

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Predrag Z. Jovanović

**DEJSTVO OKSITOCINA NA
SIMPATOADRENOMEDULARNI SISTEM
I SRCE PACOVA HRONIČNO IZLAGANIH
STRESU IZOLACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Predrag Z. Jovanović

**EFFECTS OF OXYTOCIN ON
SYMPATHOADRENOMEDULLARY
SYSTEM AND HEART OF
CHRONICALLY ISOLATED RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Dr Slađana Dronjak Čučaković, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke
“Vinča”, Univerzitet u Beogradu, **mentor**

Dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor Biološkog fakulteta, Univerzitet u Beogradu,
mentor

Dr Nataša Spasojević Popović, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke
“Vinča”, Univerzitet u Beogradu, **član komisije**

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" u okviru projekata finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 173044 - „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama CNS-a i perifernog tkiva kod sisara“.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Slađani Dronjak Čučaković, na velikoj podršci, uloženom vremenu, savetima i vođenju tokom čitavog toka izrade ove disertacije. Hvala joj na ukazanom poverenju i što mi je pružila priliku da radim u njenom timu.

Zahvalnost dugujem i mentoru dr Nebojši Jasniću na dragocenoj pomoći i stručnim savetima prilikom izrade ove teze.

Hvala dr Nataši Spasojević Popović na prijateljskoj pomoći, detaljnom čitanju teksta, konstruktivnim savetima, diskusijama i divnoj saradnji.

Hvala dr Neli Puškaš na saradnji ostvarenoj prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem i kolegamicama Bojani Stefanović i Mirjani Šućur na nesebičnoj pomoći u svakom trenutku kada mi je bila potrebna.

Hvala i svim kolegama Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove teze.

Mojoj porodici i prijateljima veliko hvala na strpljenju, podršci i ljubavi.

HVALA!

Sledeće stranice posvećujem mojoj majci.

DEJSTVO OKSITOCINA NA SIMPATOADRENOMEDULARNI SISTEM I SRCE PACOVA HRONIČNO IZLAGANIH STRESU IZOLACIJE

REZIME

Uvod: Simpatoadrenomedularni sistem predstavlja jedan od glavnih sistema uključenih u odgovor organizma na stres, reagujući na stres povećanim oslobađanjem kateholamina. Odsustvo interakcije između jedinki iste vrste, kao izvor stresa, dovodi do aktivacije simpatoadrenomedularnog sistema. Stoga je hronična socijalna izolacija već duže vreme prepoznata kao faktor rizika koji povećava stopu srčanih oboljenja. Oksitocin (OXT) predstavlja deo sistema koji koordinira odgovor organizma na stres a njegova kardioprotektivna uloga je predmet sve većeg broja studija.

Materijal i metode: Mužjaci Wistar soja pacova su podvrgnuti hroničnoj socijalnoj izolaciji u trajanju od 12 nedelja. Poslednje dve nedelje životinje su tretirane OXT (3.6µg/100g s.c). Parametri ponašanja životinja su praćeni u testu otvorenog polja. Radioenzimskom metodom je utvrđivana koncentracija adrenalina (ADR) i noradrenalina (NA) u plazmi i ispitivanim tkivima. HE bojenjem i diferencijalnim tkivnim bojenjem su praćene histološke promene na nivou komora. Real-time PCR i/ili Wester blot metodom su praćene promene u nivou ekspresije gena za tirozin hidroksilazu (TH), noradrenalinski transporter (NET) i vezikularno monoaminski transporter 2 (VMAT2) kao i za beta3-adrenalinski (β_3 -AR) i muskarinski M₂ receptor (M₂ MR) i inducibilnu azot-oksidi sintetazu (iNOS) u ispitivanim tkivima.

Rezultati: Stres socijalne izolacije je doveo do povećane količine ADR i NA u plazmi, dok u srži nadbubrežne žlezde deluje na sintezu i skladištenje kateholamina, povećavajući nivo TH enzima i VMAT2. Hronična socijalna izolacija je dovela i do asimetrije u aktivnosti leve i desne stelatne ganglije povećavajući nivo ekspresije gena za TH i NET u desnoj stelatnoj gangliji. U levoj pretkomori i levoj komori je pokazano povećanje nivoa NA a utvrđeno je i povećanje nivoa M₂ MR u levoj i desnoj pretkomori kod socijalno izolovanih životinja. Stres je doveo i do povećanja iNOS proteina i veličine kardiomiocita u levoj komori. Tretman OXT u trajanju od 14 dana je pokazao anksiolitičko dejstvo u testu otvorenog polja, a

doveo je i do smanjenja količine ADR i NA u plazmi socijalno izolovanih životinja. Oksitocin je uticao na povećanje preuzimanja i skladištenja kateholamina u srži nadbubrežne žlezde, dok je doveo do smanjene sinteze u desnoj stelatnoj gangliji. U levoj pretkomori je došlo do povećanja nivoa NET proteina usled tretmana OXT. U obe pretkomore tretman OXT je povećao nivo β_3 -AR, dok je u levoj komori doveo do povećanja nivoa M_2 MR receptora. Oksitocin utiče na smanjenje veličine kardiomiocita u levoj komori socijalno izolovanih životinja.

Zaključak: OXT u uslovima stresa pospešuje procese preuzimanja i skladištenja kateholamina u srži nadbubrežne žlezde, dok je u desnoj stelatnoj gangliji smanjio povećanu simpatičku aktivnost u uslovima stresa. Svoju glavnu kardioprotektivnu ulogu u srcu ispoljava delovanjem na kardioinhibitorne receptore, a ima i izraženo dejstvo u smanjenju hipertrofije nastale usled hronične izloženosti socijalnoj izolaciji. Sve ovo navodi na zaključak da je OXT deo sistema koji u uslovima stresa pomaže u uspostavljenju narušene homeostaze.

Ključne reči: Socijalna izolacija, stres, oksitocin, kateholamini, simpatoadrenomedularni sistem, srce.

Naučna oblast: Endokrinologija

Uža naučna oblast: Neuroendokrinologija

UDK broj: 577.175.3:[577.175.5+611.12](043.3)

EFFECTS OF OXYTOCIN ON SYMPATHOADRENOMEDULLARY SYSTEM AND HEART OF CHRONICALLY ISOLATED RATS

ABSTRACT

Introduction: The sympathoadrenomedullary system represents one of the major mechanisms involved in the body's response to stress, reacting to stress by increasing the release of catecholamines. The absence of interaction between individuals of the same species, as the source of stress, leading to the activation of sympathoadrenomedullary system. For this reason the chronic social isolation has long been recognized as a risk factor that increases the rate of heart disease. Oxytocin (OXT) is part of a system that coordinates the body's response to stress and its cardioprotective role remains the subject of a growing number of studies.

Material and methods: Male Wistar rats were subjected to chronic social isolation for a period of 12 weeks. The animals were treated with OXT (3.6µg /100 g s.c.) for the last two weeks of social isolation. The behavioral parameters of animals were monitored by application of an open field test. The radioenzymatic method was used to determine the concentration of adrenaline (ADR) and noradrenaline (NA) in the plasma and tissue samples. HE staining and differential tissue staining were used to observe histologically changes in the ventricles. Real-time PCR and / or Western blot methods were used for monitoring the level of gene expression of tyrosine hydroxylase (TH), noradrenaline transporter (NET) and the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and the beta3-adrenergic (β_3 -AR), the muscarinic M₂ receptor (M₂ MR) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the examined tissues.

Results: The social isolation has led to an increase in ADR and NA plasma levels, while in the adrenal medulla enhanced synthesis and storage of catecholamines, by increasing the level of TH enzymes and VMAT2. The chronic social isolation has led to the asymmetry in activities of the left and right stellate ganglia by increasing the level of gene expression of TH and NET in the right stellate ganglia. In the left atrium and the left ventricle social isolation has been shown to increase NA content and increase the level of M₂ MR in the left and right atrium. The stress led

to an increase in iNOS protein and size of cardiomyocytes in the left ventricle. The treatment with OXT for a period of 14 days showed anxiolytic effects in the open field test, and led to a decline of ADR and NA plasma levels of socially isolated animals. The oxytocin treatment led to an increased capacity of catecholamine uptake and storage in the adrenal medulla, while at the same time resulting in reduced synthesis in the right stellate ganglia. There was an increase in the left atrium in the level of the NET protein due to the OXT treatment. In both, atria OXT treatment has increased the level of β_3 -AR, while in the left ventricle has led to increased levels in M_2 MR receptors. The oxytocin has affected the reduction in size of cardiomyocytes in the left ventricle of socially isolated animals.

Conclusion: The OXT treatment under stress enhances the uptake and storage of catecholamines in the adrenal medulla, while in the right stellate ganglia reduces the increased sympathetic activity under stress. The main cardioprotective role of OXT in heart is to exert action on cardioinhibitory receptors and OXT has a pronounced effect in reducing hypertrophy caused by chronic exposure to social isolation. All this suggests that the OXT is a part of the system which helps maintaining homeostasis under stress.

Key words: Social isolation, stress, oxytocin, catecholamines, sympathoadrenomedullary system, heart.

