real time quantitative PCR)
SAM	- simpato-adreno-medularni
SDS	- natrijum dodecil sulfat
SEM	- standardna greška srednje vrednosti (eng. <i>standard error of mean</i> )
SLASA	- srpsko udruženje za korišćenje životinja u nauci i obrazovanju (eng. <i>Serbian Laboratory Animal Science Association</i> )
SNS	- simpatički nervni sistem
SOD	- superoksid dismutaza
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin
TMB	- tetrametilbenzidin
TNF	- faktor nekroze tumora (eng. <i>tumor necrosis factor</i> )

# **1. Uvod**

## 1.1. Stres i reakcija organizma na stres

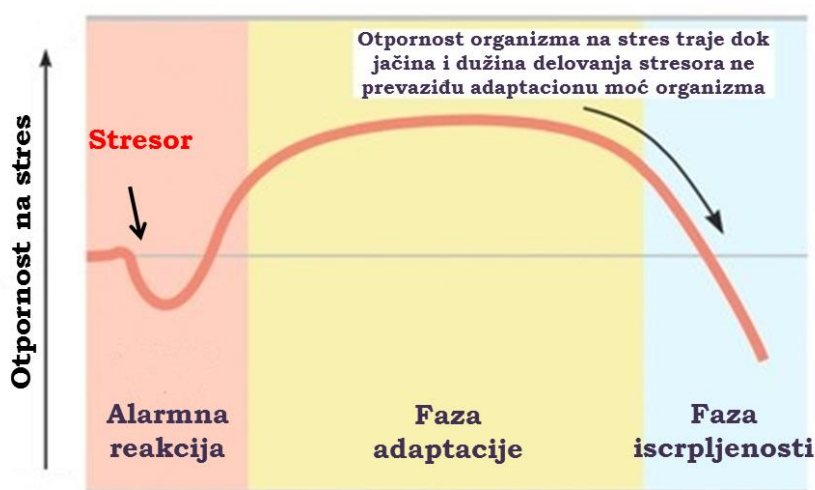
Svaki od faktora sredine, ukoliko je prekomeran po intezitetu i po trajanju, može da deluje stresogeno na živi organizam. Stresnim stanjem ili stresom nazivamo izmenjeno ravnotežno stanje fizioloških procesa. Stabilnost unutrašnje sredine, integracija organizma i adekvatno reagovanje na promene u spoljašnoj sredini se postižu prvenstveno regulatornom aktivnošću nervnog, endokrinog i imunskog sistema koja je poznata i kao odgovor na stres (Chrousos i Gold, 1992; Pacak i Palkovits, 2001).

Još 1878. godine Klod Bernard je prvi opisao aktivnosti organizma u cilju očuvanja unutrašnje stabilnosti pod uticajem različitih činilaca koji deluju iz spoljašne sredine. Prvi koncept i odgovarajuće definicije stresa je prvi izneo Volter Kenon 1914. godine, a nešto kasnije, 1936. godine i Hans Selye. Ovi istraživači su otkrili da dugotrajno delovanje negativnih stimulusa kao što su bol, glad, žeđ, nepovoljni klimatski uslovi, kao i delovanje drugih štetnih činilaca prouzrokuje promene fizioloških parametara u organizmu koje mogu da dovedu do poremećaja homeostaze i potencijalno do razvoja patoloških stanja.

Hans Selye je prvi uveo originalni koncept stresa, definišući stres kao nespecifični odgovor organizma na izmenjene uslove sredine, a stresor kao stimulus koji izaziva stres. Nespecifičan odgovor na stresor Selye je definisao kao generalni adaptacioni sindrom, koji čine tri sukcesivne faze (Slika 1). Prvi, akutni stadijum fiziološkog odgovora organizma čini kratkotrajna i brza **alarmna reakcija „bori se ili beži“**, kada telo mobilise svoje energetske rezerve da bi se suočilo sa opasnošću, i kada se aktivira hipotalamo-hipofizno-adrenalni (HPA, eng. hypothalamic-pituitary-adrenal) sistem, simpatički nervni sistem (SNS), nadbubrežne žlezde, i kardiovaskularni i respiratorni sistem. Istovremeno se obustavlja sekrecija anaboličkih hormona, kao što je npr. insulin. Organizam daje prednost aktivnostima koje mu omogućavaju opstanak (povećan kardiovaskularni ton, nivo respiracije i metabolizma), u odnosu na svoje druge potrebe (ishrana, digestija, rast, reprodukcija i imunitet) (Sapolsky i saradnici, 2000). Zato, tokom alarmne reakcije opada produktivnost i rezistentnost na infekcije. Ako stresor duže



deluje na organizam, tada alarmna reakcija prelazi u **fazu adaptacije**. U ovoj fazi organizam pokušava da se prilagodi uticaju negativnog stimulusa. Sekretacija adrenalnih hormona je i dalje u porastu, kako bi raspoložive energetske rezerve uvek bile dostupne, ali ako stresor nije jakog intenziteta, tada se nivo hormona nadbubrežne žlezde ipak može vratiti u fiziološke granice. U ovoj fazi je rezistencija na bolesti uglavnom normalna. Takođe postoje i dokazi da stresori srednje jačine, na čije delovanje životinja uspe da se adaptira, omogućavaju kasnije životinji da se lakše prilagodi delovanju stresora jačeg intenziteta. Međutim, ako jačina i dužina delovanja stresora prevaziđu adaptacionu moć organizma, tj. ako metaboličko i fiziološko reorganizovanje budu takvog stepena da idu na štetu organizma, dolazi do **faze iscrpljenosti**. U ovoj fazi, pored podložnosti infekcijama, česte su metaboličke bolesti i poremećaji u ponašanju, a moguća je čak i smrt organizma. Neke od patoloških promena koje nastaju kao posledica dugotrajnog delovanja stresora su hipertrofija nadbubrežnih žlezda, atrofija timo-limfatičnog sistema i gastrična ulceracija.



Slika 1. Generalni adaptacioni sindrom - faze odgovora na stres

Jedna od važnih karakteristika uspešnog suočavanja sa stresom je da se fiziološki sistemi ne samo efikasno uključe onda kada su potrebni, nego i da se isključe nakon delovanja stresora. Zbog toga, ako se neuroendokrini sistem nedovoljno brzo mobilizuje, ili se nedovoljno brzo isključuje posle delovanja stresora, povišeni nivoi hormona mogu postati opasni za organizam, i mogu

dovesti do niza bolesti izazvanih stresom, kao što su hipertenzija, moždani udar, dijabetes, gojaznost, autoimuna i inflamatorna oboljenja (McEwen, 1998).

U današnje vreme stresu se pridaje sve veći značaj. Stres je pojam koji se prilično često koristi, ali ga je zbog kompleksnosti i sve teže u potpunosti definisati. Obično se opisuje kao negativan osećaj koji može imati uticaj na pojavu psihosomatskih poremećaja, povećane sklonosti ka infekcijama, kao i činilac koji narušava dobrobit i prouzrokuje patnju organizma, mentalno i fizičko zdravlje, ali je nejasno šta tačno definiše stres, odnosno da li je stres uzrok, posledica ili oboje. Stres je prirodna pojava, često se pojavljuje u modernom životu, ali ne označava samo negativno iskustvo. Richard Lazarus je 1974. godine objavio model kojim je stres podelio na eustres i distres, gde se eustresom smatra stres koji ima pozitivne efekte na individuu, dok distres ima negativni efekat. Drugi istraživači smatraju da je nepotrebna podela stresora na dobre i loše, jer svaki stresor, koji deluje često i dugo može imati štetne posledice za organizam. Sposobnost organizma da se prilagodi i funkcioniše na novom nivou kako bi odgovorio promenjenim zahtevima spoljašnje ili unutrašnje sredine i omogućio opstanak naziva se alostatički odgovor. Kada se uslovi sredine menjaju, vraćanje u ravnotežu tj. održavanje homeostaze može biti problematično. Simptomi stresa su drugačiji kod svake jedinke. Neki uobičajeni telesni simptomi mogu da uključe poremećaje spavanja, uznemirenost, promene u raspoloženju, napetost mišića, promene u prehranbenim navikama, probavne smetnje, gubitak energije i umor. Naravno, nijedan od ovih simptoma ne mora nužno označavati stres, već mogu biti prouzrokovani drugim zdravstvenim ili psihološkim stanjima.

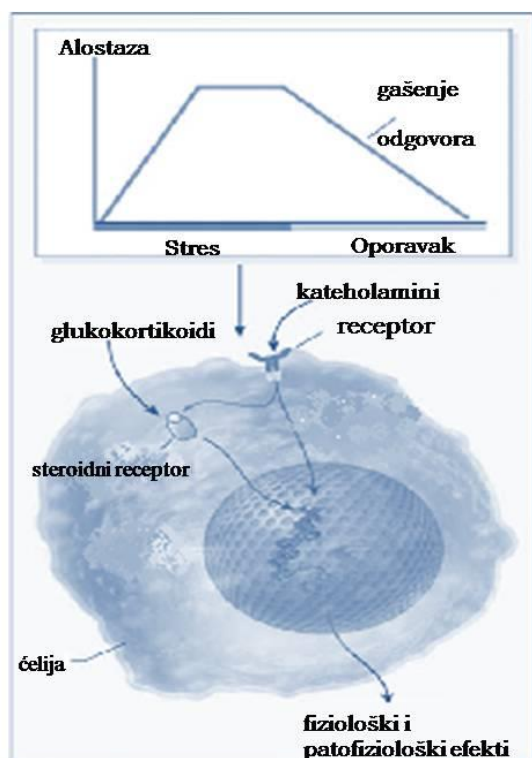
Danas termin "stres" ima mnogo šire značenje i definiše se kao pokušaj organizma da se prilagodi na uslove života, pri čemu u ovoj adaptaciji angažuje svoje fiziološke kapacitete kao i kapacitete unutar svih oblika ponašanja. Drugačije rečeno, stres označava pokušaj organizma da fiziološke funkcije organizma i svoje ponašanje prilagodi uslovima života. S toga se stres po najnovijem shvatanju može šire definisati kao kompleks reakcija od momenta delovanja stresora na organizam, preko pokušaja organizma da savlada delovanje stresora ili da mu se prilagodi do konačnog ishoda.

## 1.2. Tipovi stresora

U odnosu na vremenski aspekt stresnog odgovora može se uočiti razlika u delovanju između akutnog (1 sat ili manje), ponavljajućeg (intermitentnog) i hroničnog stresora (koji traje i do nekoliko nedelja). Habitucija na ponovljeni ili hronični stresor je moguća, ali u slučaju da nije uspešna, doći će do prekomernog oslobađanja hormona stresa što može dovesti do patofizioloških promena. Takođe, fiziološke reakcije na neki stresor nisu generalne, već variraju zavisno od tipa stresora i razlika među individuama. Svaki stresor može izazvati različite neurološke, endokrine i metaboličke promene, kao i promene u ponašanju. Različiti stresori se razlikuju i po intenzitetu koji se određuje na osnovu nivoa oslobođenih hormona stresa (Baldi i Bucherelli, 2005).

### 1.2.1. Akutna imobilizacija – paradigma normalnog odgovora na stres

Akutni stresori su vremenski ograničeni događaji koji mogu biti fizičke,



Slika 2. Alostatički odgovor tokom akutnog stresa: učešće SNS i HPA sistema.

emocionalne ili psihološke prirode, i koji imaju jasno određen početak i kraj. Tokom odgovora na akutni stresor, fiziološki procesi preusmeravaju iskorišćavanje energije između različitih organa i dolazi do mobilizacije energetske rezerve, kako bi organizam bio ponovo spreman za nepredviđene događaje. Povećano snabdevanje organa energijom se postiže aktiviranjem SNS i HPA sistema, oslobađanjem kateholamina i glukokortikoida koji povećavaju glukoneogenezu i glikogenolizu, inhibiraju preuzimanje glukoze i

povećavaju proteolizu i lipolizu (O'Connor i saradnici, 2000). Dolazi do ubrzanog rada srca, pojačanog disanja i povećanja krvnog pritiska. Krv se preusmerava iz ekstremiteta ka velikim mišićima, pripremajući organizam na reakciju. Nakon akutnog stresnog odgovora dolazi do kompletnog oporavka fiziološkog stanja organizma, i rezultat je kompletna adaptacija. Dakle, sistem reaguje na akutni stresor započinjanjem adaptivnog odgovora, održavanjem nivoa adaptivnog odgovora i njegovim gašenjem (Slika 2).

Stres izazvan **imobilizacijom** utiče na nagli porast koncentracije noradrenalina i adrenalina, i definisan je kao intenzivan fizičko-emotivno-psihosocijalni stres (Garcia i saradnici, 2000) i u studijama se koristi kao model normalnog odgovora na stres (McEwen, 1998a). Nivo adrenalina, noradrenalina i adrenokortikotropnog hormona (ACTH) dostiže najveću vrednost u prvih 30 min od početka imobilizacije, da bi se potom smanjio na stabilnu, ali ipak povišenu vrednost. Sa druge strane, nivo kortikosterona dostiže svoju maksimalnu vrednost posle 30 minuta od početka imobilizacije (Kvetnansky i Mikulaj, 1970; Dronjak i saradnici, 2004). Adaptivni odgovor na imobilizaciju, tj. vraćanje nivoa hormona stresa na bazalni nivo se javlja tek nakon 2-3 h od prestanka imobilizacije (Garcia i saradnici, 2000).

U odsustvu stresa kod svih do sada ispitanih sisara je konstatovano da je sekrecija glukokortikoida ograničena na jedan kraći period u toku 24 časa. Tako je kod pacova sekrecija glukokortikoida najniža ujutro, pa se efekti različitih stresora mogu tada najpreciznije studirati (Furay i saradnici, 2006).

### **1.2.2. Hronična socijalna izolacija – model za proučavanje poremećaja raspoloženja**

Dugotrajni stres je jedan od glavnih faktora u nastanku mnogih oboljenja. Hipertenzija, gastritis, hiperinsulinemija, hiperglikemija, kardiovaskularne bolesti i poremećaji raspoloženja, samo su neka od brojnih oboljenja koja se vezuju za stres (Endo i Shiraki, 2000). Zbog toga je veoma važno istražiti efekt dugotrajnog stresa na organizam. Preduslov da bi se uopšte govorilo o dugotrajnom stresu je hronično delovanje stresora koje može trajati tri ili više nedelja. Kada se životinje izlažu

takvom tretmanu može doći do dva ishoda: do navikavanja na delovanje stresora ili do stanja hroničnog stresa. Ove dve mogućnosti se razlikuju i u pogledu bazalnog nivoa glukokortikoida i u pogledu promena do kojih dolazi u ponašanju jedinke. Neke životinje pokazuju generalno promenjeno ponašanje u smislu povećane nesigurnosti (na primer: potrebno im je duže vremena da pronađu izlaz iz novonastale situacije, ili im je smanjena sposobnost istraživanja ako se nađu u novoj i nepoznatoj okolini i sl.). Do navedenih promena ne dolazi kod životinja koje su se uspešno adaptirale na hronično delovanje stresora. Koji će se od ova dva ishoda desiti zavisi od mnogih faktora: genetske predispozicije, ranijeg iskustva jedinke i njene starosti, vrste stresora, intenziteta stimulusa, njegovog trajanja i dr. (Ottenweller i saradnici, 1989). Svaki stresor ima sopstveni neurohemijski „potpis“ sa kvantitativno i kvalitativno različitim centralnim i perifernim putevima regulacije i mehanizmima delovanja (Djordjević i saradnici, 2003) i ovo treba imati u vidu prilikom korišćenja modela hroničnog stresa u analizi poremećaja raspoloženja. Poslednjih godina, razvijeni su životinjski modeli koji se koriste za proučavanje poremećaja raspoloženja kao i efikasnosti terapije koja se koristi u lečenju ovih poremećaja. Naime, hronični stres se koristi za izazivanje i proučavanje promena u centralnom nervnom i neuroendokrinom sistemu koje imaju dosta sličnosti sa promenama koje nastaju u razvoju poremećaja raspoloženja. Među njima, od posebnog su značaja oni sa psihosocijalnom komponentom, jer je poznato da socijalni stres kod životinja dovodi do razvoja simptoma koji dosta podsećaju na one koji su primećeni kod pacijenata koji boluju od depresije. Iako je patofiziologija depresije još uvek nedovoljno razjašnjena, studije su pokazale da deficit u energetsom metabolizmu mozga može igrati bitnu ulogu u razvoju ove bolesti (Harvey, 2008).

**Socijalna izolacija** laboratorijskih životinja je hronični tip stresora definisan kao nedostatak socijalne interakcije između životinja (House, 2001), kada životinja ima normalna auditorna i olfaktorna iskustva, ali nema vizuelne niti taktilne kontakte, odnosno ne može da dotakne ili da bude dotaknuta od strane druge životinje u koloniji (Sanchez i saradnici, 1998). Socijalna sredina je značajan faktor regulacije razvoja limbičkog HPA sistema i verovatno je odgovorna za

individualne razlike u osetljivosti na stres. Neki autori su pokazali da dugotrajna socijalna izolacija prouzrokuje hipofunkciju HPA sistema kod odraslih pacova (Sanchez i saradnici, 1998; Malkesman i saradnici, 2006). Retana-Marquez i saradnici (2003) su u jednoj od brojnih studija utvrdili da dugotrajna socijalna izolacija posle kratkog perioda dojenja prouzrokuje hipofunkciju HPA sistema kod odraslih pacova. Ova hipofunkcija je posebno izražena posle izlaganja pacova starih 16 dana akutnom stresu socijalne izolacije. Međutim, kod životinja koje su podvrgnute hroničnom stresu ograničavanja (engl. restraint) uočen je povećan bazalni nivo glukokortikoida (Zafir i Banu, 2009). Dakle, aktivacija HPA sistema zavisi od vrste stresa, dužine trajanja stresa i od perioda (dan, veče) kada su životinje izlagane stresu.

### **1.3. Stres i ponašanje**

Bihevizizam je pristup u psihologiji koji se temelji na činjenici da je ponašanje vredno naučnog istraživanja, i pretpostavlja da se naučne metode mogu primenjivati na ponašanja koja se mogu opažati i meriti. Bihevizisti smatraju da je posmatranje ponašanja najpouzdaniji način istraživanja psiholoških i mentalnih procesa i da ponašanje odslikava stanje nervnog sistema. U odgovoru na stres, osim fizioloških promena, dešavaju se i brojne promene na nivou ponašanja, a sve u cilju poboljšanja uslova za preživljavanje individue i vraćanja u stanje homeostaze. Na nivou ponašanja odgovor može obuhvatati izmenjene kognitivne funkcije (npr. pojačanu pažnju), promene u motivaciji (npr. redukcija u ishrani i seksualnoj aktivnosti), emocionalnost (npr. agresiju, strah) i neosetljivost na bol (analgeziju) (McEwen, 1998b). Ponašanje životinja predstavlja direktan odgovor organizma na okolinu pri čemu životinja teži da se prilagodi uslovima spoljašnje ili unutrašnje sredine (Whishaw i Kolb, 2005). Cilj analize ponašanja laboratorijskih životinja je da se razume molekularna signalizacija koja se nalazi u osnovi ponašanja, i kako promene u molekularnoj signalizaciji utiču na promene u ponašanju.

U analizi ponašanja životinja je moguće pratiti više elemenata: opšte stanje životinje koje obuhvata analizu oblika i težine tela, temperature tela, stanja brkova,

krzna i repa, kao i analizu čistoće i izgleda kaveza u kome životinja boravi; senzomotorno ponašanje čiji je cilj da se ocene senzorne i motorne mogućnosti životinje i to odgovor na zvučne, mirisne, dodirne i čujne stimulise životinje u kavezu i u nepoznatom otvorenom polju; refleksi i položaj tela pri čemu se prati držanje, uspravljanje i postavljanje u određeni položaj; lokomotorna aktivnost koja obuhvata sva delovanja kojima se životinja premešta sa jednog mesta na drugo (šetanje, trčanje, plivanje, eksploratorna aktivnost, okretanje); spretnost (eng. skilled movement) koja se odnosi na analizu određenih uvežbanih pokreta u koje spadaju pritiskanje poluge, dohvatanje hrane kroz otvor, penjanje uz konopac i merdevine i kretanje po gredi; ponašanja koja su karakteristična za vrstu kao što su timarenje, prenošenje hrane, pravljenje gnezda, socijalno ponašanje, agresija, seksualno ponašanje, briga o potomstvu i igra. Ovi oblici ponašanja pripadaju tzv. stereotipnim aktivnostima. Učenje obuhvata analizu memorije, pasivnog izbegavanja i prepoznavanja objekata, zatim analizu uslovljene naklonosti za mesto, analizu ponašanja poznatog kao odbrambeno zakopavanje i analizu prostorne navigacije. Za različite tipove učenja i memorije razvijeni su brojni testovi i aparature od kojih se najviše koriste različite vrste lavirinata koji mogu biti postavljeni na suvom (npr. zrakasti lavirint ili lavirint u obliku slova T) ili u vodi (npr. Morisov test vodenog lavirinta).

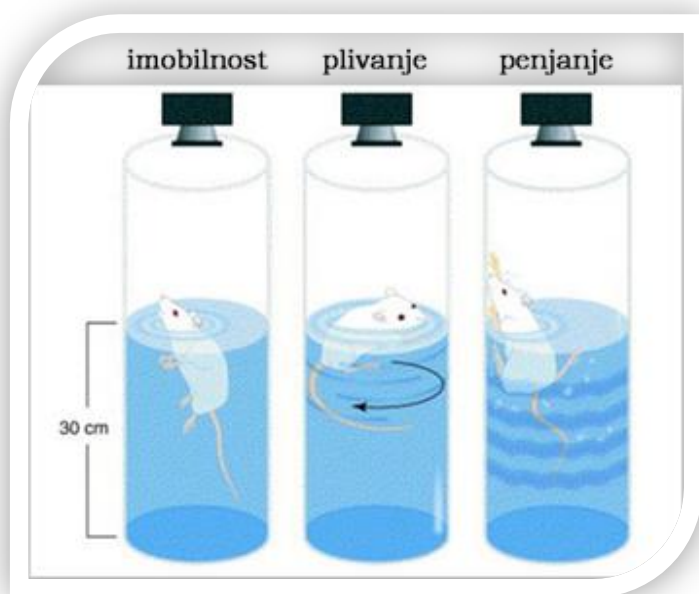
U poslednje vreme postoji sve više dokaza o tome da pored fizioloških promena, stres moduliše kognitivne funkcije mozga i da tako može uticati na ponašanje. Štaviše, veruje se da su stresna iskustva tokom života tesno povezana sa razvojem psiholoških promena u domenu kognitivnih funkcija koje mogu dovesti do neuropsihijatrijskih oboljenja (Mazure, 1995; Heim i Nemeroff, 1999). Kod ljudi se socijalni tipovi stresa smatraju glavnim etiološkim faktorom u razvoju poremećaja ponašanja, kao što su anksioznost i depresija (Kessler i Frank, 1997). Životinjski modeli socijalnog stresa mogu biti akutni ili hronični, ali svi imaju intenzivan uticaj na ponašanje. Hronična socijalna izolacija se smatra modelom koji je najbliži ljudskim studijama psihosocijalnog stresa. Naime, pošto su pacovi životinje koje prirodno žive u grupama, dugotrajna izolacija je kontinualna i kvalitativno drugačija od drugih modela hroničnog stresa. Najupečatljivija

promena u ponašanju, do koje dolazi zbog socijalne izolacije, je povećanje agresivnosti kod mužjaka glodara, čak iako je u pitanju relativno kratak period izolacije (Brain, 1975). Pacovi lišeni socijalnog kontakta sa drugim pacovima u toku ranog perioda svog razvoja, pokazuju određene promene na nivou ponašanja (Einon i Morgan, 1977), postaju agresivni, neofobični i agresivni su pri resocijalizaciji (Wongwitdecha i Marsden, 1996). Takođe, testovi ponašanja za ispitivanje anksioznosti, kao što su test izdignutog plus lavirinta i test svetlo-tamne kutije, su pokazali da socijalna izolacija kod glodara dovodi do povišenog nivoa straha (Voikar i saradnici, 2005).

Kao što je već pomenuto, hronični stres, a posebno socijalni tipovi hroničnog stresa, se smatraju bitnim činiocima u etiologiji anksioznosti i depresije. Anksioznost je kod ljudi emocionalno iskustvo koje može biti opisano psihološkim simptomima kao što su zabrinutost, nemir i strah i fiziološkim simptomima kao što su znojenje, ubrzan rad srca i drhtavica. Za razliku od straha, anksioznost nije odgovor na specifičan stimulus i prisutnu pretnju, već odgovor na potencijalno prisustvo pretnje (Voikar, 2006). Metode za testiranje anksioznosti na glodarima se mogu podeliti u dve kategorije i to na uslovljene i neuslovljene ili etološke. Etološki testovi se zasnivaju na prirodnim stimulusima koji mogu izazvati stanje anksioznosti i bazirani su na eksploratornoj aktivnosti. Ravnoteža između straha od nepoznatog prostora i instinktivne radoznalosti životinje određuje njeno ponašanje u ovakvoj situaciji. Jedan od najčešće primenjivanih etoloških testova za ispitivanje eksploratorne aktivnosti i prostorne naklonosti pacova i miševa (Hogg, 1996) je već pomenuti test izdignutog plus lavirinta (eng. elevated plus-maze test, EPM), u kome je životinji omogućeno da se kreće u opasnoj zoni (otvoreni kraci lavirinta) ili da ostane u sigurnoj zoni (zatvoreni kraci lavirinta). Kretanje životinje po otvorenim kracima lavirinta, bilo da je ono prinudnog ili dobrovoljnog karaktera, povezano je sa povišenim nivoom kortikosterona u plazmi, povećanom defekacijom, hormonalnim promenama kao i promenama u ponašanju, svim simptomima koji su indikativni za povišenu anksioznost. Broj ulazaka u otvorena polja lavirinta i vreme provedeno u njima odražavaju konflikt između straha i istraživačke aktivnosti i pokazale su se kao dve kritične determinante anksioznog



ponašanja (Pellow i saradnici, 1985). Glodari imaju prirodnu tendenciju da se kreću po tamnom i zatvorenom prostoru, izbegavajući otvoren prostor. Direktna korelacija između kretanja po otvorenom prostoru i anksioznosti je pokazana primenom anksiolitičkih lekova, koji su redukovali averziju životinja prema otvorenom prostoru i pojačali njihovu eksploratornu aktivnost (Fernandes i File, 1996). Zbog kompleksne psihološke simptomatologije depresije kod ljudi, njeno modeliranje kod glodara je vrlo teško. U stvari, patologija depresije se ne može rekapitulirati kod glodara, ali se mogu meriti specifična ponašanja (tzv. endofenotipovi) koja su relevantna za depresiju kod ljudi. Depresija je često opisana kao manifestacija nesposobnosti da se jedinka izbori sa stresom (Kessler i Frank, 1997) pa se modeliranje vrši u životinjama izloženim stresnim situacijama koje izazivaju prepoznatljive promene ponašanja. Test forsiranog plivanja (eng. forced swimming test, FST) je metoda pomoću koje se procenjuje beznadežnost



**Slika 3.** Test forsiranog plivanja – 3 oblika aktivnog ponašanja: imobilnost, plivanje i penjanje.

održe glavu iznad vode. Imobilnost odražava stanje smanjenog raspoloženja u kome su životinje napustile svaku nadu da će pronaći izlaz i predstavlja vrstu bespomoćnosti u ponašanju životinje (Porsolt i saradnici, 1993). Iako je ovo stanovište bilo kritikovano od strane brojnih autora koji smatraju da povećana nepokretljivost u ovom testu može predstavljati pozitivnu adaptaciju u ponašanju i da je životinja naučila da ne može da pobegne i da zato čuva energiju sve dok je

(eng. behavioral despair) u stresnim situacijama. Porsolt (1977) i saradnici su primetili da miševi i pacovi pušteni da plivaju u ograničenom prostoru iz koga nema izlaza vrlo brzo zauzimaju karakterističan imobilni položaj (Slika 3) i ne prave nikakve dalje pokušaje da se izbave osim pokreta neophodnih da

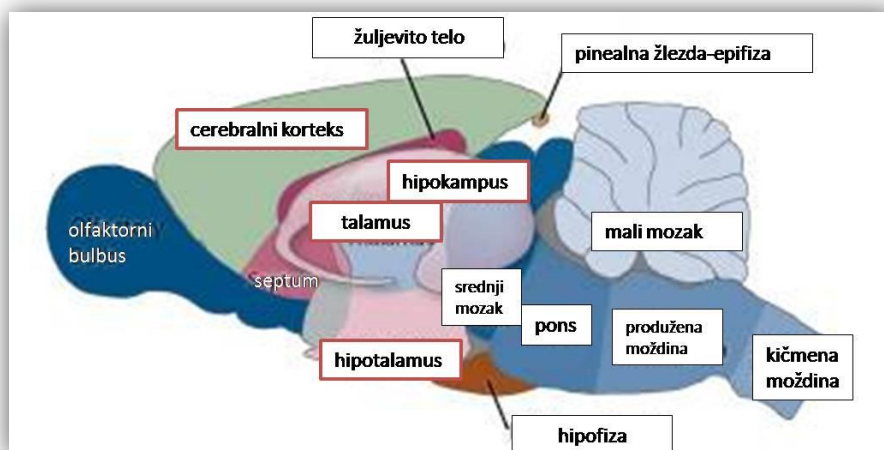
eksperimentator ne izvadi iz vode, ostaje činjenica da se vreme imobilnosti u FST-u može smanjiti pomoću velikog broja antidepresiva (Cryan i Mombereau, 2004). S toga je Porsoltov test još uvek vodeći u ispitivanju depresivnog ponašanja kod glodara. Weiss i saradnici (1998) su bili prvi koji su u okviru ovog testa prepoznali različite oblike aktivnog ponašanja eksperimentalnih životinja (Slika 3). Naime, osim imobilnosti, u aktivnom ponašanju oni razlikuju penjanje uz zidove cilindra i plivanje. Penjanje se obično dešava u prvim minutima testiranja, plivanje tokom celog testa, dok je imobilnost najučestalija na samom kraju testiranja. Penjanje i plivanje su dva oblika aktivnosti koja se dešavaju naizmenično u serijama, kao pokušaj da se izađe iz cilindra. Pokazano je da inhibitori preuzimanja noradrenalina stimulišu penjanje životinje uz zidove cilindra, odnosno rešenost da se iz njega izađe, dok inhibitori preuzimanja serotonina stimulišu plivanje (Page i saradnici, 1999).

#### **1.4. Centralni nervni sistem i stres**

Centralni nervni sistem izuzetno brzo detektuje i obrađuje stresne stimuluse menjajući koncentracije hormona i neurotransmitera. Uspešna adaptacija na stres uključuje udruženo delovanje hormona na nekoliko nivoa u centralnom nervnom sistemu, koji obuhvataju limbički sistem, hipokampus i amigdale (De Kloet i saradnici, 2005; Kvetnansky i saradnici, 1995). U regulaciju mnogih hormonskih sistema uključuje se i hipotalamus preko koga se prenosi čitav niz spoljašnjih i unutrašnjih stimulusa.

Postoji mnogo dokaza da je stres vrlo moćan modulator moždanih funkcija (Joels i saradnici, 2007). Čak se veruje da su stresna iskustva u bliskoj vezi sa razvojem psiholoških promena, pa čak i neuropsihijatrijskih oboljenja (Heim i Nemeroff, 1999). Naime, smatra se da je hronični stres jedan od glavnih etioloških faktora u razvoju nekih psihijatrijskih oboljenja, kao što je depresija. Paralelno sa podacima dobijenim na ljudima, kod kojih je pokazana atrofija određenih moždanih regiona prouzrokovana stresom i glukokortikoidima (Lupien i saradnici, 1998), studije na eksperimentalnim životinjama su pokazale da stres značajno utiče na moždane strukture limbičkog sistema koje imaju ulogu u kogniciji i

emocijama (Bremner, 1999). Limbički sistem, koji se često naziva „emocionalnim mozgom“, je filogenetski najstariji deo mozga koji se prvi aktivira u odgovoru na



Slika 4. Struktura limbičkog sistema u mozgu pacova

stres. Predstavlja sistem međusobno povezanih kortikalnih i subkortikalnih moždanih struktura koji čine: hipokampus, hipotalamus, amigdale, prednje jedro talamusa i prefrontalni korteks (Slika 4).

Limbički sistem je uključen u kontrolu emocija, motivacije, ponašanja i dugotrajnog pamćenja (Drevets, 2000), a njegova disfunkcija ima važnu ulogu u brojnim neuropsihijatrijskim oboljenjima kao što je depresija. Uzimajući u obzir vezu između stresa i emotivnih poremećaja, važno je napomenuti da su hipokampus, amigdala i prefrontalni korteks, kao delovi limbičkog sistema, uključeni u regulaciju HPA sistema i to tako što hipokampus i prefrontalni korteks u većoj meri inhibiraju aktivnost HPA sistema i sekreciju glukokortikoida, dok je amigdala uključena u njenu aktivaciju (Feldman i Conforti, 1995; Jacobson i Sapolsky, 1991).

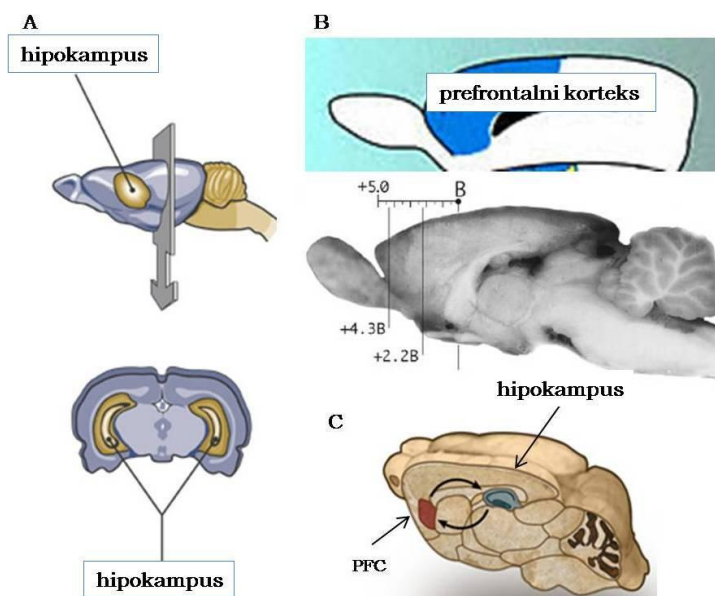
#### 1.4.1. Hipokampus

Hipokampus pripada limbičkom sistemu mozga i njegova osnovna uloga je u formiranju dugotrajne memorije. To je parna struktura, smeštena u medijalnom temporalnom lobusu ispod cerebralnog korteksa sa kojim je tesno povezana (Slika 5A). Brojne studije povezuju hipokampus sa inhibicijom HPA sistema, jer

stimulacija ove limbičke strukture dovodi do smanjenja sekrecije glukokortikoidnih hormona kod pacova i ljudi (Dunn i Orr, 1984).

Različiti tipovi hroničnih stresora, zatim starenje, kao i visok nivo glukokortikoida, dovode do oštećenja neurona u hipokampusu i do smanjenja nivoa kortikosteroidnih receptora, što rezultira produženim odgovorom na stres, oslabljenom glukokortikoidnom signalizacijom i inhibicijom HPA sistema (Issa i saradnici, 1990; Sapolsky i saradnici, 1986).

Kako hipokampus spada među moždane regione najosetljivije na oksidativni stres, adaptivne promene unutar same strukture su jako bitne za očuvanje njegove funkcionalnosti (McEwen, 1999; McEwen, 2008). Za uspešnu adaptaciju na stres, između ostalog, neophodan je adekvatan antioksidativni odgovor CNS-a (Sapolsky, 2003), koji u hipokampusu uključuje izmenjenu ekspresiju čitavog skupa gena i proteina. Međutim, kada stres predugo traje ili je prejakog intenziteta, on može ugroziti uspešan adaptivni odgovor u hipokampusu (Touyarot i saradnici, 2004; McEwen, 1999).



Slika 5. A) Hipokampus B) Prefrontalni korteks i C) njihov međusobni položaj u mozgu pacova

#### 1.4.2. Prefrontalni korteks

Prefrontalni korteks (PFC) je kod pacova lokalizovan medijalno i orbitalno na insularnim površinama rostralnog cerebeluma i uključen je u regulaciju kognitivnih i autonomno-visceromotornih funkcija (Cechetto i Saper, 1990) (Slika 5B). Osim u hipokampusu, vrlo velika gustina kortikosteroidnih receptora je prisutna i u cerebralnom korteksu pacova (McEwen i saradnici, 1986) i ljudi (Sarrieau i saradnici, 1988), a posebno u njegovom medijalnom regionu. Odatle

potiče ideja da je medijalni deo PFC-a uključen u regulaciju aktivnosti HPA sistema i dok ventralni region medijalnog PFC-a ima stimulatornu ulogu, dorzoventralni region ima inhibitorni uticaj na aktivnost HPA sistema (McEwen i saradnici, 1986). Evolutivno najrazvijeniji region u mozgu je PFC ali, uz hipokampus, i najosetljiviji na negativne efekte stresa (Arnsten, 2009). Čak i blag, nekontrolisan stres može veoma lako da ugrozi funkcije PFC-a, dok izlaganje hroničnom stresu vodi ka njegovim strukturnim promenama (Cerqueira i saradnici, 2007). Kada je hronični stres dugotrajan i intenzivan on može povećati osetljivost neurona u korteksu, pa čak i dovesti do njihove smrti, apoptoze, uglavnom preko unutrašnjeg, mitohondrijanog, puta apoptoze (Bachis i saradnici, 2008).

### **1.5. Hormoni i signalni putevi stresa**

Stresni odgovor predstavlja način i sredstvo nespecifičnog prilagođavanja organizma na nepovoljno delovanje različitih spoljašnjih i unutrašnjih faktora. To dalje znači da stresni odgovor predstavlja reakciju koja organizmu obezbeđuje održavanje vitalnih funkcija u fiziološkim granicama. Prvenstveno aktivira koru (luči glukokortikoidne hormone – kortizol) i srž (luči hormone kateholamine – adrenalin) nadbubrežnih žlezda. Dva glavna sistema koja regulišu održavanje homeostaze organizma u toku njegovog izlaganja stresorima su: hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalni sistem i simpato-adrenomedularni sistem (SAM).

Prilikom delovanja stresnog stimulusa, najpre se u roku od nekoliko sekundi aktivira SAM sistem i dolazi do oslobađanja kateholamina. Kateholamini su adrenalin, noradrenalin i dopamin, koji nastaju u hromafinim ćelijama srži nadbubrežne žlezde. Oni su prisutni u specifičnim regionima mozga, perifernim tkivima, plazmi, kao i u urinu, i učestvuju u ublažavanju simptoma stresa. Ovaj sistem odgovara brzo na promene u organizmu (Goldstein, 2003), a glavna posledica aktivacije SAM sistema je povećanje sposobnosti organizma da izvrši jaku mišićnu aktivnost, npr. već pomenuto ponašanje tipa „bori se ili beži“ koji zahteva korišćenje energetske zaliha. U neuroendokrini odgovor na stresni stimulus su osim kateholamina uključeni i kortikosteroidi iz adrenalnog korteksa, koji čine drugi, sporiji talas stresnog odgovora. Oni su krajnji rezultat aktivacije

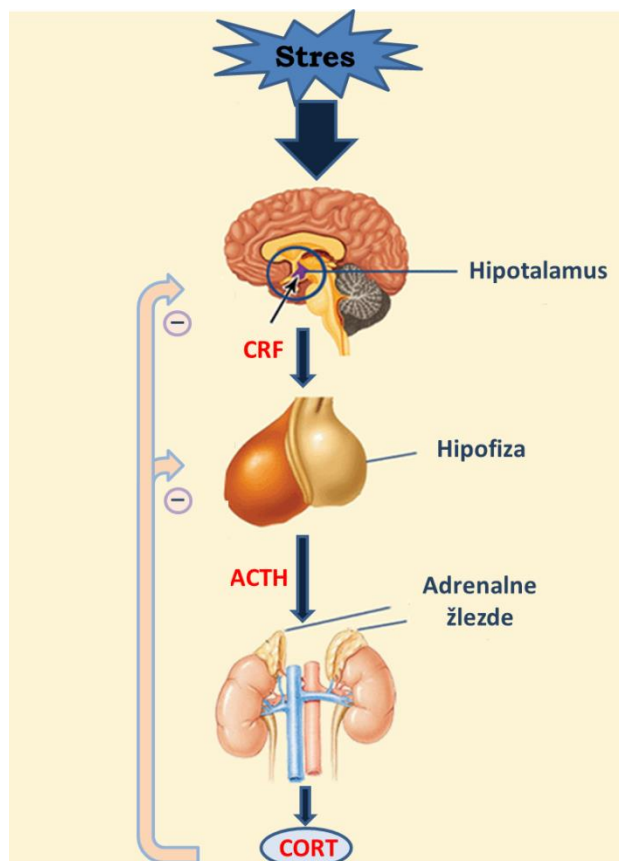
HPA sistema i hipokampusa i predstavljaju glavni adaptivni odgovor organizma na stres (Munck i saradnici, 1984). Dakle, kateholamini i glukokortikoidi svojom zajedničkom akcijom deluju na organizam u cilju savladavanja promena nastalih delovanjem stresnih faktora. Hipotalamus i hipokampus zajedno integrišu neuroendokrine, autonomne i emocionalne puteve, što određuje dužinu i intenzitet nervnog i hormonskog odgovora na stres. Oba regulaciona sistema, nervni i humoralni, su integrisani u medjumozgu, tačnije u hipotalamusu. Ovaj deo centralnog nervnog sistema (CNS) je najviši integrativni centar autonomnog vegetativnog sistema i endokrinog sistema. U hipotalamusu se sintetiše veliki broj polipeptidnih hormona koji kontrolišu funkciju prednjeg režnja hipofize. Otuda autonomni nervni sistem i endokrini sistem predstavljaju jedinstveni neuroendokrini sistem, koji objedinjuje i usklađuje metaboličke i druge funkcije u organizmu. Nakon odgovora organizma - ponašanja „bori se ili beži“, kortikosteroidi su potrebni za ponovno uspostavljanje homeostaze preko mehanizma negativne povratne sprege.

### **1.5.1. Hipotalamo-hipofizno-adrenalni sistem**

Aktivacija HPA sistema igra ključnu ulogu u odgovoru organizma na stres (Slika 6). HPA sistem čine paraventrikularna jedra hipotalamusa, prednji režanj hipofize i kora nadbubrežnih (adrenalnih) žlezda. Od limbičkog sistema, hipokampusa i amigdala polaze specifični nervi do paraventrikularnih jedara hipotalamusa gde depolarizacijom nervnih završetaka podstiču sintezu i sekreciju kortikotropin-oslobađajućeg faktora (eng. corticotrophin releasing factor, CRF) kao odgovor na delovanje stresa. CRF se osim u paraventrikularnom jedru sintetiše i na drugim mestima CNS-a kao što su limbičko područje, nucleus rafe, locus coeruleus i kortikalni interneuroni. Količina ovog hormona se prilikom stresa povećava naročito u locusu coeruleus-u i utiče na oslobađanje noradrenalina. CRF reguliše i seriju drugih, stresom indukovanih, promena u organizmu, kao što su: aktivacija simpatoadrenomedularnog sistema, promene u ponašanju, supresija apetita i smanjena mogućnost reprodukcije (Melia i Duman, 1991; Herbert, 1996). CRF se u roku od nekoliko sekundi preko eminencije medijane oslobađa u portalni krvotok

hipofize. Preko portne vene pars tuberalisa, CRF stiže do adenohipofize, gde svojim delovanjem u roku od 15 sekundi izaziva oslobađanje ACTH u periferni krvotok. CRF je samo jedan od hormona hipotalamusa koji reguliše oslobađanje ACTH iz hipofize (Herbert, 1996).

Koncentracija ACTH se kvantitativno povećava pod uticajem raznih tipova stresora (kao što su na primer: agregacija, povišena temperatura, hladnoća, gladovanje). U slučaju izlaganja životinja povišenoj temperaturi ili agregaciji najintenzivnije povećanje ACTH nastaje 20 i 60 minuta od početka izlaganja stresu (Đorđević i saradnici, 2003). ACTH stimuliše ćelije fascikularne zone adrenalnog korteksa koje u roku od nekoliko minuta sintetišu i izlučuju glukokortikoide. Kod ljudi, glavni glukokortikoid je kortizol, dok je kod pacova i miševa to kortikosteron. Porast koncentracije



**Slika 6.** Hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalni sistem. CRF kortikotropin-oslobađajući factor; ACTH adrenokortikotropni hormon; KORT – kortikosteron ili kortizol

glukokortikoida u serumu nakon delovanja stresa je evidentan već nakon nekoliko minuta, dok se maksimum koncentracije dostiže nakon 10 minuta (Kusnecov i Rabin, 1994). HPA sistem ima takođe i važan mehanizam autoregulacije koji se zasniva na negativnoj povratnoj sprezi (Slika 6), pri čemu glukokortikoidi u cirkulaciji inhibiraju sintezu i sekreciju CRF-a u hipotalamusu (Engelmann i saradnici, 2004, McEven, 2000).

