

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

doktorska disertacija

**Modeliranje dinamičkih stanja hipotalamo-
hipofizno-adrenalnog sistema i
koncentracije kortizola**

Vladimir M. Marković

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Doctoral Dissertation

**Modeling dynamic states of the
hypothalamic-pituitary-adrenal system and
cortisol concentration**

Vladimir M. Marković

Belgrade, 2013

Mentori:

dr Ljiljana Kolar-Anić, redovni profesor
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Željko Čupić, naučni savetnik
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Ljiljana Kolar-Anić, redovni profesor
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Željko Čupić, naučni savetnik
Centar za katalizu i hemijsko inženjerstvo, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

dr Dragomir Stanisavljev, redovni profesor
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Svetozar Damjanović, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Miloš Mojović, docent
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Ana Ivanović-Šašić, naučni saradnik
Centar za katalizu i hemijsko inženjerstvo, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

Srdačno se zahvaljujem svojim mentorima prof. dr Ljiljani Kolar-Anić i naučnom savetniku dr Željku Čupiću na celokupnom dosadašnjem radu i pruženoj podršci.

Prof. dr Dragomiru Stanisavljevu, prof. dr Svetozaru Damjanoviću, docentu dr Milošu Mojoviću i naučnom saradniku Ani Ivanović-Šašić zahvaljujem se na korisnim savetima i sugestijama pri izradi ove disertacije. Ani Ivanović-Šašić se dodatno zahvaljujem na odličnoj zajedničkoj saradnji.

Dodatnu zahvalnost iskazujem vanrednom prof. Vladani Vukojević (Karolinska Institutet, Stockholm) i naučnom savetniku i vanrednom prof. Slobodanu Aniću.

Za mnoga stečena znanja i preneti iskustva zahvaljujem se profesorima i saradnicima sa Fakulteta za fizičku hemiju.

Profesoru dr Draganu Karadžiću (Šumarski fakultet, Beograd) hvala na mogućnosti izrade svog prvog naučnog rada. Takođe, zahvaljujem se svojim profesorima iz gimnazije „Uroš Predić“ i svojim nastavnicima i učiteljima iz osnovne škole „Jovan Jovanović Zmaj“, Pančevo.

Svojim profesorkama jezika, Radi Savović, Nadi Karanović i Veroniki Nikolić, hvala što su mi pokazale šta jesu izuzetnost i profesionalizam. Profesorki Veroniki na svim razgovorima koje smo vodili, na svim savetima kako koračati putevima koji nam predstoje, na inspiraciji za stalnim usavršavanjem sebe i prostora oko sebe – toliko puta hvala.

Svojim najbližim (WIN), posebno dragim i svim ostalim prijateljima, hvala za to što jesu i što su tu.

Mirjani i Mladenu, mami i tati – mojim neizmernostima, hvala na beskonačnoj ljubavi.

VM

Carolyn McDuffy (C. Ricci): You know, mum, life isn't as easy as I thought.

Chippy McDuffy (L. Banes): Oh, honey, oh – yes it is.

Iz filma „Pumpkin”,

scenrio: Adam Larson Broder; režija: Anthony Abrams i Adam Larson Broder

REZIME

Hipotalamo-hipofizno-adrenalna (eng. hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) osa predstavlja složen neuroendokrini sistem koji učestvuje u održavanju optimalnog dinamičkog stanja živog sistema (homeostaze). Bilo da je u osnovnom (bazalnom) ili nekom pobuđenom stanju pod dejstvom stresa, takav složeni nelinearni sistem je uvek daleko od termodinamičke ravnoteže i poseduje povratnu spregu. Zato hormone koji ga čine nalazimo u različitim dinamičkim stanjima. U osnovnom stanju, tzv. bazalnoj fiziologiji, koncentracija hormona kortizola, krajnjeg produkta i glavnog efektornog hormona HPA sistema čoveka, ispoljava složenu oscilatornu evoluciju u vremenu, sa unutar dnevnim (ultradijalnim) oscilacijama superponiranim na dnevne (cirkadijalne) oscilacije.

Na osnovu sve većeg broja dokaza postalo je očigledno da je odgovarajuća oscilatorna dinamika HPA sistema nepohodan preduslov za normalno funkcionisanje i zdravlje organizma, s obzirom na to da su promene u dinamičkom ponašanju HPA sistema povezane sa mnogim metaboličkim i psihijatrijskim poremećajima. Stoga je potrebno sveobuhvatnije ispitivanje dinamičkih svojstava HPA ose, koje obuhvata ne samo eksperimentalne studije, već i modeliranje i predviđanje na bazi numeričkih simulacija. U tom cilju je u skorije vreme razvijen priličan broj matematičkih modela koji mogu da simuliraju različite dinamičke karakteristike HPA ose u njenim osnovnim kao i u patološkim stanjima. Modeliranje mehanizma procesa na bazi stehiometrijskih relacija između reakcionih vrsta, i osnovnih principa nelinearne dinamike se pokazalo kao koristan pristup u simuliranju različitih složenih dinamičkih stanja koji se javljaju u mnogim sistemima, uključujući oscilatorno ponašanje HPA sistema.

Glavni cilj ove doktorske disertacije je modeliranje dinamičkih stanja HPA sistema čoveka i koncentracije kortizola kao reprezentativnog hormona za prikazivanje tih stanja, koja se mogu javiti pod različitim fiziološkim uslovima ili usled delovanja perturbatora HPA sistema, kao što su akutni i hronični stres. Taj cilj je postignut upotrebom stehiometrijskog modela aktivnosti HPA ose, formulisanog od strane Jelić i saradnika (2005) kao polazne osnove. U ovoj tezi, navedeni model je postepeno razvijan unapređivanjem i usklađivanjem njegovog mehanizma sa poznatim *in vivo* eksperimentalnim podacima. U toku istraživanja je pokazano da ovakvo modeliranje na

bazi stehiometrijskih relacija između vrsta poseduje značajan potencijal za proučavanje kompleksnih nelinearnih reakcionih procesa koji se nalaze u stanjima udaljenim od termodinamičke ravnoteže, kao što su procesi koji se odigravaju u neuroendokrinom HPA sistemu.

Polazni model (Jelić i saradnici, 2005) posmatra HPA osu kao nelinearanu reakcionu mrežu sa petljama pozitivne i negativne sprege. Ovaj model obuhvata samo najznačajnije reakcije između četiri dinamičke promenljive modela (koncentracije ključnih hormona HPA sistema: CRH, ACTH, kortizol i aldosteron), u skladu sa ustanovljenim eksperimentalnim nalazima. U numeričkim simulacijama je pokazano da je model u stanju da generiše samoodržive unutar-dnevne oscilacije. Sprezanjem sa zadatom dnevnom funkcijom, kao oblikom spoljnje pobude, model može simulirati kompleksnu oscilatornu dinamiku u kojoj su unutar-dnevne oscilacije superponirane na dnevne oscilacije, kao što se to dešava *in vivo*. Osim toga, u ranijim istraživanjima je pokazano da navedeni model poseduje potencijal u pogledu opisa dinamičkog odgovora HPA ose pod različitim uslovima akutnog i hroničnog stresa.

U ovoj doktorskoj tezi isti model (osnovni model HPA sistema) je upotrebljen za ispitivanje dinamičkog odgovora HPA ose i koncentracije kortizola na akutne perturbacije spoljnjim glukokortikoidima, lekovima na bazi kortizola sa snažnim antizapaljenskim i imunosupresivnim efektima, koji se uobičajeno koriste u lečenju različitih poremećaja. Dodatno, navedeni model je upotrebljen u cilju karakterizacije promena dinamičkih stanja HPA sistema koje se odigravaju u uslovima hroničnog stresa. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje značajne zavisnosti dinamičkog odgovora HPA sistema od intenziteta perturbacije spoljnjim glukokortikoidima, kao i unutar-dnevne faze i dnevne faze oscilacija koncentracije kortizola pri kojoj je ta perturbacija delovala. Osim toga, u simulacijama je pokazano da hronični stres u značajnoj meri može modifikovati svojstva dinamičkih stanja koncentracije kortizola i drugih hormona HPA sistema, kao što su njihov srednji nivo, oblik, amplituda i frekvencija oscilacija, pa čak i kvalitativni tip njihove dinamike. S tim u vezi, bufurkaciona analiza je pokazala da postoji nelinearna funkcionalna zavisnost između srednjeg nivoa CRH i dinamičkog odgovora koncentracije kortizola. Sa aspekta nelinearne dinamike, ovaj rezultat bi mogao ponuditi moguće teorijsko objašnjenje za

suprostavljene eksperimentalne nalaze da hronični stres može izazvati kvalitativno suprotno dinamičko ponašanje HPA ose.

U narednoj etapi istraživanja, mehanizam polaznog modela je dodatno proširen i usklađen sa fiziologijom realnog sistema. Prvo je polazni model (Jelić i saradnici, 2005) proširen uključivanjem reakcija eliminacije CRH i aldosterona. Nakon toga je u tako dobijeni prošireni osnovni model HPA sistema uvršćen holesterol, inicijalni prekursor kortizola, aldosterona i drugih steroidnih hormona, kao nova intermedijerna vrsta, čija koncentracija predstavlja dodatnu dinamičku promenljivu modela.

Da bi mogli da simuliraju oscilatornu dinamiku, stehiometrijski modeli moraju posedovati barem jedno nestabilno neravnotežno stacionarno, odnosno nestabilno ustaljeno, stanje. To da li predloženi reakcioni mehanizam može uopšte biti nestabilan, može se uspešno utvrditi primenom analize stehiometrijskih mreža (eng. stoichiometric network analysis, SNA), matematičke metode za analizu stabilnosti modela proizvoljne dimenzije, čija je kinetika zasnovana na zakonu o dejstvu masa. Primenom unapređene SNA je pokazano da svaki od izvedenih modela zadovoljava svoj uslov nestabilnosti, te da se u njima mogu javiti samoodržive oscilacije. Ova predviđanja na bazi SNA su potvrđena i u numeričkim simulacijama. Dodatno, SNA je pokazala da sva tri ispitivana modela HPA sistema (osnovni model, i oba izvedena modela - prošireni osnovni model i model sa holesterolom), poseduju zajedničko jezgro nestabilnosti. U numeričkim simulacijama je pokazano da su novoizvedeni modeli zadržali mnoge dinamičke kvalitete svojih prethodnika, što predstavlja važno svojstvo i prednost stehiometrijskih modela.

Model HPA sistema sa holesterolom ispoljio je nekoliko važnih poboljšanja u poređenju sa prethodna dva modela. Nedostaci u pogledu vrednosti koncentracija CRH, kao i dinamike i vrednosti koncentracije aldosterona su ispravljani i usklađeni sa eksperimentalnim nalazima. U simulacijama za svih pet dinamičkih promenljivih modela (holesterol, CRH, ACTH, kortizol, aldosteron) pokazano je dobro slaganje sa odgovarajućim ekperimentalnim koncentracionim vremenskim serijama u pogledu njihovih oscilatornih dinamičkih svojstava; istovremeno, koncentracione vremenske serije svih vrsta, osim ACTH, bile su u fiziološkim granicama. Osim toga, model sa holesterolom je pokazao da se različiti tipovi dinamičkih stanja koncentracije holesterola mogu dobiti variranjem vrednosti kinetičkih parametara holesterola

(konstanti brzina njegovog ulaza i izlaza). Dobijeni rezultati ukazuju na značaj uloge brzine ulaza i izlaza holesterola odnosno ukupne brzine promene njegove koncentracije na dinamiku HPA sistema kao celine, i time na njihovu moguću ulogu u održavanju homeostatskog kapaciteta HPA ose. Osim toga, model sa holesterolom predviđa negativnu korelaciju između srednje koncentracije holesterola i kortizola kao posledica promene vrednosti konstante brzine ulaza holesterola u sistem. Sveukupno gledajući, navedeni rezultati ukazuju na potencijal daljeg usavršavanja sličnih *in silico* eksperimenata, koji bi mogli biti upotrebljeni kao sredstva u cilju šireg razumevanja kompleksne međuzavisnosti stresa, dinamike HPA sistema i nivoa holesterola.

Sumarno, u ovoj doktorskoj disertaciji demonstrirani su potencijali i koristi modeliranja jednog složenog nelinearnog sistema, neuroendokrinog HPA sistema. To je učinjeno na bazi stehiometrijskih modela koji poseduju regulatorne mehanizme povratnih sprega. Date su mogućnosti praktične primene ovakvog vida modeliranja u predviđanju dinamičkih stanja HPA sistema i koncentracije kortizola pri različitim fiziološkim ulovima kao i pri uslovima delovanja raznih perturbatora, poput akutnog stresa, hroničnog stresa ili glukokortikoidnih lekova. Dobijeni rezultati i proistekli zaključci ukazuju na važnost odgovarajućih dinamičkih stanja HPA sistema i koncentracije kortizola za održavanje homeostaze, kao i za nastajanje brojnih metaboličkih i psihijatrijskih poremećaja (poput metaboličkog sindroma ili unipolarne depresije). U disertaciji je ukazano i na značaj modeliranja neuroendokrinih procesa na bazi stehiometrijskih modela u cilju dizajniranja individualnih terapija glukokortikoidima i daljem unapređenju personalizovane medicine.

Ključne reči: modeliranje, HPA, SNA, oscilatorna stanja, ultradijalni ritam, cirkadijalni ritam, kortizol, holesterol, stres, nelinearna dinamika

Naučna oblast: fizička hemija

Uža naučna oblast: fizička hemija - biofizička hemija i dinamika neravnotežnih procesa

UDK broj: 577.31

ABSTRACT

Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis represents a complex neuroendocrine system involved in maintaining optimal dynamic state of the organism as a whole (*i.e.* the state of homeostasis). Whether being in its basal state or in some of the perturbed stress states, this highly nonlinear system always functions under conditions far away from the thermodynamic equilibrium, possessing various feedback mechanisms. Consequently, hormones comprising the HPA axis can be found in different dynamic states. Under basal conditions, *i.e.* basal physiology, concentration of a hormone cortisol, the end-product and chief effector of human HPA axis, displays complex oscillatory time-evolution, with ultradian oscillations being superimposed on circadian oscillations.

It has become evident from a growing body of evidence that adequate oscillatory dynamics of HPA axis is a necessary prerequisite for its normal functioning and health, given that alterations of HPA axis dynamics are associated with many metabolic and psychiatric disorders. Thus, more exhaustive understanding of dynamic properties of HPA axis is required, accounting for not only experimental studies but also modeling and numerical simulation predictions. To this end, many mathematical models emulating different dynamical properties of HPA axis, in its regular as well as in pathological states, have been recently developed. Modeling the mechanism of a process by employing jointly stoichiometric relations between the reaction species and basic principles of nonlinear dynamics has proven to constitute a useful approach in emulating various forms of complex dynamic states occurring in a variety of systems, including the oscillatory behavior within the HPA axis.

The main goal of this dissertation is the modeling of dynamical states of human HPA axis and concentration of cortisol, as a representative hormone for describing these HPA axis states, occurring under different physiological conditions or due to the impact of the HPA axis perturbators, such as acute and chronic stress. This goal was accomplished by utilizing a stoichiometric model of HPA axis activity proposed by Jelić et al. (2005) as a starting ground. In this dissertation, the above-mentioned model was gradually developed by upgrading and adjusting its mechanism with known *in vivo* experimental data. During the course of these investigations, it was shown how predictive modeling based on stoichiometric relations between the model's species

possessed a strong potential for studying complex nonlinear reaction processes operating in states far from thermodynamic equilibrium, such as those appearing within the neuroendocrine HPA system.

The initial model (Jelić et al., 2005) considers HPA axis as a nonlinear reaction network with positive feed-forward and negative feedback loops. This model takes into account only the most significant interactions among the four dynamical variables of the model (concentrations of key HPA axis hormones CRH, ACTH, cortisol and aldosterone), in accordance with established experimental findings. In numerical simulations, the model has demonstrated to be able to give rise to self-sustained ultradian oscillations. By coupling with a given circadian function, as a form of an external forcing, the model can simulate complex oscillatory dynamics, with ultradian oscillations being superimposed on circadian oscillations, as observed *in vivo*. Additionally, in previous studies the model has proven to possess strong predictive potential for describing dynamic response of the HPA axis under various acute and chronic stress conditions.

In this doctoral thesis, the same model (basic model of the HPA system) was employed to investigate dynamic response of the HPA axis and cortisol concentration to acute perturbations with exogenous glucocorticoids, cortisol-like drugs with strong anti-inflammatory and immunosuppressive effects, which are widely used for treating various medical conditions. Additionally, the model was employed to further characterize changes in dynamical states of the HPA occurring during chronic stress. The obtained results showed there was a strong dependence of the response of HPA axis and cortisol concentration response on intensity, ultradian and circadian timing of exogenous glucocorticoid perturbations. Furthermore, the simulation results indicated to the possibility of chronic stress to significantly modify important dynamic properties of dynamical states of cortisol and of other HPA axis hormones' concentrations, such as mean level, shape, amplitude and frequency of their oscillations, and even the qualitative type of their dynamics. In that regard, bifurcation analysis has shown a nonlinear relationship between mean levels of CRH and the dynamic response of cortisol concentration. Such results might offer a possible theoretical interpretation in terms of nonlinear dynamics, for conflicting experimental findings regarding the ability of chronic stress to induce qualitatively opposite HPA axis dynamic behavior.

In the following stage of investigation, the mechanism of the initial model was further extended and adjusted to the real, *in vivo* physiology of the HPA axis. Firstly, the basic model of the HPA system (Jelić et al., 2005) was extended by including reactions of eliminations of CRH and aldosterone. Subsequently, in thus obtained extended basic model of the HPA system, cholesterol, the initial precursor of cortisol, aldosterone and other steroid hormones, was introduced as a novel intermediary species, whose concentration represents an additional dynamical variable of the model.

In order to give rise to oscillatory dynamics, each stoichiometric model must have at least one unstable nonequilibrium stationary (*i.e.* unstable steady) state. Determination whether the proposed reaction mechanism can at all be unstable, can be successfully carried out by employing stoichiometric network analysis (SNA), a mathematical method for stability analysis of models of arbitrary dimensionality, whose kinetics is based on the law of mass action. By utilizing an improved SNA methodology, it has been shown that each of derived models satisfies its own instability condition, thus being able to give rise to sustained oscillatory dynamics. This was further validated in numerical simulations. Furthermore, SNA has shown that all three investigated models of the HPA system (basic model, and both of the derived models – extended basic model and model with cholesterol) have common core of instability. Numerical simulations have shown that newly derived models retain many dynamic qualities of their predecessors, which is an important property and advantage of stoichiometric models.

The HPA model with cholesterol has displayed several important improvements in comparison to the two previous ones. Shortcomings regarding CRH levels and aldosterone's dynamics and concentration were corrected and adjusted to experimental observations. In simulations for all five dynamic variables (cholesterol, CRH, ACTH, cortisol and aldosterone), there was a good agreement with corresponding experimental concentration time-profiles of the species in terms of their oscillatory dynamical properties; concomitantly, concentration time-series for all species, except ACTH, were within their physiological levels. Additionally, model with cholesterol has shown that different types of dynamical states of cortisol concentration can arise by varying the values of cholesterol's kinetic parameters (rate constants of its inflow or outflow). These results indicate to the significance of the role of cholesterol inflow and outflow

rate, *i.e.* of cholesterol net reaction rate, on the dynamics of HPA axis as a whole, thus suggesting to their possible importance for maintaining HPA axis' homeostatic capacity. Furthermore, the model with cholesterol predicts a negative correlation between mean cholesterol and mean cortisol concentrations, arising when the value of rate constant for cholesterol inflow into the system is changed. Taken altogether, these results indicate to the potential for further development of similar *in silico* experimental designs, which may be exploited as means towards more comprehensive understanding of intricate interplay between stress, HPA axis dynamics and cholesterol levels.

In summary, in this doctoral thesis potentials and benefits of modeling of a complex nonlinear system, a neuroendocrine HPA system, were demonstrated. This goal was accomplished by employing stoichiometric models, which incorporate regulatory feedback loop mechanisms. The thesis also addressed possibilities for practical applications of such a modeling approach to predict dynamical states of HPA axis and cortisol concentration under different physiological conditions and due to influence of various perturbators, such as acute stress, chronic stress or glucocorticoid medications. The obtained results and subsequent conclusions indicate to the importance of certain dynamical states of HPA axis and cortisol concentration for maintaining homeostasis, as well as for the etiology of many metabolic and psychiatric disorders (such as metabolic syndrome or major depression). The thesis also indicated to possibilities the modeling of neuroendocrine processes using stoichiometric models offers in order to aid the design of individually-tailored glucocorticoid therapy, thus contributing to further improvements in the field of personalized medicine.

Key words: modeling, HPA, SNA, oscillatory states, ultradian rhythm, circadian rhythm, cortisol, cholesterol, stress, nonlinear dynamics

Scientific field: physical chemistry

Field of academic expertise: physical chemistry - biophysical chemistry and dynamics of non-equilibrium processes

UDC number: 577.31

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1 Dinamička stanja reakcionih sistema.....	6
1.2 Ispitivanje stabilnosti neravnotežnih stacionarnih stanja reakcionih sistema.....	8
1.3 Hipotalamo-hipofizno adrenalni (HPA) sistem (osa).....	13
<i>1.3.1 Steroidni hormoni.....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.2 Adrenalna steroidogeneza.....</i>	<i>16</i>
<i>1.3.3 Regulacija aktivnosti HPA sistema.....</i>	<i>19</i>
<i>1.3.4 Oscilatorna dinamika HPA sistema.....</i>	<i>26</i>
1.4 Dosadašnji modeli HPA sistema.....	27
1.5 Osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 9 reakcija).....	31
2. METODE.....	40
2.1. Numeričke metode.....	40
2.2 Analiza stehiometrijskih mreža (SNA).....	41
<i>2.2.1 Osnovni principi metode SNA.....</i>	<i>41</i>
<i>2.2.2 Postupak metode SNA.....</i>	<i>42</i>
3. REZULTATI.....	55

3.1. Dinamička stanja osnovnog modela HPA sistema (model sa 4 vrste i 9 reakcija) u funkciji akutnih i hroničnih perturbatora.....	55
<i>3.1.1 Predstavljanje akutnog i hroničnog stresa u osnovnom modelu HPA sistema.....</i>	<i>55</i>
<i>3.1.2 Definisanje parametara perturbacija i dinamičkog odgovora modela na perturbacije.....</i>	<i>58</i>
<i>3.1.3 Predstavljanje uslova akutnog i hroničnog stresa u numeričkim simulacijama.....</i>	<i>64</i>
<i>3.1.4 Korelacija dinamičkih stanja modela i fizioloških stanja HPA sistema.....</i>	<i>65</i>
3.1.4.1 Simulacije efekata akutnog stresa.....	65
3.1.4.1.1 Efekat intenziteta akutnog stresa i momenta primene u odnosu na unutarnevnu oscilaciju.....	65
3.1.4.1.2 Efekat intenziteta i dnevnog faznog ugla akutnog stresa.....	67
3.1.4.1.3 Efekat dve uzastopne akutne perturbacije na dinamiku HPA sistema.....	69
3.1.4.2 Simulacije efekata hroničnog stresa.....	71
3.1.4.2.1 Efekat hroničnog stresa na unutarnevne oscilacije.....	72
3.1.4.2.2 Efekat hroničnog stresa na dinamiku spregnutih unutarnevnik i dnevnih oscilacija.....	74
3.1.4.2.3 Efekat amplitude dnevnih oscilacija koncentracije CRH na dinamiku HPA sistema.....	76
3.1.4.2.4 Efekat hroničnog stresa na frekvenciju unutarnevnik oscilacija koncentracije kortizola.....	78

3.1.4 <i>Diskusija efekata akutnog i hroničnog stresa na dinamička stanja HPA sistema i fiziološke promene</i>	79
3.2 Prošireni osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija)	84
3.2.1 <i>Opis proširenog osnovnog modela HPA sistema</i>	84
3.2.2 <i>SNA proširenog modela HPA sistema</i>	86
3.2.3 <i>Numerička analiza proširenog osnovnog modela HPA sistema</i>	92
3.3. Model HPA sistema sa holesterolom (model sa 5 vrsta i 13 reakcija)	95
3.3.1 <i>Opis modela HPA sistema sa holesterolom</i>	95
3.3.2 <i>SNA modela HPA sistema sa holesterolom</i>	101
3.3.3 <i>Numerička analiza modela HPA sistema sa holesterolom</i>	112
3.3.3.1. <i>Vremenske serije dinamičkih varijabli modela</i>	112
3.3.3.2. <i>Uticaj kinetičkih parametara holesterola na globalnu dinamiku HPA sistema</i>	118
3.3.3.3. <i>Korelacija između srednjeg nivoa kortizola i holesterola u oscilatornom domenu modela</i>	121
4. DISKUSIJA	126
5. ZAKLJUČAK	131
6.LITERATURA	133

1. UVOD

Hipotalamo-hipofizno-adrenalni (HPA, eng. hypothalamic-pituitary-adrenal) sistem (osa, osovina) predstavlja neuroendokrini sistem koji učestvuje u održavanju optimalnog dinamičkog stanja organizma sisara, njegove homeostaze, pri fiziološki normalnim, kao i stresnim uslovima [1-3]. Kod čoveka, glavni hormon HPA sistema, kortizol, ispoljava složeno dinamičko ponašanje pri kojem njegova koncentracija pokazuje oscilatornu evoluciju, u okviru koje je moguće razlikovati dva tipa spregnutih oscilacija [2-4]: unutardnevne (ultradijalne) oscilacije sa periodom od 20-120 min superponirane na dnevne (cirkadijalne) oscilacije čiji period iznosi skoro tačno 24 h. Značaj dnevnog ritma za adekvatno funkcionisanje HPA sistema poznat je već nekoliko decenija [5, 6], dok o značaju unutardnevnih oscilacija u zdravoj fiziologiji HPA sistema svedoče rezultati značajnog broj kako eksperimentalnih [7-13], tako i teorijskih radova zasnovanih na modeliranju dinamike kortizola [14-44].

Razni oblici akutnog i hroničnog stresa mogu značajno uticati na promenu dinamike HPA sistema [3, 45]. Osim toga, dinamička stanja kortizola kao njegovog sastavnog dela, mogu biti u značajnoj meri modifikovana u terapiji glukokortikoidima, [46]. Glukokortikoidi predstavljaju grupu anti-inflamatornih i imunosupresorskih lekova na bazi kortizola, koji se rutinski primenjuju pri akutnom i hroničnom tretmanu velikog broja zapaljenskih i imunoloških poremećaja [46]. Zapravo, u mnogim metaboličkim i psihičkim poremećajima i bolestima, kortizol se nalazi u izmenjenim dinamičkim stanjima, sa drugačijom srednjom koncentracijom i/ili oblikom, amplitudom i frekvencijom oscilacija, u odnosu na ona koje ima kod zdravih osoba. U tipične primere takvih poremećaja spadaju [2, 47]: primarna (Addison-ova bolest) i sekundarna adrenokortikalna insuficijencija, Cushing-ov sindrom, visceralna gojaznost, dijabetes, hipertenzija, osteoporoza, posttraumatski stresni poremećaj (PTSD, eng. posttraumatic stress disorder), unipolarna depresija.

Radi boljeg razumevanja principa koji omogućuju složenu dinamiku HPA ose i kortizola kao glavnog hormona ovog sistema, i radi mogućnosti predviđanja vremenske evolucije koncentracije kortizola pri dejstvu raznih oblika perturbatora, razvijeno je nekoliko modela HPA sistema [14-29, 48]. Navedeni modeli mogu u dobroj meri da

simuliraju određena dinamička svojstva evolucije koncentracije kortizola i drugih osnovnih vrsta HPA sistema, ali nijedan od njih nije u stanju da na bazi predloženog mehanizma zadovolji sve ključne odlike složene oscilatorne dinamike hormona HPA ose u okvirima fizioloških vrednosti njihovih koncentracija. Do sada jedini stehiometrijski model aktivnosti HPA sistema predložili su Jelić i saradnici, 2005 [16]. Mehanizmi stehiometrijskih modela se mogu menjati na prirodan način sa novim hemijskim vrstama i/ili reakcijama u skladu sa hemizmom ispitivanog sistema poznatog na bazi raspoloživih eksperimentalnih podataka. Pored toga razna dinamička stanja, kao što su proste oscilacije, oscilacije mešanih modova i kaos, mogu sa značajnim uspehom biti opisana pomoću stehiometrijskih modela [49]. Upravo iz navedenih razloga, u predloženoj tezi kao polazna osnova za modeliranje različitih dinamičkih stanja kortizola uzet je stehiometrijski model HPA sistema, postavljen od strane Jelić i saradnika [16].

Numeričke simulacije vremenskih evolucija hormona navedenog modela pokazuju dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u pogledu dinamičkog ponašanja HPA sistema u fiziološkim uslovima [16-18]. Osim toga, navedeni model se pokazao korisnim za *in silico* ispitavanje uticaja akutnog stresa na dinamiku HPA sistema, ukazujući na značaj faze odn. dinamičkog stanja hormona HPA ose u trenutku delovanja stresora [17, 18]. Navedeni rezultati numeričkih simulacija potvrđuju validnost opisanog stehiometrijskog modela aktivnosti HPA sistema, čineći ga dobrim polazištem za dalja proučavanja dinamike kortizola i drugih hormona HPA ose, kako u fiziološkim uslovima, tako i pod dejstvom različitih vrsta perturbatora.

U cilju daljeg proučavanja dinamičkog ponašanja kortizola (kao i celog HPA sistema), u numeričkim simulacijama na bazi prethodno navedenog modela HPA sistema ispitivan je dinamički odgovor modela na dejstvo perturbacija glukokortikoidima [27]. Isti model je takođe korišćen za ispitivanje uticaja hroničnog stresa i posledica koje on ostavlja na dinamička stanja kortizola [27].

Iako navedeni model veoma dobro opisuje samu dinamiku hormona HPA sistema time što se u numeričkim simulacijama dobijaju unutar-dnevne i dnevne oscilacije sa karakteristikama koje su u skladu sa eksperimentalnim podacima (dobar oblik i frekvencija oscilacija), on nije u stanju da istovremeno za sva četiri hormona uključena u model dobro opiše oblast koncentracija u kojem se javljaju oscilacije kao ni

njihove amplitude. Zahtev da se u datom modelu za sva četiri hormona dobiju odgovarajuće vremenske evolucije koje verno odslikavaju njihovu dinamiku u koncentracionom opsegu unutar njihovih fizioloških granica nije bilo moguće postići ni dodatnim optimizacijama parametara datog modela. To se može objasniti time što razmatrani model predstavlja pojednostavljeni model aktivnosti HPA sistema, čiji je osnovni cilj bio da dobro opiše globalno dinamičko ponašanje HPA sistema. Iz tog razloga, njegov mehanizam obuhvata samo glavne dinamičke vrste ovog neuroendokrinog sistema. On ne obuhvata holesterol kao glavni prekursor steroidnih hormona, već obuhvata samo CRH i ACTH koji kontrolišu količinu nastalih steroidnih hormona iz holesterola.

Ovakav problem se principijelno može prevazići daljim proširivanjem ovog stehiometrijskog modela HPA sistema sa novim reakcijama i vrstama od važnosti za njegov mehanizam. Dakle, u cilju dodatnog usaglašavanja ponašanja kortizola i drugih ključnih hormona HPA sistema sa eksperimentalnim podacima, u navedeni model uvršćen je i holesterol, prirodni prekursor steroidnih hormona (ovde su to kortizol i aldosteron), a mehanizam modela je dopunjen sa odgovarajućim reakcijama u skladu sa hemizmom ovog sistema u živom sistemu (čovjeku). Postavljanjem novog modela HPA sistema sa holesterolom omogućilo je da se u numeričkim simulacijama direktno ispituju uticaji ovog glavnog i jedinog prekursora steroidnih hormona na globalnu dinamiku HPA sistema i dinamička stanja kortizola. Dodatno, koncentracije pojedinih vrsta su mogle biti svedene na prirodnije veličine. Tako je koncentracija CRH u predloženom modelu HPA sistema sa holesterolom kao glavnom prekursorskom vrstom, smanjena na približno fiziološke koncentracije za oko četiri reda veličine manje od koncentracije kortizola [50]. Kako su fiziološke koncentracije holesterola za oko četiri reda veličine veće od koncentracije kortizola [2], on i iz tog ugla zaista predstavlja pravu prekursorsku vrstu kortizola.

Veoma koristan metod za analizu stabilnosti višedimenzionalnih stehiometrijskih modela i optimizaciju njihovih parametara predstavlja matematički postupak poznat kao analiza stehiometrijskih mreža (eng. stoichiometric network analysis, SNA) [51, 52]. U te svrhe, SNA metod je primenjen i na modelu HPA sistema [18], dok se u ovoj tezi SNA metod koristi u analizi stabilnosti modifikacija ovog modela HPA sistema, tzv. proširenog osnovnog modela HPA (model sa 4 vrste i 11

reakcija [48] (poglavlje 3.2) i modela HPA sistema sa holesterolom (model sa 5 vrsta i 13 reakcija) (poglavlje 3.3).

Glavni cilj ove doktorske disertacije predstavlja modeliranje dinamičkih stanja HPA sistema čoveka i koncentracije kortizola kao reprezentativnog hormona za prikazivanje tih stanja, koja se mogu javiti pod različitim fiziološkim uslovima ili usled delovanja perturbatora HPA sistema, kao što su akutni i hronični stres.

Modeliranje dinamičkih stanja koncentracije kortizola trebalo bi da pruži bolji uvid u mehanizme kojima se obezbeđuje samoregulacija oscilatorne evolucije kortizola unutar HPA sistema čoveka, sa posebnim osvrtom na značaj međudejstva i usaglašavanje naizmenične dominacije pozitivnih i negativnih sprega uključenih u te mehanizme. Osim toga, ovakvo modeliranje pruža mogućnost predviđanja vremenske evolucije kortizola ne samo u fiziološkim uslovima, već i pod dejstvom različitih perturbatora HPA sistema, poput akutnog i hroničnog stresa ili glukokortikoidnih medikamenata, koji u realnim okolnostima mogu da tranzijentno ili permanentno modifikuju dinamiku kortizola.

Imajući u vidu da su u mnogim metaboličkim kao i psihijatrijskim poremećajima, poput Cushing-ovog sindroma, unipolarne depresije ili posttraumatskog stresnog poremećaja, dinamička stanja kortizola izmenjena, ovakva ispitivanja bi mogla doprineti njihovom boljem razumevanju. Sa druge strane, predviđanje različitih dinamičkih stanja kortizola na bazi postavljenih modela HPA sistema može imati značaj i u definisanju što efikasnijih tretmana pacijenata pod glukokortikoidnom terapijom, u kojima bi doza leka bila usklađena sa satnicom njegovog uzimanja, shodno dinamičkom stanju kortizola unutar HPA sistema pacijenta u datom trenutku.

U cilju provere validnosti predloženih stehiometrijskih modela aktivnosti HPA sistema primenjene su numeričke simulacije vremenskih evolucija promenljivih (koncentracije hemijskih vrsta) uvršćenih u te modele (poglavlje 2.1). Na osnovu numeričkih simulacija dobijeno je dinamičko ponašanje ispitivanih modela kako u bazalnim (osnovnim) uslovima, tako i uslovima akutnih i hroničnih perturbatora dinamičkih stanja kortizola i drugih hormona uključenih u analizirani model HPA sistema [27, 48] (poglavlja 3.1, 3.2.3 i 3.3.3).

Pomoću metode poznate kao analiza stehiometrijskih mreža (eng. stoichiometric network analysis, SNA) ispitana je stabilnost analiziranih modela, proširenog osnovnog

modela HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija) [48] (poglavlje 3.2.2) i modela HPA sistema sa holesterolom (model sa 5 vrsta i 13 reakcija) (poglavlje 3.3.2). Ova matematička metoda predstavlja efikasnu i opštu metodu za ispitivanje stabilnosti neravnotežnih stacionarnih (ustaljenih) stanja u kompleksnim, višedimenzionalnim reakcionim sistemima [49, 52, 52]. Primenjen je unapređeni oblik SNA, prema kojem se uslov za nestabilnost modela, izražen u uobičajenom postupku SNA preko brzina struja (čije brojne vrednosti u opštem slučaju ne moraju biti definisane), može uvek transformisati u oblik koji sadrži isključivo brzine reakcionih koraka u neravnotežnom stacionarnom (ustaljenom) stanju [53, 54], čije se brojne vrednosti uvek mogu definisati.

1.1 Dinamička stanja reakcionih sistema

U nelinearnoj dinamici, dinamika posmatranog sistema determinisana je sistemom diferencijalnih jednačina koji opisuje brzine promena dinamičkih promenljivih sistema. Rešenja tog sistema diferencijalnih jednačina opisuju vremensku evoluciju razmatranog dinamičkog sistema. Za kompletno definisanje stanja dinamičkog sistema potrebno je i dovoljno poznavati skup od n nezavisnih dinamičkih promenljivih. Svako stanje dinamičkog sistema može se predstaviti tačkom u n -dimenzionom faznom prostoru, čija je dimenzija (odn. broj n koordinatnih osa) određena brojem n stepeni slobode sistema tj. brojem n njegovih nezavisnih dinamičkih promenljivih. Dinamičko stanje sistema odn. evolucija njegovih stanja u vremenu predstavljeno je trajektorijom nastalom kretanjem navedene tačke tokom vremena u faznom prostoru [49, 55, 56]. Ako je u limitu beskonačno dugog vremenskog intervala trajektorija sistema u faznom prostoru zatvorena linija, dinamičko stanje sistema je periodičnog tipa, dok se u slučaju otvorene trajektorije radi o aperiodičnom dinamičkom stanju sistema.

Reakcioni sistemi spadaju u dinamičke sisteme, te se navedena opšta svojstva odnose i na ovu grupu dinamičkih sistema. U reakcionim sistemima dinamičke promenljive su tipično koncentracije vrsta, temperatura ili pritisak. Kada su termodinamičke veličine temperatura, pritisak i druge relevantne veličine konstantne, odn. kada su koncentracije vrsta jedine dinamičke promenljive u sistemu, fazni prostor reakcionog sistema predstavljen je koncentracionim faznim prostorom.

U reakcionim sistemima mogu se razlikovati ravnotežna i neravnotežna stacionarna stanja [57, 58]. U slučaju ravnotežnog stacionarnog stanja, odn. stanja kada se sistem nalazi u termodinamičkoj ravnoteži, brzine svih vrsta uključenih u mehanizam hemijske reakcije, dakle, svih reaktanata, produkata i intermedijera, jednake su nuli. Tada je i promena slobodne Gibbs-ove energije sistema jednaka nuli. Sistem će se naći u neravnotežnom stacionarnom odn. ustaljenom stanju onda kada su brzine svih intermedijera jednake nuli, dok su brzine reaktanata ili produkata različite od nule [49, 55, 59]. Dakle, neravnotežna stacionarna stanja mogu se realizovati samo u reakcionim sistemima koji imaju barem jednu intermedijernu vrstu. Treba istaći da se u terminologiji hemijske kinetike često umesto termina *neravnotežno stacionarno stanje* koristi samo termin *stacionarno stanje*.

Prema karakteru lokalne stabilnosti, svako stacionarno stanje može biti stabilno ili nestabilno. Stacionarno stanje je stabilno ako infinitezimalno male perturbacije sistema u okolini datog stacionarnog stanja, po prestanku delovanja perturbatora, opadaju, te se sistem ponovo vraća u polazno stanje, dok je nestabilno, ako po prestanku delovanja perturbatora, nastale infinitezimalno male perturbacije rastu, i sistem trajno napusti polazno stacionarno stanje [49, 56].

Postoji nekoliko generalnih termodinamičkih i kinetičkih preduslova da bi u nekom sistemu (hemijskom, fizičkom, biološkom, društvenom) moglo doći do pojave spontanijih oscilacija [60]:

- 1) neprigušene oscilacije mogu se odvijati samo u termodinamički otvorenim (sa okolinom razmenjuju i energiju i masu) sistemima, udaljenim od stanja termodinamičke ravnoteže,
- 2) oscilatorni sistem mora posedovati barem dva stepena slobode, tj. njegovu vremensku evoluciju mora opisivati odgovarajući sistem od barem dve simultane diferencijalne jednačine (po jedna za svaku od vrsta prisutnih u sistemu),
- 3) između pokretačkih termodinamičkih sila i flukseva mora postojati izražena nelinearna zavisnost,
- 4) oscilatorni sistem mora posedovati nestabilno neravnotežno stacionarno (ustaljeno) stanje,
- 5) između individualnih (pojedinačnih) procesa u sistemu, mora postojati međusobno kinetičko sprežanje (kuplovanje),
- 6) u fizičko-hemijskim sistemima, oscilatorni procesi su često praćeni procesima u prostoru (npr. difuzijom), te su oni uvek i vremenski i prostorni fenomeni.

Kada se nalaze u stanju udaljenom od termodinamičke ravnoteže, oscilatorne reakcioni sistemi mogu ispoljiti nemonotonu evoluciju i multistabilnost (pojavu da za isti skup vrednosti parametara sistema, sistem ima na raspolaganju dva ili više (neravnotežnih) stacionarnih stanja). Nemonotona dinamička stanja mogu biti periodična, kada se veličina koja reprezentuje stanje sistema ponavlja na pravilan način, ili aperiodična, kada ne postoji takva regularnost [56, 59, 61].

U periodične režime nemonotone evolucije oscilatornih procesa spadaju proste oscilacije (imaju dobro definisan period, amplitudu i oblik) i oscilacije mešanih

modova, a u aperiodične, razni tipovi haosa [56, 59, 61]. Osim ovih dinamičkih stanja, u oscilatornim hemijskim reakcijama javlja se i kvaziperiodičnost. Ona podrazumeva takvo dinamičko stanje u kojem postoje dve (ili više) frekvencija oscilacija čiji količnik nije racionalan broj, i čiji se atraktor u faznom prostoru kreće po površini torusa (dvodimenzionalnog odn. T^2 -torusa za dve osnovne frekvencije, odn. hipertorusa dimenzije n , T^n , za n osnovnih frekvencija) [56, 59].

U režimu prostih oscilacija, period, amplitude i oblik oscilacija su stalni i dobro definisani u toku celog režima. Kada je sistem u stanju oscilacija mešanih modova, oscilacije se razlikuju po amplitudama, tako da se definišu oscilacije malih i velikih amplituda. Međutim, u ovom periodičnom režimu, postoji pravilna sekvenca velikih i malih oscilacija, koja se na regularan način ponavlja tokom trajanja ovog režima. Ta sekvenca se simbolički može obeležiti sa L^s , gde L označava broj velikih, a eksponent s broj malih oscilacija u datoj sekvenci [49, 55]. Aperiodični (nemonotoni) režimi predstavljaju najslabije oblike dinamike reakcionih sistema. Ova stanja se nazivaju i deterministički kaos (ili samo kaos), koji predstavlja neuređeno, aperiodično kretanje određeno determinističkim zakonima [56, 59, 61].

Za ispitivanje stabilnosti neravnotežnih stacionarnih odn. ustaljenih stanja u slučaju opšteg n -dimenzionalnog reakcionog sistema, treba utvrditi stabilnost rešenja kinetičkih jednačina koje se koriste za definisanje vremenske evolucije tog reakcionog sistema

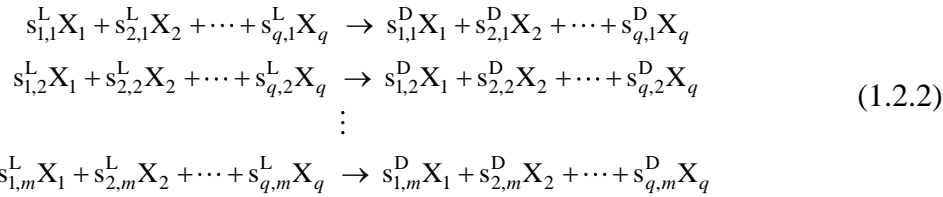
1.2 Ispitivanje stabilnosti neravnotežnih stacionarnih stanja reakcionih sistema

Za ispitivanje stabilnosti neravnotežnih stacionarnih odn. ustaljenih stanja u slučaju opšteg n -dimenzionalnog reakcionog sistema, treba utvrditi stabilnost rešenja kinetičkih jednačina koje se koriste za definisanje vremenske evolucije tog reakcionog sistema:

$$\begin{aligned}
\frac{dx_1}{dt} &= f_1(x_1, x_2, \dots, x_n) \\
\frac{dx_2}{dt} &= f_2(x_1, x_2, \dots, x_n), \\
&\vdots \\
\frac{dx_n}{dt} &= f_n(x_1, x_2, \dots, x_n)
\end{aligned}
\tag{1.2.1}$$

gde je n broj nezavisnih dinamičkih promenljivih x_i ($i = 1, 2, \dots, n$), potrebnih i dovoljnih da se u potpunosti odredi neravnotežno stacionarno stanje koje se ispituje. Kada se definišu neravnotežna stacionarna stanja (u uslovima konstantne temperature, pritiska ili neke druge veličine od koje zavisi intenzitet interakcija u reakcionom sistemu), nezavisne dinamičke promenljive su koncentracije n nezavisnih intermedijernih vrsta. Intermedijerne vrste (kraće intermedijeri) su vrste koje i nastaju i nestaju u reakcionim koracima reakcionog sistema, tako da ne figurišu u sumarnim stehiometrijskim izrazima celokupnog procesa. Broj nezavisnih intermedijera u reakcionom sistemu jednak je maksimalnom broju linearno nezavisnih vrsta (redova) tj. rang u tzv. stehiometrijske matrice \mathbf{S} [49]. Elemente matrice \mathbf{S} čine stehiometrijski koeficijenti svih intermedijera (vrste matrice \mathbf{S}) u svim reakcijama (kolone matrice \mathbf{S}) reakcionog sistema (v. jed. (2.2.2)). Dakle, pri ispitivanju stabilnosti ustaljenih stanja nekog reakcionog sistema, broj n određuje dimenzionalnost tog sistema, i odgovara broju nezavisnih intermedijernih vrsta u tom reakcionom sistemu. Treba istaći da je u najvećem broju slučajeva broj nezavisnih intermedijernih vrsta u ispitivanom reakcionom sistemu jednak ukupnom broju njegovih intermedijera [49].

U stehiometrijskim reakcionim sistemima funkcije f_i ($i = 1, 2, \dots, n$) u jednačini (1.2.1) obično se nalaze u obliku algebarskih suma brzina pojedinačnih reakcionih koraka. Naime, u opštem slučaju, stehiometrijski reakcioni sistem sastavljen od m reakcionih koraka i u kojem postoji ukupno q vrsta (svi reaktanti, produkti i intermedijeri) X_q može se predstaviti sledećim sistemom od m reakcionih koraka (stehiometrijskih jednačina):



gde $s_{r,l}^L$ odn. $s_{r,l}^D$ označavaju stehiometrijske koeficijente r -te vrste ($r = 1, 2, \dots, q$) sa leve odn. desne strane l -tog reakcionog koraka ($l = 1, 2, \dots, m$) u datom reakcionom sistemu.

Ako u takvom reakcionom sistemu ima n nezavisnih intermedijera, tada se njihove kinetičke jednačine mogu predstaviti sistemom diferencijalnih jednačina:

$$\begin{aligned}
\frac{dx_1}{dt} &= S_{1,1}v_1 + S_{1,2}v_2 + \dots + S_{1,m}v_m \\
\frac{dx_2}{dt} &= S_{2,1}v_1 + S_{2,2}v_2 + \dots + S_{2,m}v_m, \\
&\vdots \\
\frac{dx_n}{dt} &= S_{n,1}v_1 + S_{n,2}v_2 + \dots + S_{n,m}v_m
\end{aligned} \tag{1.2.3}$$

gde je v_l ($l = 1, \dots, m$) brzina l -tog reakcionog koraka, dok je ukupni stehiometrijsku koeficijent za dati intermedijer X_i , $S_{i,l}$, definisan izrazom $S_{i,l} = s_{i,l}^D - s_{i,l}^L$, pri čemu je $i = 1, \dots, n$.

Brzine pojedinačnih reakcionih koraka v_l izvode se u skladu sa zakonom o dejstvu masa. Prema zakonu o dejstvu masa, brzina pojedinačnog reakcionog koraka, v_l , jednaka je proizvodu konstante brzine tog koraka, k_l i koncentracija svih vrsta koje učestvuju kao reagujuće vrste u datom reakcionom koraku (vrste sa leve strane reakcione jednačine (koraka)) stepenovanih za vrednost svog stehiometrijskog koeficijenta $s_{r,l}^L$:

$$v_l = k_l x_1^{s_{1,l}^L} x_2^{s_{2,l}^L} \dots x_r^{s_{r,l}^L} . \tag{1.2.4}$$

Kada se analiziraju neravnotežna stacionarna stanja, kako je ranije podvučeno, vremensku evoluciju sistema definišu koncentracije n nezavisnih intermedijera, tako da se umesto celog sistema kinetičkih jednačina, analiziraju samo kinetičke (diferencijalne) jednačine od n nezavisnih intermedijera (jed. 1.2.3). Koncentracije preostalih linearno zavisnih vrsta mogu se lako izračunati iz algebarskih jednačina kao funkcije koncentracija nezavisnih vrsta.

Da bi se utvrdila stabilnost nekog neravnotežnog dinamičkog stanja potrebno je odrediti kako se u razmatranom sistemu menjaju tokom vremena infinitezimalno male promene koncentracija, Δx_i ($i = 1, \dots, n$), od n nezavisnih intermedijera u okolini neravnotežnog stacionarnog stanja čiju stabilnost je potrebno odrediti. Razvojem polaznog sistema diferencijalnih jednačina (1.2.3) (koje su u najvećem broju primera nelinearne) u Taylor-ov red u okolini ustaljenog stanja čija se stabilnost utvrđuje, i zanemarivanjem viših članova dobijenog razvoja (članovi u kojima figurišu izvodi veći od jedan), dobija se linearni sistem jednačina (1.2.5) koji omogućava određivanje stabilnosti datog ustaljenog stanja posmatranog n -dimenzionalnog sistema:

$$\begin{aligned}
 \frac{d\Delta x_1}{dt} &= \left(\frac{\partial f_1}{\partial x_1} \right)_{ss} \cdot \Delta x_1 + \left(\frac{\partial f_1}{\partial x_2} \right)_{ss} \cdot \Delta x_2 + \dots + \left(\frac{\partial f_1}{\partial x_n} \right)_{ss} \cdot \Delta x_n \\
 \frac{d\Delta x_2}{dt} &= \left(\frac{\partial f_2}{\partial x_1} \right)_{ss} \cdot \Delta x_1 + \left(\frac{\partial f_2}{\partial x_2} \right)_{ss} \cdot \Delta x_2 + \dots + \left(\frac{\partial f_2}{\partial x_n} \right)_{ss} \cdot \Delta x_n \cdot \\
 &\vdots \\
 \frac{d\Delta x_n}{dt} &= \left(\frac{\partial f_n}{\partial x_1} \right)_{ss} \cdot \Delta x_1 + \left(\frac{\partial f_n}{\partial x_2} \right)_{ss} \cdot \Delta x_2 + \dots + \left(\frac{\partial f_n}{\partial x_n} \right)_{ss} \cdot \Delta x_n
 \end{aligned}
 \tag{1.2.5}$$

Supskript „ss“ u jednačini (1.2.5) označava vrednosti parcijalnih izvoda $\partial f_j / \partial x_i$ u ustaljenom (neravnotežnom stacionarnom) stanju.