Scientific field: Endocrinology

Scientific subfield: Neuroendocrinology

UDC number: 577.175.3:[577.175.5+611.12](043.3)

SKRAĆENICE

AAAD – Aromatična L-amino dekarboksilaza

ACh – Acetilholin

ACTH – Adrenokortikotropni hormon

ADR – Adrenalin

ANP – Atrijalni natriuretski peptid

AR – Adrenalinski receptor

ATP – Adenozin-trifosfat

AVP – Vazopresin

A.J. – Arbitrarne jedinice

BNP – Moždani natriuretski peptid

BNST – Bed nucleus striae terminalis

BSA – Albumin iz goveđeg seruma

cAMP – Ciklični adenozin 3'5'-monofosfat

cDNK – Komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

CRH – Kortikotropni oslobađajući hormon

DA – Dopamin

DAT – Dopaminski transporter

DBH – Dopamin- β -hidroksilaza

DHMA – Dihidroksimandelična kiselina

DHPG – Dihidroksifenilglikol

DOPA – Dihidroksifenilalanin

EMT – Ekstraneuralni monoaminski transporter

eNOS – Endotelijalna azot-oxid sintetaza

ET – Endotelin

GAS – Generalni adaptivni sindrom

GDP – Guanozin-difosfat

GPCR – Rodopsinski G protein kuplovani receptor

GTP – Guanozin-trifosfat

HHA – Hipotalamus-hipofiza-adrenokortikalna osovina

IMO – Imobilizacija

iNOS – Inducibilna azot-oxid sintetaza

iRNK – Informaciona ribonukleinska kiselina

i.p. – Intraperitonealno

KA – Kateholamini

KOMT – Katehol-O-metiltransferaza

MAO – Monoamin oksidaza

MHPG – 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol

MR – Muskarinski receptor

M₂ KO – soj miševa kojima je isključen muskarinski M₂ receptor

NA – Noradrenalin

NET – Noradrenalinški transporter

NGF – faktor rasta nervnih ćelija

NNA – Neneuralni adrenalinski sistem

nNOS – Neuralna azot-oksidi sintetaza

NO – Azot-oksidi

NOS – Azot-oksidi sintetaza

OD – Optička gustina

OXT – Oksitocin

OXTR – Oksitocinski receptor

PCR – polimerazna lančana reakcija

PKA – cAMP-protein zavisna kinaza

PNMT – Feniletanolamin-N-metil transferaza

PVDF – Poliviniliden difluorid

PVN – Parvocelularni neuroni

SAM – Simpato-adrenomedularni sistem

SAMe-³H - S-adenozil-L-(³H-metil)-metionin

SDS-PAGE – Natrijum dodecil sulfat poliakrilamidni gel za elektroforezu

SN – Simpato-neuralni sistem

s.c. – Subkutano

VMA – Vanililmandelična kiselina

VMAT – Vezikularni monoaminski transporter

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Stres | 2 |
| 1.1.1. Definicija stresa | 2 |
| 1.1.2. Stresori | 4 |
| 1.2. Neuroendokrini odgovor organizma na stres | 5 |
| 1.3. Stres socijalne izolacije | 6 |
| 1.4. Kateholamini | 8 |
| 1.4.1. Sinteza kateholamina | 8 |
| 1.4.2. Otpuštanje kateholamina..... | 10 |
| 1.4.3. Inaktivacija i preuzimanje kateholamina | 11 |
| 1.4.4. Degradacija kateholamina..... | 13 |
| 1.4.5. Mehanizam delovanja kateholamina | 14 |
| 1.5. Periferni kateholaminski sistem u stresu..... | 17 |
| 1.6. Oksitocin | 22 |
| 1.6.1. Struktura i sinteza | 22 |
| 1.6.2. Oksitocinski receptor | 22 |
| 1.6.3. Glavni fiziološki efekti oksitocina i njihova klinička primena..... | 23 |
| 1.6.4. Oksitocin i stres | 24 |
| 1.6.5. Oksitocin i kardiovaskularni sistem | 25 |
| 2. CILJ RADA | 26 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 28 |
| 3.1. MATERIJALI | 29 |
| 3.2. METODE | 29 |
| 3.2.1. Životinje..... | 29 |
| 3.2.2. Eksperimentalni protokol | 29 |
| 3.2.2.1. Socijalna izolacija..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2.2. Tretman oksitocinom | 30 |
| 3.2.2.3. Kanilacija..... | 30 |
| 3.2.2.4. Test otvorenog polja | 31 |
| 3.2.2.5. Žrtvovanje životinja i uzimanje tkiva..... | 32 |
| 3.2.3. Histološka analiza..... | 32 |
| 3.2.4. Metoda određivanja oksitocina u plazmi..... | 33 |
| 3.2.5. Metoda određivanja kateholamina (ADR i NA) u plazmi | 33 |
| 3.2.6. Izolacija RNK i Real Time PCR..... | 35 |
| 3.2.6.1. Izolacija ukupne RNK..... | 35 |
| 3.2.6.2. Merenje koncentracije ukupne RNK..... | 36 |
| 3.2.6.3. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) | 36 |
| 3.2.6.4. Real-Time PCR..... | 36 |
| 3.2.7. Izolacija proteina i Western blot analiza..... | 38 |
| 3.2.7.1. Izolacija ukupnih proteina..... | 38 |
| 3.2.7.2. Merenje koncentracije ukupnih proteina..... | 38 |
| 3.2.7.3. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) | 39 |
| 3.2.7.4. Transfer proteina sa gela na membranu..... | 40 |
| 3.2.7.5. Imunodetekcija proteina | 40 |
| 3.2.8. Statistička obrada rezultata..... | 42 |
| 4. REZULTATI | 43 |
| 4.1. Parametri ponašanja pacova u testu otvorenog polja..... | 44 |
| 4.1.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na parametre lokomocije u testu otvorenog polja kod nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 44 |
| 4.1.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na parametre koji ukazuju na anksiozno ponašanje životinja u testu otvorenog polja kod nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 46 |
| 4.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na telesnu težinu životinja, apsolutne i relativne težine leve i desne nadbubrežne žlezde i srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju OXT u plazmi nestresiranih pacova..... | 50 |
| 4.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u plazmi nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 51 |
| 4.4. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u srži nadbubrežne žlezde nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 52 |
| 4.5. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za TH, NET i VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 54 |
| 4.6. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u levoj i desnoj stelatnoj gangliji nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 59 |
| 4.7. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za TH, NET i VMAT2 u levoj i desnoj stelatnoj gangliji nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 60 |
| 4.8. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 65 |
| 4.9. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za TH, NET i VMAT2 u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 66 |
| 4.10. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za β_3 -AR i M ₂ MR u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 70 |
| 4.11. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 73 |
| 4.12. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za TH, NET i VMAT2 u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 74 |
| 4.13. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na nivo proteina β_3 -AR i relativnu ekspresiju gena za M ₂ MR u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 78 |

| | |
|--|-----------|
| 4.14. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na nivo proteina iNOS u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 80 |
| 4.15. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na histološke parametre u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 81 |
| 5. DISKUSIJA | 83 |
| 5.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na parametre u testu otvorenog polja kod nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 84 |
| 5.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na telesnu težinu životinja, apsolutne i relativne težine leve i desne nadbubrežne žlezde i srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 87 |
| 5.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju kateholamina u plazmi nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 89 |
| 5.4. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 90 |
| 5.5. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u levoj i desnoj stelatnoj gangliji nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 94 |
| 5.6. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na srce nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 97 |
| 5.6.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na levu i desnu pretkomoru srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 99 |
| 5.6.1.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 99 |
| 5.6.1.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na ekspresiju gena za β_3 -AR i M_2 MR u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 100 |
| 5.6.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na levu i desnu komoru srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 102 |

| | |
|---|-----|
| 5.6.2.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 102 |
| 5.6.2.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na ekspresiju gena za β_3 -AR i M ₂ MR levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 104 |
| 5.6.2.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na nivo iNOS proteina u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije..... | 105 |
| 5.6.2.4. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na histološke parametre u komorama srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije | 106 |
| 6. ZAKLJUČAK | 109 |
| 7. LITERATURA | 113 |

I UVOD

1.1. Stres

1.1.1. Definicija stresa

Termin stres je danas u svakodnevnoj upotrebi, posebno imajući u vidu način života savremenog čoveka i njegovu izloženost istom. Stres je univerzalni fenomen koji uglavnom negativno utiče na većinu ljudi i kao takav predmet je mnogobrojnih istraživanja. Još su Aristotel, Hipokrat i drugi antički učenjaci bili svesni postojanja stresa i njegovih štetnih efekata. Međutim Claude Bernard (1859) je bio prvi koji je i formalno pojasnio kako ćelija i tkivo u višćelijskom organizmu mogu biti zaštićeni od uticaja stresa. On je u svom radu istakao da su ćelije okružene medijumom koji amortizuje i ublažava sve promene tako da odstupanja budu najmanja moguća u odnosu na zadate biološke parametre, na taj način pružajući jednu stabilnu sredinu. Nekoliko decenija kasnije, Cannon (1929) uvodi u upotrebu termin homeostaze da označi koordinisane fiziološke procese koji održavaju organizam u stanju ravnoteže u odnosu na fiziološke parametre. On je takođe i tvorac termina „fight-or-flight“ kojim je opisao odgovor životinje na neposrednu opasnost. Koncept „fight-or-flight“ odgovora podrazumeva da prilikom izloženosti nekoj opasnosti životinja reaguje mobilizacijom simpatičkog nervnog sistema, omogućavajući životinji da se bori ili pobegne od opasnosti. Ovaj odgovor je kasnije prepoznat kao prva faza „generalnog adaptivnog sindroma“ (GAS) definisanog od strane Hansa Selye-a kao univerzalnog odgovora na stres kod kičmenjaka i drugih organizama.

Hans Selye je prvi uveo i popularizovao koncept stresa kao medicinski i naučni termin. Još na studijama medicine je počeo da proučava stres. Primetio je da pacijenti sa različitim oboljenjima imaju iste, zajedničke „nespecifične“ odgovore kada su izloženi stresnim stimulusima. Ova saznanja kao i eksperimentalni rad sa pacovima doveli su do nastanka Selijske teorije stresa. Prema njegovoj teoriji „stres je nespecifičan odgovor organizma na zahteve sredine“. Pored termina stresa uvodi i „distres“ koji je prema njemu oblik stresa koji je neprijatan ili štetan za organizam. Pored distresa, Selye je definisao i

„eustres“ kao ugodan i konstruktivan oblik stresa, koji pozitivno utiče na intelektualni razvoj jedinke (Selye, 1976). Njegova istraživanja su podržavala koncept „generalnog adaptivnog sindroma“ po kojem on tvrdi „da dugotrajna izloženost stresu dovodi do adaptacije ili bolesti“. „Generalni adaptivni sindrom“ ima tri faze: faza uzbune (alarma), faza otpora i faza iscrpljenosti. Kada su opasnost ili stresor identifikovani, organizam se alarmira. Oslobađa se adrenalin i razvija se „fight-or-flight“ odgovor. Ako je stresor prisutan više sati, neophodno je da se organizam prilagodi na tu situaciju. Reakcije uzbune iščezavaju i funkcije brojnih sistema u organizmu se vraćaju u ravnotežu. Poslednju fazu karakteriše iscrpljenost, kada normalne funkcije organizma ne mogu više da se održe. Dolazi do otkazivanja jednog ili više organskih sistema. Javlja se opet reakcija alarma, ali je sada ona iverzibilna i fatalna (Selye, 1950).