Kateholamini mozga takođe imaju značajnu ulogu u aktivaciji HPA sistema. Adrenalektomija izaziva povećano oslobađanje noradrenalina iz hipotalamusa što ima za posledicu smanjenje glukokortikoida u serumu (Avakian i Callingham,

1968). Dokazano je da glukokortikoidi značajno utiču na sintezu, razgradnju i oslobađanje kateholamina u raznim tkivima (Westfall i Osada, 1969; Parvez i Parvez, 1972; Petrović i Janić-Šibalić, 1978).

### **1.5.2. Struktura i molekularni mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona**

Organizam u stanju stresa ima neposrednu potrebu za energijom. Stoga je osnovna funkcija glukokortikoida da obezbedi brzu mobilizaciju energetske rezerve i da moduliše kardiovaskularni i imunski odgovor. Kao i kateholamini, glukokortikoidi deluju na sve organe. U većini organa oni podstiču kataboličke procese. Ovi hormoni povećavaju nivo glukoze u krvi, tako što smanjuju njeno korišćenje na periferiji, dok u jetri indukuju glukoneogenezu i povećavaju količinu glikogena (Sapolski i saradnici, 2000). Povećavaju nivo masnih kiselina i deluju katabolički na metabolizam proteina. Međutim, za razliku od kateholamina njihovo dejstvo je mnogo sporije.

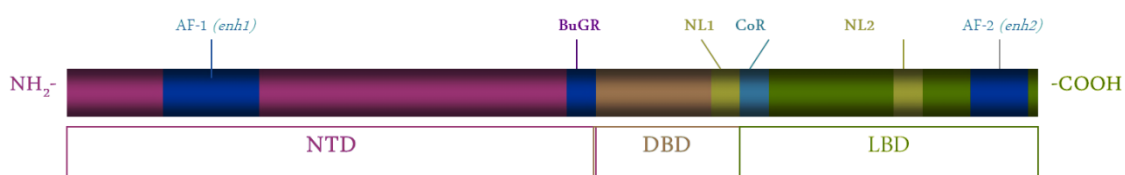
Glukokortikoidi su po hemijskom sastavu derivati holesterola koji sadrži ciklopentanoperhidrofenantrensko jezgro. Oni su C-21 steroidi, čiji se bočni lanac od dva ugljenikova atoma nalazi na poziciji 17, D prstena. Biosinteza glukokortikoida se vrši u fascikularnoj i retikularnoj zoni adrenalnog korteksa gde se holesterol pretvara u pregnenolon, reakcijom koju katalizuje ACTH. Od pregnenolona dalje vode tri puta sinteze, jedan je u pravcu nastanka mineralokortikoida na čijem kraju se nalaze kortikosteron i aldosteron, drugi vodi od 17-hidroksipregnenolona, na njegovom kraju se nalazi kortizol, i treći put koji vodi takođe od 17-hidroksipregnenolona, na njegovom kraju se nalaze seksualni steroidi, u najvećoj meri androgeni. Kortikosteron i kortizol se izlučuju u perifernu cirkulaciju, gde se vezuju za alfa-globuline plazme, transkortin, i tako prenose po organizmu. Pored vezanih u cirkulaciji, nalazi se i manja količina slobodnih hormona koji pokazuju fiziološku aktivnost. Hormon u vezanom obliku predstavlja na neki način rezervu odakle se po potrebi oslobađaju nove količine slobodnog hormona. S druge strane, transkortin "štiti" ćelije od visoke koncentracije



hormona u stresnim situacijama i igra značajnu ulogu u ostvarivanju efekta hormona, na šta ukazuje i mogućnost vezivanja transkortina za ćelijsku membranu.

Svi steroidni hormoni deluju na genski aparat jedra ćelije posredstvom svojih specifičnih receptora. Glukokortikoidni receptor (GR) je smešten u citoplazmi u inaktivnoj formi sve dok se ne veže za glukokortikoidni steroidni ligand. Nakon vezivanja receptor se aktivira i prelazi u jedro, gde reaguje sa specifičnim DNK sekvencama unutar regulatornih regiona gena koje regulišu glukokortikoidi. Postoji šest tipova steroidnih receptora za šest grupa steroidnih hormona: glukokortikoide, mineralokortikoide, gestragene, estrogene, androgene i vitamin D. Kortikosteroidi reaguju sa specifičnim receptorima u ciljnom tkivu koji regulišu ekspresiju kortikosteroid-odgovarajućih gena, time menjaju nivo i ćelijsku raspodelu sintetisanih proteina u različitim tkivima. Efekti glukokortikoida su uočljivi tek posle nekoliko časova, imajući u vidu vreme potrebno za regulaciju ekspresije i sintezu proteina. Mada glukokortikoidi pre svega deluju na povećanje ekspresije gena, dokazano je takođe da mogu i da smanjuju transkripciju gena. Nasuprot ovim genomskim dejstvima, mnoge studije su pokazale da kortikosteroidi ostvaruju neka od svojih dejstava i direktno posredstvom receptora vezanih na ćelijskoj membrani (Wehling, 1994).

**Glukokortikoidni receptor** pripada filogenetski konzerviranoj superfamiliji steroidnih/tireoidnih hormonskih receptora u koje spadaju i



**Slika 7.** Funkcionalni domeni glukokortikoidnog receptora: NTD- N-terminalni domen; DBD- domen vezivanja za DNK; LBD-ligand vezujući domen.

receptori za mineralokortikoide, androgene, progesterone, estrogene, vitamin D, tireoidne hormone, retinoičnu kiselinu kao i veliki broj tzv. "siročić" (eng. orphan) receptora za koje još nisu identifikovani specifični ligandi (Evans, 1988). Netransformisani GR predstavlja multiproteinski kompleks molekulske mase 300 kDa (Pratt i saradnici, 2004) u čiji sastav ulazi jedna subjedinica koja vezuje steroid od 94 kDa, dva molekula Hsp90, po jedan molekul Hsp56 i Hsp70, protein

molekulske mase 59 kDa (p59), imunofilini FK506- i rapamicin-vezujuće klase i protein molekulske mase 23 kDa (p23) (Hutchison i Scherrer, 1993). U odsustvu hormona, GR/Hsp kompleks je neaktivan i prolazi kroz stalne cikluse disocijacije, kao i adenozin tri fosfat (ATP)- i Hsp70-zavisne reasocijacije. Posle vezivanja hormona za receptor dolazi do alosterične modifikacije steroid-vezujućeg domena i do odvajanja HSP-a pri čemu se deblokira DNK-vezujući domen koji nakon transporta GR u jedro može da se veže za odgovarajuće genske regulatorne elemente (Petrović i Cvijić, 1997).

Jedan molekul glukokortikoidnog receptora (94 kD) sadrži tri funkcionalna domena (Slika 7), pri čemu N-terminalni region GR-a može da reguliše transkripciju nezavisno od vezivanja hormona (Beato i Klug, 2000). Centralni domen receptora sadrži visokokonzervirane „prste“ koji imaju vezan cink i koji učestvuju u vezivanju za DNK (eng. DNA binding domain, DBD). C-terminalni region je ligand vezujući domen (eng. ligand binding domain, LBD) koji takođe pokazuje transaktivirajuću funkciju. Takođe, N-terminalni region GR-a je glavno mesto ligand-zavisne fosforilacije GR-a na serinu (Bodwell i saradnici, 1998). GR kod pacova može biti fosforilisan na 6 mesta, od čega su četiri mesta fosforilacije lokalizovana u N-terminalnom domenu (treonin 171, serin 224, serin 232 i serin 246) (Krstić, 1995).

Steroidni hormoni koji su ostvarili svoj efekat metabolišu se u forme koje se slabo vezuju za receptor i stoga difunduju iz ćelije. Poluživot im je 60-90 minuta, a potom se hormoni metabolišu u jetri, gde se vezuju za glukuronsku kiselinu. Jedan deo kortizola u jetri prelazi u kortizon, i to je jedina količina prisutna u organizmu, pošto se on u žlezdi ne sintetiše. Iz jetre kortizon samo u minimalnoj količini prelazi u cirkulaciju i izlučuje se mokraćom.

**Proteini toplotnog stresa** (eng. heat shock proteins, HSPs) su familija evolutivno visoko konzerviranih proteina, čija se ekspresija povećava u odgovoru na različite metaboličke promene, a ime su dobili zahvaljujući otkriću značajnog povećanja sinteze ovih proteina u odgovoru na povišenu temperaturu iznad fiziološke granice. Pored povišene temperature, povećanu ekspresiju HSP-a mogu izazvati i drugi faktori, kao što su prisustvo teških metala, hipoksija i različiti

tretmani koji povećavaju nivo ATP-a. Većina proteina iz ove familije je konstitutivno eksprimirana i učestvuje u procesima koji su esencijalni za ćeliju. Primarna funkcija HSP-a je sprečavanje agregacije denaturisanih proteina u ćeliji, kao i pomoć drugim proteinima pri zauzimanju native konformacije tokom sinteze ili nakon renaturacije (Hartl i Hayer-Hartl, 2002). Proteini toplotnog stresa imaju bitnu ulogu i kao molekularni pratioci (šaperoni). Oni deluju na proteine za koje se vezuju tako što stabilizuju zrele polipeptidne lance, i na taj način smanjuju mogućnost neispravnog savijanja polipeptidnog lanca i pogrešnog 3D pakovanja. HSP-i mogu imati i druge funkcije, kako u normalnom fiziološkom stanju, tako i u stanju stresa, a to su funkcija u sekreciji proteina, u njihovom kretanju kroz ćeliju, u degradaciji proteina, ali i u regulaciji funkcije transkripcionih faktora i proteinskih kinaza. U uslovima stresa HSP-i utiču na procese zamene oštećenih, kao i na povećanje sinteze novih proteina. Familija proteina toplotnog stresa se može klasifikovati po molekulskoj težini, po veličini molekula, ili po strukturi i funkciji svojih članova. Prema ovim kriterijumima HSP-i su podeljeni u nekoliko grupa: grupe Hsp100, Hsp90, Hsp70 i Hsp60 (šaperonini) i grupa malih proteina toplotnog stresa (alfa-kristalini). Različiti članovi ove familije proteina su raspoređeni u različitim delovima ćelije, gde vrše svoje funkcije (Bukau i saradnici, 2006). Postoji takođe i tkivna specifičnost ekspresije ovih proteina, što može odrediti njihovu osetljivost na glukokortikoide u odgovoru na stres.

Jedan od najpoznatijih proteina toplotnog stresa, Hsp90, omogućuje savijanje i funkciju preko 100 proteina uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, regulaciju obrade DNK, intraćelijske komunikacije, apoptoze. Neophodan je faktor vijabilnosti eukariotske ćelije i kao takav postao je target protein u lečenju mnogih bolesti. Hsp90 je najzastupljeniji HSP u ćeliji i predstavlja skoro 1 % ukupnih ćelijskih proteina u nestresiranim ćelijama. Iako homolog ovih proteina u bakterijama nije esencijalan za preživljavanje, funkcionalan Hsp90 protein je neophodan za preživljavanje eukaritoskih ćelija. Za razliku od nekih HSP-a čija šaperonska funkcija podrazumeva interakciju sa mnogim ćelijskim proteinima, Hsp90 pokazuje selektivnost za određene proteine, kao što su neki transkripcioni faktori, kao i veliki broj proteinskih kinaza. Kao što je već navedeno Hsp90 se,

zajedno sa setom ko-šaperonskih molekula Hsp70 i Hsp40, vezuje za steroidne receptore u citoplazmi. Kao što je već rečeno, u citoplazmi, inaktivirani GR se nalazi vezan sa šaperonima u multimernom kompleksu koji se sastoji od nekoliko molekula među kojima su i Hsp90 i Hsp70 (Dittmar i Pratt, 1997; Rajapandi i saradnici, 2000) (Slika 8). Iako se Hsp90 nalazi uglavnom u citoplazmi (Gething i Sambroock, 1992), u nekim nestresiranim i stresiranim ćelijama Hsp90 je nađen i u jedru (Gasc i saradnici, 1990). Vezivanje Hsp90 proteina sa GR-om je dinamičan proces i pokazano je da se ova dva proteina zajedno mogu transportovati iz citoplazme u jedro, u kome takođe mogu ostati vezani (Sanchez i saradnici, 1990).

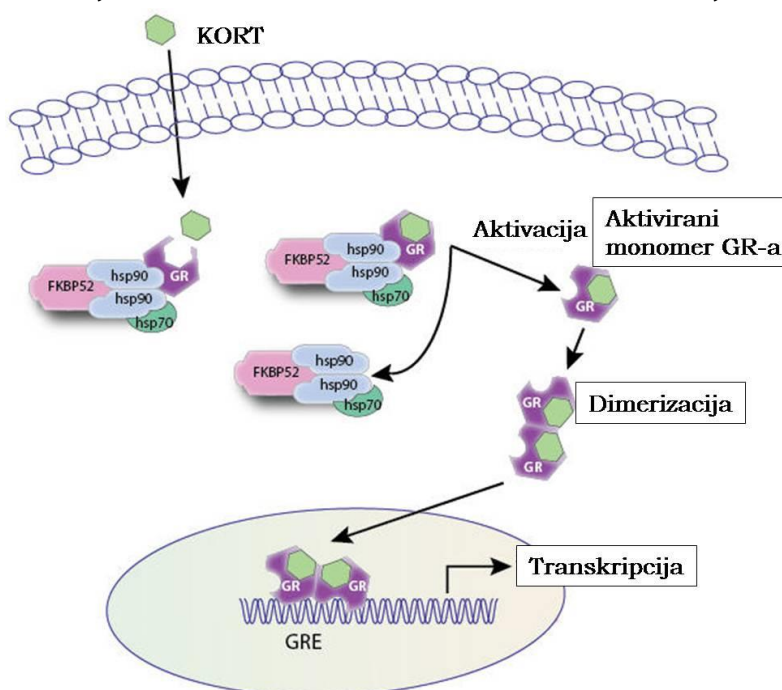
Pripadnici Hsp70 familije proteina imaju najznačajniju ulogu u vezivanju i stabilizaciji novonastalih polipeptida, koji dolaze sa ribozoma, i prelaze u endoplazmatski retikulum i mitohondrije. Za interakciju Hsp70 šaperona sa konformaciono nesavijenim proteinima je neophodan ATP i ko-šaperonski molekuli. U okviru Hsp70 familije, različiti članovi se nalaze u različitim ćelijskim

frakcijama, kao što su citosolni i jedarni Hsp70 i Hsc70 (poznati i kao Hsp72 i Hsp73), Grp78 ili Bip koji se nalazi u međumembranskom prostoru

endoplazmatskog retikuluma i Grp75 (ili mortalin) koji je lokalizovan u

mitohondrijama. Kod sisara, Hsp72 se eksprimira samo u

uslovima stresa i često predstavlja indikator da je u ćeliji, tkivu ili organu aktiviran stresni odgovor. Takođe, Hsp70, zajedno sa Hsp90, učestvuje u pravilnom savijanju



**Slika 8.** Multimerni šaperonski kompleks za koji je vezan inaktivni GR u citoplazmi. Vezivanjem liganda dolazi do disocijacije šaperona i aktivacije receptora; KORT- kortikosteron.

GR-a (Caamano i saradnici, 2001), olakšavanju njegovog transporta u jedra (Sanchez i saradnici, 1990) i u interakciji GR-a sa regulatornim sekvencama DNK koje su regulisane glukokortikoidima (eng. glucocorticoid responsive element, GRE) (Srinivasan i saradnici, 1994).

Budući da su Hsp90 i Hsp70 uključeni u regulaciju ćelijskog odgovora na glukokortikoidne hormone preko interakcije sa GR-om, izgleda da je optimalan stehiometrijski odnos između ovih šaperona i GR-a neophodan za odgovarajuću aktivnost steroidnih hormona. Navedena pretpostavka se bazira na prethodno objavljenim podacima koji su pokazali da promena u stehiometrijskom odnosu HSP-a i GR-a u jedrima, kao i povećan nivo jedarnih HSP-a, imaju ulogu u inaktivaciji GR-a, tako što inhibiraju njegovu interakciju sa GRE (Kang i saradnici, 1999).

### **1.6. Izvori oksidativnog stresa tokom neuroendokrinog disbalansa u CNS-u**

Mnogi stresni događaji praćeni su povećanjem protoka krvi u mozgu i energetskog metabolizma, i imaju zajednički adrenergički mehanizam (Bryan, 1990; Evans, 1993). Mozak je najveći potrošač kiseonika u organizmu (čak 20% ukupne potrošnje) iako čini svega 2% ukupne telesne mase (Clarke i Sokoloff, 1999). Veoma je osetljiv na oštećenja koja izazivaju reaktivne vrste kiseonika (ROS), kako zbog velike metaboličke aktivnosti (mozak ima visok oksidativni kapacitet zbog velikog nivoa potrošnje kiseonika), značajne količine polinezasićenih masnih kiselina i sadržaja metala, tako i zbog relativno slabe antioksidativne zaštite. Oksidativni stres može da dovede do oštećenja nervnog tkiva, pre svega narušavajući funkciju mitohondrija, a zatim i neuronsku signalizaciju, kao i neurogenezu. Sposobnost mozga da se odbrani od oksidativnog stresa je ograničena zbog određenih anatomskih, fizioloških i biohemijskih razloga (Calabrese i saradnici, 2000) kao što su: visoka koncentracija lako oksidabilnih supstrata (npr. polinezasićenih masnih kiselina i kateholamina); relativno mali nivo antioksidanasa u poređenju sa drugim tkivima, kakav je glutathion, vitamin E i antioksidativnih enzima (glutathion peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaza);

endogena geneza reaktivnih kiseonikovih slobodnih radikala kroz nekoliko specifičnih reakcija: aktivnost lanca transporta elektrona u mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu, autooksidacija kateholamina, askorbinske kiseline ili tiola, kakvi su glutation, cistein i homocistein; povećana zastupljenost Fe u specifičnim regionima humanog mozga- globus palidus i supstancia nigra.

Pokazano je da ROS reaguje sa više aminokiselinskih ostataka *in vitro*, i može da izazove modifikaciju i smanjenu aktivnost proteina ili njihovu denaturaciju i inaktivaciju. Najosetljivije su amino kiseline sa ostacima koji sadrže sulfidnu grupu. Oksidaciona oštećenja proteina dovode do promene strukture proteina i nagomilavanja izmenjenih formi enzima. Oksidaciona oštećenja proteina mogu nastati putem dva odvojena mehanizma: reakcijom između produkata lipidne peroksidacije i proteina, i 'site-specific' reakcijama  $H_2O_2$  i  $Fe^{2+}$  na mestu vezivanja metala za enzim koje dovode do produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (Stadtman i Berlett, 1991).

Povećani nivo ROS-a i smanjena efikasnost reparativnih/degradativnih mehanizama kao što je proteoliza dešavaju se u oksidativnom stresu i oštećenju mozga. Funkcionalna posledica oksidativnih oštećenja proteina je povećanje membranske rigidnosti što utiče na signalizaciju koja je posredovana receptorima u membrani. Takođe, dolazi do smanjenja mitohondrijalne funkcije i povećanja njihove senzitivnosti na ćelijsku smrt izazvanu ekscitatornim neurotransmiterima. Smanjena produkcija energije u mitohondrijama vodi mobilizaciji kalcijuma iz intraćelijskih depoa, oksidativnom stresu, oštećenju neurona i ćelijskoj smrti (Calabrese i saradnici, 2000).

Poznato je da glukokortikoidi povećavaju produkciju i toksičnost ROS-a i narušavaju balans između produkcije oksidanata i antioksidativne zaštite, što može da rezultuje stanjem oksidativnog stresa. Istraživanja su pokazala da povećana sekrecija kortizola dovodi do promene u potencijalu mitohondrijalne membrane i oslobađanja citohroma c u citoplazmu, gde aktiviranjem kaspaza on izaziva ćelijsku smrt (Zhang i saradnici, 2007). Promene na mitohondrijama i ćelijska smrt mogu biti uzroci atrofije hipokampusa i PFC-a, koja je primećena kod depresivnih pacijenata (Galecki i saradnici, 2008). Gong i saradnici (2011) su

pokazali da hronični stres izaziva strukturna oštećenja mitohondrija i da narušava njihovu funkciju u proizvodnji energije u mozgu miševa.

Oksidativni stres ne nastaje samo u uslovima povećane produkcije ROS-a, već može biti i posledica smanjenog kapaciteta antioksidativne zaštite. Tako je pokazano da povećana sekrecija glukokortikoida tokom stresa utiče na antioksidativni odbrambeni kapacitet hipokampalnih neurona i menja njihovu osetljivost na metaboličke promene. Veliki broj eksperimentalnih podataka ukazuje na izmenjen nivo aktivnosti antioksidativnih enzima u različitim fiziološkim i patološkim stanjima, uključujući i stres. Stres imobilizacijom dovodi do akumulacije oksidativnih i nitrozativnih medijatora u mozgu, nakon oslobađanja TNFalfa (tumour necrosis factor-alpha) i drugih citokina (Garcia-Bueno i saradnici, 2005). Na taj način oksidativni stres dovodi do oksidativnih oštećenja nervnih ćelija i tako posredno izaziva strukturne promene u mozgu koje mogu dovesti do nastanka ili progresije neurodegenerativnih bolesti.

Nastanak brojnih neurodegenerativnih bolesti, poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti ili amiotrofičke lateralne skleroze, dovodi se u vezu sa oksidativnim oštećenjima (Ng i saradnici, 2008). Naime, ove bolesti karakterišu brojne patološke promene, poput akumulacije aberantnih proteinskih agregata, aktivacija mikroglije, disfunkcija mitohondrija, koje su povezane sa povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta. Kod ovih pacijenata izmeren je i povišen nivo HNE (4-hidroksi-2,3-nonenal), akroleina, malondialdehida, koji nastaju kao produkti lančane reakcije izazvane lipidnim peroksidima (Barnham i saradnici, 2004).

### **1.7. Jetra - glavni anabolički organ u stresu**

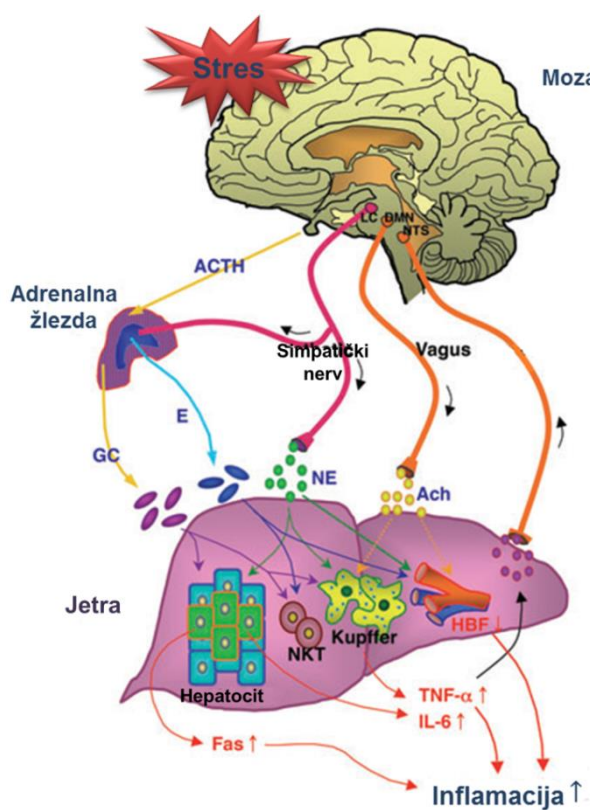
Organizam odgovara na faktore stresa aktivacijom preko nervnog sistema i hormona. Hormoni koji se oslobađaju u krvotok ubrzavaju srčani rad, ubrzavaju disanje, podižu nivo krvnog pritiska i ubrzavaju metabolizam, pospešuju rad nekih mišićnih grupa, šire zenice. Jedna od funkcija glukokortikoida jeste i da obezbede brzu mobilizaciju energetske rezerve, jer organizam u stanju stresa ima neposrednu povišenu potrebu za energijom. Ovi hormoni povećavaju nivo šećera u

krvi, dok u jetri indukuju glukoneogenezu i povećavaju količinu glikogena (Sapolski i saradnici, 2000). Jetra oslobađa glukozu iz sopstvenih depoa kako bi omogućila veću produkciju energije. Povećana produkcija energije praćena je i povećanjem koncentracije ROS-a. Jetra je organ koji je najbogatiji antioksidativnim enzimima.

Međutim, pokazano je da stres (posebno hronični) može na više načina da dovede i do oštećenja jetre. Tako, hroničan strah i osećaj nelagodnosti značajno smanjuju protok krvi kroz jetru. Eksperimenti u kojima su kod ispitanika hipnotičkom sugestijom izazivani strah i anksioznost, pokazali su smanjenje protoka krvi kroz jetru (Hirose i saradnici, 1961). Ljudi koji imaju veću osetljivost na dugotrajni stres, imaju i veću šansu za akutno odbacivanje presađene jetre (Walter i saradnici, 2002).

Kod ljudi obolelih od hepatitisa C pokazana je pozitivna korelacija između stepena depresije i nivoa alanin-aminotransferaze (ALT), enzima povezanog sa oštećenjem jetre (Fukudo i saradnici, 1989). Stres može direktno uticati na inflamatorne procese koji se odvijaju u jetri (Slika 9). Za vreme stresa dolazi do širenja prirodnih ćelija ubica (eng. natural killer cells, NKT) u jetri što doprinosi

smrti ćelija jetre. Kod osoba sa hroničnim oboljenjem jetre, upala je početak serije događaja koji uzrokuju oštećenje jetre. Istraživači su na zdravim životinjama otkrili kako vezivanje i davanje električnih šokova kroz noge uzrokuje povećavanje nivoa ALT-a (Fernandez i saradnici, 2000; Chida i saradnici, 2006), dok su druge studije



**Slika 9.** Uticaj stresa na inflamatorne procese u jetri (Chida i saradnici, 2006)



pokazale značajna oštećenja jetre kod miševa koji su tretirani kortikosteronom. Iako nije potpuno jasna interakcija između stresa i različitih funkcija jetre, svi autori se slažu da postoji veza između stresa i progresije oboljenja jetre.

## 1.8. Redoks ravnoteža i oksidativni stres

### 1.8.1. Reaktivne kiseonične vrste

Svi živi organizmi na planeti mogu se prema mogućnosti korišćenja kiseonika u metaboličkim procesima podeliti na aerobne i anaerobne. Sam molekulski kiseonik u organizmu je slabo reaktivan i njegova toksičnost zavisi od vrste organizma, starosti i fiziološkog stanja. Fenomeni toksičnosti kiseonika obuhvataju sve aerobne organizme i to kako biljke i životinje, tako i bakterije (Halliwell i Gutteridge, 1985). Najveći deo molekulskog kiseonika u ćelijama aerobnih organizama se redukuje do vode. U ovom procesu koji se odigrava na unutrašnjoj membrani mitohondrija uz katalitičku ulogu kompleksa citohrom-oksida svaki molekul kiseonika veže 4 elektrona.



Međutim, pri redukciji molekulskog kiseonika manjim brojem elektrona nastaju delimično redukovani i toksični međuproizvodi – slobodni radikali. Slobodni radikali su molekuli, joni ili atomi koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Neki molekuli kao što je singlet kiseonik, vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), sadrže reaktivne funkcionalne grupe sa kiseonikom, a po definiciji nisu slobodni radikali jer ne poseduju nesparene elektrone. Oni različitim hemijskim reakcijama generišu slobodne radikale, pa je uveden pojam reaktivnih vrsta kiseonika. Nesparen elektron slobodnih radikala je visoko reaktivan i u reakciji sa biomolekulima uzima jedan elektron iz njihovog elektronskog para. Ukoliko je ovaj biomolekul visoko reaktivan dolazi do lančane produkcije slobodnih radikala i sekundarnih reaktivnih produkata kakvi su lipidni peroksidi (Cannio i saradnici, 2000, Nordberg i Arner, 2001). Da bi prekinuli ovu lančanu reakciju, novoformirani radikali moraju reagovati sa drugim slobodnim radikalom, na taj način eliminišući nesparene elektrone ili sa primarnim

antioksidantima čija slaba reaktivnost dovodi do prekidanja lančane produkcije slobodnih radikala.

Normalan oksidativni metabolizam glavni je endogeni generator slobodnih radikala i ROS-a (Finkel, 2000). Slobodni radikali i ROS se generišu u mitohondrijama svih sisarskih ćelija kao posledica ćelijskog disanja. U drugim delovima ćelije oni nastaju kao posledica biohemijskih reakcija koje koriste kiseonik ili aktivnosti enzima kao što su NADPH oksidaza, ksantin oksidaza, peroksidaze, lipoksigenaze i ciklooksigenaze. Neki od ovih molekula su ekstremno reaktivni, kao hidroksilni radikal, dok su neki manje reaktivni (superoksid i  $H_2O_2$ ).

Superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) je produkt sa jednim redukovanim elektronom. Formira se u skoro svim aerobnim ćelijama (Richmond i saradnici, 1981). Može se redukovati i formirati molekulski kiseonik ( $O_2$ ), ili oksidovati i formirati vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ). Superoksid anjon radikal sam po sebi ima ograničenu reaktivnost i u fiziološkim uslovima može biti kao signalni molekul uključen u regulaciju rasta i intraćelijsku signalizaciju. U mozgu (i drugim tkivima) superoksid dismutaza (SOD) ga prevodi u  $H_2O_2$ . Toksičnost ovog radikala uglavnom zavisi od interakcije sa  $H_2O_2$ , kada nastaje ekstremno oksidovana vrsta, hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ).

Vodonik peroksid nije slobodni radikal, ali je važan zbog svoje permeabilnosti kroz biološke membrane.  $H_2O_2$  se proizvodi delovanjem nekoliko oksidaza in vivo, uključujući oksidaze amino kiselina i enzim ksantin oksidazu (Chance i saradnici, 1979). On može da oksiduje sulfhidrilne komponente i metioninske ostatke u proteinu, ali ova oksidacija se dešava samo ako je koncentracija  $H_2O_2$  mnogo veća od one prisutne u fiziološkim uslovima (preko 1mM). Druga važna uloga  $H_2O_2$  je ta da on može biti i unutarćelijski signalni molekul. Dalje, jednom produkovan  $H_2O_2$  uklanja se sistemom od tri antioksidativna enzima, katalazom, selen-zavisnom glutation peroksidazom i peroksiredoksinom.  $H_2O_2$  je prekursor veoma reaktivnog  $\cdot OH$  u Haber-Weissovoj reakciji (1934). Hidroksilni radikal može inicirati lipidnu peroksidaciju i generisati sekundarne slobodne radikale, iz čega proizilazi njegova toksičnost. Oksidativna deaminacija dopamina, u CNS-u, preko enzima monoamino-oksidge (MAO) ima

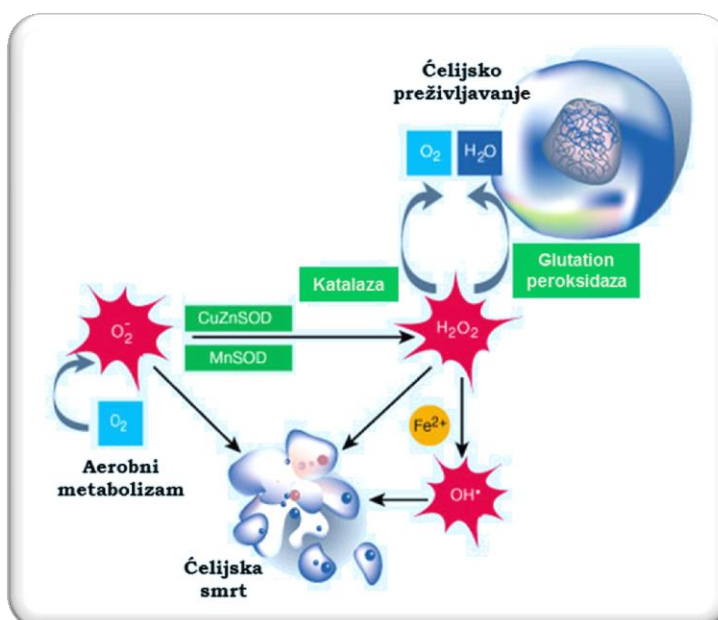
poseban značaj u produkciji  $H_2O_2$ . MAO se nalazi na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani i glavna uloga ovog enzima je učesće u metabolizmu neurotransmiterskih amina (Spina i Cohen, 1989). Svi sistemi koji proizvode superoksidni radikal, formiraju i  $H_2O_2$ , i ako se ovaj proces akumulira, oni počinju da formiraju hidroksilne radikale. Hidroksilni radikali nastaju iz  $H_2O_2$  u reakciji katalizovanoj jonima prelaznih metala  $Fe^{2+}$  i  $Cu^+$ , vezanih u kompleks sa različitim proteinima i ostalim molekulima, Fentonovom reakcijom.  $Cu$  i  $Fe$  mogu biti oslobođeni iz proteina kakav je fernetin i [4Fe-4S] centara različitih dehidrataza u reakciji sa  $O_2^{\cdot-}$ . Superoksid tako ima ulogu u recikliranju jona metala. Ovaj mehanizam je specifičan za žive ćelije i zove se *in vivo* Haber-Weiss-ova reakcija (Nordberg i Arner, 2001).

Hidroksilni radikal je snažno oksidaciono sredstvo sa visokom reaktivnošću ali sa niskom selektivnošću, i skoro trenutno reaguje sa svim tipovima biomolekula: aminokiselinama, DNK, šećerima, fosfolipidima, i proizvode sekundarne radikale sa različitom reaktivnošću (Richmond i saradnici, 1981). Zbog svoje velike reaktivnosti  $\cdot OH$  pravi mnogo veća oštećenja biomolekula od bilo kog drugog ROS.

Slobodni radikali i neradikalni reaktivni molekuli nastali iz radikala postoje u ćelijama i tkivima u niskim ali merljivim koncentracijama. Njihova koncentracija je određena balansom između nivoa njihove produkcije i nivoom njihove eliminacije različitim antioksidativnim komponentama i enzimima (Droge, 2002). Danas se zna za brojne fiziološke funkcije slobodnih radikala i neradikalnih reaktivnih molekula u organizmu (Valko i saradnici, 2007). Oni su uključeni u: aktivaciju i modulaciju puteva signalne transdukcije, odbranu od patogena, modulaciju aktivnosti redoks-senzitivnih transkripcionih faktora i regulaciju aktivnosti mitohondrijskih enzima, procese starenja, patologiju ishemije i neurodegenerativnih bolesti. Takođe, mogu povećati aktivnost protein kinaza, i inaktivirati ostale enzime kao što su protein fosfataze. Imaju ulogu u mobilizaciji kalcijuma, transportu jona, aktiviranju MAP kinazne kaskade (Matsuzawa i Ichijo, 2005), oni su signali u razviću. Oni mogu direktno delovati na konformaciju i/ili aktivnost molekula sa sulfhidril grupama, kakvi su proteini ili glutation,

oksidacijom njihovih tiolnih ostataka. Ovaj tip redoks regulacije dešava se kod mnogih proteina važnih za transdukciju signala, kakvi su protein kinaza C,  $\text{Ca}_2+$ -ATPaza, kolagenaza, i tirozin kinaza, kao i mnogi drugi proteini i membranski receptori (Allen i Tresini, 2000). Neki od citokina, faktora rasta, hormona i neurotransmitera koriste ROS kao sekundarne glasnike u unutarćelijskoj transdukciji signala.

Narušavanje balansa između produkcije oksidanata i antioksidativne zaštite rezultuje stanjem oksidativnog stresa, koje za posledicu može imati brojna patološka stanja, uključujući degenerativno starenje i pojavu različitih neurodegenerativnih oboljenja. Takođe, oksidativni stres ima ulogu u ćelijskim procesima, kakvi su apoptoza, nekroza, neuromodulacija i starenje (Scandalios, 2002). U preživljavanju ćelija i ćelijskoj smrti ROS imaju dvostruku ulogu kroz interakciju između apoptotske mašinerije i ćelijskih signalnih mehanizama (Slika 10)



(Martindale i Holbrook, 2002). **Slika 10.** Uloga ROS-a i antioksidativne zaštite u preživljavanju ćelije i ćelijskoj smrti

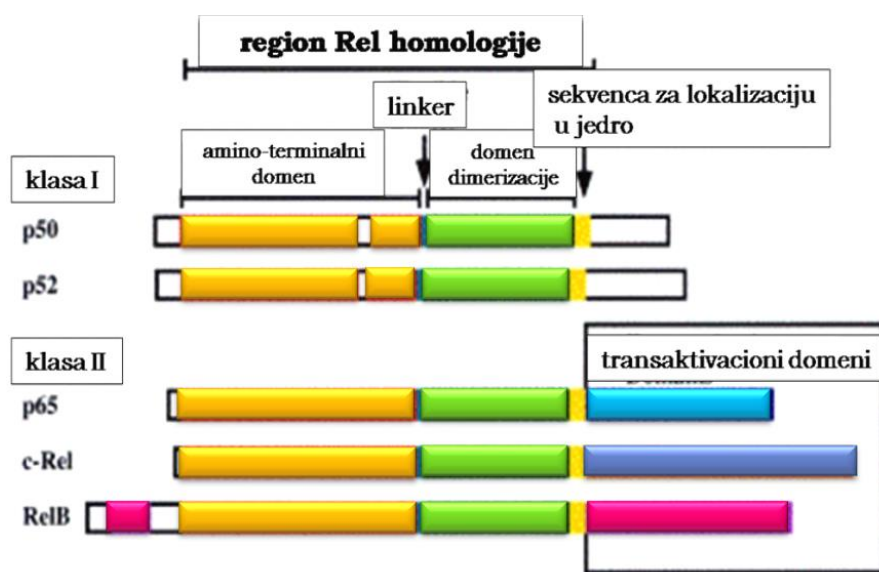
### 1.8.2. Redoks senzitivni transkripcioni faktori

Redoks modifikacije biomolekula, pre svega proteina, dugo su posmatrane samo kao oksidativna oštećenja ovih molekula. Danas one predstavljaju nosioce bioloških informacija koje su neophodne za održavanje ćelijske homeostaze i čine deo sistema oksidativne regulacije (D'Angio i Finkelstein, 2000; Adler i saradnici, 1999). Promene u genskoj ekspresiji čine suštinu ćelijskog odgovora na

ekstracelularne signale i promene u njenoj okolini. Regulacija signalnog odgovora na nivou gena postiže se aktivnošću transkripcionih faktora koji se vezuju za kontrolne regione target gena i menjaju njihovu ekspresiju. Sa razvojem slobodno-radikalske biologije i sa novim saznanjima o oksidativnom stresu kao uzročniku ili pratiocu brojnih humanih bolesti, redoks senzitivni transkripcioni faktori postali su bitan segment brojnih istraživanja. Mehanizmi odgovorni za izmenjenu kontrolu transkripcionih faktora mogu se dešavati putem smanjenog vezivanja za promotorni region zbog oksidativnog oštećenja DNK, ili redoks-regulacijom aktivnosti transkripcionih faktora i/ili promenom vezivanja DNK uzrokovanom redoks-indukovanom modifikacijom transkripcionog faktora. Za nekoliko transkripcionih faktora, ROS funkcionišu kao fiziološki medijatori transkripcione kontrole. Samo neki od redoks senzitivnih transkripcionih faktora su nuklearni faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) i aktivacioni protein-1 (AP-1) (Nordberg i Arner, 2001), Sp-1, c-Mxb, p-53, egr-1 i faktor indukovan hipoksijom (Hif-1, hypoxia-inducible factor), Nrf2 (engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Johnson i saradnici, 2008).

### 1.8.2.1. Nuklearni faktor kappa B u odgovoru na stres

Nuklearni faktor kappa B (NF $\kappa$ B) pripada grupi redoks senzitivnih transkripcionih faktora, zato što male promene redoks stanja u ćeliji utiču na njegovu aktivnost. Pored glukokortikoidnog receptora, NF $\kappa$ B je još jedan transkripcioni faktor osetljiv na stres. U uslovima neuroendokrinog stresa



Slika 11. Strukturna organizacija proteina NF $\kappa$ B familije

ekspresija antioksidativnih enzima regulisana je kako glukokortikoidima preko GR-a, tako i NF $\kappa$ B signalnim putem (De Bosscher i saradnici, 2003; Antras-Ferry i saradnici, 1997), tako da njihov međusobni odnos u velikoj meri određuje sudbinu ćelije u odgovoru na oksidativni stres.

Aktivna forma NF $\kappa$ B proteina je konstitutivno prisutna u jedru zrelih B ćelija, gde je i prvi put pronađena, dok je kod svih ostalih ćelija ovaj protein vezan za inhibitorni protein I $\kappa$ B. Različiti ekstraćelijski stimuli indukuju fosforilaciju i proteolitičku degradaciju I $\kappa$ B. Ovaj proteolitički proces aktivira NF $\kappa$ B, koji se potom translocira u jedro gde reguliše ciljne gene vezujući se za dekamerni motiv (kB motiv) GGGRNNYYCC na promotoru ili pojačavačkom (enhancerskom) regionu ciljnih gena. Degradacijom I $\kappa$ B-a dolazi do izlaganja DNK-vezujućeg domena NF $\kappa$ B transkripcionog faktora, kao i do izlaganja sekvence koja određuje njegovu lokalizaciju u jedro, čime se obezbeđuje stabilan prelazak NF $\kappa$ B u jedro, u kome on ostvaruje svoju funkciju regulacije ciljnih gena (Karin i saradnici, 2004).

Transkripcioni faktor NF $\kappa$ B eksprimiran je u ćelijama sisara. Ovaj protein je evolutivno veoma konzerviran kod različitih vrsta, a kod sisara NF $\kappa$ B familija proteina (poznata i kao Rel familija) sadrži pet članova, a to su: p50 (proizvod NF $\kappa$ B1 gena), p52 (proizvod NF $\kappa$ B2 gena), p65 (poznat i kao RelA), c-Rel i RelB. Članovi Rel familije funkcionišu kao dimeri i svih pet subjedinica imaju sposobnost da grade homo- ili heterodimere. Takođe, svi članovi familije dele Rel domen (Slika 11), koji sadrži funkcionalni region neophodan za vezivanje DNK, dimerizaciju, jedarnu lokalizaciju i interakciju sa I $\kappa$ B inhibitornim proteinima.

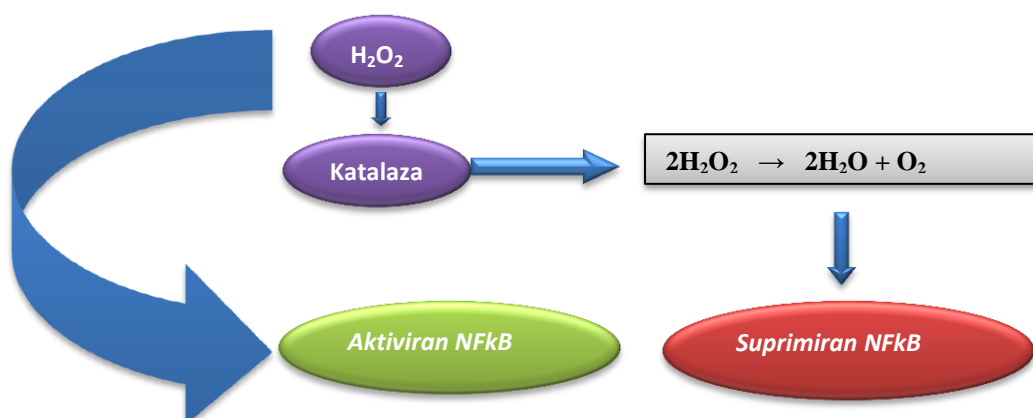
NF $\kappa$ B je otkriven zahvaljujući svojoj interakciji sa DNK sekvencom koja je deo pojačavača (eng. enhancer) kappa imunoglobulinskog lakog lanca u limfocitima (Sen i Baltimore, 1986).

Od otkrića NF $\kappa$ B, pa do danas, opisan je širok spektar stimulusa koji ga mogu aktivirati, kao i veliki broj gena i bioloških funkcija koje reguliše ovaj transkripcioni faktor. Samo neki od mnogih gena regulisani NF $\kappa$ B-om su: citokini/hemokini i njihovi modulatori, imunoreceptori, proteinski antigeni, ćelijski adhezioni molekuli, akutno fazni proteini, geni aktivirani u odgovoru na stres, ćelijski površinski receptori, regulatori apoptoze, faktori rasta i njihovi

modulatori, geni ranog odgovora, transkripcioni faktori, i enzimi bakar-cink i mangan superoksid dismutaze (CuZnSOD, MnSOD).

U odgovoru na oksidativni stres, fosfatidilinizitol 3 kinaza (PI3K) i njen nizvodni protein kinazni efektor (Akt – serin/treonin kinaza ili protein kinaza B – PKB) omogućavaju adaptaciju ćelije u cilju preživljavanja. Efekat ova dva proteina se ostvaruje preko Akt posredovane fosforilacije proapoptotskih proteina i transkripcionih faktora. Akt direktno fosforiliše NFκB protein.