Opšta rešenja linearizovanih jednačina dinamike (1.2.5) imaju oblik:

$$\begin{aligned}
\Delta x_1(t) &= c_{1,1}e^{\lambda_1 t} + c_{1,2}e^{\lambda_2 t} + \dots + c_{1,n}e^{\lambda_n t} \\
\Delta x_2(t) &= c_{2,1}e^{\lambda_1 t} + c_{2,2}e^{\lambda_2 t} + \dots + c_{2,n}e^{\lambda_n t} \\
&\vdots \\
\Delta x_n(t) &= c_{n,1}e^{\lambda_1 t} + c_{n,2}e^{\lambda_2 t} + \dots + c_{n,n}e^{\lambda_n t}
\end{aligned} \tag{1.2.6}$$

Shodno obliku jednačina (1.2.6) koje opisuju vremensko ponašanje infinitezimalnih perturbacija sistema u okolini ispitivanog ustaljenog stanja, stabilnost i tip ispitivanog ustaljenog stanja su definisani karakterom (realan ili imaginaran) eksponenata λ_i i predznakom (pozitivan ili negativan) njihovog realnog dela. Da bi ustaljeno stanje bilo nestabilno, potrebno je da barem jedan od λ_i ima pozitivan realni deo [49, 55, 56].

Eksponenti λ_i predstavljaju svojstvene vrednosti operatora jakobijana \mathbf{J} u okolini datog ustaljenog stanja:

$$\mathbf{J} = \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial f_1}{\partial x_1} \right)_{ss} & \left(\frac{\partial f_1}{\partial x_2} \right)_{ss} & \dots & \left(\frac{\partial f_1}{\partial x_n} \right)_{ss} \\ \left(\frac{\partial f_2}{\partial x_1} \right)_{ss} & \left(\frac{\partial f_2}{\partial x_2} \right)_{ss} & \dots & \left(\frac{\partial f_2}{\partial x_n} \right)_{ss} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \left(\frac{\partial f_n}{\partial x_1} \right)_{ss} & \left(\frac{\partial f_n}{\partial x_2} \right)_{ss} & \dots & \left(\frac{\partial f_n}{\partial x_n} \right)_{ss} \end{bmatrix}. \tag{1.2.7}$$

Eksponenti λ_i se mogu odrediti kao rešenja svojstvenog problema operatora dinamike \mathbf{J} odn. kao rešenja njegovog karakterističnog polinoma:

$$\lambda^n + \alpha_1 \lambda^{n-1} + \alpha_2 \lambda^{n-2} \dots + \alpha_{n-1} \lambda + \alpha_n = 0. \tag{1.2.8}$$

Znak i karakter svojstvenih vrednosti λ_i ($i = 1, 2, \dots, n$), a time i stabilnost dinamičkog sistema, određeni su koeficijentima α_i karakterističnog polinoma operatora \mathbf{J} (jed. (1.2.8)).

Analiza stabilnosti relativno jednostavnih modela, kao što je stehiometrijski model autokatalator [55, 59, 62, 63] (u kojem je broj nezavisnih intermedijera $n = 2$), može se izvesti bez ozbiljnijih poteškoća primenom opisanog postupka analize

dinamičke stabilnosti sistema diferencijalnih jednačina na bazi određivanjem karaktera i znaka svojstvenih vrednosti karakterističnog polinoma sistema. Međutim, svojstveni problem odn. rešavanje karakterističnog polinoma (jed. 1.2.8) nema u opštem slučaju analitičko rešenje za $n > 4$, a i u slučajevima kada je $n = 3$ ili $n = 4$, polinom je teško rešiv. Stoga je analiza stabilnosti na način koji je do sada izložena, u znatnoj meri ograničena, s obzirom na to da su realni dinamički sistemi (mnogi fizički, hemijski, fizičkohemijski, a praktično svi biološki i društveni sistemi) po pravilu multidimenzionalni (sa $n > 2$). Kako bi se omogućila analiza stabilnosti tako složenih sistema, razvijeno je više matematičkih metoda [64-71]. Zbog svoje opštosti i efikasnosti, istaknuto mesto u određivanju stabilnosti kompleksnih reakcionih sistema zauzima analiza stehiometrijskih mreža (eng. stoichiometric network analysis, SNA) [49, 51, 52, 72, 73]. SNA predstavlja matematičku metodu koja omogućava analizu lokalne stabilnosti neravnotežnih stacionarnih stanja reakcionih sistema odn. mreža reakcija sa definisanom stehiometrijom proizvoljne dimenzije. Zbog navedenih kvaliteta metod SNA je primenjen u ovoj tezi radi određivanja stabilnosti stehiometrijskih modela HPA sistema. Glavni principi metode analize stehiometrijskih mreža i postupak njenog sprovođenja objašnjeni su u poglavlju 2.2.

1.3 Hipotalamo-hipofizno adrenalni (HPA) sistem (osa)

Hipotalamo-hipofizno-adrenalni (eng. hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) sistem (osa) predstavlja složen neuroendokrini sistem koji učestvuje u održavanju homeostaze organizma u uslovima bazalne fiziologije i uslovima raznih tipova stresa [1-3].

Pod homeostazom se podrazumeva optimalno dinamičko stanje celog organizma koje se u živim sistemima realizuje kada se sistem nalazi u stanju udaljenom od termodinamičke ravnoteže. Ovo stanje se nalazi pod stalnim uticajima unutrašnjih i spoljnjih faktora (perturbatora), poznatih u tim sistemima pod zajedničkim imenom *stresori* [74]. Živa bića poseduju različite reakcije kojima se odupiru dejstvu stresora, i koji im omogućava ponovno uspostavljanje homeostaze i/ili zaštitu od njenog narušavanja. Ove reakcije, poznate kao adaptivni odgovori organizma, obuhvataju ogroman broj veoma složenih, kako fizioloških, tako i mentalnih procesa. Pored HPA

sistema, u organizmu postoji još jedan sistema zadužen za formulisanje adaptivnog odgovora na stresore. To je tzv. *locus caeruleus*-adrenergički (norepinefrinergički) (LC/NE) autonomni simpatički sistem (LC-NE/simpatički sistem) [3, 74]. Ova dva sistema čine dve grane jedinstvenog sistema za regulaciju stresa.

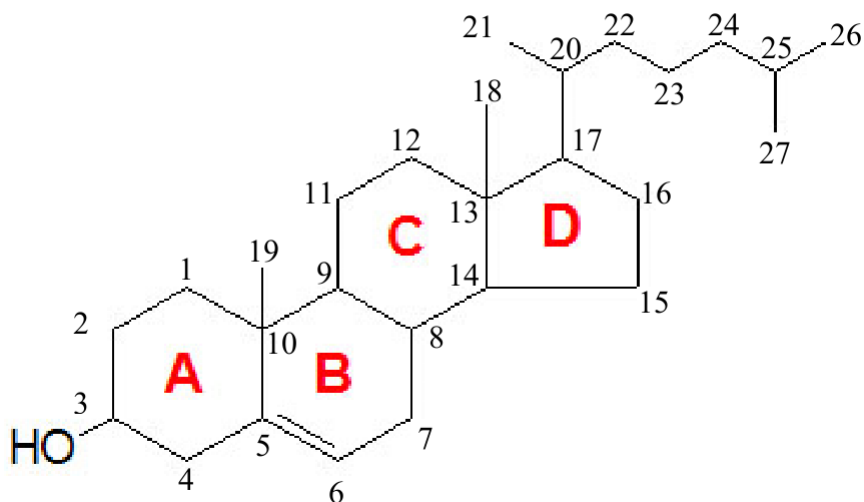
Glavne anatomske komponente HPA sistema su [2]:

- 1) hipotalamus, u čijem se paraventrikularnom jedru sintetiše i luči kortikotropin relaksirajući hormon (faktor) CRH (CRF) (eng. corticotropin releasing hormone (factor)) i arginin vazopresin (AVP);
- 2) prednji režanj (lat. *lobus anterior*) hipofize, čije ćelije izlučuju i sintetišu adrenokortikotropni hormon ACTH (eng. adrenocorticotrop hormone);
- 3) nadbubrežne (adrenalne) žlezde (lat. *glandulae adrenales*), u čijoj kori (korteksu) se proizvode i luče glukokortikoidi, mineralokortikoidi, a u manjoj meri i drugi steroidni hormoni.

1.3.1 Steroidni hormoni

Steroidi, pored terpena i prostaglandina, predstavljaju članove grupe prostih lipida [75]. Oni su derivati ciklopentanoperhidrofenantrena, molekula od 17 C atoma, sastavljenog od 3 šestočlana (A, B i C) i jednog petočlanog prstena (D). Svi steroidi vode poreklo od linearnog triterpena skvalena.

Može se razlikovati veliki broj steroida prema broju i poziciji dvostrukih veza i supstitenata na njima. Najčešća mesta supstitucije su C₃ atom na A prstenu, C₁₁ na C prstenu i C₁₇ atom na D prstenu [2, 75].



Slika 1.3.1. Hemijska formula holesterola. Brojevi označavaju položaje C-atoma. [76]

Najrasprostranjeniji steroid je holesterol (slika 1.3.1). Posедуje 27 C atoma i svrstava se u grupu sterola, steroidnih alkohola, koji na C₃ atomu A prstena poseduju OH-grupu, a na C₁₇- atomu D prstena alifatični lanac od 8 ili više C- atoma. Holesterol je jedna od osnovnih komponenti ćelijskih membrana, a prisutan je i u membranama organela. Zbog posedovanja dvostruke veze između C₅- i C₆- atoma na B prstenu, onemogućena je rotacija oko C₅-C₆ veze, pa holesterol poseduje značajnu čvrstoću, čineći membrane dovoljno čvrstim za obavljanje njihovih funkcija.

Holesterol je prekursor velikog broja jedinjenja, od kojih su u animalnim ćelijama najvažnije žučne kiseline, vitamin D i steroidni hormoni.

Steroidni hormoni se svrstavaju u pet kategorija [75]:

- 1) glukokortikoidi
- 2) mineralokortikoidi
- 3) progestini
- 4) estrogeni i
- 5) androgeni.

Glukokortikoidi, mineralokortikoidi i progestini sadrže po 21 C-atoma, androgeni po 19 C-atoma, a estrogeni po 18 C-atoma. Pored toga što imaju po 18 C-atoma, zajedničko hemijsko svojstvo estrogena je posedovanje aromatičnog A prstena. Glavni predstavnici glukokortikoida su kortizol (dominantni glukokortikoid kod ljudi) i

kortikosteron (dominantni glukokortikoid kod glodara), glavni predstavnik mineralokortikoida je aldosteron, dok su biološki najznačajniji progestini progesteron i 17- α -hidroksiprogesteron. Od estrogena (ženskih polnih hormona) najzastupljeniji su estradiol-17 β (E₂), estron i estriol, dok su glavni predstavnici androgena (muških polnih hormona) testosteron, dehidroepiandrosteron (DHEA) i DHEA-sulfat (DHEAS) i androstendion.

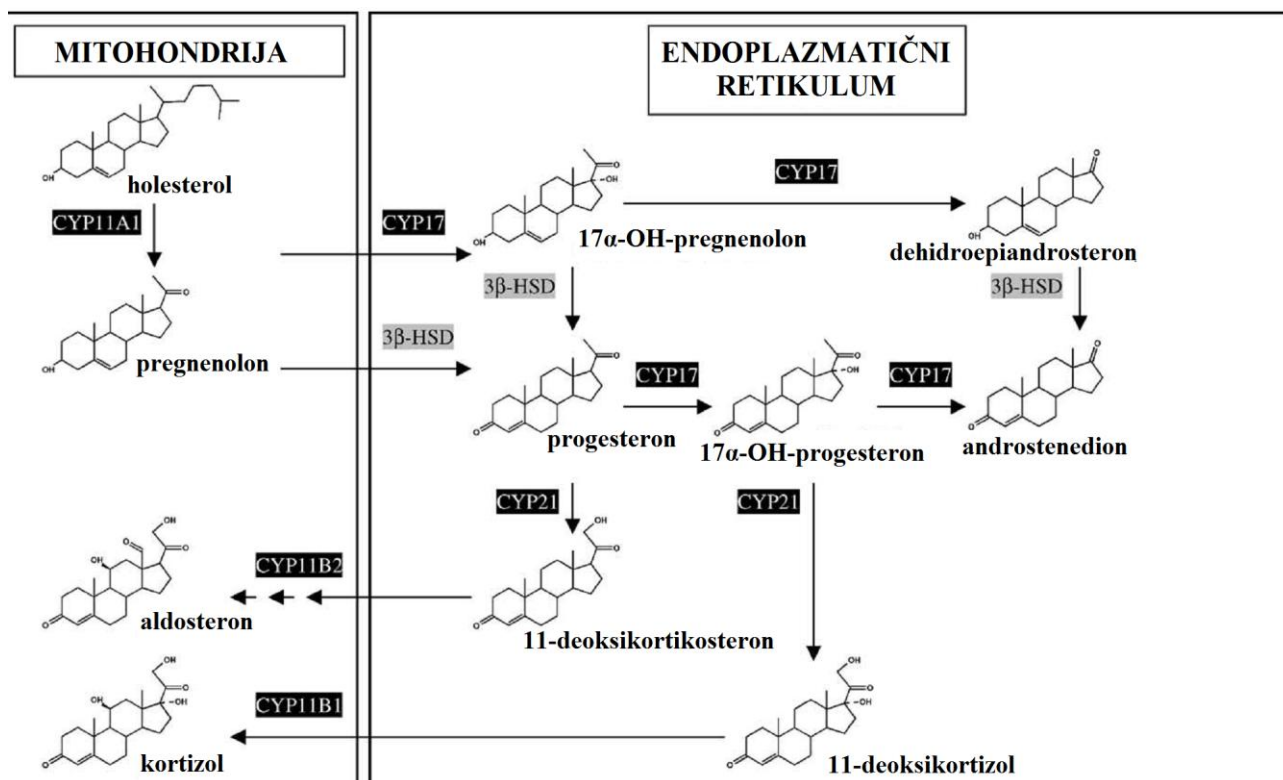
1.3.2 Adrenalna steroidogeneza

Adrenalna steroidogeneza predstavlja kompleksan multienzimski metabolički proces biosinteze steroidnih hormona u kori (korteksu) nadbubrežnih (adrenalnih) žlezda [2, 77, 78]. Polazni prekursor svih steroidnih hormona je holesterol, te je njegovo dopremanje do steroidogenih ćelija važan preduslov za regularno odvijanje procesa steroidogeneze. U takvom, širem smislu [78], adrenalna steroidogeneza obuhvata nekoliko potprocesa: (1) ulazak (influks) holesterola u steroidogene ćelije kore nadbubrežne žlezde i njegovo skladištenje u odgovarajuće ćelijske depoe (npr. masne kapljice) [77-79]; (2) mobilizaciju holesterola iz ćelijskih depoa, transport holesterola do spoljnje membrane mitohondrija i prenošenje holesterola sa spoljnje na unutrašnju membranu mitohondrija [77-79]; (3) niz biohemijskih konverzija holesterola dopremljenog do unutrašnje membrane mitohondrija do odgovarajućih steroidnih hormona [77]. Početni stupanj ovog procesa obuhvata složenu reakciju u kojoj se holesterol transformiše do pregnenolona. Ova složena reakcija ujedno predstavlja i najsporiji stupanj biosinteze steroidnih hormona. Sve reakcije u procesu adrenalne steroidogeneze katalizovane su i regulisane od strane odgovarajućih enzima, kofaktora i genske mašinerije koja ih kodira. Koji steroidni hormoni će biti proizvedeni i sekretovani iz koje histološke zone adrenalnog korteksa zavisi upravo od toga koje vrste enzima su najzastupljenije i biološki najaktivnije u ćelijama koje čine datu histološku zonu. U zoni fascikulati prevladava biosinteza i sekrecija kortizola (kod čoveka) odn. kortikosterona (kod pacova), u zoni glomerulozi aldosterona, dok se u zoni retikularis, u određenom opsegu, odvija biosinteza i sekrecija muških (androgenih) polnih hormona,

pre svega dehidroepiandrosterona (DHEA) i DHEA-sulfata (DHEAS), manja količina androstenediona i, u mnogo manjoj meri, testosterona [77].

Osim u adrenalnom korteksu, intenzivna steroidogeneza se odvija i u drugim tkivima i organima: u Leydig-ovim ćelijama testisa, u ćelijama teke i granuloze ovarijama, sinciciotrofoblastnim ćelijama placente (posteljice) [77]. Osim toga, potvrđeno je da se steroidogeneza odvija u mozgu i drugim delovima nervnog sistema glodara, a najverovatnije i ljudi; glavni steroidni hormoni koji se proizvode u nervnom sistemu su DHEA, DHEAS, progesteron i njegov derivat Allo [77].

Na slici 1.3.2 prikazan je metabolički put biosinteze adrenalnih steroidnih hormona. Kako je istaknuto, početni i najsporiji stupanj ovog procesa predstavlja konverziju holesterola do pregnenolona. Ovaj proces je regulisan od strane ACTH, koji vezivanjem za svoj receptor (melanokortin tip II receptor (MC2R)) na plazma membrani steroidogenih ćelija kore nadbubrežnih žlezda, pokreće metabolički put cikličnog adenzin-monofosfata (cAMP). Aktivacija cAMP puta dovodi do niza potprocesa [80-82] kojima se obezbeđuje dopremanje holesterola i dejstvo enzima CYP11A1 (P450_{sc}, dezmolaza) na unutrašnjoj strani mitohondrijalne membrane. Ovaj enzim katalizuje proces uklanjanja alifatičnog lanca sastavljenog od 6 C-atoma na C₁₇-atomu holesterola, pri čime nastaje pregnenolon. To se postiže hidroksilacijom, prvo C₂₀-, a zatim C₂₂- atoma, kako bi došlo do raskidanja veze između ova dva C-atoma [2, 77].



Slika 1.3.2. Biosinteza glukokortikoida i mineralokortikoida u organelama steroidogenih ćelija kore nadbubrežnih žlezda. Na strelicama hemijskih jednačina prikazan je odgovarajući enzim koji katalizuje datu reakciju. [83]

Zatim se proces biosinteze iz mitohondrija izmešta i nastavlja u endoplazmatičnom retikulumu, gde pregnenolon učestvuje u dvema paralelnim reakcijama [77, 83]. U jednoj od njih, enzim CYP17 (steroid C₁₇ hidroksilaza) katalizuje uvođenje OH-grupe u α –položaj na C₁₇-atomu pregnenolona, pri čemu nastaje 17α-OH-pregnenolon. Nakon toga isti enzim uklanja preostala 2 C-toma (C₂₀ i C₂₁) na C₁₇, i vrši oksidaciju C₁₇- atoma, formirajući na njemu keto-grupu. Time nastaje dehidroepiandrosteron (DHEA). U narednom koraku enzim 3β-HSD (3β-hidroksisteroid dehidrogenaza) katalizuje oksidaciju 3'-OH grupe u 3'- keto grupu molekula DHEA, uz istovremenu izomerizaciju Δ⁵ dvostruke veze u B prstenu (dvostruka veza između C₅ - i C₆ – atoma) u Δ⁴ dvostruku vezu (dvostruka veza između C₄ - i C₅ – atoma) u A prstenu, dajući kao proizvod androstenedion [2, 75, 77, 83].

U drugoj paralelnoj reakciji, od pregnenolona nastaje novi intermedijer progesteron. U ovom koraku enzim 3β- HSD, slično kao i pri katalizi DHEA od strane ovog enzima, katalizuje oksidaciju 3'-OH grupe u 3'- keto grupu uz istovremenu izomerizaciju Δ⁵ dvostruke veze u Δ⁴ dvostruku vezu, čime je dvostruka veza iz B

prstena izmeštena u A prsten. Progesteron je zajednički prekursor glukokortikoida, mineralokortikoida, androgena i estrogena. On podleže dvema paralelnim reakcijama, od kojih jedna čini početak račve za biosintezu aldosterona, dok se preko druge odvija sinteza kortizola sa jedne strane, a androgena i estrogena sa druge [2, 75, 77, 83].

U račvi koja predstavlja put biosinteze aldosterona, od progesterona posredstvom enzima CYP21 (steroid 21 hidroksilaze) na C₂₁- atom uvodi se OH- grupa i nastaje 11- deoksikortikosteron. Zatim enzim CYP11B1 (steroid C₁₁ β hidroksilaza) katalizuje uvođenje OH-grupe u β- položaj na C₁₁- atomu 11- deoksikortikosterona, pri čemu nastaje kortikosteron. Kod glodara, kortikosteron predstavlja glavni hormon sa glukokortikoidnim dejstvom. Konačno, enzim CYP11B2 u mitohondrijama katalizuje uvođenje OH-grupe na C₁₈-atom kortikosterona pri čemu nastaje 18-OH-kortikosteron, u kom se pod dejstvom istog enzima vrši oksidacija 18'- OH grupe 18-OH-kortikosterona u aldehidnu grupu, čime nastaje aldosteron [2, 75, 77, 83].

U drugoj paralelnoj reakciji progesterona, dejstvom enzima CYP17 uvodi se OH-grupa u α-položaj na C₁₇-atomu progesterona. Tako nastaje 17α-hidroksiprogesteron, koje daje dve grane. U jednoj grani, enzim CYP21 omogućava uvođenje OH- grupe na C₂₁- atom 17α- OH-progesterona. Time se formira 11-deoksikortizol koji se iz endoplazmatičnog retikuluma premešta do mitohondrije, gde enzim CYP11B1 katalizuje uvođenje OH-grupe u β- položaj na C₁₁- atomu 11-deoksikortizola, čime nastaje kortizol [2, 75, 77, 83].

1.3.3 Regulacija aktivnosti HPA sistema

Pravilno funkcionisanja HPA sistema podrazumeva usklađivanje rada pojedinih anatomsko-fizioloških komponenti ovog sistema sa promenama koje se dešavaju u unutrašnjoj i spoljnoj sredini organizma. Da bi se to realizovalo, u organizmu treba da bude uspostavljen precizan prenos i obrada različitih spoljnjih i unutrašnjih informacija kako bi se obezbedila adekvatna (re)akcija organizma. Ovi složeni procesi odvijaju se posredstvom određenih komponenti nervnog sistema i hormona koji učestvuju u regulaciji HPA ose. Kod čoveka, glavni hormoni uključeni u fiziologiju HPA sistema su CRH i AVP, ACTH, kortizol, i aldosteron.

CRH (ili CRF) predstavlja peptid sastavljen od 41 aminokiseline [84]. Glavno mesto njegove sinteze predstavljaju neuroni medijalnog parvocelularnog dela PVN hipotalamusa, ali nastaje i na drugim mestima u centralnom nervnom sistemu (CNS) (npr. olfaktorni bulbus, medijalna preoptička regija hipotalamusa, bazalno jedro *stria-terminalis*), kao i na periferiji (npr. nadbubrežne žlezde, testisi, placenta). Pored CRH, relativno skoro su otkrivena još tri člana iz porodice CRH peptida: urokortin (Ucn 1), Ucn 2 (eng. stresscopin related- peptide) i streskopin (eng. stresscopin). Preko tzv. hipotalamo-hipofiznih portalnih krvnih sudova CRH dospeva iz hipotalamusa u hipofizu, gde obavlja ulogu glavnog regulatora sekrecije ACTH iz kortikalnih ćelija prednjeg režnja hipofize. Pored ove primarne uloge, CRH učestvuje u regulaciji autonomnog nervnog sistema, procesima učenja i pamćenja, nagona za ishranom i reprodukcijom. Postoje dva tipa CRH receptora [85, 86]: CRH-R1 (dominantni receptor u CNS-u) i CRH-R2 (prisutan gotovo isključivo u perifernim tkivima). Vezivanjem CRH za CRH-R1 kortikotropnih ćelija hipofize pokreće se sistem preko sekundarnog glasnika cAMP i indukuje nastajanje i izlučivanje ACTH.

Arginin vazopresin (AVP) je nonapeptid koji pokazuje visoku ekspresiju u PVN-u, supraoptičkom (lat. *nucleus supraopticus*) i suprahijazmatičnom jedru (lat. *nucleus suprahypophysialis*) hipotalamusa. Magnocelularni neuroni PVN i supraoptičkog jedra se projektuju do zadnjeg režnja hipofize, odakle se AVP direktno izlučuje u globalni krvotok, i učestvuje u održavanju homeostaze osmotskog pritiska. Sa druge strane, parvocelularni neuroni PVN-a sintetišu i sekretuju AVP u hipotalamo-hipofizne portalne sudove, preko kojih u prednjem režnju hipofize AVP stimuliše lučenje ACTH. Agonističko (stimulatorno) dejstvo AVP na sekreciju ACTH u hipofizi ostvaruje se preko vazopresinskog receptora V_{1b} (sinonim je i V_3) na ćelijskim membranama kortikotropnih ćelija prednjeg režnja hipofize. Vezivanjem AVP za V_{1b} aktivira se fosfolipaza sprežanjem sa Gq proteinima. Ovako aktivirana fosfolipaza C stimuliše protein kinazu C (PKC), pojačavajući lučenje ACTH [85, 86].

Kao što je istaknuto, CRH i AVP, delujući na kortikotrofne ćelije prednjeg režnja hipofize, indirektno regulišu sintezu i sekreciju ACTH. Naime, ova dva hormona direktno učestvuju u regulaciji sinteze i sekrecije pro-opiomelanokortina (eng. pro-opiomelanocortin, POMC), koji se izlučuje u globalni krvotok. Nakon metaboličke obrade, od POMC-a nastaje ACTH, kao i nekoliko drugih bioaktivnih peptida: β -

endorfin, β -lipotropni hormon i melanokortini. ACTH putem globalne cirkulacije dospeva do kore nadbubrežnih žlezda, gde se vezuje za svoj M2CR receptor, lokalizovan na plazma membrani steroidigenih ćelija korteksa nadbubrežnih žlezda. Kako je istaknuto, vezivanjem za M2CR, ACTH indukuje sintezu i sekreciju glukokortikoida, kao i mineralokortikoida, iz odgovarajućih histoloških zona kore nadbubrežnih žlezda aktivacijom niza sukcesivnih reakcija u okviru puta sekundarnog glasnika cAMP. Produkcija glukokortikoida se odvija u histološkoj zoni kore nadbubrežnih žlezda označenoj kao *zona fasciculata*.

Glukokortikoidi predstavljaju glavne efektorne hormone HPA sistema, koji ispoljavaju uticaj na većinu organa i fizioloških sistema u organizmu. Kod čoveka, glavni glukokortikoid je kortizol (sinonim hidrokortizon), koji vrši najveći deo svih funkcija koje kod ljudi ostvaruju glukokortikoidi. Pored njega, značajnije glukokortikoidno dejstvo ostvaruje kortikosteron, jedan od intermedijera u sintezi aldosterona. Kod glodara, kortikosteron vrši najveći deo svih glukokortikoidnih funkcija. Po dospevanju u sistemsku cirkulaciju, oko 90 – 97 % kortizola se vezuje za transportne proteine krvne plazme, za kortizol-vezujući globulin (eng. cortisol binding globulin, CBG) ili za albumin, i u takvom, vezanom obliku biva transportovan putem krvi do ciljnih tkiva, dok preostali deo kortizola ostaje u slobodnom (nevezanom) obliku.

U najvažnije funkcije koje ostvaruju glukokortikoidi spadaju [2, 87]:

1) *Uticaj na metabolizam ugljenih hidrata*

To podrazumeva stimulaciju glukoneogeneze tj. metaboličkih puteva stvaranja (katabolizma) glukoze u organizmu, kao i umereno smanjenje korišćenja glukoze u ćelijama celog organizma; posledica ova dva efekta je porast koncentracije glukoze u krvi.

2) *Uticaj na metabolizam proteina*

Ovaj uticaj podrazumeva smanjivanje zaliha proteina u skoro svim ćelijama u organizmu, osim u ćelijama jetre; povećanje količine proteina u jetri i krvnoj plazmi; porast nivoa aminokiselina u krvi, smanjenje transporta aminokiselina u ekstrahepatičnim ćelijama i povećanje njihovog transporta u ćelije jetre. U vezi sa ovim uticajem kortizola, smatra se da se većina njegovih metaboličkih

dejtava u organizmu ostvaruje zahvaljujući njegovom svojstvu mobilizacije aminokiselina iz ekstrahepatičnih tkiva u jetru, što omogućava povećanu sintezu enzima u ćelijama jetre, neophodnih za obavljanje njenih funkcija. Bitne efekti koji se pod uticajem kortizola događaju u jetri su: a) povećan obim deaminacije aminokiselina, b) povećana sinteza proteina, c) povećano stvaranja proteina krvne plazme i d) podsticanje glukoneogeneze.

3) *Uticaj na metabolizam masti*

Glukokortikoidi podstiču mobilizaciju masnih kiselina iz adipoznog (masnog) tkiva, usled čega se povećava koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvnoj plazmi, a time i mogućnost dobijanja energije, pre svega neophodne za adekvatno dejstvo HPA sistema u različitim stresnim okolnostima.

4) *Antiinflamatorno (antizapaljensko) dejstvo*

Glukokortikoidi blokiraju započinjanje ranih stadijuma inflamatornih procesa, a u slučajevima kada je inflamatorni proces, usled delovanja snažnog induktionog agensa, ipak započeo, kortizol utiče na brzo povlačenje zapaljenja. Navedena dejstva odvijaju se pre svega zahvaljući uticaju koje glukokortikoidi vrše na membranu lizozoma (ćelijske organele koje poseduju razne vrste litičkih enzima). Glukokortikoidi dovode do stabilizacije membrane lizozoma, otežavajući njeno prskanje. Time se smanjuje mogućnost izlivanja proteolitičkih enzima, najčešćih uzročnika zapaljenja.

5) *Uticaj na kardiovaskularni sistem*

6) *Uticaj na zapreminu tečnosti u organizmu usled hemoragije (krvarenja)*

7) *Uticaj na nervni sistem i ponašanje*

8) *Uticaj na reproduktivni sistem.*

Zahvaljujući svom imunosupresorskom i anti-inflamatornom efektu, sintetički glukokortikoidi se standardno koriste kao medikamenti u značajnom broju oboljenja i kliničkih stanja, kao što su [46, 88]: artritis, alergijske reakcije, bronhijalna astma, poremećaji kože, neki maligniteti, gastrointestinalni poremećaji, bolesti očiju, poremećaji vezani za kolagen u vaskularnom tkivu, Adisonova bolest, kao sredstvo protiv odbacivanja u transplantacijama tkiva i organa i drugo.

Kao što je istaknuto, osim glukokortikoida, u adrenalnom korteksu se odvija i produkcija mineralokortikoida, čiji glavni predstavnik predstavlja aldosteron. Biosinteza

aldosterona se odvija u ćelijama korteksa adrenalnih žlezda smeštenih u histološkoj zoni kore nadbubrega označenoj kao *zona glomerulosa*. Biosintezu aldosterona reguliše renin-angiotenzinski sistema, K^+ -joni, a takođe i ACTH posredstvom već navedenog cAMP puta [89]. Osnovna funkcija aldosterona je održavanje homeostaze i osmotskog pritiska reapsorpcijom Na^+ , Cl^- i HCO_3^- jona, i izlučivanje K^+ i Na^+ jona u distalnim tubulima bubrega [2].

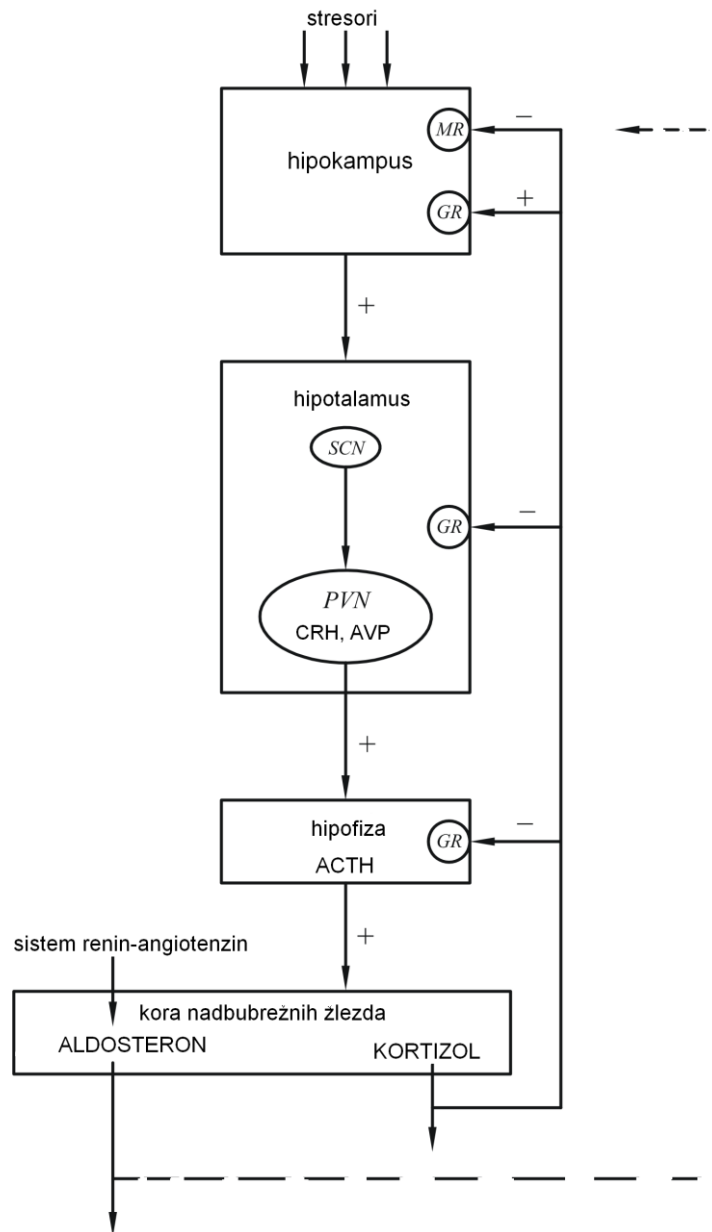
Glukokortikoidi i mineralokortikoidi ostvaruju fiziološke funkcije vezivanjem za svoje nuklearne receptore, glukokortikoidne (GR) i mineralokortikoidne receptore (MR). GR su rasprostranjeni u većini tkiva u organizmu [90], dok MR imaju lokalizovanije prisustvo, u bubrezima, epitelijalnom i neepitelijalnom tkivu kardiovaskularnog sistema, strukturama mozga (kao što je hipokampus) i drugim tkivima i organima [91]. U svom neaktivnom obliku, pre vezivanja sa glukokortikoidima, GR se nalaze u multiproteinskom kompleksu sa više vrsta proteina toplotnog šoka (eng. heat shock proteins, HSP). Asocijacija sa ligandom (glukokortikoidom) izaziva konformacijske promene koje dovode do disocijacije receptora iz multikompleksa sa HSP, i premeštanja izdvojenog kompleksa ligand-GR do jedra (nukleusa) ćelije. Vezivanjem za specifičnu sekvenciju na promotoru ciljnog gena, označenu kao GRE (eng. GR response element), posredstvom transkripcionih faktora, glukokortikoidi učestvuju u regulaciji ekspresije (aktivnosti) datog gena. Pored ovog glavnog načina dejstva, postoji i mogućnost regulacije genske ekspresije i bez učešća GRE, preko protein-protein interakcija sa transkripcionim faktorima kao što su aktivacioni protein 1 (AP-1) i nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) [86]. Analogni mehanizmi važe i za procese vezivanja liganada za MR.

Kortizol i kortikosteron imaju oko 10 puta veći afinitet vezivanja za MR nego za svoje prirodne receptore GR [92, 93]. Navedeni međuodnosi afiniteta vezivanja glukokortikoida i mineralokortikoida za GR odn. MR čine važan faktor u samoregulaciji HPA sistema, kako u uslovima bazalne fiziologije tako i tokom stresa [94, 95].

Samoregulacija HPA sistema ostvaruje se mehanizmom pozitivne i negativne povratne sprege (slika 1.3.3).

Može se smatrati da kortizol, kao glavni efektor HPA ose, u najvećoj meri reguliše aktivnost HPA sistema, odn. sopstvenu produkciju: sa porastom koncentracije kortizola, u bazalnim ili stresnim uslovima, raste inhibicija koju on vrši na hipofizu,

hipotalamus, ali i hipokampus (deo limbičkog sistema, koji, pored funkcija u formiranju memorije, ima važnu ulogu u regulaciji aktivnosti HPA ose) (slika 1.3.3). Kada inhibicija postane dovoljno velika, koncentracija kortizola počinje opadati, što, pak, slabi inhibiciju, ponovo pospešujući produkciju kortizola. Negativna povratna sprega putem kortizola (odn., u opštem slučaju, putem nekog glukokortikoida), može se ostvarivati na klasičan, genomski regulisan način preko GR i MR [96, 97], kao i putem bržeg, negenomskog mehanizma [9, 98, 99]. Glavni put kojim se u organizmu ostvaruje negativna povratna sprega u okviru HPA sistema odvija se preko GR. Kortizol se vezuje za GR, formirajući kompleks kortizol-GR, koji se vezuje za DNA na GRE promotora gena, regulišući tako transkripciju tog gena. Regulacija ekspresije ciljnih gena iziskuje izvesno vreme, pa se ovakva vrsta negativne povratne sprega predstavlja vremenski odloženu povratnu spregu. Kada je potrebna brza reakcija i supresija aktivnosti HPA sistema, u organizmu se može aktivirati negenomski mehanizam negativne povratne sprega koji ne uključuje regulaciju genske ekspresije.

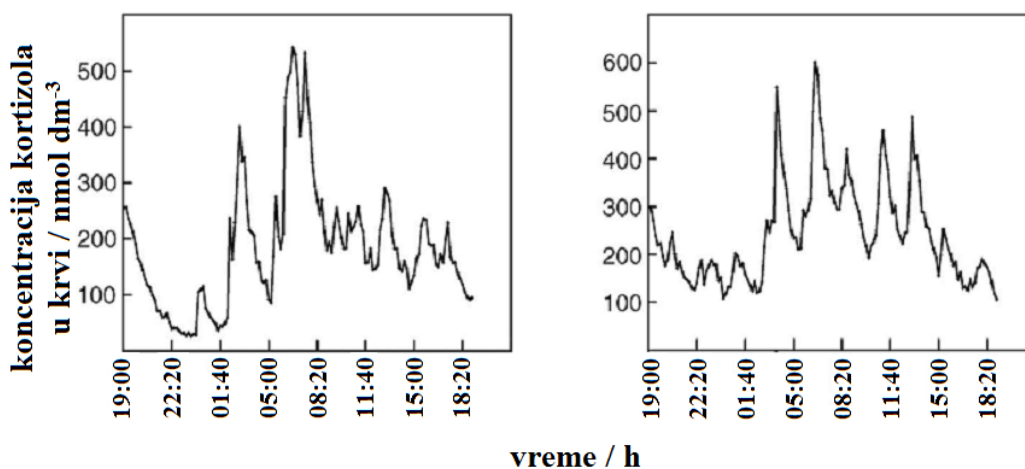


Slika 1.3.3. Povratne sprege u hipotalamo-hipofizno-adrenalnom sistemu. Kortikotropni oslobađajući hormon (CRH) i arginin-vazopresin (AVP) stimulišu lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz hipofize, koji stimuliše lučenje kortizola iz kore nadbubrežnih žlezda. Negativna povratna sprega kortizola ostvarena putem glukokortikoidnih receptora (GR) u hipotalamusu i hipofizi, kao i putem mineralokortikoidnih receptora (MR) u hipokampusu, odgovorna je za održavanje bazalne aktivnosti, kao i za okončavanje pojačane aktivnosti ovog sistema izazvane dejstvom stresora. Osim negativne, u sistemu postoji i pozitivna povratna sprega ostvarena putem GR u hipokampusu, kojom kortizol pojačava sintezu CRH. Kao kompetitivni antagonista kortizola pri vezivanju za MR u hipokampusu, aldosteron takođe reguliše aktivnost HPA sistema (isprekidana strelica). [16, 17]

Pozitivna povratna sprega u HPA sistemu je kasnije uočena. Smatra se da je izazvana, pod stresnim uslovima, porastom koncentracije ACTH, koja utiče na još brži porast koncentracije kortizola [100]. Iako detalji mehanizma kojim se pozitivna sprega realizuje nije dovoljno poznat, pretpostavlja se da važnu ulogu u ovom procesu čini aktivacija hipokampalnih GR [101, 102].

1.3.4 Oscilatorna dinamika HPA sistema

Navedeni mehanizmi negativne i pozitivne povratne sprege omogućuju da koncentracije hormona HPA sistema u krvi ispoljavaju oscilatornu dinamiku. Koncentracija kortizola u plazmi krvi pokazuje složenu oscilatornu vremensku evoluciju, gde su unutardnevne oscilacije superponirane na dnevne oscilacije koncentracije kortizola (slika 1.3.4) [2, 103].



Slika 1.3.4. Vremenske serije koncentracije kortizola merene u plazmi krvi dva zdrava muškarca. Grafici prikazuju složenu oscilatornu dinamiku koncentracije kortizola, u kojoj su dnevne oscilacije spregnute sa unutardnevnim. Uzimanje uzoraka krvi za određivanje koncentracije kortizola vršeno je automatski, na svakih 10 minuta, pomoću tzv. automatizovanog sistema za brzo uzorkovanje krvi kod ljudi. [103].

Dnevne oscilacije koncentracije kortizola, kao i svi ostali dnevni ritmovi koji postoje u organizmu, generisani su od strane glavnog dnevnog sata, koji se nalazi u suprahijzmatičnom jedru prednjeg dela hipotalamusa [104-107]. Kao što o tome govori

njihovo ime, period dnevnih oscilacija iznosi približno 24 h. Smatra se da SCN generiše dnevni ritam prilično nezavisno od delovanja raznih spoljnjih faktora. Kod čoveka (kao biološke vrste aktivne u toku dana), uzlazna (ascendentna) faza dnevnog ritma koncentracije kortizola se odvija u toku noći (odgovara periodu neaktivnosti čoveka), dok silazna (descendentna) faza traje u toku dana (odgovara periodu aktivnosti čoveka). U toku noći amplitude unutardnevnih—oscilacija koncentracije kortizola pokazuju najmanje amplitude, a nivo kortizola dostiže svoju najnižu vrednost u toku jednog dvadesetčetvoročasovnog ciklusa. Kod većine ljudi dnevni minimum koncentracije kortizola javlja se između 22 h i 4 h ujutru [108]. Sa druge strane, u toku dnevnog perioda, unutardnevne oscilacije kortizola poseduju veće amplitude, a nivo kortizola dostiže maksimalnu vrednost ujutru, kod većine ljudi oko 8 h ujutru [2].

U novijim istraživanjima je pokazano da unutardnevne oscilacije koncentracije kortikosterona mogu postojati i onda kada je jedro SCN, kao glavni generator dnevnog ritma, pretrpelo značajna oštećenja [109]. Ti rezultati su ukazali na to da su unutardnevne oscilacije u HPA sistemu samoodržive, da nastaju zahvaljujući mehanizmima negativne i pozitivne povratne sprege na nivou hipofize i nadbubrežnih žleza, i da za njihovo odvijanje nisu neophodni ritmični signali iz viših nervnih centara (hipotalamusa). Kod čoveka, period unutardnevnih oscilacija koncentracije kortizola nalazi se u opsegu od 20-120 min [3, 4, 110].

Osim kortizola (odn. kortikosterona), i koncentracioni profili ACTH [103, 111] i aldosterona [112] mereni u plazmi krvi pokazuju složenu oscilatornu dinamiku, sa spregnutim unutardnevnim i dnevnim oscilacijama. Takođe, sekrecija CRH i AVP ima ritmični karakter, sa 1 – 3 sekretorna pulsa na svakih sat vremena [111, 113, 114].

1.4 Dosadašnji modeli HPA sistema

Modeli HPA sistema se mogu podeliti na nestehiometrijske ili stehiometrijske modele [17]. Važan aspekt ove podele je način na koji je postavljen sistem diferencijalnih jednačina koje opisuju dinamiku sistema, naročito način uvođenja nelineranih članovi koji u modelu opisuju mehanizme povratne sprege. Kod stehiometrijskih modela članovi koji formiraju sistem diferencijalnih jednačina logično i nužno slede iz

predloženog reakcionog mehanizma. Kod nestehiometrijskih modela to ne mora biti slučaj, već se članovi diferencijalnih jednačina, posebno oni nelinearni koji opisuju povrtane sprege (negativne ili pozitivne) u sistemu i obezbeđuju nestabilnost sistema, mogu uvoditi i *ad hoc*, u vidu pogodnih matematičkih funkcija, prema potrebama modeliranja. Odgovarajuće diferencijalne jednačine nestehiometrijskih modela često se ne mogu dobiti kao posledica bilo kojeg realnog reakcionog mehanizma koji bi obuhvatao set hemijskih reakcija koji se odigravaju u realnom sistemu [17].

Zbog ispoljavanja kompleksne evolucije u vidu dva tipa oscilacija, unutar dnevnih i dnevnih, sa jedne strane, i značaja koji ima za održavanje homeostaze i reakciju organizma na stresore, sa druge, u literaturi postoji veći broj modela HPA sistema. Skoro svi do sada predloženi modeli dinamike HPA sistema i sekrecije kortizola su nestehiometrijski i niskodimenzionalni odn. obuhvataju samo nekoliko vrsta HPA sistema za koje su autori modela smatrali da su od najveće važnosti za opis dinamike HPA sistema i za potrebe konkretnog cilja istraživanja. Osim toga, manji broj do sada objavljenih modela razmatra istovremeno i dnevnu i unutar dnevnu dinamiku HPA sistema.

U tekstu koji sledi, biće u kratkim crtama navedeni glavni predstavnici postojećih modela HPA sistema.

Autori Gonzalez-Heydrich i sar. (1999. g.) [32], Chakraborty i sar. (1999. g.) [33], Dokoumetzidis i sar. (2002. g.) [35] su razmatrali dinamiku koncentracije kortizola odn. dinamiku njegove sekrecije iz kore nadbubrežnih žlezda u sistemski krvotok pomoću jednodimenzionalnih modela, u kojima koncentracija kortizola predstavlja jedinu dinamičku promenljivu. Model formulisan od strane Chakraborty i sar. [33] simulira samo dnevne oscilacije koncentracije kortizola, dok modeli predloženi od strane Gonzalez-Heydrich i sar. [32] i Dokoumetzidis i sar. [35] mogu da opišu eksperimentalno dobijene vremenske serije koncentracije kortizola, u kojima su unutar dnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola.

Peters i sar. (2007. g.) [39] i Conrad i sar. (2009. g.) [42] su predložili dvodimenzionalne modele HPA sistema, gde su koncentracija ACTH i koncentracija kortizola dinamičke promenljive modela. U ovim modelima simulirani su dinamički odgovori HPA sistema na različite akutne i hronične perturbatore (npr. akutni pulsevi pomoću CRH, kontinuirana infuzija hidrokortizonom (vrsta sintetičkog

glukokortikoida)), dok osnovna (bazalna) oscilatorna dinamika koncentracije kortizola nije razmatrana.

Dinamika HPA sistema i izlučivanje (sekrecija) kortizola opisani su od strane autora Lenbury i Pacheenburawana (1991. g.) [30], Gonzalez-Heydrich i sar. (1994. g.) [31], Savić i Jelić (2005. g.) [37, 38], Bairagi i sar. (2008. g.) [15], McAuley i sar. (2009. g.) [41] pomoću trodimenzionalnih modela, koji kao dinamičke promenljive sadrže koncentracije CRH, ACTH i kortizola. Walker i sar. (2010) [29] su polazeći od četvorodimenzionalnog modela koji su predložili Gupta i sar. [40], formulisali trodimenzionalni model HPA sistema u kojem su koncentracije ACTH, kortizol i GR dinamičke promenljive, dok je uvedena aproksimacija da se koncentracija CRH može smatrati parametrom sistema. Koncentracija CRH u ovom modelu definisana je oblikom kosinusne funkcije koja opisuje periodičnu dinamiku sistema [29]. U modelu formulisanom od strane Gonzalez-Heydrich i sar. [31] nije razmatrana bazalna dinamika HPA sistema, već samo njegov dinamički odgovor na pulsne perturbacije pomoću CRH određene koncentracije. Modeli koje su predložili Savić i Jelić [37, 38] i McAuley i sar. [41] mogu opisati samo dnevnu evoluciju koncentracije kortizola, dok su modeli čiji su autori Lenbury i Pacheenburawana [26], Bairagi i sar. [15] i Walker i sar. [29] u stanju da simuliraju spregnute unutarnevne i dnevne oscilacije koncentracije kortizola.

Gupta i sar. [40] su predložili četvorodimenzionalni model, koji pored koncentracija CRH, ACTH i kortizola, kao četvrtu dinamičku promenljivu sadrži i koncentraciju slobodnih glukokortikodinih receptora (GR) u hipofizi. Ovaj model može da simulira spregnute dnevne i unutarnevne oscilacije koncentracije kortizola. Sriram i sar. (2012. g.) [43] su takođe postavili četvorodimenzionalni model u kojem, uz koncentraciju CRH, ACTH i kortizola, dodatnu dinamičku promenljivu predstavlja kompleks nastao vezivanjem kortizola za glukokortikodine receptore. Pomoću navedenog modela simulirana je samo dnevna dinamika koncentracije kortizola i drugih vrsta koje učestvuju u mehanizmu.

Liu i sar. (1999.) [34] i Kyrilov i sar. (2005. g.) [36] za opis dinamičkih stanja HPA sistema koriste petodimenzionalne modele, koji pored koncentracije CRH, ACTH i slobodnog kortizola (kortizol koji nije vezan za svoje proteinske transportere u krvi, albumin i kortizol vezujući globulin (CBG)), sadrži još i dva dodatna oblika kortizola čije su koncentracije nove dinamičke promenljive u modelima: jedna oblik je kortizol

vezan za albumin, dok je drugi oblik kortizol vezan za kortizol-vezujući globulin (CBG). Model predložen od strane Liu i sar. [34] može da opisuje samo unutardnevnu unutardnevnu oscilatornu dinamiku kortizola. U model predloženom od strane Korylov i sar. [36] dodata je kosinusna funkciju kao spoljni generator dnevnog ritma u modelu, što ima za posledicu da ovaj model simulira i unutardnevnu i dnevnu dinamiku kortizola.

Svega nekoliko modela HPA sistema [14, 23-25] sadrži koncentraciju holesterola kao dinamičku promenljivu, uprkos činjenici da je holesterol, kao jedini i glavni prekursor kortizola i svih ostalih steroidnih hormona, vrsta neophodna za regularno funkcionisanje HPA ose.

U modelu predloženom od strane Dempsher i sar. (1984) [14] detaljno je opisan proces adrenalne steroidogeneze, veoma složenog metaboličkog procesa konverzije holesterola do kortizola, aldosterona i drugih steroidnih hormona na nivou adrenalnih žlezda [2, 77]. Pored holesterola, ovaj model uključuje ACTH, kao i druge intermedijere uključene u proces biosinteze kortizola u adrenalnim žlezdama. Međutim, model ne sadrži CRH kao dinamičku promenljivu, zanemarujući na taj način uticaj viših neuroendokrinih signala iz hipotalamusa na produkciju kortizola. Model opisuje samo dnevne oscilacije u HPA sistemu uvođenjem fenomenološke konstante (diktira dnevni ritam uzimanjem ili jedne maksimalne ili jedne minimalne vrednosti u toku 24 h), dok unutardnevne oscilacije vrsta nisu razmatrane.

Model predložen od strane Hermann-Mayer i sar. [23] je u značajnom broju simulacija pokazao da može ponuditi prihvatljiva objašnjenja za međudejstvo HPA sistema i imunog sistema i njihov mogući značaj u nastanku reumatoidnog artritisa. Od ključnih vrsta HPA ose, ovaj nestehiometrijski model sadrži kortizol i holesterol kao jedne od vrsta čije su koncentracije dinamičke promenljive u modelu, dok CRH i ACTH nisu direktno uključeni u opis dinamike sistema. Kao i u slučaju prethodnog modela [14], ovaj model može da simulira samo dnevnu oscilatornu evoluciju, ali ne i unutardnevne oscilacije.