Chrousos i Gold (1992) su modifikovali Selijevu doktrinu o nespecifičnom odgovoru, predlažući da iznad određenog inteziteta, bilo koji stresor pokreće nespecifičan odgovor. Oni su stres definisali kao stanje disharmonije ili pretnje homeostazi koje izaziva fiziološki i bihevioralni adaptivni odgovor koji može biti specifičan u odnosu na stresor ili opšti i nespecifični odgovor kada pretnja homostazi pređe određeni nivo. Oni su takođe uključili i genetički polimorfizam, promene u ekspresiji gena i faktor sredine kao važne determinante individualnog odgovora na stres. Pola veka posle Selijeve doktrine o nespecifičnosti, eksperimentalno testiranje nije uspelo da je potvrdi. Dobijeni rezultati nisu bili u skladu sa doktrinom nespecifičnosti i postojanja jedinstvenog „sindroma stresa“ i više idu u prilog koncepta po kojem svaki stresor pojedinačno izaziva njemu svojstven centralni i periferni neuroendokrini odgovor (Pacak i sar., 1998).

Goldstein (1995) je dao novu definiciju stresa po kojoj je stres „stanje gde se očekivanja, bilo da su genetički predodređena, ustanovljena na osnovu prethodnog iskustva ili izvedena iz okolnosti, ne poklapaju sa sadašnjom ili očekivanom percepcijom unutrašnje i spoljašnje sredine, i ovo odstupanje onoga što je opaženo i doživljeno od onoga što je očekivano dovodi do odgovora koji se odvija po određenom obrascu“. McEwen (1998) je u istraživanju stresa razradio

koncept alostaze, koji su kao termin uveli Sterling (1981), i za koji su rekli da označava variranje u okviru prihvatljivih vrednosti parametara unutrašnje sredine kao posledica očekivanih i doživljenih zahteva. McEwen alostazu definiše kao sposobnost da se održi stabilnost unutrašnje sredine putem promena. Selye (1956) je definisao termin heterostaze da bi opisao novo stabilno stanje koje nastaje promenom tačke reagovanja organizma na neobično velike promene. Ovaj njegov koncept promene homeostatskog stanja organizma kroz adaptivne procese je svoju potvrdu dobio uvođenjem alostatske teorije. Usled izloženosti organizma hroničnom stresu, pokreće se fiziološki odgovor organizma koji dovodi do alosteričnog (adaptivnog) odgovora. Ako je alosterički odgovor efikasan, dolazi do adaptacije organizma i on je zaštićen od štetnih efekata. U situaciji kada je alosterički odgovor produžen, neodgovarajući ili prenaplašen usled ponovljene izloženosti većem broju stresora i ako ne dolazi do adaptacije, ovakav odgovor dovodi do oštećenja na organima.

Stres se danas posmatra kao svesna ili nesvesna pretnja koja dovodi do narušavanja homeostaze. Odgovor na stres ima određenu dozu specifičnosti, u zavisnosti između ostalog i od samog oblika pretnje, doživljaju stresora od strane organizma i njegove sposobnosti da se sa njim nosi (Goldstein i Kopin, 2007).

1.1.2. Stresori

Stresor se može posmatrati kao stimulus koji narušava uspostavljenu homeostazu. Na osnovu pregleda literature Pacak i Palkovits (2001) su podelili stresore u četiri grupe:

1. fizičke stresore, koji imaju negativnu ili, u nekim situacijama, pozitivnu psihološku komponentu (hladnoća, toplota, radijacija, buka, vibracije, različite hemijske supstance, itd.)

2. psihološki stresori koji odslikavaju naučenu reakciju na prethodnu izloženost štetnim uslovima (oni imaju veliki uticaj na emotivne procese koji mogu dovesti do promena u ponašanju)

3. socijalni stresori koji odražavaju poremećene interakcije između pojedinaca (ulazak na teritoriju dominantne jedinke, socijalna izolacija, a kod ljudi nezaposlenost, raskid veze, usamljenost, itd.)

4. stresore koji su pretnja kardiovaskularnoj i metaboličkoj homeostazi (vežbanje, hipoglikemija, hemoragija, itd.)

U pogledu dužine trajanja stresori mogu biti podeljeni u tri grupe:

1. akutni

2. ponovljeni

3. hronični stresori

Takođe treba naglasiti da se stresori razlikuju po intenzitetu.

U pogledu posledica po zdravlje tokom izloženosti organizma različitim stresorima, mehanizmi suočavanja sa stresom i relevantan mehanizam povratne sprege su odlučujući za preživljavanje i smanjenje zdravstvenih posledica izazvanih stresom.

1.2. Neuroendokrini odgovor organizma na stres

Neuroendokrini sistem ima važnu ulogu u prilagođavanju organizma na stres. U normalnim, povoljnim okolnostima, ima ulogu u rastu, razvoju i razmnožavanju. Međutim svaki dovoljno jak stresor, koji predstavlja pretnju održavanju homeostaze, stavlja organizam u stanje stresa i aktivira adaptivni odgovor koji omogućava individui da preživi stresno okruženje, dok se ne pojave povoljnije okolnosti. Regulacija unutrašnjeg sistema usled stanja prouzrokovanih unutrašnjim i spoljašnjim promenama je proces koji zahteva koordinisanu kontrolu endokrinog, autonomnog nervnog sistema i ponašanja.

Adekvatan odgovor na stres je neophodan u cilju očuvanja homeostaze organizma. On ne zavisi samo od inteziteta stresora već i od nasleđenih

sposobnosti ovih sistema da ostvare i održe adekvatan nivo i trajanje odgovora na stresore. Neadekvatan, prejak ili prekratak odgovor je štetan za organizam. Kao što je Cannon naglašavao ulogu simpato-adrenomedularnog sistema (SAM) u očuvanju homeostaze, tako su i Selye i njegovi studenti naglašavali aktivnost hipotalamus-hipofiza-adrenokortikalne (HHA) osovine. Dva sistema su uključena u odgovor organizma na stres: kortikotropni oslobađajući hormon (CRH)/arginin-vazopresin u hipotalamusu i neuroni autonomnog nervnog sistema u *locus ceruleus*-u. Oni regulišu perifernu aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalnog sistema i simpato-adrenomedularnog sistema oslobađajući kortikosteroide i kateholamine u cirkulaciju. Kateholamini vrlo brzo stižu do ciljnih organa postizujući efekat za svega nekoliko sekundi/minuta. Za razliku od njih kortikosteroidi deluju na receptore koju su smešteni u nukleusu ćelije i utiču na transkripciju brojnih gena. To zahteva vreme, pa se efekti HHA osovine uočavaju mnogo kasnije (Kvetnansky i sar., 2009).

1.3. Stres socijalne izolacije

Interakcije između jedinki iste vrste imaju veliki fiziološki značaj i bitno utiču na ponašanje jedinke. Društveno okruženje ima veliki uticaj na fizičko i psihičko zdravlje. Interakcije sa jednom ili većim brojem jedinki iste vrste mogu biti značajan izvor stresa, posebno kod onih vrsta (uključujući glodare i primare) koje imaju veoma kompleksnu i dinamičnu socijalnu organizaciju (Sgoifo i sar., 2001). Sa druge strane, i odsustvo interakcije između jedinki iste vrste, kao izvor stresa, može biti veoma štetno. Hronična socijalna izolacija je već duže vreme prepoznata kao faktor rizika koji povećava stopu oboljevanja i smrtnosti. Rezultati studija koje prate promene u ponašanju sugerišu generalni princip da doživljeni osećaj socijalne izolovanosti aktivira nervni, neuroendokrini i bihevioralni odgovor koji za cilj ima kratkoročno samoodržanje. Neuralni i bihevioralni efekti doživljene socijalne izolacije kod ljudi uključuju povećanje budnosti izazvane potencijalnom društvenom opasnošću u sadejstvu sa povećanom anksioznošću, izraženo neprijateljstvo i socijalno povlačenje, česte prekide sna i dnevni umor, povišen vaskularni otpor, izmenjenu gensku ekspresiju i imunski odgovor,

povećanu negativnost i simptome depresije, povećanje rizika od smanjenja kognitivnih funkcija i demencije sa porastom godina (Cacioppo i Hawkley, 2009).

Kod ljudi i drugih vrsta koje pokazuju težnju pojedinca da uspostavi neposredan i blizak socijalni kontakt i da se emocionalno poveže i veže sa drugim pripadnicima svoje vrste, socijalna izolacija može biti snažan stresor (DeVries i sar., 2007). Uticaj društvenog okruženja je dokumentovan u velikom broju studija koje se bave različitim oboljenjima kod čoveka, uključujući srčana oboljenja (Holahan i sar., 1997, Empana i sar., 2008), oboljenja bubrega (Dimond, 1979), demenciju (Luanaigh i Lawlor, 2008), artritis (Bediako i Friend, 2004), dijabetes (Marteau i sar., 1987). Pokazano je da su socijalna izolacija i smanjena socijalna aktivnost prediktivni parametri za povećanje incidence moždanog udara kao i njegovog lošijeg ishoda (Boden-Albala i sar., 2005, Rutledge i sar., 2008). Takođe, oporavak kognitivnih funkcija posle moždanog udara je umnogome bolji kod pacijenata sa izraženom socijalnom podrškom (Glymour i sar., 2008). Studija izvršena od strane Holt-Lunstad i sar. (2010) je pokazala da je socijalna izolacija značajno povećala rizik od smrtnog ishoda i kod muškaraca i kod žena.

U animalnom modelu je pokazano da hronična socijalna izolacija pacova u trajanju od 21 dana povećava nivo adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortikosterona ali ne i kateholamina u plazmi (Gavrilovic i Dronjak, 2005). Međutim, socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja dovodi do značajnog povećanja nivoa adrenalina (ADR) i noradrenalina (NA) (Gavrilovic i sar., 2010).