Aktivirana forma NFκB preko PI3K/Akt fosforilacije stimuliše ekspresiju CuZnSOD gena, što rezultira smanjenjem oksidativnih oštećenja (Rojo i saradnici, 2004). PI3K/Akt signalni put može predstavljati senzor za količinu ROS i na taj način održavati homeostazu ROS preko transkripcione aktivacije antioksidantnih enzima.



**Slika12.** Shematski prikaz uticaja katalaze na aktivnost NFκB

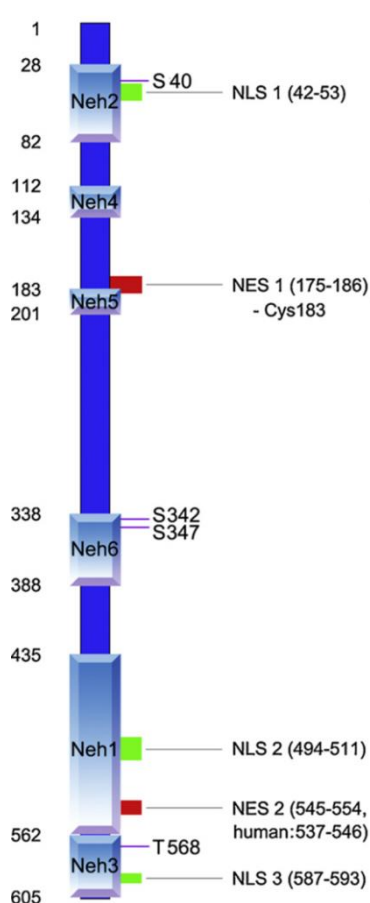
Xu i saradnici (1999) su pokazali da su ROS uključene u aktivaciju NFκB, preko TNF receptora. Xu i saradnici su pronašli nekoliko NFκB vezujućih mesta na 3' i 5' regionu kao i na intronskom regionu MnSOD gena. Lokacija ovih elemenata unutar MnSOD gena je kritična za indukciju MnSOD preko NFκB proteina posredovanu TNF.

Schmidt i saradnici (1995) su demonstrirali ulogu ROS-a u NFκB aktivaciji. U njihovim eksperimentima oni su manipulirali nivoom superoksida i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kroz različit nivo CuZnSOD-a i katalaze. Zaključili su da prekomerna ekspresija katalaze i CuZnSOD suprotno utiče na aktivnost NFκB proteina, jer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukuje NFκB

direktnije od superoksidnog anjona. Isti autori su pokazali da je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potreban za aktivaciju NFκB preko TNF. Vodoni peroksid omogućava fosforilaciju IκB inhibitorynog proteina, što rezultira u aktivaciji NFκB. Prekomerna ekspresija katalaze suprimira NFκB aktivaciju tako što uklanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji ima ulogu aktivatora ovog transkripcionog faktora (Slika 12).

### 1.8.2.2. Nrf2/Keap1 sistem u odgovoru na stres

Redoks regulacija predstavlja vrlo bitan metabolički modulator ćelijskih funkcija, i sve je više istraživanja koja potvrđuju njegovu ulogu u brojnim hroničnim inflamatornim i neurodegenerativnim bolestima. Oksidativni stres može



**Slika 13.** Funkcionalni domeni transkripcionog faktora Nrf2 (Zhana i saradnici, 2013)

da dovede do neuralnih oštećenja, da menja intracelularnu signalizaciju i konačno izazove i neuronalnu smrt.

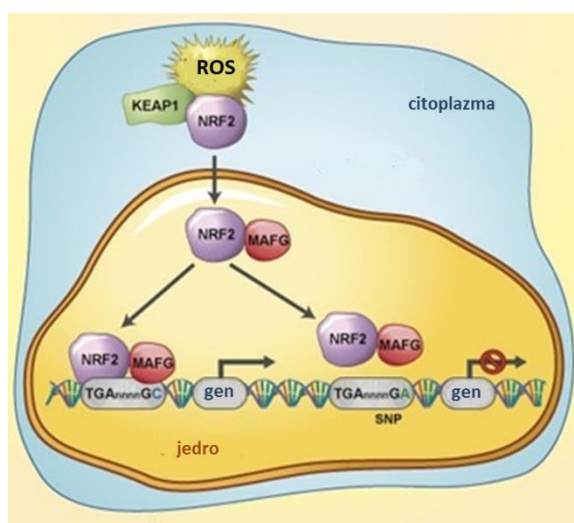
Aktivacija citoprotektivnih enzima u odgovoru na oksidativni stres dešava se prvenstveno na transkripcionom nivou. Ovaj koordinisani odgovor odvija se preko cis-vezane sekvence DNK regulisane antioksidantima (eng. antioxidant response element, ARE) i može biti aktiviran kako ROS-om tako i ostalim hemijskim jedinjenjima koja trpe metaboličke transformacije u reaktivne ili elektrofilne intermedijere. ARE je locirana u promotorskom regionu brojnih gena uključenih u borbu protiv oksidativnog stresa, inflamatornih oštećenja i akumulacije toksičnih metabolita.

Među brojnim transkripcionim faktorima koji se u uslovima izmenjenog redoks stanja u ćeliji vezuju za ARE sekvencu, posebno je interesantan nuklearni factor E2 vezani factor 2 (engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) (Nguyen i saradnici, 2009). Nrf2 pripada familiji transkripcionih faktora sa motivom leucinskog "rajfešlusa" (eng. cap `n` collar leucin zipper) (Motohashi i



saradnici, 2002). Sastoji se od šest Neh (Nrf2-ECH homolozi) domena, Neh1-6, i svaki od ovih domena ima svoju funkciju (Baird i Dinkova-Kostova, 2011; Slika 13). Ima konzervisan motiv u N-terminalnom domenu b-Zip structure, i formira heterodimerni kompleks sa malim Maf proteinima. Nrf2 je konstitutivno eksprimiran u ćeliji i prelazi u jedro odmah nakon sinteze. Nrf2 reguliše bazalnu i inducibilnu ekspresiju brojnih gena za detoksifikujuće i antioksidativne enzime (Nguyen i saradnici, 2005). Najviše je zastupljen u metaboličkim organima i organima za detoksifikaciju, poput jetre i bubrega, kao i u organima koji su konstantno izloženi uticajima iz spoljašne sredine, kao što su koža, pluća i digestivni trakt (Slika 16) (Lee i saradnici, 2005).

U bazalnim uslovima redoks senzitivni Nrf2 je lociran u citoplazmi gde je preko Keap1 (engl. Kelch ECH associated protein 1) vezan za citoskelet (Kensler i saradnici, 2007). U uslovima povećanog oksidativnog stresa Nrf2 se odvaja od



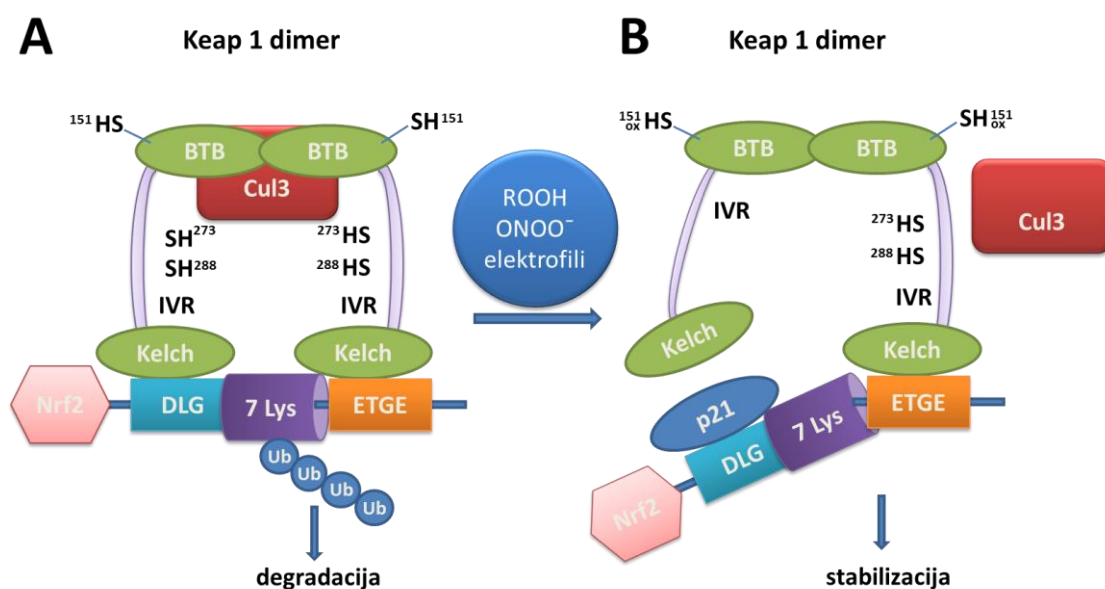
**Slika 14.** U uslovima oksidativnog stresa Nrf2 se odvaja od Keap1 proteina i iz citoplazme prelazi u jedro gde pokreće transkripciju brojnih gena

Keap1 proteina i prelazi u jedro gde pokreće transkripciju brojnih gena koji kodiraju proteine uključene u antioksidativnu zaštitu (Slika 14). Nakon aktivacije gena, transkripciona aktivnost Nrf2 se zaustavlja uz pomoć Keap1 proteina tako što Keap1 ulazi u jedro, vezuje i prenosi Nrf2 u citoplazmu gde Nrf2 vrlo brzo podleže degradaciji ubikvitinacijom.

Stabilizacija Nrf2 u ćeliji, u uslovima stresa zavisi od mehanizama koji ili sprečavaju ili smanjuju pristup Keap1 proteina Nrf2 faktoru (Motohashi i Yamamoto 2004). Nrf2/Keap1 sistem je visoko konzerviran među vrstama, i osim kod sisara nađen je i kod riba (zebrafish), dok je CNC homologni protein nađen i kod *C. elegans*.

Keap1 je aktin-vezujući citoplazmatski protein koji se sastoji od tri funkcionalna domena: BTB (bric-a-brac) domen, IVR (eng. intervening region) i

DGR (poznatiji kao Kelch domen). Keap1 formira homodimer i svaki od dimera vezuje po jedan molekul Nrf2 preko svoja dva Kelch domena sa DLG (vezujuće mesto slabog afiniteta) i ETGE (vezujuće mesto visokog afiniteta) motivom u Neh2 domenu Nrf2 faktora. Nrf2/Keap1 kompleks je povezan sa funkcionalnim E3 ubikvitin-ligaznim kompleksom (Rbx1) preko proteina Cullin3. Sedam lizinskih ostataka Nrf2 u ovom kompleksu olakšavaju ubikvitinaciju posredovanu Rbx1 proteinom (Slika 15A) (McMahon i saradnici, 2006). Ubikvitovani Nrf2 se naknadno razgrađuje uz pomoć 26S proteazoma. Dakle, inhibitorno svojstvo Keap1 potiče od uloge koju igra u degradaciji Nrf2. U uslovima oksidativnog stresa dešava se disocijacija kompleksa Nrf2/Keap1 (Kobayashi i saradnici, 2006). Bogat

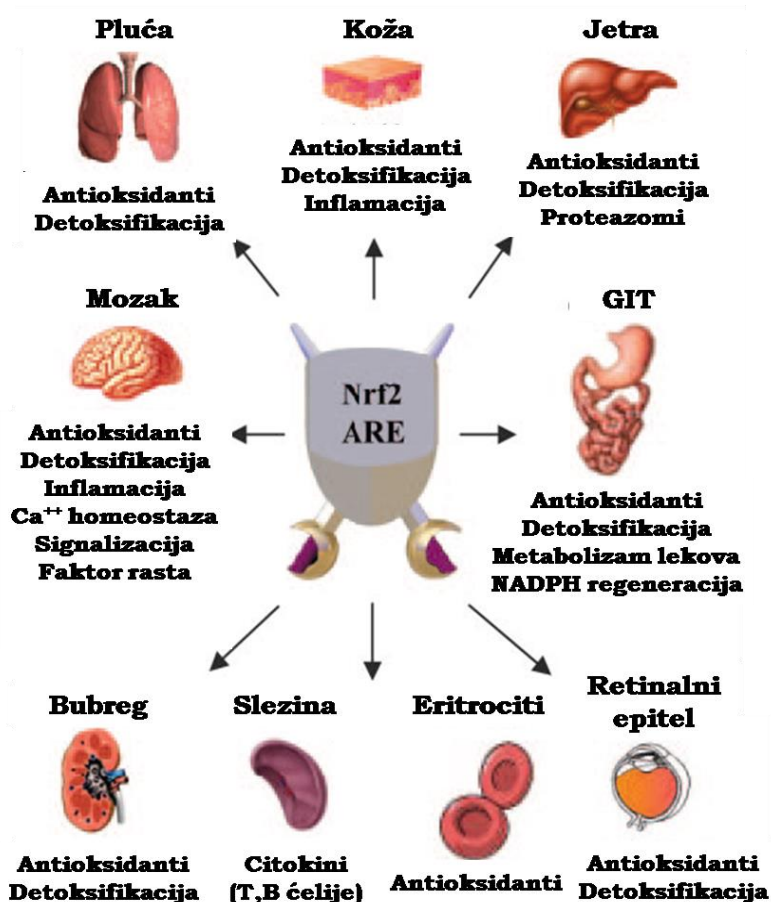


**Slika 15.** Promene u strukturi Keap1 izazvane oksidativnim stresom regulišu aktivaciju Nrf2. U bazalnim uslovima (A) Keap1 je vezan za Nrf2 i omogućava njegovu ubikvitinaciju i degradaciju. U uslovima oksidativnog stresa (B) Keap1 oslobađa Nrf2, koji potom može preći u jedro. BTB-bric-a-brac domen; IVR- eng. intervening region; DLG-vezujuće mesto slabog afiniteta; ETGE-vezujuće mesto visokog afiniteta; Ub-ubikvitin (Brigelius-Flohé i Flohé, 2011).

cisteinskim ostacima, Keap1 predstavlja dobar proteinski senzor oksidativnog stresa. Dva cisteinska ostatka u IVR domenu (Cys273 i Cys288) učestvuju u vezivanju i supresiji Nrf2 aktivnosti, dok Cys151 u BTB domenu ima suprotnu ulogu (Yamamoto i saradnici, 2008). Oksidacija ovih cisteinskih ostataka menja konformaciju Keap1 i dovodi do njegove disocijacije od DLG motiva Nrf2 (Slika 15B). Pretpostavlja se da se na ovaj način dešava inhibitorna modulacija njegove aktivnosti i samim tim aktivacija Nrf2 transkripcionog faktora u citoplazmi. Da bi

obavio svoju transkripcionu ulogu Nrf2 mora da se transportuje u jedro. Međutim, ovaj mehanizam još uvek nije potpuno razjašnjen. U regulaciji transporta brojnih transkripcionih faktora u jedro i iz njega, glavnu ulogu igraju sekvence za jedarni eksportni signal (nuclear export signal, NES) i signal za jedarnu lokalizaciju (nuclear localization signal, NLS). Tako su ove sekvence nađene i u Nrf2 proteinu (Slika 13). Pravac kretanja Nrf2 u mnogome zavisi i od balansa između tzv. 'ulaznih' i 'izlaznih' jedarnih signala, koji deluju preko ovih sekvenci (Li i Kong, 2009; Li i saradnici, 2006). Pokazano je takođe i da fosforilacija Nrf2 na Ser40 u Neh2 domenu (Huang i saradnici, 2002) utiče na disocijaciju od Keap1 (Bloom i Jaiswal, 2003) i transport ovog transkripcionog faktora u jedro (Numazawa i saradnici, 2003).

U jedru, Nrf2 formira heterodimer sa malim Maf proteinom preko svog Neh1 domena a potom se vezuje za ARE (Itoh i saradnici, 1997). Keap1



Slika 16. Nrf2 reguliše bazalnu i inducibilnu ekspresiju brojnih gena za detoksifikujuće i antioksidativne enzime u metaboličkim organima i organima za detoksifikaciju (Lee i saradnici, 2005)

takođe poseduje sekvencu za izbacivanje iz jedra (eng. nuclear export sequence, NES) u svom vezujućem regionu za CRM1/eksportin put, što ukazuje na činjenicu da se ovaj protein transportuje iz jedra u citoplazmu i obrnuto. Tako se pretpostavlja da nakon indukcije Nrf2-posredovanog antioksidativnog odgovora, Keap1 ulazi u jedro, vezuje i prenosi Nrf2 nazad u citoplazmu, gde Nrf2 vrlo brzo

podleže degradaciji ubikvitinacijom (Sun i saradnici, 2007). Preterana aktivnost Nrf2 faktora sprečena je negativnom povratnom spregom, tako što se ARE sekvence nalaze i u promotorskim regionima Cul3, Rbx1 i Keap1 gena, koji su deo kompleksa za degradaciju Nrf2 (Kaspar i Jaiswal, 2011; Lee i saradnici, 2007).

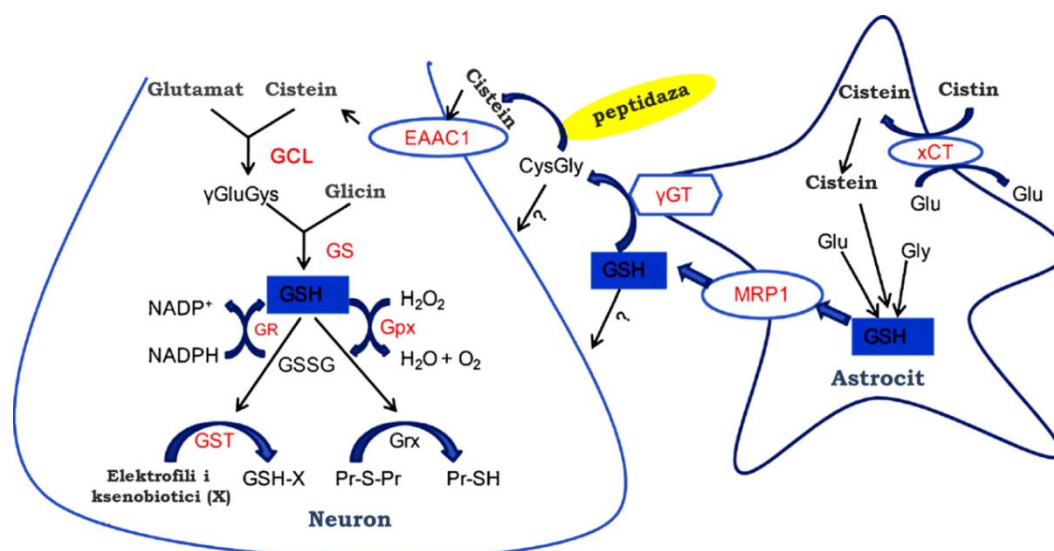
U odgovoru na oksidativni ili elektrofilni stres, Nrf2 reguliše ekspresiju sledećih gena: antioksidativnih (SOD1, hem oksigenaza), gena uključenih u glutationski put (glutation peroksidaza, glutation reduktaza, glutamat cistein ligaza), gena uključenih u tireodoksinski put (tireodoksin reduktaza, peroksiredoksin), NADPH-regenerišućih enzima (glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, fosfoglukonat dehidrogenaza, maleični enzim 1) i ksenobiotik-detoksifikujućih enzima (glutation-S-transferaza, UGT1A1, epoksid hidrolaza, karbonil reduktaza, LTB4dh, NQO1, MRP). Vezujući se za ARE sekvencu i aktivirajući ekspresiju citoprotektivnih gena Nrf2 igra takođe važnu ulogu i u zaštiti nervnih ćelija od oksidativnih oštećenja (Johnson i saradnici, 2008). Narušavanje Keap1-Nrf2 interakcije ili genetska overekspresija Nrf2 mogu povećati endogeni antioksidativni kapacitet u mozgu i tako ga zaštititi od prekomernog oksidativnog stresa. Novija istraživanja koriste ciljanu Nrf2 prekomernu ekspresiju kao terapijsku strategiju u lečenju neurodegenerativnih poremećaja (Joshi i Johnson, 2012). U CNS-u, Nrf2 takođe reguliše ekspresiju gena uključenih u redukciju potencijala, inflamaciju u astrocitima, homeostazu kalcijuma, faktora rasta, signalnih molekula i receptora/kanala.

Nedavno objavljene studije su pokazale da je u tkivima pacijenata koji boluju od različitih neuroloških poremećaja izmenjena ekspresija gena faze II koji su regulisani Nrf2/Keap1 sistemom (Zhang i saradnici, 2012), i mnogi naučnici smatraju da Nrf2-indukovana antioksidativna zaštita može dati pozitivne rezultate u borbi protiv povišenog nivoa ROS-a u neurodegenerativnim bolestima (De Vries i saradnici, 2008).

## Glutationski sistem

Redukovani glutation (GSH) je glavni neenzimski antioksidans u mozgu. Deluje kao antioksidans sinergistički sa askorbinskom kiselinom (vitaminom C) i vitaminom E, koji je esencijalan za neurološku funkciju, a oba su 'čistači' slobodnih radikala i stabilizatori membrana. GSH je važan za normalno funkcionisanje mozga jer je depo netoksičnog cisteina (Janaky i saradnici, 2000), kofaktor za brojne enzime, komponenta metaboličkih i transportnih puteva i protektor protiv reaktivnih kiseonikovih i azotnih slobodnih radikala (Aoyama i saradnici, 2008). Uklanjanje ovog pula može značajno pogoditi aktivnost respiratornog lanca i dovesti do pada energije. GSH je neophodan za strukturu mitohondrije i funkciju dok metabolički događaji uključujući oksidativni stres dovode do ireverzibilnih oštećenja i indukcije mitohondrijalne tranzitorne permeabilnosti, kompletnog kolapsa membranskog potencijala i bubrenje mitohondrijalnog matriksa.

Glija igra važnu ulogu u održavanju redoks homeostaze u neuronima (Slika 17). Tako se GSH primarno sintetise iz glutamata u astrocitima koje eksportuju GSH neuronima (Anderson i saradnici, 2003; Dringen i saradnici, 2000). Glija takođe snabdeva neurone prekursorima za sintezu glutaciona (Dringen i saradnici,



**Slika 17.** Uloga Nrf2 u sintezi glutaciona u neuronima i astrocitima. Molekuli koje regulise Nrf2 prikazani su crvenom bojom. Glu-glutamat; Cys- cistein; Gly-glicin; gGluCys-gglutamincistein; CysGly-cisteinilglicin; GSSG-glutation disulfid; GCL-g-glutamincistein ligaza; GS-glutation sintaza; Gpx-glutation peroksidaza; GR-glutation reduktaza; GST-glutation-S-transferaza; gGT-g-glutamincistein transferaza; Grx-glutareduktaza; Pr-protein; MRP1- eng. multidrug resistance protein 1; EAAC1-ekscitatorni aminokiselinski nosač 1 (Zhang i saradnici, 2013)

1999; Qin i saradnici, 2006). Neuronu sadrže enzime neophodne za sintezu GSH ali manje nego astrociti. Astrocitni GSH ima ulogu u neuroprotekciji jer je prekomerna količina glutamata u ekstracelularnoj sredini neurotoksična i astrociti imaju jak sistem za preuzimanje glutamata.

Pored samog glutaciona, glutationski redoks sistem čine i tri grupe enzima koji učestvuju u biosintezi i transferu glutaciona do njegovih supstrata, kao i u redukciji oksidovanog glutaciona. Genska ekspresija ovih enzima nalazi se pod direktnom kontrolom Nrf2 faktora (Slika 17). Sintaza GSH dešava se sukcesivnom aktivnošću dva enzima. Najpre g-glutamilcistein sintaza (GCL) vezuje glutamatnu kiselinu za cistein, i ovaj korak je glavni regulator sinteze glutaciona. Drugi enzim, glutation sintaza (GS), dodaje glicin i tako završava sintezu glutaciona. U primarnim glijalnim i neuronskim kulturama prekomerna ekspresija Nrf2 vodi povećanoj sintezi glutaciona i povećanoj ekspresiji glutation sintaze (Shih i saradnici, 2003; Vargas i Johnson JA 2009). Nrf2 takođe reguliše ekspresiju nekih membranskih transportera koji učestvuju u prenosu materijala, tj. aminokiselina neophodnih za sintezu glutaciona. Tako, na primer, ekscitatorni aminokiselinski nosač 1 (eng. excitatory amino acid carrier 1, EAAC1), transportuje cistein u neurone (Escartin i saradnici, 2011). Cistein je limitirajući supstrat za sintezu glutaciona a enzim GCL limitirajući biosintetički enzim u neuronima.

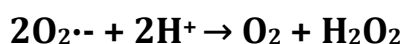
U transferu glutaciona do njegovih supstrata učestvuje nekoliko enzima a među njima su i glutation peroksidaza (GPx) i glutation S-transferaza (GST) (Shih i saradnici, 2003). Dok GPx učestvuje u redukciji vodonik peroksida i oksidovanih lipida, GST vezuje glutation za elektrofile i ksenobiotike (Raza, 2011). Neki od GST izoenzima igraju važnu ulogu u neuroprotekciji. Tako GSTP1 učestvuje u negativnoj regulaciji ciklin zavisne kinase 5, koja se vezuje za brojne neurološke poremećaje (Sun i saradnici, 2011) i suprimira proapoptotsku JNK (c-Jun N-terminalna kinaza) koja se aktivira u stresu (Elsby i saradnici, 2003). Glutation reduktaza (GLR) je zadužena za recikliranje oksidovanog glutaciona u redukovanu. Za nju je takođe pokazano da se nalazi pod regulacijom Nrf2.

### 1.8.3. Antioksidativna zaštita

Antioksidativni zaštitni sistem (eng. antioxidant system, AOS) nastao je tokom evolucije kod svih aerobnih organizama kako bi se sprečila, ograničila ili „popravila“ oštećenja nastala delovanjem reaktivnih vrsta kiseonika (eng. reactive oxygen species, ROS). Sva jedinjenja koja su prisutna u malim koncentracijama u poređenju sa koncentracijom oksidacionog supstrata, a značajno odlažu ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata, pripadaju AOS (Halliwell, 1997). AOS je vrlo kompleksan sistem koji reguliše i određuje ravnotežu između nivoa produkcije ROS i njihovog uklanjanja, i sadrži: male antioksidativne molekule poput vitamina (E, C, A), zatim primarne antioksidativne enzime (SOD, katalaza, GPx), sekundarne antioksidativne enzime (GLR i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza), glutation, glutaredoksin i tireodoksin sistem. Tu su i komponente koje imaju relativno malu specifičnu antioksidativnu aktivnost u bazalnim koncentracijama, ali mogu biti značajni antioksidansi kada su prisutni u povišenim koncentracijama. To su amino kiseline, metabolički intermedijeri i mali molekuli (cistein, histidin, piruvat, bilirubin, feritin,  $\alpha$ -tioglicerol,  $\beta$ -merkaptioetanol), peptidi i proteini (albumin, transferin, ceruplazmin, itd.) (Droge, 2002). Prema Halliwell-u i Gutteridge-u (1995) u antioksidante spadaju i: melatonin, metalotioneini,  $\alpha$ -ketoglutarat, estrogenski hormoni, dihidrolipoininska kiselina, karnozin, homokarnozin, anserin i melanin.

#### 1.8.3.1. Superoksid dismutaze

Superoksid dismutaze (SOD) su enzimi koji imaju važnu ulogu u biološkoj odbrani protiv patofizioloških promena uzrokovanih aktiviranim kiseonikom i/ili slobodnim radikalima. U mitohondrijama, superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) se formira u relativno visokim koncentracijama tokom curenja elektrona iz respiratornog lanca. SOD je veoma efikasna u eliminaciji  $O_2^{\cdot-}$ , koga uklanja putem katalizovane dismutacije superoksidnog radikala u vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i molekularni kiseonik ( $O_2$ ) (Fridovich, 1998).



Superoksidni anjon je uzročnik lipidne peroksidacije u različitim ćelijskim i tkivnim membranama, a produkti peroksidacije mogu izazvati oštećenja DNK. U tkivima sisara postoje tri izoenzima SOD koja se međusobno razlikuju po svojoj lokaciji, proteinskoj strukturi i po jonu metala koji sadrže u aktivnom centru.

**Mangan superoksid dismutaza (MnSOD)** je prvi put opisana 1973. godine. To je homotetramerni enzim molekulske mase 88000g/mol. Sintetiše se u citoplazmi kao prekursorski molekul i sadrži mitohondrijalnu target sekvencu koja omogućava transport u mitohondrije (Fridovich 1975; Shimoda-Matsubayashi i saradnici, 1996). Transportuje se u mitohondrijski matriks u blizinu elektron transportnog lanca (Fridovich, 1998). Gen za MnSOD je lokalizovan na hromozomu 6q25 i nefunkcionalnost ovog gena je letalna uz pojavu neuroloških smetnji i kardiotoksičnosti (Lebovitz i saradnici, 1996; Melov i saradnici, 1999). Količina ovog enzima u ćelijama koreliše sa metaboličkom aktivnošću određenih tkiva, pa se najveće količine ovog enzima mogu naći u srcu, mozgu, jetri, bubrezima i nadbubrežnoj žlezdi.



Slika 18. Mangan superoksid dismutaza

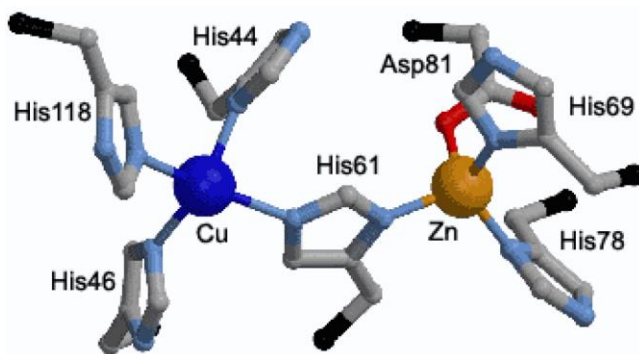
MnSOD sadrži jedan jon mangana po subjedinici. Aktivno mesto MnSOD enzima čine metalni joni (Mn) koji su koordinativnom vezom vezani sa bočnim ostacima histidina i asparaginske kiseline, u obliku trigonalne bipiramide (Slika 18).

Mnogobrojni faktori, među kojima su hiperoksija, zračenje, TNF $\alpha$ , IL-1, interferon- $\gamma$  i ćelijsko redoks stanje (Crapo i Tierney, 1974; Oberley i saradnici, 1987; Wong i Goeddel, 1988; Kinscherf i saradnici, 1997) mogu indukovati MnSOD i na iRNK i na proteinskom nivou. Promotor, kao i kontrolni region drugog introna MnSOD gena, sadrže mesto vezivanja za transkripcioni faktor NF $\kappa$ B. Nedavne studije su pokazale da pro- i antiapoptotski odgovori mogu biti aktivirani



modulacijom MnSOD ekspresije posredovane NF $\kappa$ B. Istovremeno, visok nivo ovog enzima negativno utiče na NF $\kappa$ B aktivnost (Das i saradnici, 1995) i koreliše sa slabim apoptotskim potencijalom. Takođe je pokazano da visok nivo MnSOD ima neuroprotektivnu ulogu, smanjujući apoptozu i ishemična oštećenja mozga (Keller i saradnici, 1998).

**Bakar/cink superoksid dismutaza (CuZnSOD)** se nalazi pretežno u ćelijskoj citoplazmi, ali se može detektovati i u ćelijskoj membrani, jedru i mitohondrijama. Unutar mitohondrija lokalizovan je u intermembranskom prostoru. Ovaj enzim je homodimer, molekulske mase 32000g/mol i njegov gen je lokalizovan na hromozomu 21q22. Bakar je esencijalan za katalitičku funkciju ovog enzima, dok cink ima ključnu ulogu u održavanju strukture enzima (Fridovich, 1998). Jon cinka je vezan za tri histidinska i jedan asparaginski ostatak. Atom bakra je vezan za četiri histidinska ostatka. Dva metalna jona su međusobno povezana histidinskim mostom (Slika 19). Superoksid se ne vezuje direktno za aktivno mesto, već se uz pomoć elektrostatičkog privlačenja smešta u blizinu



Slika 19. Bakar/cink superoksid dismutaza

aktivnog mesta. Specifična forma elektrostatičkog privlačenja označava se kao katjonski levak. Kada prvi superoksid bude privučen u blizinu aktivnog mesta, elektron sa njega prelazi na aktivno mesto, razgrađuje se histidinski most i dolazi do promene konformacije aktivnog mesta. Po dolasku drugog superoksida, redukovani bakar se reoksiduje, elektron se vraća na superoksidni molekul zajedno sa dva protona, gradeći molekul vodonik peroksida. Poliakrilamid gel elektroforezom izolovana su dva izoenzimska oblika humane CuZnSOD. Različiti izoenzimski oblici nastaju u procesu posttranslacijskih modifikacija primarnih transkriptata. CuZnSOD je izuzetno stabilan enzim. Otporan je na delovanje proteaza i denaturišućih agenasa. CuZnSOD igra važnu ulogu u prvoj liniji antioksidativne obrane.

aktivnog mesta. Specifična forma elektrostatičkog privlačenja označava se kao katjonski levak. Kada prvi superoksid bude privučen u blizinu aktivnog mesta, elektron sa njega prelazi na aktivno mesto, razgrađuje se histidinski most i dolazi do

Biološki poluživot CuZnSOD je 5-15 min u slobodnoj formi, a 24h u lipozomalnoj formi. Pokazano je prisustvo ovog enzima u svim tkivima kao i u plazmi i eritrocitima, a posebno visoku aktivnost pokazuje u jetri, bubrezima, srcu, centralnom nervnom sistemu i nadbubrežnoj žlezdi (Marklund, 1984). Inkubacija sa niskim dozama vodonik peroksida u trajanju od 24 h blago povećava aktivnost ovog enzima, pružajući dokaze da oksidativni stres indukuje ovaj enzim. Nasuprot tome visoke koncentracije vodonik peroksida smanjuju enzimsku aktivnost, ne menjajući iRNA nivo CuZnSOD.

Promotorski region CuZnSOD gena sadrži vezujuće mesto za NFκB transkripcioni faktor, kao i za GR (Kim i saradnici, 1994). CuZnSOD i MnSOD su visoko eksprimirane u neuronima. Međutim, ove dve SOD nisu koordinisano regulisane u odgovoru na različite vrste oksidanata ili citokina. Naime, indukcija CuZnSOD citokinima, oksidantima, interleukinima je manja u poređenju sa indukcijom MnSOD (Isoherranen i saradnici, 1997). Takođe, nefunkcionalnost CuZnSOD gena nije letalna, kao što je to slučaj sa MnSOD, već samo povećava podložnost neurološkim oštećenjima (Reaume i saradnici, 1996). Mutacije u genu za CuZnSOD nađene su kod obolelih od amiotrofične lateralne skleroze (Rosen i saradnici, 1993), kao i kod osoba sa Daunovim sindromom, gde je zbog trizomije 21. hromozoma detektovana i veća količina ovog enzima praćena povećanom lipidnom peroksidacijom u cerebralnom korteksu (Brooksbank i Balazs, 1984).

**Ekstracelularna superoksid dismutaza** je tetramerni, slabo hidrofobni glikoprotein. Sadrži jedan atom Zn i jedan atom Cu u aktivnom centru. Po svojim strukturnim osobinama, ekstracelularna SOD je sličnija CuZnSOD, nego MnSOD. Ima veliki afinitet za glikozaminoglikane, kao što su heparin i heparansulfat. U zavisnosti od sposobnosti vezivanja za heparin razlikujemo tri frakcije ekstracelularne SOD: frakcija A (ne poseduje afinitet za heparin), frakcija B (poseduje slabi afinitet za heparin) i frakcija C (poseduje veliki afinitet za heparin). Ekstracelularna SOD sintetizuju fibroblasti, ćelije gljive, makrofagi, hondrociti i endotelne ćelije. Prisutna je u ekstracelularnoj sredini: plazmi, limfi i cerebrospinalnom likvoru. Ekspirimira se u mozgu, ali mnogo manje od CuZnSOD i MnSOD.

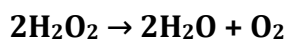
### 1.8.3.2. Katalaza

Katalaza je jedan od najrasprostranjenijih enzima u prirodi i nalazi se u svim živim organizmima. To je homotetramerni enzim molekulske mase 24000g/mol (Slika 20). Lokalizovana je uglavnom u peroksizomima, ali se može naći i u citoplazmi i u mitohondrijama (Radi i saradnici, 1991; Kinnula i saradnici, 1995; Fridovich 1998). Gen za humanu katalazu je mapiran na hromozomu 11p13. Poznata su tri izoenzimska oblika (A, B, C) koji nastaju posttranslacionom modifikacijom primarnog proteina. Svaki monomer sadrži prostetetičnu grupu sa hemom u katalitičkom centru, koji se sastoji od protoporfirinskog prstena i centralnog



Slika 20. Katalaza

atoma Fe. Monomeri katalaze kod određenih vrsta takođe sadrže vezan NADPH, koji štiti enzim od oksidanata, kao što je i sam supstrat katalaze,  $H_2O_2$ , i povećava njegovu efikasnost (Nordberg i Arner, 2001). Katalaza ima dominantnu ulogu u razgradnji  $H_2O_2$  kada je njena produkcija povećana (Jones i saradnici, 1981). Tokom katalitičkog ciklusa  $H_2O_2$  se razlaže na vodu i kiseonik.



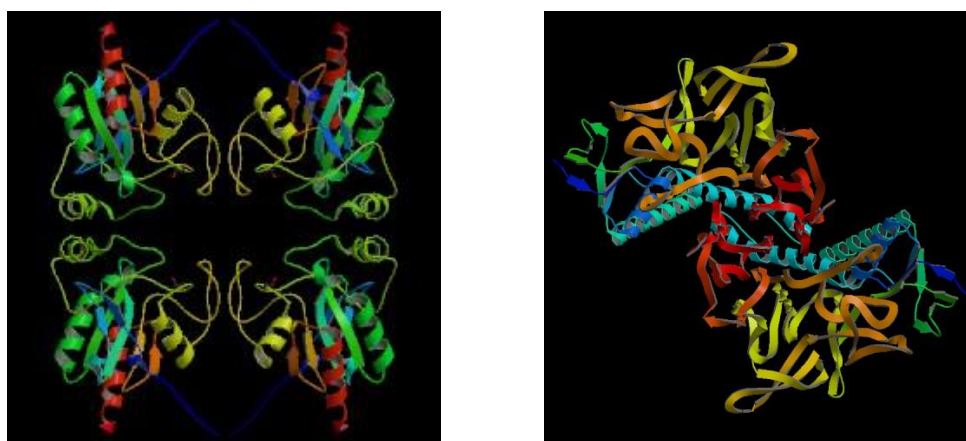
Ova reakcija odigrava se u dva koraka. Najpre se vezuje jedan molekul  $H_2O_2$ , iz koga se izvlači jedan atom kiseonika i vezuje za centralni atom gvožđa uz oslobađanje molekula vode. Kada se veže drugi molekul  $H_2O_2$ , drugi atom kiseonika se kombinuje sa atomom kiseonika vezanim za gvožđe, i oslobađa se još jedan molekul vode i  $O_2$ . Antioksidativna uloga katalaze je da smanji rizik od formiranja hidroksilnih radikala iz  $H_2O_2$  preko Fentonove reakcije katalizovane jonima Cu ili Fe. Katalaza takođe ima funkciju da detoksifikuje različite supstrate, npr. fenole i alkohole, preko kuplovane redukcije  $H_2O_2$ . Pri fiziološkim koncentracijama  $H_2O_2$  prevladava peroksidazni tip reakcije. Dok glavnu ulogu u odstranjivanju malih količina vodonikovog peroksida ima GPx, katalazna aktivnost se detektuje tek pri većim koncentracijama  $H_2O_2$ , što govori da je katalaza

isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uslovima oksidativnog stresa. Hiperoksija, oksidansi i citokini mogu indukovati aktivnost katalaze. Čelije proizvode  $O_2^-$  pod normalnim i patološkim uslovima. Reakcija katalaze sa ovom reaktivnom vrstom rezultuje u inaktivaciji enzima. Posledica inhibicije ovog enzima je povećan nivo  $H_2O_2$ , koji može izazvati oštećenje tkiva.

Katalaza je prisutna u svim tkivima sisara, pri čemu se visokom aktivnošću posebno ističu jetra i eritrociti. Mala aktivnost enzima nađena je u mozgu, srcu, skeletnim mišićima i slezini (Halliwell i Gutteridge, 1995). Katalaza je zadužena za uklanjanje viška vodonik peroksida u neronima (Schad i saradnici, 2003), dok u mikroglialnim ćelijama tu funkciju vrši prvenstveno GPx (Lindenau i saradnici, 1998). Narušen peroksidazni sistem registrovan je u nekim studijama starenja kod miševa (DeHaan i saradnici, 2003).

### 1.8.3.3. Glutation peroksidaza i glutacion reduktaza

Centralno mesto u redukciji organskih hidroperoksida zauzima enzim **glutation peroksidaza, GPx** (Slika 21).



**Slika 21.** *Glutation peroksidaza i glutacion reduktaza*

Postoji nekoliko oblika ovog enzima i to:

1) selen-zavisna glutacion peroksidaza (Se-GPx) koja redukuje  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole, uz prisustvo glutaciona kao drugog supstrata. Primarno je citosolni i mitohondrijalni tetramerni selenoprotein,

i u aktivnom centru ima selen u obliku selenocisteina. Selen je neophodan za sintezu i enzimsku aktivnost GPx-a.

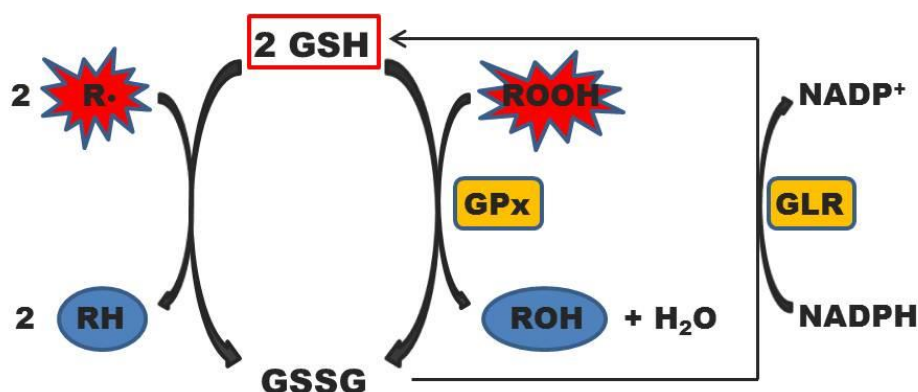
2) selen-nezavisna forma, koja koristi samo organske hidroperokside kao supstrate i pripada familiji enzima glutathion-S-transferaze, GST, koji katalizuju reakcije konjugacije redukovano glutathiona sa raznim organskim jedinjenjima. GST je multifunkcionalni enzim, nalazi se u citosolu, dimer je i ima tri različite funkcije: katalizuje reakcije konjugacije redukovano glutathiona sa različitim elektrofilima, deluje kao vezujući protein za različite supstance (steroidi, metaboliti i neki lekovi) i kovalentno vezuje neke kancerogene, pesticide i potencijalno toksične supstance;

3) enzim fosfolipid-hidroperoksid glutathion peroksidaza, PH-GPx, koja reaguje samo sa fosfolipidnim hidroperoksidima, redukuje fosfolipide, monomer je, u aktivnom centru sadrži selenocistein, nalazi se u citosolu, jedina je forma glutathion peroksidaze koja inhibira proces lipidne peroksidacije uz obavezno prisustvo fizioloških koncentracija vitamina E. Različite izoforme enzima različito su raspoređene po tkivima. Tkiva s najvećom količinom GPx su jetra i bubrezi, u umerenoj količini prisutna je u srcu, plućima i mozgu, a malo je ima u mišićima.

Neuroprotektivna uloga ovog enzima dokumentovana je u mnogim radovima (DeHaan i saradnici, 2003; Weisbrot-Lefkowitz i saradnici, 1998). Takođe, izmenjena aktivnost ovog enzima primećena je kod životinjskih modela stresom indukovane depresije (Eren i saradnici, 2007), kao i u patogenezi neurodegenerativnih bolesti u nekim kliničkim studijama (Power i Blumbergs, 2009). GPx-a najviše ima u mikroglijalnim ćelijama (Lindenau i saradnici, 1998), dok je u neuronima i astrocitima mnogo manje zastupljen. Glutathion peroksidaza je nekoliko puta više zastupljenija u mozgu od katalaze.

Za enzimsku aktivnost GPx-a neophodno je prisustvo redukovano glutathiona koji služi kao kosupstrat. Glutathion je najzastupljeniji intraćelijski antioksidans baziran na tiolu. Prisutan je u milimolarnim koncentracijama u svim sisarskim ćelijama, sintetiše se u citoplazmi iz glutamata, glicina i cisteina, a zatim se transportuje u mitohondrije (Dringen i saradnici, 2000). Uglavnom ima funkciju sulfhidrilnog pufera, ali služi i kao detoksifikujuća komponenta  $H_2O_2$  u GPx

katalizovanoj reakciji pri čemu prelazi u oksidovanu formu GSSG (Slika 22). Redukovani glutatjon je glavni neenzimski antioksidans u mozgu. Deluje kao antioksidans sinergistički sa askorbinskom kiselinom i vitaminom E, koji je esencijalan za neurološku funkciju a oba su 'čistači' slobodnih radikala i stabilizatori membrana. Razlozi zašto je GSH važan za normalno funkcionisanje mozga su jer je on depo netoksičnog cisteina, kofaktor koji je esencijalan za brojne enzime, komponenta metaboličkih i transportnih puteva i protektor protiv reaktivnih slobodnih radikala kiseonika i azota. Uklanjanje glutationskog pula može značajno pogoditi aktivnost respiratornog lanca i dovesti do pada energije.