Detaljni model predložen od strane Breen i sar. (2010) [24] i njegova proširena verzija [25], razmatraju pitanje *in vitro* adrenalne steroidogeneze i sekrecije kortizola i drugih steroidnih hormona u cilju određivanja kinetičkih i transportnih parametara ovog metaboličkog procesa. U radu je testirana i mogućnost navedenog modela da

predvidi dinamički odgovor sistema na toksični uticaj endokrino aktivnog jedinjenja (metirapon), sposobnog da inhibira biosintezu adrenalnih steroidnih hormona. Model sadrži holesterol, kortizol i aldosteron, uključujući i intermedijere i druge adrenalne hormone u procesu konverzije holesterola do adrenalnih steroida kao dinamičke promenljive. Shodno cilju i težištu istraživanja, efekti viših sistemskih neuroendokrinih signala u regulaciji adrenalne steroidogeneze nisu razmatrani, pa su u modelima CRH i ACTH izostavljeni kao hemijske vrste. Osim toga, oba modela ne simuliraju niti dnevnu niti unutardnevnu oscilatornu dinamiku u okviru HPA sistema.

Svi prethodno navedeni modeli dinamike HPA sistema i sekrecije kortizola spadaju u grupu nestehiometrijskih modela.

Jedini do sada u literaturi poznat strogo stehiometrijski model aktivnosti HPA sistema objavili su Jelić i sar. (2005. g.) [16] (v. poglavlje 1.5). Pošto se, kako je ranije istaknuto, u stehiometrijskim modelima proširivanje i modifikovanje njihovih diferencijalnih jednačina novim članovima izvodi na jednostavan i prirodan način, u skladu sa predloženim mehanizmom modela, ovi modeli poseduju značajnu prednost nad nestehiometrijskim modelima pri ispitivanju dinamike složenih reakcionih sistema. To se odnosi i na modeliranje dinamičkih stanja složenih fizioloških sistema kao što je HPA osa, gde se poboljšanje modela u cilju što vernijeg opisa realnih procesa i njihovih predviđanja, može ostvariti postupnom evolucijom početnog stehiometrijskog modela. Iz navedenih razloga, modeliranje dinamičkih stanja HPA sistema koja mogu nastati u različitim fiziološkim i patofiziološkim uslovima, u ovom radu je bazirano na stehiometrijskom modelu HPA sistema predloženom od strane Jelić i sar. [16].

1.5 Osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 9 reakcija)

U ovoj disertaciji kao polazna osnova za modeliranje različitih dinamičkih stanja HPA sistema i koncentracije kortizola poslužio je stehiometrijski model aktivnosti HPA sistema predložen od strane Jelić i sar. (2005) [16]. U ovom tzv. *osnovnom modelu HPA sistema* (naziv koji će za ovaj model biti korišćen u ovoj disertaciji) hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa se posmatra kao jedan nelinearni reakcioni sistem koji regularno funkcioniše kada se nalazi u stanjima udaljenim od stanja termodinamičke

ravnoteže. Model pripada grupi konceptualnih modela [115], što znači da je mnoštvo reakcionih vrsta i interakcija među njima koje se odvijaju u realnom, živom sistemu, u modelu predstavljeno pomoću malog broja ključnih vrsta i reakcionih koraka potrebnih za opis dinamike HPA sistema. Osnovni model HPA sistema sadrži četiri takve ključne vrste: CRH, ACTH, kortizol i aldosteron. Ujedno, CRH, ACTH, kortizol i aldosteron su međusobno nezavisne intermedijerne vrste razmatranog modela, čije koncentracije u datom trenutku vremena, redom, $[CRH]$, $[ACTH]$, $[CORT]$ i $[ALDO]$, predstavljaju nezavisne dinamičke promenljive. U ovom modelu interakcije u okviru HPA sistema su predstavljene pomoću 9 reakcionih koraka, (R1), (R2),..., (R9) (tabela 1.1). Izrazi za brzine ovih reakcionih koraka, v_i ($i = 1, \dots, 9$), neposredno su izvedeni iz mehanizma predloženog stehiometrijskog modela prema zakonu o dejstvu masa (jed. (1.2.4)) (tabela 1.1).

U tekstu koji sledi, dati su opis i značenje pojedinačnih reakcionih koraka (R1) – (R9), čiji su detalji postavljanja i značenja izloženi u ref. [16].

Reakcijom (R1) opisuje se brzina nastajanja CRH iz paraventrikularnog jedra hipotalamusa (preko portalnog hipotalamo-hipofiznog lokalnog krvotoka) kada se sistem nalazi u osnovnom (bazalnom) stanju, drugim rečima, kada sistem nije perturbovan, odnosno kada nije izložen delovanju stresa. Smatra se da ovaj proces ima kinetiku nultog reda, sa brzinom koja ostaje konstantna za dato stanje HPA sistema. Promenom njene vrednosti (odn. vrednosti k_1), uspostavlja se novo stanje HPA sistema, što je iskorišćeno u ispitivanju uticaja hroničnog stresa na dinamiku HPA sistema (v. poglavlje 2.3.2).

U reakciji (R2) opisano je uvodjenje aldosterona u sistem pod kontrolom reninskog-angiotenzionskog sistema. Slično (R1), i ovaj reakcioni korak ima kinetiku nultog reda.

Treba istaći da konstante brzina k_0 i k_m u sebi sadrže koncentracije prekursora CRH i aldosterona, redom.

Reakcija (R3) opisuje lučenje ACTH u sistemsku cirkulaciju i njegovu ponovnu sintezu u hipofizi, procese stimulisane dejstvom CRH.

U reakcijama (R4) i (R5) opisuju se procesi adrenalne steroidogeneze i sekrecije u opšti krvotok kortizola i aldosterona, respektivno, iz korteksa adrenalne žlezde,

stimulacijom od strane hormona ACTH. Pretpostavljeno je da se ovi procesu mogu predstaviti reakcijama prvog reda.

Tabela 1.1. Osnovni model aktivnosti HPA sistema [16]. P_1 i P_2 označavaju produkte eliminacije ACTH i kortizola, respektivno. $M = \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

$\xrightarrow{k_0} \text{CRH}$	$v_1 = k_0$ $k_0 = 1,83 \cdot 10^{-8} \text{ M min}^{-1}$	(R1)
$\xrightarrow{k_m} \text{ALDO}$	$v_2 = k_m$ $k_m = 6,09 \cdot 10^{-11} \text{ M min}^{-1}$	(R2)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_1} \text{ACTH}$	$v_3 = k_1[\text{CRH}]$ $k_1 = 1,83 \text{ min}^{-1}$	(R3)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_2} \text{CORT}$	$v_4 = k_2[\text{ACTH}]$ $k_2 = 3,60 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R4)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_3} \text{ALDO}$	$v_5 = k_3[\text{ACTH}]$ $k_3 = 2,88 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	(R5)
$\text{ACTH} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_4} 3\text{CORT}$	$v_6 = k_4[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2$ $k_4 = 1,26 \cdot 10^{14} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-2}$	(R6)
$\text{ALDO} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_5} \text{CORT}$	$v_7 = k_5[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2$ $k_5 = 7,05 \cdot 10^{12} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-2}$	(R7)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_6} P_1$	$v_8 = k_6[\text{ACTH}]$ $k_6 = 5,35 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R8)
$\text{CORT} \xrightarrow{k_7} P_2$	$v_9 = k_7[\text{CORT}]$ $k_7 = 4,10 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R9)

Reakcija (R6) opisuje petlju pozitivne povratne sprege kortizola u HPA sistemu, uzimajući u obzir uočene stimulatorne efekte aktivacije hipokampalnih GR receptora od strane kortizola na njegovu sopstvenu produkciju. Aktivacijom hipokampalnih GR od strane kortizola stimuliše se nastajanje CRH, koji oslobadjanjem ACTH, preko niza medjufaza, konačno utiče na nastajanje kortizola. Pozitivna sprega kortizola je u modelu predstavljena u vidu kubne autokatalize kortizola sa ACTH.

U reakciji (R7) opisana je petlja negativne povratne sprege kortizola u HPA sistemu, uzimajući u obzir inhibitorne efekte kompetitivne aktivacije hipokampalnih MR receptora od strane aldosterone i kortizola, kao i aktivacije hipotalamusnih i hipofiznih GR receptora od strane kortizola na svoje sopstveno lučenje. Negativna sprema kortizola predstavljena je u modelu kvadratnim autoinhibicionim korakom kortizola sa aldosteronom.

Reakcioni koraci (R6) i (R7) predstavljaju „srce nestabilnosti“ modela, s obzirom na to da definišu dinamiku modela [16]. Oni omogućuju da model može simulirati unutardnevnu oscilatornu evoluciju HPA sistema. Treba istaći da su reakcije pozitivne i negativne sprege kortizola, (R6) odn. (R7), bazirane na eksperimentalno uočenim efektima aktivacije odgovarajućih GR i MR receptora od strane kortizola (i aldosterona) na sekreciju i sintezu kortizola [101, 116-118], kojima se obezbeđuje samoregulacija unutar HPA sistema. Međutim, zbog jednostavnosti i konceptualne prirode modela čiji je osnovni cilj simulacija dinamike HPA sistema, ovi receptori nisu uvršćeni u model eksplicitno, kao nezavisne vrste, već implicitno, u okviru konstanti brzina reakcija (R6) i (R7) (k_6 odn. k_7), pretpostavljajući da važi aproksimacija da se njihov broj odn. koncentracija ne menjaju sa vremenom.

Reakcioni korak (R8) opisuje proces eliminacije odn. izlaza ACTH iz sistema i opisan je kinetikom prvog reda.

Reakcioni korak (R9), prikazuje proces eliminacije odn. izlaza kortizola iz sistema, i takođe je opisan kinetikom prvog reda.

Korišćenjem izraza za pojedinačne reakcione stupnjeve, v_l ($l = 1, \dots, 9$) (tabela 1.1), može se shodno jednačini (1.2.3) definisati skup kinetičkih jednačina po nezavisnim intermedijerima modela, CRH, ACTH, aldosteronom i kortizolom, kojim se opisuje unutardnevna dinamika HPA sistema:

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_0 - k_1[\text{CRH}] \quad (1.5.1)$$

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_1[\text{CRH}] - (k_2 + k_3 + k_6)[\text{ACTH}] - k_4[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 \quad (1.5.2)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_m + k_3[\text{ACTH}] - k_5[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 \quad (1.5.3)$$

$$\frac{d[\text{CORT}]}{dt} = k_2[\text{ACTH}] + k_4[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_5[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_7[\text{CORT}]. \quad (1.5.4)$$

Numeričkom integracijom sistema diferencijalnih jednačina (1.5.1) – (1.5.4) dobijaju se njegova rešenja u vidu funkcija promene koncentracije ovih intermedijera u vremenu, odn. njihove vremenske serije.

Osnovni model HPA sistema za dati skup parametara (Tab. 1.1) može da simulira unutarnevnu oscilatornu evoluciju koncentracije kortizola (slika 1.5.1 a), kao i unutarnevnu dinamiku koncentracija ostalih intermedijera modela.

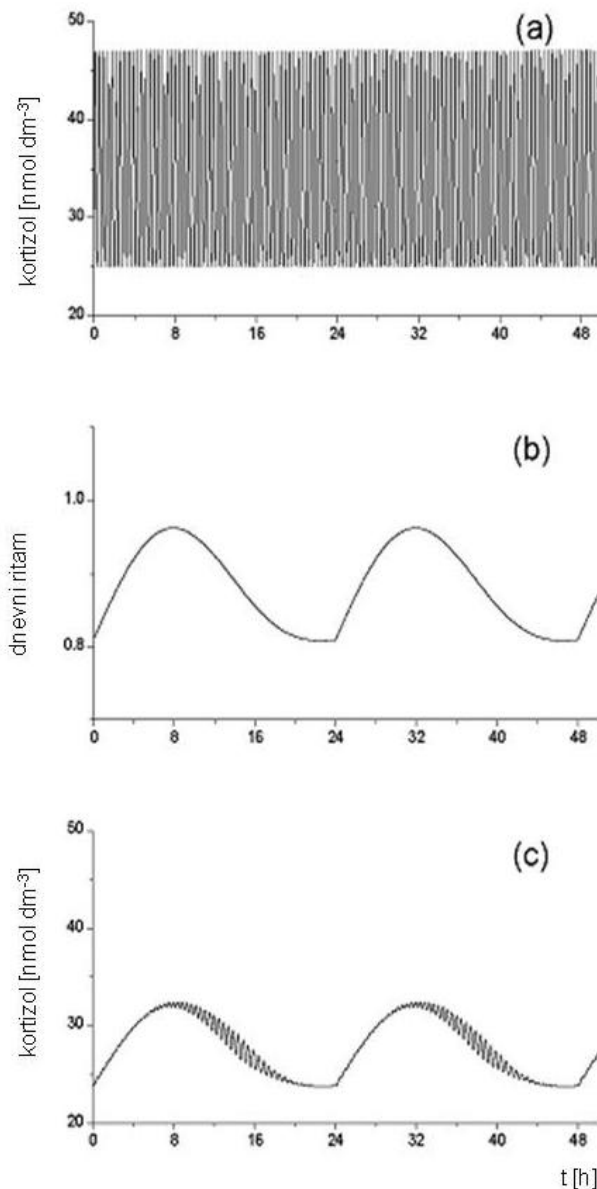
Da bi model uz unutarnevnu mogao da simulira i dnevnu dinamiku unutar HPA sistema, uvedena je periodična funkcija, dnevna funkcija D' ,

$$D' = 0,8095 + 0,061248 \cdot \sin(2\pi t/1440) + 0,11484 \cdot |\sin(\pi t/1440)|, \quad (1.5.5)$$

koja deluje kao spoljni oscilator koji moduliše unutarnevnu dinamiku koncentracija vrsta u modelu.

Ova funkcija ima period od 24 h, i simulira asimetriju u dvadesetčetvoročasovnom ritmu prosečnog čoveka, gde noćna faza (faza mirovanja) traje 8 sati, a dnevna faza (faza aktivnosti) traje preostalih 16 sati (slika 1.5.1 b). U modelu je uzeto da ova funkcija utiče na brzinu nastajanja CRH, transformišući je u periodičnu promenljivu zavisnu od vremena, prema izrazu $k_D(t) = k_0 \cdot D'$. Vremenske serije dobijene ovakvim sprežanjem sistema jednačina (1.5.1) – (1.5.5) pokazuju složenu oscilatornu evoluciju, gde su unutarnevne oscilacije superponirane na dnevne (slika 1.5.1 c), u skladu sa ponašanjem HPA sistema *in vivo*.

Dnevne oscilacije koncentracije CRH i dnevni ritam drugih vrsta u HPA sistemu modelirani su od strane drugih autora na sličan način, sprežanjem spoljnje periodične funkcije sa bazičnim modelom, s tom razlikom što različiti autori koriste različite oblike dnevnih funkcija [14, 30].

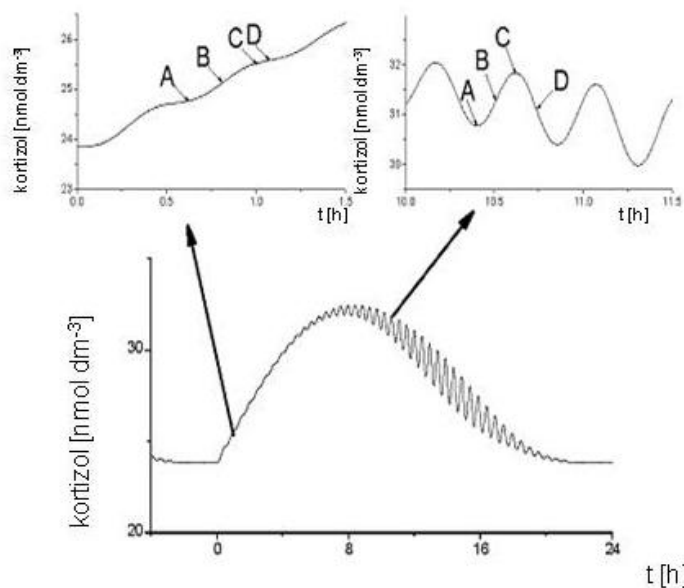


Slika 1.5.1. Numeričke simulacije vremenskih serija koncentracije kortizola pri osnovnim (bazalnim) uslovima. **(a)** Koncentracija kortizola ispoljava unutardnevnu oscilatornu dinamiku kada nema sprezanja modela sa dnevnom funkcijom D' . Početne vrednosti koncentracija CRH, ACTH, aldosterona i kortizola su, redom: $[CRH]_0 = 1,0 \cdot 10^{-8}$ M, $[ACTH]_0 = 1,0 \cdot 10^{-8}$ M, $[ALDO]_0 = 9,76 \cdot 10^{-9}$ M i $[CORT]_0 = 2,76 \cdot 10^{-8}$ M. **(b)** Vremenska evolucija dnevne funkcije D' . **(c)** U slučaju sprezanja sa D' , javljaju se složene oscilacije koncentracije kortizola, gde su unutardnevne oscilacije superponirane na dnevne oscilacije. Početne vrednosti koncentracija su: $[CRH]_0 = 8,09 \cdot 10^{-9}$ M, $[ACTH]_0 = 9,15 \cdot 10^{-8}$ M, $[ALDO]_0 = 2,03 \cdot 10^{-8}$ M, $[CORT]_0 = 2,38 \cdot 10^{-8}$ M. [17]

Pored mogućnosti da simulira ponašanje HPA sistema pod bazalnim uslovima, osnovni model HPA sistema može da opiše dinamički odgovor HPA sistema i u različitim uslovima stresa [17, 18]. Treba istaći da u preciznoj terminologiji stanje stresa

izazviju agensi označeni kao stresori. Slično tome, perturbacije sistema nastaju usled delovanja perturbatora. Rezultati numeričkih simulacija su pokazali da reakcija (odziv) HPA sistema u uslovima stresa zavisi kako od intenziteta perturbacije tako i od trenutka njegovog delovanja odn. od faze unutar dnevnih i dnevnih oscilacija. Ovde se pod datom fazom podrazumeva stanje unutar jednog oscilatornog perioda odnosno jedne oscilacije bilo da se radi o unutar dnevnoj ili dnevnoj oscilaciji. Posebno su ispitivana dinamička stanja sistema u kada su vršene perturbacije u minimumu oscilacije, njenom maksimum, uzlaznom delu oscilacije i prevojnim tačkama na uzlazna prevojna tačka (tačka na uzlaznom delu oscilacije između minima i maksimuma) i silazni deo oscilacije i silazna prevojna tačka (tačka na silaznom delu oscilacije između maksimuma i minima) (za dalje objašnjenje v. jed. (3.1.6)).

Prvo, model je pokazao da pri uslovima akutnog stresa, simuliranog u vidu akutnih perturbacija sistema pomoću [CRH], postoji značajna razlika u odgovoru sistema na akutni stres, izraženog kao promene u amplitudama oscilacija koncentracije kortizola, u zavisnosti od toga u kojoj fazi se nalazila unutar dnevna oscilacija koncentracije kortizola kada je perturbacija delovala (slika 1.5.2). Naime, perturbacija istog intenziteta izaziva povećanje relativne amplitde, A_{rel} (v. jed. (3.1.5)), unutar dnevni oscilacija [CORT] ukoliko deluje u minimumu (tačka A, slika 1.5.2), maksimumu (tačka C, slika 1.5.2) ili između maksimuma i prethodnog (levog) minimuma, u oblasti tzv. uzlazne prevojne tačke (tačka B, slika 1.5.2) unutar dnevne oscilacije [CORT] [17, 18]. Ako perturbacija istog intenziteta tj. iste koncentracije CRH ([CRH]) deluje u oblasti tzv. silazne prevojne tačke, između maksimuma i narednog (desnog) minimuma unutar dnevne oscilacije [CORT] (tačka D, slika 1.5.2), dolazi do smanjenja amplituda unutar dnevne oscilacija [CORT] [18].

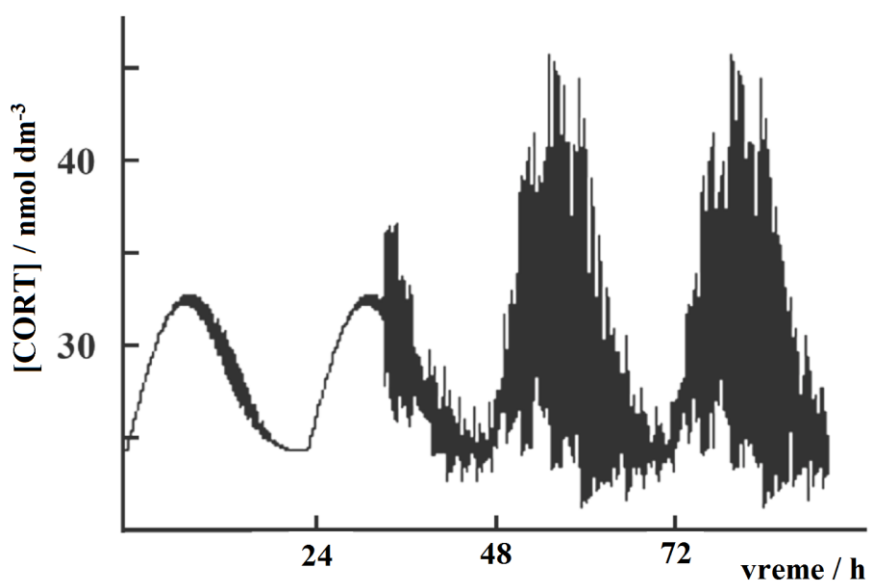


Slika 1.5.2. Simulirani dnevni ritam sekrecije kortizola pri bazalnim uslovima. Unutardnevne oscilacije odabrane za vršenje perturbacija prikazane su na uvećanim delovima. Slova A, B, C i D označene su četiti različite faze odabranih pulseva, u kojima se vrše perturbacije. [17]

Prethodno opisani efekti dobijeni perturbacijom iste koncentracije CRH, dobijeni su kada je ta perturbacija delovala u toku dana. Međutim, ponavljanjem potpuno analognih numeričkih simulacija perturbovanjem sistema u toku noći, zapaženi su drugačiji dinamički odgovori sistema [17, 18]. Ti rezultati pokazuju da dinamički odgovor osnovnog modela HPA sistema zavisi od doba dana (obdanica/noć) kada je delovala perturbacija jednog istog intenziteta (iste koncentracije CRH). Drugim rečima, perturbacija istog intenziteta može izazvati različite odgovore HPA sistema ukoliko deluje u različitim fazama, dnevne oscilacije koncentracije kortizola: (1) kada perturbacija pomoću [CRH] deluje kada se dnevna oscilacija koncentracije kortizola nalazi u silaznoj fazi, što se kod ljudi dešava tokom obdanice (desna strelica na slici 1.5.2) ili (2) kada perturbacija pomoću [CRH] kada se dnevna oscilacija koncentracije kortizola nalazi u uzlaznoj fazi, što se kod ljudi odigrava u toku noći (leva strelica na slici 1.5.2). Rezultati simulacija su pokazali da je sistem generalno osetljiviji na akutne perturbacije pomoću [CRH] ukoliko one deluju tokom noći tj. u uzlaznoj fazi dnevnog ritma [17, 18].

Osim toga, osnovni model HPA sistema upotrebljen je za simuliranje dinamičkih stanja HPA sistema u uslovim hroničnog stresa (slika 1.5.3). U numeričkim

simulacijama, ovo stanje je dobijeno u uzastopnim perturbacijama sistema pomoću iste koncentracije CRH u dužem vremenskom periodu, pri čemu je svaka naredna perturbacija primenjena pre nego što je sistem uspeo da se relaksira do bazalnog stanja. Kao posledica ovakvih hroničnih perturbacija sistem je ušao u vrstu haotičnog stanje (slika 1.5.3). Takvo stanje nesinhronizovane i neregularne dinamike HPA sistema formirane u uslovima hronične izloženosti delovanju stresora može biti jedan od potencijalnih, dinamičkih mehanizama nastanka poremećaja koji se povezuju sa stanjima hroničnog stresa (unipolarna depresija, metabolički sindrom itd.).



Slika 1.5.3. Numerička simulacija hroničnog dejstva stresora, pri čemu je HPA sistem perturbovan na svaka 2 sata pomoću CRH koncentracije $[CRH] = 5 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$. [18]

Imajući u vidu navedene kvalitete osnovnog modela HPA sistema da predvidi ponašanje realnih sistema, ovaj model je iskorišćen u istraživanjima prikazanim u disertaciji za dodatnu karakterizaciju dinamičkih stanja HPA sistema i koncentracije kortizola, koja se javljaju u uslovima različitih akutnih perturbacija pomoću spoljnjih glukokortikoida (poglavlje 3.1.3.1) i uslovima hroničnog stresa (poglavlje 3.1.3.2). Spoljni (egzogeni) glukokortikoidi, kao sintetički derivati kortizola, spadaju u rasprostranjenu grupu lekova koji se rutinski koriste u medicinskoj praksi [46]. Stoga utvrđivanje efekata spoljnjih glukokortikoida na dinamiku HPA sistema, ne poseduje samo teorijski već i praktični značaja, nudeći potencijalni doprinos u unapređenju efikasnosti i smanjivanju neželjenih efekata tokom glukokortikoidne terapije.

2. METODE

2.1. Numeričke metode

Sve numeričke simulacije razmatranih modela HPA sistema su izvedene u programskom paketu MATLAB, nalaženjem rešenja sistema običnih diferencijalnih jednačina koje opisuju dinamiku tih modela. Ta rešenja predstavljaju vremenske serije koncentracija nezavisnih intermedijera ispitivanog modela. U te svrhe korišćen je ode15s solver, zasnovan na Gear-ovom algoritamu za integraciju krutih diferencijalnih jednačina [119]. U svim simulacijama dobijenim na bazi ispitivanih modela HPA sistema apsolutna i relativna tolerancija greške su iznosile $3 \cdot 10^{-12}$ i $1 \cdot 10^{-20}$, redom.

Početni uslovi su bile početne koncentracije svakog intermedijera u datom modelu. U svim prikazanim rezultatima numeričkih simulacija, odgovarajuće početne koncentracije intermedijera za dati model su iznosile: (1) $[\text{CRH}]_0 = 0,9 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 8,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ALDO}]_0 = 1,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ i $[\text{CORT}]_0 = 2,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, u slučaju simulacija dobijenih na bazi osnovnog modela HPA sistema (model sa 4 vrste i 9 reakcija) [27]; (2) $[\text{CRH}]_0 = 1,00 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 9,66 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ALDO}]_0 = 9,66 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ i $[\text{CORT}]_0 = 2,76 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, za simulacije dobijene na bazi proširenog osnovnog modela HPA sistema (model sa 4 vrsta i 11 reakcija) [48]; (3) $[\text{CHOL}]_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CRH}]_0 = 1 \cdot 10^{-12} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CORT}]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ i $[\text{ALDO}]_0 = 6 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$, za simulacije dobijene pomoću modela HPA sistema sa holesterolom (model sa 5 vrsta i 13 reakcija, poglavlje 3.3). Oznake $[\text{CHOL}]_0$, $[\text{CRH}]_0$, $[\text{ACTH}]_0$, $[\text{CORT}]_0$ i $[\text{ALDO}]_0$ predstavljaju početne koncentracija holesterola, CRH, ACTH, kortizola i aldosterona, redom.

Za bazalne fiziološke uslove, parametri funkcije D (v. jed. (3.1.1)) su iznosili u svim simulacijama u radu $d_1 = 0,88524$ i $d_2 = 0,957$.

2.2 Analiza stehiometrijskih mreža (SNA)

Kao što je ranije istaknuto, analiza stehiometrijskih mreža (eng. stoichiometric network analysis, SNA) predstavlja opštu matematičku metodu koja omogućava efikasnu analizu lokalne stabilnosti neravnotežnih stacionarnih stanja n -dimenzionalnih reakcionih sistema odn. mreža reakcija tačno definisane stehiometrije [49, 51, 52, 72, 73]. U ovom poglavlju prvo su izloženi glavni principi na kojima se zasniva metoda SNA, a nakon toga je na primeru osnovnog modela HPA [18] sistema opisan opšti postupak određivanja stabilnosti na bazi ove metode.

2.2.1 Osnovni principi metode SNA

U metodi SNA, određivanje stabilnosti nekog ustaljenog stanja se utvrđuje uvođenjem novih parametara sistema, koji omogućuju jednostavnije određivanje svojstvenih vrednosti karakterističnog polinoma jakobijana sistema (jed. 1.2.8). Preduslov za izvođenje analiza stabilnosti pomoću metode SNA jeste da ispitivani model bude stehiometrijski odn. da među komponentama ispitivanog dinamičkog sistema moraju biti definisane stalne stehiometrijske veze koje se ne menjaju u vremenu i prostoru. U SNA se za definisanje uslova nestabilnosti ispitivanog stehiometrijskog modela ne koriste uobičajene kinetičke veličine, konstante brzina reakcija i koncentracije intermedijera u ustaljenom stanju, već se upotrebljavaju novouvedeni parametri: recipročne koncentracije, h_i ($i = 1, \dots, n$, gde je n broj nezavisnih intermedijera u sistemu) i tzv. *brzine ekstremnih struja* ili kraće *brzine struja* j_l [49, 51]. Brzine struja se dobijaju na bazi analize nezavisnih reakcionih puteva prisutnih u ispitivanom reakcionom sistemu. Naime, u terminologiji SNA, reakcioni put koji se ostvaruje kada je sistem u ustaljenom stanju označen je kao *ekstremna struja*. Osnovni zadatak u SNA je upravo određivanje svih ekstremnih struja koje mogu postojati u ispitivanom složenom procesu koji se odvija kada je sistem u ustaljenom stanju. Na taj način se pomoću SNA metode za svaku reakcionu mrežu sa definisanom stehiometrijom može odrediti jedinstven skup od s međusobno nezavisnih veličina, brzina struja, j_l ($l = 1, 2, \dots, s$), čijom se

odgovarajućom linearnom kombinacijom može za svaku od ukupno m reakcija u sistemu izraziti njena brzina u ustaljenom stanju, $v_{z,ss}$ ($z = 1, 2, \dots, m$).

U opštem slučaju vrednosti brzina struje j_i mogu ostati neodređene. Tada je nemoguće izračunati vrednost izraza koji definiše uslov nestabilnosti sistema, i analiza stabilnosti ne može biti izvedena do kraja. U tom pogledu, nedavno je ostvaren značajan napredak u primeni SNA, kada je pokazano da se uslov nestabilnost sistema izražen preko brzina struja može u potpunosti transformisati u izraz koji je funkcija isključivo brzina reakcionih koraka modela u neravnotežnom stacionarnom (ustaljenom) stanju [53, 54]. Brzine u ustaljenom stanju mogu biti određene poznavanjem vrednosti konstanti brzina reakcionih koraka i vrednosti koncentracija vrsta u ustaljenom stanju, bilo korišćenjem njihovih eksperimentalnih vrednosti bilo na bazi teorijskih vrednosti definisanih za potrebe numeričkih simulacija. Ovo unapređenje omogućuje da se i u opštem slučaju SNA metoda može iskoristiti za optimizaciju parametara ispitivanog stehiometrijskog modela i usaglašavanje njegovih simulacija sa eksperimentalnim rezultatima.

U tekstu koji sledi biće izložena opšta procedura analize stabilnosti u SNA. Radi jasnijeg sagledavanja, SNA postupak će uporedo biti prikazan i na konkretnom primeru, na osnovnom modelu HPA sistema (model sa 4 vrste i 9 reakcija) [18].

2.2.2 Postupak metode SNA

U cilju određivanja ekstremnih struja, u SNA se vremenska evolucija nezavisnih intermedijera umesto sistemom diferencijalnih jednačina (1.2.3), izražava u matričnom obliku:

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = \mathbf{S}_{\text{tot}} \vec{v}, \quad (2.2.1)$$

gde je \vec{x} vektor koncentracija svih N vrsta (svih reaktanata, produkata i intermedijera) X_i ($i = 1, 2, \dots, N$), dok je \vec{v} vektor m reakcija R_z ($z = 1, 2, \dots, m$) u datom

stehiometrijskom modelu. Stehiometrijska matrica \mathbf{S}_{tot} predstavlja operator čiji su elementi, u literaturi često označavani kao stehiometrijski koeficijenti, definisani izrazom:

$$\mathbf{S}_{i,z} = s_{i,z}^{\text{D}} - s_{i,z}^{\text{L}}. \quad (2.2.2)$$

U jednačini (2.2.2) $s_{i,z}^{\text{L}}$ i $s_{i,z}^{\text{D}}$ predstavljaju stehiometrijske koeficijente vrste X_i sa leve (L) i desne (D) strane reakcionog koraka (R_z), respektivno. Kako je ranije naznačeno (poglavlje 1.2), pri ispitivanju stabilnosti neravnotežnih stacionarnih stanja u obzir se uzimaju samo nezavisne intermedijerne vrste X_i , $i = 1, \dots, n$, gde n predstavlja broj tih nezavisnih intermedijera u datom reakcionom sistemu. Tada u jednačini (2.2.1), umesto stehiometrijske matrice \mathbf{S}_{tot} koja obuhvata stehiometrijske koeficijente svih vrsta (sve reaktante, sve produkte i sve intermedijere), figuriše matrica \mathbf{S} , čiji su elementi samo oni stehiometrijski koeficijenti $S_{i,z}$ (jed. (2.2.2)) koji se odnose na n nezavisnih intermedijernih vrsta, odn. $i = 1, \dots, n$, dok je, kao i ranije, $z = 1, \dots, m$, gde je m ukupan broj reakcija u sistemu.

U slučaju osnovnog modela HPA sa sistema (model sa 4 vrste i 9 reakcija) [16], matrica \mathbf{S} , direktno izvedena iz mehanizma datog u tabeli 1.1, ima oblik [18]:

$$\mathbf{S} = \begin{array}{cccccccccc} \text{R1} & \text{R2} & \text{R3} & \text{R4} & \text{R5} & \text{R6} & \text{R7} & \text{R8} & \text{R9} & \\ \left[\begin{array}{cccccccccc} 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & -1 \end{array} \right] & \begin{array}{l} \text{CRH} \\ \text{ACTH} \\ \text{ALDO} \\ \text{CORT} \end{array} \end{array}. \quad (2.2.3)$$

U ustaljenom stanju, brzine promena koncentracija svih intermedijera jednake su nuli, pa jednačina 2.2.1 postaje:

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = \mathbf{S} \vec{v} = \vec{0}, \quad (2.2.4)$$

gde je \vec{x} vektor koncentracija n nezavisnih intermedijera X_i ($i = 1, 2, \dots, n$), \mathbf{S} stehiometrijska matrica n nezavisnih intermedijera koji učestvuju u m reakcija dimenzije $n \times m$, a $\vec{0}$ predstavlja nula-vektor dimenzije n odn. vektor čijih svih n elemenata ima vrednost nula.

U osnovnom modelu HPA sistema rang matrice \mathbf{S} (jed. (2.2.3)) iznosi 4, pa je broj nezavisnih intermedijera $n = 4$. Stoga, imajući u vidu da ovaj model ima ukupno 4 intermedijera (CRH, ACTH, aldosteron i kortizol), svi oni su međusobno nezavisni.

Zamenjujući jednačinu (2.2.3) u jednačinu (2.2.4), dobija se matični zapis vremenske evolucije osnovnog modela HPA sistema u ustaljenom stanju:

$$\begin{bmatrix} \frac{d[\text{CRH}]}{dt} \\ \frac{d[\text{ACTH}]}{dt} \\ \frac{d[\text{ALDO}]}{dt} \\ \frac{d[\text{CORT}]}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_9 \end{bmatrix}_{ss} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}. \quad (2.2.5)$$

Prema teoriji SNA, svaki proces koji se odvija u ustaljenom stanju može biti predstavljen kao linearna kombinacija nekoliko elementarnih reakcionih puteva sa nenegativnim koeficijentima [49, 51]. Ovi elementarni putevi se u terminologiji SNA nazivaju *ekstremne struje*, E_l . Doprinos neke ekstremne struje E_l brzinama reakcionih koraka u ustaljenom stanju, $v_{i,ss}$, u teoriji SNA označen je kao *brzina ekstremne struje* ili kraće *brzina struje*, j_l . Brzine struja čine elemente vektora brzine struja, \vec{j} , dok ekstremne struje obrazuju kolone \vec{E}_l matrice ekstremnih struja \mathbf{E} . Broj ekstremnih struja jednak je broju brzina struja, i predstavlja svojstvo svakog pojedinačnog modela. Ako se taj broj označi sa s , onda supskript l u oznakama za ekstremne struje E_l odn. brzine struja j_l uzima vrednosti $l = 1, \dots, s$.

Matrica \mathbf{E} se dobija nalaženjem rešenja sistema jednačina stacionarnosti po svim nezavisnim intermedijernim vrstama u sistemu (jed. (2.2.4)). Sa aspekta linearne algebre, to znači da u vektorskom prostoru brzina reakcija datog modela tražimo

potprostor čiji elementi zadovoljavaju jednačinu (2.2.5) tj. potprostor brzina u ustaljenom stanju. Matrica \mathbf{E} osnovnog modela HPA sistema se dobija rešavanjem sistema jednačina (2.2.5):

$$\mathbf{E} = \begin{array}{cccccccc|l} E_1 & E_2 & E_3 & E_4 & E_5 & E_6 & E_7 & & \\ \hline 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 2 & 2 & & \text{R1} \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & & \text{R2} \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 2 & 2 & & \text{R3} \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & & \text{R4} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & & \text{R5} \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & & \text{R6} \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & & \text{R7} \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & & \text{R8} \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & & \text{R9} \end{array} \quad (2.2.6)$$

U osnovnom modelu HPA sistema ima $l = 7$ ekstremnih struja. Na primer, ekstremna struja E1 predstavlja reakcioni put sistema u ustaljenom stanju sastavljen od reakcionih koraka R1+R2 +R3+R4+R7, dok se E6 čine reakcioni koraci 2R1 + 2R3 + R4 + R5 + R7. Poznavajući matricu ekstremnih struja \mathbf{E} , brzine reakcionih koraka modela u ustaljenom stanju, $v_{i,ss}$, mogu da se razlože na brzine struja j_i prema tzv. osnovnoj jednačini analize stehiometrijskih mreža [49, 51, 73]:

$$\vec{v}_{ss} = \mathbf{E} \vec{j}, \quad (2.2.7)$$

gde \vec{v}_{ss} predstavlja vektor čiji su elementi brzine reakcija u ustaljenom stanju, $v_{i,ss}$, dok je, kako je napomenuto, \vec{j} vektor čiji su članovi brzine struja j_i . Imajući u vidu da se brzina svakog reakcionog koraka u modelu, $v_{i,ss}$, zavisi od odgovarajuće konstante brzine i koncentracija u ustaljenom stanju (u skladu sa zakonom o dejstvu masa), osnovna jednačina SNA (2.2.7) omogućuje da se u ustaljenom stanju uspostavi korelacija između klasičnih parametara hemijske kinetike sa SNA parametrima. Za ovaj model, zamenom jed. (2.2.6) u osnovnu jednačinu SNA (2.2.7), dobijaju se sledeće relacije između $v_{i,ss}$ ($i = 1, \dots, 9$) i j_l ($l = 1, \dots, 7$):

$$v_{1,ss} = k_0 = j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 \quad (2.2.8)$$

$$v_{2,ss} = k_m = j_1 + j_4 \quad (2.2.9)$$

$$v_{3,ss} = k_1[\text{CRH}]_{ss} = j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 \quad (2.2.10)$$

$$v_{4,ss} = k_2[\text{ACTH}]_{ss} = j_1 + j_3 + j_6 \quad (2.2.11)$$

$$v_{5,ss} = k_3[\text{ACTH}]_{ss} = j_6 + j_7 \quad (2.2.12)$$

$$v_{6,ss} = k_4[\text{ACTH}]_{ss}[\text{CORT}]_{ss}^2 = j_4 + j_5 + j_7 \quad (2.2.13)$$

$$v_{7,ss} = k_5[\text{ALDO}]_{ss}[\text{CORT}]_{ss}^2 = j_1 + j_4 + j_6 + j_7 \quad (2.2.14)$$

$$v_{8,ss} = k_6[\text{ACTH}]_{ss} = j_2 \quad (2.2.15)$$

$$v_{9,ss} = k_7[\text{CORT}]_{ss} = j_3 + j_5, \quad (2.2.16)$$

gde $[\text{CRH}]_{ss}$, $[\text{ACTH}]_{ss}$, $[\text{ALDO}]_{ss}$ i $[\text{CORT}]_{ss}$ označavaju koncentracije CRH, ACTH, aldosterona i kortizola u ustaljenom stanju, redom.

Linearnom kombinacijom jednačina (2.2.8) – (2.2.16) mogu se dobiti međusobno nezavisne linearne relacije među brzinama pojedinih reakcionih koraka u ustaljenom stanju:

$$v_{1,ss} = v_{3,ss} \quad (2.2.17)$$

$$v_{7,ss} = v_{2,ss} + v_{5,ss} \quad (2.2.18)$$

$$v_{1,ss} = v_{4,ss} + v_{5,ss} + v_{6,ss} + v_{8,ss} \quad (2.2.19)$$

$$v_{3,ss} = v_{5,ss} + v_{7,ss} + v_{8,ss} + v_{9,ss} \quad (2.2.20)$$

Sledeća faza u SNA predstavlja ispitivanje karaktera stabilnosti kretanja celokupnog sistema oko datog neravnotežnog stacionarnog (ustaljenog) stanja nakon infinitezimalnih perturbacija koncentracija n nezavisnih intermedijernih vrsta sistema Δx_i ($i = 1, 2, \dots, n$) (jed. (1.2.5)). U poglavlju 1.2 je naznačeno da se u te svrhe upotrebljava linearizovani operator dinamike jakobijan \mathbf{J} (jed. (1.2.7)) u okolini datog

ustaljenog stanja, pa u matičnom zapisu jednačina (1.2.5) za vremenske evolucije perturbacija Δx_i postaje:

$$\frac{d\vec{\Delta x}}{dt} = \mathbf{J} \vec{\Delta x}, \quad (2.2.21)$$

gde je \vec{x} vektor perturbacija Δx_i ($i = 1, \dots, n$). U SNA matični operator \mathbf{J} je određen izrazom :

$$\mathbf{J} = -\mathbf{V}(\vec{j}) \text{diag} \vec{h}, \quad (2.2.22)$$

gde je \vec{h} vektor recipročnih koncentracija h_i ($i = 1, \dots, n$) svih nezavisnih intermedijernih vrste X_i , $\text{diag} \vec{h}$ njegoza dijagonalna matrica, a $\mathbf{V}(\vec{j})$ matrica brzina struja, definisana izrazom:

$$\mathbf{V}(\vec{j}) = -\mathbf{S} \text{diag}(\mathbf{E}\vec{j})\mathbf{K}^T. \quad (2.2.23)$$

Operator $\text{diag} \vec{a}$ definiše transformaciju nekog n -dimenzionalnog vektora \vec{a} u kvadratnu matricu dimenzije $n \times n$ čiji elementi na glavnoj dijagonali a_{ii} odgovaraju elementima vektora a_i ($i = 1, \dots, n$), redom, dok su ostali elementi matrice jednaki nuli. U razmatranom osnovnom modelu HPA, $\text{diag} \vec{h}$ ima oblik:

$$\text{diag} \vec{h} = \begin{bmatrix} h_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & h_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & h_3 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & h_4 \end{bmatrix}, \quad (2.2.24)$$

gde su h_1, h_2, h_3, h_4 recipročne vrednosti $[\text{CRH}]_{ss}$, $[\text{ACTH}]_{ss}$, $[\text{ALDO}]_{ss}$ i $[\text{CORT}]_{ss}$, redom.

Veličina \mathbf{K} u jednačini (2.2.23) predstavlja *matricu redova reakcija*, čiji su elementi stehiometrijski koeficijenti sa levih strana reakcionih koraka vrste X_i ($i = 1, \dots, N$, gde je N ukupan broj svih vrsta prisutnih u sistemu) u reakcionom koraku R_z ($z = 1, 2, \dots, m$, pri čemu je m ukupan broj reakcionih koraka u sistemu), $s_{i,z}^L$:

$$\mathbf{K} = \begin{matrix} & R_1 & R_2 & \cdots & R_m \\ \begin{matrix} X_1 \\ X_2 \\ \vdots \\ X_n \end{matrix} & \begin{bmatrix} s_{1,1}^L & s_{1,2}^L & \cdots & s_{1,m}^L \\ s_{2,1}^L & s_{2,2}^L & \cdots & s_{2,m}^L \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{n,1}^L & s_{n,2}^L & \cdots & s_{n,m}^L \end{bmatrix} \end{matrix} \quad (2.2.25)$$

U jednačini (2.2.23) \mathbf{K}^T je transponovana matrica matrice \mathbf{K} (jed. (2.2.25)). U slučaju osnovnog modela HPA sistema matrica \mathbf{K} ima oblik:

$$\mathbf{K} = \begin{matrix} & R1 & R2 & R3 & R4 & R5 & R6 & R7 & R8 & R9 \\ \begin{matrix} CRH \\ ACTH \\ ALDO \\ CORT \end{matrix} & \begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 1 \end{bmatrix} \end{matrix} \quad (2.2.26)$$

Zamenjujući jednačine (2.2.3), (2.2.6) i (2.2.26) u izraz (2.2.23), za osnovni model HPA sistema određena je matrica brzina struja $\mathbf{V}(\vec{j})$:

$$\mathbf{V}(\vec{j}) = \begin{bmatrix} j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 & -j_4 & j_4 & 0 \\ -j_1 - j_2 - j_3 - j_4 - j_5 - 2j_6 - 2j_7 & j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 & 0 & 2j_4 + 2j_5 + 2j_7 \\ 0 & -j_6 - j_7 & j_1 + j_4 + j_6 + j_7 & 2j_1 + 2j_4 + 2j_6 + 2j_7 \\ 0 & -j_1 - j_3 - j_5 - j_6 - j_7 & j_1 + j_6 + j_7 & 2j_1 + j_3 - j_5 + 2j_6 \end{bmatrix} \quad (2.2.27)$$

Dimenzija matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ iznosi 4×4 imajući u vidu da ispitivani model sadrži četiri nezavisne intermedijerne vrste (CRH, ACTH, aldosteron i kortizol).

Konačno, znajući izraze (2.2.24) i (2.2.27), na osnovu relacije (2.2.22) može se odrediti linearizovani operator dinamike sistema u ustaljenom stanju, tj. jakobijan sistema \mathbf{J} .

Kako je već napomenuto u poglavlju 1.2, stabilnost nekog neravnotežnog stacionarnog stanja zavisi u opštem slučaju od znaka (pozitivan ili negativan) i karaktera (realan ili imaginaran) svojstvenih vrednosti odn. rešenja λ karakterističnog polinoma linearizovanog operatora dinamike \mathbf{J} u okolini tog stanja (jed. (1.2.8)). U SNA, svojstvene vrednosti λ se izračunavaju nalaženjem korena karakterističnog polinoma [49, 51] oblika:

$$\text{Det}[\lambda \mathbf{I} - \mathbf{J}] = \alpha_0 \lambda^n + \alpha_1 \lambda^{n-1} + \alpha_2 \lambda^{n-2} + \dots + \alpha_{n-1} \lambda + \alpha_n, \quad (2.2.28)$$

gde α_i ($i = 1, 2, \dots, n$) predstavlja koeficijent karakterističnog polinoma uz odgovarajuću svojstvenu vrednosti λ^{n-i} , n je broj nezavisnih intermedijera u modelu, dok je \mathbf{I} jedinična matrica. Prema konvenciji, karakteristični polinom se zapisuje u obliku tako da je $\alpha_0 = 1$. U razmatranom modelu, $n = 4$, pa karakteristični polinom glasi:

$$\text{Det}[\lambda \mathbf{I} - \mathbf{J}] = \alpha_0 \lambda^4 + \lambda^3 \alpha_1 + \lambda^2 \alpha_2 + \lambda \alpha_3 + \alpha_4. \quad (2.2.29)$$

U SNA, koeficijent karakteristične jednačine α_i ($i = 1, \dots, n$) jednak je sumi svih dijagonalnih minora dimenzije $i \times i$ matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ pomnoženih odgovarajućim kombinacijom od i recipročnih koncentracija h_i [49, 51]. Na primer, dijagonalni minori dimenzije 3×3 se mogu formirati kombinacija bilo koja tri reda i tri odgovarajuće kolone: redova 1, 2, 3 i kolona 1, 2, 3 (minor M_{123}); redova 1, 2, 4 i kolona 1, 2, 4 (minor M_{124}); redova 1, 3, 4 i kolona 1, 3, 4 (minor M_{134}); i redova 2, 3, 4 i kolona 2, 3, 4 (minor M_{234}). Svaki od navedenih minora se množi odgovarajućim proizvodom recipročnih koncentracija: $h_1 h_2 h_3$, $h_1 h_2 h_4$, $h_1 h_3 h_4$ i $h_2 h_3 h_4$, dajući članove, redom: $M_{123} h_1 h_2 h_3$, $M_{124} h_1 h_2 h_4$, $M_{134} h_1 h_3 h_4$ i $M_{234} h_2 h_3 h_4$. Na kraju, suma svih dijagonalnih

minora trećeg reda pomnoženih odgovarajućim proizvodom recipročnih koncentracija predstavlja koeficijent karakterističnog polinoma α_3 :

$$\alpha_3 = M_{123} h_1 h_2 h_3 + M_{124} h_1 h_2 h_4 + M_{134} h_1 h_3 h_4 + M_{234} h_2 h_3 h_4. \quad (2.2.30)$$

Kako su u SNA koeficijenti karakterističnog polinoma α_i predstavljeni sumama dijagonalnih minora matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$, oni su isključivo funkcije brzina struja j_i . Ranije je istaknuto da se dijagonalni minori, a time i koeficijenti α_i , mogu u potpunosti transformisati iz oblika u kojima su funkcije brzina struja j_i u formu koja je funkcija isključivo brzina u neravnotežnom stacionarnom (ustaljenom) stanju, $v_{i,ss}$ [53, 54]. Pošto se vrednosti brzina reakcija u ustaljenom stanju mogu odrediti (eksperimentalno ili mogu biti izračunate teorijskim putem), druga forma izražavanja α_i je znatno pogodnija za upotrebu u opštem slučaju.

Treba istaći da zbog toga što osnovna jednačina SNA (2.2.7) u opštem slučaju može imati više od jednog rešenja (što se ogleda u postojanja linearnih veza među brzinama u ustaljenom stanju, za ovaj model datih jed. (3.23) – (3.26)), supstitucija brzina struja j_i sa brzinama u ustaljenom stanju $v_{i,ss}$ nije jednoznačna. Koristeći linearne veze među brzinama u ustaljenom stanju uslovi nestabilnosti izraženi preko $v_{i,ss}$ se mogu definisati i na drugačiji način, shodno potrebama istraživanja. Ukoliko se uslovi nestabilnosti izražavaju pomoću brzina struja j_i , onda su oni jednoznačno određeni. Međutim, ukoliko je neophodno odrediti tačan izraz za nestabilnost ispitivanog modela, tada se analiza nastavlja, određivanjem Hurwitz-ove determinante, čiji su elementi upravo koeficijenti α_i [51].