U modelu socijalne izolacije monogamnih voluharica koji uključuje razdvajanje od partnera, dolazi do dugoročnih kardiovaskularnih disfunkcija već između 2. i 4. nedelje izolacije. U stanju mirovanja izolovane voluharice pokazuju povećanje broja srčanih otkucaja, smanjenje varijabilnosti srčane frekvence (Grippo i sar., 2007) i izraženo povećanje koncentracije kortikosterona u plazmi kao i težinu nadbubrežnih žležda (Bosch i sar., 2009).

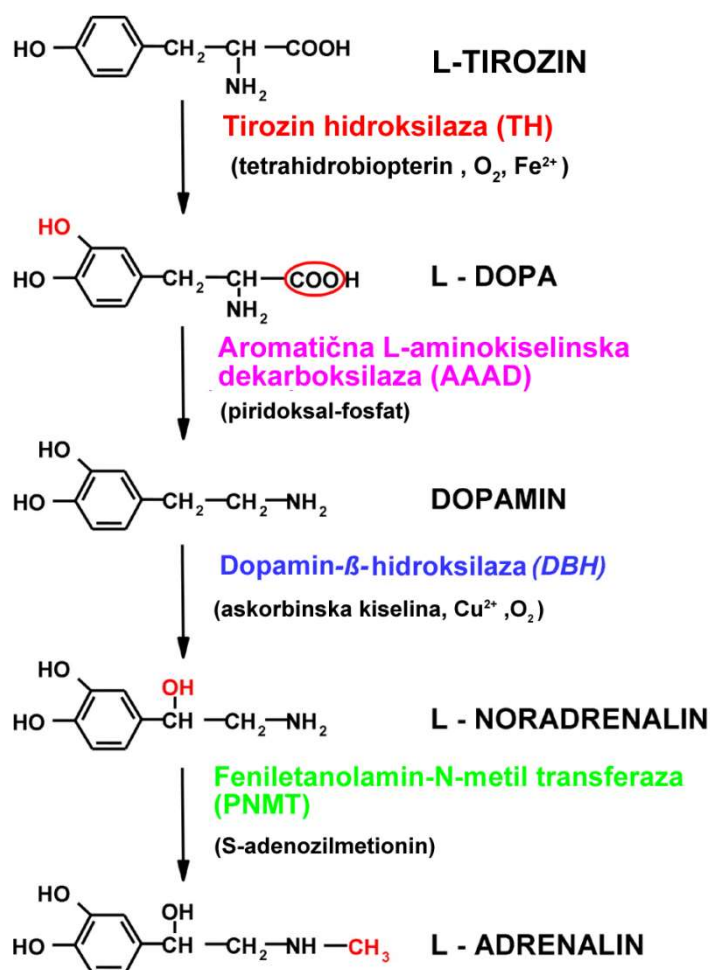
1.4. Kateholamini

Kateholamini (KA), neurotransmiteri i hormoni adrenomedularnog, simpato-neuralnog i moždanog kateholaminskog sistema, su otkriveni još na početku 20-tog veka. KA utiču na sva tkiva i imaju mnogobrojne funkcije. Zajedno sa drugim nervnim i hormonalnim sistemima oni daju značajan doprinos u regulaciji različitih fizioloških procesa. KA su uključeni u regulaciju sekrecije brojnih peptida i steroidnih hormona i takođe mogu modifikovati sintezu hormona putem njihovog efekta na gensku transkripciju.

1.4.1. Sinteza kateholamina

KA se sintetišu iz prekursora amino kiseline *L*-tirozin. Postoje dva primarna izvora tirozina: ishrana i hidrosilacija aminokiseline fenilalanina u jetri. Po ulasku u hromafinske ćelije, simpatičke ili moždane kateholaminergičke nervne završetke, tirozin se konvertuje u dihidroksifenilalanin (DOPA) od strane solubilnog citoplazmatičnog enzima tirozin hidrosilaze (TH). Po hemijskoj strukturi TH je tirozin 3-monooksigenaza. Kao kofaktore koristi molekule kiseonika i biopterin. TH koristi tirozin, kiseonik i biopterin da sintetiše DOPA, dihidrobiopterin i vodu. Ovaj enzim je nađen u svim ćelijama koje sintetišu kateholamine, pa je stoga i limitirajući enzim u procesu sinteze kateholamina (Nagatsu, 1995). Aktivnost enzima TH može biti kratkotrajno i dugotrajno regulisan. U kratkom roku, TH enzimsko aktivnost je regulisana povratnom inhibicijom, tako da je TH inhibirana od strane DOPA, dopamina (DA) i noradrenalina (NA). Aktivnost TH je takođe regulisana alosteričkom regulacijom i fosforilacijom. Na duži rok TH može biti regulisana putem enzimske stabilnosti, transkripcione regulacije, stabilnosti RNK i aktivnostima na nivou translacije.

DOPA se konvertuje u DA od strane nespecifičnog enzima, aromatične *L*-amino dekarboksilaze (AAAD). Aktivnost AAAD zavisi od nivoa kofaktora, piridoksal fosfata.



Slika 1. Proces sinteze kateholamina

DA se preuzima iz citoplazme u vezikule i konvertuje se u NA od strane enzima dopamin- β -hidroksilaze (DBH). DBH za svoju aktivnost koristi bakar, askorbinsku kiselinu i molekularni kiseonik. U formi je homotetramera koji u svojoj strukturi sadži Cu^{2+} koji je uključen u transfer elektrona u reakciji. Enzim je koncentrisan u vezikulama u kojima se skladište kateholamini. Deo DBH se oslobađa egzocitozom zajedno sa NA i adrenalinom (ADR) i zbog toga je detektovan i u

plazmi i u cerebrospinalnoj tečnosti (Weinshilboum i Axelrod, 1971).

NA se konvertuje u ADR od strane solubilnog citoplazmatičnog enzima feniletanolamin-N-metiltransferaze (PNMT) koja koristi S-adenozil-metionin kao kofaktor. PNMT se aktivira pod dejstvom glukokortikoida. Ovaj enzim je uglavnom lokalizovan u srži nabubrežne žlezde, međutim male količine ADR se sintetišu i u organima sa simpatičkom inervacijom i u nekim delovima mozga (Diaz Borges i sar., 1978). PNMT je pronađen i u nekim neneuronskim ćelijama pluća, srca i kože (Kennedy i sar., 1993, Huang i sar., 2005, Pullar i sar., 2006).

Biosinteza KA je značajno povećana u uslovima stresa (Kvetnansky i sar., 1971).

1.4.2. Otpuštanje kateholamina

Proces otpuštanja KA je sličan u nadbubrežnim žlezdama i u simpatičkim nervnim završecima. Acetilholin otpušten iz preganglijskog nervnog završetka vezuje se za nikotinske holinergičke receptore dovodeći do depolarizacije ćelijske membrane, što povećava propustljivost membrane za natrijum (Na^+). To pokreće niz događaja koji dovode do povećanog ulaska kalcijuma (Ca^{2+}) neophodnog za proces ugrađivanja vezikula koje sadrže KA u membranu hromafinske ćelije ili simpatičkog nervnog završetka. Putem egzocitoze oslobađaju se KA, zajedno sa hromograninima, drugim neuropeptidima, adenozin trifosfat (ATP) i frakcijama DBH. Tačan mehanizam Ca^{2+} indukovane egzocitoze još uvek nije poznat. Nekoliko proteina ima važnu ulogu u procesu egzocitoze, kao na pr, sinapsin, sineksin, sintaksin, katestatin. Neki od ovih proteina imaju inhibitornu ulogu u sekreciji KA, kao što je kastetin (Kennedy i sar., 1993). Adrenomedularne ćelije luče KA direktno u krvotok. Posle egzocitoze, vezikularne membrane bivaju vraćene iz plazma membrane i reciklirane u novoformirane vezikule.

Simpatički nervni završeci mogu da oslobađaju NA i nezavisno od Ca^{2+} , neegzocitoznim mehanizmom, npr. putem obrnutog transporta od strane neuralnog nosača. Ovaj proces se u *in vivo* uslovima uglavnom dešava u nekim izuzetnim uslovima kao na primer u toku ishemije (Kurz i sar., 1996).

Nakon oslobađanja, KA koji izbegnu ponovno preuzimanje difunduju u cirkulaciju formirajući cirkulišući nivo kateholamina. U plazmi se KA brzo razgrađuju. Nivo kateholamina u krvi se menja veoma brzo. Poluvreme razlaganja je ~ 2.5 min (Esler i sar., 1979). U mirovanju nizak nivo KA se ispušta u krv iz nadbubrežne žlezde i simpatičkih krajeva. U slučaju stresne stimulacije, velika količina ADR ($\sim 95\%$) i značajna količina NA (i do 30% od ukupnog NA u cirkulaciji) se oslobodi iz nadbubrežne žlezde. Preostalih 70% NA poreklom je iz simpatičkih nerava i ulazi u krvotok na mestu otpuštanja u neuroefektnim spojnicama (Kvetnansky i sar., 2009).

1.4.3. Inaktivacija i preuzimanje kateholamina

Biološki efekat KA otpuštenih u sinaptičke pukotine se okončava vrlo brzo preuzimanjem od strane simpatičkih nervnih završetaka i efektornih ćelija ili konverzijom KA u neaktivne metabolite. Sinaptički nervni završetci preuzimaju KA iz vanćelijske tečnosti procesom koji se razlikuje od intraneuralnog preuzimanja KA. Neuralno preuzimanje je poznato pod nazivom „uptake 1“ (Eisenhofer, 2001) a preuzimanje od strane neneuralnih tkiva kao „uptake 2“ (Iversen, 1997).

„Uptake 1“ ima ulogu u preuzimanju lokalno otpuštenog NA ili cirkulišućeg NA u funkciji njihovog čuvanja od strane intraneuralnih vezikula koje ih skladište za ponovnu upotrebu. „Uptake 1“ je energetski zahtevan i posredovan nosačima. Nosači mogu transportovati KA protiv velikog gradijenta koncentracije. Ovaj vid preuzimanja ima manje značajnu ulogu u inaktivaciji cirkulišućeg ADR. „Uptake 1“ se povećava paralelno sa povećanjem oslobađanja NA koje se dešava u uslovima stresa. Oko 90 % oslobođenog NA se ponovo preuzima i vraća u neurone (Eisenhofer i sar., 1990, Eisenhofer i sar., 1991).