**Slika 22.** Glutatjon redukuje slobodne radikale ( $R\bullet$ ) u neenzimskoj reakciji, dok se u enzimskoj reakciji ponaša kao donor elektrona za redukciju peroksida ( $ROOH$ ) glutatjon peroksidazom ( $GPx$ ). Glutatjon reduktaza ( $GLR$ ) regeneriše GSH iz GSSG koristeći NADPH kao kofaktor.

GSH je neophodan za strukturu mitohondrije i funkciju dok metabolički događaji uključujući oksidativni stres dovode do ireverzibilnih oštećenja i indukcije mitohondrijalne tranzitorne permeabilnosti, kompletnog kolapsa membranskog potencijala i bubrenje mitohondrijalnog matriksa. Metabolizam GSH u mozgu je usko povezan sa homeostazom tiola. GSH se primarno sintetiše iz glutamata u astrocitima koje eksportuju GSH neuronima (Dringen i saradnici, 1999). Neuronima sadrže enzime neophodne za sintezu GSH ali manje nego astrociti. Astrocitni GSH ima ulogu u neuroprotekciji jer je prekomerna količina glutamata u ekstracelularnoj sredini neurotoksična i astrociti imaju jak sistem za preuzimanje glutamata.

Oksidovani glutation (GSSG) se redukuje NADPH-zavisnim flavoenzimom GLR-om. Glutation reduktaza katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa u redukovani glutation, uz učešće NADPH kao redukujućeg kofaktora. GLR je dimer (Slika 21) čija svaka subjedinica sadrži u aktivnom centru flavin adenin dinukleotid (FAD). Nalazi se u citoplazmi i mitohondrijama, a njegova glavna funkcija je da održava glutation u redukovanom obliku. Ima značajnu ulogu u zaštiti organizma od oksidativnih oštećenja. Nedostatak ovog enzima dokumentovan je u različitim patološkim stanjima (Loos i saradnici, 1976). Povećana aktivnost GLR kao odgovor na oksidativni stres, rezultat je indukcije sinteze specifične iRNK, kao i uspostavljanja ravnoteže sa ostalim komponentama antioksidativnog sistema zaštite (Mullineaux i Creissen, 1997). GSSG može takođe efikasno biti redukovano tioredoksinom (Nordberg i Arner, 2001).

## **2. Cilj rada**



Budući da je poznato da je hronični stres jedan od najčešćih etioloških faktora u razvoju psihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti, i da se u osnovi ovih bolesti često nalazi oksidativni stres ili neadekvatna antioksidativna zaštita, osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je da se ispita efekat hroničnog stresa socijalne izolacije, koja predstavlja model najbliži ljudskim studijama psihosocijalnog stresa, na mehanizme antioksidativne zaštite u jetri i u limbičkim strukturama mozga (hipokampusu i prefrontalnom korteksu), kod mužjaka pacova Wistar soja.

Bilo je od interesa da promene do kojih dovodi socijalna izolacija, okarakterišemo i na nivou ponašanja životinja.

Ispitali smo da li mehanizmi uočenih promena uključuju hormonsku signalizaciju u stresu, na nivou kortikosterona, kao i aktiviranje transkripcionih faktora osetljivih na oksidativni stres i ekspresiju gena koji su njima regulisani.

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio je da se pokaže da li na nivou antioksidativne zaštite postoji razlika u odgovoru na stres između hipokampusa i prefrontalnog korteksa.

Takođe smo želeli da ispitamo da li socijalna izolacija menja antioksidativni odgovor praćenih struktura na naknadni akutni stresor. Moguće efekte neadekvatnog odgovora definisali smo kao ireverzibilne promene na nivou studiranih parametara.

### **3. Materijal i metode**

### 3.1. Materijal

U eksperimentima smo koristili hemikalije p.a. (pro analisi) stepena čistoće. Od firme Sigma Chemical Company, St. Louis, USA, smo nabavili natrijum dodecil sulfat (eng. sodiumdodecyl sulphate, SDS), fenilmetilsulfonil hlorid (PMSF), Tween-20, saharozu, natrijum fluorid,  $\beta$ -merkaptoetanol, ditiotreitol (DTT), etilendiamino tetrasirćetnu kiselinu (Na<sub>2</sub>EDTA), akrilamid, bisakrilamid, Folin reagens, Tris bazu, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin), dietilpirokarbonat (DEPC), agarozu, difenilamin. Od firme SERVA electrophoresis, Heidelberg, Germany, smo nabavili sledeće hemikalije: glicin i proteazne inhibitore: aprotinin, leupeptin i antipain. Za ispitivanje koncentracije kortikosterona u serumu smo koristili Corticosterone OCTEIA kit, American Laboratory Products Co, a za određivanje koncentracije glukoze u krvi Accutrend aparat firme Roche Diagnostics, USA. Za merenje aktivnosti MnSOD i CuZnSOD u moždanim strukturama smo koristili komercijalni kit, Randox Laboratories, Crumlin, UK.

Za prepisivanje RNK u cDNK smo koristili High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit firme Applied Biosystems. Hemikalije koje smo koristili za lančanu polimeraznu reakciju (PCR) su proizvodi firme Fermentas, Lithuania, a „prajmeri“ su proizvodi firme Metabion, Germany.

Antitela koja smo koristili u Western blot analizi su od sledećih proizvođača: zečja poliklonska antitela na GR (M-20), NF $\kappa$ B (C-20), GPx (H-151), GLR (H-120), kao i mišja monoklonska antitela na Hsp90  $\alpha/\beta$  (F-8) su proizvod firme Santa Cruz Biotechnology, USA. Zečje poliklonsko antitelo na  $\beta$ -aktin (ab 8227) je proizvod firme Abcam. Zečja poliklonska antitela na MnSOD (SOD-101) i CuZnSOD (SOD-100), kao i mišje monoklonsko antitelo na Hsp70 (NS 27F3-4) su proizvod firme Stressgen, USA, a mišja monoklonska antitela na Nrf2 (MAB3925) i Keap1 (MAB3024) su proizvod firme R&D Systems. Zečje poliklonsko antitelo na katalazu je proizvod firme Calbiochem, a mišje monoklonsko antitelo na mHsp70 (MA3028) je proizvod firme Affinity Bioreagents. Sva sekundarna antitela obeležena peroksidazom izolovanom iz rena (HRP, eng. horse-radish peroxidase) smo nabavili od firme Amersham, USA. Za detekciju hemiluminiscencije obeleženih

proteina na Western blot-u smo koristili koncentrovani ECL supstrat proizvođača Pierce, USA.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Gajenje eksperimentalnih životinja

U svim eksperimentima smo radili sa odraslim mužjacima pacova Wistar soja, starim 2.5 do 3 meseca, telesne mase od 330 do 400 g. Životinje smo gajili po 4 jedinke u plastičnom kavezu standardne veličine (širina 32 cm, dužina 46 cm i visina 22 cm), sa hranom i vodom ad libitum, na sobnoj temperaturi od  $20 \pm 2$  °C, sa pravilnom smenom svetla i mraka u intervalima od po 12 sati (Slika 23). Vlažnost vazduha u prostoriji bila je 55 %.

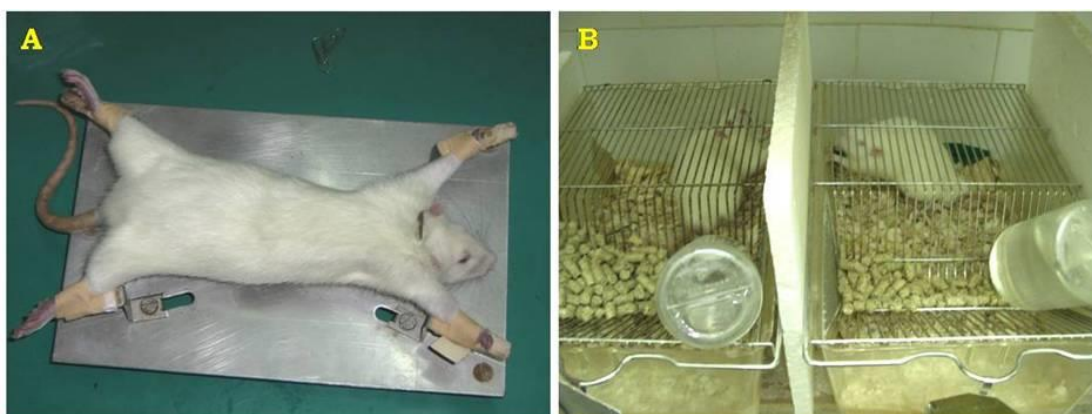


*Slika 23. Gajenje eksperimentalnih životinja*

Sve životinje smo gajili u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta „Vinča“ i sve procedure na životinjama su odobrene od strane Etičkog komiteta za korišćenje laboratorijskih životinja Instituta za nuklearne nauke u Vinči, i prema nacrtima Srpskog udruženja za korišćenje životinja u nauci i obrazovanju (engl. Serbian Laboratory Animal Science Association, SLASA).

### 3.2.2. Tretman eksperimentalnih životinja

U našim eksperimentima smo želeli da proučimo promene koje stres socijalne izolacije izaziva kod mužjaka Wistar pacova, kao i njegov uticaj na odgovor životinje na akutni stres imobilizacijom koji se smatra normalnim odgovorom na stres. Za potrebe eksperimenta, životinje smo podelili u četiri grupe. U prvoj grupi su bile kontrolne, nestresirane životinje, koje su odgajane u standardnim (prethodno opisanim) laboratorijskim uslovima. Drugu grupu su činile životinje koje smo izlagali akutnoj imobilizaciji po metodi Kvetnanskog i Mikulaja (1970), u trajanju od 30 min (9.00–9.30h). Životinje smo imobilisali u ležećem opruženom položaju na imobilizacionoj dasci, okrenute stomakom na dole, tako što smo fiksirali glavu metalnom petljom a ekstremitete eksperimentalne životinje leukoplastom za držače ploče (Slika 24A). Ova vrsta imobilizacije je standardna procedura, koja dovodi do dobro okarakterisanog povećanja kateholamina i kortikosteroida. Ovaj tretman smo koristili kao model



**Slika 24.** Tretman eksperimentalnih životinja A) akutnom imobilizacijom i B) hroničnom socijalnom izolacijom

normalnog odgovora na stres. Treću grupu životinja smo izlagali hroničnom stresu izolacije u trajanju od 21 dana. Hronični stres izolacije smo izvodili tako što smo životinje čuvali individualno u kavezima 21 dan, pri čemu ove životinje nisu bile u mogućnosti da se vide ili dodiruju, ali su imale delom normalne slušne i mirisne kontakte (Slika 24B). Da bi proverili da li životinje koje su živele u izolaciji 21 dan imaju sposobnost da na akutni stres odgovore isto kao kontrolne životinje, koristili smo model kombinovanog stresa, gde smo životinje koje su bile izolovane 21 dan naknadno podvrgnuli akutnom stresu imobilizacijom (četvrta grupa).

Sve četiri eksperimentalne grupe životinja smo 1h pre tretiranja imobilizacijom i/ili žrtvovanja prebacili u prostoriju gde smo izvodili eksperiment. Za potrebe dodatnog eksperimenta gde smo pratili promene u subćelijskoj distribuciji Nrf2 i Keap1 proteina tokom trajanja akutnog stresa, koristili smo životinje koje smo izlagali akutnoj imobilizaciji u trajanju od 5, 10, 20 i 30 minuta. Životinje smo žrtvovali dekapitacijom na giljotini (Harvard-Apparatus, USA), neposredno posle tretmana, u isto vreme, da bi izbegli varijacije u novou kortikosterona koje potiču od cirkadijalnog ritma glukokortikoida.

### **3.2.3. Testovi ponašanja**

Testove ponašanja smo radili samo sa kontrolnim i hronično stresiranim životinjama, da bi utvrdili da li hronična socijalna izolacija izaziva promene u ponašanju koje su nalik na anksiozno i depresivno ponašanje. U tu svrhu smo koristili testove za analizu anksioznog ponašanja - test izdignutog plus lavirinta (eng. elevated plus maze, EPM) i test za analizu depresivnog ponašanja- test forsiranog plivanja (eng. forced swimming test, FST). Sve testove smo izvodili tokom dana, u periodu između 9.00-15.00h, i sve životinje smo 1h pre testiranja prebacili u prostoriju gde smo izvodili testove ponašanja.

#### **3.2.3.1. Test izdignutog plus lavirinta**

Test izdignutog plus lavirinta je jednostavan metod koji se koristi za procenu anksioznog ponašanja životinja (Walf i Frye 2007). Pacovi i miševi prirodno izbegavaju jako osvetljena, nepoznata mesta i otvoren prostor, tako da okruženje koje im je ponuđeno u ovom testu (otvoreni krakovi) za njih predstavlja anksiogeni stimulus što omogućava eksperimentatoru da merenjem vremena koje životinja provede u zatvorenim krakovima lavirinta odredi da li se životinja ponaša anksiozno.

Improvizovana aparatura koju smo koristili za test izdignutog plus lavirinta se sastoji od 4 kraka izdignutih na platformu visine 50 cm. Dva naspramna kraka dimenzija 50 x 10 cm su otvorena a druga dva istih dimenzija imaju i zidove visine 50 cm (Slika 25). Testiranje smo izvodili u sobi sa kontrolisanom temperaturom,

bukom i osvetljenjem. Životinje smo uneli u sobu za testiranje sat vremena pre početka testa. Sva testiranja smo radili u periodu između 9.00-12.00h u zatamnjenoj prostoriji. Životinju smo postavljali u centar platforme tako da bude okrenuta otvorenom kraku, nakon čega smo započinjali snimanje kamerom (Canon S3, Japan) u trajanju od 5 minuta. U testu smo pratili sledeće elemente ponašanja: ukupan broj ulaza (kada je životinja sa 3 šape u kraku), broj ulaza u otvorena i zatvorena polja lavirinta, kao i vreme koje životinja provodi u otvorenim poljima



**Slika 25.** Test izdignutog plus lavirinta (EPM)

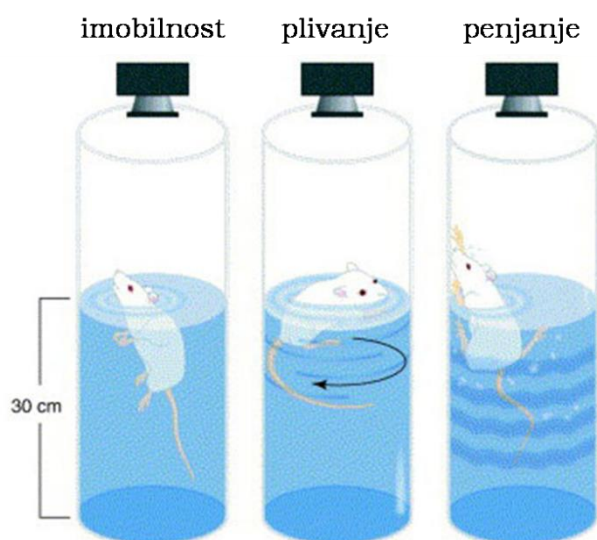
lavirinta. Posle svakog testiranja, životinje smo vraćali u svoje kaveze i zatim u sobu gde su odgajane, a prostor za testiranje smo čistili rastvorom 90% etanola. Video snimke pojedinačnih testiranja smo analizirali subjektivnom metodom od strane dva eksperimentatora. Snimak (rezolucije 640 x 480) je analiziran u programu Windows Media Player 11.

Kamera koju smo koristili ima brzinu blende (eng. shutter speed) od 1/3200, kao i mogućnost automatskog smanjivanja brzine otvaranja blende (eng. high ISO auto setting i optical image stabilizer) koje je neophodno za uspešno snimanje u zamračenim uslovima.

### 3.2.3.2. Test forsiranog plivanja

Test forsiranog plivanja se smatra standardnim testom za praćenje ponašanja koje je nalik depresivnom ponašanju (eng. depressive-like behavior) i najčešće se koristi da se odredi efikasnost antidepresiva u korekciji ponašanja laboratorijskih životinja (uglavnom pacova i miševa).

Test forsiranog plivanja po metodi Porsolta (Porsolt i saradnici, 1977) smo radili jedan dan nakon testiranja u izdignutom plus lavirintu. Životinje smo uneli u sobu za testiranje 30 min pre početka testa. Sva testiranja smo radili u periodu između 9.00-12.00h u zatamnjenoj prostoriji. Improvizovana aparatura koju smo



Slika 26. Test forsiranog plivanja (FST)

koristili za test forsiranog plivanja predstavlja cilindar od pleksiglasa (visine 50 cm i prečnika 20 cm), koji je napunjen vodom temperature  $24.0 \pm 0.5$  °C, do visine od  $30 \pm 1.5$  cm. Životinju smo spuštali u cilindar sa vodom gde joj je dozvoljeno da pliva u uslovima u kojima izlazak iz cilindra nije moguć (Slika 26) u trajanju od 5 minuta. Posle svakog testiranja, životinje smo vraćali u

svoje kaveze i zatim u sobu gde su odgajane. Takođe, nakon svakog testiranja, cilindar smo čistili i punili svežom vodom, jer je pokazano da korišćenje vode u kojoj je prethodno plivala druga životinja menja njihovo ponašanje.

Svako pojedinačno testiranje smo snimali u zamračenoj sobi video kamerom (Canon S3, Japan) iz dva položaja (iznad cilindra i sa strane), a snimak smo naknadno analizirali, na isti način kao i test izdignutog plus lavirinta. Vremenski interval od 5 minuta smo podelili u 60 mini intervala od 5 sekundi, i sa snimka smo za svaki mini interval određivali jedno od tri dominantna ponašanja: imobilnost, plivanje ili penjanje (Slika 26). Imobilnost smo definisali kao izostanak pokreta celog tela, osim malih pokreta, neophodnih da životinja održi glavu iznad vode. Plivanje smo definisali kao namerno horizontalno kružno kretanje životinje po cilindru, po površini vode. Pod penjanjem se podrazumevaju intenzivni pokreti šapama po površini vode ili uz zid cilindra, gde životinja pokušava da izađe iz cilindra.



### 3.2.4. Priprema tkiva i seruma

Za potrebe analiza jetre i moždanih tkiva hipokampusa i PFC-a životinje smo žrtvovali dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus). Mozak smo izolovali i brzo prebacili na led a zatim smo odvajali hipokampus i PFC. Jetru smo perfundovali hladnim fiziološkim rastvorom, izolovali i prebacili takođe na led. Tkiva smo trenutno zamrzavali u tečnom azotu i čuvali na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalje obrade. Krv smo sakupljali u epruvete i ostavili da koaguliše na sobnoj temperaturi 30 min, nakon čega smo je centrifugirali 15 min na 3000 rpm (Heraus centrifuga). Dobijene serume smo čuvali na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do ELISA eseja.

### 3.2.5. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu i glukoze u krvi

Koncentraciju kortikosterona u serumu smo određivali esejem specifičnim za pacovski serum (OCTEIA kit, American Laboratory Products Co). To je kompetitivni ELISA esej u kome je poliklonsko antitelo na kortikosteron vezano za unutrašnju površinu mikrotitar ploče. Kalibratore (standarde), kontrolne uzorke i razblažene uzorke nepoznate koncentracije kortikosterona smo nanosili na ploču u duplikatu i inkubirali preko noći na  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  sa antitelom koje je konjugovano sa HRP. Ploču smo zatim tri puta sukcesivno isprali, i dodali hromogeni supstrat tetrametilbenzidin (TMB) koji dovodi do razvijanja boje. Enzimsku reakciju smo prekinuli dodavanjem STOP rastvora ( $0.5\text{ M HCl}$ ), nakon čega smo očitali apsorbancu na  $450\text{ nm}$  i  $650\text{ nm}$  ( $650\text{ nm}$  je korekciona OD) na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, LKB). Intenzitet razvijene boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji kortikosterona u uzorku. Vrednosti koje smo očitali sa semilogaritamske standardne krive smo izrazili u ng/ml.

Koncentraciju glukoze u krvi smo odredili pomoću komercijalnih traka za merenje glukoze (Accutrend strips). Na traku smo naneli  $10\text{ }\mu\text{l}$  krvi i koncentraciju glukoze smo automatski očitali sa Accutrend aparata.

### **3.2.6. Izolovanje proteina i priprema citosolnih, jedarnih, mitohondrijalnih i peroksizomalnih frakcija moždanih struktura**

Za određivanje nivoa proteina smo koristili specifične subćelijske frakcije, i to citosolnu, jedarnu, mitohondrijalnu i peroksizomalnu frakciju obe moždane strukture. Subćelijske frakcije smo dobijali iz skupine 4 hipokampusu ili 4 PFC-a. Pulovalo, smrznuto tkivo smo homogenizovali u homogenizeru staklo-teflon (Potter-Elvehjem) sa 20 zaveslaja tučkom, u 2 zapremine hladnog (4 °C) 20 mM Tris-HCl pufera (pH 7.4) koji je sadržao 10 % glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM Na<sub>2</sub>EGTA, 2 mM DTT i proteazne (20 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml tripsin inhibitor i 3 mM benzamidin) i fosfatazne inhibitore (20 mM β-glicerofosfat, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25 mM NaF), dodate neposredno pred rad. Homogenat smo centrifugirali 10 min/2000 x g/4 °C (Eppendorf 5417), nakon čega smo supernatant koristili za dobijanje citosola i mitohondrija, a talog za dobijanje jedarnog ekstrakta.

Dobijeni supernatant smo dalje centrifugirali 30 min/20,000 x g/4 °C da bi dobili mitohondrijalnu frakciju u talogu, i supernatant čijim smo daljim centrifugiranjem 60 min na 105,000 x g (4 °C) (Beckman L8-M) dobili finalni supernatant koji predstavlja citosolnu frakciju. Citosolnu frakciju smo alikvotirali i čuvali na -70 °C. Talog koji smo dobili u ovom centrifugiranju smo lizirali u puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 % glicerol, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5 mM DTT, prethodno pomenuti proteazni inhibitori i 0.05 % Triton X-100), inkubirali na ledu 90 min uz često intenzivno mućkanje (vorteksovanje) da bi dobili peroksizomalnu frakciju. Mitohondrijalnu frakciju smo oprali tri puta u po 0.5 ml homogenizacionog pufera i centrifugirali na 2000xg u trajanju od 30 min. Dobijeni talog smo lizirali u puferu i inkubirali na ledu 90 min uz često vorteksovanje da bi dobili finalni mitohondrijalni ekstrakt. Talog dobijen u prvom centrifugiranju smo oprali tri puta u po 0.5 ml homogenizacionog pufera (10min/2000 x g/ 4 °C) da bi dobili prečišćena jedra. Jedra smo resuspendovali u ekvivalentnoj zapremini pufera za liziranje jedara (homogenizacioni pufer kome je dodat KCl u finalnoj koncentraciji

0.5 M), inkubirali na ledu 60 min, uz intenzivno vorteksovanje, a zatim centrifugirali 10 min na 8000 x g. Dobijene supernatante koje smo koristili kao jedarni ekstrakt, smo alikvotirali i čuvali na -70 °C.

### 3.2.7. Izolovanje proteina i priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta jetre

Tkivo jetre smo homogenizovali u homogenizeru staklo-teflon Potter-Elvehjem sa 20 zaveslaja tučka u deset zapremina hladnog (4 °C) pufera (0.32 M saharoza, 5 mM HEPES, 20 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml tripsin inhibitor i 3 mM benzamidin). Homogenate smo inkubirali na ledu 120 min uz vorteksovanje, nakon čega smo ih centrifugirali 30 min na 12000 rpm (4 °C). Dobijene supernatante smo koristili kao ukupni ćelijski ekstrakt jetre.

### 3.2.8. Određivanje koncentracije proteina

U ćelijskim ekstraktima smo određivali koncentraciju proteina po Lowry – ju (1951). Mikro metoda se koristi kada je očekivana koncentracija proteina u uzorku u opsegu od 5 µg/ml do 50 µg/ml. Standard za određivanje koncentracije proteina je goveđi serum albumin (bovine serum albumin, BSA), od koga smo pripremali osnovni (štok) rastvor koncentracije 50 µg/ml. Od štoka BSA smo pripremili 7 razblaženja za standardnu krivu po sledećoj shemi:

Za 5 mL BSA standarda	Finalna koncentracija µg/ml	Zapremina stoka BSA u ml	Zapremina dd H <sub>2</sub> O u ml
1	50 µg/ml	5 ml	0 ml
2	40 µg/ml	4 ml	1 ml
3	30 µg/ml	3 ml	2 ml
4	20 µg/ml	2 ml	3 ml
5	10 µg/ml	1 ml	4 ml
6	5 µg/ml	0.5 ml	4.5 ml

Zatim smo u svakom uzorku radili duplikatna ili triplikatna merenja tako što smo uzeli po 1 ml svakog standarda BSA ili 1 ml uzorka i njemu dodali 2.5 ml reagensa A (reagens A=1 ml 1% CuSO<sub>4</sub> + 1 mL 2%KNa-tartarata + 98 ml 2%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0.1 M NaOH), promešali na Vortex-u i inkubirali 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga smo uzorcima dodali po 160 µl Folin-Ciocalteau reagensa (originalnog, nerazblaženog), inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi i pročitali OD750nm svakog uzorka. Konstruisali smo pravu OD750nm= a x Cp (µg/ml) + b. Sa prave smo odredili koncentracije proteina u uzorku na osnovu pročitane OD750nm za uzorak (korigovane za razblaženje i izražene kao mg/ml originalnog uzorka). Nakon što smo odredili koncentracije proteina u ćelijskim lizatima, alikvote uzoraka smo pomešali sa denaturišućim puferom prema Laemmli-ju (1970) (0.125 M Tris-Hcl pH 6.8, 0.4% β-merkaptetanol, 4% SDS, 1% Brom Fenol Plavo i 20% glicerol), i kuvali ih 5 min na 100°C.

### 3.2.9. Elektroforeza na SDS poliakrilamidnom gelu

Posle faze kuvanja uzoraka, sve uzorke smo ohladili do sobne temperature i naneli na SDS – PAG (poliakrilamidni gel). Proteini su amfoterična jedinjenja, tj. njihovo ukupno naelektrisanje je određeno pH vrednošću medijuma u kome su suspendovani. U rastvoru čija je pH vrednost iznad izoelektrične tačke proteina, proteini imaju ukupno naelektrisanje negativno i u električnom polju migriraju ka anodi. Ispod svoje izoelektrične tačke, proteini su pozitivno naelektrisani i migriraju ka katodi.

Sodijum dodecil sulfat (SDS) je anjonski deterdžent koji denaturiši proteine, narušavajući njihovu trodimenzionalnu strukturu. SDS se vezuje za proteine specifično u masenom odnosu 1.4 : 1. SDS daje negativno naelektrisanje polipeptidu u proporciji njegove dužine i denaturisani polipeptidi postaju negativno naelektrisani sa jednakim naelektrisanjem po jedinici dužine. Izduženi i redukovani kompleks protein SDS ima štapičastu strukturu. Neophodno je redukovati disulfidne mostove u proteinima pre nego što oni zauzmu konformaciju svoje primarne strukture, što se postiže β – merkaptetanolom. U denaturišućoj SDS – PAG elektroforezi, migracija nije određena naelektrisanjem polipeptida, već

njegovom molekulskom masom. Svi proteini prekriveni SDS – om su jako negativno naelektrisani i zato se kreću ka pozitivnoj elektrodi. U proteinskom ekstraktu manji molekuli se kreću brže kroz gel (zbog manjeg otpora sredine) i za isto vreme, putuju dalje od većih molekula. Na kraju elektroforeze proteini su razdvojeni u diskretne trake po opadajućoj masi (veličini molekula), od mesta nanošenja do kraja gela.

Uzorke proteina (60 µg) smo razdvajali po modifikovanoj metodi Laemmlija (1970) na aparatu Mini Protein Electrophoresis Cell (Bio-Rad), na 10% (MnSOD, CuZnSOD, katalaza, GPx, GLR, Hsp90, Hsp70, mHsp70, GR, NFκB) ili 7.5% (Nrf2 i Keap1) poliakrilamidnim denaturišućim gelovima u puferu za elektroforezu koji sadrži 0.25 M Tris bazu, 0.192 M glicin i 0.1% SDS. Elektroforeza je trajala 90 min pri konstantnom naponu od 100 V. Posle elektroforeze gelove smo koristili za „Western blot“ analizu. Kao molekulski marker smo koristili Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas), koji se sastoji od 9 proteina različitih molekulskih masa (250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa i 11 kDa).

### 3.2.10. Detekcija proteina metodom „Western blot“-a

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

Nakon završene elektroforeze gel smo stavili u transfer pufer (20% metanol, 0.025 M Tris-baza, 0.192 M glicin, pH~8.3), maksimalno 10 min. PVDF membranu odgovarajuće veličine smo prvo aktivirali držanjem 60 s u 100% metanolu, zatim smo je isprali u vodi i potopili u hladan transfer pufer. Nakon toga smo formirali sendvič koji se sastoji od Mini Trans-Blot® filter papira (Bio Rad), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i sledećeg filter papira (svi natopljeni transfer puferom), dok smo eventualno nastale mehurove udaljili prostim prevlačenjem horizontalno položene epruvete preko sendviča sa jednog kraja na

drugi. Ovako napravljen sendvič smo postavili u aparat za transfer u rastvoru (Trans-Blot Cell, Bio Rad) i dodatno potopili u pufer za transfer. Ceo aparat smo priključili na električni ispravljač i najčešće smo koristili transfer pri konstantnoj struji od 400 mA na 4°C u trajanju od 2 h. Po isteku datog vremena, transblot aparat smo rasklopili, a PVDF membranu smo u daljoj proceduri blokirali u puferu za blokiranje [PBS pufer (0.137 M NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl) sa 5% nemasnim mlekom], na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje, u trajanju od 1 h. Blokiranje membrane omogućava da se sva slobodna nespecifična mesta na membrani zasite, tako da se specifična antitela za njih ne mogu vezati.

U daljoj proceduri, tako blokiranu membranu smo inkubirali sa primarnim antitelima na MnSOD (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada), CuZnSOD (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada), katalazu (Calbiochem), GPx (H-151, Santa Cruz Biotechnology), GLR (H-120, Santa Cruz Biotechnology), Hsp90 (F-8, Santa Cruz Biotechnology), Hsp70 (NS 27F3-4, Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada), GR (M-20, Santa Cruz Biotechnology), NFκB (C-20, Santa Cruz Biotechnology), Nrf2 (MAB3925, R&D Systems), Keap1 (MAB3024, R&D Systems), mHsp70 (MA3-028, Affinity Bioreagents) i β-aktin (ab 8227, Abcam), preko noći na 4 °C. Sva antitela su bila razblažena u PBST puferu (0.1% Tween-20 u PBS-u) sa 2.5% mlekom. Razblaženja primarnih antitela su sledeća: GPx (1:500), Hsp90, Hsp70, GR, GLR, Nrf2 i Keap1 (1:1000), NFκB (1:2000), MnSOD, katalaza i β-aktin (1:5000) i mHsp70 i CuZnSOD (1:10000). Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane smo ispirali 3 puta po 10 min PBST puferom na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje na mešalici. Nakon ispiranja membrane smo inkubirali 2 h, uz stalno mućkanje, sa sekundarnim anti-mišjim (odnosno zečjim) antitelom konjugovanim sa HRP (razblaženja 1:5000). Nakon inkubacije, membrane smo opet ispirali 3 puta po 10 min u PBST puferu, nakon čega smo na membrane nanosili pufer za hemiluminescenciju (ECL, eng. enhanced chemiluminescence).

Supstrat za ECL se dobija mešanjem istih zapremina luminola i rastvora vodonik-peroksida, koji u prisustvu HRP enzima na sekundarnom antitelu dovodi do hemijske reakcije (oksidacije luminola) i do oslobađanja svetlosne energije

(fotona određene energije dovoljne da osvetli rendgen film). Membrane smo inkubirali u ECL supstratu 5 min, nakon čega smo ih sušili, pokrili tankom providnom folijom i stavili u kasete za razvijanje filmova. Na pokrivene membrane smo postavili rendgen film (Agfa, Belgium), pri čemu je dužina ekspozicija varirala od 1 do 5 min. Intenzitet signala na filmu odgovara intenzitetu emitovane svetlosti, a ona količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Kvantifikaciju signala smo radili denzitometrijski u PC programu za analizu slike ImageJ.

### 3.2.11. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza

Ukupnu SOD aktivnost u ćelijskom ekstraktu jetre smo merili po metodi McCord i Fridovich-u (1969). Jedna jedinica aktivnosti je definisana kao količina proteina potrebnog da inhibira za 50% redukciju citohroma c. Reakcionu smešu čine 451.1 µl rastvora A (0.1M fosfatni pufer pH 7.8, 0.1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.1 mM NaN<sub>3</sub>, 50 µM Ksantin, 20 µM citohrom C), 35.1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 35.1 µl rastvora B (0.1M fosfatni pufer pH 7.8, 0.1 mM EDTA-Na<sub>2</sub> i 0.02 U ksantin oksidaze). Reakciju smo započeli dodavanjem rastvora B (ksantin/ksantin oksidaza sistem). Esej smo radili na 25°C. Celu smešu smo dobro izmešali i merili apsorbanču na 550 nm tokom 3 min. Srednja promena apsorbanče treba da bude oko 0.025/min. Podešavanje srednje promene apsorbanče smo postigli podešavanjem koncentracije ksantin oksidaze u rastvoru B. Iz izmerenih podataka smo crtali krivu promene apsorbanče na 550 nm u funkciji vremena i izračunali smanjenje te promene za 50% koje predstavlja jednu jedinicu enzimске aktivnosti. Ovako pripremljene rastvore A i B smo koristili za određivanje enzimске aktivnosti u uzorku. Rastvoru A smo dodavali uzorak (umesto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), kivetu smo postavili u spektrofotometar i dodali rastvor B. Dobro smo izmešali smešu rastvora pipetom i merili OD<sub>550nm</sub> na temperaturi od 25 °C. Aktivnost enzima smo izračunali po sledećoj formuli:

$$U/mg = ((\Delta A \text{ blanka} - \Delta A \text{ uzorka} / 1U) \times R) / C_p$$

gde je:  $\Delta A$  blanka – promena apsorbanče blanka,  $\Delta A$  uzorka – promena apsorbanče uzorka, 1U – definisana jedinična aktivnost, R – razblaženje uzorka,  $C_p$  – koncentracija proteina u mg/ml. Rezultate smo predstavili u jedinicama SOD po mg proteina.

U moždanim strukturama smo merili aktivnost MnSOD i CuZnSOD korišćenjem komercijalnog kita (Randox Laboratories, Crumlin, UK). Ovaj metod koristi ksantin/ksantin oksidaza sistem za stvaranje superoksid radikala koji reaguju sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom i stvaraju crvenu formazan boju. Jedna jedinica aktivnosti je definisana kao količina proteina potrebnog da inhibira 50% redukciju 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hlorida. Najpre smo merili ukupnu aktivnost SOD, dok je aktivnost MnSOD enzima merena 30 min nakon dodavanja 4mM KCN koji inhibira enzimsku aktivnost CuZnSOD. Iz razlike ukupne aktivnosti i aktivnosti MnSOD enzima smo dobili aktivnost CuZnSOD.

### 3.2.12. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze smo određivali po metodi Claiborna (1985). Jedna jedinica aktivnosti katalaze se definiše kao količina enzima koja razgrađuje 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  u minutu po mg proteina. Kako  $\text{H}_2\text{O}_2$  pokazuje maksimalnu apsorbanču na talasnoj dužini od 240nm, aktivnost katalaze se određuje praćenjem razlaganja  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 240nm, pri čemu je pad apsorbanče proporcionalan aktivnosti katalaze. Pripremljeni 0.05 M fosfatni pufer pH 7.0 (0.05 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  titrovan sa 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  do pH 7.0) smo titrovali 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  dok apsorbanča ovakve probe na 240 nm nije dostigla vrednost između 0.525-0.550. Za blank smo koristili čist rastvor fosfatnog pufera bez  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Originalne uzorke čije su koncentracije oko 20 mg/ml smo razblažili 60 puta i to tako što smo im dodali ekvivalentnu zapreminu etanola i 58 puta veću zapreminu vode. Etanol se dodaje da bi se sav endogeno vezani  $\text{H}_2\text{O}_2$  uklonio sa katalaze, kako bi se merila stvarna aktivnost enzima. Uzorak smo do početka merenja držali na ledu. Na 15-40  $\mu\text{l}$  ovako pripremljenog uzorka smo dodali 3 ml podešenog rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  u fosfatnom puferu. Pratili smo pad apsorbanče na 240nm u toku 3 min na 25 °C. Promena apsorbanče u toku jednog minuta bi trebala da bude u opsegu 0.04-0.06. Aktivnost katalaze smo izrazili u jedinicama aktivnosti po mg proteina a izračunali je po sledećoj formuli:

$$\text{specifična aktivnost} = (\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{asp}}) \times 1000 \times V_{\text{rs}} / 43.6 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{uz}}$$



gde je:  $\Delta A_{uz}$  – srednja promena apsorbance uzorka u minuti,  $\Delta A_{sp}$  – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti,  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (ml),  $C_{pr}$ –koncentracija proteina u uzorku (mg/ml),  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (ml).

### 3.2.13. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze

Aktivnost GPx-a smo merili po metodi Marala (1977), koja koristi t-butil hidroperoksid i GSH kao supstrate. Aktivnost smo pratili merenjem promene apsorbance na 340 nm, pri temperaturi od 37 °C. Reakcionu smešu čine: 0.3 ml 0.5M fosfatnog pufera pH 7.0, 0.1 ml 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.6 ml 0.2mM NADPH (u 1% NaHCO<sub>3</sub>), 0.3ml 1mM GSH, 0.1ml 0.03M t-butil hidroperoksid, 0.1ml 1mM NaN<sub>3</sub>, 5 $\mu$ l GLR-a i 1.5 ml vode. Pre dodavanja u smešu, osnovnu koncentraciju GLR smo razblaživali sve dok promena apsorbancije na 340 nm u blanku ( $\Delta A_{bl}$ ) nije dostigne vrednost 0.014/min. U ovakvu reakcionu smešu smo dodavali 60-100 $\mu$ l uzorka i merili promenu apsorbance na 340 nm u trajanju od 150 sekundi. Aktivnost GPx smo računali po sledećoj formuli:

$$\text{specifična aktivnost} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000 \times V_{rs} / 6.22 \times 0.835 \times C_{pr} \times V_{uz}$$

gde je:  $\Delta A_{uz}$  – srednja promena apsorbance uzorka u minuti,  $\Delta A_{sp}$  – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti,  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (ml),  $C_{pr}$ –koncentracija proteina u uzorku (mg/ml),  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (ml). Aktivnost smo izrazili u jedinicama po miligramu proteina.

### 3.2.14. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze

Aktivnost GLR-a smo merili po metodi Glatzle i saradnika (1974). GLR katalizuje redukciju oksidovanog glutationa uz pomoć NADPH. Oksidaciju NADPH smo pratili merenjem promene apsorbance na 340 nm. U kivetu smo dodali 0.6 ml 0.5 M fosfatnog pufera (0.5M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> titruje se sa 0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> do pH 7.4), 0.1 ml 2 mM GSSG, 0.1 ml 0.5 mM EDTA i 2 ml vode. Pre dodavanja 0.1 ml 0.1 mM NADPH, čijim dodavanjem otpočinje reakcija, dodali smo i uzorak (5, 10, 15  $\mu$ l). Kao blank

smo koristili fosfatni pufer. Optimalna temperatura reakcije je 37 °C. Pratili smo promenu apsorbance u toku 3 minuta, a aktivnost računali pomoću jednačine:

$$\text{specifična aktivnost} = (\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{abl}}) \times 1000 \times V_{\text{rs}} / 6.22 \times C_{\text{uz}} \times V_{\text{uz}}$$

gde je:  $\Delta A_{\text{uz}}$  – srednja promena apsorbance uzorka u minuti (0.004-0.01),  $\Delta A_{\text{abl}}$  – srednja promena apsorbance blanka u minuti (0.0011-0.0012),  $V_{\text{rs}}$  – zapremina reakcione smeše (ml),  $C_{\text{uz}}$  – koncentracija proteina u uzorku (mg/ml),  $V_{\text{uz}}$  – zapremina uzorka (ml), 6.22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH. Aktivnost GLR smo izrazili u jedinicama po miligramu proteina (nM NADPH/min/mg prot).

### 3.2.15. Izolacija ukupne ćelijske RNK

Ukupnu RNK iz hipokampusa i PFC-a smo izolovali Trizol® reagensom (Invitrogen, USA). Smrznuto tkivo smo homogenizovali u Potter-Elvehjem staklo-teflon homogenizeru u odnosu 1 ml Trizol®-a na 100 mg tkiva hipokampusa ili PFC-a. Dobijene homogenate smo zatim inkubirali 5 min na 30 °C da bi nukleoproteinski kompleksi potpuno disosovali. Zatim smo u svaki homogenat dodavali 0.2 ml hloroforma i epruvete sa uzorkom (ependorfice) smo snažno mućkali po 15 sekundi, i opet inkubirali na temperaturi od 30 °C, 3 min. Uzorke smo zatim centrifugirali 15 min na 12000 x g u prethodno ohlađenoj centrifugi na 4 °C. Nakon ovog centrifugiranja u ependorficama su se razdvojile tri faze: donja (organska) faza, interfaza i gornja (vodena) faza. RNK koja se nalazi u vodenoj fazi, smo prebacili u nove ependorfice u koje smo dodali 0.5 ml izopropanola. Smešu smo inkubirali 10 min na 30 °C i centrifugirali 10 min na 12000 x g. Nakon centrifugiranja talog smo resuspendovali u 75% etanolu i centrifugirali 5 min na 7500xg na 4 °C. Dobijeni talog smo osušili na vazduhu i rastvorili u 100 µl 0.1 % DEPC vode (voda sa dietil-pirokarbonatom).

Koncentraciju RNK smo odredili spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (Thermo Scientific) merenjem apsorpcije uzorka na 260 nm. Da bi proverili integritet dobijene RNK radili smo elektroforezu ukupne RNK na 2 % agaroznom gelu, u trajanju od 30 min i pri konstantnoj voltaži od 100 V.

### 3.2.16. Reverzna transkripcija

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

### 3.2.17. Kvantitativni PCR

U cilju određivanja ekspresije gena za glutamat cistein ligazu (Gclm), glutation S transferazu (Gsta 3) i glutation reduktazu (Gsr) koristili smo „SYBR green“ (Power SYBR Green PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster City, CA) postupak i kvantitativni RTqPCR (7500 Real-time PCR System Applied Biosystems).

U RTqPCR reakciji smo koristili specifične prajmere (Tabela 1) za amplifikaciju Gclm, Gsta 3, Gsr i Rpl19 kao „housekeeping“ gena.

**Tabela 1** Sekvence prajmera za analizu ekspresije gena za Gclm, Gsta 3, Gsr i Rpl19.

cDNA produkt	Sekvenca „prajmera“	Temperatura hibridizacije (°C)	Veličina produkta (bp)	Reference
<b>Gclm</b>	5'- GCCACCAGATTGACTGCCTTT - 3' 5'- CAGGGATGCTTTCTTGAAGAGCTT - 3'	62	119	<i>Hoang i saradnici, 2009</i>
<b>Gsta 3</b>	5' - AGTCCTTCACTACTTCGATGGCAG - 3' 5' - CACTTGCTGGAACATCAAACCTCC - 3'	64	151	<i>Hu i saradnici, 2004</i>
<b>Gsr</b>	5'- TGGACGGGACCCAAATTCTA - 3' 5'- GTGCTTTCCCACAGACATCG - 3'	59	143	<i>Shang i saradnici, 2006</i>
<b>Rpl 19</b>	5' - TCGCCAATGCCAACTCTC-3' 5' - AGCCCGGAATGGACAGT-3'	64	118	<i>Bergenheim 2007</i>

cDNK smo amplifikovali korišćenjem sledećih uslova: denaturacija 95°C/15 s; vezivanje prajmera 60°C/1 min, faza ekstenzije 60°C/1 min i finalna ekstenzija 72°C/5 min. Paralelno sa svakom PCR reakcijom, smo pratili i krivu topljenja

produkta radi utvrđivanja njegove specifičnosti. Apsolutne vrednosti ekspresije iRNA svih uzoraka smo normalizovali na signal Rpl19 uključen u svaki RTqPCR. U cilju procene efikasnosti amplifikacije (E) za svaki par prajmera smo koristili standardne krive. Efikasnost amplifikacije smo dobili iz nagiba krive (Ct-početak detektibilne amplifikacije u funkciji logaritma koncentracije cDNK) (Rutledge i Cote, 2003). Efikasnost PCR reakcije je bila slična za sve parove prajmera i kretala se u opsegu 0.96–0.99 (maksimalna moguća efikasnost je 1). Kvantifikaciju relativne količine transkripata smo radili korišćenjem  $\Delta\Delta CT$  (Livak i Schmittgen, 2001).