Hurwitz-ova determinanta reda i , Δ_i , predstavlja determinantu kvadratne matrice koja se sastoji od i redova i kolona beskonačnog niza:

$$\begin{array}{cccccc}
\alpha_1 & \alpha_3 & \alpha_5 & \alpha_7 & \alpha_9 & \dots \\
\alpha_0 & \alpha_2 & \alpha_4 & \alpha_6 & \alpha_8 & \dots \\
0 & \alpha_1 & \alpha_3 & \alpha_5 & \alpha_7 & \dots \\
0 & \alpha_0 & \alpha_2 & \alpha_4 & \alpha_6 & \dots \\
0 & 0 & \alpha_1 & \alpha_3 & \alpha_5 & \dots \\
\vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots
\end{array} \quad (2.2.31)$$

U SNA, $i = 1, 2, \dots, n$, gde je n broj nezavisnih dinamičkih promenljivih, odn. broj nezavisnih intermedijernih vrsta datog sistema. Hurwitz-ova determinanta se koristi u Routh-Hurwitz-ovoj teoremi kako bi se odredio broj onih svojstvenih vrednosti λ_i čiji su realni delovi pozitivni. Prema ovoj teoremi, suma broja promena znakova između uzastopnih članova u nizovima $1, \Delta_1, \Delta_3, \Delta_5, \dots$ i $1, \Delta_2, \Delta_4, \Delta_6, \dots$ jednaka je broju svojstvenih vrednosti sa realnim pozitivnim delom. Posledica ove teoreme je da nejednakost $\Delta_i > 0$, za sve $i = 1, 2, \dots, n$, predstavlja potreban i dovoljan uslov da se sistem nalazi u stabilnom stacionarnom stanju [51]. Ukoliko se dodatno želi pronaći i uslov za oscilatornost nekog stehiometrijskog modela, to se može odrediti nalaženjem uslova pri kojem dolazi do Andronov-Hopf-ove bifurkacije, tipa bifurkacije u kojoj sistem iz stabilnog neravnotežnog stacionarnog (ustaljenog) stanja prelazi u oscilatorno dinamičko stanje, i obratno [49, 56].

Clarke i Jiang [120] su pokazali da je uslov za pojavu Andronov-Hopf-ove bifurkacije zadovoljen kada $(n - 1)$ -ta Hurwitz-ova determinanta menja znak:

$$\Delta_{n-1} = 0. \quad (2.2.32)$$

Ukoliko je

$$\Delta_{n-1} < 0, \quad (2.2.33)$$

sistem se nalazi u oblasti nestabilnosti u kojoj se očekuje pojava oscilacija. Dakle, umesto da se u analizi koriste sve Hurwitz-ove determinante, postupak je znatno pojednostavljen jer je potrebno naći samo $(n - 1)$ -vu Hurwitz-ovu determinantu.

Kako valjan model HPA sistema mora biti u stanju da ispoljava oscilatornu dinamičku evoluciju, nije dovoljno samo pokazati da model ima oblast nestabilnosti u delu svog faznog prostora, već je potrebno utvrditi i to da li unutar nje postoji i podoblast oscilatornosti. Stoga se kada se traži egzaktni uslov oscilatornosti u slučaju osnovnog modela HPA koristi navedeni uslov (2.2.33). U ovom modelu postoje četiri nezavisna intermedijera, $n = 4$, pa je za nalaženje uslova oscilatornosti dovoljno utvrditi kada je Hurwitzovu determinanta dimenzije 3×3 negativna:

$$\Delta_3 = \begin{vmatrix} \alpha_1 & \alpha_3 & \alpha_5 \\ \alpha_0 & \alpha_2 & \alpha_4 \\ 0 & \alpha_1 & \alpha_3 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \alpha_1 & \alpha_3 & 0 \\ 1 & \alpha_2 & \alpha_4 \\ 0 & \alpha_1 & \alpha_3 \end{vmatrix} < 0, \quad (2.2.34)$$

gde je prema konvenciji izražavanja karakterističnog polinoma (jed. (2.2.28)) $\alpha_0 = 1$.

Uslov određen jed. (2.2.34) zavisi od brzina reakcionih koraka u ustaljenom stanju, $v_{i,ss}$, koje su, pak, funkcije konstanti brzina i koncentracija vrsta kada se sistem nalazi u ustaljenom dinamičkom stanju (jed. (2.2.8) – (2.2.16)). Koncentracije u ustaljenom stanju intermedijera se mogu odrediti korišćenjem uslova stacionarnosti sistema (2.2.4). U razmatranom modelu, ustaljena koncentracija CRH, $[\text{CRH}]_{ss}$, neposredno se dobija iz izraza (1.5.1) nakon njegovog izjednačavanja sa nulom:

$$[\text{CRH}]_{ss} = \frac{k_0}{k_1}, \quad (2.2.35)$$

ustaljena koncentracija ACTH, $[\text{ACTH}]_{ss}$, izjednačavanjem izraza (1.5.2) sa nulom:

$$[\text{ACTH}]_{ss} = \frac{k_0}{(k_2 + k_3 + k_6) + k_4[\text{CORT}]_{ss}^2}, \quad (2.2.36)$$

dok se izjednačavanjem izraza (1.5.3) sa nulom dobija ustaljena koncentracija aldosterona, $[\text{ALDO}]_{ss}$:

$$[\text{ALDO}]_{\text{ss}} = \frac{k_m + k_3[\text{ACTH}]_{\text{ss}}}{k_5[\text{CORT}]_{\text{ss}}^2}. \quad (2.2.37)$$

Zamenom jednačina (2.2.36) i (2.2.37) u izraz (1.5.4) izjednačen sa nulom (tj. u izraz za stacionarnost koncentracije kortizola) dobija se implicitna jednačina za koncentraciju kortizola u ustaljenom stanju, $[\text{CORT}]_{\text{ss}}$, kao polinom četvrtog stepena:

$$-k_4 k_7 [\text{CORT}]_{\text{ss}}^3 + (k_0 - k_m) k_4 [\text{CORT}]_{\text{ss}}^2 - k_7 (k_2 + k_3 + k_6) [\text{CORT}]_{\text{ss}} + [k_0 (k_2 - k_3) - k_m (k_2 + k_3 + k_6)] = 0 \quad (2.2.38)$$

Jednačine (2.2.35 – 2.2.38) pokazuju da koncentracije hormona HPA sistema u ustaljenom stanju zavise isključivo od odgovarajućih konstanti brzina k_i ($i = 0, m, 1, \dots, 7$). Stoga je i nejednakost (2.2.34) funkcija samo konstanti brzina, i može biti određen uvek kada je poznat set ovih parametara.

Egzaktni uslovi za oscilatornost dobijeni korišćenjem Hurwitz-ove determinante (2.2.33) su najčešće veoma složeni i nepraktični za dalju interpretaciju, imajući u vidu kompleksnost izraza za koeficijente α_i karakteristične jednačine (npr. izraz (2.2.30)). To je slučaj i za uslov oscilatornosti ispitivanog osnovnog modela HPA sistema (2.2.34). Međutim, analiza stehiometrijskih mreža se može završiti i pre izračunavanja Hurwitz-ovih determinanti, na osnovu izraza za koeficijente α_i , kada se primenjuje tzv. alfa aproksimacija, ili čak i ranije, nalaženjem dijagonalnih minora koji imaju negativne članove. Pokazano je da su primenom ovakvih aproksimacija u velikom broju različitih modela [53, 54, 121, 122] dobijeni izrazi za nestabilnost dovoljno visoke tačnosti za potrebe modeliranja tih sistema.

Pri analizi stabilnosti osnovnog modela HPA, SNA se može izvesti sa gotovo identičnom tačnošću ako se umesto izraza (2.2.34), uslov nestabilnosti odredi u aproksimaciji na bazi negativnih minora matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$. U slučaju razmatranog modela ustanovljeno je da svi dijagonalni minori matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ koji poseduju negativne članove sadrže član koji odgovara izrazu za dijagonalni minor drugog reda za aldosteron i kortizol, M_{34} [18]. Prema ovoj aproksimaciji, uslov nestabilnosti će biti ispunjen ukoliko je dati minor negativan, $M_{34} < 0$. Tada uslov nestabilnosti ispitivanog modela, izražen preko brzina reakcionih koraka u neravnotežnom stacionarnom stanju, glasi:

$$v_{9,ss} < 2v_{6,ss} \quad (2.2.39),$$

Dobijeni uslov (2.2.39) predstavlja jezgro nestabilnosti osnovnog modela HPA sistema, i mora biti zadovoljen da bi se HPA sistem nalazio u oscilatornom dinamičkom stanju [18].

Za vrednosti konstanti brzina osnovnog modela HPA sistema prikazanih u tabeli, izračunato je da je uslov nestabilnosti $v_{9,ss} < 2v_{6,ss}$ ispujen. Ovo predviđanje je potvrđeno u numeričkim simulacijama, gde za dati skup konstanti brzina HPA sistem ispoljava unutarodnevnu oscilatornu dinamiku (slika 1.5.1 i slika 3.1.1 b, slučaj 2).

3. REZULTATI

Rezultati obuhvataju ispitivanja dinamičkih stanja neuroendokrinog HPA sistema dobijenih na bazi analize tri varijante stehiometrijskih modela za opisivanje mehanizma HPA ose. Prvo je analizirana dinamika osnovnog modela HPA sistema [16], u kojem postoji 4 intermedijerne vrste i 9 reakcionih koraka (poglavljje 3.1). Iz ovog modela je izvedena naredna varijanta modela: prošireni osnovni model HPA sistema [17], koji sadrži 4 intermedijerne vrste i 11 reakcija (poglavljje 3.2). Polazeći od prethodno navedenog modela, postavljen je i analiziran model HPA sistema sa holesterolom, u kojem postoji 5 intermedijernih vrsta i 13 reakcija (poglavljje 3.3).

3.1. Dinamička stanja osnovnog modela HPA sistema u funkciji akutnih i hroničnih perturbatora

U ovom poglavlju, korišćenjem osnovnog modela HPA sistema sa 4 vrste i 9 reakcija, prikazan je efekat akutnog (u vidu akutnih perturbacija glukokortikoidima) i hroničnog stresa na dinamičko ponašanje HPA sistema i koncentracije kortizola. Rezultati simulacija su pokazali da vreme delovanja i intenzitet perturbacija zajednički definišu reakciju HPA na stres, sugerišući da bi oba faktora trebalo biti istovremeno uzeta u obzir u cilju utvrđivanja što efikasnije glukokortikoidne terapije, prilagođene individualnim dinamičkim karakteristikama HPA sistema svakog pacijenta.

3.1.1 Predstavljanje akutnog i hroničnog stresa u osnovnom modelu HPA sistema

Veoma bitna karakteristika stresa je njegovo vreme trajanja. Akutni stres se može definisati kao nagla, izolovana i kratkotrajna perturbacija (koja deluje u vremenskim okvirima od nekoliko sekundi do nekoliko sati), dok hronični stres predstavlja tip stresa koji se traje po nekoliko sati na dan, tokom dužeg vremenskog perioda. od nekoliko

nedelja, meseci, godina [123]. U skladu sa navedenim definicijama i razlikama između akutnog i hroničnog stresa, modeliran je njihov uticaj na dinamiku HPA sistema.

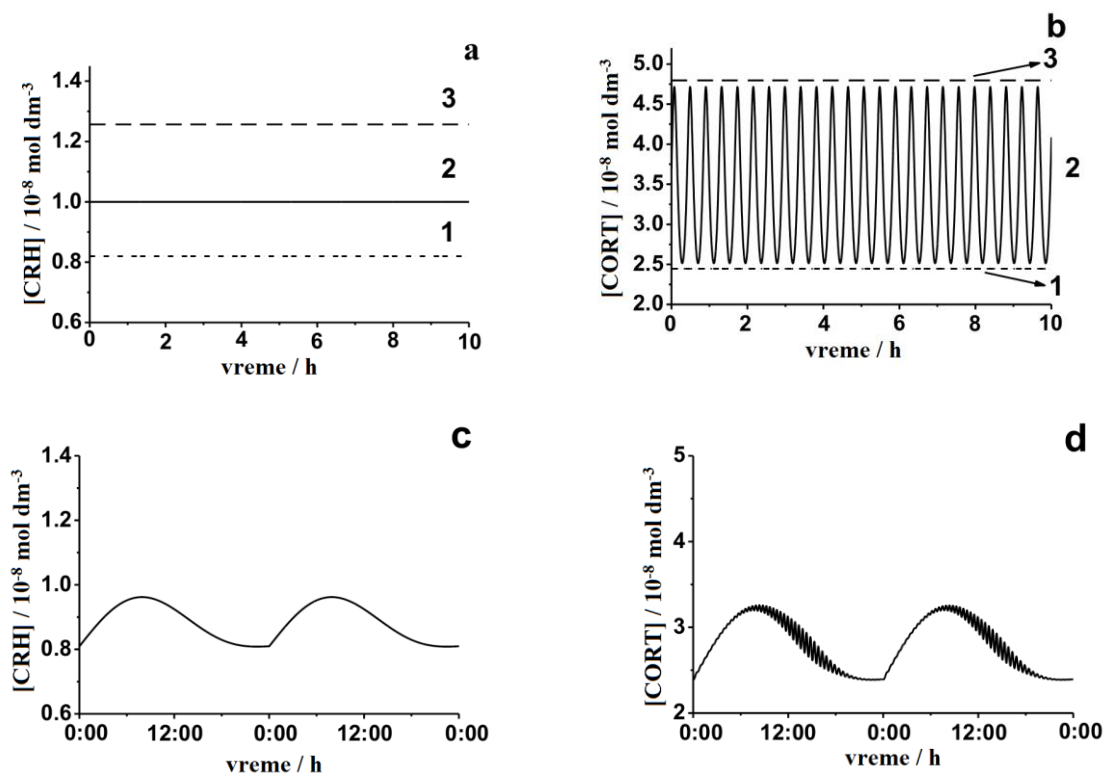
Akutni ili hronični stres mogu biti shvaćeni kao izmenjena stanja sistema nastala usled perturbacija tog sistema od strane različitih vrsta fizičkih, hemijskih ili psihogeno-socijalnih perturbatora (tj. stresora). Kao jedan od glavnih fizioloških sistema uključen u formulisanje adekvatnog odgovora organizma na delovanje takvih perturbatora, stanje HPA sistema podleže značajnim promenama tokom stresa [124]. Imajući to u vidu, dejstva različitih akutnih ili hroničnih stresora mogu se modelirati pomoću odgovarajućih perturbacija HPA sistema. Ovde su perturbatori HPA sistema bili koncentracija CRH ili koncentracija kortizola. U numeričkim simulacijama efekti akutnog davanja glukokortikoidnih medikamenata određivani su akutnim perturbovanjem sistema pomoću kortizola (promenom njegove trenutne koncentracije, poglavlje 3.1.4.1), dok su efekti hroničnih psihogenih stresora na dinamička stanja HPA sistema ispitivani perturbovanjem sistema pomoću CRH (promenom njegove srednje koncentracije ili amplituda oscilacija, poglavlje 3.1.4.2).

Za ispitivanje uticaja stresa bilo je potrebno adaptirati i dnevnu funkciju D' (jed. (1.5.5)) u odgovarajući oblik. Stoga je u tim i budućim korišćen sledeći oblik dnevnog ritma, dnevna funkcija D :

$$D = d_1 - 0,079145093 \cdot d_2 + \{0,064 \cdot \sin(2\pi t / 1440) + 0,12 \cdot \text{abs}[\sin(\pi t / 1440)]\} \cdot d_2. \quad (3.1.1)$$

Oblik dnevne funkcije D (jed. (3.1.1)) u potpunosti je ekvivalentan onom koji je originalno postavljen i koji je korišćen u prethodnim studijama [16-18] (izraz za dnevnu funkciju D' , jednačina (1.5.5)). U ovom obliku (jed. (3.1.1)) figurišu dva nezavisna parametra: parametar d_1 koji definiše srednji dnevni nivo CRH u hipotalamo-portalnog krvotoku, i parametar d_2 koji reguliše amplitudu dnevnih oscilacija CRH. Preuređivanjem izraza za funkciju D' (1.5.5) u izraz u kojem postoja dva nezavisna parametara d_1 i d_2 (jed. 3.1.1) obezbeđuje da se u simulacijama nezavisno jedan od drugog ispita uticaj srednjeg dnevnog nivoa CRH (variranjem parametra d_1) od uticaja amplitude dnevnih oscilacije CRH (variranjem d_2) na dinamiku HPA sistema. Time je omogućeno, kao što će biti prikazano u tekstu koji sledi, ispitivanje uticaja hroničnog

stresa, kao i uzimanje u obzir individualnih razlika u dinamičkim svojstvima dnevnog ritma koje u znatnoj meri postoje među različitim pojedincima.



Slika 3.1.1. Unutardnevna vremenska evolucija koncentracija (a) CRH i (b) kortizola. Pri različitim vrednostima bazalne koncentracije CRH u ustaljenom stanju, $[CRH]_{ss}$, javljaju se kvalitativno različita dinamička stanja kortizola. (1) Pri niskoj vrednosti $[CRH]_{ss}$ ($[CRH]_{ss} = 0,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$), javlja se stabilno neravnotežno stacionarno (ustaljeno) stanje kortizola niže vrednosti koncentracije, $[CORT]_{ss} = 2,49 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$. (2) Pri $[CRH]_{ss} = 1,00 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, kortizol se nalazi u unutardnevnom oscilatornom dinamičkom stanju. Amplituda ($A(CORT) = 4,054 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$) i frekvencija ($\nu_u = 2,40 \text{ h}^{-1}$) unutardnevnih oscilacija ostaju konstantne u vremenu (nakon ulaska sistema u stacionarno stanje). (3) Pri visokoj vrednosti $[CRH]_{ss}$ ($[CRH]_{ss} = 1,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$), opet se uspostavlja stabilno ustaljeno stanje kortizola, ali više vrednosti koncentracije, $[CORT]_{ss} = 4,79 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$. Kompletan bifurkacioni dijagram je prikazan na slici 3.1.6a. Složena oscilatorna evolucija (unutardnevne oscilacije superponirane na dnevne) koncentracije (c) CRH i (d) kortizola. Pod delovanjem dnevne funkcije D ($D = d_1 - 0,079145093 \cdot d_2 + \{0,064 \cdot \sin(2\pi t / 1440) + 0,12 \cdot \text{abs}[\sin(\pi t / 1440)]\} \cdot d_2$), koncentracija CRH pokazuje dnevne oscilacije, dok kortizol pokazuje složenu oscilatornu dinamiku, gde su unutardnevne oscilacije sprengnute sa dnevnim. [27]

Kao što je istaknuto u poglavlju 1.5, funkcija D moduliše brzinu nastajanja i ulaza CRH u sistem, odn. konstantu k_0 , transformišući je u periodičnu promenljivu zavisnu od vremena, prema izrazu $k_D(t) = k_0 \cdot D$. Kao posledica toga evolucija $[CRH]$

iz monotone (slika 3.1.1a), koja se javlja u slučaju kada nema sprezanja sa D (za set parametara prikazan u tabeli 1.1), prelazi u oscilatornu (slika 3.1.1 c), sa dnevnim periodom. U slučaju kortizola, [CORT] prelazi iz stanja u kojem ispoljava samo unutarodnevnne oscilacije (slika 3.1.1 b2) u stanje sa složenim oscilacijama, gde su unutarodnevnne oscilacije superponirane na dnevne (slika 3.1.1 d), što odgovara *in vivo* dinamici koncentracije kortizola u bazalnim uslovima.

3.1.2 Definisane parametara perturbacija i dinamičkog odgovora modela na perturbacije

Glavna odlika ovog modela (tabela 1.1) je da može spontano (bez delovanja spoljnih periodičnih faktora), da simulira unutarodnevnnu oscilatornu evoluciju u okviru HPA sistema, koja se javlja kao posledica unutrašnje (inherentne) nestabilnosti samog modela [16-18]. Kako je prikazano na slikama 3.1.1b i 3.1.6a, model predviđa da unutarodnevnne oscilacije kortizola postoje u određenom opsegu koncentracija CRH kada se on nalazi u stabilnom ustaljenom stanju, ukazujući da unutarodnevni ritam kortizola nije uslovljen postojanjem ritmične dnevne dinamike CRH. Ova izuzetno važna osobina modela je u saglasnosti sa nekoliko eksperimentalnih rezultata: (1) u studiji na ovcama je pokazano da unutarodnevnne oscilacije odn. pulsatlnost kortizola ne prestaje nakon hirurške diskonekcije hipotalamusa od hipofize [125]; (2) diskonekcija suprahijazmatičnog jedra (SCN) hipotalamusa, glavnog dnevnog pejsmejкера u organizmu, od HPA ose, bilo uzgajanjem odraslih pacova u uslovima konstantne svetlosti (tokom 24 h u periodu od 5 nedelja) ili izazivanjem oštećenja SCN-a elektrolitičkim putem, izazvala je gubitak dnevnog ritma koncentracije kortikosterona u plazmi pacova, dok su njegove unutarodnevnne oscilacije ostale očuvane, ukazujući da je mehanizam unutarodnevnne ritmičnosti kortikosterona nezavisan od dnevnih signala iz SCN-a [109]. Ovaj zaključak potkrepljuju i rezultati simulacija HPA modela drugih autora [29], prema kojima kortikosteron ispoljava unutarodnevnnu oscilatornu evoluciju istovremeno dok se CRH nalazi u stabilnom ustaljenom stanju (za vrednosti parametara modela u oscilatornom delu faznog prostora).

Praktična vrednost navedenih karakteristika modela, kada on nije spregnut sa dnevnom funkcijom D , sastoji se u tome što neravnotežna stacionarna (odn. ustaljena)

koncentracija CRH, $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$, može biti tretirana kao kontrolni parametar definisan količnikom nastajanja (k_0) i nestajanja CRH u procesima aktivacije sekrecije i sinteze ACTH (k_1), shodno izrazu za stacionarnu koncentraciju CRH [18]:

$$[\text{CRH}]_{\text{ss}} = \frac{k_0}{k_1} \quad (3.1.2)$$

Naime, variranjem vrednosti parametra k_0 (pri fiksiranim vrednostima ostalih konstanti brzina), jednoznačno se menjaju, sa jedne strane, $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$ prema jed. (3.1.2), a sa druge, dinamičke karakteristike kortizola i drugih vrsta HPA sistema. Iz toga se može zaključiti da određenom srednjem nivou CRH, po ulasku sistema u ustaljeno stanje, odgovara tačno jedno dinamičko stanje HPA sistema. To omogućuje da se za parametar koji definiše ovakav vid perturbacija, umesto konstante brzine k_0 , koristi $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$ kao veličina pogodnija za eksperimentalna određivanja i koja je u većoj meri zasutpljena u literaturi.

Uvršćavanje spoljnog dnevnog ritma u osnovni model HPA sistema (tabela 1.1) dovodi do usložnjavanja oscilatornog ponašanja u HPA sistema, uzrokujući dnevnu varijabilnost u pogledu dinamičkih svojstava unutar dnevnih oscilacija koja ne postoji u slučaju modela bez dnevne funkcije D (ilustrovano za CRH i kortizol na slikama 3.1.1c i 3.1.1d, redom). Pod delovanjem dnevne funkcije D , u toku jednog dnevnog (dvadesetčetvoročasovnog) perioda srednji nivoi, frekvencije i amplitude unutar dnevnih oscilacija hemijskih vrsta nisu više konstantni (kao što je to slučaj kada nema sprežanja sa D), već zavise od datog dinamičkog stanja sistema. Kao posledica toga, apsolutne vrednosti intenziteta perturbacija se ne mogu direktno porediti. Stoga, da bi se obezbedilo korektno poređenje između različitih dinamičkih stanja, precizno su definisane dinamičke veličine i perturbacioni parametri tako da uzimaju u obzir cirkadijalnu (dnevnu) varijabilnost dinamičkih svojstava internih vrsta u ovom modelu HPA sistema.

1) *Srednja dnevna koncentracija CRH u hipotalmo-hipofizno portalnom krvotoku*
($\langle [\text{CRH}] \rangle$)

U slučaju kada je model spregnut sa dnevnom funkcijom D , brzina nastajanja i nestajanja (sekrecije) CRH u hipotalmo-hipofizno portalni krvotok, (lokalni krvotok između hipotalamusa i hipofize), k_0 , menja se periodično u vremenu usled periodičnog efekta funkcije D : $k_D(t) = k_0 \cdot D$. Kao posledica ovog efekta, $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$ (jed. (3.1.2)) više nije konstantna veličina, već postaje promenljiva u vremenu, sa periodom od 24 h (slika 3.1.1c). Stoga, da bi se kvantitativno odredio nivo CRH u hipotalmo-hipofizno portalnoj cirkulaciji, definisana je srednja dnevna koncentracija CRH u hipotalmo-hipofizno portalnoj cirkulaciji, $\langle [\text{CRH}] \rangle$, kao nova dinamička veličina:

$$\langle [\text{CRH}] \rangle = \frac{\langle k_D(t) \rangle}{k_1} = \frac{k_0 \cdot \langle D \rangle}{k_1} = \frac{k_0 \cdot d_1}{k_1} \quad (3.1.3)$$

gde $\langle k_D(t) \rangle$ i $\langle D \rangle$ predstavljaju srednje vrednosti $k_D(t)$ i dnevne funkcije D u toku 24 h, redom.

2) Apsolutna amplituda ($A_i(X)$)

Zbog delovanja dnevnog ritma, svake dve susedne unutardnevne oscilacije poseduju drugačije vrednosti amplituda, a uzastopne ekstremne tačke istog tipa (npr. dva uzastopna minimuma ili dva uzastopna maksimuma) nemaju iste vrednosti (slika 3.1.1d). Stoga, uobičajena definicija amplitude kao razlike dve uzastopne ekstremne tačke (minimuma i maksimuma, i obrnuto) nije dovoljno validna za definisanje odgovora HPA sistema na perturbacije. U tom cilju, definisana je veličina *apsolutna amplituda* i -te unutardnevne oscilacije vrste X , $A_i(X)$, kao razlika koncentracije u maksimumu, $[X]_{\text{max},i}$, i aritmetičke sredine koncentracija dva susedna minimuma, jednog koji neposredno prethodi, $[X]_{\text{min-pre},i}$, i jednog koji neposredno sledi, $[X]_{\text{min-posle},i}$, nakon koncentracionog maksimuma i -te unutardnevne oscilacije (slika 3.1.2):

$$A_i(\mathbf{X}) = [\mathbf{X}]_{\max,i} - \frac{[\mathbf{X}]_{\min-\text{pre},i} + [\mathbf{X}]_{\min-\text{posle},i}}{2}. \quad (3.1.4)$$

3) Relativna amplituda (A_{rel})

Relativna amplituda (A_{rel}) vrste \mathbf{X} je definisana kao odnos amplitude odabrane referentne oscilacije posle delovanja ($A_{\text{ref}}(\mathbf{X})$) i pre delovanja ($A_{\text{ref},0}(\mathbf{X})$) perturbacije:

$$A_{\text{rel}} = \frac{A_{\text{ref}}(\mathbf{X})}{A_{\text{ref},0}(\mathbf{X})}. \quad (3.1.5)$$

Prema tome, ako je $A_{\text{rel}} < 1$, $A_{\text{rel}} > 1$ ili $A_{\text{rel}} = 1$, to znači da se amplituda referentne oscilacije smanjila, povećala ili se nije promenila, respektivno.

U vezi sa referentnom amplitudom referentne oscilacije, pogodno je definisati tri referentne veličine koje se odnose na perturbator P , označene kao $[P]_g$, $[P]_n$ i $[P]_{\min}$ (v. sliku 3.1.4).

Perturbator može biti bilo koja interna vrsta iz modela (CRH, ACTH, kortizol ili aldosteron) ili neka nova eksterna vrsta koja interreaguje sa internim vrstama. U ovom radu kortizol je bio perturbujuća vrsta. Veličina $[P]_{\min}$ predstavlja koncentraciju perturbatora P pri kojoj relativna amplituda dostiže svoju minimalnu vrednost. Veličina $[P]_g$ je najniža koncentracija perturbatora P (odn. osetljivost sistema na perturbatora P) koja može da indukuje vidljiv efekat na dinamiku HPA sistema, pri čemu je proizvoljno uzeto da vidljiva promena sistema podrazumeva promenu amplitude referentne oscilacije za više od $\pm 2,5\%$. Veličina $[P]_n$ predstavlja nenultu koncentraciju perturbatora P pri kojoj je $A_{\text{rel}} = 1$. Opisane veličine su uvedene kako bi se na efikasan način mogla porediti različita dinamička stanja, što će biti pokazano u tekstu koji sledi.

4) Unutardnevni i dnevni fazni ugao

Odgovor HPA modela na perturbacije je veoma osetljiv na fazni ugao pri kojem je perturbacija primenjena. U tom cilju definisane su dve vrste faznih uglova, jedan u

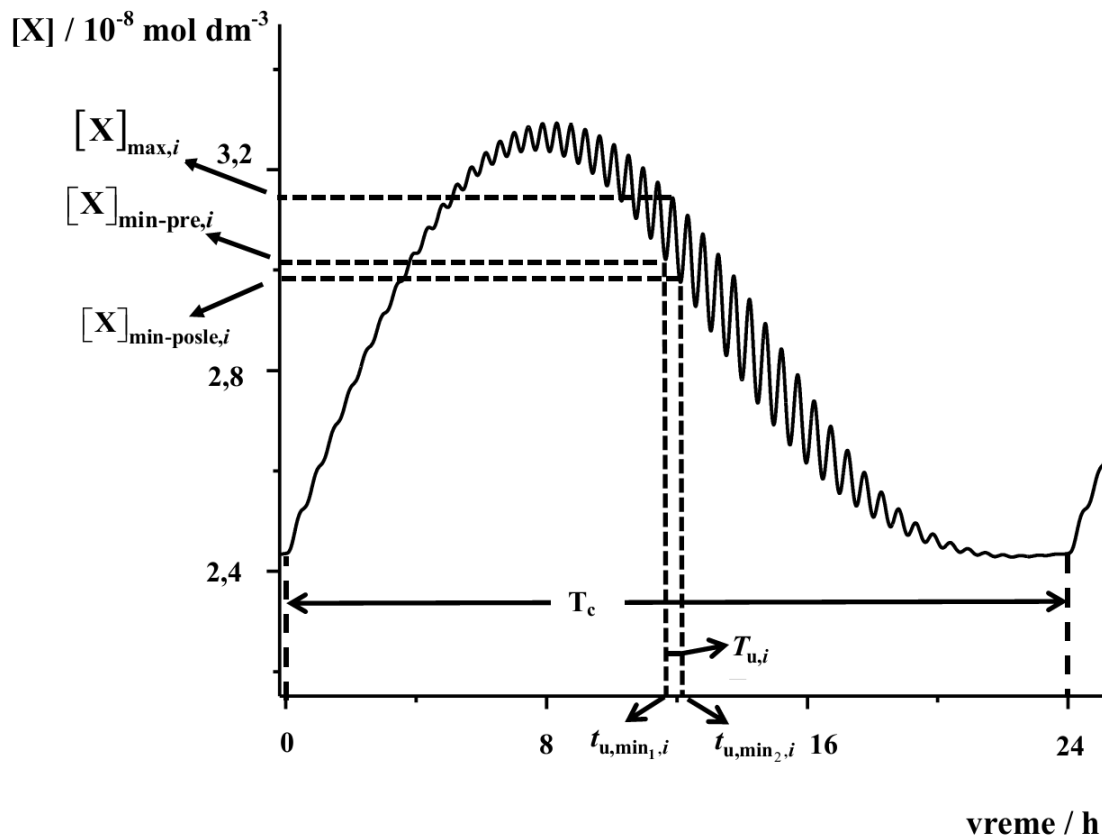
odnosu na period i -te unutarodneve oscilacije ($T_{u,i}$), i drugi u odnosu na dnevni period T_c (T_c ima konstantnu vrednost, $T_c = 24$ h).

Unutardnevni fazni ugao (φ_u)

Unutardnevni fazni ugao predstavlja relativno vreme proteklo od trenutka prvog minimuma perturbovane i -te unutarodneve oscilacije ($t_{u,\min_1,i}$) do trenutka delovanje perturbatora, $t_{u,p,i}$, u odnosu na njen period, $T_{u,i}$:

$$\varphi_u = \frac{t_{u,p,i} - t_{u,\min_1,i}}{T_{u,i}} = \frac{t_{u,p,i} - t_{u,\min_1,i}}{t_{u,\min_2,i} - t_{u,\min_1,i}}, \quad (3.1.6)$$

pri čemu je unutarodnevni period, $T_{u,i}$ definisan kao vreme koje protekne između prvog (levog), $t_{u,\min_1,i}$, i drugog (desnog), $t_{u,\min_2,i}$, minimuma koji okružuju i -ti unutarodnevni maksimum, $T_{u,i} = t_{u,\min_2,i} - t_{u,\min_1,i}$ (slika 3.1.2).



Slika 3.1.2. Definicije parametara unutardnevnih i dnevnih oscilacija. Vrsta X je kortizol ($X = \text{CORT}$).

Dnevni fazni ugao (φ_c)

Dnevni fazni ugao, φ_c , predstavlja relativno vreme proteklo od trenutka pojavljivanja prvog minimum perturbovane dnevne oscilacije, $t_{c,\text{min},1}$, do trenutka delovanja perturbatora ($t_{c,p}$) u odnosu na period dnevne oscilacije, T_c (slika 3.1.2):

$$\varphi_c = \frac{t_{c,p} - t_{c,\text{min},1}}{T_c} . \quad (3.1.7)$$

3.1.3 Predstavljanje uslova akutnog i hroničnog stresa u numeričkim simulacijama

U numeričkim simulacijama dobijenim na bazi osnovnog modela HPA sistema (tabela 1.1) dizajnirani su različiti uslovi akutnog ili hroničnog stresa kako bi se ispitala validnost i utvrdio prediktivni kapacitet reakcije modela pod takvim uslovima. Numeričke simulacije su dobijene prema opštem postupku objašnjenom u poglavlju 2.2.

U numeričkim simulacijama akutni stres je simuliran u vidu jednopulsnih perturbacija sistema tako što kompjuterski program prestaje sa izvršavanjem algoritma integracija u datoj vremenskoj tački istovremeno podižući koncentraciju perturbovane vrste za dati iznos perturbacije. Nakon toga integracija se nastavlja uzimajući kao početne uslove novu koncentraciju perturbatora a istovremeno zadržavajući koncentracije ostalih nezavisnih intermedijera nepromenjenim i jednakim njihovim vrednostima neposredno pre nego što je algoritam prekinut. Kao perturbator sistema korišćena je koncentracija kortizola.

Hronični stres je modelovan variranjem parametara koji definišu dinamiku CRH u modelu: konstante brzine k_0 reakcije (R1) (tabela 1.1), i parametara dnevne funkcije D , d_1 i d_2 (jed. (3.1.1)). Ova tri parametra su izabrana pošto između njih i dinamičkih veličina CRH postojanje odgovarajuće relacija. S obzirom na jednačinu (3.1.2), postoji jednoznačna povezanost k_0 (brzina nastajanja i sekrecije CRH u hipotalamo-hipofizni portalni krvotok (lokalni krvotok kojim produkti sekretornih nervnih ćelija (neurona) hipotalamusa dospevaju do odgovarajućih ćelija hipofize, v. poglavlje 1.2) i koncentracije CRH u ustaljenom stanju, $[CRH]_{ss}$ (ako odabrani set vrednosti ostalih konstanti brzina u modelu ostaje nepromenjen). Takođe, imajući u vidu jed. (3.1.3), parametar d_1 jednoznačno određuje srednju dnevnu koncentraciju CRH u hipotalamo-hipofiznom portalnom krvotoku. Parametar d_2 definiše amplitudu dnevnih oscilacija CRH (v. jed. 3.1.1). Jednoznačnost između navedenih parametara (k_0 , d_1 i d_2) i odgovarajućih veličina CRH važi pod uslovom da odabrani set vrednosti svih ostalih konstanti brzina u modelu (k_0 , k_m , k_1, \dots , k_7 , tabela 1.1) ostaje nepromenjen.

3.1.4. Korelacija dinamičkih stanja modela i fizioloških stanja HPA sistema

Dinamička stanja nastala usled delovanja akutnog davanja glukokortikoidnih medikamenata određivani su akutnim perturbovanjem HPA sistema pomoću kortizola, promenom njegove trenutne koncentracije (poglavlje 3.1.4.1). Efekti hroničnih psihogenih stresora na dinamička stanja HPA sistema ispitivani su perturbovanjem HPA sistema pomoću CRH, promenom njegove srednje koncentracije ili amplitude oscilovanja, (poglavlje 3.1.4.2).

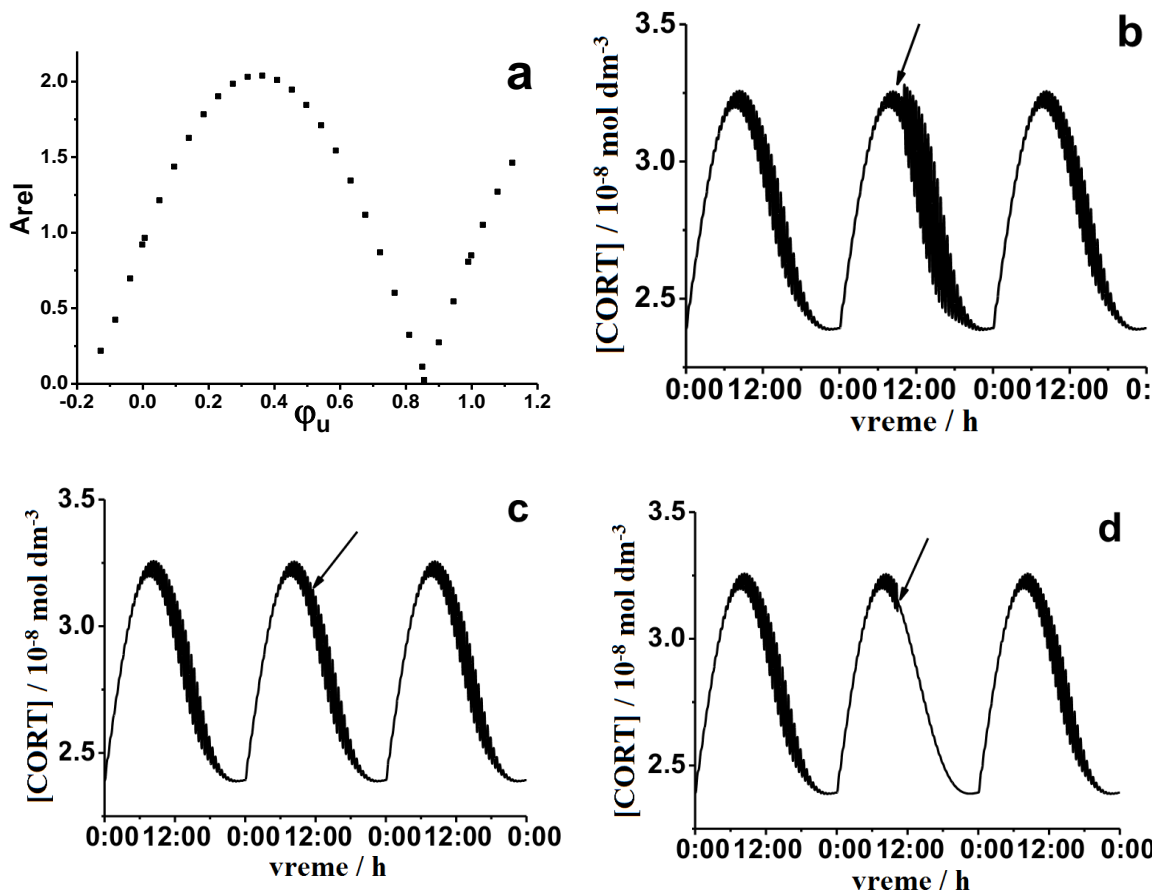
3.1.4.1 Simulacije efekata akutnog stresa

U radu je simulirano više efekata akutnog stresa. Ti efekti su dobijeni u različito dizajniranim pulsним perturbacijama sistema izazvanih pomoću koncentracije kortizola kao perturbatora HPA sistema.

3.1.4.1.1 Efekat intenziteta akutnog stresa i momenta primene u odnosu na unutarnevnu oscilaciju

Odgovor sistema, izražen preko relativne amplitude A_{rel} , jed. (3.1.5)) značajno zavisi od vrednosti unutarnevno faznog ugla φ_u u kojem je delovala perturbacija spoljnjim kortizolom uvek istog intenziteta tj. koncentracije ($[CORT] = 0,45 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$) (slika 3.1.3). Na slici 3.1.3 a ova zavisnost je prikazana dijagramom $A_{rel} = f(\varphi_u)$. Odgovarajuće vremenske serije koncentracije kortizola pokazuju da perturbacije istog intenziteta za različite vrednosti unutarnevno faznog ugla φ_u dovode do kvalitativno različitih odgovora sistema: povećanja (slika 3.1.3.b), bez efekta (slika 3.1.3.c) ili smanjenja (slika 3.1.3.d) relativne amplitude A_{rel} perturbovane unutarnevne oscilacije. U slučaju kada je odgovor sistema smanjenje A_{rel} (slika 3.1.3.d), privremeno je prisutno skoro potpuno prigušenje amplituda unutarnevno oscilacija koncentracije kortizola (tzv. *kvenčing* [126, 127]). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da iste akutne doze glukokortikoidne terapije (shvaćene kao oblik akutnog hemijskog stresa) mogu izazvati

različite efekte na HPA sistem u zavisnosti od vremena kada je glukokortikoidni lek uzet odn. od vrednosti unutardnevnog faznog ugla φ_u u kojem se nalazila oscilacija koncentracije kortizola u trenutku kada je terapija primenjena.

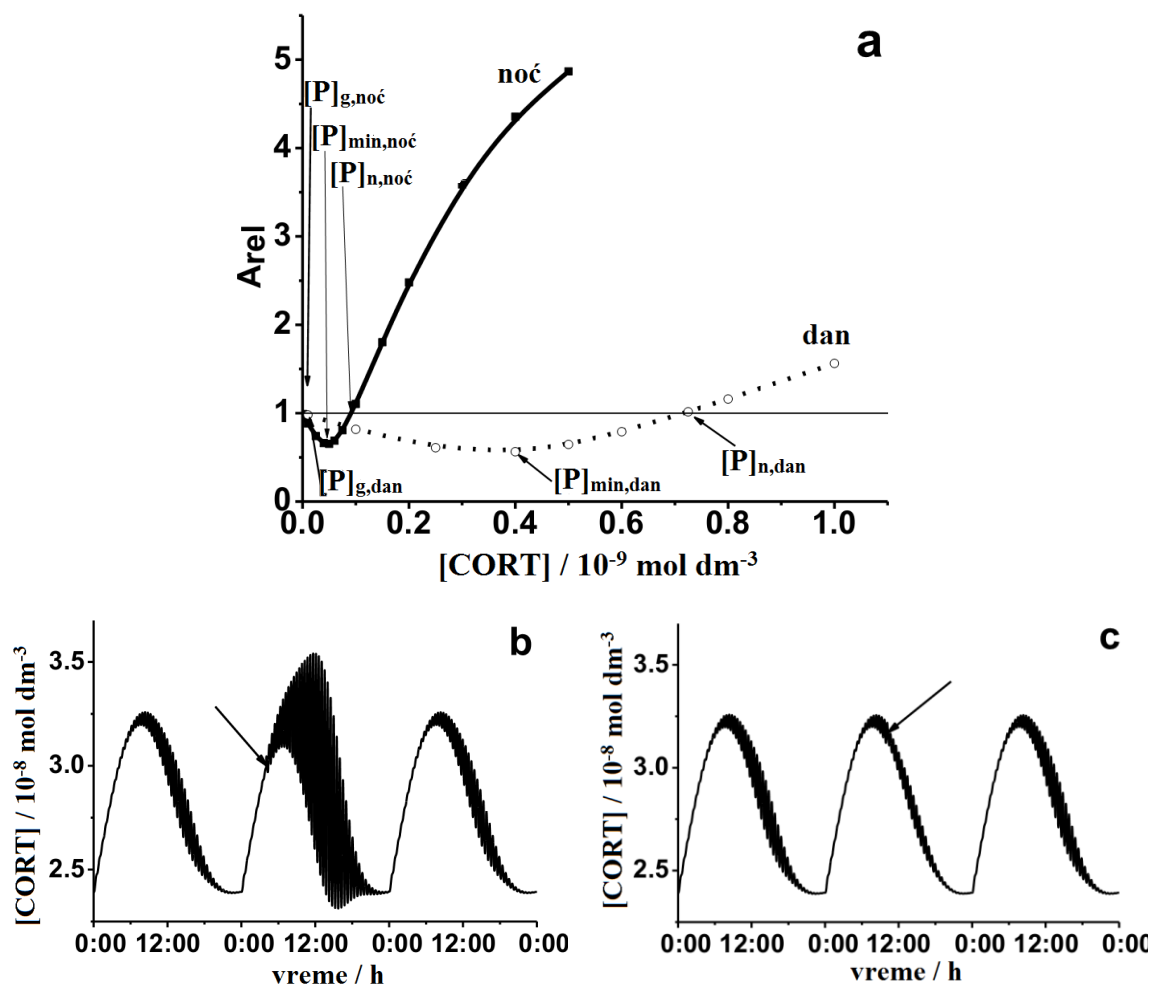


Slika 3.1.3. Odgovor HPA sistema na perturbacije spoljnim kortizolom koncentracije $[CORT] = 0,45 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$, koji je primenjen u različitim unutardnevnim faznim uglovima φ_u . **(a)** Zavisnost odgovora sistema (izraženog pomoću relativne amplitude A_{rel} , (v. jed. (3.1.5)) od unutardnevnog faznog ugla, φ_u , u kojem je delovala perturbacija, kada je model spregnut sa dnevnom funkcijom D (jed. 3.1.1). Vremenske serije koncentracije kortizola ilustruju tri kvalitativno različita odgovora HPA sistema u zavisnosti od φ_u : relativne amplitude unutardnevnih oscilacija su **(b)** značajno povećane, $A_{rel} > 1$, za $\varphi_u = 0,365$, **(c)** ostaju nepromenjene, $A_{rel} = 1$, za $\varphi_u = 0,700$, ili su **(d)** skoro u potpunosti prigušene, $A_{rel} \approx 0$ (kvenčing), za $\varphi_u = 0,857$. [27]

3.1.4.1.2 Efekat intenziteta i dnevnog faznog ugla akutnog stresa

Odgovor HPA sistema na perturbacije zavisi i od dnevnog faznog ugla (slika 3.1.4). Na slici 3.1.4 a prikazan je odgovor HPA sistema na perturbacije različitog intenziteta (različite koncentracije spoljnjeg kortizola, [CORT]) primenjenih tokom dana ili tokom noći. Odgovor HPA sistema je prikazan kao zavisnost relativne amplitude referentne oscilacije, A_{rel} , od koncentracije spoljnje pulsne perturbacije kortizolom, [CORT]: $A_{rel} = f([CORT])$. Prava $A_{rel} = 1$ razdvaja dijagram na dva dela: oblast gde dolazi do smanjenja ($A_{rel} < 1$) ili povećanja ($A_{rel} > 1$) amplitude oscilacija koncentracije kortizola kao odgovor na primenjene akutne perturbacije. Presek linije $A_{rel} = 1$ i krive $A_{rel} = f([CORT])$ se dešava u tački za čiju vrednost koncentracije perturbator ne menja relativnu amplitudu koncentracije kortizola. Perturbacije su primenjene pri istom unutar dnevnom faznom uglu ($\varphi_u = 0,766$).

Prikazane numeričke simulacije su pokazale da je dinamička reakcija HPA sistema na stres u toku noći generalno intenzivnija od reakcije na ekvivalentni stimulus koji je delovao u toku dana (slika 3.1.4 a). Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost da bi iste akutne doze glukokortikoida mogle izazvati različite reakcije unutar HPA sistema u zavisnosti od toga u koje doba dana (dan ili noć) je glukokortikoidni lek uzet odn. od vrednosti dnevnog faznog ugla φ_c u kojem se nalazila oscilacija koncentracije kortizola u trenutku kada je terapija primenjena.



Slika 3.1.4. Efekat dnevne faze (obdanica/noć) akutnih perturbacija spoljnjim kortizolom na odgovor HPA sistema. Sve perturbacije su primenjivane pri istoj unutardnevnoj fazi ($\varphi_u = 0,766$). **(a)** Relativna amplituda koncentracije kortizola (A_{rel}) data je kao funkcija pulsnih perturbacija spoljnjim kortizolom različitih koncentracija ($[CORT]$). Perturbacije su primenjivane u noćnoj, $\varphi_c = 0,168$ (■), i dnevnoj fazi dnevnog ritma, $\varphi_c = 0,428$ (○). Strelice okrenute na dole označavaju vrednosti $[P]_{g,noć}$, $[P]_{n,noć}$, $[P]_{min,noć}$ u toku noćne faze, dok strelice okrenute na gore označavaju vrednosti $[P]_{g,dan}$, $[P]_{n,dan}$, $[P]_{min,dan}$ u toku dnevne faze. Vremenske evolucije koncentracije kortizola nakon delovanja pulsne perturbacije spoljnjim kortizolom koncentracije $0,4 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ primenjenim u **(b)** uzlaznoj (ascendentnoj, kod čoveka noćnoj) i **(c)** silaznoj (descendentnoj, kod čoveka dnevnoj) fazi dnevne funkcije D . [27]

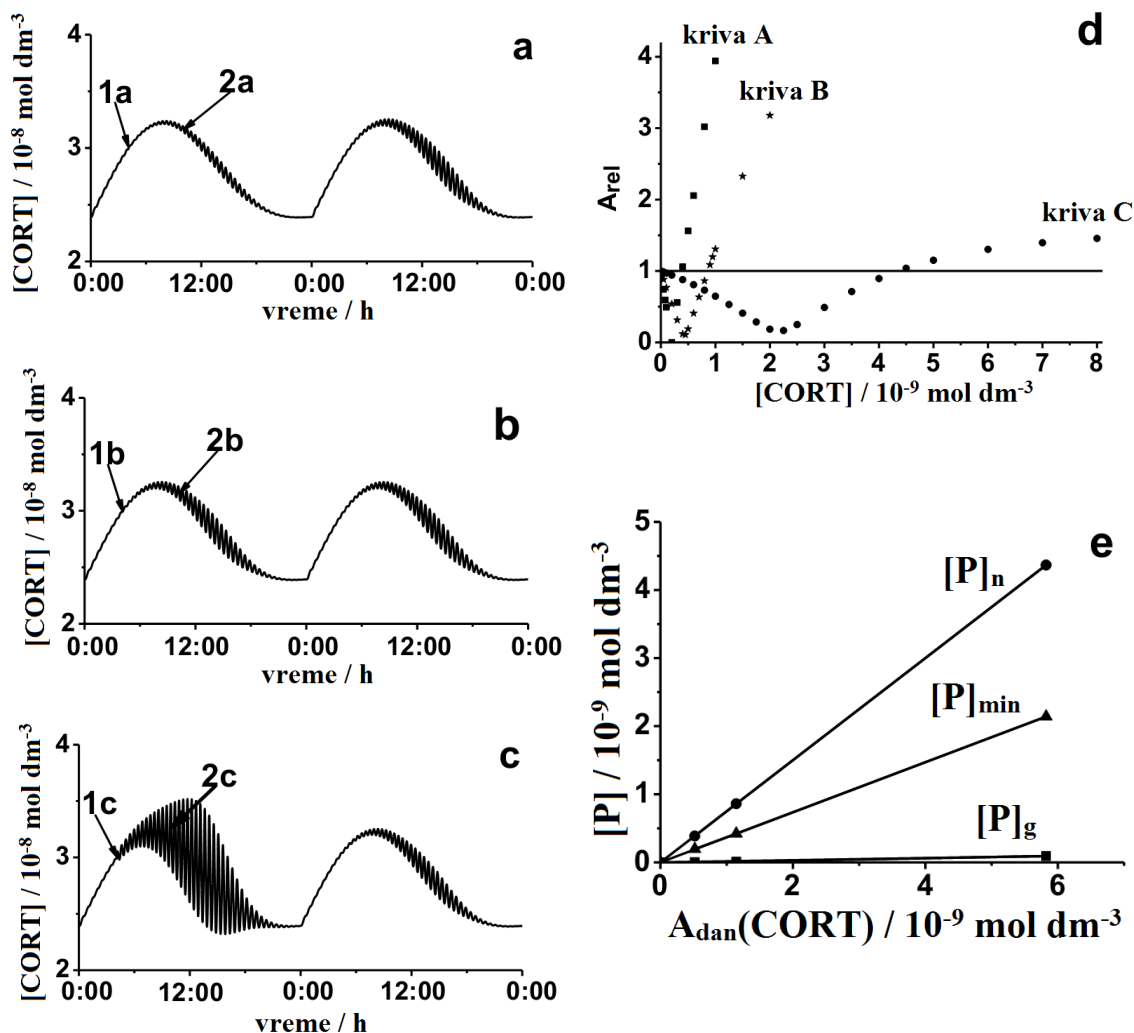
3.1.4.1.3 Efekat dve uzastopne akutne perturbacije na dinamiku HPA sistema

Na slici 3.1.5 predstavljen je dinamički odgovor modela HPA sistema na dve uzastopne perturbacije kortizolom.