Neuralno preuzimanje KA je posredovano putem noradrenalinskog (NET) i dopaminskog transportera (DAT). Transport putem NET i DAT je Na⁺- i temperaturno zavisian proces koji pokazuje visok afinitet za KA. S obzirom da „Uptake 1“ funkcioniše kao primarni kinetički proces, nivo preuzetog NA se povećava sa povećanim otpuštanjem NA. Između ovih kateholaminskih transportera postoje i razlike: NET dva puta efikasnije preuzima NA od ADR. Ovo objašnjava zašto se u simpatičkim nervnim vlaknima preuzimanje NA odigrava efikasnije od preuzimanja ADR. Dopamin je sa druge strane mnogo bolji supstrat za DAT od NA i ADR (Eisenhofer, 2001). Ova dva transportera pokazuju blisku homologiju i dele nekoliko strukturnih karakteristika: 12 transmembranskih domena, nekoliko slično konfigurisanih unutar- i vanćelijskih regiona sa svojim mestima fosforilacije. Preuzimanje NA od strane NET-a se takođe odvija u nekim ekstraneuralnim ćelijskim tipovima koji poseduju isti NET koji se eksprimira u noradrenalinskim neuronima. Ekstraneuralna mesta u kojima se eksprimira NET su hromafinske ćelije u srži nadbubrežne žlezde, u plućima, placenti.

Neneuralno preuzimanje „uptake 2“ je aktivan proces transporta u neneuralnim ćelijama. Ekstraneuralni monoaminski transporter (EMT) ima malu stereospecifičnost i ima mali afinitet i specifičnost za KA. „Uptake 2“ favorizuje preuzimanje ADR u odnosu na NA i nije ni Na⁺- ni Cl⁻-zavisian proces. „Uptake 2“ je odgovoran za metabolizam KA u jetri, bubrezima i plućima i visoko je senzitivna na inhibiciju od strane glukokortikoida (Trendelburg, 1988).

U proširenjima perifernih simpatičkih neurona ili u kateholaminskim neuronima u mozgu smeštene su citoplazmatične vezikule. Ove vezikule aktivno skladište sintetisane ili ponovno preuzete citoplazmatične KA pomoću vezikularnog monoaminskog transportera (VMAT). Utvrđeno je postojanje dve izoforme ovog proteina: VMAT1 („neuroendokrine“ izoforme) i VMAT2 („neuralne“ izoforme). Neuroni, bilo oni na periferiji ili u mozgu, ekspimiraju samo VMAT2. Sa druge strane, hromafinske ćelije srži nadbubrežne žlezde ekspimiraju obe izoforme i to VMAT1 u većem obimu kod glodara i VMAT2 u većem obimu kod ljudi (Eiden i sar., 2002). Kateholamini (DA, NA, ADR) su generalno bolji supstrat za aktivnost VMAT2 nego za VMAT1 (Goldstein, 2001). VMAT ima 12 transmembranskih domena. Energija za vezikularno preuzimanje je obezbeđena protonskim gradijentom putem H⁺ transportera. U suprotnosti sa uobičajenim očekivanjima, vezikularna skladišta KA nisu u statičnom stanju u kojem čekaju egzocitozno oslobađanje, već su naprotiv one u visoko dinamičnom ekvalibrijumu sa citoplazmom u okruženju, u procesu pasivnog curenja amina kome protivtežu obezbeđuje unutrašnji aktivni transport pod kontrolom VMAT (Eisenhofer i sar., 2004).

Preuzeti KA putem monoaminskih transportera skladište se u vezikulama dok se preostali KA metabolišu putem enzima, monoamin okidaze (MAO) u citoplazmi neurona ili putem enzima, katehol-*O*-metiltransferaze (KOMT) u neneuralnim ćelijama.

1.4.4. Degradacija kateholamina

KA otpušteni iz nervnih završetaka bivaju inaktivirani „uptake 1“ procesom u kombinaciji sa enzimskom degradacijom uz učešće MAO, mitohondrijalnim flavoproteinom lociranim u spoljašnjoj membrani presinaptičkih neurona. Cirkulišući KA su inaktivirani „uptake 2“ procesom i podvrgnuti enzimskom degradacijom KOMT-om.

Posle neuralnog preuzimanja, citoplazmatični NA može da podleže metabolizmu katalizovanom putem MAO i da formira dihidroksifenilglikol (DHPG) ili da se skladišti u vezikulama putem VMAT (Eisenhofer i sar., 1988, Goldstein i sar., 1988). MAO katalizuje deaminaciju amina, i produkuje aldehide koji se dalje metabolišu do karbonske kiseline ili alkohola. Postoje dva podtipa MAO: MAO-A koji ima veći afinitet za NA i ADR i u većoj meri je lokalizovan u neuronima mozga i MAO-B koji je odgovoran za degradaciju DA. COMT je primarno ekstraneuralni enzim, ali može biti i lokalizovan unutar neurona. Enzim koristi S-adenozilmetionin kao kofaktor. COMT metaboliše cirkulišući kateholamine uglavnom u jetri i bubregu.

Eisenhofer i sar. (2004) su u svojoj studiji prikazali nov pogled na metabolizam KA u normalnim i stresnim uslovima. Najveći deo metabolizma KA se obavlja u okviru iste ćelije u kojoj se ovi amini i sintetišu. Ovo se u najvećoj meri odigrava zbog „curenja“ KA iz vezikula u kojima su skladišteni u citoplazmu. U simpatičkim nervima aldehidi produkovani iz NA od strane MAO konvertuju se u DHPG a ne u 3,4-dihidroksimandeličnu kiselinu (DHMA). DHPG, a ne DHMA, je glavni metabolički produkt NA i ADR. Sledeći korak je ekstraneuralna *O*-metilacija koja vodi produkciji 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG) u ekstraneuralnom tkivu a ne sintezi vanililmandelične kiseline (VMA) koja se odigrava u jetri. U poređenju sa intraneuralnom deaminacijom, ekstraneuralna *O*-metilacija NA i ADR predstavlja manji deo metabolizma KA. Veći deo DHPG, koji nastaje u uslovima odmora, potiče od curenja NA iz vezikula. U čovekovom srcu u uslovima odmora ~73% obrta NA je posledica intraneuralnog metabolizma kao posledica curenja NA iz vezikula koje ih skladište, 12% obrta NA je posledica ekstraneuralnog

preuzimanja i metabolizma transmitera u cirkulaciji a 15% je posledica intraneuralnog metabolizma posle ponovnog preuzimanja. U uslovima vežbanja (50% od maksimalnog radnog kapaciteta), oslobađanje NA od strane srčanih simpatičkih nerava se uvećava za nekih 10 puta u odnosu na stanje mirovanja. U uslovima simpatičke aktivacije, količina oslobođenog i preuzetog NA prevazilazi količinu curenja NA iz vezikula, koji je pasivan process i koji se odvija nezavisno od egzocitoznog oslobađanja i ostaje relativno konstantan. U uslovima simpatičke aktivacije, ako bi obrt NA zavisio isključivo od oslobađanja NA, nemogućnost sinteze NA da održi korak sa povećanim oslobađanjem bi ubrzano vodila do pražnjenja skladištenog NA, smanjenog oslobađanja NA i nemogućnosti održavanja srčanih kontrakcija i rada kardiovaskularnog sistema. Vezikularno curenje stoga može biti posmatrano kao neki vid mehanizma odgovora na stres, gde konstantan i veliki doprinos vezikularnog curenja ukupnom obrtu KA smanjuje zahteve u toku simpatičke aktivacije za povećanjem sinteze KA kako bi bilo povećano oslobađanje KA. Pošto je kapacitet TH da poveća svoju aktivnost ograničen ovaj mehanizam opskrbljuje simpatičke nerve sa dodatnim kapacitetom za KA koji suprotno ne bi bio moguć (Eisenhofer i sar., 2004, Eisenhofer i sar., 2004).

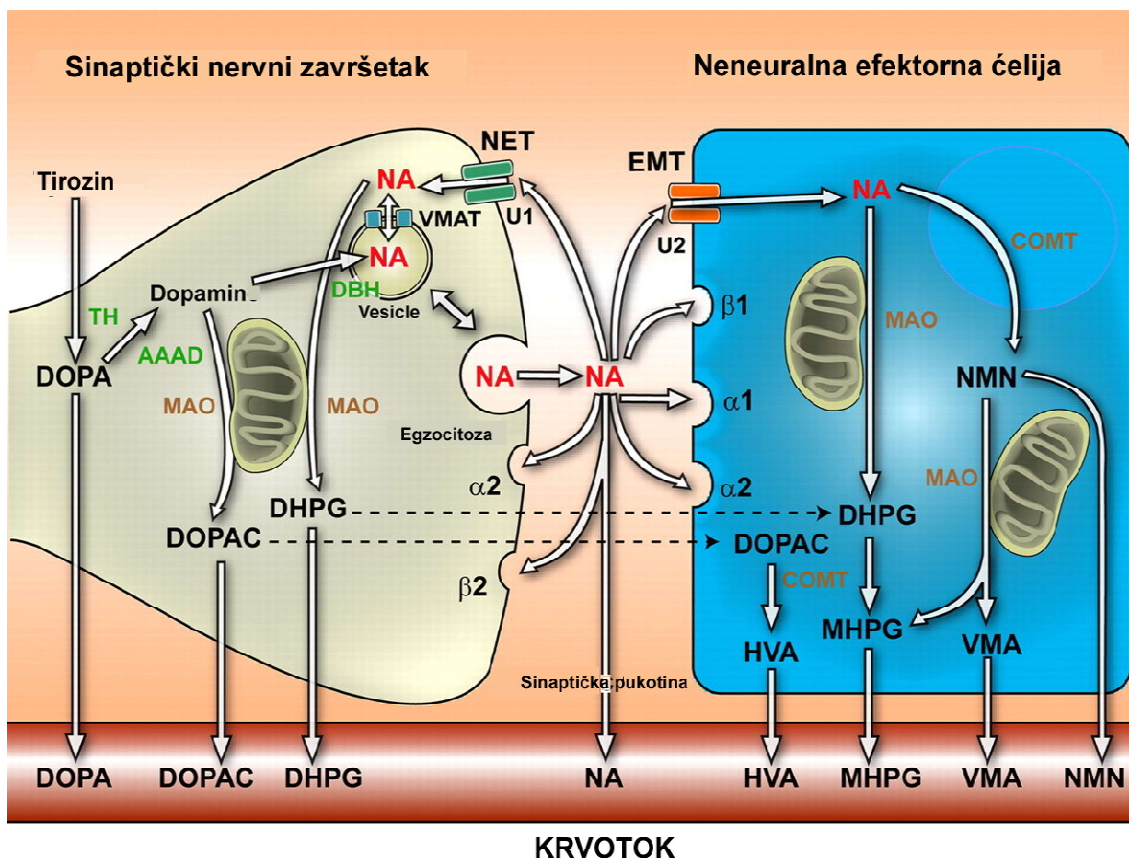
1.4.5. Mehanizam delovanja kateholamina

Otpušteni kateholamini (NA, ADR) vezuju se za specifične adrenalinske receptore (AR), koji predstavljaju specijalizovane makromolekule koje se nalaze u ćelijskoj membrani. ADR i NA ostvaruju svoju biološku funkciju aktivacijom 3 različita tipa AR odnosno 9 podtipova AR: 3 alfa1-receptora (α_{1A} , α_{1B} , α_{1C}), 3 alfa2-receptora (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) i tri beta (β) receptora (β_1 , β_2 i β_3 receptor). Svi AR pripadaju familiji G-kuplovanih proteina (GPCR) sa 7 transmembranskih domena od 22-28 aminokiselina sa tri unutarćelijske i tri vanćelijske petlje.