### 3.2.18. Statistička obrada rezultata

Kvantifikaciju rezultata dobijenih u „Western blot“ i PCR eksperimentima smo radili denzitometrijskom analizom signala u programu za analizu slike ImageJ (eng. Image processing and analysis in Java). Sve eksperimente smo ponovili tri puta, svaki put sa novim grupama kontrolnih i stresiranih životinja, pri čemu je bilo 8 životinja po grupi (n=24). Tkiva koja smo izolovali iz životinja iz iste grupe smo pulovali. Vrednosti za optičku gustinu (OD) signala izmerene ImageJ softverom, su korigovane u odnosu na OD pozadine, i izražene u arbitrarnim jedinicama (count). Za obe metode sve dobijene vrednosti smo izrazili u odnosu na apsorbanču  $\beta$ -aktina sa istog blota ili PCR-a iz istih uzoraka. Sve rezultate smo dalje predstavili kao procenat od kontrole. Statističku obradu rezultata smo radili u softverskim programima Origin 8 (OriginLab Corporation, USA) i Statistica 8 (Stat Soft, USA). Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SEM). Za procenu statističke značajnosti smo koristili jednofaktorijalnu analizu varijanse (One-way ANOVA), praćenu odgovarajućim testom („multiple range“ Tukey post-hoc test). Za sve testove pretpostavljena statistička značajnost je  $P < 0.05$ .

Kvantifikaciju rezultata dobijenih u ELISA eseju za kortikosteron smo vršili na ELISA čitaču (WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, LKB), pri čemu smo istovremeno očitavali vrednosti standarda, i na osnovu njih izračunavali standardnu krivu. Vrednosti kortikosterona smo izrazili u ng/ml. Svi uzorci mereni

su u duplikatu u 8 životinja iz svake grupe. Statističke razlike između eksperimentalnih grupa smo određivali korišćenjem jednofaktorijalne analize varijanse (One-way ANOVA), praćene Tukey post-hoc testom. Za sva merenja pretpostavljena statistička značajnost je  $P < 0.05$ .

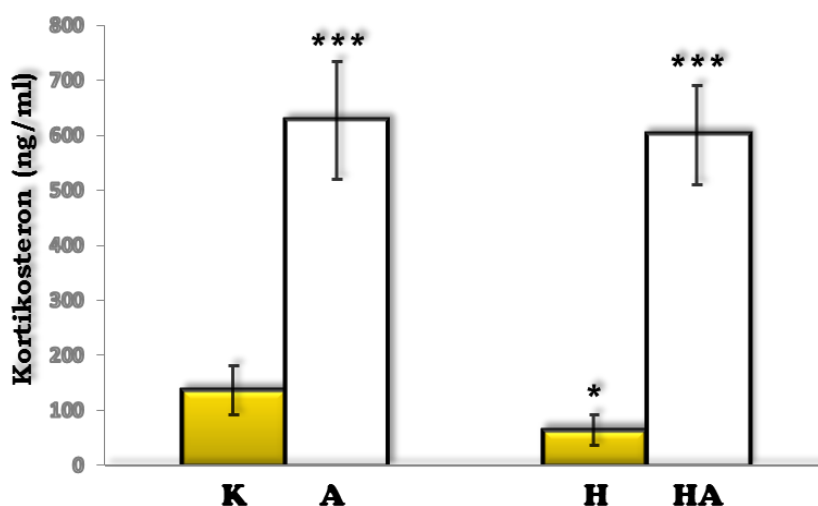
Celu grupu testova ponašanja smo ponovili 2 puta, sa 8 životinja u svakoj eksperimentalnoj grupi. Statističku razliku između grupa smo određivali Studentovim t-testom, pri čemu je  $P < 0.05$  smatrana statistički značajnom razlikom.

## **4. Rezultati**

## 4.1. Fiziološki parametri u krvi mužjaka Wistar pacova

### 4.1.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na koncentraciju kortikosterona u serumu

Kortikosteron je steroidni hormon koji se sintetiše i oslobađa iz kore nadbubrežnih žlezda u odgovoru organizma na stres. U kontrolnim grupama životinja koncentracija kortikosterona u serumu je iznosila  $136.8 \pm 44.5$  ng/ml (Slika 27), što je u skladu sa nivoom kortikosterona izmerenim u pacovima Wistar soja od strane drugih autora (Merino i saradnici, 2000; Wren i saradnici, 2002). Stres izazvan akutnom imobilizacijom u trajanju od 30 min je izazvao nagli porast u koncentraciji kortikosterona, i iznosio je  $626.9 \pm 107.1$  ng/ml (\* $P < 0.05$ ).

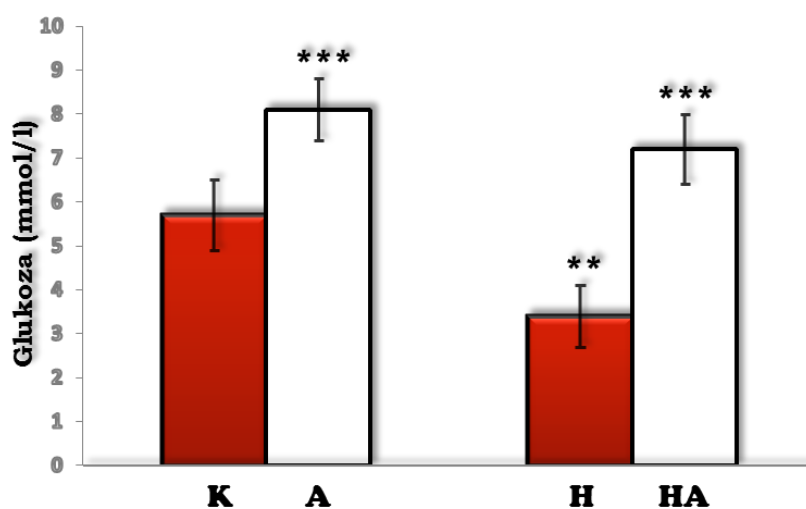


**Slika 27.** Koncentracija kortikosterona (ng/ml) u serumu kontrolnih (K), akutno (A), hronično (H) i kombinovano (HA) stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja  $\pm$  SEM. Rezultati su obrađeni One way ANOVA i post hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu.

Međutim, u serumu životinja izlaganih hroničnoj socijalnoj izolaciji izmerena koncentracija kortikosterona je iznosila  $64.7 \pm 28.3$  ng/ml i statistički je bila značajno smanjena u odnosu na koncentraciju izmerenu u kontrolama (\* $P < 0.05$ ). Kod hronično stresiranih životinja koje su naknadno bile izložene akutnoj imobilizaciji, izmerena koncentracija kortikosterona u serumu je iznosila  $601.2 \pm 89.7$  ng/ml (\* $P < 0.05$ ), što je vrednost slična kao i kod životinja izlaganih samo akutnoj imobilizaciji (Slika 27).

#### 4.1.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na koncentraciju glukoze u krvi

U kontrolnim grupama životinja koncentracija glukoze u krvi je iznosila  $5.7 \pm 0.8$  mmol/l (Slika 28). Izmereno povećanje u koncentraciji glukoze u krvi životinja stresiranih akutnim stresorom, koje je iznosilo  $8.1 \pm 0.7$  mmol/l, i kombinacijom stresora, koje je iznosilo  $7.2 \pm 0.8$  mmol/l, je u saglasnosti sa povećanjem koncentracije kortikosterona. Naime, kortikosteron učestvuje u regulaciji procesa glukoneogeneze (Friedman i saradnici, 1993) i na taj način reguliše nivo glukoze u krvi. Takođe, u slučaju hronično stresiranih životinja, kada je koncentracija serumskog kortikosterona bila niža od kontrole, i koncentracija glukoze u krvi je bila niža i iznosila je  $3.4 \pm 0.7$  mmol/l (Slika 28, \* $P < 0.05$ ).



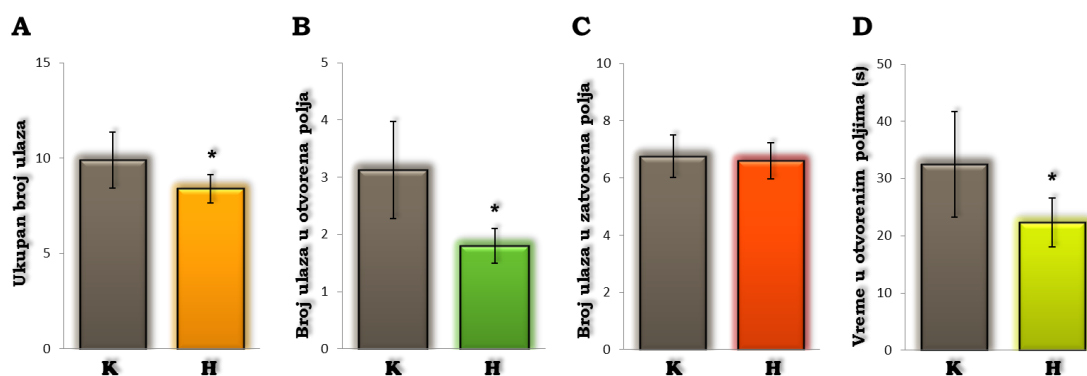
**Slika 28.** Koncentracija glukoze (mmol/l) u krvi kontrolnih (K), akutno (A), hronično (H) i kombinovano (HA) stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja  $\pm$  SEM. Rezultati su obrađeni One way ANOVA i post hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu.



## 4.2. Promene u ponašanju stresiranih mužjaka Wistar pacova

### 4.2.1. Efekat hronične socijalne izolacije na ponašanje životinja u testu izdignutog „plus” lavirinta

Kao prvi test u grupi testova ponašanja koristili smo test izdignutog „plus” lavirinta (eng. elevated plus maze, EPM). Ovim testom se pokazuje da li postoji izmenjeno ponašanje stresiranih životinja u pogledu pojave anksioznog ponašanja. U testu smo pratili ukupnu lokomotornu aktivnost životinje (kao ukupan broj ulaza u zatvorena i otvorena polja), broj ulaza u otvorena polja (kao mera anksioznosti), broj ulaza u zatvorena polja, kao i vreme provedeno u otvorenim poljima lavirinta.

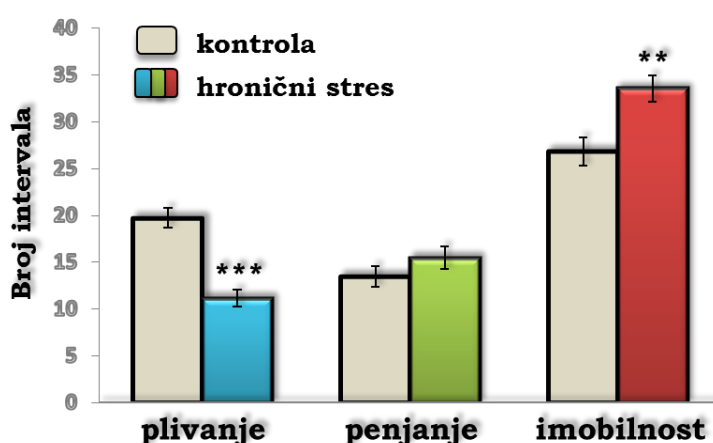


**Slika 29.** Efekat socijalne izolacije na A) ukupan broj ulaza, B) naklonost za kretanje u otvorenim poljima, C) naklonost za kretanje u zatvorenim poljima i D) vreme provedeno u otvorenim poljima u EPM-u, kontrolnih (K) i hronično stresiranih (H) Wistar mužjaka. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja  $\pm$  SEM, i obrađeni su Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao  $*P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu.

Kao što je pokazano na slici 29, statistički značajne razlike između dve grupe smo uočili u ukupnom broju ulaza i broju ulaza u otvorena polja (Slika 29A i B,  $*P < 0.05$ ), kao i u vremenu provedenom u otvorenim poljima lavirinta (Slika 29D,  $*P < 0.05$ ). Nikakvu razliku nismo uočili u naklonosti životinja za ulazanjem u zatvorena polja (Slika 29C).

#### 4.2.2. Efekat hronične socijalne izolacije na ponašanje životinja u testu forsiranog plivanja

Sledeći test u ovoj grupi testova koji smo koristili je test forsiranog plivanja (eng. forced swimming test, FST), koji se smatra standardnim testom za praćenje ponašanja koje je slično depresivnom. U ovom testu smo pratili tri oblika ponašanja životinja: plivanje (aktivno kretanje unutar cilindra i ronjenje), penjanje



**Slika 30.** Efekat socijalne izolacije na plivanje, penjanje i imobilnost kontrolnih (K) i hronično stresiranih (H) Wistar mužjaka u FST-u (izražene u broju intervala od 5 sekundi u roku od 5 minuta). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni su Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu.

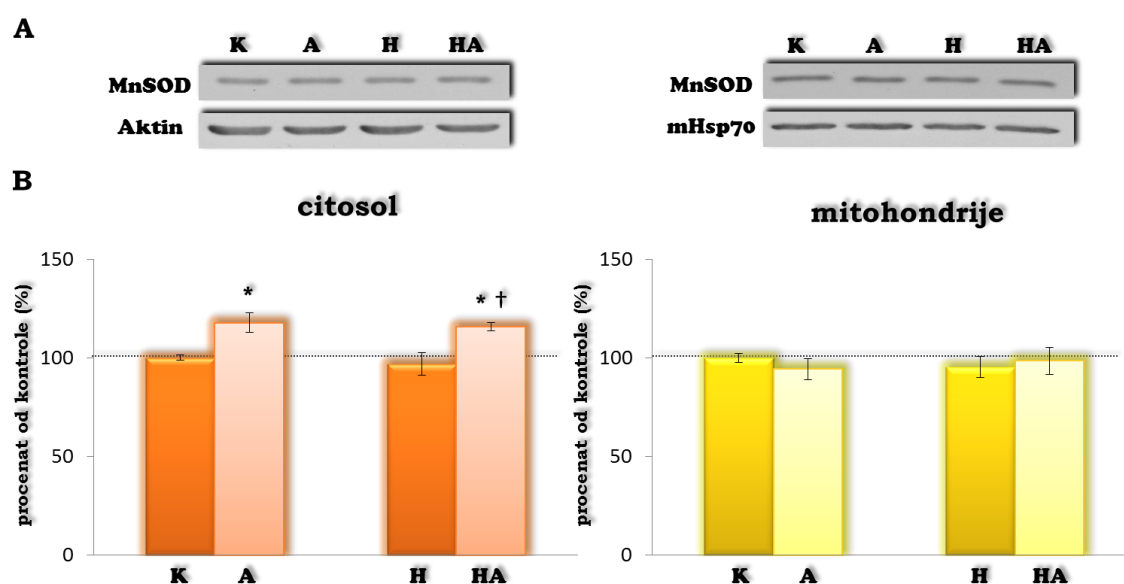
(snažni pokreti šapama u vodi i izvan nje uz zid cilindra) i imobilnost (minimum pokreta neophodnih samo za održavanje iznad vode). Testom smo određivali broj intervala od 5 sekundi u toku trajanja testa (5 minuta) u kojima je bio dominantan jedan od ova tri oblika ponašanja (Slika 30).

Kod hronično stresiranih životinja smo izmerili statistički značajno smanjenje u broju intervala kada životinja pliva i povećan broj intervala kada je životinja imobilna, u odnosu na kontrolne životinje (Slika 30, \* $P < 0.05$ ), dok nikakvu razliku nismo uočili u pokušajima penjanja.

### 4.3. Promene u hipokampusu stresiranih mužjaka Wistar pacova

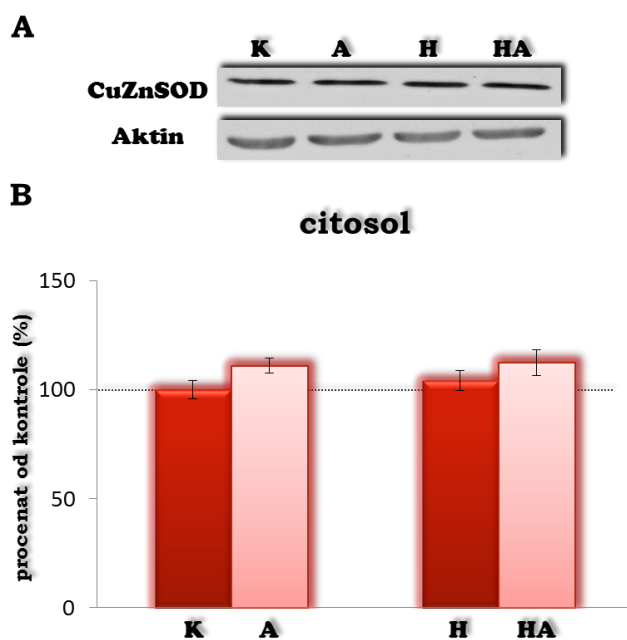
#### 4.3.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo i aktivnost antioksidativnih enzima: MnSOD, CuZnSOD, katalaze, GPx i GLR

Mozak je veoma osetljiv na oštećenja koja izazivaju ROS, između ostalog i zbog relativno slabe antioksidativne zaštite. Izlaganje životinja akutnom stresoru kao i kombinaciji stresora dovelo je do statistički značajnog povećanja nivoa MnSOD proteina u citosolu (\* $P < 0.05$ , Slika 31), dok izlaganje socijalnoj izolaciji kao hroničnom stresoru nije dovelo do promena u nivou ovog enzima. U mitohondrijama je nivo MnSOD-a ostao nepromenjen u sva tri tretmana.



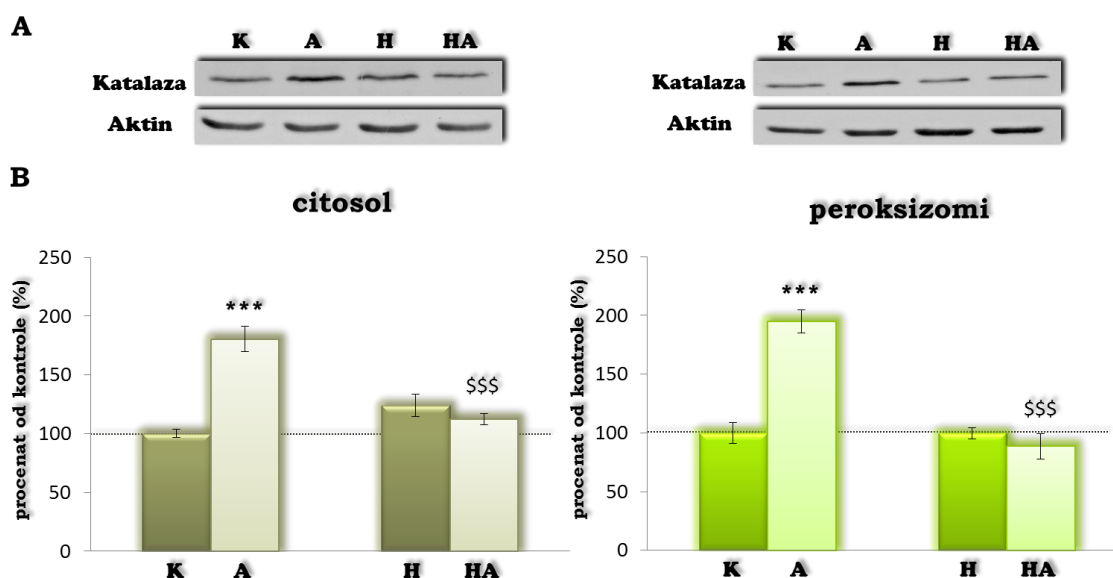
**Slika 31.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa MnSOD proteina u citosolnoj i mitohondrijalnoj frakciji hipokampusa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Povećanje enzimske aktivnosti MnSOD-a u odnosu na kontrole smo izmerili samo u citosolu akutno stresiranih životinja (\* $P < 0.05$ , Tabela 2). Kod životinja izloženih kombinaciji stresora smo izmerili povećanje enzimske aktivnosti u citosolu u odnosu na hronično stresirane životinje († $P < 0.05$ , Tabela 2).



**Slika 32.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa CuZnSOD proteina u citosolnoj frakciji hipokampusa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Nivo CuZnSOD, kao i njegova enzimska aktivnost, su ostali nepromenjeni u svim tretmanima (Slika 32, Tabela 2).

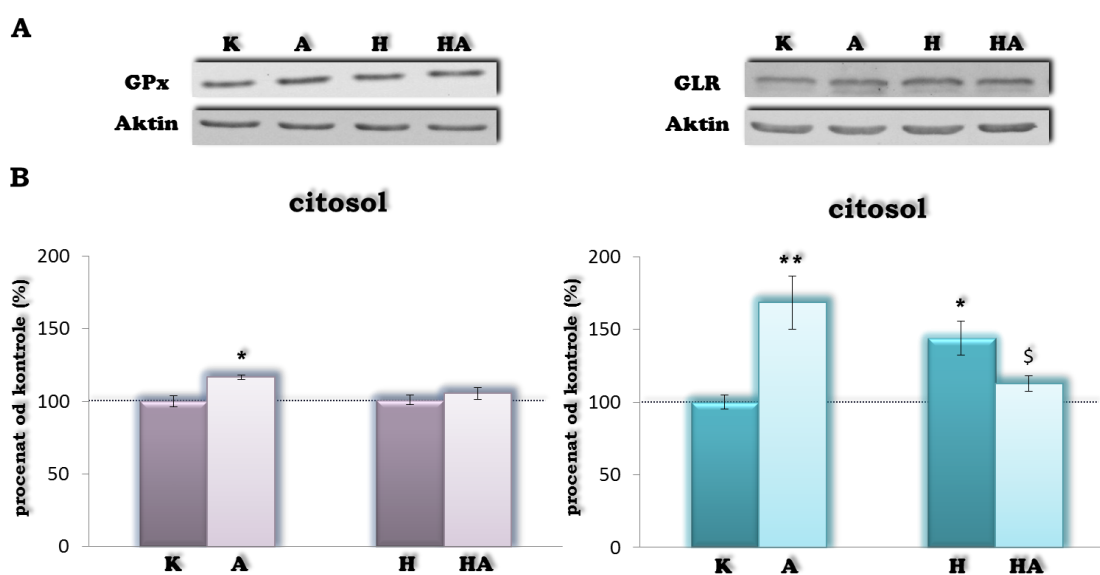


**Slika 33.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa proteina katalaze u citosolnoj i peroksizomalnoj frakciji hipokampusa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu,  $\$P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Katalaza ima dominantnu ulogu u razgradnji  $H_2O_2$  u slučaju kada je njegova produkcija u ćeliji povećana. Tokom katalitičkog ciklusa  $H_2O_2$  se razlaže na vodu i kisonik. Na Slici 33 su prikazani rezultati promena u nivou proteina katalaze u

citosolnoj i peroksizomalnoj frakciji ćelija hipokampusa u zavisnosti od primenjenog stresora. Kod akutno stresiranih životinja smo izmerili povećan nivo ovog enzima u citosolu i peroksizomima u odnosu na kontrolne životinje (\* $P < 0.05$ ), dok je u grupi životinja koje su bile izlagane socijalnoj izolaciji ili kombinaciji stresora nivo katalaze ostao nepromenjen (Slika 33). Ovaj rezultat je u saglasnosti i sa izmerenom enzimskom aktivnošću, gde smo povećanje takođe izmerili samo u citosolu i peroksizomima akutno stresiranih životinja (\* $P < 0.05$ , Tabela 2).

Merenja su takođe pokazala razliku u odgovoru kontrolnih i izolovanih životinja na akutni stresor. Naime, dok je kod kontrolnih životinja akutni stresor izazvao skoro duplo povećanje nivoa i enzimske aktivnosti katalaze, kako u citosolnoj tako i u peroksizomalnoj frakciji, kod izolovanih životinja naknadni akutni stresor nije uspeo da izazove nikakvu promenu u ovom enzimu ( $P < 0.05$ , Slika 33).



**Slika 34.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa GPx i GLR proteina u citosolnoj frakciji hipokampusa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, \$ $P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Western blot analiza drugog peroksidaznog enzima, GPx-a, je pokazala da nivo ovog proteina u citosolu raste samo u uslovima akutnog stresa ( $*P<0.05$ , Slika 34), ali enzimska aktivnost koju smo izmerili nije ispratila ovo povećanje, već je ostala nepromenjena (Tabela 2). Kod životinja koje su bile izložene socijalnoj izolaciji i kombinaciji stresora nivo GPx proteina u hipokampusu se nije menjao (Slika 34) ali je enzimska aktivnost pokazala statistički značajano smanjenje u odnosu na kontrolu, u obe grupe ( $*P<0.05$ , Tabela 2).

**Tabela 2.** Aktivnost antioksidativnih enzima (MnSOD, CuZnSOD, katalaze, glutation peroksidaze GPx i glutation reduktaze GLR) u hipokampusu kontrolnih i stresiranih životinja izražena u jedinicama po mg proteina (U/mg prot), osim za GLR, gde je aktivnost izražena u U/g prot. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između grupa su predstavljene kao  $*P<0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu,  $\$P<0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres i  $\dagger P<0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres.

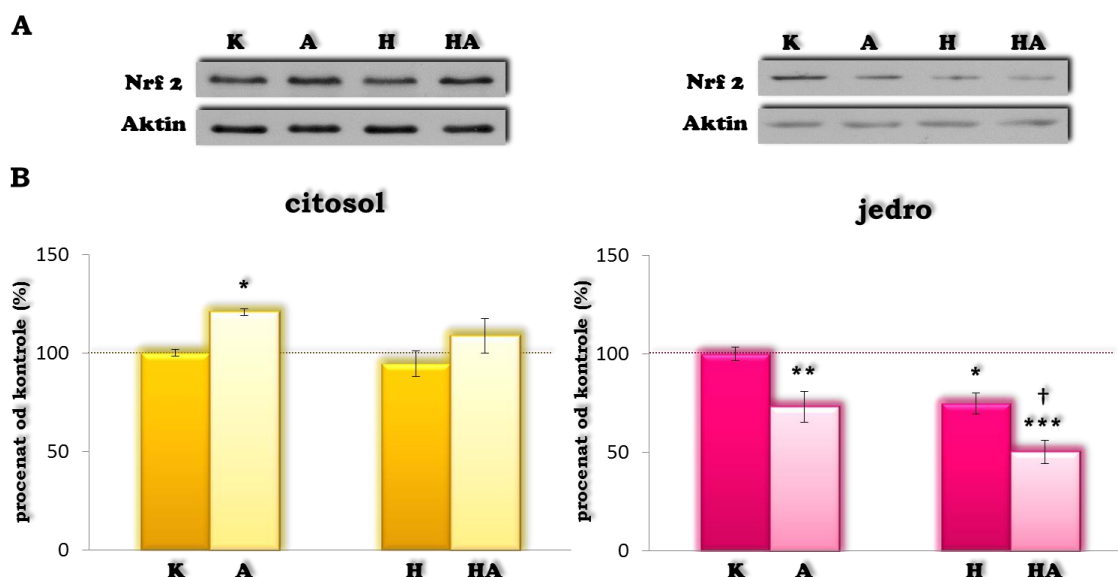
<i>stresor</i>				
<b>Aktivnost enzima (U/mg prot)</b>	<b>kontrola</b>	<b>akutni</b>	<b>hronični</b>	<b>kombinovani</b>
<b>MnSOD (u citosolu)</b>	0.52 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.02 *	0.51 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.02 †
<b>MnSOD (u mitohondrijama)</b>	0.45 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.06
<b>CuZnSOD (u citosolu)</b>	3.47 $\pm$ 0.10	3.65 $\pm$ 0.12	3.41 $\pm$ 0.11	3.51 $\pm$ 0.05
<b>katalaza (u citosolu)</b>	1.86 $\pm$ 0.16	4.34 $\pm$ 0.66 *	2.77 $\pm$ 0.11	2.88 $\pm$ 0.23 \$
<b>katalaza (u peroksimima)</b>	3.11 $\pm$ 0.34	5.06 $\pm$ 0.53 *	2.98 $\pm$ 0.29	3.73 $\pm$ 0.29 \$
<b>GPx (u citosolu)</b>	21.45 $\pm$ 1.18	19.08 $\pm$ 0.75	15.75 $\pm$ 0.60 *	14.38 $\pm$ 0.84 *\$
<b>GLR (U/g prot) (u citosolu)</b>	72.26 $\pm$ 5.80	74.75 $\pm$ 5.98	82.98 $\pm$ 8.20	57.82 $\pm$ 5.55 †

Nivo enzima koji obezbeđuje rezerve redukovano glutationa, GLR, u uslovima akutnog stresa pratio je promene GPx-a, ( $*P<0.05$ , Slika 34), ali je njegova enzimska aktivnost ostala nepromenjena (Tabela 2). U grupi životinja koje su bile izlagane socijalnoj izolaciji i gde smo izmerili smanjenu enzimsku aktivnost GPx-a, nivo GLR proteina je bio statistički značajno povećan u odnosu na kontrolu ( $*P<0.05$ , Slika 34) dok je njegova enzimska aktivnost pokazala samo trend povećanja. Kombinacija dva stresora nije izazvala promene u nivou GLR-a, dok je

enzimska aktivnost bila smanjena u odnosu na hronično stresirane životinje ( $\dagger P < 0.05$ , Slika 34, Tabela 2).

#### 4.3.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na subćelijsku raspodelu transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i na njihov relativni odnos

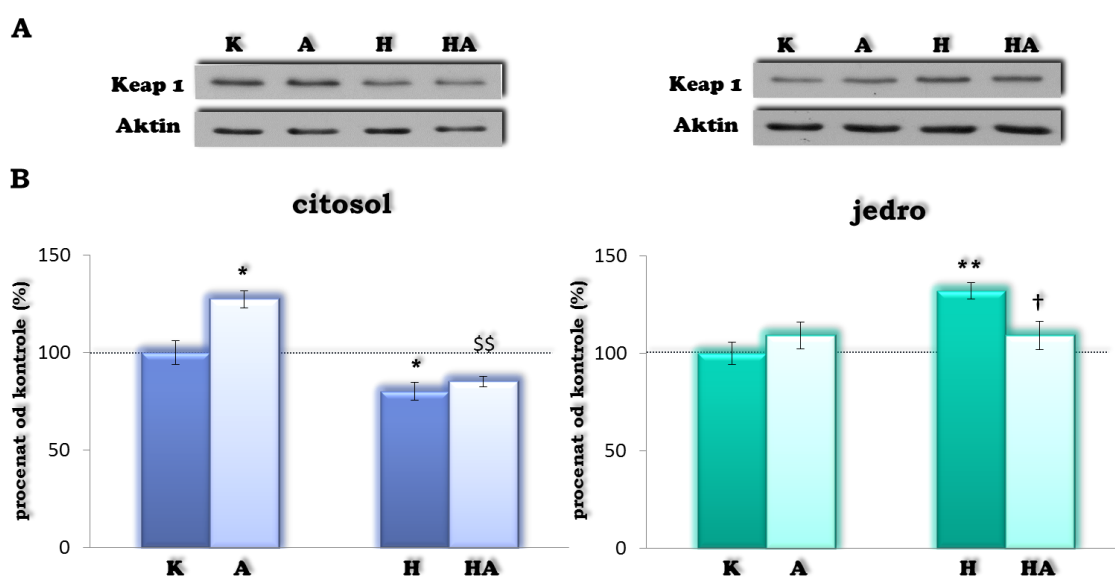
U poslednje vreme sve veći značaj u regulaciji odgovora na oksidativni stres se pridaje transkripcionom faktoru Nrf2. Transkripciona aktivnost ovog faktora je regulisana Keap1 proteinom. Keap1 ulazi u jedro, vezuje Nrf2 i prenosi ga u citoplazmu. U citoplazmi Nrf2 vrlo brzo podleže degradaciji ubikvitinacijom.



**Slika 35.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu,  $\dagger P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Western blot analiza nivoa Nrf2 proteina u hipokampusu je pokazala značajno povećanje ovog proteina u citosolnoj frakciji imobilisanih životinja (\* $P < 0.05$ , Slika 35), uz istovremeni pad u jedarnoj frakciji, što je ukazivalo na prelazak ovog proteina iz jedarne subćelijske frakcije u citoplazmu. Kod životinja izloženih hroničnom stresoru i kombinaciji stresora nije došlo do promene u nivou Nrf2 proteina u citosolu, dok je u jedarnoj frakciji zabeležen statistički značajan

pad, koji je bio mnogo izraženiji kod životinja izloženih kombinaciji stresora (\* $P < 0.05$ , † $P < 0.05$ , Slika 35). U grupi životinja koje su bile izložene akutnoj imobilizaciji primećen je i porast u nivou Keap1 proteina u citosolu (\* $P < 0.05$ , Slika 36), ali bez promena u jedarnoj frakciji. Kod životinja koje su bile izložene socijalnoj izolaciji izmeren je pad u nivou Keap1 proteina u citosolu, uz istovremeni porast u jedarnoj frakciji (\* $P < 0.05$ , Slika 36), ukazujući na prelazak ovog proteina iz jedne subćelijske frakcije u drugu. Naknadni akutni stresor kod



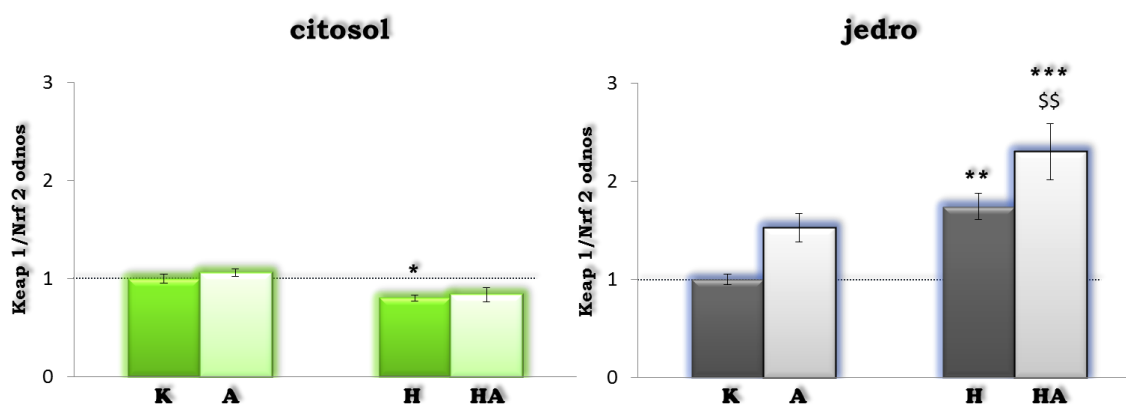
**Slika 36.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Keap1 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, § $P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

hronično izolovanih životinja (kombinacija stresora), nije izazvao porast u nivou citosolnog Keap1 proteina (§ $P < 0.05$ , Slika 36), ali je zato doveo do smanjenja u njegovom jedarnom pulu († $P < 0.05$ , Slika 36).

Analiza odnosa između Keap1 i Nrf2 proteina je pokazala da je njihov odnos u citosolu kod životinja izloženih akutnoj imobilizaciji i kombinaciji stresora nepromenjen, dok je u uslovima hronične socijalne izolacije taj odnos promenjen u korist Nrf2 proteina (\* $P < 0.05$ , Slika 37). Međutim, u jedarnoj frakciji slika je bila nešto drugačija. Odnos između Keap1 i Nrf2 proteina je bio izmenjen pod delovanjem svih stresora u odnosu na kontrolu, gde je Keap1 preovladavao u



odnosu na Nrf2 (\* $P < 0.05$ , Slika 37). Dominacija Keap1 proteina nad Nrf2, kao i smanjen nivo jedarnog Nrf2 su u saglasnosti sa ulogom koju Keap1 protein ima u vezivanju i prenošenju Nrf2 u citosol gde Nrf2 vrlo brzo podleže degradaciji.



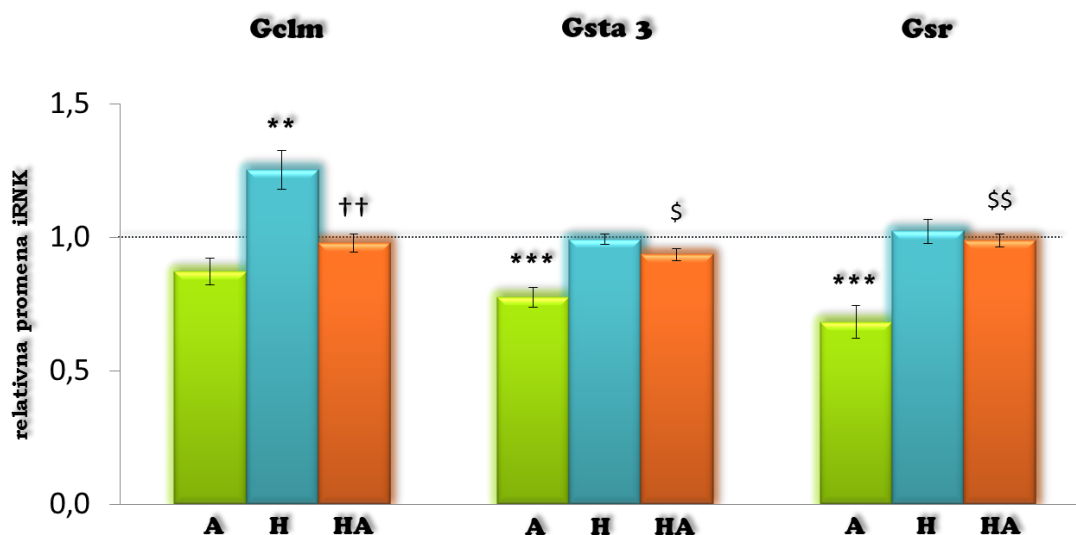
**Slika 37.** Relativni odnos nivoa Keap1 i Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu,  $\$P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

#### 4.3.3. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na ekspresiju gena za glutamat cistein ligazu, glutation S transferazu i glutation reduktazu

Paralelno sa praćenjem subćelijske raspodele Nrf2 proteina, praćena je na nivou iRNK i ekspresija gena koji su regulisani ovim transkripcionim faktorom, a to su: gen za glutamat cistein ligazu (Gclm), gen za glutation S transferazu (Gsta 3) i gen koji kodira glutation reduktazu (Gsr). Za nervne ćelije ovi geni su od posebnog značaja jer kodiraju enzime uključene u sintezu i korišćenje glutationa.

Kao što je prikazano na slici 38, u uslovima akutne imobilizacije, kada je nivo Nrf2 transkripcionog faktora bio značajno smanjen, ekspresija gena za Gsta 3 i Gsr je bila takođe značajno smanjena, dok je za gen Gclm primećen samo trend smanjenja (\* $P < 0.05$ , Slika 38). U uslovima hronične izolacije nije bilo promena u nivou iRNK za Gsta 3 i Gsr, dok je izmereno povećanje u nivou iRNK za Gclm (\* $P < 0.05$ , Slika 38). Naknadni akutni stresor kod hronično izolovanih životinja (kombinacija stresora), nije izazvao promene u nivou iRNK za Gsta 3 i Gsr, iako je kod kontrolnih životinja izazvao njihovo smanjenje ( $\$P < 0.05$ , Slika 38). Nivo iRNK

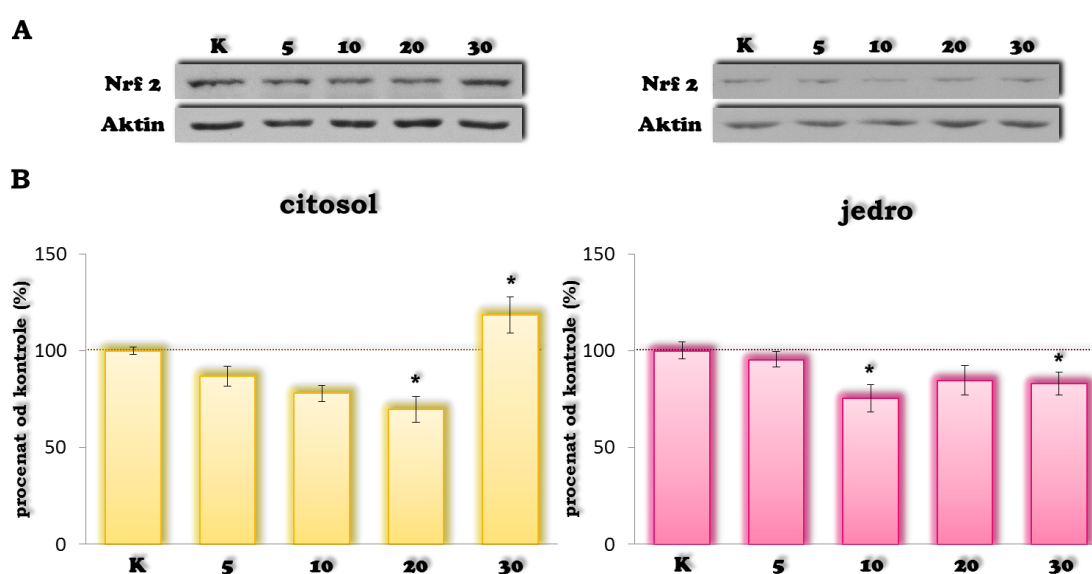
za Gclm u hipokampusu životinja tretiranih kombinacijom stresora je bio smanjen u odnosu na nivo kod hronično stresiranih životinja ( $\dagger P < 0.05$ , Slika 38), i nepromenjen u odnosu na kontrolu.



**Slika 38.** Relativna promena nivoa iRNK za glutamat cistein ligazu (Gclm), glutation S transferazu (Gsta 3) i glutation reduktazu (Gsr) u hipokampusu stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu,  $^{\S}P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres,  $^{\dagger}P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

#### 4.3.4. Subćelijska raspodela transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i njihov relativni odnos tokom trajanja akutnog stresa

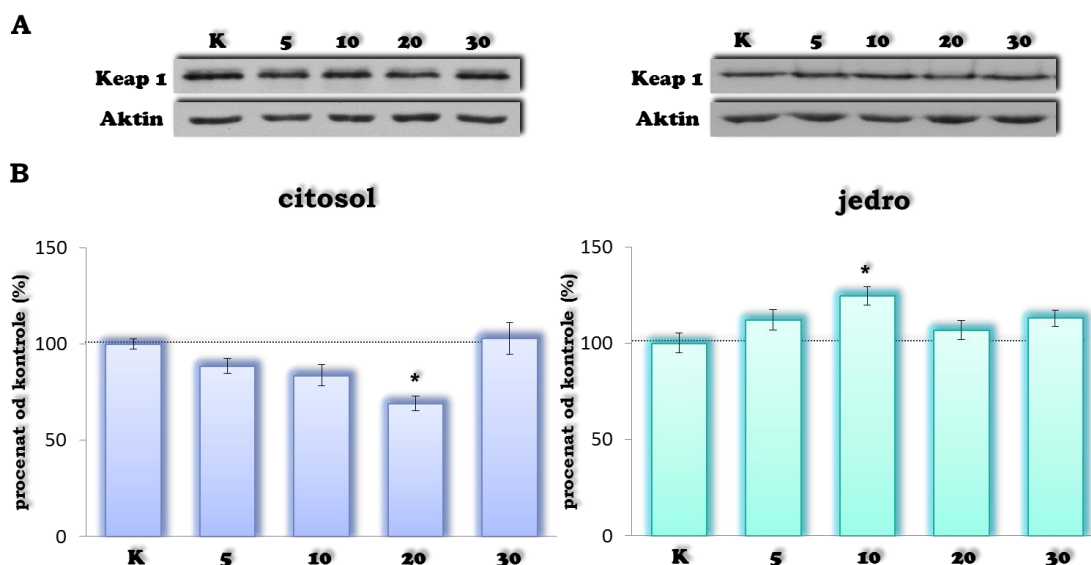
Praćenje promena nivoa Nrf2 proteina tokom trajanja akutnog stresora je pokazalo da u prvih 20 minuta dolazi do blagog pada u nivou Nrf2 proteina kako u citosolnoj tako i u jedarnoj frakciji. Po isteku 30 minuta nivo ovog transkripcionog faktora je ostao smanjen u jedarnoj frakciji, dok je istovremeno došlo do njegove akumulacije u citosolu (\* $P < 0.05$ , Slika 39).