Stanja (a), (b) i (c) (slika 3.1.5 a-c, redom) dobijena su primenjujući primarne perturbacije pomoću spoljnog kortizola različitog intenziteta (koncentracije), pri istom unutardnevnom faznom uglu $\varphi_u = 0,766$ odabrane perturbovane unutardnevne oscilacije, koja se pojavljuje tokom uzlazne (ascendentne) faze dnevnog ritma (noć kod ljudi, oko 04:00 h). Svako od dobijenih stanja okarakterisano je različitom vrednošću amplitude odabrane referentne unutardnevne oscilacije koncentracije kortizola (čiji se maksimum pojavljuje oko 10 h), $A_{\text{dan}}(\text{CORT})$. Stanje (a) (slika 3.1.5 a) je dobijeno za intenzitet primarne perturbacije $[\text{CORT}] = 0,075 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$, i karakteriše ga sniženje amplituda ($A_{\text{rel}} < 1$, $A_{\text{dan}}^{\text{a}}(\text{CORT}) = 0,5190 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$); stanje (b) (slika 3.1.5 b) odgovara bazalnom stanju, kada nema primarne perturbacije ($[\text{CORT}] = 0 \text{ mol dm}^{-3}$, $A_{\text{rel}} = 1$, $A_{\text{dan}}^{\text{b}}(\text{CORT}) = 1,1445 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$); dok stanje (c) (slika 3.1.5 c) nastaje pri $[\text{CORT}] = 0,4 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$, i karakteriše ga povećanje amplituda unutardnevnih oscilacija u odnosu na bazalno stanje ($A_{\text{rel}} > 1$, $A_{\text{dan}}^{\text{c}}(\text{CORT}) = 5,8210 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$).

Nakon toga je svako od tri dobijena stanja (a), (b) i (c), dodatno perturbovano pomoću serije sekundarnih perturbacija spoljnim kortizolom različitih koncentracija. Sekundarne perturbacije primenjivane su pri uvek istom unutardnevnom faznom uglu, $\varphi_u = 0,850$, na odabranoj unutardnevnoj oscilaciji koncentracije kortizola (pojavljuje se u toku silazne (descendentne) faze dnevnog ritma, oko 10:00 h). Ove sekundarne perturbacije (strelice 2a, 2b ili 2c, slika 3.1.5 a-c, redom) dovode do različitog dinamičkog odgovora HPA sistema, shodno početnom stanju sistema u trenutku delovanja perturbacije (krive A, B i C, redom, slika 3.1.5 d). Dodatno, sa porastom amplitude perturbovane oscilacije koncentracije kortizola, $A_{\text{dan}}(\text{CORT})$, pri konstantnoj vrednosti unutardnevnog i dnevnog faznog ugla u kojem se primenjuju sekundarne perturbacije, ustanovljen je i porast vrednosti dinamičkih parametara koji karakterišu

odgovor modela HPA sistema na perturbacije (parametri osetljivosti HPA sistema, $[P]_{g,dan}$, $[P]_{n,dan}$, $[P]_{min,dan}$) (slika 3.1.5 e).



Slika 3.1.5. Odgovor modela HPA sistema na dve uzastopne akutne perturbacije spoljnim kortizolom. Vremenske serije koncentracije kortizola dobijene za različite intenzitete primarne perturbacije spoljnim kortizolom (strelica 1a, 1b i 1c), pokazuju, redom: (a) sniženje amplituda, (b) da nema promene amplituda, (c) povećanje amplituda oscilacija koncentracije kortizola. (d) Kriva A, kriva B i kriva C, redom, prikazuje zavisnost odgovora različitih stanja HPA sistema, (a), (b) i (c), od serije sekundarnih perturbacija (strelica 2a, 2b i 2c). (e) Zavisnost parametara osetljivosti HPA sistema, $[P]_g$, $[P]_n$ i $[P]_{min}$, od veličine amplitude perturbovane unutardnevne oscilacije koncentracije kortizola ($A_{dan}(CORT)$). [27]

Ovi rezultati pokazuju da senzitivnost HPA sistema na perturbacije zavisi od istorije samog sistema tj. od dinamičkog stanja sistema determinisanog prethodnom perturbacijom. Dodatno, ovi rezultati ukazuju na važnost amplitude perturbovane

unutardnevne oscilacije kao značajne dinamičke odrednice stresnog odgovora HPA sistema: što je veća vrednost (slika 3.1.5e).

3.1.4.2 Simulacije efekata hroničnog stresa

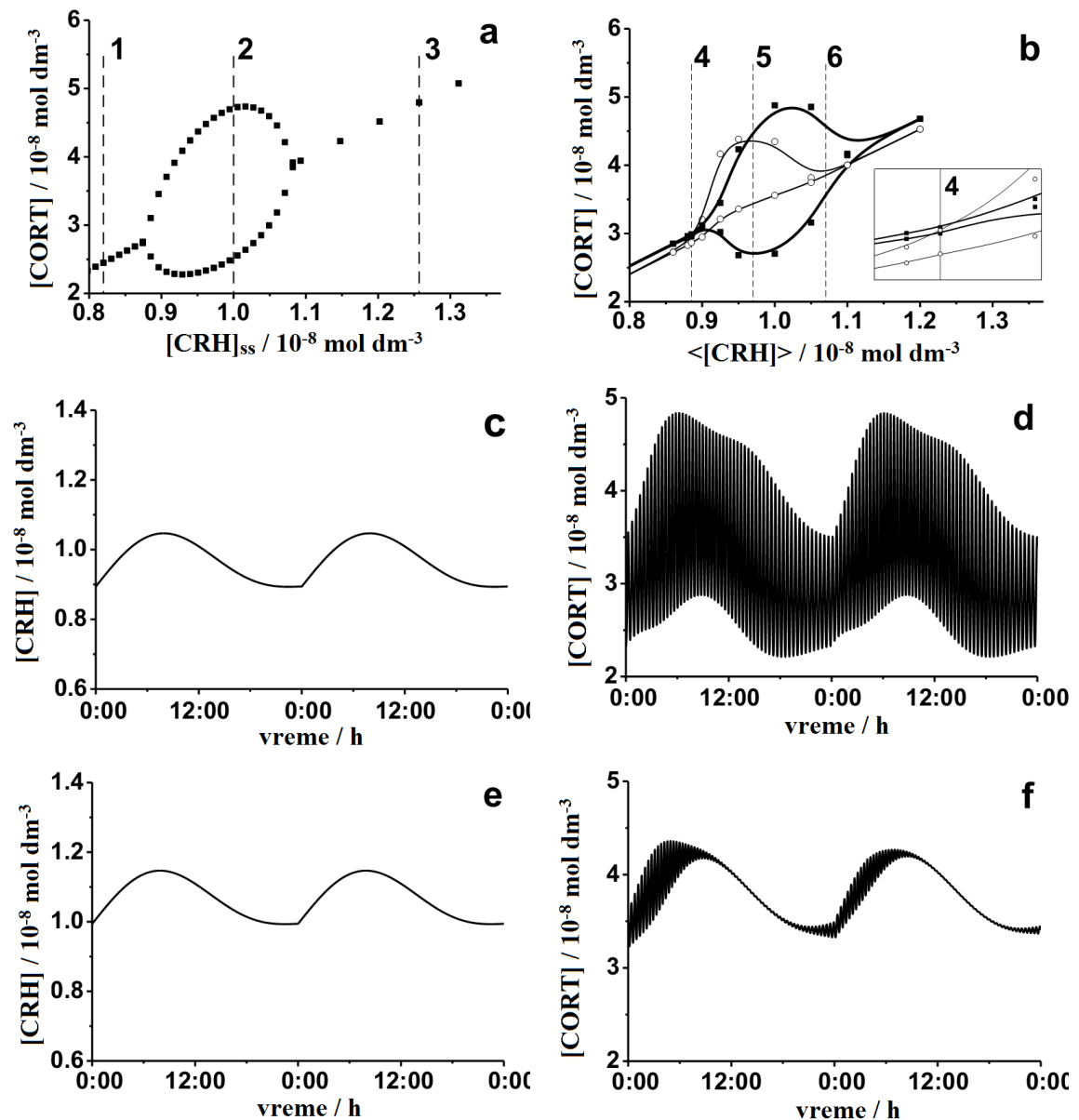
Hronični stres se može definisati kao fiziološko stanje organizma nastalo kao odgovor na kontinuirano ili diskontinuirano periodično delovanje faktora koji remete optimalno stanje organizma (homeostazu) tokom više nedelja, meseci ili dužeg vremenskog perioda [128]. Odgovor HPA sistema u hroničnom stresu može postati neadekvatan usled duže, kontinuirane izloženosti organizma delovanju stresora. Druga mogućnost neadekvatne reakcije HPA sistema tokom hroničnog stresa javlja se usled kumulativnog efekta delovanja uzastopnih akutnih stresora (perturbacija). U tom slučaju svaki naredni stresor u nizu počinje da ispoljava svoje delovanje dok se HPA sistem još uvek nalazi u perturbovanom stanju (u koje je dospelo delovanjem prethodnog stresora) jer nije bilo dovoljno vremena da se okonča reakcija HPA sistema na dejstvo prethodnog stresora i kompletira relaksacija HPA ose do bazalnog (neperturbovanog) stanja [124].

Kako je ranije istaknuto u poglavlju 1.5, u prethodnim istraživanjima pomoću osnovnog modela HPA sistema, efekat hroničnog stresa na HPA sistem modeliran je u vidu serije akutnih CRH perturbacija čije su se amplitude i vreme delovanja nasumično menjale od jedne do druge perturbacije u seriji [18]. Takvo uzastopno perturbovanje generisalo je kompleksni dinamički odgovor HPA sistema, sa nasumičnim varijacijama amplitude i frekvencije unutardnevnih oscilacija koncentracije kortizola [18]. Iako su pri različitim obrascima delovanja perturbacija dobijeni različiti dinamički odgovori HPA sistema, u svim slučajevima, nezavisno od detalja, srednji nivo CRH je bio modifikovan. Modifikacija srednjeg nivoa CRH pod delovanjem hroničnog stresa registrovana je i u eksperimentalnim istraživanjama [6], ukazujući da promene srednjeg nivoa CRH mogu predstavljati dodatni uzrok promenama u dinamičkom ponašanju HPA sistema, koje se manifestuju u mnogim metaboličkim i psihijatrijskim poremećajima [129, 130]. U tom pogledu, u ovom radu, efekat hroničnog stresa na dinamička stanja HPA sistema je ispitivan promenom srednjeg nivoa CRH ili amplituda dnevnih oscilacija CRH.

3.1.4.2.1 Efekat hroničnog stresa na unutarnevne oscilacije

U varijanti modela u kojem nema sprezanja sa dnevnom funkcijom D (jed. (3.1.1)), vrednost koncentracije CRH u ustaljenom stanju, $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$, značajno utiče na unutarnevnu dinamiku HPA sistema (slika 3.1.1 a i b). Na slici 3.1.6 a predstavljen je bifurkacioni dijagram promene dinamičkih stanja HPA sistema sa promenom $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$ kao kontrolnog parametra modela. Na tom dijagramu oscilatorna stanja su prikazana kao parovi tačaka koje odgovaraju koncentracijama kortizola u maksimumu odn. minimumu unutarnevne oscilacije za datu vrednost $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$, dok pojedinačne tačke na dijagramu označavaju stabilna ustaljena stanja koncentracije kortizola. Vertikalne linije na slici 3.1.6 a označavaju tri različita dinamička stanja kortizola (stanje (1), (2) i (3)) koja se javljaju pri različitim vrednostima nivoa $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$: stanje (1) odgovara nizak nivo ($[\text{CRH}]_{\text{ss}} = 0,82 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$), stanju (2) odgovara srednji nivo ($[\text{CRH}]_{\text{ss}} = 1,00 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$), a stanju (3) visok nivo $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$ ($[\text{CRH}]_{\text{ss}} = 1,26 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$).

Dijagram na slici 3.1.6 a pokazuje da unutarnevne oscilacije (za skup vrednosti ostalih parametara modela iz tabele 1.1) postoje samo u ograničenoj oblasti faznog prostora, izvan čije se granice, bilo u smeru smanjenja ili povećanja $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$, kortizol nalazi u stabilnom neravnotežnom stacionarom (odnosno ustaljenom) stanju.



Slika 3.1.6. Uticaj hroničnog stresa na dinamička stanja koncentracije kortizola. Bifurkacioni dijagram dinamike koncentracije kortizola ($[CORT]$) u modelu HPA sistema (a) bez dnevnog ritma i (b) sa dnevnim ritmom, u zavisnosti od stacionarne koncentracije CRH, $[CRH]_{ss}$, odn. srednjeg dnevnog nivoa CRH, $\langle [CRH] \rangle$, redom, kao parametra hroničnog stresa. Dinamičkom stanju (5) odgovaraju vremenske serije (c) i (d), stanju (6), vremenske serije (e) i (f) koncentracije CRH ($[CRH]$) i kortizola $[CORT]$, redom. Oznaka (■) odn. (○) označava unutardnevne oscilacije kortizola u toku noći odn. u toku dana, redom. U svim slučajevima, $d_2 = 0,957$. [27]

3.1.4.2.2 Efekat hroničnog stresa na dinamiku spregnutih unutar dnevnih i dnevnih oscilacija

Kada je model spregnut sa dnevnom funkcijom D (jed. 3.1.1), $\langle[CRH]\rangle$ predstavlja parametar hroničnog stresa, imajući u vidu da hronični stres može u toku dužeg vremenskog perioda ili čak trajno značajno modifikovati nivoe i dinamičko ponašanje koncentracija hormona [2], i tako usmeriti HPA sistem prema nefiziološkoj oblasti njegovog faznog prostora. Variranje parametra $\langle[CRH]\rangle$ dovelo je do kvalitativnih promena u dinamici HPA sistema (slika 3.1.6 b), analognim bifurkacionom obrascu dobijenom u slučaju kada nema sprežanja modela sa dnevnom funkcijom (slika 3.1.6 a): oscilacije postoje samo u datom opsegu vrednosti $\langle[CRH]\rangle$, izvan čijih granica (bilo u smeru sniženja ili povećanja $\langle[CRH]\rangle$) sistem ima stabilno ustaljeno stanje. Za razliku od bifurkacionog dijagrama na slici 3.1.6 a, u ovom slučaju, promenom vrednosti parametra $\langle[CRH]\rangle$ javlja se različit efekat u toku dana (slika 3.1.6 b, puni kvadrati) i u toku noći (slika 3.1.6 b, prazni krugovi). Vertikalne linije na slici 3.1.6 b označavaju tri različita dinamička stanja (stanje (4), (5) i (6)) koja nastaju zavisnosno od vrednosti nivoa $\langle[CRH]\rangle$. Stanje (4) odgovara bazalnim fiziološkim uslovima i javlja se pri niskoj vrednosti $\langle[CRH]\rangle$ ($\langle[CRH]\rangle = 0,88524 \cdot 10^{-8}$ mol dm⁻³). U ovom stanju, unutar dnevne oscilacija koncentracije kortizola se jasno uočavaju tokom dana, dok su tokom noći njihove amplitude veoma male (oblast uvećena i izdvojena u pravougaoniku na slici 3.1.6 b). Stanje (5) nastaje pri srednjim vrednostima $\langle[CRH]\rangle$ ($\langle[CRH]\rangle = 0,97 \cdot 10^{-8}$ mol dm⁻³), kada su unutar dnevne oscilacije koncentracije kortizola relativno velikih amplitude i javljaju se i tokom dana i tokom noći. Končno, stanje (6) se uspostavlja pri visokom nivou $\langle[CRH]\rangle$ ($\langle[CRH]\rangle = 1,07 \cdot 10^{-8}$ mol dm⁻³), Vremenske serije koncentracije CRH odn. kortizola prikazana su za stanje (4) na slici 3.1.1 c odn. 3.1.1 d, za stanje (5) na slici 3.1.6 c odn. 3.1.6 d, a za stanje (6) na slici 3.1.6 e odn. 3.1.6 f, redom.

Bifurkacioni dijagram na slici 3.1.6 b pokazuje da sa porastom faktora hroničnog stresa $\langle[CRH]\rangle$ kao kontrolnog parametra, po ulasku sistema u oscilatorni region, amplitude unutar dnevne oscilacija [CORT] prvo rastu, dostižu maksimalnu vrednost, nakon čega počinju da opadaju sve dok sistem ne prođe kroz bifurkacionu

tačku i uđe u stabilno ustaljeno stanje. To znači da ispitivani model HPA sistema predviđa da kontinuirani porast $\langle [CRH] \rangle$ može izazvati i povećanje i smanjenje unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola, što ukazuje da jedna ista vrsta hroničnog stresora može izazvati kvalitativno suprotne odgovore HPA sistema. Ovakvo predviđanje modela može imati veoma bitne implikacije. Amplituda unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola se može smatrati merilom kapaciteta HPA sistema za odupiranje efektima akutnog stresa, dok se $\langle [CRH] \rangle$ može smatrati merilom intenziteta hroničnog stresa. S obzirom na navedeno, mogao bi se izvesti zaključak da bi blaga povećanja koncentracije kortizola nastala u početnim etapama HPA aktivnosti u uslovima hroničnog stresa, mogla doprineti povećanju homeostatskog kapaciteta HPA sistema pri delovanju spoljnjih akutnih perturbatora. Ukoliko uslovi hroničnog stresa nastave da deluju duže vreme, što bi u modelu odgovaralo daljem povećanju $\langle [CRH] \rangle$, dolazi do smanjenja amplituda oscilacija koncentracije kortizola, a time i mogućnosti HPA ose da adekvatno reaguje u stanjima akutnog stresa. Ukoliko bi se nastavila akumulacija štetnih efekata hroničnog stresa, moglo bi doći i do potpunog gubitka dinamičke regulacije unutar HPA sistema usled prelaska sistema u drugačiji tip dinamičkog stanja, kao što je stabilno ustaljeno stanje (slika 3.1.6b).

Vremenske serije $[CRH]$ i $[CORT]$ (slike (3.1.6 c) – (3.1.6 f)) prikazuju kako se sa porastom $\langle [CRH] \rangle$ menjaju dinamička stanja HPA sistema. Uočljivo je da sa porastom $\langle [CRH] \rangle$ dolazi i do promene odnosa amplituda unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola u toku dana i u toku noći. U stanju (4) (nizak nivo $\langle [CRH] \rangle$) unutar dnevne oscilacije $[CORT]$ jasno se uočavaju tokom dana, dok su tokom noći njihove amplitude male (v. na bifurkacionom dijagramu sa slike 3.1.6 b oblast uvećenu i izdvojen u pravougaoniku, kao i vremensku seriju $[CORT]$ na slici 3.1.1 d), dok su u stanju (5) (srednji nivo $\langle [CRH] \rangle$) unutar dnevne oscilacije $[CORT]$ relativno velikih amplituda i tokom dana i tokom noći (slika 3.1.6 d). U stanju (6) amplitude unutar dnevnih oscilacija $[CORT]$ su u toku noći veće od onih koje se javljaju u toku dana (slika 3.1.6 f). To znači da model predviđa da pri dovoljno visokim vrednostima srednjeg dnevnog nivoa CRH ($\langle [CRH] \rangle$), kao parametra hroničnog stresa, može nastati dinamičko stanje koncentracije kortizola u kojem je odnos amplituda unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola u toku dana i noći invertovan u odnosu

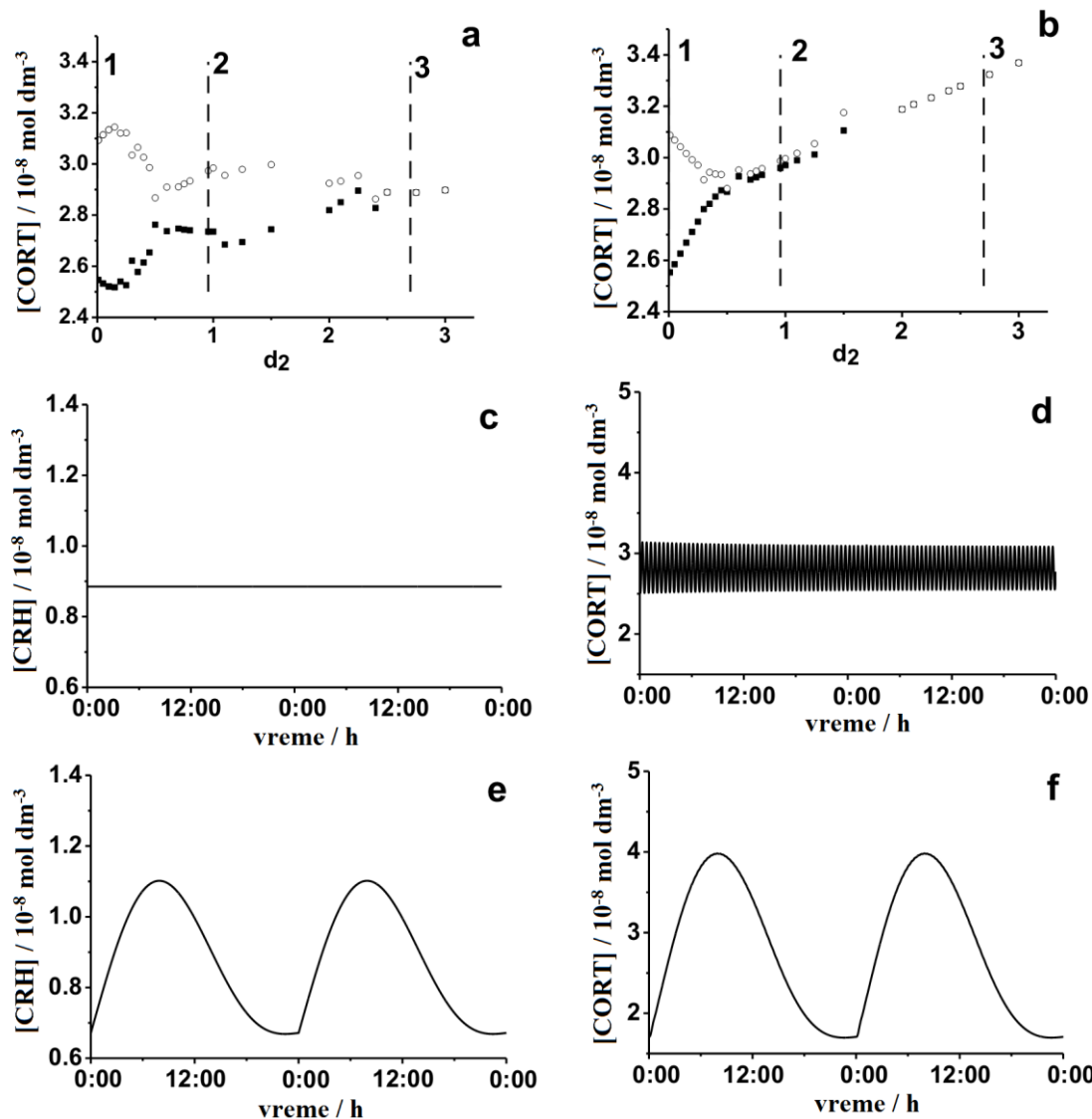
na dinamičko stanje koje odgovara bazalnim fiziološkim uslovima (uporediti sliku 3.1.6 f sa slikom 3.1.1 d).

3.1.4.2.3 Efekat amplitude dnevnih oscilacija koncentracije CRH na dinamiku HPA sistema

Promena vrednosti amplitude dnevnih oscilacija koncentracije CRH promenom vrednosti d_2 kao kontrolnog parametra, takođe uzrokuje promene u dinamičkom ponašanju HPA sistema (slika 3.1.7). Kako je već ukazano, parametar d_2 određuje amplitudu dnevnog ritma odn. dnevne funkcije D , množeći vremenski promenljivi, periodični deo ove funkcije (jed. 3.1.1). Kao i u slučaju efekta $\langle [CRH] \rangle$, promena d_2 različito utiče na dinamiku HPA sistema u toku dana (slika 3.1.7 a) ili u toku noći (slika 3.1.7 b).

U slučaju kada je amplituda dnevnih oscilacija nula ($d_2 = 0$), odn. kada nema sprezanja dnevne funkcije sa modelom, CRH se nalazi u stabilnom ustaljenom stanju i njegova produkcija i sekrecija u hipotalamo-hipofiznu portalnu cirkulaciju se ne menjaju sa vremenom (slika 3.1.7 c). Tada koncentracija kortizola ispoljava samo unutar-dnevnu oscilatornu dinamiku (slika 3.1.7 d). Sa daljim povećanjem d_2 , menja se vrednost amplitude unutar-dnevnih oscilacija koncentracije kortizola (slike 3.1.6. a i b). Pri dovoljno visokim vrednostima d_2 odn. pri dovoljno visokim vrednostima amplituda dnevnih oscilacija CRH (slika 3.1.7 e) dolazi do gašenja unutar-dnevnih oscilacija koncentracije kortizola, tako da koncentracija kortizola ispoljava samo dnevne oscilacije (slika 3.1.7 f).

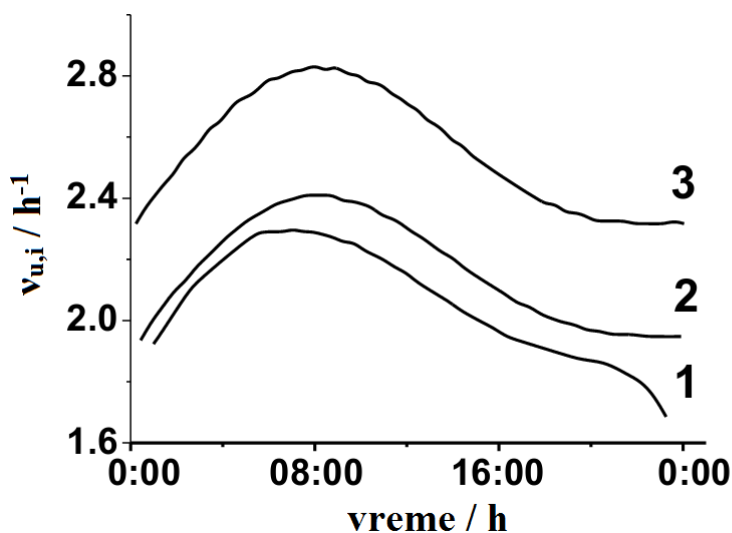
Treba napomenuti da su bifurkacioni dijagrami na slikama 3.1.5 b, 3.1.6 a i 3.1.6 b pokazali da je pulsabilnost (odn. unutar-dnevna oscilatornost) koncentracije kortizola, kada su ove oscilacije superponirane na dnevni ritam (sprezanje modela sa D), moguća samo za određene intervale vrednosti parametara hroničnog stresa, $\langle [CRH] \rangle$ odn. d_2 . Van tih okvira dinamička stanja HPA sistema postaju i kvalitativno drugačija nego u fiziološkom stanju, ukazujući na uslove koji mogu dovesti do ozbiljnih (verovatno i fatalnih) iregularnosti u održavanju homeostaze.



Slika 3.1.7. Dinamika koncentracije kortizola u funkciji amplitude dnevnih oscilacija CRH. Efekat je modeliran promenom parametra d_2 dnevne funkcije D , kao bifurkacionog parametra. Bifurkacioni dijagram pokazuje koncentraciju kortizola za referentnu unutardnevnu oscilaciju kortizola u (a) dnevnom i (b) noćnom periodu. Oscilatorna oblast je predstavljena parovima tačaka, gde prazni krugovi označavaju maksimume, a puni kvadrati minimume unutardnevnih oscilacija koncentracije kortizola; stabilna ustaljena stanja su označena pojedinačnim praznim krugovima. Za $d_2 = 0$, amplitude dnevnih, $A_{\text{dan}}(\text{CORT})$, i noćnih, $A_{\text{noć}}(\text{CORT})$, unutardnevnih oscilacija koncentracije kortizola imaju jednake vrednosti: $A_{\text{dan}}(\text{CORT}) = A_{\text{noć}}(\text{CORT}) = 0,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$. Vertikalne linije 1, 2 i 3, označavaju različita dinamička stanja: u stanju (1), $d_2 = 0$, koncentracija CRH je u stabilnom ustaljenom stanju (c), dok koncentracija kortizola pokazuje samo unutardnevne oscilacije (d). U uslovima stresa, u stanju (3), pri višim vrednostima d_2 ($d_2 = 2,7$), koncentracije (e) CRH i (f) kortizola imaju dnevnu oscilatornu evoluciju, dok unutardnevne oscilacije koncentracije kortizola više ne postoje (slika 3.1.7f). U svim slučajevima, $\langle [\text{CRH}] \rangle = 0,88524 \text{ mol dm}^{-3}$. [27]

3.1.4.2.4 Efekat hroničnog stresa na frekvenciju unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola

Pri bazalnim uslovima, kada ne postoji sprezanje između modela i funkcije D , frekvencija unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola, $\nu_{u,i}$, ostaje konstantna u vremenu (slika 3.1.1b, slučaj 2). Nasuprot tome, u slučaju kada postoji ovo sprezanje, unutar dnevna frekvencija postaje periodična funkcija od vremena (sa periodom od 24 h), pokazujući najvišu vrednost tokom dnevnog dnevnog pika (slika 3.1.8, kriva 1).



Slika 3.1.8. Efekat dnevnog ritma na frekvenciju unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola, $\nu_{u,i} = 1/T_{u,i}$, u bazalnim uslovima (kriva 1) i uslovima hroničnog stresa (krive 2 i 3). Zavisno od vrednosti $\langle[CRH]\rangle$, frekvencija unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola, i njihov broj u toku 24 h, (N_u), su modifikovani: (1) $\langle[CRH]\rangle = 0,88524 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $N_u = 49$ (bazalna fiziologija); (2) $\langle[CRH]\rangle = 0,925 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $N_u = 52$ (hronični stres); (3) $\langle[CRH]\rangle = 1,05 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $N_u = 64$ (hronični stres). [27]

U uslovima hroničnog stresa, modeliranog putem variranja vrednosti srednje dnevne koncentracije CRH u hipotalamo-hipofiznom portalnom krvotoku, $\langle[CRH]\rangle$, model predviđa funkcionalnu zavisnost unutar dnevne frekvencije u vremenu analognu onoj dobijenoj u bazalnim uslovima, sa razlikom što se sa povećanjem vrednosti parametra hroničnog stresa $\langle[CRH]\rangle$ dobijene krive translatorno pomeraju duž ordinatne ose prema višim vrednostima $\nu_{u,i}$ (slika 3.1.8, krive 2 i 3).

3.1.4 Diskusija efekata akutnog i hroničnog stresa na dinamička stanja HPA sistema i fiziološke promene

Kao što je bilo i očekivano perturbacije pomoću kortizola i CRH izazvale su značajne promene dinamike HPA sistema (slike 3.1.3. – 3.1.7). Dobijeni rezultati ukazuju da akutni stres izaziva prolazne efekte na dinamiku HPA sistema (slike 3.1.3 – 3.1.4), dok hronični stres proizvodi dugotrajnije promene, prevodeći celokupan HPA sistem u novo dinamičko stanje (slike 3.1.5 – 3.1.7). Ova nova dinamička stanja, u koja sistem dospeva pod uticajem stresa, okarakterisana su različitim amplitudama, frekvencijama i opštim izgledom unutar dnevnih oscilacija koncentracija vrsta u HPA sistemu.

Kao moguće eksperimentalne potvrde predviđanja modela da dinamički odgovor HPA sistema na akutne perturbacije zavisi od unutar dnevnog faznog ugla vremenske serije koncentracije kortizola u trenutku delovanja perturbacije (slika 3.1.3), može se navesti nekoliko *in vivo* studija izvedenih na ljudima [9] i pacovima [11-13]. Russel i saradnici [9] su na zdravim osobama ispitivali odgovor HPA sistema na akutne perturbacije pomoću spoljnog glukokortikoida prednizolona. Prednizolon je sintetički analog kortizola, čija je glukokortikoidna aktivnost, izražena kao potentnost vezivanja za GR receptore, oko četiri puta veća od aktivnosti kortizola [131], i često se upotrebljava u naučnim ispitivanjima i kao medikament tokom glukokortikoidne terapije [46]. Navedeni autori su pokazali da stepen brze inhibicije unutrašnjeg kortizola izazvane akutnom perturbacijom pomoću prednizolona zavisi od trenutka kada je perturbacija primenjena u odnosu na fazu (minimum, uzlazni deo, maksimum, silazni deo) koju je tada imala perturbovana unutar dnevnoscilacija. Konkretno, stepen inhibicije je bio više izražen što je bio duži vremenski interval od trenutka kada je perturbacija prednizolonom primenjena (što u modelu odgovara veličini $t_{u,p,i}$, v. jed. (3.1.6)) do trenutka otpočinjanja (u modelu predstavljenog kao prvi (levi) minimum, $t_{u,min_1,i}$, v. sliku 3.1.2) narednog unutar dnevnog pulsa (odn. oscilacije) [9]. Ovi rezultati ukazuju da reaktivnost HPA sistema na akutne perturbacije prednizolonom zavisi od faznog ugla unutar dnevnoscilacija koncentracije endogenog kortizola, φ_u (jed. (3.1.6)), u kojoj je delovala ta akutna perturbacija, što je u skladu sa predviđanjem ovog modela. (slika 3.1.3). U ispitivanom modelu, navedeni eksperimentalni nalazi bi odgovarali simulacijama u kojima stepen inhibicije HPA sistema odn. smanjenje

relativne amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola, A_{rel} (jed. (3.1.5)), zavisi od toga u kom delu silazne (descendentne) faze perturbovane unutardnevne oscilacije je primenjena perturbacija. Zaista, prema predviđanjima modela, akutna perturbacija spoljnim kortizolom jednog istog intenziteta može izazvati različiti stepen smanjenja unutardnevnih oscilacija kortizola (slika 3.1.3a), pa čak i njihovo potpuno prigušenje (kvenčing unutardnevnih oscilacija) (slika 3.1.3d), zavisno od toga u kojoj unutardnevnoj fazi na silaznom (descendentnom) delu perturbovane unutardnevne oscilacije je delovala perturbacija.

U *in vivo* studijama na pacovima, Windle i saradnici [11-13] su ispitivali zavisnost dinamičkog odgovora koncentracije kortikosterona (glavni glukokortikoid kod pacova i drugih glodara) na akutni stres od faze unutardnevnog ritma (silazna (descendentne) ili uzlazne (ascendentne)) pri kojoj je akutna perturbacija delovala. U ovim eksperimentima pacovi su bili izloženi akutnom stresoru, u vidu snažnom zvučnog signala jačine 114 dB u trajanju od 5 minuta. Ove akutne perturbacije zvučnim signalom primenjen su na dve grupe pacova: u jednoj grupi nalazili su se pacovi kod kojih je akutna perturbacija snažnim zvučnim signalom primenjena onda kada se njihov unutardnevni ritam kortikosterona nalazio u uzlaznoj fazi ili tzv. međupulsnoj fazi (tj. fazi između dve unutardnevne oscilacije, kojoj u modelu odgovara deo unutardnevnog ritma od trenutka završetka prethodne do početka naredne unutardnevne oscilacije odn. pulsa), dok su drugu grupu sačinjavali pacovi kod kojih je zvučna perturbacija primenjena dok se njihov unutardnevni ritam kortikosterona nalazio u silaznoj (descendentnoj) fazi. U prvoj grupi pacova, gde je akutni stres izazvan u uzlaznoj fazi [11-13] ili u međupulsnoj fazi [13] bazalnog unutardnevnog ritma kortikosterona registrovano je značajno povećanje nivoa kortikosterona, dok u drugoj grupi pacova, u kojoj je akutna zvučni perturbacija primenjena u silaznoj fazi unutardnevnog ritma kortikosterona, nije uočen značajan odgovor HPA sistema na stres.

Ovi eksperimentalni rezultati su u skladu sa predviđanjem modela da akutna perturbacija istog intenziteta može izazvati različiti dinamički odgovor HPA sistema, koji se ispoljava u vidu promene amplitude unutardnevnih oscilacija kortikosterona, za različite vrednosti unutardnevnog faznog ugla perturbovane unutardnevne oscilacije (slika 3.1.3).

Kako je ranije istaknuto, tokom stresa dolazi do intenzivnog lučenja CRH i posledičnih promena u aktivnosti HPA sistema. Kako bi utvrdili da li postoji zavisnost odgovora HPA sistema od faze unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortikosterona i onda kada se umesto konkretnog fizičkog stresora (snažan zvučni signal) direktno upotrebi CRH, na pacovima su sprovedeni dodatni eksperimenti. Slično prethodnim eksperimentima, pacovi su bili podeljeni u dve grupe, pri čemu je u jednoj grupi pacova CRH intravenski injektiran tokom uzlazne faze unutar dnevnog ritma kortikosterona, dok je u drugoj grupi pacova ista doza CRH injektirana u silaznoj fazi [12]. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da intravenska injekcija CRH (u dozi od 2 µg), kao oblik akutne perturbacije HPA sistema, nije uspela da izazove statistički značajnu razliku u reaktivnosti HPA sistema između te dve grupe pacova [12].

Moguće objašnjenje ovih rezultata može ležati u tome što primenjena doza CRH nije bila adekvatna za izazivanje različitih odgovora. Naime, dinamički odgovor HPA sistema na stres istovremeno zavisi ne samo od trenutka tj. faze delovanja perturbatora već i od intenziteta primenjene perturbacije (slika 3.1.4).

Slično prethodnim eksperimentima u kojima je ispitivan uticaj faze unutar dnevnog ritma kortizola (odn. kortikosterona) pri kojoj je delovao akutni perturbator na dinamički odgovor HPA ose, Russel i sar. [9] su ispitivali i to da li postoje razlike u dinamičkom odgovoru HPA sistema na akutne perturbacije intravenskom infuzijom prednizolona kod zdravih muškaraca u zavisnosti od faze dnevnog ritma kortizola odn. doba dana kada je infuzija prednizolonom izvršena. Jedna grupa ispitanika je primila infuziju prednizolona u trajanju od 5 minuta u toku popodneva (što kod čoveka odgovara silaznoj fazi dnevnog ritma kortizola), dok je druga grupa primila istu dozu prednizolona u toku prepodneva (tj. u uzlaznoj fazi dnevnog ritma kortizola). Rezultati su pokazali da između dve grupe ispitanika nisu dobijene statistički značajne razlike u pogledu promena amplituda ili nivoa koncentracija kortizola niti koncentracija ACTH, ukazujući da dnevna faza pri kojoj je akutni perturbator delovao nema uticaja na dinamiku koncentracije kortizola [9]. Međutim, ovi eksperimenti su izvedeni tokom prepodneva ili popodneva, ali ne i tokom noći, kada su amplitude oscilacija kortizola najniže u toku 24 h, i kada bi se, prema predviđanjima ovde ispitivanog modela, mogle očekivati značajnije razlike u dinamičkom odgovoru HPA ose na akutne perturbacije (slika 3.1.4). Osim toga, u

eksperimentima je korišćena samo jedna doza prednizolona. Zato bi trebalo sprovesti dodatne eksperimente u kojima bi različite doze prednizolona (ili nekog drugog spoljnog glukokortikoida) bile primenjene u različitim dobima dana odn. pri različitim fazama dnevnog ritma kortizola, a po mogućstvu i pri istim fazama unutardnevne oscilacije kortizola, pre nego što se odbaci prepostavka da kod ljudi ne postoji dnevna zavisnost dinamičkog odgovora HPA sistema na perturbacije prednizolonom (ili nekim drugim spoljnim glukokortikoidom).

Zbog dužine trajanja i/ili učestalosti delovanja, hronični stres može izazvati u različitim delovima mozga (npr. hipokampus, amigdala i prefrontalni korteks) promene kao što su dislokacije receptora, promene u brzinama hemijskih reakcija i transportnih procesa [132, 133]. To može dalje dovesti do promena u obrascima aktivnosti mozga koji mogu biti registrovani različitim neinvazivnim neuroimidžing tehnikama poput PET-a (eng. positron emission tomography, pozitronska emisiona tomografija), fMRI-a (eng. functional magnetic resonance imaging, funkcionalna magnetna rezonanca), MEG (eng. magnetoencephalography, magnetoencefalografija) ili EEG (elektroencefalografija). Takvi efekti hroničnog stresa na nivou centralnog nervnog sistema mogu dovesti do značajnog smanjenja efikasnosti dinamičkih regulatornih mehanizama unutar HPA sistema. Nastale promene u efikasnosti i nemogućnost HPA sistema da se adekvatno odupre delovanju „spoljašnjih pritisaka“ mogle bi biti interpretirane pomoću bifurkacionih dijagrama poput onih prikazanih na slikama 3.1.5a i b i 3.1.6a i b. Prolazak kroz bifurkacionu tačku bi mogao ukazati da je došlo do kolapsa dinamičkog regulatornog mehanizma i prevođenja sistema u dinamičko stanje koje pogoduje nastanku bolesti. Takve promene iz jednog u drugo dinamičko stanje mogu biti povratne, ali takođe i nepovratne, ispoljavajući histerezis. Stoga, iako se organizam više ne nalazi u stanju stresa, HPA sistem se ne mora vratiti u prvobitno fiziološko stanje već se može naći u nekom novom, neravnotežnom stacionarnom odnosno ustaljenom stanju [45, 134]

Dinamika HPA sistema je tesno povezana sa ciklusom budnosti i sna, a hormoni ovog sistema aktivno učestvuju u regulaciji spavanja. U tom smislu je potpuno razumljivo što različiti faktori koji izazivaju perturbacije ovog ciklusa mogu dovesti do suptilnih promena u dinamici HPA sistema. Kao primer može se navesti efekat primene injekcija CRH i ACTH koji dovodi do poremećaja sna [134], kao i povezanost hronične

insomnije (nesanice) sa pojačanom sekrecijom i brojem unutar dnevnih pulseva (oscilacija) koncentracije kortizola i ACTH u toku 24 h ciklusa [135]. Ispitivani model HPA sistema korektno predviđa da sa porastom srednjeg dnevnog nivoa dnevnih oscilacija koncentracije CRH u hipotalmo-hipofiznom portalnom krvotoku, $\langle [CRH] \rangle$, dolazi do modifikovanja dinamike HPA sistema (slika 3.1.6), koja može u jednom trenutku, sa daljim rastom $\langle [CRH] \rangle$, dovesti do drastičnih promena unutar dnevnih dinamike HPA sistema. U takvim ekstremnim uslovima, moguće je u simulacijama dobiti vremenske serije koncentracije kortizola u kojima amplitude unutar dnevnih oscilacija koncentracije kortizola postaju izraženije u toku noći (slika 3.1.6f), situaciju suprotnu od one koja postoji u bazalnoj fiziologiji. Slična inverzija sekretorne aktivnosti HPA sistema, u kojoj su unutar dnevnih sekretorni pulsevi kortizola i ACTH izraženiji u toku noći, uočena je kod pacijenata obolelih od hronične insomnije [135].

Treba istaći da bifurkacioni dijagrami, poput onog datog na slici 3.2.5, mogu biti upotrebljeni kao sredstvo za tumačenje različitih, nekad i kvalitativno suprotnih odgovora HPA sistema na delovanje jednog istog hroničnog stresora. Sa aspekta teorije nelinearne dinamike i fizičke hemije oscilatornih reakcionih sistema takvi bifurkacioni dijagrami bi mogli pružiti potencijalno teorijsko objašnjenje za naizgled kontradiktorne nalaze *in vivo* da hronični stres može indukovati i hiperkortizolizam i hipokortizolizam [130].

Imuni sistem predstavlja jedan od sistema čija je funkcija u značajnoj meri izmenjena u stresnim uslovima, posredstvom glukokortikoidnih hormona i drugih komponenti aktiviranih od strane HPA ose u toku stresnog odgovora [87, 132-134]. Bifurkaciona analiza bi mogla biti od značajne koristi i u ovom slučaju, pružajući teorijski okvir za boljim razumevanjem kako hronični stres može dovesti do nelinearnih reakcija imunog sistema [123, 136].

Navedene studije potvrđuju mogućnosti osnovnog modela HPA sistema da opiše i predvidi mnoga dinamička stanja HPA sistema i koncentracije kortizola nastala pod različitim uslovima akutnih i hroničnih perturbatora HPA sistema [27]. Pri postavljanju osnovnog modela, zbog težnje da se u prvoj iteraciji modeliranja tako složenog reakcionog sistema kao što je HPA osa pođe od što je moguće jednostavnijeg modela, koji sadrži samo ključne vrste i interakcije potrebne da se opišu glavne dinamičke karakteristike HPA sistema, zanemarena je poznata činjenica da hormoni ovog sistema

poseduju i reakcije izlaza (eliminacije) iz HPA sistema [2]. Stoga je, radi daljeg unapređenja i poboljšanja svojih performansi, osnovni model HPA sistema [16] proširen sa još dva dodatna koraka: reakcijom eliminacije CRH i reakcijom eliminacije aldosterona. Nastali model, tzv. *prošireni osnovni model HPA sistema* [48], opisan je u narednom poglavlju (poglavlje 3.2) ove disertacije.

3.2 Prošireni osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija)

Osnovni model HPA sistema predložen od strane Jelić i sar. [16], čija su dinamička stanja ispitivana u prethodnom poglavlju, dopunjen je sa još dve reakcije, (R10) i (R11) (tabela 3.2.1), u cilju usklađivanja mehanizma modela sa onim koji postoji u realnom sistemu. Reakcija 10 opisuje proces eliminacije CRH, a reakcija 11 proces eliminacije aldosterona iz sistema. Na ovaj način formulisan je novi model – prošireni osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija) [48]. Zbog izvršenih izmena, bilo je potrebno ponovo uraditi analizu stabilnosti modela. U tu svrhu, korišćena je analiza stehiometrijskih mreža čiji je opšti postupak prikazan u poglavlju 2.2.

3.2.1 Opis proširenog osnovnog modela HPA sistema

Prošireni osnovni model HPA sistema (model sa četiri vrste i 11 reakcija) prikazan je u tabeli 3.1. U skladu sa zakonom o dejstvu masa, na osnovu predloženog mehanizma (tabela 3.1) postavljen je sistem diferencijalnih jednačina koji opisuje vremensku evoluciju ovog dinamičkog sistema:

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_0 - (k_1 + k_8)[\text{CRH}] \quad (3.2.1)$$

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_1[\text{CRH}] - (k_2 + k_3 + k_6)[\text{ACTH}] - k_4[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 \quad (3.2.2)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_m + k_3[\text{ACTH}] - k_5[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_9[\text{ALDO}] \quad (3.2.3)$$

$$\frac{d[\text{CORT}]}{dt} = k_2[\text{ACTH}] + k_4[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_5[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_7[\text{CORT}] \quad (3.2.4)$$

gde [CRH], [ACTH], [ALDO] i [CORT] označavaju koncentracije CRH, ACTH, aldosterona i kortizola, redom, dok su k_i ($i = 0, m, 1 - 9$) konstante brzina odgovarajućih reakcionih koraka datih u tabeli 3.2.1.

Tabela 3.2.1. Prošireni osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija) [48]. $M = \text{mol dm}^{-3}$. P_1, P_2, P_3 i P_4 označavaju produkte eliminacije ACTH, kortizola, CRH i aldosterona, redom.

$\xrightarrow{k_0} \text{CRH}$	$v_1 = k_0$ $k_0 = 1,83 \cdot 10^{-8} \text{ M min}^{-1}$	(R1)
$\xrightarrow{k_m} \text{ALDO}$	$v_2 = k_m$ $k_m = 6,09 \cdot 10^{-11} \text{ M min}^{-1}$	(R2)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_1} \text{ACTH}$	$v_3 = k_1[\text{CRH}]$ $k_1 = 1,83 \text{ min}^{-1}$	(R3)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_2} \text{CORT}$	$v_4 = k_2[\text{ACTH}]$ $k_2 = 3,60 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R4)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_3} \text{ALDO}$	$v_5 = k_3[\text{ACTH}]$ $k_3 = 2,88 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	(R5)
$\text{ACTH} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_4} 3\text{CORT}$	$v_6 = k_4[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2$ $k_4 = 1,26 \cdot 10^{14} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-2}$	(R6)
$\text{ALDO} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_5} \text{CORT}$	$v_7 = k_5[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2$ $k_5 = 7,05 \cdot 10^{12} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-2}$	(R7)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_6} P_1$	$v_8 = k_6[\text{ACTH}]$ $k_6 = 5,35 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R8)
$\text{CORT} \xrightarrow{k_7} P_2$	$v_9 = k_7[\text{CORT}]$ $k_7 = 4,10 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R9)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_8} P_3$	$v_{10} = k_8[\text{CRH}]$ $k_8 = 1,10 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R10)
$\text{ALDO} \xrightarrow{k_9} P_4$	$v_{11} = k_9[\text{ALDO}]$ $k_9 = 1,35 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R11)

Predloženi model predstavlja modifikaciju polaznog modela HPA sa 9 reakcija (tabela 1.1), u čiji mehanizam su uvedene dve dodatne reakcije eliminacije: reakcija eliminacije CRH (R10) i eliminacije (R11) [48]. Ovakva modifikacija polaznog modela izvršena je u cilju približavanja njegovog mehanizma realnoj fiziologiji HPA sistema, eksplicitno pokazujući da su i CRH i aldosteron, a ne samo ACTH i kortizol, podložni procesima eliminacije iz sistema [2].

3.2.2 SNA proširenog modela HPA sistema

Analiza stabilnosti razmatranog proširenog osnovnog modela HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija) sprovedena je prema opštem postupku metode analize stehiometrijskih mreža (SNA) izloženom u poglavlju 2.2. Prikazani su samo konkretni rezultati za analizirani model, bez ponovnog razmatranja opštih jednačina SNA.

Kao i tada, početni korak analize podrazumeva prevođenje sistema običnih diferencijalnih jednačina (jed. (3.2.1) – (3.2.4)) u matrični oblik, korišćenjem jednačina (2.2.1) i (2.2.2).

Matrica stehiometrijskih koeficijenata \mathbf{S} proširenog osnovnog modela, čiji su elementi određeni prema jed. (2.2.2) na osnovu mehanizma modela (tabela 3.2.1), glasi:

$$\mathbf{S} = \begin{array}{cccccccccccc} \text{R1} & \text{R2} & \text{R3} & \text{R4} & \text{R5} & \text{R6} & \text{R7} & \text{R8} & \text{R9} & \text{R10} & \text{R11} & \\ \left[\begin{array}{cccccccccccc} 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 \end{array} \right] & \begin{array}{l} \text{CRH} \\ \text{ACTH} \\ \text{ALDO} \\ \text{CORT} \end{array} \end{array} \quad (3.2.5)$$

Rang matrice \mathbf{S} (jed. (3.2.5)) iznosi 4, pa je u proširenom osnovnom modelu HPA sistema broj nezavisnih intermedijera $n = 4$. S obzirom na to, kao i na činjenicu da ovaj model ima ukupno 4 intermedijera (CRH, ACTH, aldosteron i kortizol), svi navedeni intermedijeri su ujedno i međusobno nezavisni, kao što je to bio slučaj i u osnovnom modelu.