Ljudsko srce sadrži sva tri podtipa β AR. β_1 -AR je najzastupljenija forma beta AR u zdravom miokardu i zastupljen je sa 75-80% od ukupnog broja β AR. β_2 AR je zastupljen sa 15-18%, β_3 AR je zastupljen sa 2-3% od ukupnog broja β AR u kardiomiocitima u normalnim okolnostima (Brodde, 1993). Osnovna uloga β AR u srcu je regulacija srčanih otkucaja i kontraktilnosti kao odgovora na stimulaciju NA

i ADR. Stimulacija β_1 -AR (uglavnom) i stimulacija β_2 -AR (u manjem obimu) povećava: srčane kontrakcije (pozitivni inotropni efekat), srčanu frekvenciju (pozitivni hronotropni efekat) i stopu relaksacije (lusitropni efekat), aktivnost pejsmejker ćelija u sinoatrijalnom čvoru, kao i ubrzavanje sprovođenja impulsa kroz atrioventrikularni čvor (pozitivan dromotropni efekat) (Colucci i sar., 1986). β_3 -AR su pretežno neaktivni u normalnim fiziološkim stanjima (Skeberdis i sar., 2008), a njihova stimulacija izaziva negativni inotropni efekat i aktivaciju signalnog puta koji uključuje azot oksid sintetazu (NOS) (Gauthier i sar., 1998), delujući kao neka vrsta „sigurnosnog ventila“ u uslovima intenzivne srčane adrenalinske stimulacije (Rozec i sar., 2009). Aktivacija beta adrenoreceptora putem agonista katalizuje promenu guanozin-trifosfata (GTP) u guanozin-difosfat (GDP) na G_α subjedinici G proteina, što rezultira razdvajanjem heterotrimeru u aktivne G_α - i G_β - subjedinice, koje prenose signal nezavisno jedna od druge (Lohse i sar., 2003). Velika heterogenost alfa subjedinice G proteina, gde postoji oko 20 podjedinica (Gs, Gi, Gq, Go, itd.), je centralna osnova G-kuplovanog receptorskog signalnog puta.

U ljudskom srcu aktivacija β_1 -AR i β_2 -AR je jedan od najjačih fizioloških mehanizama za povećanje srčanih performansi. β_1 -AR aktivira Gs proteine dok β_2 -AR aktivira i Gs i Gi proteine. Aktivacija Gs signalnog puta deluje kao svojevrsan “receptor-aktivator” a Gi kao “receptor-kočnica” (Feldman i sar., 2005). Aktivacija Gs-proteina stimuliše enzim adenilat ciklazu, koji konvertuje ATP u ciklični adenozin 3',5'-monofosfat ili cAMP, koji se vezuje i aktivira cAMP-zavisnu protein kinazu (PKA). PKA je glavni efektor cAMP i fosforilacija različitih substrata rezultira u značajnom povećanju intracelularne koncentracije Ca^{2+} , koji je glavni regulator kontrakcije srčanog mišića. β_2 -AR takođe posreduje u regulaciji efekata kateholamina u srcu, ali na drugaciji način u odnosu na β_1 -AR, jer on može da napravi spregu i sa adenilat ciklaza inhibitornim G-proteinom (Gi). Preusmeravanje β_2 -AR signalizacije od Gs ka Gi proteinu zahteva indukciju fosforilacije od strane PKA. Aktivacija β_1 -AR pojačava apoptozu dok aktivacija β_2 -AR ima antiapoptotski efekat na kardiomiocite srca (Communal i sar., 1999).



Slika 2. Prikaz procesa sinteze, preuzimanja, skladištenja, degradacije i delovanja katecholamina (modifikovano iz Kvetnansky i sar. (2009)).

Postoji mali broj studija koje se bave preciznim utvrđivanjem aktivacije signalnog puta preko β_3 -AR u srcu. Za razliku od β_1 - i β_2 -AR, β_3 -AR se stimuliše pri većim koncentracijama katecholamina i indukuje negativan inotropni efekat (Niu i sar., 2012). U pretkomorama kod ljudi, aktivacija β_3 -AR dovodi do fosforilacije kalcijumovih kanala i povećanju I_{Ca} . Delovanje β_3 -AR agonista u komorama kod ljudi dovodi do negativnog inotropnog efekta, sto je povezano sa aktivacijom inhibitornog Gi proteina (Gauthier i sar., 1998). Stimulacija Gi proteina ne dovodi do inhibicije adenilat ciklaze, već dovodi do aktivacije azot oksid (NO) signalnog puta, najverovatnije uključujući endotelnu azot oksid sintetazu (eNOS). Produkcija NO dovodi do povećanja unutarćelijskog cikličnog guanozin monofosfata (cGMP), i posredno do inhibicije fosfodiesteraze 3 i/ili aktivacije PKA što dovodi do smanjenja jačine kontrakcije srčanog mišića, stimulisano cAMP signalnim putem. Da li je stimulacija β_3 AR protektivni odgovor na velike količine katecholamina ili doprinosi srčanom zastoju i dalje je kontraverzna tema; međutim sve je veći broj

dokaza koji ukazuju da deluje kao “fiziološka kočnica” kojom se srce čuva od prevelike količine kateholamina delujući kao protivteža odgovoru koji uključuje aktivaciju srčanog cAMP (Kulandavelu i Hare, 2012, Niu i sar., 2012).

1.5. Periferni kateholaminski sistem u stresu

Veoma je važno razumeti funkciju kateholaminskog sistema u normalnim i stresnim uslovima. U suprotnosti sa prvobitnim Canon-ovim konceptom jedinstvenog simpatoadrenalnog sistema, koji se zasniva na tome da srž nadbubrežne žlezde i simpatički nervni sistem funkcionišu kao jedna celina, danas je jasno da postoji veći broj kateholaminskih sistema koji mogu biti drugačije regulisani od strane raznih stresora (Goldstein, 2003, Kvetnansky i sar., 2009). Prema novom konceptu, postoji najmanje četiri periferna kateholaminska sistema, svaki sa različitom ulogom, regulacijom i efektorima. Periferni kateholaminski sistemi su: SAM, simpato-neuralni sistem (SN), DOPA dopamin autokrin/parakrin sistem i neneuralni adrenalinski sistem (NNA).

Akutno izlaganje stresu imobilizacije (IMO) u trajanju od dva sata je praćeno značajnim smanjenjem od 15-20% kompletno sintetisanog adrenomedularnog ADR, bez značajnih promena u nivou NA (Kvetnansky i Mikulaj, 1970). Polazeći od toga da u sintezi ADR učestvuje veći broj enzima, studije su u novije vreme fokusirane upravo na praćenje aktivnosti tri enzima koji učestvuju u sintezi kateholamina: TH, DBH i PNMT. Ranije studije potvrđuju da promene u aktivnosti TH indukovane IMO ili stesom hladnoće, rezultiraju povišenim nivoom enzima i njegovom sintezom (Kvetnansky i sar., 1970, Thoenen, 1970, Kvetnansky i sar., 1971). Ponovljeni stres ili hronična izloženost stresu takođe povećava aktivnost DBH i u manjoj meri i PNMT u srži nadbubrežne žlezde (Kvetnansky i sar., 1970, Thoenen, 1972). Drugi stresori takođe utiču na biositezu kateholamina i aktivnost enzima. Kontinuirano izlaganje hladnoći (4°C) povećava nivo adrenalnog TH, DBH i PNMT. Socijalni stres kao i agregacija takođe imaju uticaja na gensku ekspresiju enzima koji učestvuju u sintezi KA. Kod životinja koje su gajene u istom kavezu u većem broju od predviđenog smanjen je nivo PNMT i RNK (Morita i sar., 2001). Kada je reč o proteinima koji učestvuju u preuzimanju i skladištenju KA,

pokazano je da hronični blagi nepredvidivi stres u trajanju od 28 dana smanjuje nivoe iRNA za NET i VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde pacova (Spasojevic i sar., 2015). Akutni stres imobilizacije i ponovljeni stres imobilizacije u trajanju od 6 dana dovode do povećanja nivoa iRNA za VMAT2 ali ne i za VMAT1 u srži nadbubrežne žlezde pacova. Nivo proteina VMAT2 je značajno povećana samo kod ponovljene imobilizacije u trajanju od 6 dana (Tillinger i sar., 2010).