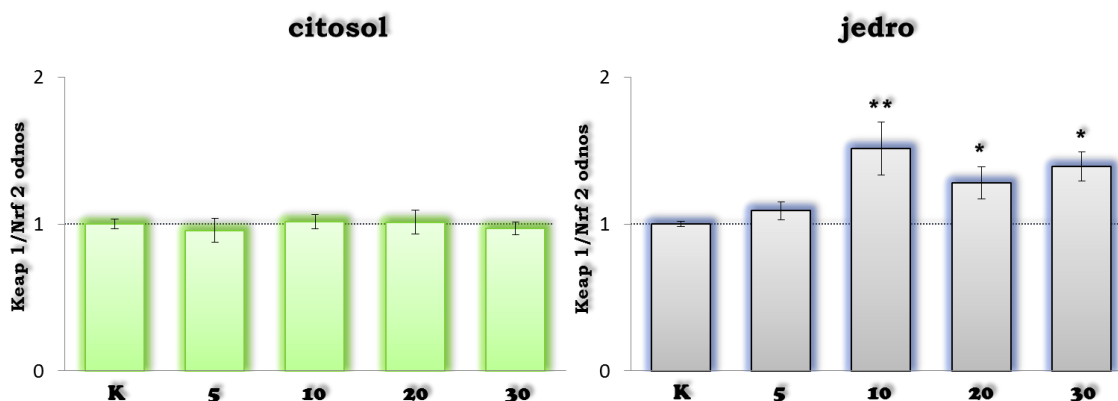
**Slika 39.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa Wistar mužjaka izloženih akutnoj imobilizaciji različitog trajanja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; 5, 10, 20, 30 - trajanje akutnog stresa u minutima)

Situacija sa Keap1 proteinom je bila nešto drugačija. U citosolu se nivo ovog proteina smanjivao, da bi u dvadesetom minutu dostigao neki minimum (\* $P < 0.05$ , Slika 40). Nakon 30 min nivo Keap1 se vratio na nivo kontrole. U jedarnoj frakciji je izmeren porast nivoa Keap1 posle 10 minuta akutne imobilizacije (\* $P < 0.05$ , Slika 40), da bi se posle toga vratio na kontrolni nivo. Zabeležen pad u nivou Keap1 proteina u citosolu, uz istovremeni porast u jedarnoj frakciji, ukazuje na prelazak ovog proteina iz jedarne ćelijske frakcije u citosol.

Merenje odnosa ova dva proteina, kako u citosolnoj tako i u jedarnoj frakciji, je pokazalao da do promena dolazi samo u jedarnoj frakciji. Prelazak



**Slika 40.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Keap1 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa Wistar mužjaka izloženih akutnoj imobilizaciji različitog trajanja. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; 5, 10, 20, 30 - trajanje akutnog stresa u minutima)



**Slika 41.** Relativni odnos nivoa Keap1 i Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji hipokampusa Wistar mužjaka izloženih akutnoj imobilizaciji različitog trajanja. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; 5, 10, 20, 30 - trajanje akutnog stresa u minutima)

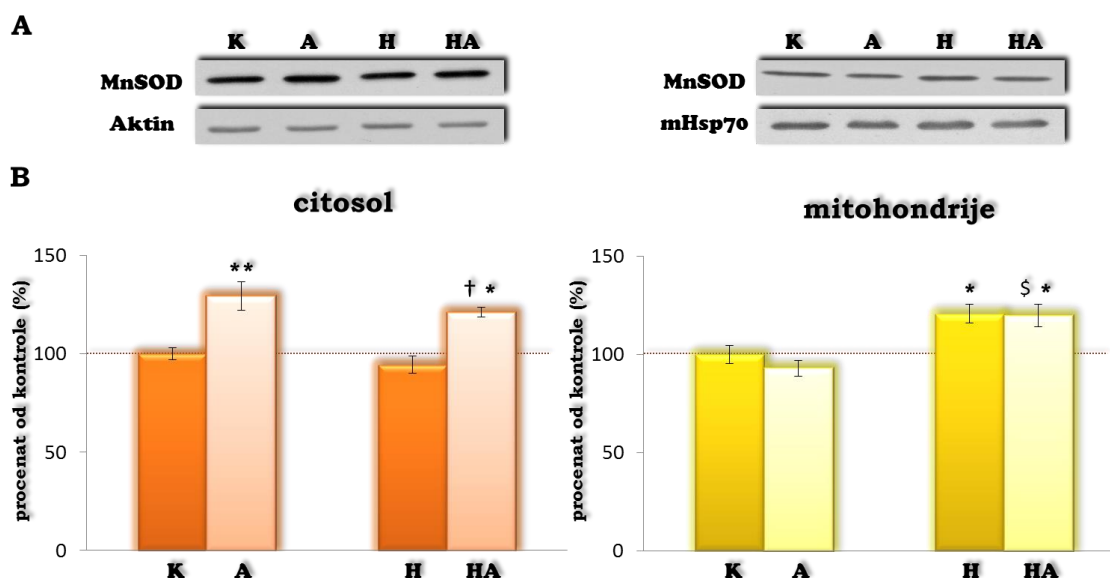
Keap1 proteina iz citosola u jedro u desetom minutu je uticalo na promenu odnosa Keap1 prema Nrf2 proteinu u korist Keap1.

Ovakav odnos se zadržao i posle 30 minuta imobilizacije (\* $P < 0.05$ , Slika 41). Dominacija Keap1 proteina nad Nrf2 u poslednjih 20 minuta imobilizacije, može biti objašnjenje za snižen nivo jedarnog Nrf2 (\* $P < 0.05$ , Slika 39).

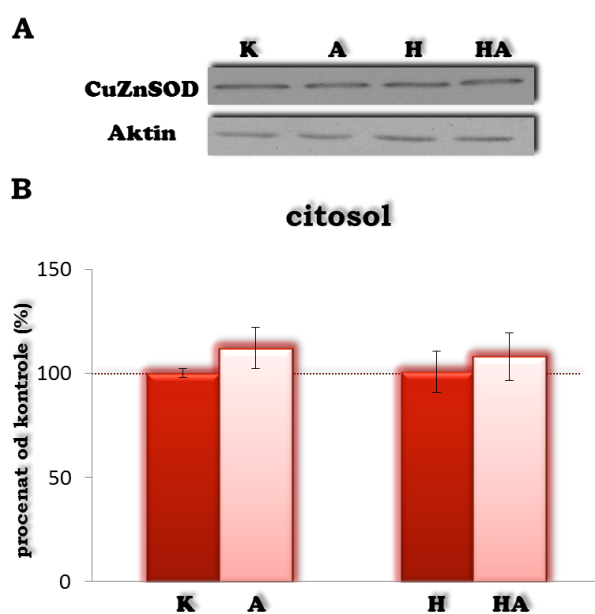
#### 4.4. Promene u prefrontalnom korteksu stresiranih mužjaka Wistar pacova

##### 4.4.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo i aktivnost antioksidativnih enzima: MnSOD, CuZnSOD, katalaze, GPx i GLR

Izlaganje životinja akutnom stresoru kao i kombinaciji stresora dovelo je do statistički značajnog povećanja nivoa MnSOD proteina u citosolu u odnosu na kontrolu (\* $P < 0.05$ , Slika 42), ali je uprkos povećanom nivou enzima, aktivnost MnSOD-a u citosolu ostala nepromenjena (Tabela 3). Povećanje koje je izmereno kod životinja izloženih kombinaciji stresora je bilo statistički značajno i u odnosu na hronično stresirane životinje ( $^{\dagger}P < 0.05$ , Slika 42).



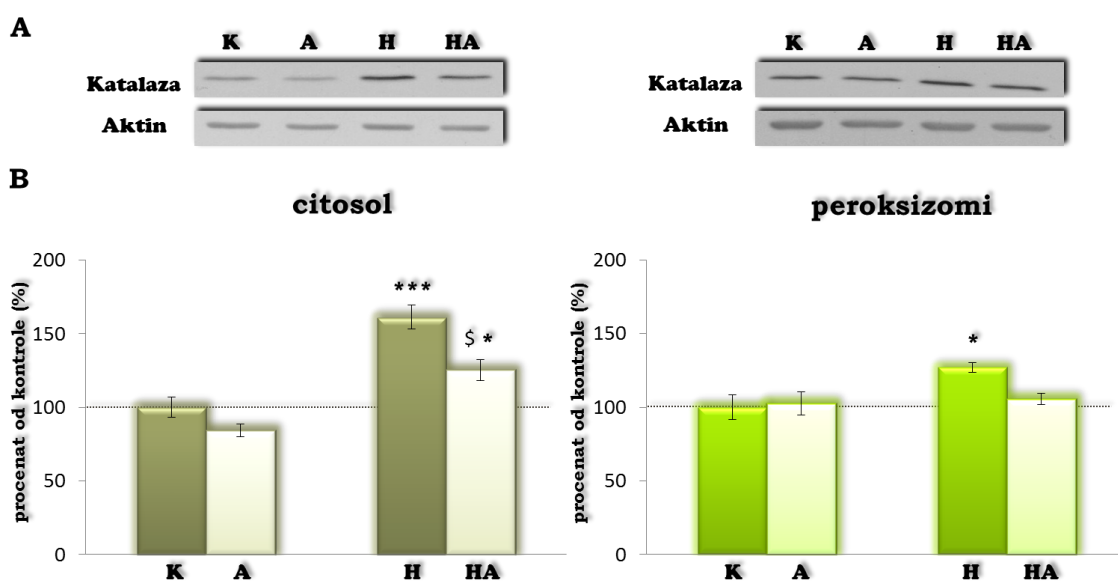
**Slika 42.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa MnSOD proteina u citosolnoj i mitohondrijalnoj frakciji prefrontalnog korteksa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu,  $^{\dagger}P < 0.05$  hronični u odnosu na kombinovani stres,  $^{\S}P < 0.05$  akutni u odnosu na kombinovani stres (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)



**Slika 43.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa CuZnSOD proteina u citosolnoj frakciji prefrontalnog korteksa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Izlaganje socijalnoj izolaciji kao hroničnom stresoru nije dovelo do promena u nivou ovog enzima u citosolu, dok je u mitohondrijama izmeren povećan nivo MnSOD-a kod životinja izloženih hroničnom

stresoru kao i u slučaju kombinacije stresora (\* $P < 0.05$ , Slika 42). Povećanje enzimske aktivnosti je izmereno samo u mitohondrijama životinja izloženih socijalnoj izolaciji (\* $P < 0.05$ , Tabela 3), dok je kod životinja izloženih kombinaciji



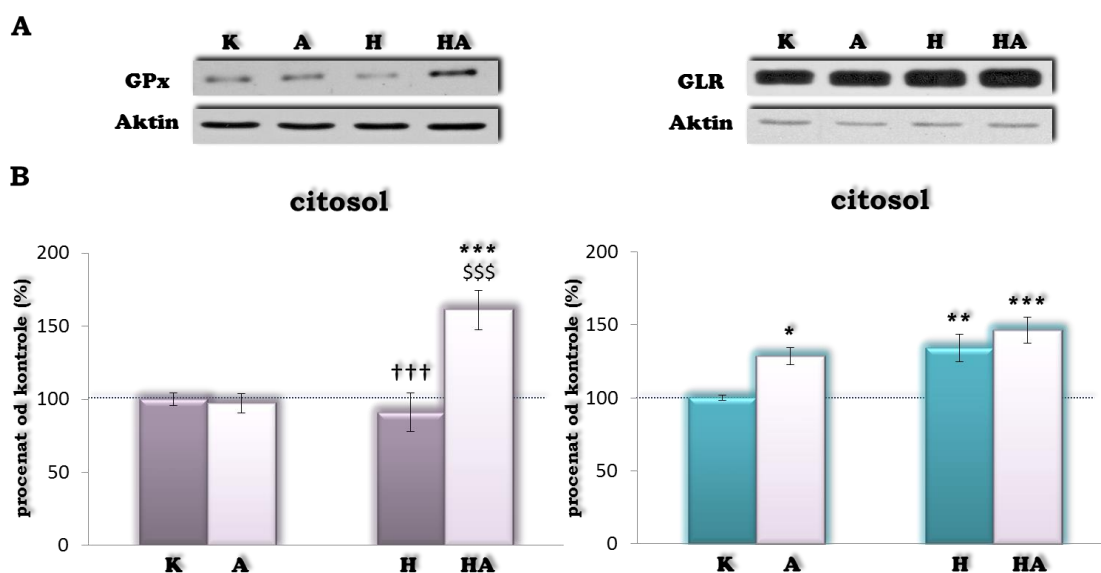
**Slika 44.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa proteina katalaze u citosolnoj i peroksisomalnoj frakciji prefrontalnog korteksa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, § $P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

stresora dodatno primećen i trend smanjenja aktivnosti ovog enzima u odnosu na hronično stresirane životinje.

Merenje nivoa drugog SOD enzima u citosolnoj frakciji, CuZnSOD, je pokazalo da je on ostao nepromenjen u svim tretmanima (Slika 43). Ovaj rezultat je potvrdila i izmerena enzimska aktivnost CuZnSOD-a (Tabela 3).

Na slici 44 su prikazani rezultati promena u nivou proteina katalaze u citosolnoj i peroksizomalnoj frakciji ćelija PFC-a u zavisnosti od stresa kome su životinje bile izložene. Za razliku od hipokampusa gde je izmereno povećanje ovog enzima samo kod akutno stresiranih životinja, u PFC-u je dominantan porast primećen kod hronično stresiranih životinja i nešto manje intenzivan porast kod životinja izloženih kombinaciji stresora (\* $P < 0.05$ , Slika 44). U peroksizomima je izmereno povećanje nivoa katalaze samo kod hronično stresiranih životinja (\* $P < 0.05$ , Slika 44). Povećana enzimska aktivnost katalaze je izmerena u citosolu i peroksizomima životinja izloženih hroničnoj socijalnoj izolaciji (\* $P < 0.05$ , Tabela 3).

Western blot analiza ekspresije drugog peroksidaznog enzima, GPx-a, u



**Slika 45.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa GPx i GLR proteina u citosolnoj frakciji prefrontalnog korteksa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres, ‡ $P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

PFC-u, je pokazala da je nivo ovog proteina u citosolu ostao nepromenjen kada su životinje bile izlagane samo akutnom ili samo hroničnom stresoru. Međutim kod životinja izloženih kombinaciji stresora, došlo je do skoro dvostrukog povećanja u nivou ovog enzima (\* $P < 0.05$ , Slika 45). Izmerena enzimaska aktivnost GPx-a takođe je bila povećana samo kod životinja koje su bile izložene kombinaciji stresora (Tabela 3).

Nivo enzima koji obezbeđuje rezerve redukovano glutaciona, GLR, je bio povećan pod uticajem sva tri stresna režima (\* $P < 0.05$ , Slika 45), međutim aktivnost ovog enzima je ostala nepromenjena (Tabela 3).

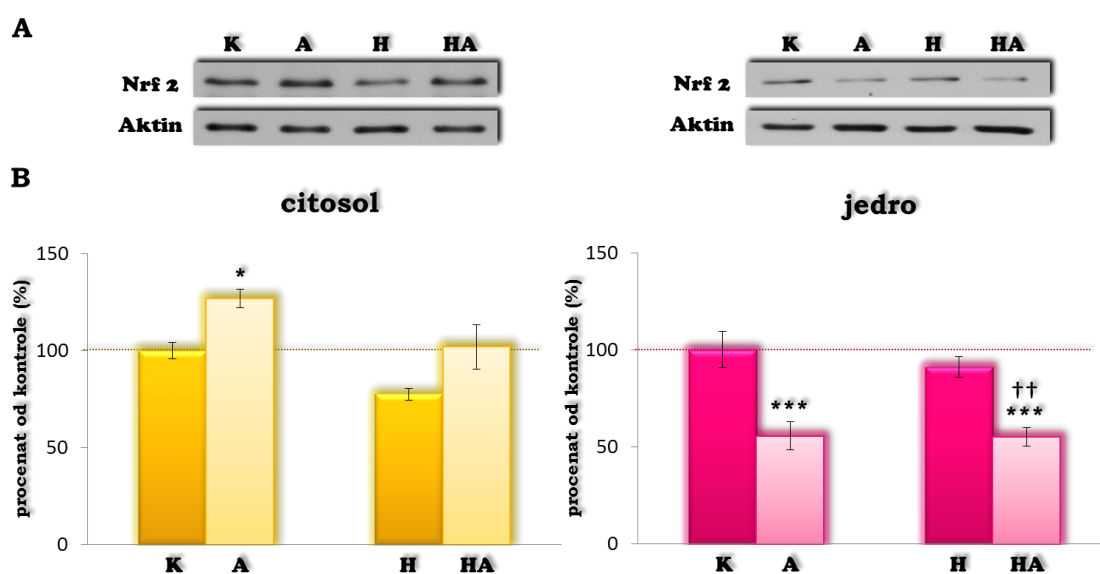
**Tabela 3.** Aktivnost antioksidativnih enzima (MnSOD, CuZnSOD, katalaze, glutation peroksidaze GPx i glutation reduktaze GLR) u prefrontalnom korteksu kontrolnih i stresiranih životinja izražena u jedinicama po mg proteina (U/mg prot), osim za GLR, kada je aktivnost izražena u U/g prot. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, † $P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres i ‡ $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres.

<i>stresor</i>				
<b>Aktivnost enzima (U/mg prot)</b>	<b>kontrola</b>	<b>akutni</b>	<b>hronični</b>	<b>kombinovani</b>
<b>MnSOD (u citosolu)</b>	0.59 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.10
<b>MnSOD (u mitohondrijama)</b>	0.59 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.08 *	0.65 $\pm$ 0.06
<b>CuZnSOD (u citosolu)</b>	5.37 $\pm$ 0.02	5.80 $\pm$ 0.06	5.39 $\pm$ 0.02	4.70 $\pm$ 0.11
<b>katalaza (u citosolu)</b>	8.42 $\pm$ 0.55	6.67 $\pm$ 0.47	10.62 $\pm$ 0.42 *	8.93 $\pm$ 0.42
<b>katalaza (u peroksizomima)</b>	8.13 $\pm$ 0.55	8.58 $\pm$ 0.61	11.41 $\pm$ 0.38 *	9.51 $\pm$ 0.78
<b>GPx (u citosolu)</b>	10.6 $\pm$ 0.38	11.40 $\pm$ 0.57	10.83 $\pm$ 0.89	14.22 $\pm$ 1.35 *†‡
<b>GLR (U/g prot) (u citosolu)</b>	34.62 $\pm$ 0.95	32.45 $\pm$ 5.32	32.04 $\pm$ 0.59	35.62 $\pm$ 1.07



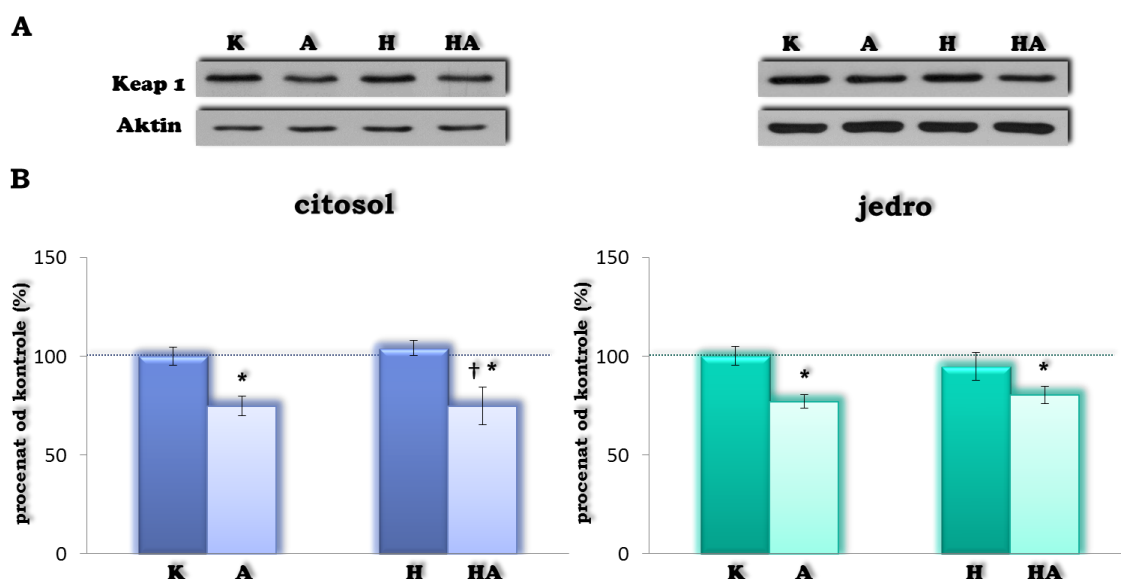
#### 4.4.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na subćelijsku raspodelu transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i njihov relativni odnos

Western blot analiza nivoa Nrf2 proteina u PFC-u kod imobilisanih životinja, pokazala je slične promene ovog proteina kao u hipokampusu. Značajno povećanje nivoa ovog proteina u citosolnoj frakciji uz istovremeni pad u jedarnoj frakciji (\* $P < 0.05$ , Slika 46) su ukazali na prelazak ovog transkripcionog faktora iz jedne subćelijske frakcije u drugu. Kod životinja izloženih hroničnom stresoru nivo Nrf2 proteina je ostao nepromenjen u obe ćelijske frakcije, dok je kod životinja izloženih kombinaciji stresora u jedarnoj frakciji zabeležen statistički značajan pad, kako u odnosu na kontrolu tako i u odnosu na hronično stresirane životinje (\* $P < 0.05$ , † $P < 0.05$ , Slika 46). U citosolnoj frakciji nije došlo do promene u nivou Nrf2.



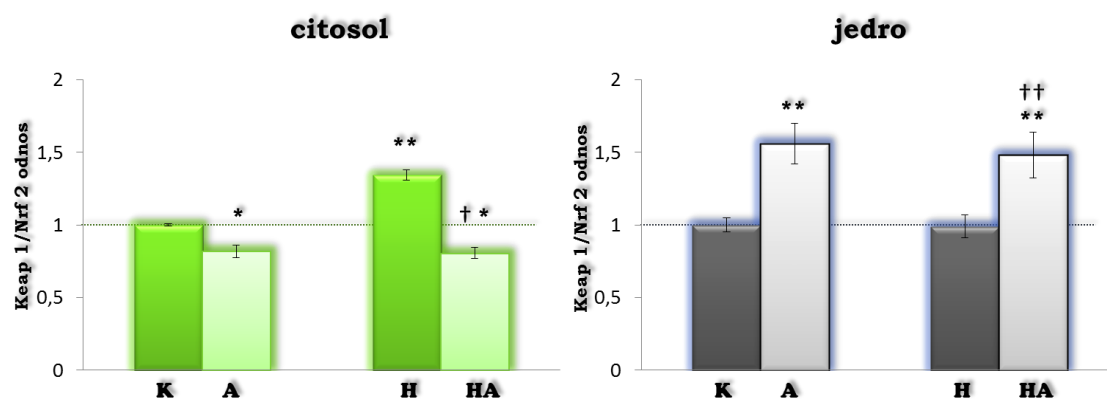
**Slika 46.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji prefrontalnog korteksa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Kod životinja koje su bile izložene akutnoj imobilizaciji primećen je pad u nivou Keap1 proteina kako u citosolu tako i u jedarnoj frakciji (\* $P < 0.05$ , Slika 47).



**Slika 47.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Keap1 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji prefrontalnog korteksa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Kod socijalno izolovanih životinja nisu zabeležene promene u nivou ovog proteina. Kombinacija stresora je dovela do istih promena kao i akutna imobilizacija, odnosno do pada u nivou Keap1 proteina kako u citosolnoj tako i u jedarnoj frakciji (\* $P < 0.05$ , Slika 47).

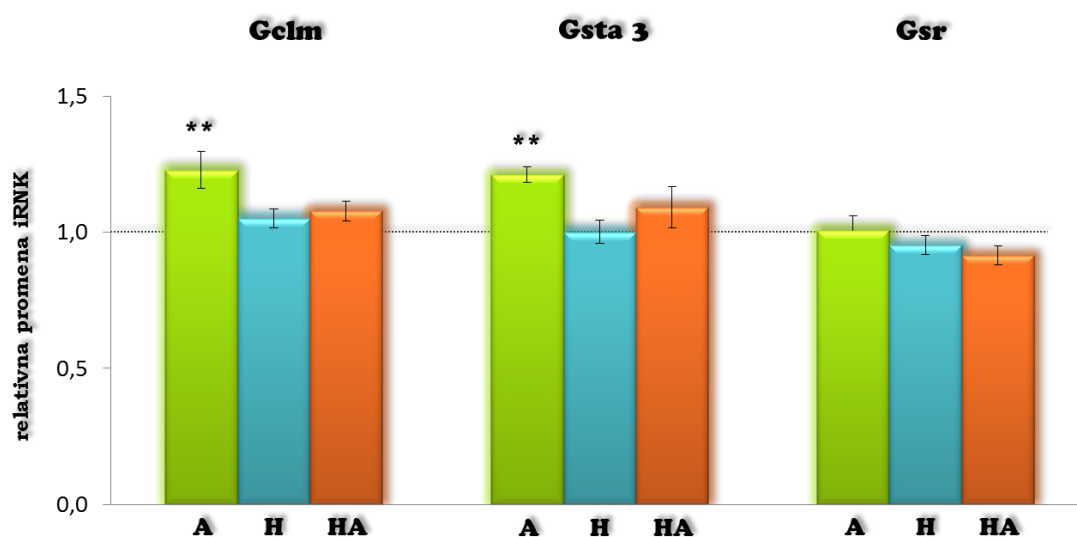


**Slika 48.** Relativni odnos nivoa Keap1 i Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji prefrontalnog korteksa stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Analiza odnosa između Keap1 i Nrf2 proteina je pokazala da je njihov odnos u citosolu kod životinja izloženih akutnoj imobilizaciji i kombinaciji stresora bio promenjen u korist Nrf2 proteina, dok je u uslovima hronične socijalne izolacije Keap1 bio dominantan u odnosu na Nrf2 (\* $P < 0.05$ , Slika 48). Kod životinja izloženih akutnoj imobilizaciji i kombinaciji stresora, merenje odnosa ova dva proteina u jedarnoj frakciji, je pokazalo dominaciju Keap1 nad Nrf2 u odnosu na kontrolu (\* $P < 0.05$ , Slika 48), dok se u uslovima hronične socijalne izolacije ovaj odnos nije menjao.

#### 4.4.3. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na ekspresiju gena za glutamat cistein ligazu, glutation S transferazu i glutation reduktazu

Paralelno sa praćenjem subćelijske distribucije Nrf2 proteina, pratili smo i ekspresiju gena regulisanih ovim transkripcionim faktorom. Kao što je prikazano na slici 49, u uslovima akutne imobilizacije, kada je nivo transkripcionog faktora Nrf2 u jedarnoj frakciji bio značajno smanjen, ekspresija gena za Gsta 3 i Gclm je

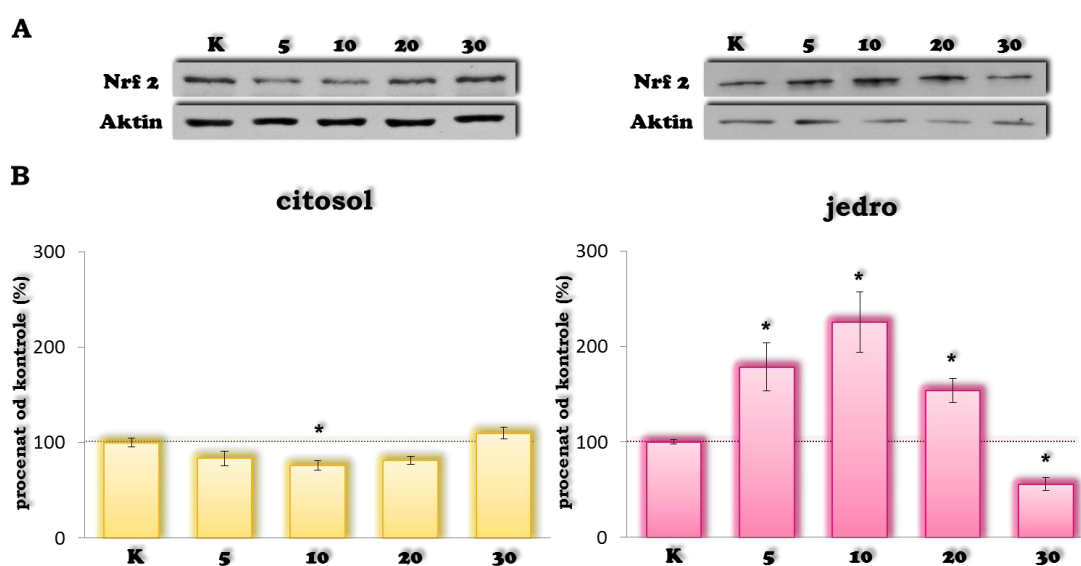


**Slika 49.** Relativna promena nivoa iRNK za glutamat cistein ligazu (Gclm), glutation S transferazu (Gsta 3) i glutation reduktazu (Gsr) u prefrontalnom korteksu stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

bila značajno povećana (\* $P < 0.05$ , Slika 49), dok je ekspresija gena za Gsr bila nepromenjena. U uslovima hronične socijalne izolacije kada nije bilo promena u nivou Nrf2 u jedarnoj frakciji, nivo iRNK za Gsta 3, Gclm i Gsr, je takođe ostao nepromenjen. Naknadni akutni stresor kod hronično izolovanih životinja (kombinacija stresora), koji je doveo do smanjenja Nrf2 u jedarnoj frakciji, nije izazvao promene u nivou iRNK za Gsta 3, Gclm i Gsr, iako je kod kontrolnih životinja izazvao njihovo povećanje (Slika 49).

#### 4.4.4. Subćelijska raspodela transkripcionog faktora Nrf2 i njegovog regulatora Keap1, i njihov relativni odnos tokom trajanja akutnog stresa

Analize nivoa Nrf2 proteina u PFC-u tokom trajanja akutnog stresora su pokazale da ova moždana struktura reaguje potpuno drugačije od hipokampusa. U citosolnoj frakciji je zabeležen blagi pad u nivou Nrf2 proteina posle 10 min

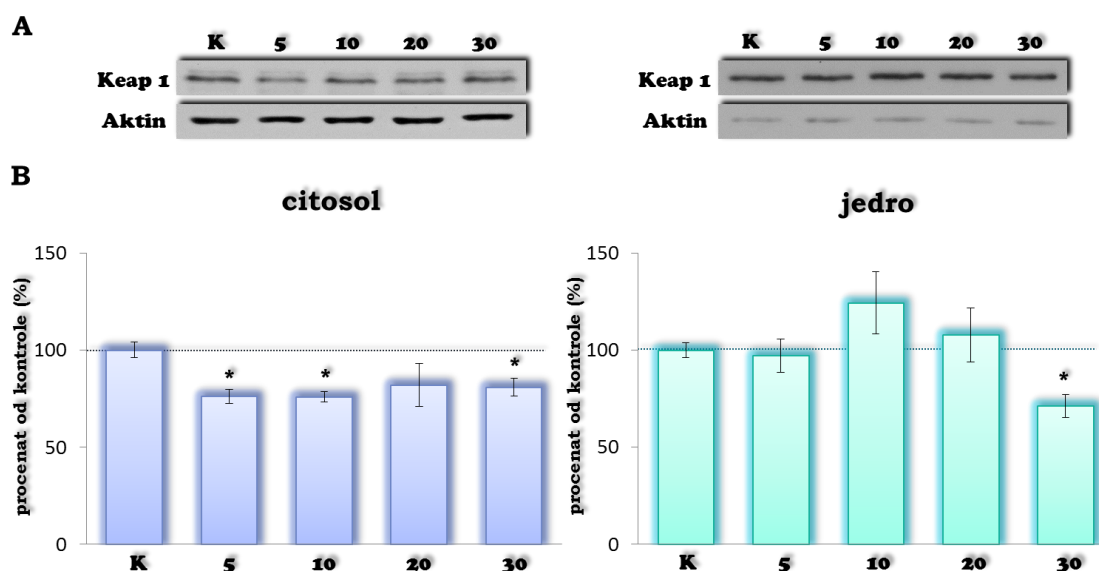


**Slika 50.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji prefrontalnog korteksa Wistar mužjaka izloženih akutnoj imobilizaciji različitog trajanja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; 5, 10, 20, 30-trajanje akutnog stresa u minutima)

(\* $P < 0.05$ , Slika 50), da bi se po isteku 30 min ekspresija ovog transkripcionog faktora vratila na kontrolni nivo. U jedarnoj frakciji je došlo do naglog porasta

nivoa Nrf2 nakon 10 min, da bi po isteku 30 min došlo do pada u nivou Nrf2 ispod nivoa kontrole (\* $P < 0.05$ , Slika 50). Ovaj rezultat je u saglasnosti i sa povećanom ekspresijom gena za Gsta3 i Gclm, koju smo izmerili kod akutno stresiranih životinja.

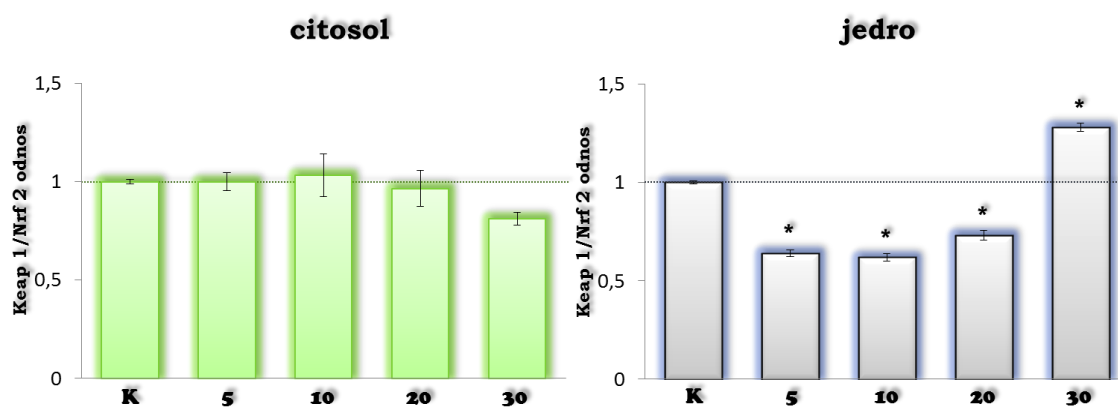
Situacija sa Keap1 je bila nešto drugačija. U citosolu je zabeležen blagi pad u nivou Keap1 proteina već posle 5 min (\* $P < 0.05$ , Slika 51), da bi ostao na sniženom nivou i po isteku pola sata. U jedarnoj frakciji posle 10 min akutne imobilizacije je zapažen trend porasta nivoa Keap1, da bi posle 30 min nivo ovog proteina pao ispod nivoa kontrole.



**Slika 51.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Keap1 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji prefrontalnog korteksa Wistar mužjaka izloženih akutnoj imobilizaciji različitog trajanja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; 5, 10, 20, 30-trajanje akutnog stresa u minutima)

Merenje odnosa ova dva proteina, kako u citosolnoj tako i u jedarnoj frakciji, je pokazalao da, kao i u hipokampusu, i u PFC-u dolazi do promena samo u jedarnoj frakciji. I dok je u hipokampusu sve vreme trajanja akutnog stresa odnos nivoa Nrf2 i Keap1 izmenjen u korist Keap1 proteina, u PFC-u je u prvih 20 min ovaj odnos izmenjen u korist Nrf2 (\* $P < 0.05$ , Slika 52).

Nakon 30 min imobilizacije odnos Nrf2 i Keap1 se menja u korist Keap1 proteina ( $*P < 0.05$ , Slika 52), što koincidira sa padom u nivou jedarnog Nrf2 ( $*P < 0.05$ , Slika 50).



**Slika 52.** Relativan odnos nivoa Keap1 i Nrf2 proteina u citosolnoj i jedarnoj frakciji prefrontalnog korteksa Wistar mužjaka izloženih akutnoj imobilizaciji različitog trajanja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao  $*P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; 5, 10, 20, 30 - trajanje akutnog stresa u minutima)

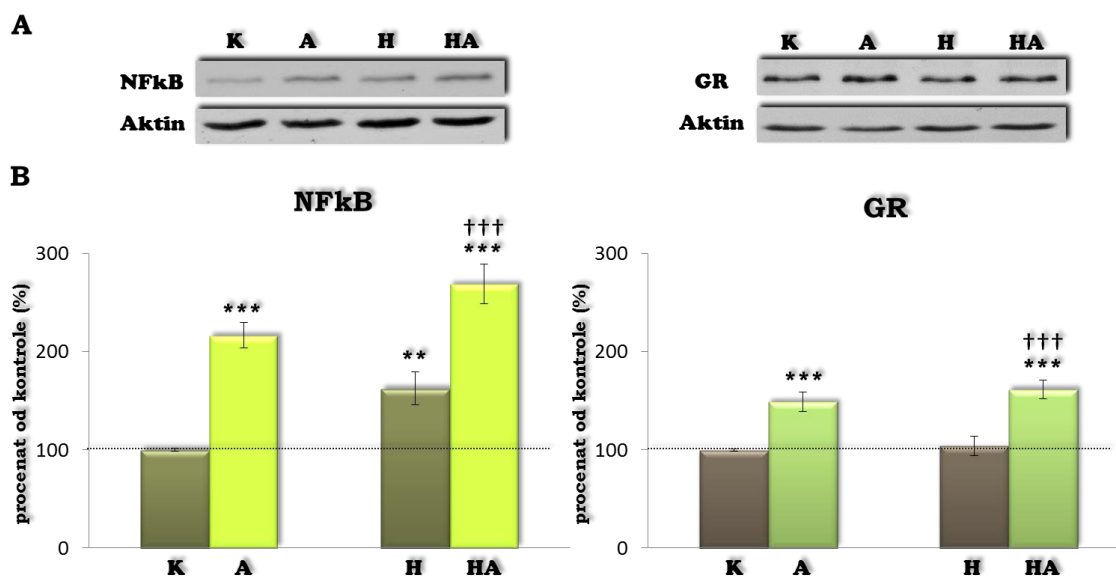
## 4.5. Promene u jetri stresiranih mužjaka Wistar pacova

### 4.5.1. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo transkripcionih faktora, NFκB i GR, i Hsp proteina

Uloga transkripcionih faktora u odgovoru na različite stimulse je ključni faktor u adaptaciji ćelije na izmenjene uslove sredine. Male promene redoks stanja u ćeliji utiču na aktivnost transkripcionih faktora poput NFκB i GR-a. Kako su oni odgovorni za regulaciju ekspresije preko 150 gena uključenih u različite procese u ćeliji, praćenje njihovih promena je od izuzetne važnosti.

Western blot analiza nivoa NFκB proteina je pokazala značajno povećanje ovog proteina u jetri imobilisanih životinja, kao i u životinjama izloženim kombinovanom stresoru (Slika 53, \*P<0.05). Povećan nivo ovog proteina smo izmerili i kod hronično stresiranih životinja, ali je ovo povećanje bilo mnogo manjeg inteziteta (Slika 53, \*P<0.05).

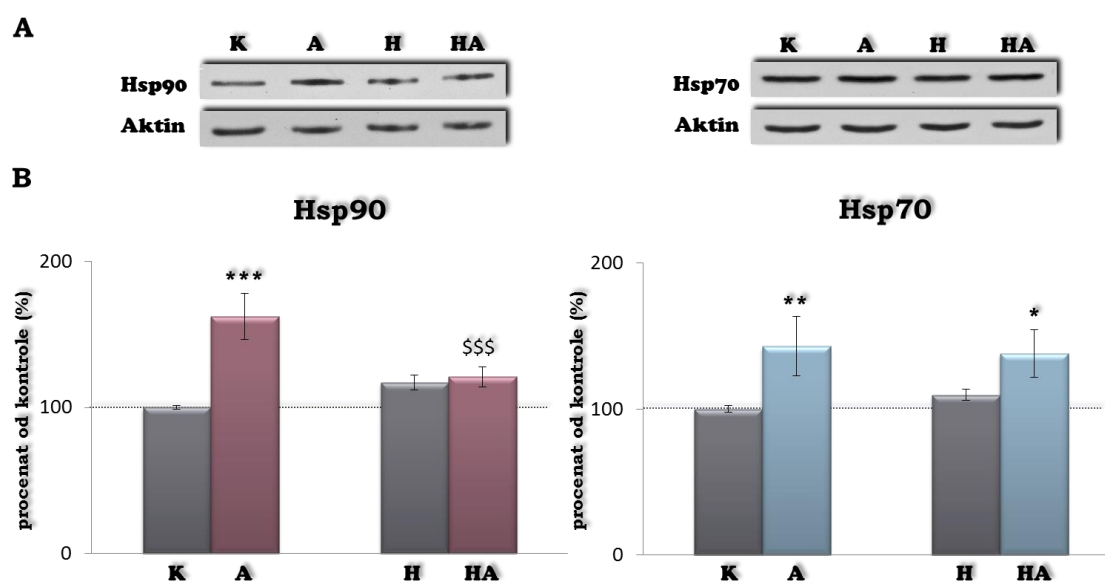
U odgovoru na akutni stresor kao i na kombinaciju stresora, gde smo izmerili značajan skok u koncentraciji kortikosterona u serumu, nivo GR proteina u



**Slika 53.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa NFκB i GR proteina u jetri stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \*P<0.05 u odnosu na kontrolnu grupu. †P<0.05 za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

jetri je takođe bio značajno povećan u odnosu na kontrolne životinje, što je pokazano na Slici 53 (\* $P < 0.05$ ). U grupi životinja koje su bile izlagane socijalnoj izolaciji nivo GR proteina je ostao nepromenjen.

Western blot analiza nivoa Hsp90 proteina u jetri imobilisanih životinja je pokazala značajno povećanje u odnosu na kontrolu, dok je u ostalim tretmanima nivo ovog proteina ostao nepromenjen (Slika 54, \* $P < 0.05$ ). Takođe treba pomenuti i statistički značajnu razliku u nivou Hsp90 proteina između životinja koje su bile izložene samo akutnom stresoru i životinja koje su pre akutnog bile i hronično stresirane (kombinacija stresora, Slika 54, \$ $P < 0.05$ ). Kao što se vidi sa Slike 54, nivo šaperonskog Hsp70 proteina u jetri je bio značajno povećan kod akutno stresiranih životinja i kod životinja podvrgnutih kombinaciji dva stresora (\* $P < 0.05$ ). Međutim, u grupi životinja koje su bile izlagane socijalnoj izolaciji nivo Hsp70 proteina u jetri je ostao nepromenjen.



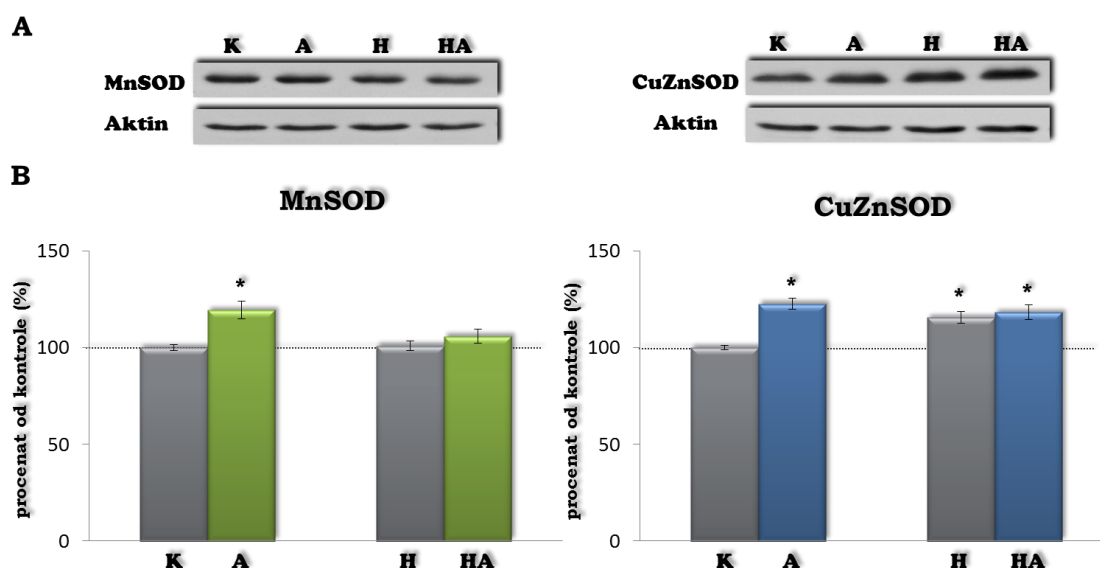
**Slika 54.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa Hsp90 i Hsp70 proteina u jetri stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. \$ $P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)



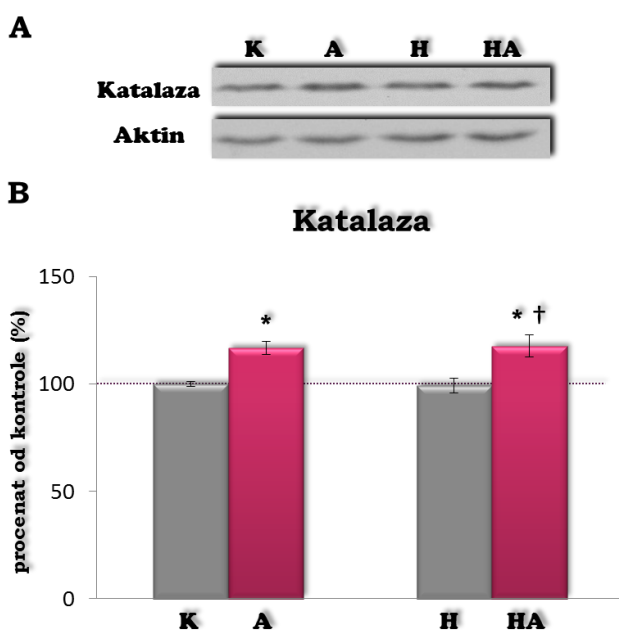
#### 4.5.2. Efekti akutnog i hroničnog stresora i njihove kombinacije na nivo i aktivnost antioksidativnih enzima: MnSOD, CuZnSOD, katalaze, GPx i GLR

Jetra je organ koji je najbogatiji antioksidativnim enzimima. U cilju određivanja promena u antioksidativnoj zaštiti jetre, u funkciji različitih tipova stresora, merili smo nivo proteina kao i aktivnost sledećih antioksidativnih enzima: MnSOD, CuZnSOD, katalaze, GPx-a i GLR-a u ukupnom ćelijskom lizatu jetre. Western blot analiza nivoa MnSOD enzima u jetri je pokazala značajno povećanje u imobilisanim životinjama u odnosu na kontrolu, dok je u ostalim tretmanima nivo ovog proteina ostao nepromenjen (Slika 55, \* $P < 0.05$ ).