Zamenjujući jednačinu (3.2.5) u jednačinu (2.2.4), dobija se matricni zapis vremenske evolucije intermedijernih vrsta proširenog osnovnog modela HPA sistema u ustaljenom stanju:

$$\begin{bmatrix} \frac{d[\text{CRH}]}{dt} \\ \frac{d[\text{ACTH}]}{dt} \\ \frac{d[\text{ALDO}]}{dt} \\ \frac{d[\text{CORT}]}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_9 \\ v_{10} \\ v_{11} \end{bmatrix}_{\text{ss}} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (3.2.6)$$

Matrica \mathbf{E} analiziranog modela dobijena je kao rešenje sistema jednačina (3.2.6):

$$\mathbf{E} = \begin{matrix} & E_1 & E_2 & E_3 & E_4 & E_5 & E_6 & E_7 & E_8 & E_9 & E_{10} \\ \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 2 & 2 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 2 & 2 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix} & \text{R1} \\ & \text{R2} \\ & \text{R3} \\ & \text{R4} \\ & \text{R5} \\ & \text{R6} \\ & \text{R7} \\ & \text{R8} \\ & \text{R9} \\ & \text{R10} \\ & \text{R11} \end{matrix} \quad (3.2.7)$$

Kao što se vidi iz matrice \mathbf{E} (jed. (3.2.7)), prošireni osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija) ima 10 ekstremnih struja E_l . Kao i ranije, svaka od kolona \bar{E}_l ($l = 1, \dots, 10$) određuje reakcioni put koji se može realizovati u ustaljenom stanju predloženog modela. Dakle, proširivanjem osnovnog modela sa reakcijama eliminacije

CRH (R10) i aldosterona (R11) dovelo je do formiranja tri dodatne ekstremne struje (uporediti sa jed. (2.2.6)), dok je prvih 7 struja ostalo nepromenjeno.

Zamenom matrice \mathbf{E} (jed. (3.2.7)) u osnovnu jednačinu SNA ($\vec{v}_{ss} = \mathbf{E} \vec{j}$, jed. (2.2.7)), dobijaju se izrazi kojima se brzine reakcionih koraka proširenog osnovnog modela HPA sistema u ustaljenom stanju, $v_{i,ss}$ ($i = 1, \dots, 11$), povezane sa brzinama struja, j_l ($l = 1, \dots, 10$):

$$v_{1,ss} = k_0 = j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 + j_8 + j_{10} \quad (3.2.8)$$

$$v_{2,ss} = k_m = j_1 + j_4 + j_9 \quad (3.2.9)$$

$$v_{3,ss} = k_1[\text{CRH}]_{ss} = j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 + j_{10} \quad (3.2.10)$$

$$v_{4,ss} = k_2[\text{ACTH}]_{ss} = j_1 + j_3 + j_6 \quad (3.2.11)$$

$$v_{5,ss} = k_3[\text{ACTH}]_{ss} = j_6 + j_7 + j_{10} \quad (3.2.12)$$

$$v_{6,ss} = k_4[\text{ACTH}]_{ss}[\text{CORT}]_{ss}^2 = j_4 + j_5 + j_7 \quad (3.2.13)$$

$$v_{7,ss} = k_5[\text{ALDO}]_{ss}[\text{CORT}]_{ss}^2 = j_1 + j_4 + j_6 + j_7 \quad (3.2.14)$$

$$v_{8,ss} = k_6[\text{ACTH}]_{ss} = j_2 \quad (3.2.15)$$

$$v_{9,ss} = k_7[\text{CORT}]_{ss} = j_3 + j_5 \quad (3.2.16)$$

$$v_{10,ss} = k_8[\text{CRH}]_{ss} = j_8 \quad (3.2.17)$$

$$v_{11,ss} = k_9[\text{ALDO}]_{ss} = j_9 + j_{10}, \quad (3.2.18)$$

gde $[\text{CRH}]_{ss}$, $[\text{ACTH}]_{ss}$, $[\text{ALDO}]_{ss}$ i $[\text{CORT}]_{ss}$ označavaju koncentracije CRH, ACTH, aldosterona i kortizola u ustaljenom stanju, redom.

Kombinovanjem jednačina (3.2.8 – 3.2.18) dobijene su međusobno nezavisne linearne relacije među brzinama pojedinih reakcionih koraka u ustaljenom stanju:

$$v_{1,ss} = v_{3,ss} + v_{10,ss} = v_{4,ss} + v_{5,ss} + v_{6,ss} + v_{8,ss} + v_{10,ss} \quad (3.2.19)$$

$$v_{7,ss} + v_{11,ss} = v_{2,ss} + v_{5,ss} \quad (3.2.20)$$

$$v_{3,ss} = v_{4,ss} + v_{5,ss} + v_{6,ss} + v_{8,ss} \quad (3.2.21)$$

$$v_{4,ss} + v_{6,ss} = v_{7,ss} + v_{9,ss} \cdot \quad (3.2.22)$$

Prema jednačini (2.2.25), određena je i matrica redova reakcija **K** za prošireni osnovni model HPA sistema:

$$\mathbf{K} = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{R1} & \text{R2} & \text{R3} & \text{R4} & \text{R5} & \text{R6} & \text{R7} & \text{R8} & \text{R9} & \text{R10} & \text{R11} \end{matrix} \\ \begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} & \begin{matrix} \text{CRH} \\ \text{ACTH} \cdot \\ \text{ALDO} \\ \text{CORT} \end{matrix} \end{matrix} \quad (3.2.23)$$

Zamenom izraza za **S** (3.2.5), **E** (3.2.7) i **K** (3.2.23) u jednačinu (2.2.23), izračunata je matrica brzina struja $\mathbf{V}(\vec{j})$ za analizirani model:

$$\mathbf{V}(\vec{j}) = \begin{bmatrix} j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 + j_{10} & 0 & 0 & 0 \\ -j_1 - j_2 - j_3 - j_4 - j_5 - 2j_6 - 2j_7 - j_{10} & j_1 + j_2 + j_3 + j_4 + j_5 + 2j_6 + 2j_7 & 0 & 2j_4 + 2j_5 + 2j_7 \\ 0 & -j_6 - j_7 - j_{10} & j_1 + j_4 + j_6 + j_7 + j_9 + j_{10} & 2j_1 + 2j_4 + 2j_6 + 2j_7 \\ 0 & -j_1 - j_3 - j_4 - j_5 - j_6 - j_7 & j_1 + j_4 + j_6 + j_7 & 2j_1 + j_3 - j_5 + 2j_6 \end{bmatrix} \quad (3.2.24)$$

Pošto ovaj model sadrži četiri intermedijerne vrste (CRH, ACTH, aldosteron i kortizol), dimenzije matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ su 4×4 .

Zamenom izraza za matricu brzina struja $\mathbf{V}(\vec{j})$ (3.2.24) u jednačinu $\mathbf{J} = -\mathbf{V}(\vec{j}) \text{diag } \vec{h}$ (jed. (2.2.22)), može se odrediti jakobijan posmatranog modela **J** kao linearizovani operator njegove dinamike u okolini datog ustaljenog stanja. Elemente vektora recipročnih koncentracija \vec{h} čine recipročne koncentracije h_i ($i = 1, \dots, 4$) intermedijera ispitivanog modela u ustaljenom stanju, $[\text{CRH}]_{ss}$, $[\text{ACTH}]_{ss}$, $[\text{ALDO}]_{ss}$ i $[\text{CORT}]_{ss}$, redom.

U proširenom osnovnom modelu HPA sistema, kao i u samom osnovnom modelu, postoje četiri intermedijerne vrste, te je karakteristična jednačina operatora **J**:

$$\text{Det}[\lambda \mathbf{I} - \mathbf{J}] = \alpha_0 \lambda^4 + \lambda^3 \alpha_1 + \lambda^2 \alpha_2 + \lambda \alpha_3 + \alpha_4. \quad (3.2.25)$$

Koeficijent α_i ($i = 1, \dots, 4$) karakterističnog polinoma (3.2.25), kako je ranije napomenuto, određuje se kao suma svih dijagonalnih minora dimenzije $i \times i$ matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ pomnoženih odgovarajućim proizvodom koji čini kombinacija od i recipročnih koncentracija h_i ; kao i do sada, prema konvenciji, $\alpha_0 = 1$. Koeficijenti α_i su funkcije brzina struja j_i , ali se i u ovom slučaju mogu u potpunosti transformisati u, za računanje, pogodniji oblik koji je funkcija isključivo brzina u neravnotežnom stacionarnom (ustaljenom) stanju, $v_{i,ss}$.

Kao i kod osnovnog modela HPA sistema, uslov nestabilnosti je određen u veoma dobroj aproksimaciji na bazi dijagonalnih minora matrice brzina struja $\mathbf{V}(\vec{j})$ koji sadrže negativne članove. Nađeno je da u proširenom osnovnom modelu HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija) svi dijagonalni minori matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ (jed. (3.2.24)) koji poseduju negativne članove sadrže izraz koji odgovara izrazu za dijagonalni minor drugog reda za aldosteron i kortizol, M_{34} . Prema ovoj aproksimaciji, uslov nestabilnosti će biti ispunjen ukoliko je dati minor negativan, $M_{34} < 0$. Tada uslov nestabilnost proširenog osnovnog modela HPA, izražen preko reakcionih brzina u neravnotežnom stacionarnom stanju $v_{i,ss}$, postaje:

$$v_{7,ss}v_{9,ss} + 2v_{7,ss}v_{11,ss} + v_{9,ss}v_{11,ss} < 2v_{6,ss}v_{7,ss} + 2v_{6,ss}v_{11,ss} \quad (3.2.26)$$

Uslov (3.2.26) je zadovoljen za set konstanti brzina modela datih u tabeli 3.2.1. Korišćenjem nezavisnih relacija među brzinama u ustaljenom stanju (3.2.19) - (3.2.22), uslov nestabilnosti (3.2.26) se može izraziti na različite načine, tako da sadrži one brzine u ustaljenom stanju koje su od značaja za razmatranje konkretnog istraživačkog problema.

Uslov nestabilnosti (3.2.26) je napisan u funkciji $v_{9,ss}$ i $v_{6,ss}$. Izjednačavanjem sa nulom svih članova u izrazu za jezgro nestabilnosti ovog modela koji sadrži brzine reakcija u ustaljenom stanju koje ne postoje u mehanizmu osnovnog modela ($v_{10,ss}$ i $v_{11,ss}$) dobija se isti izraz za uslov nestabilnosti kao što je onaj u osnovnom modelu $v_{9,ss} < 2v_{6,ss}$ (jed. 2.2.39)[18]. To znači da je jezgro nestabilnosti oba modela HPA

sistema isto. Konkretno, reakcioni korak (R11) (reakcija eliminacije aldosterona) ne postoji u osnovnom modelu HPA sistema, pa je $v_{11,ss} = 0$, i izraz (3.2.26) se svodi upravo na $v_{9,ss} < 2v_{6,ss}$. Navedena nejednakost predstavlja jezgro nestabilnosti modela, i ona mora biti zadovoljena da bi model bio u nestabilnom neravnotežnom stacionarnom stanju, i da bi mogao da ispolji oscilatorno evoluciju nastalu kao rezultat njegove unutrašnje nestabilnosti.

Da bi se utvrdila ispunjenost uslova nestabilnosti (3.2.26), potrebno je odrediti vrednosti brzina u ustaljenom stanju, $v_{i,ss}$ odn., shodno jednačinama (3.2.8) - (3.2.28) za brzine reakcionih koraka u ustaljenom stanju, potrebno je znati vrednosti njihovih konstanti brzina i odrediti koncentracije intermedijera modela u ustaljenom stanju.

Koncentracije intermedijera u ustaljenom stanju izračunate su na bazi uslova stacionarnosti modela, izjednačavanjem sa nulom svih brzina po intermedijerima modela (CRH, ACTH, aldosterona i kortizola) u jednačinama (3.2.1) – (3.2.4). Ustaljena koncentracija CRH određena je izjednačavanjem sa nulom jednačine (3.2.1):

$$[\text{CRH}]_{ss} = \frac{k_0}{k_1 + k_8}, \quad (3.2.27)$$

ustaljena koncentracija ACTH je dobijena izjednačavanjem sa nulom jednačine (3.2.2) i uvrščavanjem u nju izraza za $[\text{CRH}]_{ss}$ u jednačini (3.2.27):

$$[\text{ACTH}]_{ss} = \frac{k_0 k_1}{(k_1 + k_8)[k_2 + k_3 + k_6 + k_4([\text{CORT}]_{ss})^2]}, \quad (3.2.28)$$

dok je izjednačavanjem izraza (3.2.3) sa nulom dobijena koncentracija aldosterona u ustaljenom stanju:

$$[\text{ALDO}]_{ss} = \frac{k_m + k_3[\text{ACTH}]_{ss}}{k_5([\text{CORT}]_{ss})^2 + k_9}, \quad (3.2.29)$$

Zamenom izraza za koncentracije ACTH (jed. (3.2.28)) i aldosterona u ustaljenom stanju (jed. (3.2.29)) u izraz za brzinu po kortizolu (3.2.4) izjednačenim sa

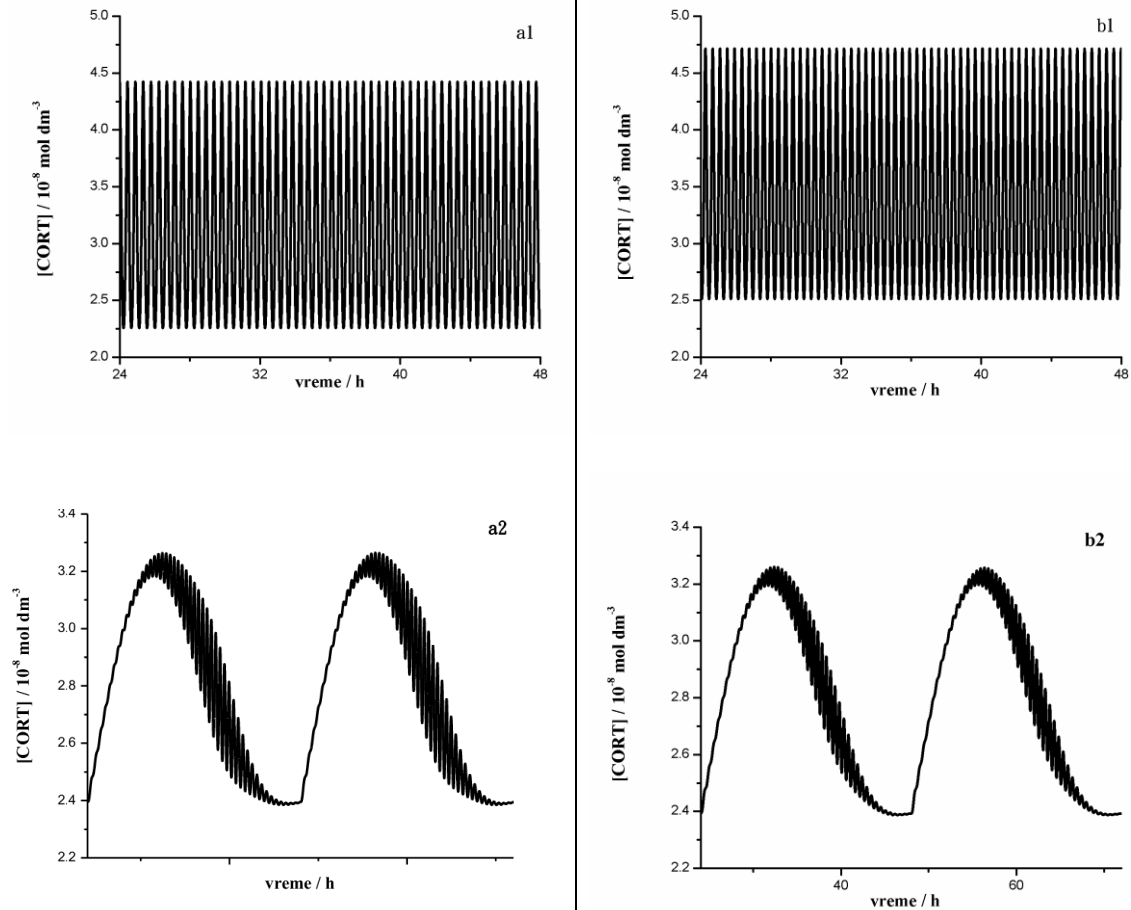
nulom dobija se implicitna jednačina za koncentraciju kortizola u ustaljenom stanju u obliku polinoma petog stepena po $[\text{CORT}]_{ss}$:

$$\begin{aligned}
 & k_4 k_5 k_7 (k_1 + k_8) ([\text{CORT}]_{ss})^5 + k_4 k_5 [k_m (k_1 + k_8) - k_0 k_1] ([\text{CORT}]_{ss})^4 \\
 & + k_7 (k_1 + k_8) [k_4 k_9 + k_5 (k_2 + k_3 + k_6)] ([\text{CORT}]_{ss})^3 \\
 & + \{k_0 k_1 [k_5 (k_2 - k_3) + k_4 k_9] - k_m k_5 (k_1 + k_8) (k_2 + k_3 + k_6)\} ([\text{CORT}]_{ss})^2 \cdot \quad (3.2.30) \\
 & + k_7 k_9 (k_1 + k_8) (k_2 + k_3 + k_6) [\text{CORT}]_{ss} - k_0 k_1 k_2 k_9 = 0
 \end{aligned}$$

Jednačine (3.2.27) – (3.2.30) pokazuju da koncentracije svih intermedijera HPA sistema u ustaljenom stanju zavise jedino od odgovarajućih konstanti brzina. Stoga je i uslov nestabilnosti modela (3.2.26) funkcija samo konstanti brzina k_i ($i = 0, m, 1 - 9$, tabela 3.2.1). Pri vrednostima konstanti brzina datim u tabeli 3.2.1, uslov nestabilnosti (3.2.26) predloženog modela je ispunjen, što znači da prošireni osnovni model HPA sistema poseduje oblast nestabilnosti i može, kao posledicu toga, imati oscilatorna dinamička stanja.

3.2.3 Numerička analiza proširenog osnovnog modela HPA sistema

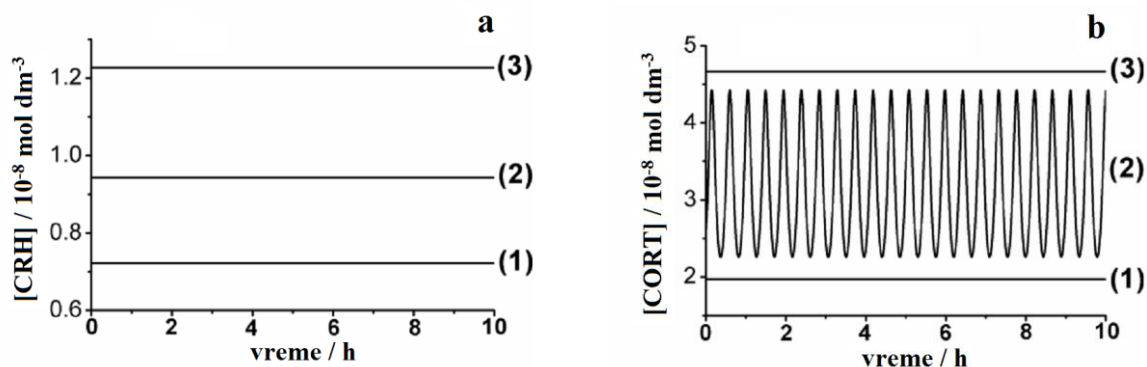
Kao i u slučaju osnovnog modela HPA sistema (poglavlje 1.5 i 3.1), validnost ispitivanog modela je potvrđena na bazi njegovih numeričkih simulacija, prema opštem postupku datom u poglavlju 2.1.



Slika 3.2.1. Uporedni prikaz vremenskih serija koncentracije kortizola za prošireni osnovni model HPA sistema odn. osnovni model HPA sistema. **(a1)** Prošireni osnovni model odn. **(b1)** osnovni model nije spregnut sa dnevnom funkcijom D (jed. 3.1.1); **(a2)** prošireni osnovni model odn. **(b2)** osnovni model jeste spregnut sa dnevnom funkcijom D . Simulacije proširenog osnovnog modela HPA sistema i osnovnog modela HPA sistema, dobijene su za vrednosti parametara datih u tabeli 3.2.1 i tabeli 1.1, redom.

Na osnovu dobijenih simulacija je utvrđeno da prošireni osnovni model HPA sistema pokazuje analogne karakteristike kao i model iz kojeg je izveden, pri bazalnim uslovima kao i tokom stresa. Kao primer, na slici 3.2.1. uporedno su prikazane vremenske serije koncentracije kortizola za prošireni i osnovni model HPA sistema, za slučajeve kada su modeli spregnuti ili nisu spregnuti sa dnevnom funkcijom D (jed. (3.1.1)). Na slici 3.2.2 prikazan je uticaj vrednosti konstante k_0 (odn. brzina produkcije i sekrecije CRH) na dinamička stanja koncentracije kortizola. Takvo dinamičko

ponašanje HPA sistema je analogno onom dobijenom pomoću osnovnog modela HPA sistema (slika 3.1.1). Saglasnost rezultata između ove dve varijante modela je bila očekivana, imajući u vidu da je metodom SNA utvrđeno da se izraz za uslov nestabilnosti proširenog osnovnog modela (jed. (3.2.26)) može redukovati na izraz za uslv nestabilnosti osnovnog modela (jed. (2.2.39)), odn. da oba modela imaju zajedničko jezgro nestabilnosti (v. poglavlje 3.2.2).



Slika 3.2.2. (a) Vremenske evolucije koncentracije CRH, $[CRH]$, i (b) koncentracije kortizola, $[CORT]$, u proširenom osnovnom modelu HPA sistema (tabela 3.2). Simulacije su dobijene pri različitim vrednostima konstante produkcije i sekrecije CRH, k_0 , kao kontrolnog parametra. (1) $k_0 = 1,39 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$, (2) $k_0 = 1,74 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ i (3) $k_0 = 2,23 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$. U svim slučajevima (1), (2) i (3), $[CRH]$ se nalazi u stabilnom ustaljenom stanju: $[CRH]_{ss} = 0,76 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $[CRH]_{ss} = 0,95 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ i $[CRH]_{ss} = 1,22 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, redom. U slučajevima (1) i (3), $[CORT]$ se takođe nalazi u stabilnom ustaljenom stanju, dok u slučaju (2) ispoljava unutardnevne oscilacije. [48]

3.3. Model HPA sistema sa holesterolom (model sa 5 vrsta i 13 reakcija)

U ovom poglavlju opisan je stehiometrijski HPA model sa holesterolom, početnim prekursorom kortizola, aldosterona i drugih steroidnih hormona. Novi model je dobijen uvrščavanjem holesterola u mehanizam proširenog osnovnog modela HPA sistema (model 4 vrste sa 11 reakcija) [48]. Predloženi model ima 5 dinamičkih promenljivih i 13 reakcija. Kao i u slučaju prethodnih varijanti modela HPA sistema, stabilnost modela je ispitana SNA analizom, a njegova validnost je proverena u numeričkim simulacijama. Simulacije dobijene pomoću novog modela su pokazale još veću usklađenost sa dinamičkim ponašanjem koje postoji *in vivo* u HPA sistemu čoveka, istovremeno zadržavši pozitivne kvalitete koji se dobijaju u simulacijama na bazi njegovih prethodnika. Sve to ukazuje na veći prediktivni kapacitet novog modela HPA sistema sa holesterolom.

Kao što je istaknuto u poglavlju 1.4, prilično mali broj teorijskih modela aktivnosti HPA sistema eksplicitno sadrži holesterol kao jednu od glavnih hemijskih vrsta i dinamičkih varijabli modela [14, 23-25]. Međutim, od navedenih modela, nijedan nije stehiometrijski. Dalje, nijedan od njih ne sadrže istovremeno, pored holesterola, CRH, ACTH i kortizol kao intermedijerne vrste, i ne opisuje ponašanje HPA sistema na sistemskom nivou. Takođe, nijedan od navedenih modela ne simulira složenu oscilatornu evoluciju kortizola u kojoj su unutar-dnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama. HPA model sa holesterolom koji je predložen u ovoj disertaciji ne poseduje navedene nedostatke.

3.3.1 Opis modela HPA sistema sa holesterolom

Prošireni, petodimenzionalni model samoregulacije i aktivnosti HPA sistema sa holesterolom kao novom intermedijernom vrstom i koncentracijom holesterola kao novom dinamičkom promenljivom prikazan je u tabeli 3.3.1. To je stehiometrijski model sa 13 reakcionih koraka, R_i ($i = 1, \dots, 13$), neposredno izveden iz prethodne varijante stehiometrijskog modela HPA sistema (prošireni osnovni model HPA sistema

[48], tabela 3.2.1), u čiji mehanizam je, pored 4 dinamičke varijable (koncentracije CRH, ACTH, CORT, ALDO) prisutne u ranijim modelima HPA (osnovni i prošireni osnovni model HPA sistema), dodat i holesterol. Uključivanje holesterola i proširivanje mehanizma prethodnog HPA modela (prošireni osnovni HPA model) izvedeno je modifikacijom postojećih kao i dodavanjem potpuno novih reakcionih koraka u skladu sa aktuelnim eksperimentalnim saznanjima procesa adrenalne steroidogeneze kortizola i aldosterona. Opisani proces formiranja HPA modela sa holesterolom je realizovan pažljivim i postupnim izvođenjem što je bilo moguće manjeg broja ključnih i neophodnih promena polaznog mehanizma, kako bi pored novih, izvedeni model zadržao i pozitivne kvalitete svojih prethodnika.

Korišćenjem izraza za brzine reakcionih koraka v_i ($i = 1, \dots, 13$) dobijenih na osnovu zakona o dejstvu masa (tabela 3.3.1), jednoznačno je izveden sistem običnih diferencijalnih jednačina koje opisuju brzinu promene koncentracija nezavisnih intermedijernih vrsta:

$$\frac{d[\text{CHOL}]}{dt} = k_1 - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_9[\text{CHOL}] \quad (3.3.1)$$

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_2 - (k_4 + k_{10})[\text{CRH}] \quad (3.3.2)$$

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_4[\text{CRH}] - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_{11}[\text{ACTH}] \quad (3.3.3)$$

$$\frac{d[\text{CORT}]}{dt} = k_5[\text{CHOL}][\text{ACTH}] + k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{12}[\text{CORT}] \quad (3.3.4)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_3 + k_6[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{13}[\text{ALDO}] \quad (3.3.5)$$

Tabela 3.3.1. Model HPA sistema sa holesterolom (model HPA sa 5 vrsta i 13 reakcija). $M = \text{mol dm}^{-3}$. P_1, P_2, P_3, P_4 i P_5 predstavljaju produkte eliminacije holesterola, CRH, ACTH, kortizola, i aldosterona, redom.

$\xrightarrow{k_1} \text{CHOL}$	$v_1 = k_1$ $k_1 = 1,380 \cdot 10^{-4} \text{ M min}^{-1}$	(R1)
$\xrightarrow{k_2} \text{CRH}$	$v_2 = k_2$ $k_2 = 1,830 \cdot 10^{-8} \text{ M min}^{-1}$	(R2)
$\xrightarrow{k_3} \text{ALDO}$	$v_3 = k_3$ $k_3 = 6,090 \cdot 10^{-11} \text{ M min}^{-1}$	(R3)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_4} \text{ACTH}$	$v_4 = k_4 [\text{CRH}]$ $k_4 = 1,830 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1}$	(R4)
$\text{CHOL} + \text{ACTH} \xrightarrow{k_5} \text{CORT}$	$v_5 = k_5 [\text{CHOL}][\text{ACTH}]$ $k_5 = 11,94 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R5)
$\text{CHOL} + \text{ACTH} \xrightarrow{k_6} \text{CORT}$	$v_6 = k_6 [\text{CHOL}][\text{ACTH}]$ $k_6 = 9,552 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R6)
$\text{ACTH} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_7} 3\text{CORT}$	$v_7 = k_7 [\text{ACTH}][\text{CORT}]^2$ $k_7 = 1,260 \cdot 10^{14} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-2}$	(R7)
$\text{ALDO} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_8} \text{CORT}$	$v_8 = k_8 [\text{ALDO}][\text{CORT}]^2$ $k_8 = 7,050 \cdot 10^{12} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-2}$	(R8)
$\text{CHOL} \xrightarrow{k_9} P_1$	$v_9 = k_9 [\text{CHOL}]$ $k_9 = 4,500 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R9)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_{10}} P_2$	$v_{10} = k_{10} [\text{CRH}]$ $k_{10} = 1,100 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R10)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_{11}} P_3$	$v_{11} = k_{11} [\text{ACTH}]$ $k_{11} = 5,350 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R11)
$\text{CORT} \xrightarrow{k_{12}} P_4$	$v_{12} = k_{12} [\text{CORT}]$ $k_{12} = 4,100 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R12)
$\text{ALDO} \xrightarrow{k_{13}} P_5$	$v_{13} = k_{13} [\text{ALDO}]$ $k_{13} = 1,350 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R13)

Rešenje sistema diferencijalnih jednačina (3.3.1) – (3.3.5) su vremenske serije koncentracija intermedijarnih vrsta modela (holesterol, CRH, ACTH, kortizol i aldosteron), koje simuliraju dinamičko ponašanje sistema za odabrani set parametara modela. Parametri modela su konstante brzina, k_i ($i = 1-13$), od kojih svaka karakteriše kinetiku odgovarajućeg reakcionog koraka, (R_i) ($i = 1-13$). Reakcioni koraci (R_i) ($i =$

1–13) konceptualno opisuju najvažnije eksperimentalno poznate interakcije u HPA sistemu za koje je pretpostavljeno da su od ključnog značaja za opisivanje kompleksne dinamike HPA ose.

Reakcioni korak (R1) opisuje ukupni ulaz (unos) holesterola u sistem obuhvatajući sve moguće izvore i puteve njegovog ulaska [2]. Pod pretpostavkom da rezervoari holesterola dostupni za procese njegovog ćelijskog unosa ili iskorišćenja ostaju praktično na konstantnom nivou (s obzirom na to da je njihova količina znatno veća od one koja se koristi u procesu adrenalne steroidogeneze) i prepostavljaajući da se unos holesterola za svrhe steroidogeneze odvija konstantnom brzinom k_1 ovaj proces je modeliran reakcionim korakom čija je kinetika nultog reda.

Kao i u prethodne dve varijante HPA modela, reakcioni korak (R2) odnosno (R3) opisuju ulaz CRH odn. aldosterona u sistem. Pretpostavljeno je da se oba procesa odvijaju po kinetici nultog reda.

Reakcioni korak (R4) je zadržan u istom obliku kao i u prethodna dva modela, opisujući kao procese sa kinetikom prvog reda stimulatorni efekat CRH na lučenje ACTH u opštu cirkulaciju i njegovu ponovnu sintezu.

Reakcioni korak (R5) sumira složene procese biosinteze kortizola regulisane od strane ACTH koji se odvijaju u histološkoj zoni kore nadbubrežnih žlezda označenoj kao *zona fasciculata*, i sekreciju kortizola u sistemsku cirkulaciju (v. poglavlje 1.3.2). *In vivo* ovaj proces obuhvata nekoliko potprocesa (v. poglavlje 1.3.2): mobilizaciju aktivne forme holestrola tj. slobodnog holestrola iz holesterolskih depoa, transport slobodnog holesterola do mitohondrija, transfer holesterola sa spoljnje na unutrašnju mitohondrijalnu membranu, zatim konverziju holesterola u pregnenolon pomoću enzima CYP11A1, kaskadu biosintetskih transformacija pregnenolona u kortizol (slika 1.3.2), i konačno spontani izlazak holesterola u opštu cirkulaciju; svaki od ovih potprocesata je složen sam po sebi, obuhvatajući više enzimski katalizovanih reakcionih koraka [2, 77, 78]. Kao što je istaknuto u uvodu (poglavlje 1.3.2), konverzija holesterola u pregnenolon, predstavlja prvi biohemijski korak u biosinteze kortizola, a ujedno najsporiji proces na celom metaboličkom putu adrenalne steroidogeneze [2]. Stoga celokupna kaskada produkcije kortizola na način kako je to ovde sažeto može u određenoj aproksimaciji biti predstavljena jednim reakcionim korakom kinetike drugog reda koji uključuje ACTH kao glavnu hormonsku regulatornu vrstu koja definiše brzinu

biosinteze kortizola, i holesterol, kao početnog prekursora kortizola. Treba naglasiti da konstanta brzine k_5 predstavlja složenu konstantu brzine koja zavisi od statusa svih intermedijernih metabolita i enzima kao i konstanti brzina u kojima oni učestvuju, a koji su sumarno obuhvaćeni u reakcionom koraku (R5). Predopstavljajući da koncentracija i aktivnosti ovih metabolita i enzima ostaju u stabilnom kvazistacionarnom stanju tokom vremenskog okvira u kome se završi jedan ciklus adrenalne steroidogeneze, k_5 se može posmatrati kao parametar, određene konstantne vrednosti.

Reakcioni korak (R6) sumira složni proces steroidogeneze aldosterona, koji se odvija u histološkoj zoni kore nadbubrežnih žlezda označenoj kao *zona glomerulosa*, i njegovu sekreciju u opštu cirkulaciju. Obrazloženje postavljanja ovog reakcionog koraka sa kinetikom drugog reda je analogan onom detaljno obrazloženom za kortizol u reakcionom koraku (R5).

Reakcioni korak (R7) opisuje regulaciju HPA ose pomoću složenog mehanizma pozitivne povratne sprege predstavljenog u modelu kubnom autokatalizom kortizola. Reakcioni korak (R8) predstavljen u modelu pomoću kvadratne autoinhibicije kortizola reprezentuje složene mehanizme negativne povratne sprege u okviru HPA sistema. Oba koraka (R7) i (R8) zadržana su u izvornom obliku kao i u prethodna dva modela (v. poglavlje 2).

Reakcioni koraci (R9), ..., (R13) određuju kinetiku eliminacije holesterola, CRH, ACTH, kortizola i aldosterona, respektivno. Pretpostavljno je da ove reakcije mogu biti opisane sa kinetikom prvog reda. Reakcije eliminacije ACTH i kortizola [16] kao i CRH i aldosterona [48] su bile uvedene u prethodnim varijantama modela. Reakcija eliminacije kortizola (R9) obuhvata nekoliko procesa koji omogućuju redukciju ili smanjenje viška aktivnog (slobodnog) oblika holesterola do fizioloških granica. Jedan od tih procesa podrazumeva uklanjanje holesterola iz citoplazme steroidogenih ćelija kroz plazma membranu tih ćelija (efuks holesterola), proces koji je uglavnom omogućen posredstvom membranskih receptora ABCA1 (eng. ATP-binding membrane cassette (ABC) transporter A1) [137]. Drugi od tih procesa podrazumeva eliminaciju holesterola putem njegovog ugradjivanja u ćelijske membrane (proces biogeneze membrana), imajući u vidu da je holesterol jedan od glavnih konstituenata ćelijskih membrana. Konačno, eliminacija holesterola se odvija i usled drugih procesa potrošnje holesterola koji ne uključuju metabolizam kortizola i aldosterona, kao što su produkcija oksisterola

i žučnih kiselina, vitamina D i drugih steroidnih hormona [79, 138]. Kako su brzine navednih procesa eliminacije (potrošnje) holesterola prvenstveno zavisne od same koncentracije holesterola pretpostavljeno je da svi ti procesi mogu biti sumarno prikazani pomoću kinetike prvog reda u reakcinom koraku (R9). Uzimajući u obzir to da se stanje organizma u pogledu aktivnosti enzima, receptora i drugih regulacionih faktora uključenih u proces eliminacije holesterola ne menja tokom vremenskog okvira odvijanja tih procesa, k_9 se može uzeti za složenu konstantu reakcinog koraka (R9).

Reakcioni koraci (R2), (R3), (R4), (R7), (R8), (R10), (R11), (R12) i (R13) zadržani su iz prethodnih varijanti modela: proširenog osnovnog modela HPA sistema (tabela 3.2.1), odn. osnovnog modela HPA sistema (izuzimajući reakcije (R10) i (R12) koje ne postoje u osnovnom modelu) (tabela 1.1). Konstante brzina k_2 , k_3 , k_7 , k_6 , k_{11} i k_{12} imaju iste vrednosti kao u proširenom osnovnom modelu (tabela 3.2.1), odn. u osnovnom modelu.

Kako je model HPA sistema sa holesterolom nastao razvojem prethodnog modela, preostale konstante su se mogle okvirno odrediti na bazi održanja brzina pojedinih reakcionih puteva. Na taj način su određene njihove polazne vrednosti, koje su kasnije doterane sistematičnim ispitivanjem dinamičkog ponašanja sistema izvođenjem velikog broja numeričkih simulacija za različite vrednosti konstanti brzina. Pored toga, određivanje nepoznatih konstanti potpomognuto je ispitivanjem stabilnosti predloženog modela HPA sistema sa holesterolom metodom analize stehiometrijskih mreža (SNA), čime je dobijen izraz za nestabilnost modela (v. poglavlje 3.3.2). Dobijeni uslov je iskorišćen kao dodatno ograničenje u optimizaciji modela, s obzirom na to da taj uslov mora biti zadovoljen da bi model mogao ispoljiti oscilatorno ponašanje.

Pošto je cilj ovog istraživanja modeliranje oscilatornog ponašanja hormona HPA sistema, sledeći korak u razvoju modela je ispitivanje njegove stabilnosti, odn. utvrđivanje da li i pod kojim uslovima jednačine (3.3.1) – (3.3.5) mogu posedovati barem jedno nestabilno neravnotežno stacionarno stanje koje može dati oscilatornu evoluciju. Stoga, slično kao i u slučaju analize stabilnosti prethodnih varijanti modela HPA sistema, stabilnost predloženog modela HPA sa holesterolom ispitana je metodom analize stehiometrijskih mreža (SNA).

3.3.2 SNA modela HPA sistema sa holesterolom

SNA procedura modela HPA sa holesterolom izvršena je na analogan način kao i u slučaju prethodnih modela HPA sistema (poglavlja 2.2 i 3.2). Ovde će biti prikazani samo rezultati SNA koji se odnose na ispitivani model HPA sa holesterolom, bez ulaženja u detalje izvođenja date u poglavlju 2.2.

Kao i tada, početni korak analize predstavlja izražavanje sistema običnih diferencijalnih jednačina (jed. (3.3.1) – (3.3.5)) u matičnom obliku (v. jed. (2.2.1)), pogodnijem za izražavanje vremenske evolucije nezavisnih intermedijera u SNA.

U slučaju razmatranog modela HPA sa holesterolom, matrica \mathbf{S} , direktno izvedena iz mehanizma datog u tabeli 3.3.1 shodno jednačini (2.2.2), ima oblik:

$$\mathbf{S} = \begin{matrix} & \text{R1} & \text{R2} & \text{R3} & \text{R4} & \text{R5} & \text{R6} & \text{R7} & \text{R8} & \text{R9} & \text{R10} & \text{R11} & \text{R12} & \text{R13} \\ \left[\begin{array}{cccccccccccc} 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{array} \right] & \begin{array}{l} \text{CHOL} \\ \text{CRH} \\ \text{ACTH} \\ \text{CORT} \\ \text{ALDO} \end{array} \end{matrix} \quad (3.3.6)$$

Rang matrice \mathbf{S} (jed. (3.3.6)) iznosi 5, te je u modelu HPA sistema sa holesterolom broj nezavisnih intermedijera $n = 5$. Zato, uzimajući u obzir i činjenicu da ovaj model ima ukupno 5 intermedijera (holesterol, CRH, ACTH, kortizol, aldosteron), svi navedeni intermedijeri su međusobno nezavisni.

Zamenjujući jednačinu (3.3.6) u jednačinu (2.2.4), dobija se matični zapis vremenske evolucije intermedijernih vrsta modela HPA sistema sa holesterolom u ustaljenom stanju:

$$\begin{bmatrix} \frac{d[\text{CHOL}]}{dt} \\ \frac{d[\text{CRH}]}{dt} \\ \frac{d[\text{ACTH}]}{dt} \\ \frac{d[\text{CORT}]}{dt} \\ \frac{d[\text{ALDO}]}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_9 \\ v_{10} \\ v_{11} \\ v_{12} \\ v_{13} \end{bmatrix}_{\text{ss}} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

(3.3.7)

Matrica **E** ispitivanog modela dobijena je kao rešenje sistema jednačina (3.3.7):

$$\mathbf{E} = \begin{matrix} & E_1 & E_2 & E_3 & E_4 & E_5 & E_6 & E_7 & E_8 & E_9 & E_{10} & E_{11} \\ \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 2 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 2 & 1 & 2 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 2 & 1 & 2 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} & \begin{matrix} \text{R1} \\ \text{R2} \\ \text{R3} \\ \text{R4} \\ \text{R5} \\ \text{R6} \\ \text{R7} \\ \text{R8} \\ \text{R9} \\ \text{R10} \\ \text{R11} \\ \text{R12} \\ \text{R13} \end{matrix} \end{matrix} .$$

(3.3.8)

U ovom modelu postoji 11 ekstremnih struja E_l . Uvođenjem holesterola i odgovarajućih novih reakcionih koraka dovelo je do dodatnog povećanja broja ekstremnih struja odn. reakcionih puteva koji se mogu realizovati u neravnotežnom

stacionarnom stanju u odnosu na prethodne varijante modela: model sa holesterolom ima jednu ekstremnu struju više od proširenog osnovnog modela (jed. (3.2.7)), odn. četiri ekstremne struje više od osnovnog modela HPA sistema (jed. (2.2.6)). Kolone 1, 4, 5, 7, 8, 9 i 11 matrice \mathbf{E} (jed. (3.3.8)) formiraju, redom, sledeće reakcione puteve koji daju sumarne reakcije koje postoje i u osnovnom modelu HPA sistema:

put 1: $R_1+R_2+R_3+R_4+R_5+R_8$,
 put 4: $R_2+R_4+R_{11}$,
 put 5: $R_1+R_2+R_4+R_5+R_{12}$,
 put 7: $R_2+R_3+R_4+R_7+R_8$,
 put 8: $R_2+R_4+R_7+R_{12}$,
 put 9: $2R_1+2R_2+2R_4+R_5+R_6+R_8$ i
 put 11: $R_1+2R_2+2R_4+R_6+R_7+R_8$.

Prošireni osnovni model, pored sumarnih reakcija definisanih preko reakcionih puteva dobijenih iz gorenavedenih kolona matrice \mathbf{E} , sadrži i sumarne reakcije određene na osnovu reakcionih puteva dobijenih iz kolona 3, 6 i 10, redom, iste matrice \mathbf{E} :

put 3: R_2+R_{10} ,
 put 6: R_3+R_{13} i
 put 10: $R_1+R_2+R_4+R_6+R_{13}$.

Potpuno nov reakcioni put (odgovara protoku holesterola kroz sistem), koji se pojavljuje samo u modelu HPA sistema sa holesterolom, dobija se iz kolone 2 matrice \mathbf{E} (jed. (3.3.8)):

put 2: R_1+R_9 .

Uvrščavanjem matrice \mathbf{E} (jed. (3.3.8)) u osnovnu jednačinu SNA ($\vec{v}_{ss} = \mathbf{E} \vec{j}$, jed. (2.2.7)), dobijaju se relacije koje povezuju brzine reakcionih koraka modela HPA sistema sa holesterolom u ustaljenom stanju, $v_{i,ss}$ ($i = 1, \dots, 13$) sa brzinama ekstremnih struja, j_l ($l = 1, \dots, 11$):

$$v_{1,ss} = k_1 = j_1 + j_2 + j_5 + j_6 + 2j_9 + j_{10} + j_{11} \quad (3.3.9)$$

$$v_{2,ss} = k_2 = j_1 + j_3 + j_4 + j_5 + j_7 + j_8 + 2j_9 + j_{10} + 2j_{11} \quad (3.3.10)$$

$$v_{3,ss} = k_3 = j_1 + j_6 + j_7 \quad (3.3.11)$$

$$v_{4,ss} = k_4[\text{CRH}]_{ss} = j_1 + j_4 + j_5 + j_7 + j_8 + 2j_9 + j_{10} + 2j_{11} \quad (3.3.12)$$

$$v_{5,ss} = k_5[\text{CHOL}]_{ss}[\text{ACTH}]_{ss} = j_1 + j_5 + j_9 \quad (3.3.13)$$

$$v_{6,ss} = k_6[\text{CHOL}]_{ss}[\text{ACTH}]_{ss} = j_9 + j_{10} + j_{11} \quad (3.3.14)$$

$$v_{7,ss} = k_7[\text{ACTH}]_{ss}[\text{CORT}]_{ss}^2 = j_7 + j_8 + j_{11} \quad (3.3.15)$$

$$v_{8,ss} = k_8[\text{ALDO}]_{ss}[\text{CORT}]_{ss}^2 = j_1 + j_7 + j_9 + j_{11} \quad (3.3.16)$$

$$v_{9,ss} = k_9[\text{CHOL}]_{ss} = j_2 \quad (3.3.17)$$

$$v_{10,ss} = k_{10}[\text{CRH}]_{ss} = j_3 \quad (3.3.18)$$

$$v_{11,ss} = k_{11}[\text{ACTH}]_{ss} = j_4 \quad (3.3.19)$$

$$v_{12,ss} = k_{12}[\text{CORT}]_{ss} = j_5 + j_8 \quad (3.3.20)$$

$$v_{13,ss} = k_{13}[\text{ALDO}]_{ss} = j_6 + j_{10}, \quad (3.3.21)$$

gde $[\text{CHOL}]_{ss}$, $[\text{CRH}]_{ss}$, $[\text{ACTH}]_{ss}$, $[\text{CORT}]_{ss}$ i $[\text{ALDO}]_{ss}$ označavaju, redom, koncentracije holesterola, CRH, ACTH, kortizola i aldosterona u ustaljenom stanju.

Na osnovu jednačina (3.3.9) – (3.3.21) dobijene su međusobno nezavisne linearne relacije među brzinama pojedinih reakcionih koraka u ustaljenom stanju:

$$v_{1,ss} = v_{5,ss} + v_{6,ss} + v_{9,ss} \quad (3.3.22)$$

$$v_{2,ss} = v_{4,ss} + v_{10,ss} \quad (3.3.23)$$

$$v_{3,ss} + v_{6,ss} = v_{8,ss} + v_{13,ss} \quad (3.3.24)$$

$$v_{5,ss} + v_{7,ss} = v_{8,ss} + v_{12,ss} \cdot \quad (3.3.25)$$

$$v_{4,ss} = v_{5,ss} + v_{6,ss} + v_{7,ss} + v_{11,ss} \cdot \quad (3.3.26)$$

Kao što se može videti, u modelu sa holesterolom postoji pet nezavisnih relacija (3.3.22) – (3.3.26), za razliku od prethodnih varijanti modela HPA sistema u kojima

postoje po četiri takve relacije (jed. (3.2.19) – (2.2.22) za prošireni osnovni model i jed. (2.2.17) – (2.2.20) za osnovni model HPA sistema). Ovako dobijen broj nezavisnih relacija mora biti, i jeste, u saglasnosti sa brojem relacija dobijenih na bazi analize odgovarajućih diferencijalnih jednačina u stacionarnom stanju (jed. (3.3.1) – (3.3.5)).

Sledeća faza u SNA predstavlja ispitivanje karaktera stabilnosti kretanja celokupnog sistema oko neravnotežnog stacionarnog (ustaljenog) stanja nakon infinitezimalne perturbacije.

Za te potrebe, koristeći jednačinu (2.2.25), određena je matrica redova reakcija za model HPA sistema sa holesterolom, \mathbf{K} :

$$\mathbf{K} = \begin{matrix} & \text{R1} & \text{R2} & \text{R3} & \text{R4} & \text{R5} & \text{R6} & \text{R7} & \text{R8} & \text{R9} & \text{R10} & \text{R11} & \text{R12} & \text{R13} \\ \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} & \text{CHOL} \\ & & & & & & & & & & & & & \text{CRH} \\ & & & & & & & & & & & & & \text{ACTH} \\ & & & & & & & & & & & & & \text{CORT} \\ & & & & & & & & & & & & & \text{ALDO} \end{matrix} \quad (3.3.27)$$

Korišćenjem izraza za \mathbf{S} (3.3.6), \mathbf{E} (3.3.8) i \mathbf{K} (3.3.27), prema jednačini (2.2.23), izračunata je matrica brzina struja $\mathbf{V}(\vec{j})$ za ispitivani model:

$$\mathbf{V}(\vec{j}) = \begin{bmatrix} V(1,1) & V(1,2) & V(1,3) & V(1,4) & V(1,5) \\ V(2,1) & V(2,2) & V(2,3) & V(2,4) & V(2,5) \\ V(3,1) & V(3,2) & V(3,3) & V(3,4) & V(3,5) \\ V(4,1) & V(4,2) & V(4,3) & V(4,4) & V(4,5) \\ V(5,1) & V(5,2) & V(5,3) & V(5,4) & V(5,5) \end{bmatrix}. \quad (3.3.28)$$

Elementi matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$, $V(i, j)$ ($i, j = 1, 2, \dots, 5$), glase:

$$V(1,1) = j_1 + j_2 + j_5 + 2j_9 + j_{10} + j_{11}$$

$$V(1,2) = 0$$

$$V(1,3) = j_1 + j_5 + 2j_9 + j_{10} + j_{11}$$

$$V(1,4) = 0$$

$$V(1,5) = 0$$

$$\begin{aligned}
V(2,1) &= 0 \\
V(2,2) &= j_1 + j_3 + j_4 + j_5 + j_7 + j_8 + 2j_9 + j_{10} + 2j_{11} \\
V(2,3) &= 0 \\
V(2,4) &= 0 \\
V(2,5) &= 0 \\
V(3,1) &= j_1 + j_5 + 2j_9 + j_{10} + j_{11} \\
V(3,2) &= -j_1 - j_4 - j_5 - j_7 - j_8 - 2j_9 - j_{10} - 2j_{11} \\
V(3,3) &= j_1 + j_4 + j_5 + j_7 + j_8 + 2j_9 + j_{10} + 2j_{11} \\
V(3,4) &= 2j_7 + 2j_8 + 2j_{11} \\
V(3,5) &= 0 \\
V(4,1) &= -j_1 - j_5 - j_9 \\
V(4,2) &= 0 \\
V(4,3) &= -j_1 - j_5 - j_7 - j_8 - j_9 - j_{11} \\
V(4,4) &= 2j_1 + j_5 - j_8 + 2j_9 \\
V(4,5) &= j_1 + j_7 + j_9 + j_{11} \\
V(5,1) &= -j_9 - j_{10} - j_{11} \\
V(5,2) &= 0 \\
V(5,3) &= -j_9 - j_{10} - j_{11} \\
V(5,4) &= 2j_1 + 2j_7 + 2j_9 + 2j_{11} \\
V(5,5) &= j_1 + j_6 + j_7 + j_9 + j_{10} + j_{11}.
\end{aligned} \tag{3.3.28}$$

Dimenzije matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ su 5×5 s obzirom na to da ispitivani model sadrži pet nezavisnih intermedijernih vrsta (holesterol, CRH, ACTH, kortizol i aldosteron).

Na osnovu jednačine $\mathbf{J} = -\mathbf{V}(\vec{j}) \text{diag } \vec{h}$ (jed. (2.2.22)), uz korišćenje izraza za matricu brzina struja $\mathbf{V}(\vec{j})$ (jed. (3.3.28)), može se odrediti jakobijan ovog sistema kao linearizovani operator dinamike sistema u okolini datog ustaljenog stanja. U ovom modelu, elementi vektora recipročnih koncentracija \vec{h} su recipročne koncentracije h_i (i

= 1,...,5) njegovih intermedijera u ustaljenom stanju, $[\text{CHOL}]_{\text{ss}}$, $[\text{CRH}]_{\text{ss}}$, $[\text{ACTH}]_{\text{ss}}$, $[\text{CORT}]_{\text{ss}}$ i $[\text{ALDO}]_{\text{ss}}$, redom.