Postavlja se pitanje kako se adrenomedularni odgovor na akutni stres razlikuje od odgovora na hronični stres i kada taj odgovor postaje neprilagođen. Životinja ili čovek koji je izložen akutnom stresoru, ne zna do kada će taj stresor delovati, ali i kad okonča dejstvo on ne zna kada će i da li će opet delovati. U skladu sa ovom neizvesnošću postavlja se pitanje kako srž nadbubrežne žlezde ispunjava svoju ulogu za trenutnom potrebom za ADR i NA u nadbubrežnim hromafinskim ćelijama i kako će se odvijati snabdevanje, ako bude potrebe za tim u neizvesnim uslovima. Trajanje i ponavljanje stresa ima značajan efekat na promene u ekspresiji gena za enzime koji učestvuju u sintezi KA. Ovo je bio predmet ispitivanja nekoliko studija koje su se bavile neuroendokrinim odgovorom na stres hladnoće i IMO. Izlaganje životinje stresu hladnoće nekoliko sati dnevno predstavlja okidač za povećanje nivoa iRNK za TH u srži nadbubrežne žlezde, ali kada se stres produži u trajanju od mesec dana ekspresija TH se vraća na nivo kontrolne grupe životinja (Kvetnansky i sar., 2002). Akutna izloženost IMO stresu dovodi do velikog povećanja iRNK za enzime koji učestvuju u sintezi kateholamina. U poređenju sa kontrolnim nestresiranim životinjama nivo iRNK za TH je veći za 7 puta, DBH za 2,5 puta i PNMT za 5 puta kod životinja koje su bile podvrgnute IMO u trajanju od 2h (Tai i sar., 2007). Nivo iRNK za TH i PNMT je takođe veoma visok i kod životinja koje su podvrgnute ponovljenoj IMO. Kada se životinja ponovo, čak i jedanput, izloži istom stresoru, postoji određena „memorija“ prvog iskustva tako da je povećanje nivoa iRNK za TH odloženo i održava se duži period po završetku delovanja stresora. Hronični stres, za razliku od akutnog, pokreće stalnu aktivaciju gena za TH, DBH i PNMT u srži nadbubrežne žlezde, što može biti proces koji je odgovoran za adaptaciju u uslovima stresa. Stres hronične socijalne izolacije odraslih mužjaka pacova u trajanju od 12 nedelja dovodi do smanjenja ekspresije

gena za enzime koji učestvuju u sintezi KA u srži nadbubrežne žlezde, verovatno kao posledica adaptacije sistema odgovornog za sintezu KA (Gavrilovic i sar., 2008).

Istraživanja na polju stresa u novije vreme su usmerena na ispitivanje kako isti stresor može da podstakne različite ili alternativne odgovore u zavisnosti od prethodnog iskustva od istog ili drugačijeg stresora. Nađeno je da pacovi aklimatizovani na stres hladnoće ili izlagani hroničnom stresu imobilizacije, nakon izlaganja novom akutnom stresoru, povećavaju nivoa ADR i NA u plazmi kao odgovor na novi stresor. Do povećanja nivoa KA u plazmi najverovatnije dolazi usled povećanog korišćenja uskladištenih KA u nadbubrežnim žlezdama (Dronjak i sar., 2004). Kao posledica izlaganja novom akutnom stresu životinja koje su prethodno bile podvrgnute hroničnom stresu hladnoće takođe dolazi do povećanja na nivou ekspresije gena za TH i PNMT u srži nadbubrežne žlezde (Kvetnansky i sar., 2002, Kvetnansky, 2004). Spremnost organizma koji je bio dugoročno izložen jednom tipu stresora da odgovori na drugi tip stresora povećanom aktivacijom KA može se smatrati važnim adaptivnim fenomenom SAM kod pacova iako postoje studije koje prikazuju suprotne rezultate (Kvetnansky i sar., 2003, Kvetnansky, 2004). Oni su pokazali da kod pacova koji su više puta izlagani IMO stresu a zatim izloženi novom akutnom stresoru, nije došlo do povećanja nivoa iRNK za TH i PNMT u srži nadbubrežne žlezde. Ovi nalazi mogu biti objašnjeni intenzitetom stresa koji određeni stresor prouzrokuje. Imobilizacija se smatra jednim od najjačih stresora i zbog toga je nivo ekspresije gena za enzime sinteze kateholamina kod ovih životinja još uvek značajno povećan, tako da izlaganje ovih životinja novom slabijem stresoru ne dovodi do novog povećanja genske ekspresije koja je već uvećana u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Ovi rezultati ukazuju na to da novi stresor izaziva povećani odgovor kod prestresiranih životinja samo onda kada je stresor istog ili većeg intenziteta i trajanja i/ili kada se ponavlja.

SN nervni sistem je veoma bitan posrednik u odgovoru organizma na stres i učestvuje u mnogobrojnim patofiziološkim odgovorima organizma na stres, kao

što su hipertenzija i drugi kardiovaskularni poremećaji, gastrointestinalna oboljenja, karcinomi itd.

Rane studije su utvrdile da izlaganje pacova različitim stresorima pokreće povećanje enzimske aktivnosti TH i DBH u većem broju simpatičkih ganglija, uključujući i gornju cervikalnu i stelatnu gangliju (Thoenen, 1970, Otten i sar., 1973, Webb i sar., 1975). Izlaganje akutnom stresu IMO povećava nivo iRNK za TH dva ili tri puta i u cervikalnoj i u stelatnoj gangliji (Kvetnansky et al., 2004). Povećana ekspresija gena za PNMT u stelatnoj gangliji je zabeležena posle izlaganja akutnom stresu IMO kao i posle ponovljenog stresa IMO (Kubovcakova i sar., 2006). Psihosocijalni stres u trajanju od 12 nedelja takođe dovodi do povećanja iRNK za TH i DBH u stalatnoj gangliji (Gavrilovic i sar., 2009). Povećanje kapaciteta za biosintezu KA u simpatičkom nervnom sistemu najverovatnije posreduje kod povećanja nivoa NA u plazmi i ciljnim tkivima pri delovanju stresa.

Poređenje regulacije ekspresije gena za enzime koji učestvuju u sintezi KA u simpatičkim ganglijama i srži nadbubrežne žlezde pokazuje da su u suprotnosti sa prvobitnim viđenjem jedinstvenog simpato-adrenalnog sistema i da postoje dva odvojena sistema. Ekspresija gena za enzime koji učestvuju u sintezi KA u simpatičkim ganglijama je, slično kao i u srži nadbubrežne žlezde, povećana i kao takva predstavlja deo adaptivnog mehanizma organizma na dugoročnu izloženost jednom tipu stresora. Međutim, iako stres povećava aktivnost enzima koji učestvuju u sintezi KA i u srži nadbubrežne žlezde i u simpatičkim ganglijama, postoje ipak bitne razlike. Nivo iRNK za TH i DBH tokom imobilizacije u cervikalnoj i stelatnoj gangliji je povećana dva do tri puta u odnosu na bazalni nivo, dok je u srži nadbubrežne žlezde značajno veći (Nankova i sar., 1996). Vremenski period promena nivoa iRNK je takođe drugačiji u simpatičkim ganglijama u poređenju sa srži nadbubrežne žlezde. U stelatnoj gangliji povećanje iRNK za TH i DBH je postepen i povećanje traje duže u odnosu na srž nadbubrežne žlezde. Maksimalne promene u stelatnoj gangliji su primećene 24h posle izlaganja akutnom stresu IMO koje traje čak i 48h posle IMO (Kvetnansky i sar., 2004, Kvetnansky i sar., 2009). Suprotno ovome, u srži nadbubrežne žlezde dolazi do povećanja ekspresije gena za

TH i do sedam puta u odnosu na bazalni nivo posle akutnog izlaganja stresu IMO a maksimum dostiže 3h posle izlaganja IMO i vraća se nivo blizak bazalnom u roku od jednog dana (Nankova i sar., 1994). Sve ovo ukazuje da je SN sistem, barem kada se govori o TH i DBH, regulisan drugačije u odnosu na srž nadbubrežne žlezde.

NA je glavni signalni neurotransmiter autonomnog simpatičkog nervnog sistema, gde ima ulogu u kontroli regulacije srčanih otkucaja. Većina srčanih simpatičkih aksona i nervnih završetaka potiče od strane bilateralne stelatne ganglije. Uklanjanje leve i desne stelatne ganglije smanjuje nivo srčanog NA od 89-100% (Pardini i sar., 1989) i to ukazuje da >90% simpatičke inervacije vodi poreklo od stelatne ganglije. Ponovno preuzimanje NA u celom srcu je veoma efikasan proces i procenjuje se da ~ 90% oslobođenog NA biva ponovo preuzeto od strane NET (Goldstein i sar., 1988). Nema mnogo podataka o promenama na nivou ekspresije transportera koji učestvuju u preuzimanju i skladištenju KA u simpatičkom nervnom sistemu tokom stresa. Li i sar. (2001) su prvi dokazali da se NET eksprimira u stelatnoj gangliji, koja kontroliše srčanu aktivnost. Rezultati njihove studije su pokazali da je nivo ekspresije NET značajno veći u desnoj nego u levoj gangliji, ukazujući na veći kapacitet za preuzimanje NA u desnoj komori, što može da ima pozitivan efekat na održavanje funkcije desne komore u patološkim stanjima.

Do skora se verovalo da se ADR u srcu preuzima iz cirkulacije i da se sintetiše na završetcima simpatičkih neurona. Međutim neka istraživanja su pokazala da deo ADR u srcu može biti sintetisan direktno od strane srčanog tkiva (Ebert i sar., 2008). Nekoliko radova je pokazalo da se i kod pacova i kod čoveka održava skoro normalni, bazalni nivo ADR u krvi i urinu, posle adenektomije, kojom se uklanja najveći izvor ADR (Kennedy i Ziegler, 1991). PNMT se može posmatrati kao marker protein za sintezu ADR u ćelijama i tkivu. Ekstra-adrenalni sistem koji produkuje ADR takođe reaguje na stres. Stres indukuje ekspresiju gena za PNMT ne samo u srži nadbubrežne žlezde, već i u srčanim pretkomorama i komorama (Krizanova i sar., 2001, Gavrilovic i sar., 2010)

1.6. Oksitocin

1.6.1. Struktura i sinteza

Oksitocin (OXT) je otkriven od strane Ser Henry Dale 1906. god, kada je otkrio da ekstrakt iz zadnjeg režnja hipofize dovodi do kontrakcija materice kod bremenite mačke. Ser Henri Dejl je takođe i dao naziv oksitocin ovom hormonu, što ima svoju osnovu u grčkom jeziku i označava „brzi porođaj“. Oksitocin je prvi hormon koji je sekvencioniran i sintetisan od strane Vincent Du Vigneaud 1953. god i za ovo otkriće je dobio Nobelovu nagradu 1955. god.