Sa Slike 55 se takođe može videti da su sva tri tretmana uzrokovala povećanje nivoa CuZnSOD u jetri. Izmerena aktivnost ukupne SOD, prikazana u Tabeli 4, je pokazala da je u sva tri tretmana došlo do povećanja, iz čega se može zaključiti da povećanje u aktivnosti prvenstveno potiče od CuZnSOD a ne od MnSOD, osim u slučaju akutnog stresora, gde smo imali porast u nivou oba enzima.

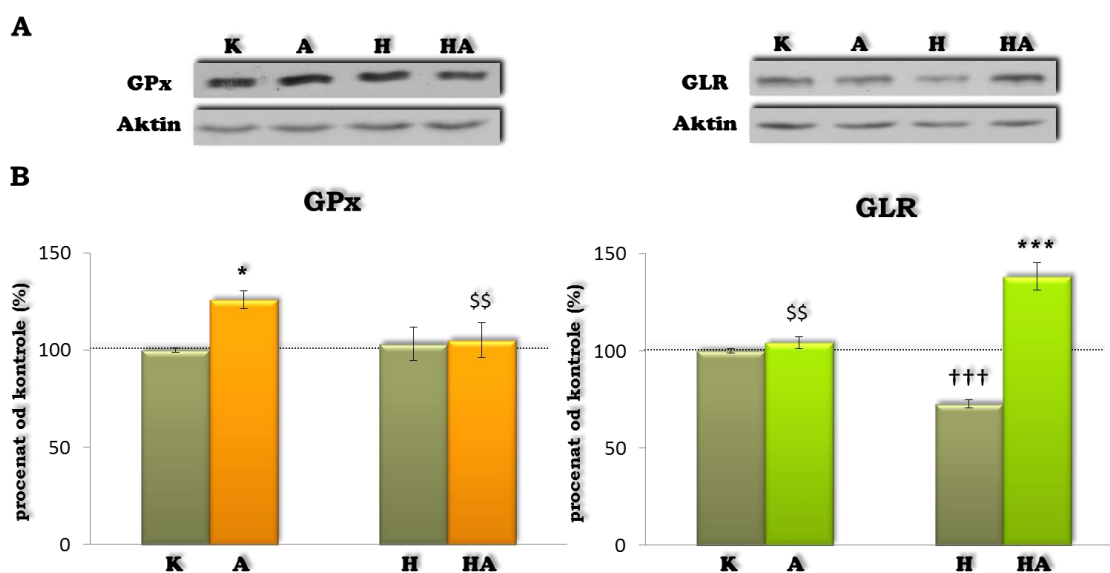


**Slika 55.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa MnSOD i CuZnSOD proteina u jetri stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)



**Slika 56.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperiment i B) relativna kvantifikacija nivoa proteina katalaze u jetri stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu i † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

Na Slici 56 su prikazani rezultati promena u nivou proteina katalaze u jetri u zavisnosti od primenjenog stresora. Povećan nivo ovog enzima u odnosu na kontrolne životinje, smo izmerili u jetri akutno stresiranih životinja i kod životinja podvrgnutih kombinaciji dva stresora (\* $P < 0.05$ ), dok je u grupi životinja koja je bila izlagana socijalnoj izolaciji nivo katalaze u jetri ostao nepromenjen. Ovaj rezultat je u saglasnosti i sa izmerenom enzimskom aktivnošću, gde smo povećanje takođe izmerili samo u jetri akutno stresiranih životinja i kod



**Slika 57.** A) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti i B) relativna kvantifikacija nivoa glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GLR) u jetri stresiranih Wistar mužjaka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \* $P < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu, § $P < 0.05$  za akutni u odnosu na kombinovani stres, † $P < 0.05$  za hronični u odnosu na kombinovani stres. (K-kontrola; A-akutni stres; H-hronični stres; HA-kombinovani stres)

životinja podvrgnutih kombinaciji dva stresora (Tabela 4, \*P<0.05).

Western blot analiza drugog peroksidaznog enzima, GPx-a, je pokazala da nivo ovog proteina u jetri raste samo u uslovima akutnog stresa (\*P<0.05, Slika 57). Povećanje enzimske aktivnosti GPx-a takođe je izmereno samo kod akutno stresiranih životinja (Tabela 4). Aktivnost GPx-a zavisi od dostupnosti redukovano glutationa. Enzim GLR, koji obezbeđuje rezerve redukovano glutationa neophodnog za enzimsku aktivnost GPx-a, nije pratio promene GPx-a ni u jednom tretmanu. U uslovima akutnog stresa gde smo detektovali povećanje nivoa GPx-a, nivo GLR proteina kao i njegova enzimska aktivnost su ostali nepromenjeni (Slika 57, Tabela 4). U grupi životinja koje su bile izlagane socijalnoj izolaciji i gde je GPx u jetri ostao nepromenjen, nivo

GLR proteina kao i njegova enzimska aktivnost su bili statistički značajno smanjeni u odnosu na kontrolu (\*P<0.05), dok je kombinacija dva stresora izazvala statistički značajno povećanje u nivou i enzimskoj aktivnosti GLR (\*P<0.05, Slika 57, Tabela 4).

**Tabela 4.** Aktivnost antioksidativnih enzima (ukupne SOD, katalaze, glutation peroksidaze GPx i glutation reduktaze GLR) u jetri kontrolnih i stresiranih životinja izražena u jedinicama po mg proteina (U/mg prot). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost merenja  $\pm$  SEM i obrađeni One-way ANOVA i post-hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao \*P<0.05 u odnosu na kontrolnu grupu.

<i>stresor</i>				
<i>Aktivnost enzima (U/mg prot)</i>	<b>kontrola</b>	<b>akutni</b>	<b>hronični</b>	<b>kombinovani</b>
<b>SOD</b>	66.48 $\pm$ 0.77	77.93 $\pm$ 1.25 *	77.04 $\pm$ 2.04 *	81.91 $\pm$ 2.64 *
<b>katalaza</b>	322.11 $\pm$ 3.98	374.71 $\pm$ 4.42 *	320.81 $\pm$ 5.18	384.54 $\pm$ 4.85 *
<b>GPx</b>	36.42 $\pm$ 1.30	42.03 $\pm$ 1.10 *	37.76 $\pm$ 1.69	38.46 $\pm$ 2.30
<b>GLR</b>	21.35 $\pm$ 0.62	22.69 $\pm$ 0.46	18.09 $\pm$ 0.65 *	26.22 $\pm$ 0.89 *

## **5. Diskusija**

Smatra se da je hronični stres jedan od glavnih etioloških faktora u razvoju psihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti, a mnogi naučnici tvrde da se u osnovi ovih bolesti nalazi i narušena redoks ravnoteža. Uspešna adaptacija na stres uključuje udruženo delovanje hormona simpato-adreno-medularnog i hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema na nekoliko nivoa u centralnom nervnom sistemu, koji obuhvataju moždane strukture kao što su hipokampus i prefrontalni korteks.

U literaturi je poznato da glukokortikoidi izazivaju povećavanu proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta i da mogu da naruše ravnotežu između nastanka oksidanata i antioksidativne zaštite, što može da dovede do stanja oksidativnog stresa. Kako hipokampus spada među moždane regione najosetljivije na oksidativni stres, adaptivne promene unutar same strukture su jako bitne za očuvanje njegove funkcionalnosti. Evolutivno najrazvijeniji region u mozgu je PFC ali, uz hipokampus, i najosetljiviji na negativne efekte stresa. Čak i blag, nekontrolisan stres može veoma lako da ugrozi funkcije PFC-a, dok izlaganje hroničnom stresu vodi ka njegovim strukturnim promenama. Za uspešnu

adaptaciju na stres, između ostalog, neophodan je adekvatan antioksidativni odgovor CNS-a, koji uključuje izmenjenu ekspresiju čitavog skupa gena i proteina.

Cilj ove disertacije je bio da ispitamo promene na nivou antioksidativne zaštite u hipokampusu i PFC-u pod dejstvom hroničnog, akutnog i kombinovanog stresora. U jetri smo takođe želeli da ispitamo da li relativni odnos između dva transkripciona faktora osetljiva na stres, GR i NFkB, može uticati na odgovor antioksidativne zaštite u datim uslovima. Dugotrajna socijalna izolacija je odabrana kao potencijalni maladaptivni hronični stresor, pri čemu je bilo bitno utvrditi i da li prethodno izlaganje hroničnom stresoru menja odgovor na naknadni akutni stresor. U tu svrhu je korišćena akutna imobilizacija, koja se definiše kao fizičko-emotivno-psihosocijalni stresor visokog intenziteta (Garcia i saradnici, 2000). Ovaj tip stresora je odabran zbog toga što značajno podiže nivo serumskog kortikosterona i stoga se može smatrati paradigmom "normalnog" odgovora na stres.

Kako se značaj veze između fiziološke i molekularne signalizacije u ispitivanim limbičkim moždanim strukturama i neadekvatnog odgovora na hronični stres, ogleda najbolje u izmenjenom ponašanju ispitivanih životinja, bilo je neophodno analizirati određene karakteristike ponašanja hronično stresiranih pacova.

## 5.1. Hronična socijalna izolacija izaziva promene u ponašanju životinja u pravcu anksioznosti i depresije

Kompleksna simptomatologija depresivnih poremećaja kod ljudi dosta otežava korišćenje životinjskih modela u proučavanju ovih bolesti, ali se određeni oblici ponašanja ipak mogu pratiti i meriti. Poslednjih godina su razvijeni životinjski modeli koji se koriste za proučavanje poremećaja raspoloženja kao i za praćenje efikasnosti terapija koje se koriste u njihovom lečenju. Poznato je da hronični stres ima značajnu ulogu u etiologiji depresije, kao i da dovodi do promena u centralnom nervnom i neuroendokrinom sistemu koje imaju sličnosti sa promenama karakterističnim za razvoj poremećaja raspoloženja. Među njima, od posebnog su značaja stresori sa psihosocijalnom komponentom. Modeli hroničnog stresa prvi put su korišćeni još 1987. godine za izazivanje depresivnog ponašanja kod glodara (Willner i saradnici, 1987). Uzimajući u obzir činjenicu da se anksioznost i depresija najčešće javljaju udruženo, bilo je važno pokazati da li hronična socijalna izolacija dovodi do promena u ponašanju životinja, i to promena koje bi se mogle definisati kao ponašanje nalik anksioznom ili depresivnom.

Jedan od najčešće korišćenih testova u analizi anksioznog ponašanja jeste test izdignutog plus lavirinta. U našim eksperimentima je praćena ukupna lokomotorna aktivnost životinje (kao ukupan broj ulaza u zatvorena i otvorena polja), broj ulaza u otvorena polja kao i vreme provedeno u njima (kao mera anksioznosti), i broj ulaza u zatvorena polja. U uslovima hronične socijalne izolacije je izmereno statistički značajno smanjenje lokomotorne aktivnosti životinja u poljima lavirinta. Trend smanjenja lokomotorne aktivnosti se slaže sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da socijalni stres utiče na izmenjeno lokomotorno ponašanje životinja (Koolhaas i saradnici, 1997; Rygula i saradnici, 2005). Broj ulazaka u otvorena polja i vreme provedeno u njima odražavaju konflikt između težnje životinje da se kreće u zaštićenom prostoru (zatvorena polja) i istraživačke aktivnosti u otvorenim poljima, i služe kao uobičajeni indikatori anksioznosti. Smanjen broj ulazaka u otvorena polja, kao i vremena provedenog u otvorenim poljima lavirinta je direktna mera anksioznog ponašanja životinja. Naši rezultati su pokazali da tri nedelje socijalne izolacije prouzrokuju smanjenu eksploratornu

aktivnost životinje u izdignutom plus lavirintu tj. pojavu anksioznog ponašanja. Brojne studije su se bavile temom hroničnog stresa i ponašanja. Neke su pokazale da stres smanjuje anksiozno ponašanje (D'Aquila i saradnici, 1994; Kompagne i saradnici, 2008), druge da povećava anksiozno ponašanje (Bessa i saradnici, 2009; Pohl i saradnici, 2007), dok neke tvrde da stres ne dovodi do promena u ponašanju (Matuszewich i saradnici, 2007) u testu izdignutog plus lavirinta. Međutim, većina radova je pokazala pozitivnu vezu između stresa i anksioznog ponašanja. Razlike u dobijenim rezultatima se mogu objasniti drugačijim metodološkim konceptima ovih istraživanja. Tako su, na primer, u istraživanjima gde nisu korišćeni direktni fizički stresori životinje pokazale anksiozno ponašanje u testu izdignutog plus lavirinta, dok u testiranju životinja koje su tretirane direktnim fizičkim stresorima (Matuszewich i saradnici, 2007) anksiozno ponašanje nije zabeleženo. Sve ovo govori u prilog tome da rezultati testa izdignutog plus lavirinta zavise od istorije i konteksta u kojima se ponašanje životinja analizira.

Spasojević i saradnici (2007) su pokazali da hronična psihosocijalna izolacija u trajanju od 4 nedelje dovodi do pojave anksioznog ponašanja, praćenog smanjenim brojem vertikalnih izdizanja i promenama u timarenju u odnosu na kontrolne životinje. Iako promene u timarenju nisu obuhvatale razlike u učestalosti između hronično izolovanih i kontrolnih pacova, aktimetarski test, koji omogućava detaljnu kvalitativnu analizu timarenja, pokazao je smanjenu dužinu pojedinačnih timarenja, produžen period između dva timarenja, kao i učestalije timarenje tela i genitalija u odnosu na glavu. Kako je timarenje kod glodara stereotipno ponašanje koje ima određeni redosled, poremećen redosled faza u timarenju kao i njihova dužina ukazuju na anksiogeni efekat stresa (Komorowska i Pisula, 2003).

Test forsiranog plivanja se smatra standardnim testom za praćenje ponašanja koje je slično depresivnom i u istraživanjima se često koristi da se odredi efikasnost antidepresiva. Imobilnost odražava stanje smanjenog raspoloženja, u kome su životinje napustile svaku nadu da će pronaći izlaz i predstavlja vrstu bespomoćnosti u ponašanju životinje. Test je rađen sa jednim merenjem (eng. one-trial test) da bi se izbegao lažni rezultat koji potiče od naučene



bespomoćnosti životinja, koja se javlja u testovima sa višestrukim merenjima (Porsolt i saradnici, 1978; Shimazoe i saradnici, 1987). U literaturi je pokazano da hronični stres utiče na povećanje vremena imobilnosti životinje u testu forsiranog plivanja (Bielajew i saradnici, 2003). U našim merenjima je zabeleženo statistički značajno povećanje vremena imobilnosti kod hronično izolovanih životinja, što je u skladu sa rezultatima drugih autora, dobijenih kod hronično stresiranih životinja (Brenes i Fornaguera, 2009; Spasojević i saradnici, 2008).

Weiss i saradnici (1998) su bili prvi koji su u okviru testa forsiranog plivanja prepoznali različite oblike aktivnog ponašanja eksperimentalnih životinja. Naime, osim imobilnosti, u aktivnom ponašanju oni razlikuju penjanje uz zidove cilindra i plivanje. Penjanje se obično dešava u prvim minutima testiranja, plivanje tokom celog testa, dok je imobilnost najučestalija na samom kraju testiranja. Penjanje i plivanje su dva oblika aktivnosti koja se dešavaju naizmenično u serijama, kao pokušaj da se izađe iz cilindra. Pokazano je da inhibitori preuzimanja noradrenalina stimulišu penjanje uz zidove (rešenost da se izađe iz cilindra), dok je plivanje manifestacija inhibicije preuzimanja serotonina. Naša istraživanja su pokazala da hronična socijalna izolacija ne menja vreme koje životinja provede u penjanju, ali značajno smanjuje vreme plivanja, što ukazuje da ovaj tip hroničnog stresa pogađa pre svega serotonergičku signalizaciju.

Ukupno gledano, hronična socijalna izolacija je imala uticaj na pojedine elemente ponašanja životinja, dovodeći do pojave nekih od karakteristika anksioznog i depresivnog ponašanja. Ove promene pokušali smo da dovedemo u vezu sa fiziološkim i molekularnim parametrima, koji su pod uticajem hronične socijalne izolacije bili izmenjeni u limbičkim strukturama mozga.

## **5.2. Hronična socijalna izolacija smanjuje aktivnost peroksidaznih enzima u hipokampusu Wistar mužjaka**

Mozak je veoma osetljiv na oštećenja koja izazivaju reaktivne kiseonične vrste, kako zbog svoje velike metaboličke aktivnosti, značajne količine polinezasićenih masnih kiselina i sadržaja metala, tako i zbog relativno slabe antioksidativne zaštite. Određeni regioni CNS-a, kao što je hipokampus, su posebno

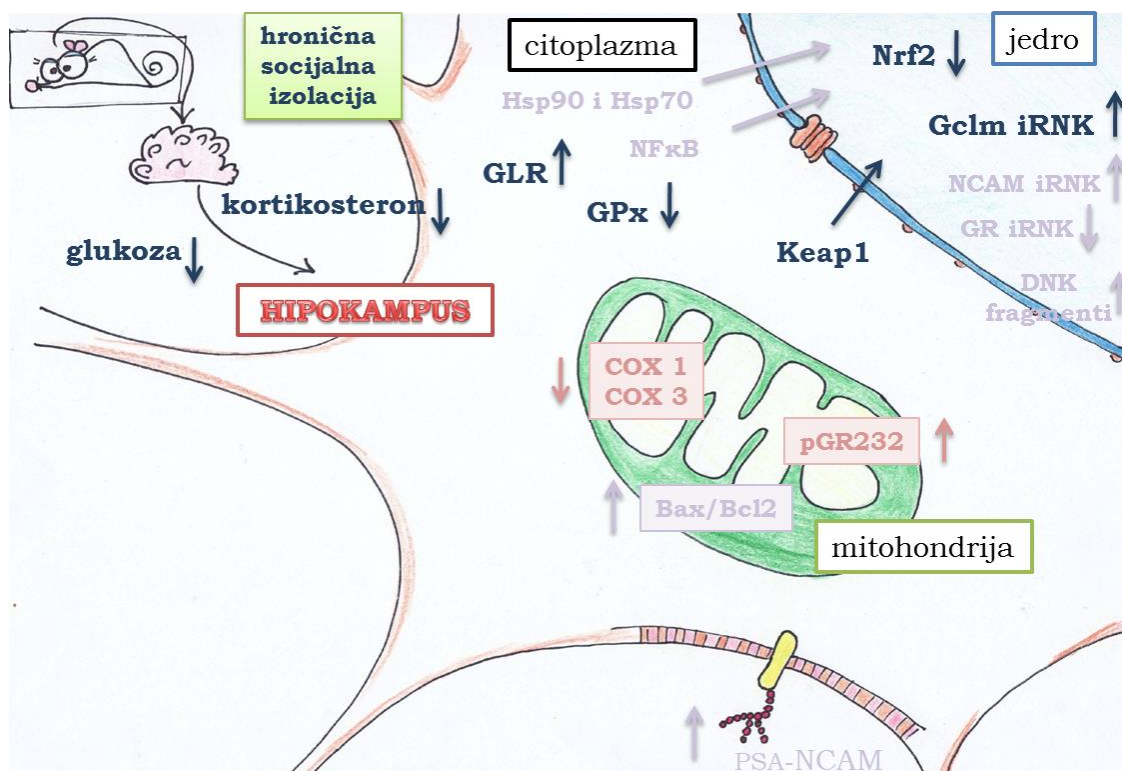
osetljivi na oksidativni stres zbog nižih koncentracija endogenog vitamina E u odnosu na druge moždane strukture (Santos i saradnici, 2009). U bazalnim uslovima čak i slaba antioksidativna odbrana pruža adekvatnu zaštitu moždanih struktura od nastalih oksidanata, međutim u prooksidativnim uslovima ovakva odbrana povećava šansu za stvaranje oksidativnog stresa. U pojedinim fazama neuroregulatornih fizioloških procesa, koji se ostvaruju preko steroidnih hormona, kao i u toku metabolizma samih steroidnih hormona, dolazi do značajnih promena oksido-redukcijske ravnoteže, ukoliko ne postoji efikasna antioksidativna enzimska odbrana. Tako je poznato da glukokortikoidni hormoni narušavaju balans između nastanka oksidanata i antioksidativne zaštite tako što povećavaju produkciju ROS-a (Behl i saradnici, 1997).

U odgovoru na akutnu imobilizaciju, gde smo izmerili značajno povećanje koncentracije serumskog kortikosterona, aktivirao se čitav set antioksidativnih enzima, što se može tumačiti kao adaptivni odgovor na povećanu produkciju ROS-a (Tabela 2). Povećana produkcija ROS-a može biti poreklom od narušenog transportnog lanca elektrona i povećane produkcije superoksida u mitohondrijama, kao i od aktivirane mikroglije i NADPH oksidaze. Takođe, može biti posledica metabolizma kateholamina (Smythies i Galzigna, 1998) koji su, kako su pokazali Dronjak i saradnici (2004), u uslovima akutnog stresa višestruko povišeni. Naše ranije studije su pokazale povećanu jedarnu aktivnost NF $\kappa$ B i GR-a u hipokampusu u uslovima akutnog stresa (Djordjevic i saradnici, 2009). Važno je napomenuti da promotor, kao i kontrolni region drugog introna MnSOD gena, sadrže vezujuće mesto za transkripcioni faktor NF $\kappa$ B, dok promotorski region CuZnSOD gena sadrži vezujuće mesto za NF $\kappa$ B i GR (Kim i saradnici, 1994). Uklanjanje viška H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u neuronima, koji nastaje usled aktivnosti SOD enzima, vrši prvenstveno katalaza (Schad i saradnici, 2003). U uslovima akutnog stresa njena aktivnost bila je čak dvostruko povišena. Svi ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se u uslovima akutnog stresa ova moždana struktura uspešno bori protiv povećane produkcije ROS-a (usled povišenih kateholamina, kortikosterona i glukoze). Povećana aktivnost antioksidativnih enzima može poticati i od aktivirane mikroglije kao i od signalizacije poreklom od IL1 i TNF $\alpha$  (Bruce i saradnici, 1996).

To se pre svega odnosi na povećanu ekspresiju GPx-a, koga najviše ima u ćelijama mikroglije (Lindenau i saradnici, 1998), dok je u neuronima i astrocitima mnogo manje zastupljen. Indukovani odgovor GPx-a je posledica promene u produkciji lipidnih peroksida. Nepromenjena aktivnost ovog enzima može biti posledica povišenog kortikosterona, za koji je pokazano da smanjuje aktivnost GPx-a u hipokampusu (McIntosh i saradnici, 1998). Takođe, razlog možemo tražiti i u nedovoljnoj količini glutationa koji je neophodan za njegovu aktivnost, jer je aktivnost GLR-a koji obezbeđuje rezerve redukovano glutationa, ostala takođe nepromenjena. Nizak nivo redoks senzitivnog transkripcionog faktora Nrf2 koji smo izmerili u jedru (Slika 35), može predstavljati moguće objašnjenje za ovakav rezultat. Naime, Nrf2 reguliše bazalnu i inducibilnu ekspresiju brojnih gena za detoksifikujuće i antioksidativne enzime, kao i gena uključenih u glutationski put (glutation reduktaza, glutamat cistein ligaza, glutation S transferaza). Naši rezultati su pokazali da Keap1 izbacuje Nrf2 iz jedra već posle 10 min (Slika 41), što je rezultiralo smanjenom ekspresijom gena za enzime koji obezbeđuju nove rezerve glutationa. Smanjena aktivnost Nrf2 u jedru može se povezati i sa povećanim nivoom NFκB, za koji je poznato da igra važnu ulogu u inaktivaciji Nrf2. Nepromenjena aktivnost GPx-a i GLR-a i smanjena ekspresija gena koji sintetišu ili koriste glutation sugeriše da je u uslovima akutnog stresa odgovor glutationskog sistema u hipokampusu izostao.

Rezultati iz drugih laboratorija su pokazali narušenu antioksidativnu zaštitu u različitim modelima hroničnog stresa kao što su: stres ograničavanjem (Zafir i Banu, 2009), hronična imobilizacija (Grillo i saradnici, 2003) ili hronično izlaganje niskim temperaturama (Kaushik i Kaur, 2003). Zajednička karakteristika svih ovih modela jeste povišen nivo kortikosterona u serumu koji može biti odgovoran za povećanu produkciju ROS-a (Liu i Mori, 1999). S druge strane, naša ranija istraživanja na modelu hronične socijalne izolacije i sniženog kortikosterona, su pokazala smanjeni kapacitet oksidativne fosforilacije i mitohondrijalne respiracije u hipokampusu (Adzic i saradnici, 2009a), što takođe može imati za posledicu narušenu redoks ravnotežu. Merenje antioksidativnih enzima u našoj studiji je pokazalo da u hipokampusu hronično stresiranih životinja nema bitnih promena u

nivou ovih enzima, ali da je aktivnost GPx-a značajno smanjena. Neuroprotektivna uloga ovog enzima je dokumentovana u mnogim studijama (DeHaan i saradnici, 2003; Weisbrot-Lefkowitz i saradnici, 1998). Kliničke studije su pokazale



**Slika 58.** Shematski prikaz praćenih parametara u hipokampusu, koji su bili promenjeni pod uticajem hronične socijalne izolacije (ilustrovala Ana Đorđević)

smanjenu aktivnost GPx-a kod ljudi koji boluju od depresije (Maes i saradnici, 2011), kao i u patogenezi drugih neurodegenerativnih bolesti (Power i Blumbergs, 2009), dok je izmenjena aktivnost ovog enzima primećena i kod životinjskih modela depresije indukovane stresom (Eren i saradnici, 2007). Smanjena aktivnost GPx-a može da dovede do pomeranja ravnoteže u pravcu akumulacije  $H_2O_2$  i OH radikala, kao i peroksidovanih biomolekula, pre svega lipidnih peroksida, čije je prisustvo takođe izmereno u nekim kliničkim studijama (Bilici i saradnici, 2001). Akumulacija proteinskih i lipidnih peroksida u uslovima blagog hroničnog stresa je dokumentovana i u studijama na životinjama (Lucca i saradnici, 2009) i može uticati na aktivnost enzima osetljivih na ove molekule, poput glukokortikoidnih receptora, kinaza, JNK, CDK ili NFκB, što je i pokazano u našim ranijim radovima (Adzic i saradnici, 2009b; Djordjevic i saradnici, 2009). Povišen nivo GLR-a kao i iRNK za glutamat cistein ligazu, limitirajući enzim za sintezu glutaciona, bi mogao

da se tumači kao pokušaj sistema da održi redoks ravnotežu povećavajući rezerve redukovano glutationa i aktivirajući odbranu koja ne uključuje GPx. Uprkos povećanom nivou GLR-a, nisu izmerene veće promene u njenoj enzimskoj aktivnosti što može biti posledica nedovoljne količine njenog supstrata, NADPH, usled sniženog nivoa glukoze (Suh i saradnici, 2007). Veliki broj eksperimentalnih podataka ukazuje na to da oksidativni stres igra značajnu ulogu u starenju i patogenezi neurodegenerativnih oboljenja, gde je poseban akcenat stavljen baš na glutationski sistem (DeHaan i saradnici, 2003; Hovatta i saradnici, 2010; Halliwell, 2006). Analize genske ekspresije i testova ponašanja kod različitih sojeva miševa su izdvojile enzim GLR kao mogući biomarker anksioznog ponašanja (Hovatta i saradnici, 2005). Smanjen nivo Nrf2 u jedru nije uticao na ekspresiju gena regulisanih ovim transkripcionim faktorom. Smanjena jedarna aktivnost Nrf2, koji igra važnu ulogu u zaštiti nervnih ćelija od oksidativnih oštećenja (Johnson i saradnici, 2008), čini ovu strukturu podložniju oksidativnim oštećenjima. Poznato je i da višak  $H_2O_2$  dovodi posredno do izbacivanja Nrf2 iz jedra i njegove degradacije preko aktivacije GSK kinaza, što može biti jedno od objašnjenja dobijenih rezultata. Višak  $H_2O_2$  u hipokampusu može biti jedan od uzroka različite aktivnosti Nrf2 u hipokampusu i PFC-u u uslovima hroničnog stresa. Procesi koji sprečavaju aktivnost Nrf2 u jedru, dovode do oštećenja funkcije i/ili gubitka neurona. Smanjen nivo proteina Nrf2 u jedru ne mora biti samo rezultat degradacije (nivo u citosolu nije promenjen), već može biti posledica poremećenog transporta u jedro, što je primećeno u slučaju nekih drugih transkripcionih faktora. Nedavno objavljene studije kod pacijenata za različitim neurološkim poremećajima su pokazale izmenjenu ekspresiju gena regulisanih sistemom Nrf2/Keap1 (Zhang i saradnici, 2013; Ramsey i saradnici, 2007). Smanjena funkcija Nrf2 može poslužiti i kao pokazatelj predispozicije za hronične inflamatorne bolesti. Tako su rezultati naših ranijih studija pokazali povećanu jedarnu aktivnost NFkB u hipokampusu hronično stresiranih životinja. Prema podacima iz literature, povećana aktivnost NFkB i smanjena aktivnost Nrf2 se mogu interpretirati kao markeri neurodegeneracije, što potvrđuju i naši raniji rezultati koji su kod hronično izolovanih životinja pokazali povećanje količine fragmentisane DNK, inicijaciju apoptoze kao i ugrožen proces ćelijskog disanja u mitohondrijama sa povišenim

nivoom GR-a u mitohondrijama, čije se prisustvo u ovim organelama smatra indikatorom inicijacije apoptoze (Adzic i saradnici, 2009b). Takođe, oksidativni stres može biti i uzrok izmenjene plastičnosti u ovoj moždanoj strukturi (Mattson i Liu, 2002), koju su pokazali naši raniji radovi (Djordjevic i saradnici, 2010). Svi ovi podaci govore u prilog činjenici da u uslovima hronične izolacije poreklo oksidativnog stresa u hipokampusu treba tražiti u neadekvatnoj antioksidativnoj zaštiti a ne u povećanoj produkciji ROS-a.

U nastavku studije smo analizirali sposobnost hipokampusu da sprovede normalan odgovor na stres, tako što smo hronično stresirane pacove izlagali naknadnoj akutnoj imobilizaciji. Rezultati su pokazali da je obrazac promena antioksidativnih enzima u kombinovanom stresu izmenjen u odnosu na odgovor na akutni stresor. Naime, reakcija je potpuno izostala na nivou peroksidaznih enzima, GPx-a i katalaze. Narušen peroksidazni sistem već je pokazan u nekim studijama starenja kod miševa, zbog čega se smatra da stres može da ubrza procese starenja mozga (DeHaan i saradnici, 2003). Aktivnost GLR-a koja je bila dodatno smanjena u kombinovanom stresu u odnosu na hronični stres, iako je nivo glukoze obnovljen, može da dovede do praznjenja depoa redukovano glutaciona. Ovo stanje se u literaturi povezuje sa pojavom depresije izazvane stresom kao i sa kognitivnim poremećajima (Pal i Dandiya, 1994; Dean i saradnici, 2009). Sistem Nrf2/Keap1 je imao isti obrazac promena kod kombinovano stresiranih životinja kao i kod akutno stresiranih životinja, s tom razlikom što nije doveo do smanjenja ekspresije gena koji su njime regulisani. Dobijeni rezultati su nas naveli da zaključimo da hronični stres dovodi do trajnih i nepovratnih promena na nivou antioksidativne zaštite u hipokampusu, pre svega do promene u aktivnosti peroksidaznih enzima, katalaze i GPx-a (Slika 58), koji pod dejstvom naknadne akutne imobilizacije nisu dostigli nivo opisan kod akutno stresiranih životinja, već su se, sudeći po njihovoj enzimskoj aktivnosti, dalje pogoršale u pravcu stvaranja prooksidativnog stanja. Ove promene mogu izazvati akumulaciju peroksidovanih produkata, pre svega lipida, glavnih konstituenata membrana neurona, kao i inicijaciju proapoptotske signalizacije koja je već dokumentovana u ovoj moždanoj strukturi u našim ranijim studijama (Djordjevic i saradnici, 2009). Dobijeni

rezultati podržavaju nalaze drugih autora (McEwen, 2008; Manoli i saradnici, 2007) da je hronični stres možda ključni faktor koji ugrožava adaptivni odgovor CNS-a, a posebno njegove limbičke strukture, hipokampusa.

### **5.3. Hronična socijalna izolacija aktivira antioksidativnu zaštitu u prefrontalnom korteksu Wistar mužjaka**

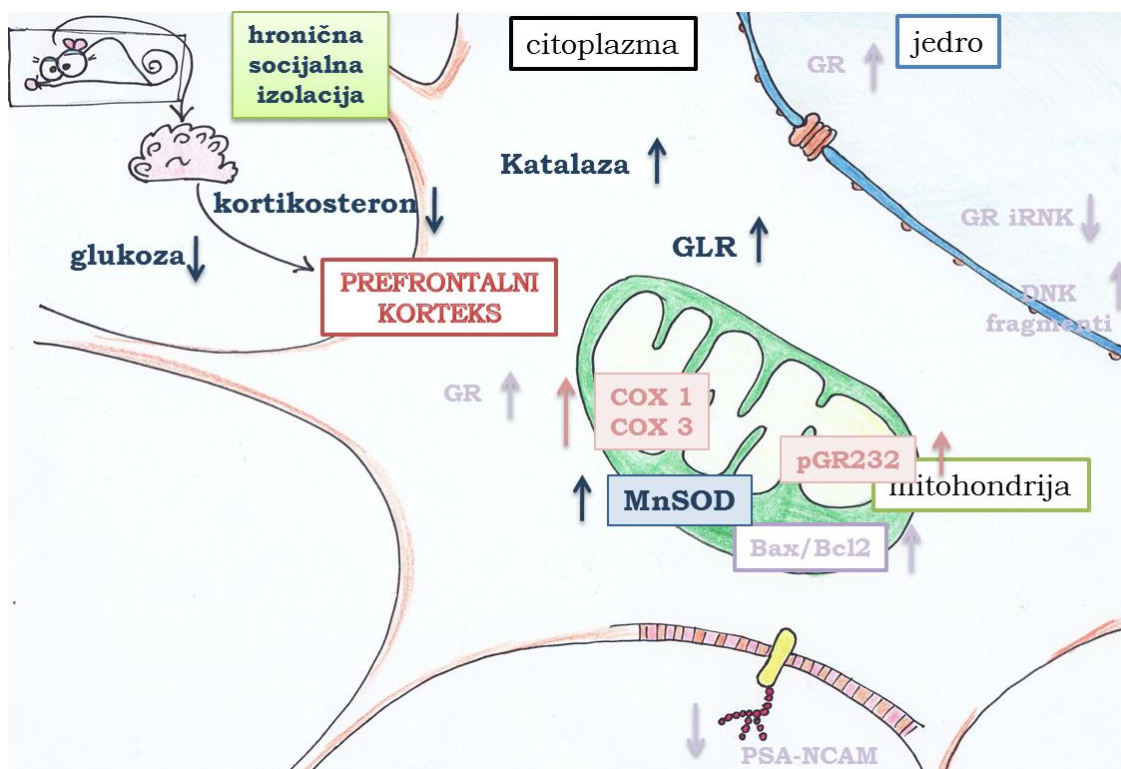
Prefrontalni korteks je moždana struktura, koja je pored hipokampusa, uključena u regulaciju negativne povratne sprege HPA sistema a samim tim i odgovora na stres koji je posredovan glukokortikoidima (Diorio i saradnici, 1993). Uspešna adaptacija na stres podrazumeva sinergističko delovanje glukokortikoida i kateholamina na nekoliko nivoa CNS-a, i uključuje promene u PFC-u. Prefrontalni korteks, kao evolutivno najrazvijeniji region mozga, istovremeno je i najosetljiviji region na štetne efekte stresa (Arnsten, 2009). Čak i blagi stres može u kratkom vremenu ugroziti funkcionisanje PFC-a, a izlaganje hroničnom stresu može dovesti i do strukturnih promena u ovom regionu mozga (Cerqueira i saradnici, 2007). Da bismo utvrdili kako PFC reaguje na stresore koje smo koristili u našoj studiji, kao i da li se taj odgovor razlikuje u odnosu na odgovor u hipokampusu, pratili smo promene istih parametara kao i u hipokampusu pod dejstvom odabranih stresora.

Kao što je već pomenuto, akutni stres, koji dovodi do povišenog nivoa kortikosterona, može da izazove povećanu produkciju ROS-a u mozgu (McEwen, 2001), tako da ne iznenađuje činjenica da je i u PFC-u, kao i u hipokampusu, izmeren povećan nivo MnSOD. Indukcija MnSOD-a predstavlja odbrambeni mehanizam na prooksidativno stanje, sa ciljem da se ponovo uspostavi stanje homeostaze (Greenlund i saradnici, 1995). Imajući u vidu naše ranije rezultate (Djordjevic i saradnici, 2009; Djordjevic i saradnici, 2010) koji su pokazali prelazak GR-a iz citoplazme u jedra u obe moždane strukture, i činjenicu da promotorski region CuZnSOD gena sadrži vezujuće mesto za GR (Kim i saradnici, 1994), zanimljivo je da nismo uočili statistički značajne promene u nivou CuZnSOD-a. Za razliku od hipokampusa, gde su najupadljivije promene bile u peroksidaznim enzimima, u PFC-u se nivo ovih enzima zadržao na kontrolnom nivou. Iako je neuroprotektivna uloga SOD enzima pokazana u više studija (Keller i saradnici,

1998; Greenlund i saradnici, 1995), važno je napomenuti da se u ćeliji može stvoriti prooksidativno stanje ukoliko njihova aktivnost nije sinhronizovana sa aktivnošću peroksidaznih enzima. Liu i saradnici (1996) su pokazali da imobilizacija izaziva oksidativna oštećenja lipida, proteina i DNK u mozgu pacova, kao i da su ta oštećenja najizraženija u cerebralnom korteksu. Interesantno je da je, kao i u hipokampusu, došlo do značajnog porasta nivoa enzima GLR, ali da nismo zapazili promene u njegovoj aktivnosti. Ovo se može objasniti činjenicom da u uslovima akutnog stresa glukokortikoidi obezbeđuju visok nivo glukoze u krvi tako što blokiraju preuzimanje glukoze u perifernim tkivima (Munck, 1971) i moždanim strukturama (Horner i saradnici, 1990; Virgin i saradnici, 1991), što za posledicu može imati nedovoljne količine NADPH, supstrata za GLR (Suh i saradnici, 2007). Na osnovu svih rezultata možemo da zaključimo da je za razliku od hipokampusa, u PFC-u adaptivni odgovor na akutni stresor neadekvatan na nivou antioksidativne zaštite. Kao što smo već rekli uloga Nrf2 u reakciji na stres podrazumeva vrlo brzu aktivaciju ovog transkripcionog faktora tako da ne iznenađuje rezultat da Nrf2 već posle 15 min dostiže najviši nivo u jedru. Eksperimenti sa t-BHQ tretmanom su pokazali da do akumulacije Nrf2 u jedru dolazi u roku od 15 minuta (Jain i saradnici, 2005). O povećanoj jedrnoj aktivnosti ovog transkripcionog faktora govori i povećana ekspresija gena glutationskog puta. Uloga Nrf2 u reakciji na stres podrazumeva vrlo brzu aktivaciju ovog transkripcionog faktora, ali i njegovu brzu inaktivaciju što su pokazali i naši eksperimenti, gde je nakon 30 minuta nivo Nrf2 u jedru smanjen i praćen porastom u citosolu. Aktivnost Nrf2 je sprečena negativnom povratnom spregom preko ARE sekvenci smeštenih u promotorskim regionima Cul3, Rbx1 i Keap1 gena koji su deo kompleksa za transport u citoplazmu i degradaciju proteina Nrf2 (Kaspar i Jaiswal, 2011; Lee i saradnici, 2007). Iako je nivo Keap1 proteina smanjen i u citosolu i u jedru u uslovima akutnog stresa, treba imati u vidu činjenicu da u ćeliji postoji i Keap1-nezavisna regulacija Nrf2.



U PFC-u hronično stresiranih životinja je za razliku od stanja koje je opisano u hipokampusu, došlo do aktiviranja antioksidativne zaštite. Naša ranija istraživanja su pokazala povećani kapacitet oksidativne fosforilacije i mitohondrijalne respiracije u PFC-u hronično stresiranih životinja (Adzic i saradnici, 2009a). Povećana aktivnost MnSOD-a u mitohondrijama, kao i katalaze u



**Slika 59.** Shematski prikaz praćenih parametara u prefrontalnom korteksu, koji su bili promenjeni pod uticajem hronične socijalne izolacije (ilustrovala Ana Đorđević)

citiosolu i peroksizomima može predstavljati protektivni odgovor na oksidativni stres. Poznato je da su CuZnSOD i MnSOD visoko eksprimirane u neuronima, međutim, ova dva enzima nisu koordinisano regulisana u odgovoru na različite vrste oksidanata ili citokina. Naime, indukcija CuZnSOD citokinima, oksidantima ili interleukinima je manja u poređenju sa indukcijom MnSOD (Isoherranen i saradnici, 1997). Ovo može biti jedan od razloga zašto u našim eksperimentima nije zapažena promena u nivou CuZnSOD. Visok nivo MnSOD ima neuroprotektivnu ulogu, smanjujući apoptozu i ishemična oštećenja mozga (Keller i saradnici, 1998). Povećana aktivnost katalaze je izmerena i u drugim studijama koje su ispitivale uticaj blagog hroničnog stresa (Lucca i saradnici, 2009) ili hroničnog stresiranja bukom (Manikandan i saradnici, 2006). Promene u nivou

GPx-a nisu izmerene, iako je u drugim studijama u uslovima blagog hroničnog stresa izmerena smanjena aktivnost ovog enzima u frontalnom korteksu uz povećanu lipidnu peroksidaciju (Eren i saradnici, 2007). Povećana lipidna peroksidacija je primećena i u mozgu pacova hronično stresiranih hladnoćom (Kaushik i Kaur, 2003), ali je kod njih aktivnost GPx-a bila povećana. Značajno povećanje aktivnosti katalaze uz nepromenjen GPx može značiti da je u ovoj moždanoj strukturi katalaza mnogo osetljivija od GPx-a na promene nivoa peroksida, ili da ovaj tip stresora dovodi do oksidativnih promena pre svega u neuronima a ne u gliji PFC-a, budući da je za uklanjanje viška  $H_2O_2$  u neuronima zadužena prvenstveno katalaza (Schad i saradnici, 2003), dok u glijalnim ćelijama tu funkciju vrši GPx. Nivo enzima koji obezbeđuje rezerve redukovano glutationa, GLR, je kao i u hipokampusu bio povećan ali bez promena u aktivnosti. Smanjene rezerve glutationa se dovode u vezu sa pojavom depresivnih poremećaja. Brojne studije na životinjama su pokazale smanjen nivo glutationa u mozgu u uslovima hroničnog stresa (Kaushik i Kaur, 2003). Interesantno je da, za razliku od hipokampusu, u PFC-u nisu registrovane nikakve promene na nivou sistema Nrf2/Keap1. Različita regulacija Nrf2 u uslovima hroničnog stresa može biti jedna od funkcionalnih razlika između ove dve moždane strukture kao i pokazatelj različite osetljivosti ovih struktura na oksidativni stres. Naša studija je pokazala da hronični stres u različitom stepenu utiče na redoks status i mehanizam antioksidativne zaštite u hipokampusu i PFC-u pacova.