Za razmatrani model HPA sa holesterolom, u kojem ima pet nezavisnih intermedijernih vrsta, karakteristična jednačina operatora \mathbf{J} glasi:

$$\text{Det}[\lambda \mathbf{I} - \mathbf{J}] = \alpha_0 \lambda^5 + \alpha_1 \lambda^4 + \lambda^3 \alpha_2 + \lambda^2 \alpha_3 + \lambda \alpha_4 + \alpha_5. \quad (3.3.29)$$

Koeficijent α_i ($i = 1, \dots, 5$) karakteristične jednačine (3.3.29), kao i ranije, izračunava se kao suma svih dijagonalnih minora dimenzije $i \times i$ matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ pomnoženih odgovarajućim proizvodom koji čini kombinacija od i recipročnih koncentracija h_i ; kao i do sada, prema konvenciji, $\alpha_0 = 1$. Radi ilustracije, i u ovom modelu biće navedeno izračunavanje minora dimenzije 3×3 . Za razliku od prethodna dva modela HPA sistema koji imaju četiri nezavisna intermedijera, u slučaju ovog modela postoji pet nezavisnih intermedijera, pa se dijagonalni minori dimenzije 3×3 dobija kao kombinacija bilo koja tri reda i tri odgovarajuće kolone od ukupno pet redova odn. kolona matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$: redovi 1, 2, 3 i kolone 1, 2, 3 (minor M_{123}); redovi 1, 2, 4 i kolone 1, 2, 4 (minor M_{124}); redovi 1, 2, 5 i kolone 1, 2, 5 (minor M_{125}); redovi 1, 3, 4 i kolone 1, 3, 4 (minor M_{134}); redovi 1, 3, 5 i kolone 1, 3, 5 (minor M_{135}); redovi 1, 4, 5 i kolone 1, 4, 5 (minor M_{145}); redovi 2, 3, 4 i kolone 2, 3, 4 (minor M_{234}); redovi 2, 3, 5 i kolone 2, 3, 5 (minor M_{235}); redovi 2, 4, 5 i kolone 2, 4, 5 (minor M_{245}); i redovi 3, 4, 5 i kolone 3, 4, 5 (minor M_{345}). Svaki od ovih minora je pomnožen odgovarajućim proizvodom recipročnih koncentracija intermedijera modela: $h_1 h_2 h_3$, $h_1 h_2 h_4$, $h_1 h_2 h_5$, $h_1 h_3 h_4$, $h_1 h_3 h_5$, $h_1 h_4 h_5$, $h_2 h_3 h_4$, $h_2 h_3 h_5$, $h_2 h_4 h_5$, i $h_3 h_4 h_5$, redom, pri čemu su dobijeni svi članovi potrebni za izračunavanje α_3 : $M_{123} h_1 h_2 h_3$, $M_{124} h_1 h_2 h_4$, $M_{125} h_1 h_2 h_5$, $M_{134} h_1 h_3 h_4$, $M_{135} h_1 h_3 h_5$, $M_{145} h_1 h_4 h_5$, $M_{234} h_2 h_3 h_4$, $M_{235} h_2 h_3 h_5$, $M_{245} h_2 h_4 h_5$ i $M_{345} h_3 h_4 h_5$. Na kraju, zbir ovih deset članova, koji predstavljaju sve dijagonalne minore trećeg reda pomnožene odgovarajućim tročlanim proizvodom recipročnih koncentracija intermedijera modela, definiše u karakterističnom polinomu jakobijana modela (3.3.29) koeficijent α_3 :

$$\alpha_3 = M_{123} h_1 h_2 h_3 + M_{124} h_1 h_2 h_4 + M_{125} h_1 h_2 h_5 + M_{134} h_1 h_3 h_4 + M_{135} h_1 h_3 h_5 + M_{145} h_1 h_4 h_5 + M_{234} h_2 h_3 h_4 + M_{235} h_2 h_3 h_5 + M_{245} h_2 h_4 h_5 + M_{345} h_3 h_4 h_5. \quad (3.3.30)$$

Dakle, koeficijenti karakterističnog polinoma α_i , predstavljaju sume izvedene iz matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$, i kao takvi su funkcije brzina struja j_i . Kao i u slučaju prethodna dva razmatrana modela HPA sistema, dijagonalni minori, a time i koeficijenti α_i ispitivanog modela HPA sistema sa holesterolom mogu biti u potpunosti transformisani iz oblika u kojima su dati kao funkcije brzina struja j_i u oblik koji je funkcija isključivo brzina u neravnotežnom stacionarnom (ustaljenom) stanju, $v_{i,ss}$. Kako vrednosti brzina reakcija u ustaljenom stanju mogu biti određene eksperimentalnim ili izračunate teorijskim putem, druga forma izražavanja α_i je znatno pogodnija za upotrebu u opštem slučaju.

I ovde treba istaći da zbog toga što osnovna jednačina SNA (jed. (2.2.7)) u opštem slučaju može imati više od jednog rešenja, što se ogleda u postojanja linearnih veza među brzinama u ustaljenom stanju (za ovaj model datih jed. (3.3.23) – (3.3.26)), supstitucija brzina struja j_i sa brzinama u ustaljenom stanju $v_{i,ss}$ nije jednoznačna.

Kao i u slučaju prethodna dva stehiometrijska modela HPA sistema, uslov nestabilnosti ispitivanog HPA modela sa holesterolom je određen u veoma dobroj aproksimaciji nalaženjem dijagonalnih minora matrice brzina struja $\mathbf{V}(\vec{j})$ koji imaju negativne članove. Utvrđeno je da svi minori sa negativnim članovima sadrže izraz koji odgovara dijagonalnom minoru drugog reda matrice $\mathbf{V}(\vec{j})$ (jed. (3.3.28)) čije vrste i kolone odgovaraju kortizolu i aldosteronu, M_{45} . Prema ovoj aproksimaciji, sistem će imati oblast nestabilnosti ako je $M_{45} < 0$. Prevođenjem izraza za minor M_{45} iz oblika u kojem je on funkcija brzina struja j_i u oblik koji sadrže isključivo brzine u ustaljenom stanju $v_{i,ss}$, konačno se dobija uslov nestabilnosti modela HPA sistema sa holesterolom:

$$v_{12,ss} v_{13,ss} + v_{8,ss} (v_{12,ss} + 2v_{13,ss}) < 2v_{7,ss} (v_{8,ss} + v_{13,ss}). \quad (3.3.31)$$

Navedena nejednakost predstavlja jezgro nestabilnosti ovog modela, i ona mora biti zadovoljena da bi model bio u nestabilnom neravnotežnom stacionarnom stanju, i da bi mogao da ispolji oscilatorno evoluciju nastalu kao rezultat njegove unutrašnje nestabilnosti.

Kao i u slučaju izraza za uslov nestabilnosti proširenog osnovnog modela HPA sistema (jed. (3.2.26), izraz za nestabilnost HPA modela sa holesterolom (jed. (3.3.31)) se može redukovati na izraz za jezgro nestabilnosti osnovnog modela HPA sistema. To se postiže ako se u uslovu nestabilnosti modela HPA sistema sa holesterolom (jed. (3.3.31)) sve brzine u ustaljenom stanju koje ne postoje u mehanizmu osnovnog modela HPA sistema izjednače sa nulom. Konkretno, pošto reakcioni korak (R13) ne postoji u osnovnom HPA modelu, onda je $v_{13,ss} = 0$, pa se izraz (3.3.31) svodi na:

$$v_{12,ss} < 2v_{7,ss}. \quad (3.3.32)$$

Dobijni izraz (jed. 3.3.32) predstavlja jezgro nestabilnosti osnovnog modela HPA sistema (jed. 2.2.39), i izražen je u notaciji za brzine u ustaljenom stanju kao u ovom modelu (HPA model sa holesterolom). Ovakav rezultat se donekle mogao i očekivati imajući u vidu da su oba nova stehiometrijska modela HPA (prošireni osnovni model i model HPA sistema sa holesterolom) nastala iz osnovnog modela HPA sistema dodavanjem reakcija koje regulišu nivo kortizola i aldosterona. Dobijeno slaganje i konzistentost jezgara nestabilnosti među konsektivnim modelima HPA sistema (osnovni model (4 vrste i 9 reakcija) → prošireni osnovni model (4 vrste i 11 reakcija) → model HPA sistema sa holesterolom (5 vrsta i 13 reakcija) demonstrira potencijal i praktičnu vrednost stehiometrijskih modela: polazni stehiometrijski model se može naknadno unapređivati i proširivati sa novim vrstama i reakcionim koracima, prema potrebama i ciljevima istraživanja, istovremeno zadržavajući u novim varijantama modela ključna dinamička svojstva iz modela iz kojeg je izveden.

Kako je ranije naglašeno, dobijeni uslov nestabilnosti (3.3.31) nije jednoznačno definisan, već se korišćenjem relacija među brzinama u ustaljenom stanju (3.3.23) – (3.3.26), može transformisati tako da u njemu figurišu i druge brzine u ustaljenom stanju, koje su od značaja za analizu u datom istraživanju. Ovde, prema uslovu nestabilnosti (3.3.31), moglo bi se zaključiti da stabilnost nekog ustaljenog stanja ovog sistema ne zavisi niti od jedne kinetičke veličine holesterola (niti njegove ustaljene koncentracije niti konstanti brzina reakcionih koraka u kojima učestvuje holesterol). Međutim, uslov (3.3.31) može biti transformisan tako da eksplicitno pokazuje zavisnost od kinetičkih veličina holesterola: na primer, linearnim kombinovanjem

relacija (3.3.22) i (3.3.24), dobija se relacija $v_{1,ss} + v_{3,ss} - v_{5,ss} - v_{9,ss} = v_{8,ss} + v_{13,ss}$, koja uvršćena u uslov nestabilnosti (3.3.31) daje:

$$v_{12,ss} v_{13,ss} + v_{8,ss} (v_{12,ss} + 2v_{13,ss}) + 2v_{7,ss} (v_{5,ss} + v_{9,ss}) < 2v_{7,ss}(v_{1,ss} + v_{3,ss}). \quad (3.3.33)$$

Nejednakost (3.3.33) je ekvivalentna polaznom uslovu nestabilnosti (3.3.31), i direktno pokazuje da stabilnost ustaljenog stanja i oscilatorna dinamika HPA modela sa holesterolom zavise od brzine ulaza holesterola u sistem ($v_{1,ss}$), njegove transformacije u kortizol ($v_{5,ss}$) i njegove brzine eliminacije iz sistema ($v_{9,ss}$) u ustaljenom stanju.

Koncentracije intermedijera u ustaljenom stanju izračunate su iz uslova stacionarnosti modela, izjednačavanjem sa nulom svih brzina po intermedijerima modela (holesterol, CRH, ACTH, kortizol i aldosteron), jednačine (3.3.1) – (3.3.5). Konkretno, ustaljena koncentracija holesterola je izračunata izjednačavanjem jednačine (3.3.1) sa nulom:

$$[\text{CHOL}]_{ss} = \frac{k_1}{[\text{ACTH}]_{ss} (k_1 + k_8) + k_9}, \quad (3.3.34)$$

dok je ustaljena koncentracija CRH dobijena izjednačavanjem sa nulom jednačine (3.3.2):

$$[\text{CRH}]_{ss} = \frac{k_2}{k_4 + k_{10}}. \quad (3.3.35)$$

Izjednačavanjem izraza (3.3.3) sa nulom i uvršćavanjem jednačine (3.3.34) u taj izraz dobija se koncentracija ACTH u ustaljenom stanju:

$$[\text{ACTH}]_{ss} = \frac{k_2 k_4}{(k_4 + k_{10})[(k_5 + k_6)[\text{CHOL}]_{ss} + k_7([\text{CORT}]_{ss})^2 + k_{11}]}, \quad (3.3.36)$$

dok se koncentracija aldosterona u ustaljenom stanju nalazi izjednačavanjem izraza (3.3.5) sa nulom:

$$[\text{ALDO}]_{ss} = \frac{k_3 + k_6[\text{CHOL}]_{ss}[\text{ACTH}]_{ss}}{k_8([\text{CORT}]_{ss})^2 + k_{13}}. \quad (3.3.37)$$

Zamenjujući jednačine (3.3.36) i (3.3.37) u izraz za brzinu po kortizolu (3.3.4) izjednačenu sa nulom dobija se polinom koji definiše koncentraciju kortizola u ustaljenom stanju:

$$\begin{aligned} & [k_7k_8(k_1 - k_9[\text{CHOL}]_{ss})][[\text{CORT}]_{ss}]^4 - \{[(k_5 + k_6)k_8k_{12}][[\text{CHOL}]_{ss}]\}([\text{CORT}]_{ss})^3 \\ & + \{(k_6 - k_5)k_8k_9([\text{CHOL}]_{ss})^2 - [k_7k_9k_{13} + k_3(k_5 + k_6)k_8 - k_1k_8(k_6 - k_5)][[\text{CHOL}]_{ss}]\}([\text{CORT}]_{ss})^2 \\ & - \{[(k_5 + k_6)k_{12}k_{13}][[\text{CHOL}]_{ss}][[\text{CORT}]_{ss}] - (k_5k_9k_{13}([\text{CHOL}]_{ss})^2 - k_1k_5k_{13}[\text{CHOL}]_{ss})\} = 0 \end{aligned} \quad (3.3.38)$$

Kombinovanjem jednačina (3.3.34) i (3.3.36) dobija se izraz za $[\text{CHOL}]_{ss}$ izražen samo kao funkcija od $[\text{CORT}]_{ss}$ kao jedine promenljive:

$$\begin{aligned} [\text{CHOL}]_{ss,1/2} = & \frac{-\left[k_7k_8[\text{CORT}]_{ss}^2 + \frac{k_2k_4(k_5 + k_6)}{(k_4 + k_{10})} - k_1(k_5 + k_6) + k_9k_{11} \right]}{2k_9(k_5 + k_6)} \\ & \pm \frac{\sqrt{\left[k_7k_8[\text{CORT}]_{ss}^2 + \frac{k_2k_4(k_5 + k_6)}{(k_4 + k_{10})} - k_1(k_5 + k_6) + k_9k_{11} \right]^2 - 4k_9(k_5 + k_6) \left[k_1k_7[\text{CORT}]_{ss}^2 + k_1k_{11} \right]}}{2k_9(k_5 + k_6)}. \end{aligned} \quad (3.3.39)$$

Na osnovu dobijenog izraza (3.3.39) se zaključuje da je polinom (3.3.38) implicitno polinom šestog reda po $[\text{CORT}]_{ss}$.

Za definisani skup konstanti brzina, korišćenjem izraza (3.3.34) – (3.3.38) za koncentracije intermedijera modela HPA sistema sa holesterolom u ustaljenom stanja mogu se izračunati brzine reakcionih koraka modela u ustaljenom stanju $v_{i,ss}$ (jednačine (3.3.9) – (3.3.21)). Time se može neposredno utvrditi da li je ispunjen uslov za nestabilnost modela (3.3.31). Za vrednosti konstanti brzina prikazanih u tabeli 3.3.1, uslov nestabilnosti modela HPA sistema sa holesterolom (3.3.31) je zadovoljen. Stoga predloženi model poseduje unutrašnju nestabilnost i može ispoljiti oscilatorno

ponašanje. Validnost prikazane analize stabilnosti dobijene na bazi SNA potvrđena je u numeričkim simulacijama (v. poglavlje 3.3.3).

3.3.3 Numerička analiza modela HPA sistema sa holesterolom

Kao i ranije, sledeća etapa u ispitivanju predloženog HPA modela sa holesterolom je provera njegove validnosti i procena njegovog prediktivnog kapaciteta pomoću numeričkih simulacija.

3.3.3.1. Vremenske serije dinamičkih varijabli modela

Kao i u prethodnim varijantama modela HPA, vremenske evolucije dinamičkih promenljivih modela – trenutne koncentracija njegovih internih vrsta ([CHOL], [CRH], [ACTH], [CORT], [ALDO]) – dobijene su integracijom sistema diferencijalnih jednačina (jed. (4.1) – (4.5)) u MATLAB softveru, kako je objašnjeno u poglavlju 2.1.

Kao i ranije, ispitivana su dva slučaja u vezi sa tipom i frekventnim domenom simuliranih oscilacija: kada sprezanje između modela odn. sistema jednačina (jed. (3.3.1) – (3.3.5) i dnevne funkcije D ne postoji, i onda kada ovo sprezanja postoji. Slično prethodnim istraživanjima, sprezanje modela sa periodičnom dnevnom funkcijom D se ostvaruje njenim množenjem sa konstantom brzine uvođenja CRH u sistem, k_2 , pri čemu k_2 postaje promenljiva u vremenu: $k_2(t) = k_2 \cdot D$. Rezultati za oba slučaja su dobijeni za vrednosti konstanti brzina prikazane u tabeli 3.3.1.

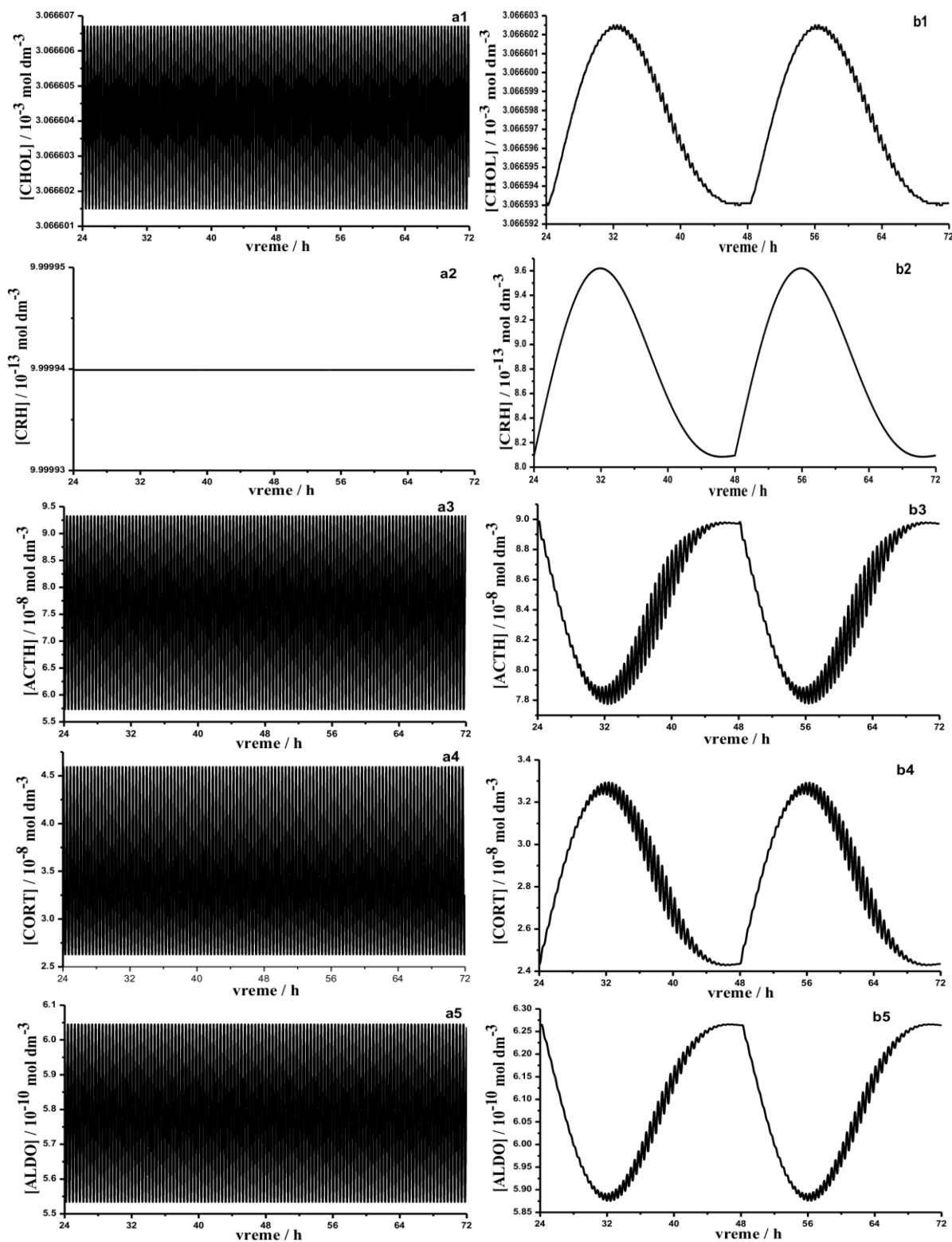
U slučaju kada nema sprezanja modela sa D , [CHOL], [ACTH], [CORT] i [ALDO] ispoljavaju unutardnevnu oscilatornu vremensku evoluciju, dok se [CRH] nalazi u stabilnom stacionarnom stanju (slike 3.3.1a1 - a5). Dinamičko stanje [CRH] je očekivano, imajući u vidu jednačinu za njegovu koncentraciju u neravnotežnom stacionarnom stanju (3.3.35), prema kojoj ta veličina zavisi samo od odnosa konstanti brzina odgovarajućih reakcionih koraka, i stoga se ne menja sa vremenom. U slučaju sprezanja modela sa D , [CHOL], [ACTH], [CORT] i [ALDO] pokazuju složenu

oscilatornu evoluciju, pri kojoj su unutarodnevnne oscilacije superponirane na dnevne oscilacije, dok [CRH] poseduje samo dnevne oscilacije ((slike 3.3.1b1 - b5)). U ovom slučaju, u modelu umesto k_2 figuriše vremenski zavisna konstanta brzine $k_2(t)$, čija se vrednost periodično menja pod delovanjem dnevne funkcije D ; s obzirom na to, ustaljena koncentracija CRH, $[CRH]_{ss}$, u jednačini (3.3.35) je srazmerna sa $k_2(t)$ i vremenska evolucija [CRH] ispoljava dnevne oscilacije.

Dobijene simulacije vremenskih serija su analogne onim iz prethodna dva modela HPA za sve vrste koje su prisutne u sva tri HPA modela (CRH, ACTH, CORT i ALDO). Koncentracija holesterola, kao nova dinamička promenljiva u modelu, u oba ispitivana slučaja sprezanja modela sa D , u simulacijama pokazuje oscilatornu dinamiku, ali sa amplitudama oscilacija koje su mnogo manje od apsolutne vrednosti koncentracije holesterola (slike 3.3.1a1 i b1). Imajući to u vidu može se smatrati da je koncentracija holesterola praktično konstantne vrednosti, nalazeći se u (kvazi)stabilnom ustaljenom stanju. Takvo dinamičko ponašanje koncentracije holesterola ukazuje da se holesterol može svrstati u tzv. neesencijalne intermedijerne vrste. Kategorizacija vrsta u nekom oscilatornom reakcionom sistemu na esencijalne i neesencijalne predložena je od strane Eiswirth i sar. [72, 139] na osnovu značaja i uloge tih vrsta u realizaciji oscilacija u datom sistemu.

Dobijene simulacije vremenske evolucije koncentracija za svih 5 nezavisnih intermedijara u ovom modelu (CHOL, CRH, ACTH, CORT and ALDO), u slučaju kada postoji sprezanje sa dnevnom funkcijom D , nalaze se u dobroj saglasnosti sa *in vivo* eksperimentalnim koncentracionim profilima ovih vrsta u pogledu tipa dinamike kao i drugih bitnih dinamičkih karakterisitka.

Srednji nivoi koncentracija hemijskih vrsta dobijenih u simulacijama ovog modela za oba ispitivana slučaja (bez i sa sprezanjem modela sa dnevnom funkcijom D) prikazani su u tabeli 3.3.2 uporedno sa odgovarajućim vrednostima dobijenim u simulacijama na bazi osnovnog modela HPA sistema [16, 18], i sa referentnim opsezima ovih vrsta u plazmi pri bazalnoj fiziologiji HPA ose čoveka.



Slika 3.3.1. Vremenske evolucije koncentracije holesterola, CRH, ACTH, kortizola i aldosterona ($[CHOL]$, $[CRH]$, $[ACTH]$, $[CORT]$ i $[ALDO]$, redom) modela HPA sistema sa holesterolom (tabela 3.3.1). U slučajevima **a1** - **a5** ne postoji, dok u slučajevima **b1** - **b5** postoji sprezanje modela (jed. (3.3.1) – (3.3.5)) sa dnevnom funkcijom D (jed. (3.1.1)).

Tabela 3.3.2. Uporedni pregled srednjih koncentracija hemijskih vrsta HPA sistema, holesterola (<[CHOL]>), CRH (<[CRH]>), ACTH (<[ACTH]>), kortizola (<[CORT]>) i aldosterona (<[ALDO]>), dobijenih u numeričkim simulacijama na bazi modela HPA sistema i eksperimentalno merenih vrednosti u krvnoj plazmi čoveka. Numeričke simulacije dobijene su korišćenjem osnovnog modela HPA sistema (tabela 1.1) i modela HPA sistema sa holesterolom (tabela 3.3.1), u slučaju kada su ovi modeli spregnuti sa dnevnom funkcijom D (jed. (3.3.1)). Sve navedene vrednosti srednjih koncentracija određene su pri bazalnim fiziološkim uslovima. $M = \text{mol dm}^{-3}$.

model	osnovni model HPA sistema	model HPA sistema sa holesterolom	referentne fiziološke vrednosti
<[CHOL]> / M	/	$3,07 \cdot 10^{-3}$	$3,10 \cdot 10^{-3} - 5,20 \cdot 10^{-3}$ * [140, 141]
<[CRH]> / M	$8,85 \cdot 10^{-9}$	$8,85 \cdot 10^{-13}$	$7,70 \cdot 10^{-13} - 2,50 \cdot 10^{-12}$ [50]
<[ACTH]> / M	$8,85 \cdot 10^{-8}$	$8,38 \cdot 10^{-8}$	$2,00 \cdot 10^{-12} - 1,32 \cdot 10^{-11}$ [142, 143]**
<[CORT]> / M	$2,41 \cdot 10^{-8}$	$2,86 \cdot 10^{-8}$	$55 \cdot 10^{-9} - 690 \cdot 10^{-9}$ [142, 144]
<[ALDO]> / M	$1,62 \cdot 10^{-8}$	$6,07 \cdot 10^{-10}$	$1,17 \cdot 10^{-10} - 1,74 \cdot 10^{-9}$ [142]

*Vrednosti se odnose na ukupni holesterol.

** Referentni opseg nivoa ACTH, u tabeli izražen u jedinicama za molarnu koncentraciju (mol dm^{-3}), izračunat je iz literaturnih podataka datih u pg ml^{-1} , uzimajući da je molarna masa ACTH 4541 g mol^{-1} [145, 146].

U slučaju sprežanja sa dnevnom funkcijom D , predloženi model sa holesterolom, pored mogućnosti da na adekvatan način simulira dinamiku HPA sistema svojstvenu njegovom bazalnom stanju *in vivo*, istovremeno može da simulira i to da se srednji koncentracioni opsezi za 4 vrste modela, CHOL, CRH, CORT i ALDO, nalaze u fiziološkim granicama svojstvenim za krvnu plazmu čoveka (tabela 3.3.2).

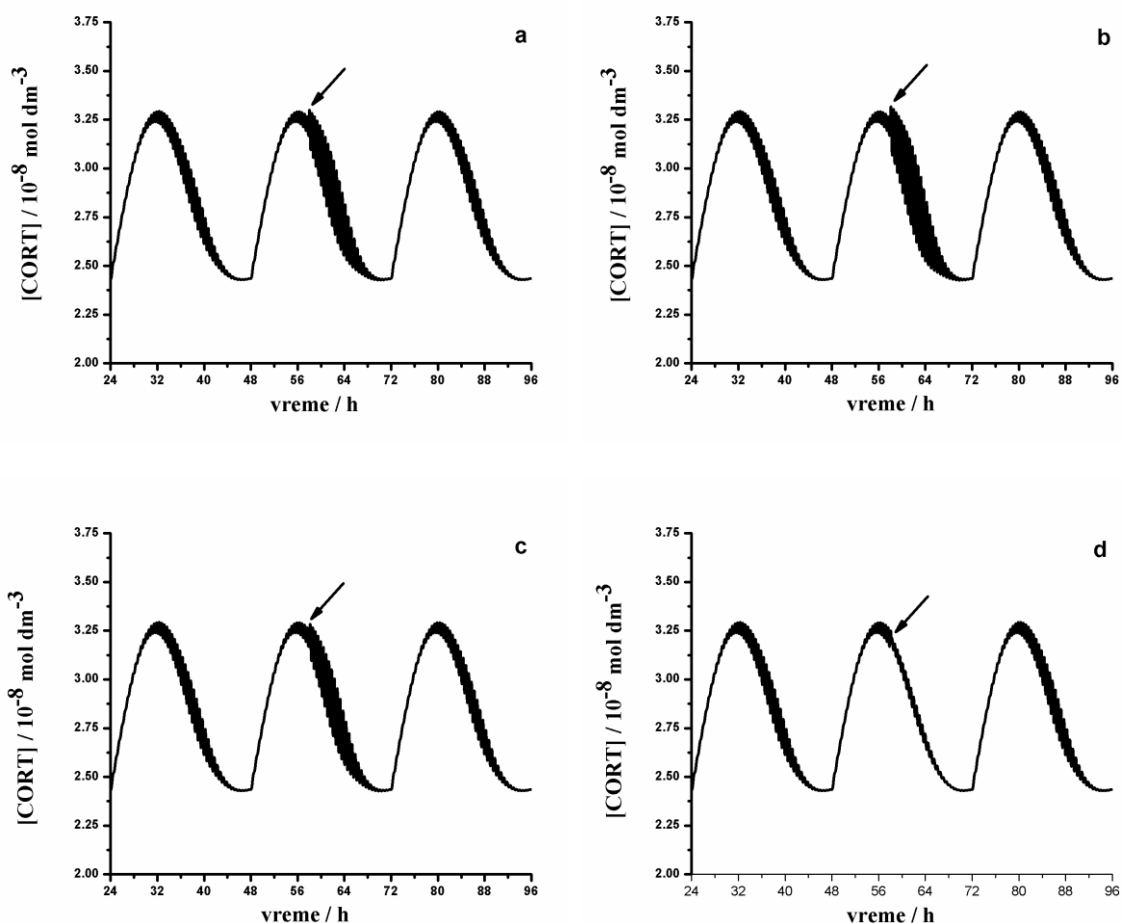
U prethodnim varijantama modela HPA sistema (osnovni model i prošireni osnovni model HPA sistema) postoje su određena odstupanja u pogledu dinamičkog ponašanja aldosterona, CRH i ACTH. Prvo, srednja koncentracija aldosterona dobijena

u simulacijama pomoću oba navedena modela je bila za oko jedan red veličine viša od fizioloških vrednosti (uporediti drugu i poslednju vrstu u tabeli), dok su njegove unutar-dnevne oscilacije, u slučaju sprežanja modela sa D , pokazivale suviše male amplitude, skoro nulte veličine, u odnosu na realni sistem gde su unutar-dnevne amplitude jasno definisane. Kao drugo, koncentracija CRH je posedovala suviše visok nivo, za oko četiri reda veličine viši od eksperimentalno merenog nivoa u plazmi hipotalamo-hipofizno portalnog krvotoka čoveka [50]. I kao treće, srednji nivo ACTH dobijen u simulacijama na bazi prethodna dva modela HPA bio je za oko tri reda veličine viši od referentnih fizioloških vrednosti. U simulacijama pomoću modela HPA sa holesterolom, početnim prekursorom kortizola i aldosterona, čija je koncentracija dodatna dinamička varijabla u modelu, navedeni nedostaci u vezi sa dinamikom i koncentracionim nivoima aldosterona i CRH su uspešno otklonjeni i usaglašeni sa eksperimentalnim rezultatima.

Međutim, i u novom modelu sa holesterolom, srednji nivo ACTH dobijen u simulacijama ostao je na suviše visok, za oko tri reda veličine viši od njegovih fizioloških vrednosti u opštoj cirkulaciji (tabela 3.3.2). Uprkos intenzivnim naporima, u simulacijama na bazi predloženog modela srednja vrednost ACTH nije mogla biti snižena na odgovarajući eksperimentalni nivo da istovremeno dinamika i koncentracioni nivoi drugih vrsta HPA sistema ostanu u skladu sa eksperimentalnim nalazima. Navedeno odstupanje nivoa ACTH dobijenog u simulacijama od njegovih fizioloških vrednosti nastaje usled još uvek pojednostavljene, konceptualne prirode predloženog modela HPA sistema sa holesterolom, koji opisuje samo najznačajnije vrste i interakcije na nivou celokupnog HPA sistema. Pored toga, jedna ista hemijska vrsta može u različitim tkivima i organima u različitim kompartmanima HPA sistema imati značajno drugačije vrednosti lokalnih koncentracija, pa se i ne zna tačno kolike su koncentracije posmatranih vrsta u posmatranim tkivima. Moglo bi se pretpostaviti da postoji značajna varijabilnost u lokalnim koncentracijama ACTH u različitim delovima (kompartmanima) HPA ose (npr. u hipofizi, sistemske cirkulaciji, na nivou adrenalnih žlezda), te da je, shodno tome, efektivna koncentracija ACTH, na mestu delovanja ACTH vezivanjem za njegove specifične receptore, melanokortin tip II (eng. melanocortin M2CR) koji se nalaze na plazma membrani steroidogenih adrenalnih ćelija, značajno viša od vrednosti ACTH merenoj u globalnoj cirkulaciji, koja se uobičajeno uzima za referentnu vrednost.

Nemogućnost da se dobiju realne, fiziološke vrednosti koncentracije ACTH bi mogla ukazati na to da bi u narednim varijantama modela HPA sistema trebalo razlikovati najmanje dve vrste ACTH jedinice: globalnu vrstu ACTH prisutnu u opštoj cirkulaciji i lokalnu vrstu ACTH na nivou adrenalne žlezde koja se direktno vezuje za svoje receptore, regulišući proces adrenalne steroidogeneze. Moguća važnost kompartmentalizacije ACTH molekula (a potencijalno, i nekih drugih hemijskih vrsta) za modeliranje dinamičkih stanja HPA sistema ostaje da bude ispitana u nekim od narednih stupnjeva evolucije predloženog modela, dok će njena potpunija potvrda biti ustanovljena tek nakon otklanjanja postojećih tehničkih poteškoća pri *in vivo* određivanju lokalnih koncentracija ACTH na različitim kompartmentima HPA ose.

Predloženi model HPA ose sa holesterolom (kada je model spregnut sa dnevnom funkcijom D) pokazao je značajnu osetljivost na vreme delovanja (tajming) i intenzitet akutnih perturbacija pomoću [CRH] (slika 3.3.2). U zavisnosti od unutardnevne faze, dnevne faze ili intenziteta [CRH] perturbacija, dinamički odgovor koncentracije kortizola, kao glavnog pokazatelja stanja i osetljivosti HPA sistema, u simulacijama je dobijen različit kvalitativni odgovor, odn. povećanje (slike 3.3.2. a - c) ili sniženje (slika 3.3.2. d) referentne amplitude unutardnevnih oscilacija koncentracije kortizola u odnosu odgovarajuću vrednost referentne amplitude kada nema delovanja stresora (bazalna fiziologija).



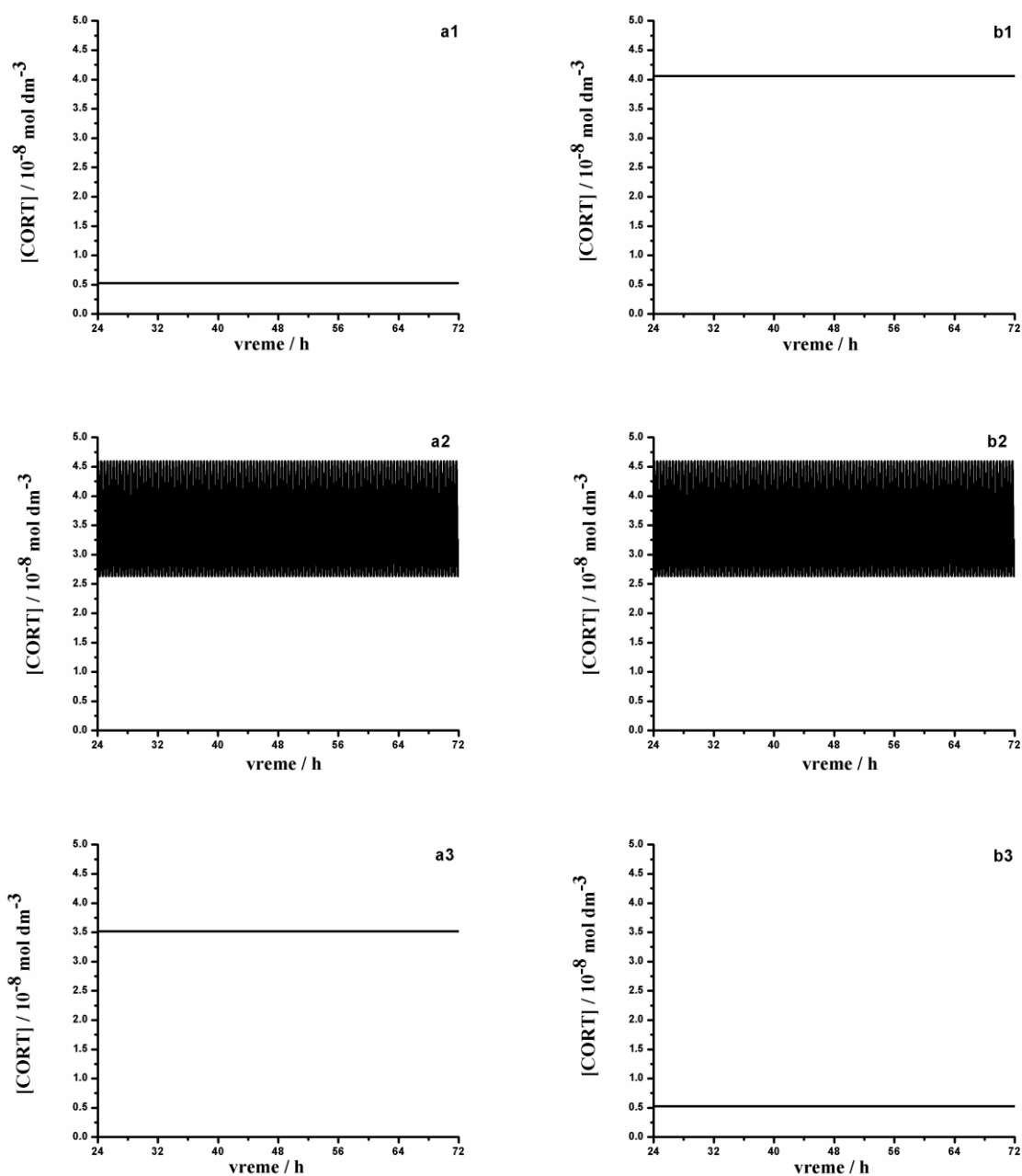
Slika 3.3.2. Efekat unutardnevnog faznog ugla na dinamički odgovor modela HPA sistema sa holesterolom. U svim slučajevima intenzitet perturbacije odn. koncentracija CRH je iznosila $[CRH] = 1 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$. Za slučajeve kada je perturbacija delovala pri unutardnevnom faznom uglu u **(a)** minimumu ($\varphi_u = 0$), **(b)** uzlaznoj prevojnoj tački ($\varphi_u = 0,328$) ili **(c)** maksimumu ($\varphi_u = 0,487$) javlja se povećanje relativne amplitude ($A_{rel} > 1$), dok u slučaju kada je perturbacija delovala u **(d)** silaznoj prevojnoj tački ($\varphi_u = 0,733$) dolazi do smanjenja relativne amplitude oscilacija koncentracije kortizola ($A_{rel} < 1$). Strelica prikazuje trenutak delovanja perturbacije.

3.3.2.2. Uticaj kinetičkih parametara holesterola na globalnu dinamiku HPA sistema

U cilju utvrđivanja značaja novouvedene dinamičke varijable, koncentracije holesterola, na globalno dinamičko ponašanje HPA ose, izvršeno je sistematsko variranje kinetičkih parametara holesterola, njegove konstante brzine za ulaz u sistem (konstanta unosa,

influksa, k_1) ili izlaz iz sistema (konstanta efluksa, k_9). Polazeći od dinamičkog stanja definisanog u simulacijama kao osnovno, bazalno fiziološko, stanja HPA sistema (dobijenog za parametre modela iz tabele 3.3.1), varirana je po jedna od navedenih konstanti (k_1 ili k_9), dok su sve ostale konstante zadržale istu vrednost kao u tabeli 3.3.1. Promenom vrednosti k_1 ili k_9 , u oba smera promene (bilo smanjenjem ili povećanjem), u slučaju kada model nije spregnut sa dnevnom funkcijom D , može dovesti do bifurkacije iz stanja unutar dnevnih oscilacija u stabilno stacionarno neravnotežno (odn. ustaljeno) stanje kod svih internih vrsta, osim CRH (koji se pri datim, početnim parametrima u ovom numeričkom eksperimentu već nalazio u stabilnom stacionarnom stanju, i čije ustaljeno stanje ne zavisi od konstanti brzina k_1 niti k_9). Ovaj efekat k_1 odn. k_9 prikazan je za kortizol na slici 3.3.3.

Dakle, predloženi model predviđa da se kortizol može naći u različitim tipovima dinamičkih stanja (unutar dnevnih oscilacije ili stabilno ustaljeno stanje) u zavisnosti od vrednosti kinetičkih parametra holesterola, bilo njegove brzine ulaza u sistem, k_1 , bilo konstante brzine njegovog izlaza iz sistema, k_9 . Dobijeni rezultati na bazi predloženog modela sa holesterolom ukazuju na značaj uloge brzine ulaza ili izlaza holesterola iz sistema, odn. sumarne brzine promene koncentracije holesterola na dinamiku celokupnog HPA sistema, podvlačeći na taj način uticaj kinetike holesterola na homeostatski potencijal HPA sistema. Ovi rezultati su u skladu sa eksperimentalnim nalazima sprovedenim na pacovima *in vivo* [137], prema kojima se promenom vrednosti ulaza (influksa) ili izlaza (efluksa) holesterola, odn. ukupnog balansa holesterola na nivou adrenalnih steroidogenih ćelija, može u značajnoj meri promeniti i poremetiti homeostaza kortizola, a time i celokupne HPA ose.



Slika 3.3.3. Efekat promene kinetičkih parametara holesterola, konstante brzina ulaza (k_1) i izlaza (k_9), na tip dinamičkog stanja koncentracije kortizola za model bez dnevne funkcije D . Različita dinamička stanja prikazana su u vremenskim serijama koncentracije kortizola dobijenim u simulacijama za različite vrednosti k_1 i k_9 . Za **(a1)** $k_1 = 1,38 \cdot 10^{-5}$ i **(a3)** $k_1 = 1,70 \cdot 10^{-4}$, koncentracija kortizola je u stabilnom ustaljenom stanju, dok za **(a2)** $k_1 = 1,38 \cdot 10^{-4}$ ispoljava unutar-dnevnu oscilatornu evoluciju (definisano kao bazalno stanje). Analogno, za **(b1)** $k_9 = 4,5 \cdot 10^{-3}$ i **(b3)** $k_9 = 4,5 \cdot 10^{-1}$, koncentracija kortizola je u stabilnom ustaljenom stanju, dok za **(b2)** $k_9 = 4,5 \cdot 10^{-2}$ pokazuje unutar-dnevnu oscilatornu evoluciju. Stanja (a2) i (b2) su identična, predstavljajući bazalnu unutar-dnevnu evoluciju kortizola. U svim prikazanim slučajevima, pri promeni date konstante brzine, ostali parametri zadržavaju vrednosti koje imaju u tabeli 3.3.1.

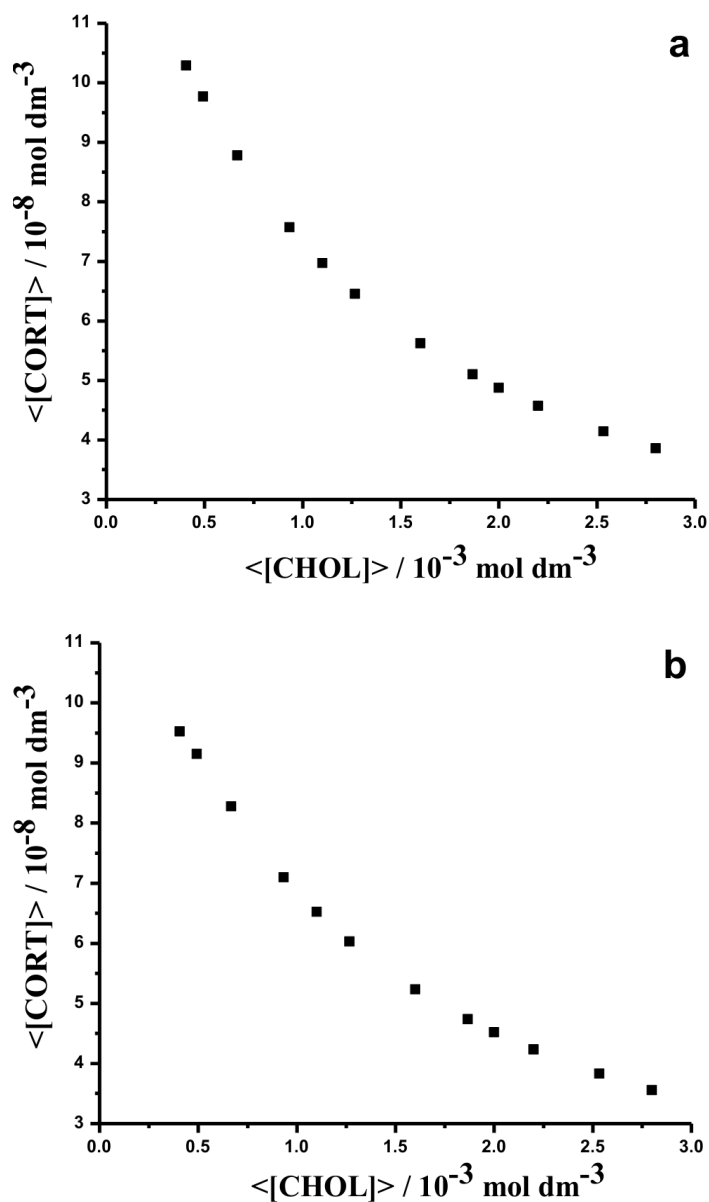
3.3.2.3. Korelacija između srednjeg nivoa kortizola i holesterola u oscilatornom domenu modela

U simulacijama je ispitan i efekat promene konstante brzine odn. brzine (reakcija (R1) je nultog reda, pa je njena brzina v_1 konstantna i jednaka konstanti brzine k_1 u bilo kom dinamičkom stanju sistema, $v_1 = v_{1,ss} = k_1$ (v. tabelu 3.3.1) ulaza holesterola u sistem, k_1 , radi ustanovljavanja povezanosti srednjeg nivoa holesterola i kortizola pri uslovima različitog stepena konzumacije i unosa hrane bogate holesterolom i mastima u organizam. Značaj i potencijal ovih *in silico* eksperimenata na bazi predloženog modela HPA sa holesterolom izložen je u tekstu koji sledi.

Sa povećanjem vrednosti k_1 (istovremeno zadržavajući ostale konstante brzina na konstantnim vrednostima prikazanim u tabeli) u okviru celog oscilatornog regiona modela, ustanovljeno je povećanje srednjeg nivoa holesterola, uz istovremeno sniženje srednjeg nivo kortizola, i kada ne postoji i kada postoji sprezanje modela sa dnevnom funkcijom D . Ovi rezultati, predstavljeni grafički kao zavisnost srednje koncentracije kortizola, $\langle[\text{CORT}]\rangle$, od srednje koncentracije holesterola, $\langle[\text{CHOL}]\rangle$, ukazuju na postojanje negativne korelacije između ove dve veličine, u slučaju bez sprezanja (slika 3.3.4 a) kao i u slučaju sa sprezanjem modela sa D (slika 3.3.4 b).

Negativna korelacija između $\langle[\text{CHOL}]\rangle$ i $\langle[\text{CORT}]\rangle$ ima i svoju eksperimentalnu potvrdu. Naime, u studijama sprovedenim na miševima, ustanovljeno je da ishrana bogata mastima i holesterolom može dovesti do sniženog, nepromenjenog ili povišenog bazalnog nivoa plazma koncentracije kortizola i aktivnosti HPA sistema, kako je detaljno opisano u revijskom radu Auvinen i sar, 2011 [147]. U mnogim od recenziranih studija, evaluacija funkcionalne povezanosti između količine i obima ishrane bogate mastima i holesterolom i aktivnosti HPA osovine nije bila primarni cilj, već je ta korelacija izvođena na više indirektan način. Kao posledica toga, u različitim radovima korišćene su različite metodologije i eksperimentalni uslovi: različit broj merenja kortizola u vremenu (u mnogim studijama postojalo je samo jedno merenje), različiti sojevi miševa, različiti načini njihovog uzgajanja, različit sadržaj i trajanje ishrane i dr. [147], što sve može biti („nedinamički“) uzrok postojanju različitih nalaza u literaturi. Međutim, treba istaći da je jedna od najskorijih studija, dizajniranoj da se otklone i ujednače mnogi od navedenih metodoloških nedostataka, pokazala da miševi

podvrgnuti režimu ishrane koji sadrži visok sadržaj masti i holesterola (u modelu HPA sa holesterolom, to odgovara višim vrednostima k_1 , odn. brzine ulaza tj. unosa holesterola u sistem), imaju snižen bazalni nivo kortikosterona u plazmi [148] (analogon kortizola odn. glavni glukokortikoid kod glodara), što je u skladu sa predviđanjima predloženog HPA modela sa holesterolom (slika 3.3.4).



Slika 3.3.4. Negativna korelacija između srednje koncentracije holesterola, $\langle[\text{CHOL}]\rangle$, i kortizola, $\langle[\text{CORT}]\rangle$, u oscilatornom regionu sistema, pri (a) unutar dnevnog ritmu i (b) spregnutom unutar dnevnog i dnevnog ritmu. Korelacija je dobijena pri kontinuiranom porastu konstante brzine ulaza holesterola u sistem, k_1 .

Dodatno, u studijama sa pacijentima kojima je dijagnostifikovana *anorexia nervosa*, *bulimia nervosa* i sindrom noćne konzumacije hrane (eng. night eating syndrome), zapaženo je da ovi pacijenti imaju povišeni bazalni nivo kortizola i hiperaktivnost HPA sistema [149, 150], dok kod pacijenata sa sindromom prejedanja (eng. binge eating syndrome) postoji hipoaktivnost u odgovoru HPA sistema na stres [151]. Imajući u vidu prethodno navedene obzervacije, u budućim istraživanjima, model HPA sistema sa holesterolom bi mogao biti upotrebljen za predviđanje međuzavisnosti stresa, izmenjenog obima konzumacije ishrane bogate mastima i holesterolom i dinamike HPA sistema, naročito u pogledu njene reaktivnosti (izražene pre svega kroz dinamičke promene u koncentraciji kortizola); takva ispitivanja bi posebno bila od značaja za bolje razumevanje navedenih poremećaja u ishrani (anoreksije nervoze, bulimije nervoze, sindroma prejedanja, sindroma noćne konzumacije hrane). Međutim, to zahteva dizajniranje dodatnih *in silico* eksperimenata, čije simulacije bi trebalo da omoguće određivanje kvalitativnih i kvantitativnih promena dinamike HPA ose, slično onim iskorišćenim u ispitivanjima akutnog i hroničnog stresa i akutnih perturbacija glukokortikoidima (v. poglavlje 3.1.4); ipak, za razliku od tih simulacija, gde su perturbacije izvođene na HPA sistemu u fiziološkom stanju, u novim simulacijama perturbacije bi trebalo izvesti nad HPA sistemom koji se nalazi u stanjima koja odgovaraju povećanom ili sniženom unosu holesterola. Ovakva istraživanja u sebi nose značajan potencijal, i kao takva biće svakako razmotrena u nekim od narednih stadijuma ispitivanja novog modela HPA sistema sa holesterolom.