Sposobnost PFC-a hronično stresiranih životinja da normalno odgovori na akutni stres, je testiran u našoj studiji uz pomoć modela kombinovanog stresa. Rezultati su pokazali da su nakon izlaganja kombinaciji stresora odgovori oba SOD enzima bili skoro isti kao oni zapaženi pod dejstvom akutne imobilizacije. Međutim, svi drugi praćeni parametri su bili drugačije izmenjeni pod dejstvom kombinovanog stresa. Dok u odgovoru PFC-a kontrolnih životinja na akutni stres nije bilo promena u peroksidaznim enzimima, kod hronično stresiranih životinja obe peroksidaze su bile izmenjene. Tako je GPx bila skoro dvostruko povećana, dok je aktivnost katalaze bila smanjena. Ovakav rezultat govori u prilog scenariju da kod hronično stresiranih životinja naknadni akutni stresor narušava integritet

neurona, a glijalne ćelije preuzimaju glavnu odbrambenu ulogu. Ovo zapažanje je u skladu sa rezultatima naših ranijih studija koje su pokazale proapoptotsku signalizaciju praćenu intenzivnijom fragmentacijom genomske DNK u ovim uslovima (Djordjevic i saradnici, 2010) i oštećenjima membrane mitohondrija (Adzic i saradnici, 2009b). Sistem Nrf2/Keap1 je pokazao isti obrazac promena kao kod akutno stresiranih životinja, ali su geni regulisani ovim sistemom ostali nepromenjeni. Svi naši rezultati su ukazivali na to da je u kombinovanom stresu u PFC-u izostao adaptivni antioksidativni odgovor.

U zaključku, rezultati dobijeni u PFC-u su pokazali da hronična socijalna izolacija menja odgovor antioksidativnih enzima na naknadni akutni stresor, i to pre svega na nivou peroksidaznih enzima.

#### **5.4. Hronična socijalna izolacija menja odgovor antioksidativne zaštite na naknadni akutni stresor u jetri Wistar mužjaka**

Kao što smo već rekli izlaganje životinja akutnoj imobilizaciji u trajanju od 30 minuta izazvalo je značajno povećanje koncentracije serumskog kortikosterona (Slika 27), i ovaj nalaz je bio u skladu sa zapažanjima drugih autora (Dronjak i saradnici, 2004; Sahin i Gumuşlu, 2004). Kortikosteron predstavlja jedan od glavnih regulatora glukoneogeneze (Friedman i saradnici, 1993), tako da je njegovo povećanje u uslovima akutnog stresa dovelo i do porasta koncentracije glukoze u krvi (Slika 28). Povećan nivo serumskog kortikosterona u uslovima akutne imobilizacije je bio dovoljan da aktivira GR, čije smo povećanje izmerili u jetri (Slika 53). Ovaj nalaz je u saglasnosti sa "dogmom" o aktivaciji GR-a steroidnim hormonima. Aktivnost glukokortikoidnih hormona zavisi od konformacije GR-a koju regulišu Hsp90 i Hsp70 proteini. Oni kontrolišu unutarćelijsko kretanje receptora, njegovu stabilizaciju i transkripcionu aktivnost (Kang i saradnici, 1999; Schneikert i saradnici, 2000). Nivo Hsp90 i Hsp70 proteina je u uslovima akutnog stresa takođe bio povišen (Slika 54). Dronjak i saradnici (2004) su izmerili i povišen nivo kateholamina u uslovimama akutnog stresa, što je i očekivano, s obzirom da se signalizacija izazvana stresom koja je poreklom od IL-1 citokina, javlja u ranijim vremenskim tačkama nego signalizacija izazvana

glukokortikoidima (Sapolsky i saradnici, 2000). Takođe je poznato i da je IL-1 jedan od najpoznatijih aktivatora signalnog puta transkripcionog faktora NFkB (Sternberg, 2006). Aktivacija NFkB nakon akutne imobilizacije, koju smo izmerili u jetri (Slika 53), može se povezati i sa povišenim nivoom kateholamina (noradrenalina i adrenalina), jer je indukcija NFkB delimično zavisna od noradrenalina preko  $\alpha$ 1- i  $\beta$ -adrenergičkih receptora (Bierhaus i saradnici, 2003).

U uslovima akutnog stresa i povišenog nivoa redoks senzitivnih transkripcionih faktora GR-a i NFkB-a, izmeren je i povišen nivo i aktivnost antioksidativnih enzima SOD-a, katalaze i GPx-a (Tabela 4). Indukovani odgovor GPx-a je najverovatnije posledica promene u produkciji lipidnih peroksida. Povećana aktivnost GPx-a uz nepromenjenu aktivnost GLR-a može da vodi pomeranju ravnoteže GSH/GSSG ka prooksidativnom stanju. Povišen nivo antioksidativnih enzima se javlja u uslovima povećane produkcije ROS-a, pa se naša zapažanja slažu sa rezultatima dobijenim i u drugim laboratorijama (Davydov i Shvets, 2001; Zaidi i saradnici, 2005; Liu i saradnici, 1994). Povećana produkcija ROS-a praćena indukcijom antioksidativnih enzima ukazuje da je detoksifikacija superoksida i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> najverovatnije efikasna u uslovima akutnog stresa, zbog čega smo odgovor na akutnu imobilizaciju uzeli kao paradigmu uobičajenog odgovora na stres u pogledu fizioloških i molekularnih parametara.

Nakon dugotrajne socijalne izolacije u trajanju od 21 dan, koncentracija kortikosterona je bila smanjena u odnosu na koncentraciju izmerenu kod kontrolne grupe. Ovo zapažanje je bilo u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da izolacija dovodi do hipoaktivnosti HPA sistema (Sanchez i saradnici, 1998; Malkesman i saradnici, 2006). Snižena koncentracija kortikosterona je dovela i do pada koncentracije glukoze u krvi. Kao posledica sniženog kortikosterona, liganda GR-a, aktivacija GR-a u jetri je izostala, dok je NFkB bio povišen. Iako aktivacija NFkB može biti rezultat izmenjene signalizacije citokina, verovatnije objašnjenje je da izostanak represije od strane GR-a povećava nivo ovog transkripcionog faktora (Sternberg, 2006, McKay i Cidlowsky, 1999). Takođe, povišen nivo i aktivnost CuZnSOD-a, uz nepromenjenu aktivnost peroksidaznih enzima, katalaze i GPx-a, može povećati produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji je poznati aktivator

NFkB puta (Kobayashi i saradnici, 2008; Schmidt i saradnici, 1995). Aktiviran NFkB povećava ekspresiju CuZnSOD-a, čija aktivnost dovodi do akumulacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji dalje aktivira NFkB. Akumulirani H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može biti odgovoran i za smanjen nivo GLR-a, jer je u literaturi poznato da povišena koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibira ekspresiju ovog enzima (Gutierrez-Correa i Stoppani, 1997; Seo i saradnici, 2006). Smanjena aktivnost GLR-a može takođe biti posledica niskog nivoa glukoze, koja je glavni pokretač energetskog metabolizma i samim tim i produkcije NADPH i redukovanog glutationa, glavnih supstrata GLR-a (Singh i saradnici, 2008; Andreyev i saradnici, 2005). Glutation reduktaza je jedan od glavnih enzima odgovornih za održavanje oksido-redukcione ravnoteže u ćelijama, i nedostatak ovog enzima je dokumentovan u različitim patološkim stanjima (Loos i saradnici, 1976). Izostanak odgovora MnSOD i peroksidaznih enzima može biti posledica smanjenog kortikosterona, s obzirom da je dokazano da prisustvo glukokortikoidnih hormona utiče na ekspresiju ovih proteina (Jose i saradnici, 1997). U uslovima hroničnog stresa u jetri se generiše prooksidativno stanje, kao posledica nesinhronizovane aktivacije antioksidativnih enzima, koji kasnije aktiviranjem redoks senzitivnog transkripcionog faktora NFkB ulazi u tzv. 'začarani krug'.

Akutna imobilizacija kod izolovanih životinja je takođe izazvala višestruko povećanje koncentracije serumskog kortikosterona kao i glukoze u krvi. Povećanje kortikosterona i glukoze je bilo još intenzivnije u poređenju sa odgovorom kontrolnih životinja. Dronjak i saradnici (2004) su izmerili intenzivniji odgovor i na nivou kateholamina u ovom modelu. Obrazac promena GR-a i NFkB-a u kombinovanom stresu je bio sličan kao u akutnom, ali je izostala reakcija šaperonskog proteina Hsp90. Budući da je optimalan stehiometrijski odnos između šaperona i GR-a neophodan za odgovarajuću aktivnost steroidnih hormona, promena u odnosu Hsp-a i GR-a može dovesti do inaktivacije GR-a, inhibirajući njegovu interakciju sa GRE (Kang i saradnici, 1999). Povišen nivo CuZnSOD i katalaze, kao i njihove enzimske aktivnosti su omogućile detoksifikacionu kaskadu povećane produkcije ROS-a. Međutim reakcija je izostala na nivou MnSOD i GPx enzima, koji su kod kontrolnih životinja bili indukovani akutnim stresorom.

Interesantno je da je reakcija GPx-a izostala uprkos povećanju aktivnosti GLR-a koja obezbeđuje supstrat za GPx. Intenzivan odgovor GLR-a na akutni stresor, koji je izostao kod kontrolnih životinja, može biti posledica povećane potrebe jetre da se izbori sa narušenom oksido-redukcionom ravnotežom koja je nastala u uslovima hroničnog stresa i koja je dodatno pojačana naknadnim akutnim stresorom. Uzimajući u obzir sve navedene rezultate, može se zaključiti da uprkos održanom odgovoru kortikosterona, glukoze i transkripcionih faktora, GR-a i NFkB-a, u uslovima kombinovanog stresa, obnavljanje oksido-redukcijske ravnoteže je samo delimično, usled nepovratnih promena u aktivnosti nekih antioksidativnih enzima, uspostavljenih u uslovima hroničnog stresa.

Ovi rezultati pružaju jedno od objašnjenja na koji način hronični neuroendokrini tj. psihosocijalni stres može da dovede do oštećenja nekih organa poput jetre (Bierhaus i saradnici, 2003). Promene u antioksidativnoj odbrani i transkripcionim faktorima koje izaziva hronični stres mogu ugroziti funkciju jetre ili pogoršati njeno stanje u već postojećim bolestima. Takođe, ove promene treba imati u vidu kod lečenja stresom izazvanih poremećaja, jer se većina lekova koji se koriste u lečenju ovih poremećaja aktivira u jetri (Mandrioli i saradnici, 2006). Tako su naša nedavna istraživanja pokazala da fluoksetin, lek koji se koristi u terapiji depresivnih poremećaja, kod pacova dovodi do inicijacije apoptotske signalizacije u jetri, koja je verovatno posledica izmenjene redoks ravnoteže (Djordjevic i saradnici, 2011).

## **6. Zaključci**

Na osnovu analize dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ◆ Hronična socijalna izolacija menja ponašanje životinja, izazivajući neke od osnovnih karakteristika anksioznog i depresivnog ponašanja.
- ◆ Hronična socijalna izolacija kod mužjaka pacova Wistar soja dovodi do snižavanja nivoa serumskog kortikosterona i koncentracije glukoze u krvi, dok akutni stres imobilizacijom izaziva višestruko povećanje ovih parametara.
- ◆ U uslovima hroničnog stresa u jetri se generiše prooksidativno stanje, kao posledica nesinhronizovane aktivacije antioksidativnih enzima, koji kasnije aktiviranjem redoks senzitivnog transkripcionog faktora NFkB ulazi u tzv. 'začarani krug'.
- ◆ Takođe, hronična socijalna izolacija modifikuje odgovor antioksidativne odbrane u jetri na naknadni akutni stresor.
- ◆ Pad u aktivnosti GPx-a i smanjena jedarna aktivnost Nrf2 u hipokampusu u uslovima hroničnog stresa ukazuju na smanjen antioksidativni kapacitet ove moždane strukture, što je čini osetljivom na naknadna oksidativna oštećenja.
- ◆ Za razliku od hipokampusa, u PFC-u hronično izolovanih životinja aktivirana antioksidativna zaštita (povećana aktivnost MnSOD i katalaze) ukazuje na povećane energetske zahteve i povećanu produkciju ROS-a u ovoj strukturi.



- ◆ Povećana ekspresija gena glutationskog sistema (Gclm i Gsta 3) u PFC-u akutno stresiranih životinja je posledica prolaznog povećanja nivoa Nrf2 u jedrima.
- ◆ Odgovor na naknadni akutni stresor je izmenjen u odnosu na zdrave životinje u obe moždane strukture, pre svega na nivou peroksidaznih enzima.
- ◆ Različit antioksidativni odgovor u hipokampusu i PFC-u u odgovoru na hronični stres može biti jedna od funkcionalnih razlika između ove dve moždane strukture. Ona takođe može ukazati i na razliku u njihovoj osetljivosti na oksidativni stres. Ovakvi uslovi mogu ugroziti mogućnost interakcije i uspešnog adaptivnog odgovora hipokampusa i PFC-a na stres, što se ogleda i u izmenjenom ponašanju životinja, kao i u stvaranju potencijalnih uslova za razvoj psihijatrijskih oboljenja izazvanih stresom.

## **7. Literatura**

- Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18(45):6104-6111.
- Adzic M, Djordjevic A, Demonacos C, Krstic-Demonacos M, Radojic MB. (2009a) The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *Int J Biochem Cell Biol* 41(11):2181-2188.
- Adzic M, Djordjevic J, Djordjevic A, Niciforovic A, Demonacos C, Radojic M, Krstic-Demonacos M. (2009b) Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol* 202(1):87-97.
- Allen RG, Tresini M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28(3):463-499.
- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. (2003) Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res* 28:293–305.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70:200–214.
- Antras-Ferry J, Maheo K, Morel F, Guillouzo A, Cillard P, Cillard J. (1997) Dexamethasone differently modulates TNF- $\alpha$ - and IL-1 $\beta$ -induced transcription of the hepatic Mn-superoxide dismutase gene. *FEBS Lett* 403:100–104.
- Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. (2008) Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci* 108:227–238.
- Arnsten AF. (2009) Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci* 10(6):410-422.

- Aschbacher K, O'Donovan A, Wolkowitz OM, Dhabhar FS, Su Y, Epel E. (2013) Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology* doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.02.004.
- Avakian VM, Callingham BA. (1968) An effect of adrenalectomy upon catecholamine metabolism. *Br J Pharmac Chemother* 33: 211P.
- Bachis A, Cruz MI, Nosheny RL, Mocchetti I. (2008) Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci Lett* 442(2):104-108.
- Baird L, Dinkova-Kostova AT. (2011) The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxic* 85:241-272.
- Baldi E, Bucherelli C. (2005) The inverted "U-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity Biol Toxicol Med* 3:9-21.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3(3):205-214.
- Beato M, Klug MJ. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod* 6:225-236.
- Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. (1997) Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology* 138(1):101-106.
- Bergenheim V. (2007) Effects of nicotine sensitization on GABAA subunit expression in the rat brain. *App* 46.
- Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pêgo JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N. (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Front Behav Neurosci* doi: 10.3389/neuro.08.001.
- Bielajew C, Konkle AT, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Hutchins AA, Santa-Maria Barbagallo L, Fouriez G. (2003) Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress* 6:269-280.
- Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, Von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP. (2003) A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1920-1925.
- Bilici M, Efe H, Köroğlu MA, Uydu HA, Bekaroğlu M, Değer O. (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64(1):43-51.
- Bloom DA, Jaiswal AK. (2003) Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I $\kappa$ Nrf2, but is not required

- for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* 278:44675–44682.
- Bodwell JE, Webster JC, Jewell CM, Cidlowski JA, Hu JM, Munck A. (1998) Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:91-99.
- Brain PF. (1975) What does individual housing mean to a mouse? Minireview. *Life Sciences* 16:187-200.
- Bremner JD. (1999) Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry* 45:797-805.
- Brenes JC, Fornaguera J. (2009) The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res* 198:199-205.
- Brigelius-Flohé R, Flohé L. (2011) Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal* 15(8):2335-2381.
- Brooksbank BW, Balazs R. (1984) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Brain Res* 318(1):37-44.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzman FW, Mattson MP. (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2(7):788-794.
- Bryan RM Jr. (1990) Cerebral blood flow and energy metabolism during stress. *Am J Physiol* 259(2 Pt 2):H269-280.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125(3):443-451.
- Caamano CA, Morano MI, Akil H. (2001) Corticosteroid receptors: A dynamic interplay between protein folding and homeostatic control. *Psychopharmacol Bull* 35:26-23.
- Calabrese V, Bates TE, Stella AM. (2000) NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* 25(9-10):1315-1341.
- Cannio R, Fiorentino G, Morana A, Rossi M, Bartolucci S. (2000) Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra- and extracellular oxidative stress. *Front Biosci* 5:D768-779.
- Cechetto DF, Saper CB. (1990) Role of the cerebral cortex in autonomic function. In: Loewy AD, Spyer KM, editors. Central regulation of autonomic function. *New York: Oxford University Press*. 208-223.

- Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N. (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27(11):2781-2787.
- Chance B, Sies H, Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59(3):527-605.
- Chida Y, Sudo N, Kubo C. (2006) Does stress exacerbate liver diseases? *J Gastroenterol Hepatol* 21:202-208.
- Chrousos GP, Gold PW. (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267:1244-1252.
- Claiborne A. (1985) Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. 283-284.
- Clarke DD, Sokoloff L. (1999) Circulation and energy metabolism of the brain. In Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects (Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K. & Uhler, M.D., eds), pp. 637-669. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Crapo JD, Tierney DF. (1974) Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 226(6):1401-1407.
- Cryan JF, Mombereau C. (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9:326-357.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. (2005) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29:547-569.
- Cvijic G, Djordjevic J. (2003) Hypothalamo-pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary systems in stress responses. *Jugoslav Med Biochem* 22:3-10.
- D'Angio CT, Finkelstein JN. (2000). Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab* 71(1-2):371-380.
- D'Aquila PS, Brain P, Willner P. (1994) Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav* 56:861-867.
- Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. (1995) Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am J Physiol* 269(5 Pt 1):L588-602.
- Davydov VV, Shvets VN. (2001) Lipid peroxidation in the heart of adult and old rats during immobilization stress. *Exp Gerontol* 36:1155-1160.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. (2003) The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- $\kappa$ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression. *Endocrine Rev* 24:488-522.

- De Kloet ER, Joels M, Holsboer F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6(6):463-475.
- De Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B, Hoozemans J, van Horssen J. (2008) Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med* 45(10):1375-1383.
- Dean O, Bush AI, Berk M, Copolov D L, Van den Buuse M. (2009) Glutathione depletion in the brain disrupts short-term spatial memory in the Y-maze in rats and mice. *Behav Brain Res* 198(1):258-262.
- DeHaan JB, Iannello RC, Crack PJ, Hertzog P, Kola I. (2003) Oxidative and free radical mechanisms in brain ageing. The ageing brain: the neurobiology and neuropsychiatry of ageing. 11:187-203.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ. (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13(9):3839-3847.
- Dittmar KD, Pratt WB. (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery: The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem* 272:13047-13054.
- Djordjevic A, Adzic M, Djordjevic J, Radojic MB. (2009) Chronic social isolation is related to both upregulation of plasticity genes and initiation of proapoptotic signaling in Wistar rat hippocampus. *J Neural Transm* 116:1579-1589.
- Djordjevic A, Adzic M, Djordjevic J, Radojic MB. (2010) Chronic Social Isolation Suppresses Proplastic Response and Promotes Proapoptotic Signalling in Prefrontal Cortex of Wistar Rats. *J Neurosci Res* 88(11):2524-2533.
- Djordjević J, Cvijić G, Davidović V. (2003) Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Phys Res* 52(1):67-72.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Elaković I, Matić G, Radojic MB. (2011) Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver. *Eur J Pharmacol* 659:61-66.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojic MB. (2010) Chronic Social Isolation Compromises the Activity of Both Glutathione Peroxidase and Catalase in Hippocampus of Male Wistar Rats. *Cell Mol Neurobiol* 30(5):693-700.
- Drevets WC. (2000) Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog Brain Res* 126:413-431.

- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912–4916.
- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19:562–569.
- Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47-95.
- Dronjak S, Gavrilović Lj, Filipović D, Radojčić M. (2004) 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.
- Dunn JD, Orr SE. (1984) Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp Brain Res* 54(1):1-6.
- Einon DF, Morgan MJ. (1977) A critical period for social isolation in the rat. *Dev Psychobiol* 10:123-132.
- Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR, Park BK. (2003) Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J Biol Chem* 278:22243–22249.
- Endo Y, Shiraki K. (2000) Behavior and body temperature in rats following chronic foot shock or psychological stress exposure. *Physiol Behav* 71(3-4):263-268.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25(3-4):132-149.
- Eren I, Naziroglu M, Demirdas A, Celik O, Uguz AC, Altunbasak A, Ozmen I, Uz E. (2007) Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. *Neurochem Res* 32(3):497-505.
- Escartin C, Won SJ, Malgorn C, Auregan G, Berman AE, Chen PC, Deglon N, Johnson JA, Suh SW, Swanson RA. (2011) Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. *J Neurosci* 31:7392–7401.
- Evans PH. (1993) Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49(3):577-587.
- Evans RM. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854):889-895.



- Feldman S, Conforti N. (1985) Modifications of adrenocortical responses following frontal cortex simulation in rats with hypothalamic deafferentations and medial forebrain bundle lesions. *Neuroscience* 15:1045-1047.
- Fernandes C, File SE. (1996) The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54:31-40.
- Fernández G, Mena M-P, Arnau A, Sánchez O, Soley M, Ramírez I. (2000) Immobilization stress induced c-Fos accumulation in liver. *Cell Stress Chaperones* 5:306-312.
- Finkel T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476:52-54.
- Fridovich I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44:147-159.
- Fridovich I. (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203-1209.
- Friedman JE, Yun JS, Patel YM, McGrane MM, Hanson RW. (1993) Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *J Biol Chem* 268:12952-12957.
- Fukudo S, Suzuki J, Tanaka Y, Iwahashi S, Nomura T. (1989) Impact of stress on alcoholic liver injury: a histopathological study. *J Psychosom Res* 33: 515-521.
- Furay AR, Murphy EK, Mattson MP, Guo Z, Herman JP. (2006) Region-specific regulation of glucocorticoid receptor/HSP90 expression and interaction in brain. *J Neurochem* 98:1176-1184.
- Gałecki P, Florkowski A, Mrowicka M, Pietras T, Gałecka E. (2008) Calcium ions, glutamate acid, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, calcium dependent ATP-ase as causes of oxidative damage in depression patients. *Pol Merkur Lekarski* 24(139):72-75.
- Garcia A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto, Aramario A. (2000) Recovery of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72:114-125.
- García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC. (2005) The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 decreases oxidative/nitrosative mediators in brain after acute stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 180(3):513-522.
- Gasc JM, Renoir JM, Faber LE, Delahaye F, Baulieu EE. (1990) Nuclear localization of two steroid receptor-associated proteins, hsp90 and p59. *Exp Cell Res* 186:362-367.
- Gething MJ, Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-44.
- Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. (1974) Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 30:665-667.
- Goldstein DS. (2003) Catecholamines and stress. *Endocr Regul* 37(2):69-80.

- Gong Y, Chai Y, Ding JH, Sun XL, Hu G. (2011) Chronic mild stress damages mitochondrial ultrastructure and function in mouse brain. *Neurosci Lett* 488(1):76-80.
- Greenlund J, Deckwerth L, Johnson M Jr. (1995) Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14:303-315.
- Grillo CA, Piroli GG, Rosell DR, Hoskin EK, McEwen BS, Reagan LP. (2003) Region specific increases in oxidative stress and superoxide dismutase in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Neuroscience* 121(1):133-40.
- Gutierrez-Correa J, Stoppani AO. (1997) Inactivation of yeast glutathione reductase by Fenton systems: effect of metal chelators, catecholamines and thiol compounds. *Free Radic Res* 27:543-555.
- Haber F, Weiss J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London Ser A* 147:332-351.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8(2):89-193.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18(1):125-126.
- Halliwell B. (1997) Antioxidants and human diseases: a general introduction. *Nutr rev* 55:S44-S52;
- Halliwell B. (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295(5561):1852-1858.
- Harvey BH. (2008) Is major depressive disorder a metabolic encephalopathy? *Hum Psychopharmacol* 23(5):371-384.
- Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. (2009) Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 46(4):443-453.
- Heim C, Nemeroff CB (1999) The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry* 46:1509-1522.
- Herbert J. (1996) Proopiomelanocortin peptides and reproduction: An integrated endocrine and behavioural system. U: Clinical perspectives in endogenous opioid peptides John Wiley & Sones Ltd. Chichester, England. 185-218.

- Hirose S, Hirayama C, Ikemi Y. (1961) The influence of emotional stress on the liver blood flow. *Kyushu J Med Sci* 12:319-323.
- Hoang YD, Nakamura BN, Luderer U. (2009) Follicle-Stimulating Hormone and Estradiol Interact to Stimulate Glutathione Synthesis in Rat Ovarian Follicles and Granulosa Cells. *Biol Reprod* 81(4):636-646.
- Hogg S. (1996) A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54:21-30.
- Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM. (1990) Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 52(1):57-64.
- House JS. (2001) Social isolation kills, but how and why? *Psychosom Med* 63(2):273-274.
- Hovatta I, Juhila J, Donner J. (2010) Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res* 68:261-275.
- Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, Ellison JA, Schadt EE, Verma IM, Lockhart DJ, Barlow C. (2005) Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438(7068):662-666.
- Hu R, Hebbar V, Kim BR, Chen C, Winnik B, Buckley B, Soteropoulos P, Tolia P, Hart RP, Kong AN. (2004) In Vivo Pharmacokinetics and Regulation of Gene Expression Profiles by Isothiocyanate Sulforaphane in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 310(1):263-271.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277:42769-42774.
- Hutchison KA, Scherrer LC, Czar MJ, Stancato LF, Chow YH, Jove R, Pratt WB. (1993) Regulation of glucocorticoid receptor function through assembly of a receptor-heat shock protein complex. *Ann NY Acad Sci* 684:35-48.
- Isoherranen K, Peltola V, Laurikainen L, Punnonen J, Laihia J, Ahotupa M, Punnonen K. (1997) Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines. *J Photochem Photobiol B*. 40(3):288-293.
- Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ. (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 10:3247-3254.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer

- mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Bioch Biophys Res Commun* 236:313–322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. (2003) Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 8(4):379-391.
- Jacobson L, Sapolsky R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12(2):118-34.
- Jain AK, Bloom DA, Jaiswal A. (2005) Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* 280:29158–29168.
- Janaky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS. (2000) Mechanisms of Lcysteine neurotoxicity. *Neurochem Res* 25:1397–1405.
- Joels M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. (2007) Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 28:72-96.
- Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC. (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147:61-69.
- Jones DP, Eklöv L, Thor H & Orrenius S. (1981) Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Arch Biochem Biophys* 210:505-516.
- Jose HJ, Berenice SG, Cecilia VR. (1997) Induction of antioxidant enzymes by dexamethasone in the adult rat lung. *Life Sci* 60:2059–2067.
- Joshi G, Johnson JA. (2012) The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7(3):218-229.
- Kang KI, Meng X, Devin-Leclerc J, Bouhouche I, Chadli A, Cadepond F, Baulieu EE, Catelli MG (1999) The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1 439-1 444.
- Kaspar JW, Jaiswal AK. (2011) An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3- Rbx1 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 285:21349–21358.
- Kaushik S, Kaur J. (2003) Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta* 333:69-77.
- Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St. Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. (1998) Mitochondrial manganese superoxide

- dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 18:687–697.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 47: 89-116.
- Kessler RC, Frank RG. (1997) The impact of psychiatric disorders on work loss days. *Psychol Med* 27(4):861-873.
- Kim HT, Kim YH, Nam JW, Lee HJ, Rho HM, Jung G. (1994) Study of 5V-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 201:1526–1533.
- Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. (1995) Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 73:3-19.
- Kinscherf R, Deigner HP, Usinger C, Pill J, Wagner M, Kamencic H, Hou D, Chen M, Schmiedt W, Schrader M, Kovacs G, Kato K, Metz J. (1997) Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *FASEB J* 11(14):1317-1328.
- Kobayashi A, Moon-Il Kang, Yoriko Watai, Kit I. Tong, Takahiro Shibata, Koji Uchida, Masayuki Yamamoto. (2006) Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26(1):221-229.
- Kobayashi Y, Nishikawa M, Hyoudou K, Yamashita F, Hashida M. (2008) Hydrogen peroxide-mediated nuclear factor  $\kappa$ B activation in both liver and tumor cells during initial stages of hepatic metastasis. *Cancer Sci* 99(8):1546–1552.
- Komorowska J, Pisula W. (2003) Does changing levels of stress affect the characteristics of grooming behaviour in rats? *Int J Comp Psychol* 16:237–246.
- Kompagne H, Bárdos G, Szénási G, Gacsályi I, Hársing LG, Lévy G. (2008) Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav Brain Res* 193(2):311-314.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A. (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:69-72.
- Krstic M. (1995) Functional Analysis of Glucocorticoid Receptor Phosphorylation. PhD Thesis, University of California, San Francisco, CA.
- Kusnecov AW, Rabin BS. (1994) Stressor-induced alterations of immune function: mechanisms and issues. *Int Arch Allergy Immunol* 105(2):107-121.

- Kvetnansky R, Mikulaj M. (1970) Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87:738-743.
- Kvetnansky R, Pacak K, Fukuhara K, Viskupic E, Hiremagalur B, Nankova B, Goldstein DS, Sabban EL, Kopin IJ. (1995) Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann N Y Acad Sci* 771:131-158.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9782-9787.
- Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA. (2005) Nrf2 a multi-organ protector? *FASEB J* 19(9):1061-1066.
- Lee OH, Jain AK, Papusha V, Jaiswal AK. (2007) An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 282:36412-36420.
- Li W, Kong AN. (2009) Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 48:91-104.
- Li W, Yu SW, Kong ANT. (2006) Nrf2 Possesses a Redox-sensitive Nuclear Exporting Signal in the Neh5 Transactivation Domain. *J Biol Chem* 281:27251-27263.
- Lindenau J, Noack H, Asayama K, Wolf G. (1998) Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24(2):252-256.
- Liu J, Mori A. (1999) Stress, Aging, and Brain Oxidative Damage. *Neurochem Res* 24(11):1479-1497.
- Liu J, Wang X, Mori A. (1994) Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: Effect of treatment with reduced glutathione. *Int J Biochem* 26:511-517.
- Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. (1996) Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J* 10:1532-1538.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T))method. *Methods* 25:402-408.
- Loos H, Roos D, Weening R, Houwerzijl J. (1976) Familial deficiency of glutathione reductase in human blood cells. *Blood* 48:53-62.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-267.
- Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J. (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 54(5-6):358-362.
- Lupien SJ, De Leon M, De Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NPV, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neurosci* 1:69-73.
- Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Leunis JC, Geffard M. (2011) IgM-mediated autoimmune responses directed against multiple neoepitopes in depression: new pathways that underpin the inflammatory and neuroprogressive pathophysiology. *J Affect Disord* 135(1-3):414-418.
- Malkesman O, Maayan R, Weizman A, Weller A. (2006) Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behav Brain Res* 175:408-414.
- Mandrioli R, Forti GC, Raqqi MA. (2006) Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: the role of cytochrome p450. *Curr Drug Metab* 7:127-133.
- Manikandan S, Padma MK, Srikumar R, Jeya Parthasarathy N, Muthuvel A, Sheela Devi R. (2006) Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 399(1-2):17-22.
- Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Yan Su A, Owen MR, Chrousos GP. (2007) Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 18:190-198.
- Maral J, Puget K, Michelson AM. (1977) Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1525-1535.
- Marklund SL. (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 74:1398-1403.
- Martindale JL, Holbrook NJ. (2002) Cellular response to oxidative stress: Signalling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192:1-15.
- Matsuzawa A, Ichijo H. (2005) Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7(3-4):472-481.
- Mattson MP, Liu D. (2002) Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2(2):215-231.

- Matuszewich L, Karney JJ, Carter SR, Janasik SP, O'Brien JL, Friedman RD. (2007) The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. *Physiol Behav* 90(4):674-681.
- Mazure CM. (1995) in *Progress in Psychiatry* (ed. Spiegel, D.) 270 (American Psychiatric, Washington DC).
- McCord JM, Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 224:6049-6055.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* 66(4):1121-1188.
- McEwen BS. (1998a) Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *N Engl J Med* 338:171-179.
- McEwen BS. (1998b) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann NY Acad Sci* 840: 33-44.
- McEwen BS. (1999) Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:105-122.
- McEwen BS. (2000) Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 48(8):721-731.
- McEwen BS. (2001) Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 933:265-277.
- McEwen BS. (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583(2-3): 174-185.
- McIntosh LJ, Hong KE, Sapolsky RM. (1998) Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res* 791: 209-214.
- McKay LI, Cidlowski JA. (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signalling pathways. *Endocrine Rev* 20:435-459.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2006. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a tethering mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24756-24768.
- Melia KR, Duman RS. (1991) Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(19):8382-8386.
- Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Mizioro H, Epstein CJ, Wallace DC. (1999) Mitochondrial



- disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:846–851.
- Merino JJ, Cordero MI, Sandi C. (2000) Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *Eur J Neurosci* 12:3283-3290.
- Motohashi H, Yamamoto M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *TRENDS Mol Med* 10(11):549-557.
- Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D., Yamamoto, M., 2002. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294, 1–12.
- Mullineaux PM, Creissen GP. (1996) Opportunities for the genetic manipulation of antioxidants in plant foods. *Biochem Soc Trans* 24(3):829-35.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5(1):25-44.
- Munck A. (1971) Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance. *Perspect Biol Med* 14(2):265-269.
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. (2008) Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:851-876.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. (2009) The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J Biol Chem* 284(20):13291-13295.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB. (2005) Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* 280(37):32485-32492.
- Nordberg J, Arner ES. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31(11):1287-312.
- Numazawa S, Ishikawa M, Yoshida A, Tanaka S, Yoshida T. (2003) Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C334– C342.
- Oberley LW, St Clair DK, Autor AP, Oberley TD. (1987) Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys* 254(1):69-80.
- O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F. (2000) The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM* 93:323-333.

- Ottenweller JE, Natelson BH, Pitman DL, Drastal SD. (1989) Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors: toward an animal model of chronic stress and stress-related mental illness. *Biol Psychiatry* 26:824-841.
- Pacak K, Palkovits M. (2001) Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Rev* 22:502-548.
- Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I. (1999) Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology* 147:162-167.
- Pal SN, Dandiya PC. (1994) Glutathione as a cerebral substrate in depressive behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 48:845-851.
- Parvez H, Parvez S. (1972) Control of catecholamine release and degradation by the glucocorticoids. *Experientia* 28(11):1330-1332.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167.
- Petrovic VM, Janic-Sibalic V. (1978) Effect of corticotropin and dexamethasone on monoamine oxidase activity in the rat brain. *Bull Acad Serbe Sci* 17:1-7.
- Pohl J, Olmstead MC, Wynne-Edwards KE, Harkness K, Menard JL. (2007) Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behav Neurosci* 121(3):462-474.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. (1978) Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379-391.
- Porsolt RD, McArthur RA, Lenegre A. (1993) Psychotropic screening procedures. In: *Methods in Behavioral Pharmacology, Ed F. van Haaren. Elsevier: Amsterdam.* pp.23-52.
- Porsolt RD, Pichon ML, Jalfre M. (1977) Depression: a new model sensitive to the antidepressant treatment. *Nature* 266:730-742.
- Power JHT, Blumbergs PC. (2009) Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 117:63-73.
- Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB. (2004) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16(8):857-872.

- Qin S, Colin C, Hinners I, Gervais A, Cheret C, Mallat M. (2006) System Xc- and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40. *J Neurosci* 26:3345–3356.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 266:22028-22034.
- Rajapandi T, Greene LE, Eisenberg E. (2000) The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 275:22597-22604.
- Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Jordan-Sciutto KL. (2007) Expression of Nrf2 in Neurodegenerative Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:75-85.
- Raza H. (2011) Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J* 278:4243–4251.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13(1):43-47.
- Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. (2003) Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm Behav* 44(4):327-337.
- Richmond R, Halliwell B, Chauhan J, Darbre A. (1981) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal Biochem* 118(2):328-335.
- Rojo AI, Salinas M, Martin D, Perona R, Cuadrado A. (2004) Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci* 24:7324–7334.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362(6415):59-62.
- Rutledge RG, Cote C. (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31:e93.

- Rygula R, Abumaria N, Flügge G, Fuchs E, Rüter E, Havemann-Reinecke U. (2005) Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162(1):127-134.
- Sahin E, Gumuşlu S. (2004) Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res* 155:241-248.
- Sanchez ER, Hirst M, Scherrer LC, Tang HY, Welsh MJ, Harmon JM, Simons SS, Ringold GM, Pratt WB. (1990) Hormone-free mouse GR overexpressed in CHO cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *J Biol Chem* 265:20123-20130.
- Sanchez MM, Aguado F, Sánchez-Toscano F, Saphier D. (1998) Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. *Endocrinology* 139:579-587.
- Santos IM, Tome Ada R, Saldanha GB, Ferreira PM, Militao GC, Freitas RM. (2009) Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid *Oxid Med Cell Longev* 2(4):214-221.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.
- Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55-89.
- Sapolsky RM. (2003) Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res* 28(11):1735-1742.
- Sarrieau A, Dussailant M, Sapolsky RM, Aitken DH, Olivier A, Lal S, Rostene WH, Quirion R, Meaney MJ. (1988) Glucocorticoid binding sites in human temporal cortex. *Brain Res* 442:159-163.
- Scandalios JG. (2002) The rise of ROS. *Genome Biol* 3(7):REVIEWS1019.
- Schad A, Fahimi HD, Völkl A, Baumgart E. (2003) Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: detection by nonradioactive in situ hybridization with signal amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC)/immunofluorescence (IF). *J Histochem Cytochem* 51(6):751-760.

- Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA (1995) The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* 2:13-22.
- Schneikert J, Hubner S, Langer G, Petri T, Jaattela M, Reed J, Cato AC. (2000) Hsp70-RAP46 interaction in downregulation of DNA binding by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 19: 6 508-6 516.
- Sen R, Baltimore D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46:705-716.
- Seo JS, Lee KW, Rhee JS, Hwang DS, Lee YM, Park HG, Ahn IY, Lee JS. (2006) Environmental stressors (salinity, heavy metals, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat Toxicol* 80:281-289.
- Shang L, Liu J, Zhu Q, Zhao L, Feng Y, Wang X, Cao W, Xin H. (2006) Gypenosides protect primary cultures of rat cortical cells against oxidative neurotoxicity. *Brain Res* 1102(1):163-174.
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. (2003) Coordinate Regulation of Glutathione Biosynthesis and Release by Nrf2-Expressing Glia Potently Protects Neurons from Oxidative Stress. *J Neurosci* 23:3394-3406.
- Shimazoe T, Shibata S, Ueki S. (1987) A new forced swimming test for the evaluation of antidepressants in rats by recording vibration of a water tank. *J Pharmacobio-Dyn* 11:639-643.
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. (1996) Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 226(2):561-565.
- Singh R, Lemire J, Mailloux RJ, Appanna VD. (2008) A novel strategy involved in anti-oxidative defense: the conversion of NADH into NADPH by a metabolic network. *PLoS One* 3(7):e2682.
- Smythies J, Galzigna L. (1998) The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim Biophys Acta* 1380(2):159-162.
- Spasojevic N, Gavrilovic L, Dronjak S (2008) Different behavioral effects of maprotiline and fluxilan in rats. *Arch Biol Scim Belgrade* 60:33-39.

- Spasojevic N, Gavrilovic L, Varagic VV, Dronjak S (2007) Effects of chronic diazepam treatments on behaviour on individually housed rats. *Arch Biol Scim Belgrade* 59:113-117.
- Spina MB, Cohen G. (1989) Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4):1398-400.
- Srinivasan G, Patel NT, Thompson EB. (1994) Heat shock protein is tightly associated with the recombinant human glucocorticoid receptor: Glucocorticoid response element complex. *Mol Endocrinol* 8:189-196.
- Stadtman ER, Berlett BS. (1991) Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* 266(26):17201-17211.
- Sternberg EM. (2006) Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6(4):318-328.
- Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA. (2007) Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117:910-918.
- Sun KH, Chang KH, Clawson S, Ghosh S, Mirzaei H, Regnier F, Shah K. (2011) Glutathione-S-transferase P1 is a critical regulator of Cdk5 kinase activity. *Journal of Neurochemistry* 118, 902–914.
- Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD. (2007) Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* 27(18):6334-6349.
- Touyarot K, Venero C, Sandi C. (2004) Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 29(2):290-305.
- Valko M, Leibfritz D, Mancel J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.
- Vargas MR, Johnson JA. (2009) The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev Mol Med* 11:e17.
- Virgin CE Jr, Ha TP, Packan DR, Tombaugh GC, Yang SH, Horner HC, Sapolsky RM. (1991) Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J Neurochem* 57(4):1422-1428.
- Voikar V (2006) Evaluation of Methods and Applications for Behavioural Profiling of Transgenic Mice. Academic Dissertation, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

- Voikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H. (2005) Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav* 4:240-252.
- Walf AA, Frye CA. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2(2):322-328.
- Walter M, Hildebrandt M, Rüter J. (2002) Evidence of psychosocial influences on acute rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 34: 3298–3301.
- Wehling M. (1994) Novel aldosterone receptors: specificity conferring mechanism at the level of the cell membrane. *Steroids* 50:160-163.
- Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Perry B, Chan PH, Inouye M, Mirochnitchenko O. (1998) Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Brain Res Mol Brain Res* 53(1-2):333-338.
- Weiss M, Cierpial MA, West CH. (1998) Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 61:49-66.
- Westfall TC, Osada H. (1969) Influence of adrenalectomy on the synthesis of norepinephrine in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 167:300-308.
- Whishaw IQ, Kolb B. (2005) *The Behavior of the Laboratory Rat (A handbook with tests)* Oxford University Press.
- Willner P, Towell A, Sampson D. (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 93:358-364.
- Wong GH, Goeddel DV. (1988) Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242(4880):941-944.
- Wongwitdecha N, Marsden CA. (1996) Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav Brain Res* 75:27-32.
- Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Jethwa PH, Kennedy AR, Murphy KG, Stanley SA, Zollner AN, Ghatei MA, Bloom SR. (2002) Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology* 143:4227-4234.
- Xu Y, Kiningham KK, Devalaraja MN, Yeh CC, Majima H, Kasarskis EJ, St Clair DK. (1999) An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol* 18:709–722.

- Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, Yamamoto M. (2008) Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol* 28:2758–2770.
- Yan W, Wang HD, Hu ZG, Wang QF, Yin HX. (2008) Activation of Nrf2-ARE pathway in brain after traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 431:150-154.
- Zafir A, Banu N. (2009) Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J Biochem Biophys* 46(1):53-58.
- Zaidi SM, Al Qirim TM, Banu N. (2005) Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. *Drugs R D* 6:157–165.
- Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. (2013) Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog Neurobiol* 100:30-47.
- Zhang M, Wang A, He W, He P, Xu B, Xia T, Chen X, Yang K. (2007) Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology* 236(3):208-216.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. (2001) NF $\kappa$ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biol Med* 31:1405–1416.



## Biografija autora

Jelena Đorđević je rođena 14. aprila 1978. godine u Surdulici. Osnovno obrazovanje stekla je u Vladičinom Hanu, gde je završila i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Školske 1997/98. godine upisala je studije na Odseku za molekularnu biologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2006. godine, i dobitnik je nagrade Fondacije "Goran Ljubijankić" za najbolji diplomski rad iz oblasti molekularne biologije odbranjen u 2006. godini.

Doktorske studije upisala je školske 2006/07. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija. Od 1. avgusta 2006. godine je zaposlena kao istraživač-pripravnik u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" na projektu „Odgovor sisarskih ćelija na endokrini i radiobiološki stres“, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u periodu 2006-2010. godine, pod rukovodstvom dr Marije Radojčić, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Univerziteta u Beogradu.

Od 2011. godine je zaposlena u istoj laboratoriji kao istraživač-saradnik na projektu pod nazivom „Definisanje klastera molekulskih biomarkera za poboljšanu dijagnostiku i terapiju poremećaja raspoloženja“ kojim rukovodi dr Miroslav Adžić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Univerziteta u Beogradu.

Dobitnik je IBRO/FENS stipendije za učešće na Sedmom FENS Forumu u Amsterdamu, Holandija, 2010. godine a takođe je i član Društva za neuronauke Srbije, Biohemijskog društva Srbije i FEBS-a.

U dosadašnjoj naučnoj karijeri, Jelena Đorđević je kao autor ili koautor objavila 23 rada u vodećim međunarodnim, međunarodnim i nacionalnim časopisima, od kojih 5 radova kao prvi autor, kao i brojna međunarodna i domaća kongresna saopštenja štampana u celini i izvodu.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписана \_\_\_\_\_ **ЈЕЛЕНА ЂОРЂЕВИЋ** \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ **Ю 060032** \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Утицај хроничне социјалне изолације на механизам антиоксидативне заштите у мозгу и јетри мужјака пацова Wistar соја

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 24.09.2013 \_\_\_\_\_



## Прилог 2.

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

Име и презиме аутора ЈЕЛЕНА ЂОРЂЕВИЋ

Број индекса Ю 060032

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Утицај хроничне социјалне изолације на механизам антиоксидативне заштите у мозгу и јетри мужјака пацова Wistar соја

Ментор др Марија Радојчић и

др Гордана Матић

Потписана Јелена Ђорђевић

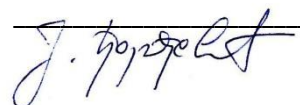
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 24.09.2013.



### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

**Утицај хроничне социјалне изолације на механизам антиоксидативне заштите у мозгу и јетри мужјака пацова Wistar соја**

која је моје ауторско дело.

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

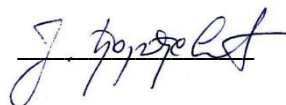
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 24.09.2013.



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

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

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.