Ipak, neka predviđanja i tumačenja u vezi sa poremećajima ishrane moguće je dobiti i koristeći aktuelni model HPA sistema sa holesterolom. Naime, dobijena korelacija srednje koncentracije kortizola i holesterola (slika 3.3.4) može biti iskorišćena za utvrđivanje ustanovljene povezanosti između promena u obimu konzumacije ishrane bogate mastima i holesterolom u anoreksiji nervozi i bulimiji nervozi i bazalne aktivnosti HPA sistema. Anoreksija i bulimija spadaju u grupu psihijatrijskih oboljenja označenih kao poremećaji ishrane [152-154]. Za osobe obolele od anoreksije je karakteristično drastično suzdržavanje od konzumiranja hrane, dok osobe obolele od bulimije tipično ispoljavaju naizmenične epizode prejedanja i izbacivanja unete hrane, najčešće namernim izazivanjem povraćanja ili uzimanjem laksativa. Kako je već naglašeno, u studijama sa pacijentima kojima je

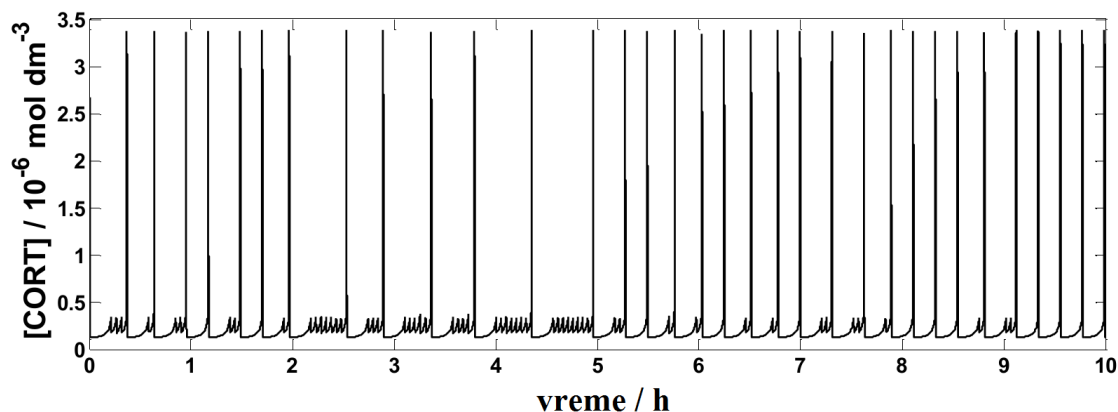
dijagnostifikovana anorexia nervosa i bulimia nervosa, zapaženo je da ovi pacijenti imaju povišeni bazalni nivo kortizola i hiperaktivnost HPA sistema [149, 150]. Pošto ishrana sa visokim sadržajem holesterola može dovesti do značajnog povišenja plazma koncentracije holesterola (npr. kod svinja podvrgnutih tipu ishrane u čijem sadržaju 2 % čini holesterol [155]), moglo bi se pretpostaviti da može važiti i obrnut efekat, da će nivo holesterola u plazmi biti snižen u okolnostima veoma niskog unosa holesterola putem ishrane, kao što je to slučaj kod pacijenata sa anoreksijom ili bulimijom. Dakle, mogli bi se smatrati opravdanim da važi pretpostavka da između unosa holesterola u sistem (konzumacije hrane sa visokim sadržajem holesterola) i njegove koncentracije u plazmi postoji linearna zavisnost; predloženi model podržava ovu hipotezu, predviđajući u simulacijama da sa porastom vrednosti k_1 (brzine unosa holesterola u sistem), raste i srednji nivo holesterola $\langle[\text{CHOL}]\rangle$.

Uzimajući u razmatranje sve navedeno, predloženi model HPA sa holesterolom bi mogao da posluži za utvrđivanje uloge holesterola i postavi osnovu za dodatna i opštija tumačenja eksperimentalno uočenih modifikacija u aktivnosti HPA ose pacijenata obolelih od anoreksije: smanjeni unos holesterola putem ishrane koji postoji kod ovih pacijenata može biti modeliran snižavanjem vrednosti brzine unosa holesterola, k_1 , na način opisan u ovom radu, pokazujući negativnu korelaciju srednjih koncentracija kortizola i holesterola u oscilatornom oblasti modela (slika 3.3.4). Prema tome, model pokazuje da što je manji unos holesterola u sistem odn. što je niža vrednost k_1 , to je niža i vrednost srednje koncentracije holesterola, dok je srednji nivo kortizola viši, što odgovara dinamičkom stanju HPA sistema primećenom kod pacijenata obolelih od anoreksije [149, 150].

Sa druge strane, povećani nivo kortizola (odn. glukokortikoida) utiče na povećano konzumiranje hrane, kao i povećanje nivoa insulina u sistemskoj cirkulaciji srazmerno povećanju koncentracije kortizola [156], doprinoseći na taj način razvoju metaboličkog sindroma i gojaznosti [157, 158]. U tom pogledu, u budućim istraživanjima, predloženi model HPA ose sa holesterolom bi mogao poslužiti kao teorijski okvir za predviđanje generalnijih međuzavisnosti između unosa holesterola (i posledično, nivoa njegove usrednjene koncentracije) i srednjeg nivoa kortizola, bilo u bazalnoj fiziologiji ili u stresnim uslovima, nudeći bolje sagledavanje mogućih regulatorne mehanizma povratnih sprega između značajnijih promena u ishrani

dinamičkih stanja HPA sistema, u kojima bi homeostaza holesterola mogla imati istaknutiju uloga nego što se to prethodno pretpostavljalo.

Na kraju bi trebalo napomenuti da model HPA sistema sa holesterolom može pod određenim uslovima ući u haotična stanja (slika 3.3.5) [159], što je dokazano pomoću standardnih metoda za ispitivanje haosa [160].



Slika 3.3.5. Vremenska serija koncentracije kortizola u haotičnom dinamičkom stanju. Simulacija je dobijena za model HPA sistema sa holesterolom u kojem nema sprezanja sa dnevnom funkcijom D (jed. 3.1.1). Konstante brzina su imale vrednosti: $k_1 = 3,065 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, $k_2 = 3,156 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, $k_3 = 6,05 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, $k_4 = 2 \cdot 10^{10} \text{ h}^{-1}$, $k_5 = 6,23 \cdot 10^{11} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, $k_6 = 2,375 \cdot 10^{13} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, $k_7 = 9,54 \cdot 10^{20} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ h}^{-1}$, $k_8 = 9,92 \cdot 10^{17} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ h}^{-1}$, $k_9 = 9,18341 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, $k_{10} = 5,04 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, $k_{11} = 1,45 \cdot 10^{-7} \text{ h}^{-1}$, $k_{12} = 7,28 \cdot 10^3 \text{ h}^{-1}$, $k_{13} = 7,89 \cdot 10^7 \text{ h}^{-1}$, dok su početne koncentracije intermedijera iznosile: $[\text{CHOL}]_0 = 1,3470 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CRH}]_0 = 1,5780 \cdot 10^{-12} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 1,0999 \cdot 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CORT}]_0 = 1,9653 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ALDO}]_0 = 4,5765 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$.

4. DISKUSIJA

Modeliranje dinamičkih stanja HPA sistema i koncentracije kortizola pomoću stehiometrijskih modela HPA sistema, upotreba analize stehiometrijskih mreža (SNA) u cilju određivanja uslova njihove nestabilnosti i primena principa teorije nelinearne dinamike i kinetike za tumačenje numeričkih simulacija dobijenih na osnovu takvih modela pružaju značajan doprinos rasvetljavanju regulacionih principa HPA sistema na sistemskom nivou i daju mogućnost boljem razumevanju dinamike ovog sistema pri različitim fiziološkim uslovima, kao što je promena influksa holesterola u sistem, kao i pod dejstvom različitih perturbatora, poput hroničnog stresa i akutnih perturbacija glukokortikodnim medikamentima.

U tezi je pokazano da stehiometrijski konceptualni modeli mogu uspešno, u skladu sa poznatim eksperimentalnim rezultatima, na sistemskom nivou (na nivou celog organizma) simulirati mnoga dinamička stanja jednog složenog fiziološkog sistema, neuroendokrinog HPA sistema, uzimajući za dinamičke promenljive i reakcione korake samo one vrste i reakcije koje su od ključnog značaja za složeno nelinearno (oscilatorno) dinamičko ponašanje koncentracije njegovih hormona, prvenstveno njegovog glavnog efektor, kortizola. Kao polazište u ispitivanju dinamike HPA sistema uzet je osnovni model aktivnosti HPA sistema [16]. Postupnom nadogradnjom osnovnog modela u skladu sa fiziološkim hemizmom metaboličkih procesa sinteze i sekrecije kortizola, kao i njegove regulacije u okviru HPA sistema čoveka, formulisani su novi modeli aktivnosti HPA sistema. Prvo je, uvođenjem reakcija eliminacije CRH i aldosterona u mehanizam osnovnog modela, postavljen prošireni osnovni model aktivnosti HPA sistema u kojem svi intermedijeri u modelu podležu reakcijama eliminacije [48]. U sledećoj etapi razvoja modela HPA sistema, u prošireni osnovni model je uveden holesterol, bazični prekursor steroidnih hormona adrenalne žlezde (u modelu su to kortizol i aldosteron), kao nova intermedijerna vrsta, čija koncentracija predstavlja dodatnu dinamičku promenljivu u modelu. Opisanim proširivanjem mehanizma osnovnog modela HPA sistema postignuta su unapređenja njegovih performansi, kako u pogledu opisa opsega koncentracija njegovih intermedijernih vrsta, tako i u pogledu ispoljavanja odgovarajuće oscilatorne dinamike. Prvo, postignut

je realističniji opis koncentracionog nivoa intermedijera modela, pre svega CRH. Zatim, poboljšane su simulacije dinamike spregnutih oscilacija (unutardnevnih i dnevnih) koncentracije aldosterona. Osim toga, holesterol, kao nova dinamička promenljiva, nalazi se u okvirima svojih fizioloških vrednosti.

Treba istaći da su u prikazanom procesu postupnog evoluiranja stehiometrijskih modela HPA sistema, izvedeni modeli zadržali sve kvalitete koje poseduje i polazni model: mogućnost simulacije složenih oscilacija u kojima su unutardnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama, koncentracione opsege kortizola i aldosterona u okviru fizioloških granica u krvi, kao i ekvivalentan dinamički odgovor sistema na različite vrste stresnih perturbacija.

Metodom analize stehiometrijskih mreža (SNA) je pokazano da sva tri ispitana modela imaju zajedničko jezgro nestabilnosti. Na osnovu SNA analize dobijena konzistentnost izraza za uslov nestabilnosti stacionarnih stanja u nizu sukcesivno izvedenih modela demonstrira bitan kvalitet stehiometrijskih modela da se odgovarajućim postepenim procesom evolucije polaznog modela mogu dobiti modeli koji uz nova, unapređena svojstva zadržavaju pozitivne dinamičke karakteristike osnovnog modela iz kojeg su izvedeni.

Prema sazanju autora, predloženi nelinearni model HPA sistema sa holesterolom (tabela 3.3.1) predstavlja prvi stehiometrijski model aktivnosti HPA ose koji, uz ostale ključne hormone ovog neuroendokrinog sistema (CRH, ACTH, kortizola i aldosterona), sadrži i holesterol, početni prekursor svih steroidnih hormona, a koji može da simulira složenu oscilatornu dinamiku HPA sistema, sa spregnutim unutardnevnim i dnevnim oscilacijama. Oscilatorna dinamička stanja ovog modela (kao i prethodna dva u ovoj disertaciji razmatrana modela – osnovnog modela i proširenog osnovnog modela HPA sistema) rezultat su postojanja nestabilnosti unutar njegovog mehanizma. Zahvaljujući tom kvalitetu, svi poremećaji dinamike su direktno povezani sa samoorganizacijom posmatranog neuroendokrinog sistema, i zato se mogu jasno korelirati sa eksperimentalnim rezultatima.

Iako je u procesu nadogradnje polaznog modela i formulisanjem modela HPA sa holesterolom učinjeno dosta značajnih unapređenja njegovih prediktivnih mogućnosti, koncentracija ACTH dobijena u simulacijama je još uvek viša (za oko 10^3 puta) u odnosu na referentne fiziološke vrednosti, i ovaj nedostatak modela će biti predmet

budućih istraživanja daljom evolucijom modela, pre svega eksplicitnim uvođenjem GR i MR nuklearnih receptora kao novih dinamičkih varijabli i posledičnom zamenom kubnog autokataličkog i kvadratnog inhibitornog koraka realističnijim setom reakcija koji bi opisivali negativnu i pozitivnu spregu u HPA sistemu.

Korišćenjem polaznog modela HPA, u nizu *in silico* dizajniranih eksperimenata pokazana je izražena nelinearnost dinamičkog odgovora HPA sistema u vidu promena koncentracije kortizola na akutne perturbacije egzogenim kortizolom, zavisno od intenziteta, unutarnevne i dnevne faze delovanja perturbacije. Ovakvi rezultati ukazuju na važnost kombinovanog efekta doze i tajminga primene glukokortikodinih medikamenata, kao i potrebe za prilagođavanjem glukokortikoidne terapije individualnim karakteristikama dnevnog i unutar dnevnog koncentracionog profila pacijenata.

Osim toga, u simulacijama na bazi osnovnog modela pokazan je i nelinearni odgovor srednjeg nivoa koncentracije kortizola, oblika njegovog oscilatornog profila i promena frekvencije unutar dnevnih oscilacija usled promene srednjeg nivoa i amplituda dnevnih oscilacija CRH. Ovakvi rezultati mogu ukazati na mogućnost stehiometrijskih modela da pruže moguća objašnjenja za na prvi pogled kontradiktorne i nekonzistente eksperimentalne rezultate, kao što su oni prema kojima hronični stres dovodi do hiper ili hipoaktivnosti HPA sistema, odn, hiperkortizolemije ili hipokortizolemije. Ukoliko se uzmu u obzir rezultati simulacija na bazi modela, oba stanja, i hiper i hipo kortizolemije su moguća pri kontinuiranom povećanju srednjeg nivoa CRH, što bi u simulacijama odgovoralo procesu kontinuiranog akumulirajućeg hroničnog stresa.

Primenom modela HPA sa holesterolom, ukazano je na važnost kinetičkih svojstava holesterola, brzine ulaza i izlaza holesterola u sistem, na dinamiku celokupnog HPA sistema, i pokazano je da u oscilatornoj oblasti svog faznog prostora model predviđa postojanje negativne korelacije između srednje koncentracije kortizola i holesterola, trend koji je takođe uočen i u *in vivo* ogledima, naročito u novijoj literaturi. Takođe se ukazuje na potencijal modela HPA sa holesterolom za boljim razumevanjem odnosa nivoa kortizola i holesterola, kao i zavisnosti stresa i HPA sistema i unosa hrane bogate holesterolom, čija je međuzavisnost od vitalnog značaja za utvrđivanje mehanizama i predviđanje ishoda u poremećajima kao što su insulinska rezistencija,

dijabetes melitus tip II, metabolički sindrom, kao i bolesti poremećaja ishrane poput anoreksije, bulimije, sindroma noćnog konzumiranja hrane.

Modeliranje dinamike HPA sistema i koncentracije kortizola kao glavnog efektoru ovog sistema koji ispoljava svoja dejstva u praktično svim tkivima organizma i daljim usavršavanjem stehiometrijskih modela HPA sistema njihovim usaglašavanjem sa postojećim eksperimentalnim rezultatima na bazi osnovnih principa nelinearne dinamike, kinetike i biofizičke hemije, ima poseban značaj u biomedicini s obzirom na rastući broj metaboličkih i psihijatrijskih poremećaja koji su povezani sa modifikovanim dinamičkim stanjima kortizola, kao što su insulinska rezistencija, dijabetes melitus tip II, metabolički sindrom, reumatoidni artritis, poremećaji ishrane (anorexia nervosa-e, bulimije, sindroma noćnog konzumiranja hrane (eng. night eating syndrome), sindrom prejedanja (eng. binge eating syndrome), unipolarna depresija, posttraumatski stresni sindrom (PTSD), bipolarni poremećaji. Još jedan bitan aspekt modeliranja HPA sistema je vezan za mogućnost poboljšanja delovanja i smanjenja neželjenih efekata terapije glukokortikoidima, usklađivanjem doze ovih lekova sa momentom i dužinom trajanja njihovog uzimanja prema individualnim dinamičkim svojstvima oscilatorne funkcije koncentracije kortizola pacijenta u vreme njihove primene.

Principijeno sličan pristup, baziran na primeni konceptualnih mehanističkih nelinearnih modela, u skorije vreme je primenjen u cilju identifikovanja opštih dinamičkih principa koji se nalaze u osnovi psihijatrijskih poremećaja, kao što je modeliranje dinamike kortizola u okviru HPA ose u unipolarnoj depresiji i posttraumatskom stresnom poremećaju [43], hroničnom sindromu umora (eng. chronic fatigue syndrome) i drugim sličnim stanjima hipokortizolizma [161], ili modeliranje dinamike bipolarnog poremećaja [162]. Osim toga, principi nelinearne dinamike su nedavno prepoznati i predloženi da postanu dodatna metodološka paradigma za razumevanje vremenske evolucije mentalnih poremećaja, definisanih kao (računska) nelinearna dinamička psihijatrija (eng. computational nonlinear dynamical psychiatry). Koristeći model zasnovan na generalizovanim spregnutim Lotka-Volterra sistemima, potencijali ovog pristupa su pokazani na primeru modeliranja opsesivno-kompulzivnog poremećaja (eng. obsessive-compulsive disorder, OCD) i bipolarnog poremećaja [163]. U navedenim primerima, pomoću predloženih modela moguće je bilo simulirati različita oscilatorna dinamička stanja za koja je pretpostavljeno da su svojstvena regularnom ili

disfunkcionalnom obliku ponašanja, kao i prelaze odn. bifurkacije unutar istog tipa odn. između kvalitativno različitih vrsta dinamičkih stanja (npr. iz oscilatornog u stabilno ustaljeno stanje) pri promeni određenih (bifurkacionih) parametara koji imaju biološki značaj u etiologiji psihijatrijskog poremećaja koji se modelira.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da stehiometrijski modeli HPA sistema mogu simulirati različita dinamička stanja HPA sistema i koncentracije kortizola u bazalnoj fiziologiji, patofiziologiji i u uslovima delovanja različitih akutnih i hroničnih perturbatora HPA sistema, kao što su akutne perturbacije spoljnim glukokortikoidima ili hronični stres.

U numeričkim simulacijama na bazi polaznog stehiometrijskog modela HPA sistema (Jelić i sar, 2005), pokazano je da kvalitativni i kvantitativni dinamički odgovor koncentracije kortizola na akutne perturbacije spoljnim glukokortikoidima istovremeno zavisi od intenziteta perturbacije, unutar dnevnog i dnevnog faznog ugla perturbacije kao i amplitude perturbovane perturbacije, odn. od trenutnog dinamičkog stanja HPA sistema u trenutku delovanja perturbacije. Korišćenjem istog modela ustanovljeno je da hronični stres, zavisno od srednje koncentracije i amplitude dnevnih oscilacija CRH, utiče na promenu dinamike koncentracije kortizola unutar iste vrste dinamičkog stanja, kao i iz jedne u drugu vrstu dinamičkog stanja.

Radi unapređenja prediktivnog kapaciteta polaznog modela HPA sistema, njegov mehanizam je proširen u skladu sa eksperimentalno utvrđenim metaboličkim putevima koji postoje u HPA sistemu. Na taj način su iz polaznog modela izvedena dva nova modela: (1) prošireni osnovni model HPA sistema (model sa 4 vrste i 11 reakcija), nastao dodavanjem reakcionih koraka za eliminaciju CRH i aldosterona u mehanizam polaznog modela; (2) model HPA sistema sa holesterolom (model sa 5 vrsta i 13 reakcija), nastao uvršćavanjem holesterola, prekursora kortizola, aldosterona i drugih steroidnih hormona, kao dodatnog nezavisnog intermedijera, u model HPA sa 11 reakcija. SNA je pokazala da oba modela mogu imati nestabilna neravnotežna stacionarna (ustaljena) stanja, te da stoga mogu imati oscilatornu evoluciju u vremenu. Primenom SNA je utvrđeno da je jezgro nestabilnosti isto u sva tri slučaja. Validnost modela je potvrđena u numeričkim simulacijama: oba modela mogu ispoljiti unutar dnevnu oscilatornu evoluciju kao svoje inherentno svojstvo, dok pri sprezanju sa spoljnom periodičnom dnevnom funkcijom, oba modela mogu opisati složene oscilacije u kojima su unutar dnevne oscilacije superponirane na dnevne. U numeričkim

simulacijama je potvrđeno i to da su oba novoizvedena modela zadržala kvalitete polaznog modela u pogledu dinamičkog odgovora HPA sistema na različite akutne i hronične perturbacije.

Model HPA sistema sa holesterolom predstavlja značajno unapređenje prethodna dva modela, s obzirom na to da u simulacijama dobijenim na bazi ovog modela, vremenske serije svih internih vrsta osim ACTH pokazuju dobro slaganje sa odgovarajućim eksperimentalnim serijama njihovih koncentracija merenim pri bazalnim uslovima u plazmi krvi čoveka.

U modelu sa holesterolom je pokazano da dinamičko stanje koncentracije kortizola značajno zavisi od brzine ulaza i izlaza holesterola u odnosno iz sistema; takođe je pokazano da u oscilatornoj oblasti modela, između koncentracije holesterola i kortizola postoji negativna korelacija. Dobijeni rezultati pokazuju kako promene u kinetici holesterola mogu značajno modifikovati dinamička stanja koncentracije kortizola.

Rezultati i nalazi izloženi u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na važnost odgovarajućih dinamičkih stanja HPA sistema i koncentracije kortizola za očuvanje njene regularne fiziologije. Oni takođe ukazuju na potencijale koje modeliranje ovih dinamičkih stanja može da ponudi u rasvetljavanju etiologije i patofiziologije brojnih metaboličkih i psihijatrijskih poremećaja koji se povezuju sa disfunkcijama HPA ose, poput metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa II, Cushing-ovog sindroma, Addison-ove bolesti, reumatoidnog artritisa, anoreksije nervoze, bulimije nervoze, posttraumskog stresnog poremećaja, unipolarne depresije, naglašavajući dinamički karakter ovih bolesti. U disertaciji je ukazano i na značaj modeliranja neuroendokrinih procesa na bazi stehiometrijskih modela u cilju dizajniranja individualnih terapija glukokortikoidima i daljem unapređenju personalizovane medicine.

6. LITERATURA

1. Lightman SL, Windle RJ, Ma XM, Harbuz MS, Shanks NM, Julian MD, Wood SA, Kershaw YM, Ingram CD (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal function, *Arch Physiol Biochem*, 110, 90-93.
2. Miller WL, Chrousos GP (2001) The Adrenal Cortex, in Felig P, Frohman L (eds) *Endocrinology & Metabolism*, McGraw-Hill, New York, pp. 387-524.
3. Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress, *J Psychosom Res*, 53, 865-871.
4. Hartmann A, Veldhuis JD, Deuschle M, Standhardt H, Heuser I (1997) Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation, *Neurobiol Aging*, 18, 285-289.
5. Nader N, Chrousos GP, Kino T (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis, *Trends Endocrinol Metab*, 21, 277-286.
6. Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration, *Ageing Res Rev*, 4, 141-194.
7. Conway-Campbell BL, McKenna MA, Wiles CC, Atkinson HC, De Kloet ER, Lightman SL (2007) Proteasome-dependent down-regulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone. *Endocrinology*, 148, 5470–5477.
8. Lightman SL, Wiles CC, Atkinson HC, Henley DE, Russell GM, Leendertz JA, McKenna MA, Spiga F, Wood SA, Conway-Campbell BL (2008) The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur J Pharmacol*, 583, 255–262.
9. Russell GM, Henley DE, Leendertz J, Douthwaite JA, Wood SA, Stevens A, Woltersdorf WW, Peeters BW, Ruigt GS, White A, Veldhuis JD, Lightman SL (2010) Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic–pituitary–adrenal ultradian activity in healthy males. *J Neurosci*, 30, 6106-6115.
10. Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, Johnson TA, Voss TC, Lightman SL, Hager GL. (2009). Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription, *Nat Cell Biol*, 11, 1093-1102.

11. Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1998) Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress, *Endocrinology*, 139, 443–450.
12. Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD (1998) The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses, *Endocrinology*, 139, 4044–4052.
13. Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Lightman SL, Ingram CD, Harbuz MS (2001) Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. *J Neuroendocrinol* 13: 905-911.
14. Dempsher DP, Gann DS, Phair RD (1984) A mechanistic Model of ACTH-stimulated cortisol secretion, *Am J Physiol*, 246, R587-R596.
15. Bairagi N, Chatterjee S, Chattopadhyay J (2008) Variability in the secretion of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and cortisol and understandability of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis dynamics - a mathematical study based on clinical evidence, *Math Med Biol*, 25, 37-63.
16. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj (2005) Mathematical modelling of the hypothalamic-pituitary-adrenal system activity, *Math Biosci*, 197, 173-187.
17. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj (2008) Modelling of the hypothalamic-pituitary-adrenal system activity based on the stoichiometric analysis, in Romano E, De Luca S (eds) *New research on neurosecretory systems*, Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 225-245.
18. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj, Vukojević V (2009) Predictive modeling of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) function. Dynamic system theory approach by stoichiometric network analysis and quenching of small amplitude oscillations, *Int J Nonolin Sci Num*, 10, 1451-1472.
19. Keenan DM, Licinio J, Veldhuis JD (2001) A feedback-controlled ensemble model of the stress-responsive hypothalamo-pituitary-adrenal axis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 4028-4033.
20. Keenan DM, Veldhuis JD (2003) Cortisol feedback state governs adrenocorticotropin secretory-burst shape, frequency, and mass in a dual-waveform construct: time of day-dependent regulation, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285, R950-R961.

21. Keenan DM, Roelfsema F, Veldhuis JD (2004) Endogenous ACTH concentration-dependent drive of pulsatile cortisol secretion in the human, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287, E652-E661.
22. Keenan DM, Chattopadhyay S, Veldhuis JD (2005) Composite model of time-varying appearance and disappearance of neurohormone pulse signals in blood, *J Theor Biol*, 236, 242-255.
23. Meyer-Hermann M, Figge MT, Straub RH (2009) Mathematical modeling of the circadian rhythm of key neuroendocrine-immune system players in rheumatoid arthritis: a systems biology approach, *Arthritis Rheum*, 60, 2585–2594.
24. Breen MS, Breen M, Terasaki N, Yamazaki M, Conolly RB (2010) Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: model development for metyrapone, *Environ Health Perspect*, 118, 265–272.
25. Breen M, Breen, MS, Terasaki N, Yamazaki M, Lloyd AL, Conolly RB (2011) Mechanistic computational model of steroidogenesis in H295R cells: role of oxysterols and cell proliferation to improve predictability of biochemical response to endocrine active chemical—metyrapone, *Toxicol Sci*, 123, 80-93.
26. Lenbury Y, Pornsawad P (2005) A delay-differential equation model of the feedback-controlled hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans, *Math Med Biol*, 22, 15-33.
27. Marković VM, Čupić Ž, Vukojević V, Kolar-Anić Lj (2011) Predictive Modeling of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Response to Acute and Chronic Stress, *Endocr J*, 58, 889-904.
28. Veldhuis JD, Keenan DM, Pincus SM (2008) Motivations and methods for analyzing pulsatile hormone secretion, *Endocr Rev*, 29, 823-864.
29. Walker JJ, Terry JR, Lightman SL (2010) Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Proc R Soc B*, 277, 1627-1633.
30. Lenbury Y, Pacheenburawana P (1991) Modelling fluctuation phenomena in the plasma cortisol secretion system in normal man, *Biosystems*, 26, 117-125.

31. Gonzalez-Heydrich J, Steingard RJ, Kohane I (1994) A computer simulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, Eighteenth Annual Proceedings of the Symposium for Computer Applications in Medical Care (SCAMC), p. 1010.
32. Gonzalez-Heydrich J, Steingard R, Putnam F, Beardslee W, Kohane I (1999) Using ‘off shelf’, computer programs to mine additional insights from published data: diurnal variation in potency of ACTH stimulation of cortisol secretion revealed, *Comp Methods Programs Biomed*, 58, 227-238.
33. Chakraborty A, Krzyzanski W, Jusko WJ (1999) Mathematical modeling of circadian cortisol concentrations using indirect response models: comparison of several methods, *J Pharmacokinet Biopharm*, 27, 23-43.
34. Liu YW, Hu ZH, Peng JH, Liu BZ (1999) A dynamical model for the pulsatile secretion of the hypothal-amo-pituitary-adrenal axis, *Math Comput Model*, 29, 103–110.
35. Dokoumetzidis A, Iliadis A, Macheras P (2002) Nonlinear dynamics in Clinical Pharmacology: the paradigm of cortisol secretion and suppression, *J Clin Pharmacol*, 54, 21-29.
36. Kyrylov V, Severyanova LA, Vieirakyrylov A (2005) Modeling Robust Oscillatory Behavior of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, *IEEE Transactions Biomed Eng*, 52, 1977-1983.
37. Savić D, Jelić S (2005) A mathematical model of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system and its stability analysis, *Chaos Soliton Fract*, 26, 427-436.
38. Savić D, Jelić S (2005) A theoretical study of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis dynamics, *Ann N Y Acad Sci*, 1048, 430-433.
39. Peters A, Conrad M, Hubold C, Schweiger U, Fischer B, Fehm HL (2007) The principle of homeostasis in the hypothalamus-pituitary-adrenal system: new insight from positive feedback, *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 293, 83-98.
40. Gupta S, Aslakson E, Gurbaxani BM, Vernon SD (2007) Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals bistability, *Theor Biol Med Model*, 4, 8.
41. McAuley MT, Kenny RA, Kirkwood TBLJ, Wilkinson DJW, Jones JL, Miller VM (2009) A Mathematical Model of aging-related and cortisol induced hippocampal dysfunction, *BMC Neurosci*, 10, 26.

42. Conrad M, Hubold C, Fischer B, Peters A (2009) Modeling the hypothalamus–pituitary–adrenal system: homeostasis by interacting positive and negative feedback, *J Biol Phys*, 35, 149–162.
43. Sriram K, Rodriguez-Fernandez M, Doyle FJ III (2012) Modeling cortisol dynamics in the neuroendocrine axis distinguishes normal, depression, and post-traumatic stress disorder (PTSD) in humans, *PLoS Comput Biol*, 8, e1002379.
44. Vinther F, Andersen M, Ottesen JT (2011) The minimal model of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *J Math Biol*, 63, 663–690.
45. McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain, *Physiol Rev*, 87, 873–904.
46. Chrousos GP (2001) Glucocorticoid Therapy, in Felig P, Frohman LA (eds) *Endocrinology & Metabolism*, McGraw-Hill, New York, pp. 609-632.
47. VanItallie TB (2002) Stress: a risk factor for serious illness, *Metabolism* 51: 40-45.
48. Marković VM, Čupić Ž, Ivanović A, Kolar-Anić Lj, The Stability of the Extended Model of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis examined by Stoichiometric Network Analysis (SNA), *Russ J Phys Chem A*, 85, 2327-2335.
49. Kolar-Anić Lj, Čupić Ž, Vukojević V, Anić S (2011) *Dinamika nelinearnih procesa*, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
50. Hashimoto K, Nishioka T, Numata Y, Ogasa T, Kageyama J, Suemaru S (1993) Plasma levels of cortico-tropin-releasing hormone in hypothalamic–pituitary–adrenal disorders and chronic renal failure, *Acta Endocrinol (Copenh)*, 128, 503–507.
51. Clarke BL (1980) Stability of Complex Reaction Networks, in Prigogine I, Rice SA (eds), *Advances in Chemical Physics*, 43, John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 1-216.
52. Clarke BL (1988) Stoichiometric Network Analysis, *Cell Biophys*, 12, 237-253.
53. Schmitz G, Kolar-Anić LjZ, Anić SR, Čupić ŽD (2008) Stoichiometric Network Analysis and Associated Dimensionless Kinetic Equations. Application to a Model of the Bray-Liebhafsky Reaction, *J Phys Chem A*, 112, 13452-13457.
54. Kolar-Anić Lj, Čupić Ž, Schmitz G, Anić S (2010) Improvement of the Stoichiometric Network Analysis for Determination of Instability Conditions of Complex Nonlinear Reaction Systems, *Chem Eng Sci*, 65, 3718-3728.
55. Gray P, Scott SK (1990) *Chemical Oscillations and Instabilities*, Clarendon Press, Oxford.

56. Hilborn RC (2000) *Chaos and Nonlinear Dynamics*, 2nd edn, Oxford University Press, Oxford,
57. Nicolis G, Prigogine I (1977) *Self-Organization in Non-equilibrium Systems*, J. Wiley, New York.
58. Nicolis G, Prigogine I (1989) *Exploring Complexity*, Freeman, New York.
59. Scott SK (1991) *Chemical Chaos*, Clarendon Press, Oxford.
60. Franck UF (1980) Feedback Kinetics in Physicochemical Oscillators, *Ber Bunsenges Phys Chem*, 84, 334-341.
61. Belić M (1990) *Deterministički haos*, SFIN, god. III, broj 3.
62. Scott SK (1987) Oscillations in simple models of chemical systems, *Acc Chem Res*, 20, 186-191.
63. Čupić Ž, 2001, Stehiometrijska mrežna analiza autokataltora, *Nauka-tehnika-bezbednost*, 2, 29-37.
64. Grütter WF, Messikommer, BH (1961) Systematische ausbeuteberechnung für isotherme reaktoren im falle zusammengesetzter reaktionen, *Chem Eng Sci*, 14, 231-239.
65. Ames WF (1962) Canonical forms for nonlinear kinetic differential equations, *Ind Eng Chem Fund*, 1, 214-218.
66. Wei J, Prater CD (1962) The structure and analysis of complex reaction systems, *Adv Catal*, 13, 203-392.
67. Horiuti J, Nakamura T (1967) On the theory of heterogeneous catalysis, *Adv Catal*, 17, 1-74.
68. Temkin MI (1979) Kinetic of some industrial heterogeneous catalytic reactions, *Adv Catal*, 28, 173-281.
69. Murzin DY, Avetisov AK (2007) Thermodynamic consistency of complex enzymatic reactions with empty routes, *Chem Eng Sci*, 62, 6492-6494.
70. Horn F, Jackson R (1972) General mass action kinetics, *Arch Rat Mech Anal*, 47, 81-116.
71. Feinberg M (1979) Lectures on chemical reaction networks, Notes of lectures given at the Mathematics Research Center of the University of Wisconsin in 1979. <http://www.chbmeng.ohio-state.edu/~feinberg/LecturesOnReactionNetworks/>

72. Ross J, Schreiber I, Vlad MO (2006) Determination of Complex Reaction Mechanisms – Analysis of Complex, Biological and Genetic Networks, Oxford University Press, Inc., New York, pp. 125–169.
73. Čupić Ž, Marković V, Ivanović A, Kolar-Anić Lj (2011) Modeling of the Complex Nonlinear Processes: Determination of the Instability Region by the Stoichiometric Network Analysis, in *Mathematical Modelling*, Brennan CR (ed.), Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 111-178.
74. Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis, *JAMA*, 267, 1244-1252.
75. Topisirović Lj, (2005) *Dinamička biohemija*, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, pp. 41-46, 346- 349.
76. <http://www.themedicalbiochemistrypage.org/largeadrenalsteroids.php>
77. Auchus RJ, Miller WL (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders, *Endocr Rev*, 32, 81-151.
78. Miller WL, Bose HS (2011) Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking, *J Lip Res*, 52, 2111-2135.
79. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S (2010) Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones, *Nutr Metab (Lond)*, 7, 47.
80. Gallo-Payet N, Payet MD (2003) Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP, *Microsc Res Tech*, 61, 275–287.
81. Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought, *Mol Endocrinol*, 19, 2647–2659
82. Vanparys C, Hectors TLM, Blust R, De Coen W (2012) Mechanistic profiling of the cAMP-dependent steroidogenic pathway in the H295R endocrine disrupter screening system-new endpoints for toxicity testing, *Toxicol Lett*, 208, 174-184
83. Lisurek M, Bernhardt R (2004) Modulation of Aldosterone and Cortisol Synthesis on the Molecular Level, *Mol Cell Endocrinol*, 215, 149–159
84. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin, *Science*, 213, 1394–1397.

85. Grammatopoulos DK, Chrousos GP (2002) Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists, *Trends Endocrinol Metab*, 13, 436–444.
86. Smith SM, Vale WW (2006) The role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis In Neuroendocrine Responses to Stress, *Dialogues Clin Neurosci*, 8, 383-395.
87. 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
88. Baxter JD, Rousseau CG (1979) Glucocorticoid hormone action: An overview, in Baxter JD, Rousseau (eds), *Glucocorticoid Hormone Action*, New York, Springer-Verlag, p. 1.
89. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE (2012) Acute and chronic regulation of aldosterone production, *Mol Cell Endocrinol*, 350, 151–162.
90. Lan NC, Karin M, Nguyen T, Weisz A, Birnbaum MJ, Eberhardt NL, Baxter JD, (1984) Mechanisms of glucocorticoid hormone action, *J Steroid Biochem*, 20, 77-88.
91. Fuller PJ, Yao Y, Young MJ (2012) Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor, *J Endocrinol*, 213, 15-24.
92. Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation, *Endocrinology*, 117, 2505–2511.
93. Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM (1988) The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response, *Neuron*, 1, 887–900.
94. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease, *Nat Rev Neurosci*, 6, 463-475.
95. Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet R (2007) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor, *Trends Neurosci*, 31, 1–7
96. de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS (1998) Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease, *Endocr Rev*, 19, 269-301.
97. Watts AG (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback, *Front Neuroendocrinol*, 26, 109–130.

98. Fehm HL, Voigt KH, Kummer G, Lang R, Pfeiffer EF (1979) Differential and integral corticosteroid feedback effects on ACTH secretion in hypoadrenocorticism, *J Clin Invest*, 63, 247–253.
99. Dallman MF (2005) Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future, *Front Neuroendocrinol*, 26, 103–108.
100. Papaikonomou E (1977) Rat adrenocortical dynamics, *J Physiol*, 265, 119-131.
101. Schulkin J, Gold PW, McEwen BS (1998) Induction of corticotrophin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load, *Psychoneuroendocrinology*, 23, 219-243.
102. Kellendonk C, Gass P, Kretz O, Schutz G, Tronche F (2002) Corticosteroid receptors in the brain: Gene targeting studies, *Brain Res Bull*, 57, 73-83.
103. Henley DE, Leendertz JA, Russell GM, Wood SA, Taheri S, Woltersdorf WW, Lightman SL (2009) Development of an automated blood sampling system for use in humans, *J Med Eng Technol*, 33, 199–208.
104. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling, *Science*, 289, 2344-2347.
105. Dijk DJ, Lockley SW (2002) Integration of human sleep-wake regulation and circadian rhythmicity, *J Appl Physiol*, 92, 852-862.
106. Cermakian N, Boivin DB (2003) A molecular perspective of human circadian rhythm disorders, *Brain Res Rev*, 42, 204-220.
107. Dickmeis T (2009) Glucocorticoids and the circadian clock, *J Endocrinol*, 200, 3-22.
108. Nicolson NA (2007) Measurement of cortisol, in Luecken LJ, Gallo LC (eds), *Handbook of Physiological Research Methods in Health Psychology*, Sage Publications, Inc., pp. 37–74.
109. Waite EJ, McKenna M, Kershaw Y, Walker JJ, Cho K, Piggins HD, Lightman SL (2012) Ultradian corti-costerone secretion is maintained in the absence of circadian cues, *Eur J Neurosci*, 36, 3142–3150.
110. Gavrilu A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS (2003) Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with

leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns, *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2838-2843.

111. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Johnson ML, Lizarralde G (1990), Amplitude, but not frequency, modulation of adrenocorticotropin secretory bursts gives rise to the nyctohemeral rhythm of the corticotropic axis in man, *J Clin Endocrinol. Metab*, 71, 452–463.

112. Charloux A, Gronfier C, Lonsdorfer-Wolf E, Piquard F, Brandenberger G (1999) Aldosterone release during the sleep-wake cycle in humans, *Am J Physiol*, 276, E43–E49.

113. Engler D, Pham T, Fullerton MJ, Ooi G, Funder JW, Clarke JJ (1989) Studies on the secretion of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin into the hypophyseal portal circulation of the conscious sheep, *Neuroendocrinology*, 49, 367–381.

114. Calogero AE, Norton JA, Sheppard BC, Listwak SJ, Cromack DT, Wall R, Jensen RT, Chrousos GP (1992) Pulsatile activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during major surgery, *Metabolism*, 41, 839–845.

115. Mogilner A, Allard J, Wollman R (2012) Cell polarity: Quantitative modeling as a tool in cell biology, *Science*, 336,175–179.

116. Holsboer F (2000) The stress hormone system is back on the map *Curr Psychiatry Rep*, 2, 454-456.

117. Kellendonk C, Gass P, Kretz O, Schutz G, Tronche F (2002) Corticosteroid receptors in the brain: gene targeting studies, *Brain Res Bull*, 57,73-83.

118. Makino S, Hashimoto K, Gold PW (2002) Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress, *Pharmacol Biochem Behav*, 73, 147-158.

119. Gear CW (1971) *Numerical initial value problems in ordinary differential equations*, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

120. Clarke BL, Jiang J (1993) Method for Deriving Hopf and Saddle-Node Bifurcation Hypersurfaces and Application to a Model of the Belousov-Zhabotinskii System, *J Chem Phys*, 99, 4464-4478.

121. Kolar-Anić Lj, Mišljenović Đ, Anić S, Nicolis G (1995) Influence of the Reduction of Iodate by Hydrogen Peroxide on the Model of the Bray-Liebhafsky Reaction, *React Kinet Catal Lett*, 54, 35 – 41.
122. Schmitz G (1991) Etude du Brayalator par la methode de Clark, *J Chim Phys*, 88, 15-25 [na francuskom].
123. Dhabhar FS (2002) Stress-induced augmentation of immune function - the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines, *Brain Behav Immun*, 16, 785–798.
124. McEwen BS (1998) Protective and damaging effects of stress mediators, *N Engl J Med*, 338, 171–179.
125. Engler D, Pham T, Liu JP, Fullerton MJ, Clarke IJ, Funder JW (1990) Studies of the regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in sheep with hypothalamic-pituitary disconnection.II. Evidence for in vivo ultradian hypersecretion of proopiomelanocortin, peptides by the isolated anterior and intermediate pituitary, *Endocrinology*, 127, 1956–1966.
126. Hynne F, Sørensen PG (1987) Quenching of Chemical Oscillations, *J Phys Chem*, 91, 6573-6575.
127. Hynne F, Sørensen PG, Nielsen K (1990) Quenching of chemical oscillations – General theory, *J Chem Phys*, 92, 1747-1757.
128. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation, *Neuron*, 64, 33-39.
129. Nader N, Chrousos GP, Kino T (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis, *Trends Endocrinol Metab*, 21, 277-286.
130. Miller GE, Chen E, Zhou ES (2007) If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans, *Psychol Bull*, 133, 25-45.
131. Haynes RC Jr, Murad F (1985) Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs: Inhibitors of adrenocortical steroid biosynthesis, in Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F (eds), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan, New York, p. 1459.
132. Joëls M, Tallie BZ (2009) The neuro-symphony of stress, *Nat Rev Neurosci*, 10, 459-466.

133. 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, 174-185.
134. Blaustein JD (2007) Behavioral Neurochemistry and Neuroendocrinology, in Lajtha A (ed) *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Springer, New York.
135. Vgontzas AN, Bixler EO, Lin HM, Prolo P, Mastorakos G, Vela-Bueno A, Kales A, Chrousos GP (2001) Chronic Insomnia Is Associated with Nyctohemeral Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Clinical Implications, *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 3787-3794.
136. Martin LB (2009) Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything, *Gen Comp Endocrinol*, 163, 70-76.
137. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, Lefranc,ois-Martinez AM, Caira F, Veyssie`re G, Mangelsdorf DJ, Lobac-caro JM (2006) Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance, *J Clin Invest*, 116, 1902–1912.
138. Redinger RN, 2003, Nuclear receptors in cholesterol catabolism-molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis, *J Lab Clin Med*, 142, 7-20.
139. Eiswirth M, Freund A, Ross J (1991) Mechanistic classification of chemical oscillators and the role of species, *Advances in Chemical Physics*, 80, 127–199.
140. http://www.heart.org/HEARTORG/GettingHealthy/FatsAndOils/Fats101/Levels-of-Cholesterol_UCM_305051_Article.jsp
141. http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine_and_metabolic_disorders/lipid_disorders/hypolipidemia.html
142. Hormonska ispitivanja (obrazac za analize), Odeljenje za endokrinološku laboratorijsku dijagnostiku, Institut za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Klinički centar Srbije, Beograd.
143. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003695.htm>
144. Plećaš D, Stanimirović B, Stanković A, Vasiljević M (2006) Ginekologija i akušerstvo: udžbenik za studente medicine, Medicinskoi fakultet Univerziteta Beograd, CIBID, Beograd.

145. Orth DN, Nicholson WE (1977) High molecular weight forms of human ACTH are glycoproteins, *J Clin Endocrinol Metab*, 44, 14–217.
146. <http://www.peptidelabs.com/acth1-39.html>
147. Auvinen HE, Romijn JA, Biermasz NR, Havekes LM, Smit JW, Rensen PC, Pereira AM (2011) Effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice: a systematic review, *Horm Metab Res*, 43, 899-906.
148. Auvinen HE, Romijn JA, Biermasz NR, Pijl H, Havekes LM, Smit JW, Rensen PC, Pereira AM (2012) The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice, *J Endocrinol*, 214, 191-197.
149. Brambilla F, Ferrari E, Panerai A, Manfredi B, Petraglia F, Catalano M, Sacerdote P (1993) Psychoimmunoendocrine investigation in anorexia nervosa, *Neuropsychobiology*, 27, 9–16.
150. Monteleone P, Di Lieto A, Tortorella A, Longobardi N, Maj M (2000) Circulating leptin in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: relationship to body weight, eating patterns, psychopathology and endocrine changes, *Psychiatry Res*, 94, 121–129.
151. Rosenberg N, Bloch M, Ben Avi I, Rouach V, Schreiber S, Stern N, Greenman Y (2012) Cortisol response and desire to binge following psychological stress: Comparison between obese subjects with and without binge eating disorder, *Psychiatry Res*, doi: 10.1016/j.psychres.2012.09.050 (in press).
152. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (2000) American Psychiatric Association (APA), 4th ed (DSM-IV), American Psychiatric Association, Washington DC.
153. Kontić O (2008) *Anoreksija i bulimija*, 1st ed, Zadužbina Andrejević, Beograd.
154. Kontić O, Vasiljević N, Trišović M, Jorga J, Lakić A, Jašović Gašić M (2012) Eating Disorders, *Srp Arh Celok Lek*, 140, 673-678.
155. Lomax MA, Karamanlidis G, Laws J, Cremers SG, Weinberg PD, Clarke L (2013) Pigs fed saturated fat/cholesterol have a blunted hypothalamic-pituitary-adrenal function, are insulin resistant and have decreased expression of IRS-1, PGC1 α and PPAR, *J Nutr Biochem*, 24, 656-663.

156. Warne JP, Akana SF, Ginsberg AB, Horneman HF, Pecoraro NC, Dallman MF (2009) Disengaging insulin from corticosterone: roles of each on energy intake and disposition, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, R1366–R1375.
157. Dallman, MF, Akana SF, Pecoraro NC, Warne JP, la Fleur SE, Foster MT (2007) Glucocorticoids, the etiology of obesity and the metabolic syndrome, *Curr Alzheimer Res*, 4, 199–204.
158. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G (2011) Metabolic syndrome: definitions and controversies, *BMC Med*, 9, 48.
159. Maćešić S, Marković VM, Ivanović-Šašić A, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj (2012) Bifurcation analysis of the oscillatory region of a hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis model, in Booklet of Abstracts, Symposium Nonlinear Dynamics Milutin Milanković - Multidisciplinary and Interdisciplinary Applications, (Stevanović) Hedrih KR, Mijajlović Ž (eds), Serbian Scientific Society, Belgrade, pp. 113-114.
160. Ivanović-Šašić AZ, Marković VM, Anić SR, Kolar-Anić LjZ, Čupić ŽD (2011) Structures of chaos in open reaction systems, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 20162-20171.
161. Ben-Zvi A, Vernon SD, Broderick G (2009) Model-Based Therapeutic Correction of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction, *PLoS Comput Biol*, 5, e1000273.
162. Goldbeter A (2011) A model for the dynamics of bipolar disorders, *Prog Biophys Mol Biol*, 105, 119-127.
163. Bystritsky A, Nierenberg AA, Feusner JD, Rabinovich M (2012) Computational non-linear dynamical psychiatry: a new methodological paradigm for diagnosis and course of illness, *J Psychiatr Res*, 46, 428-435.

BIOGRAFIJA AUTORA

Diplomirani fizikohemičar **Vladimir M. Marković** rođen je u Pančevu 4. 11. 1985. godine, gde je završio osnovnu školu, osnovnu muzičku školu i gimnaziju. Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu je upisao školske 2005/2006, gde je diplomirao sa prosečnom ocenom 9,97 (devet zarez devedeset sedam) školske 2008/2009. godine, pola godine pre Statutom predviđenog roka. Diplomski rad je odbranio je sa ocenom 10 (deset). Doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju upisao je školske 2009/2010. godine, i završio ih sa prosečnom ocenom 10,00 (deset). Od 1. 9. 2009. godine zaposlen je na Fakultetu za fizičku hemiju, prvo kao istraživač, a od 1. 10. 2012. godine kao asistent. Učestvovao je u izvođenju nastave na predmetima: Opšti kurs fizičke hemije 1 i 2, Molekulska spektrohemijska, Dinamika nelinearnih procesa i Nove fizičko-hemijske metode.

Učestvovao je u radu naučnoistraživačkih projekata Ministarstva za nauku Republike Srbije: „Fizička hemija dinamičkih stanja i struktura neravnotežnih sistema – od monotone do oscilatorne evolucije i haosa“, (br. 142025, rukovodilac prof. dr Ljiljana Kolar-Anić), septembar 2009 – decembar 2010; „Dinamika nelinearnih fizičko-hemijskih i biohemijskih sistema sa modeliranjem i predviđanjem njihovih ponašanja pod neravnotežnim uslovima“ (br. 172015, rukovodilac prof. dr Ljiljana Kolar-Anić), januar 2011 – danas.

Dobitnik je nekoliko priznanja i nagrada: stipendija Fonda Rajko i Maj Đermanović Kraljevske švedske akademije za 2011. godinu; Specijalno priznanje Srpskog hemijskog društva za 2010. godinu; diploma „Pavle Savić“ Društva fizikohemičara Srbije za 2010. godinu; nagrada „Kruna uspeha“ fonda porodice Petrović u saradnji sa Ambasadom Švajcarske u Beogradu za 2009. godinu; „Eurobank EFG stipendija“ za 2008. godinu. Tokom 2007-2009. godine bio je stipendista Republičkog fonda za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka.

Oblasti naučnog interesovanja autora su: nelinearna dinamika, biofizička hemija i sistemska neuronauka i neuroimidžing metode.

PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Владимир М. Марковић

број индекса 302/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Моделирање динамичких стања хипоталамо-хипофизно-адrenalног система и концентрације кортизола“

- 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, 12.4.2013. год.

Владимир Марковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Владимир М. Марковић

Број индекса 302/09

Студијски програм физичка хемија

Наслов рада „Моделирање динамичких стања хипоталамо-хипофизно-адреналног система и концентрације кортизола“

Ментор др Љиљана Колар-Анић, редовни професор и др Жељко Чупић, научни саветник

Потписани/а Владимир М. Марковић

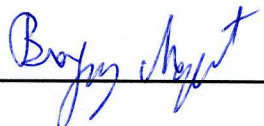
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 12. 4. 2013. год.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Моделирање динамичких стања хипоталамо-хипофизно-адrenalног система и концентрације кортизола“,

која је моје ауторско дело.

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

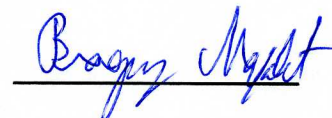
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 12.4.2013. год.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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.