OXT se sintetiše u paraventrikularnom i supraoptičkom jedru hipotalamusa i deponuje se u hipofizi. Pored OXT u hipotalamusu se sintetiše i neurofizin, mali nosač protein (93-95 aminokiselinskih ostataka), bogat disulfidnim vezama. Neurofizin I se vezuje za oksitocin a neurofizin II se vezuje za vazopresin. Glavna funkcija neurofizina je pronalaženje, vezivanje, translokacija i deponovanje OXT u granule pre njegovog otpuštanja u krvotok. OXT se transportuje do zadnjeg dela hipofize (neurohipofize) gde se otpušta i učestvuje između ostalog u regulaciji porođaja i laktacije, a ostatak se transportuje u dendrite. Manji deo OXT se sintetiše u manjim, parvocelularnim neuronima (PVN) i u zavisnosti od vrste, bed nucleus striae terminalis (BNST), medijalne preoptičke regije, kao i u amigdaloidnim jedrima i otpušta se u mozgu (Young III i Gainer, 2009).

Metabolizam i inaktivacija OXT se odvija uglavnom u bubrezima i jetri. Brza inaktivacija OXT se odvija putem delovanja enzima oksitokinaze, koji hormonski molekul dezintegriše rasturajući vezu između cisteina i tirozina.

1.6.2. Oksitocinski receptor

Oksitocinski receptor (OXTR) je tipični predstavnik familije GPCR receptora sa 7 hidrofobnih transmembranskih domena. Pokazano je da se OXTR nalazi u plazma membrani miometrijuma uterusa i mioepitelijalnim ćelijama mlečnih

žležda (Gimpl i Fahrenholz, 2001). Pored ovoga OXTR može se takođe naći u srcu (Gutkowska i sar., 1997), vaskularnom endotelijumu (Jankowski i sar., 2000), bubrežnom epitelijumu kod sisara (Arpin-Bott i sar., 2002), hipotalamusu, prednjem režnju hipofize, u određenim regijama korteksa i u regijama CNS koje nisu inervisane sa oksitocinskim vlaknima (Srisawat i sar., 2000). Mnogo je urađeno na polju kreiranja agonista i antagonista sa specifičnim afinitetom za OXTR i malom aktivnošću vezanom za vazopresinski receptor. Dva najpoznatija OXT antagonista su Atosiban (deamino-[D-Tyr²-(O-ethyl)-Thr⁴-Orn⁸-]vasotocin) i OVTA. Atosiban ima kliničku primenu kod odlaganja preuranjenog porođaja. Oba antagonista imaju afinitet i prema vazopresinskom receptoru. Nepeptidni OXTR antagonisti kao što su SSR126768 i GSK2211149A imaju veću specifičnost (Lee i sar., 2009).

1.6.3. Glavni fiziološki efekti oksitocina i njihova klinička primena

Kod žena, oksitocin stimuliše kontrakcije miometrijuma tokom porođaja i izbacivanje mleka tokom laktacije, do čega dolazi usled delovanja OXT na mioepitelijalne ćelije mlečnih žlezda. Kontrakcije mioepitelijalnih delova mlečnih žlezda su posledica fosforilacije miozina u ovim ćelijama. Produkcija oksitocina stimuliše ove kontrakcije i na taj način sprečava da se mlečne žlezde prenapregnu i pomažu oslobađanju od karcinogena, tako da produkcija oksitocina može biti faktor u prevenciji razvoja kancera dojke u pre i postmenopauznom periodu (Murrell, 1995). Iako OXT učestvuje u porođaju kod većine životinjskih vrsta, postoji dovoljno drugih mehanizama koji kontrolišu rođenje, i porođaj se može odvijati i bez OXT. Ipak, laktacija bez OXT nije moguća. Transgeni miševi kojima nedostaje gen odgovoran za sintezu OXT nemaju sposobnost laktacije kao odgovor na stimulaciju mlečnih žlezda (Russell i sar., 1995).

Novija istraživanja usredsređena su na drugačiju (neklasičnu) ulogu OXT u organizmu. Najnoviji podaci ukazuju na ulogu OXT u različitim oblicima ponašanja kao što su partnerski odnosi, odnos majka-dete, učenje i memorija, agresija, anksioznost i depresija. Pokazano je i da je OXT uključen i u regulaciju unosa hrane

i vode, respiratornih funkcija, metaboličkih procesa (regulaciju metabolizma ugljenih hidrata i masti) kao i imunom odgovoru (Young III i Gainer, 2009).

1.6.4. Oksitocin i stres

Mnogobrojna istraživanja usmerena su na ulogu OXT u odgovoru organizma na stres. Izlaganje organizma ekstremnim uslovima sredine je okidač za sekreciju brojnih hormona kao što su kortikosteron, kortizol, CRH, ACTH, KA, prolaktin, vazopresin (AVP) i OXT. Brojne studije su pokazale da OXT koji se oslobađa tokom stresa može da doprinese kontroli sekrecije ostalih hormona koji se oslobađaju kao odgovor na stres.

Iako je CRH primarni hormon koji je uključen u proces sekrecije ACTH za još neke neuropeptide, pre svega AVP i OXT, je pokazano da moduliraju efekat CRH na sekreciju ACTH i ponekad imaju glavnu ulogu u posredovanju odgovora ACTH na stres (Antoni i sar., 1983, Gibbs, 1985). Davanje OXT (i.v.) dovodi do smanjenja nivoa ACTH kod anesteziranih pacova, menjajući nivo kateholamina, tako da OXT ima važnu parakrinu funkciju u regulaciji sekrecije kateholamina (Gibbs, 1986).

Nivo OXT u vanćelijskom prostoru se povećava tokom emocionalnog stresa u prednjem ventrolateralnom i supraoptičkom jedru. Utvrđeno je da OXT utiče na oslobađanje kateholamina. Plecas i sar. (1989) su uočili da OXT deluje na nivou srži nadbubrežne žlezde tako što povećava broj hromafinih ćelija kao i sadržaj kateholamina.

Pokazano je da je nivo OXT u plazmi povećan u slučaju psihičkog i fizičkog stresa uključujući test prinudnog plivanja, restraint stres, stres hladnoće, hiperosmotski stres i socijalni stres (Lee i sar., 2009). Centralno oslobađanje OXT je praćeno sekrecijom ovog peptida u cirkulaciju, kao odgovorom na test prinudnog plivanja, i regulisano je različito kod bremenitih i nebremenitih pacova (Douglas, 2003). Tokom trudnoće sekrecija oksitocina kao i odgovor HHA osovine na stres je smanjena, čime se embrion štiti od preuranjenog porođaja i povećanog otpuštanja glukokortikoida i priprema oksitocinske neurone za njihovu važnu

ulogu tokom porođaja i laktacije (Dewey, 2001). Određena istraživanja upućuju na zaključak da OXT predstavlja deo endogenog sistema sa kapacitetom da bude na neki način amortizer u slučaju fizičkog i emocionalnog stresa. Ovaj sistem, koji je delom regulisan i posredstvom OXT, izgleda da koordinira endokrini i autonomni odgovor organizma na stres, tako što pojačava parasimpatički odgovor i/ili umanjuje simpatoadrenalni odgovor (Grippio i sar., 2009).

1.6.5. Oksitocin i kardiovaskularni sistem

Sve veći broj eksperimentalnih podataka ukazuje na blagotvorno dejstvo OXT na srce i vaskularni sistem. Kardiovaskularna svojstva OXT uključuju: a) Natriurezu i smanjenje krvnog pritiska, moguće kao posledicu oslobađanja atrijalnog natriuretskog peptida (ANP), b) Negativni inotropski i hronotropski efekat, kao i parasimpatičku neuromodulaciju, c) Vazodilataciju posredstvom OXTR-indukovanog azot oksidnog (NO) puta i rastom endotelijalnih ćelija, d) Izmenjeno oslobađanje insulina i anti-dijabetičnu aktivnost. Na ćelijskom nivou, protektivna uloga OXT se ogleda u: a) antioksidativnoj aktivnosti, b) inhibiciji zapaljenskih procesa, c) potencijalu za preuzimanje glukoze u kardiomiocitama koje su izložene hipoksiji i stanjima insulinske rezistencije, d) stimulaciji endotelijalnih markera u mezenhimalnim ćelijama i matičnim ćelijama.

Istraživanja takođe govore i o ulozi OXT u procesu kardiomiogeneze. Studija Danalache i sar. (2010) pokazuje da OXT stimuliše kardiomiogenezu u različitim linijama embrionalnih matičnih ćelija. OXT pospešuje fuziju mioblasta i miotubulske formacije. Većina transkripcionih faktora otkrivenih dosada u srcu su prisutni i u drugim mišićnim ćelijama i transplantacija mioblasta kod oštećenog srca poboljšava funkciju srca u oštećenom regionu. Pretpostavljajući sličnost u mehanizmima diferencijacije skeletnih i srčanog mišića kao i ekspresiju OXT i OXTR u ćelijama skeletnih i srčanog mišića može se pretpostaviti da OXT ima ulogu u regeneraciji oštećenog srčanog mišića (Gutkowska i Jankowski, 2011).

II CILJ RADA

Opšti cilj istraživanja je bio da se prouči dejstvo OXT na periferni kateholaminski sistem kod nestresiranih pacova kao i pacova izloženih stresu socijalne izolacije.

Konkretni cilj rada je bio:

1. Ispitati dejstvo OXT na ponašanje, korišćenjem testa otvorenog polja.
2. Ispitati uticaj tretmana OXT u trajanju od 14 dana na količinu ADR i NA u krvi, srži nadbubrežne žlezde, stelatnoj gangliji i srcu nestresiranih pacova kao i pacova izloženih stresu socijalne izolacije u trajanju od 12 nedelja.
3. Ispitati uticaj tretmana OXT u trajanju od 14 dana na ekspresiju gena za TH, NET i VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde, stelatnoj gangliji i srcu kao i za muskarinski i adrenalinski receptor u srcu kod nestresiranih pacova kao i pacova izloženih stresu socijalne izolacije u trajanju od 12 nedelja.
4. Ispitati uticaj tretmana OXT u trajanju od 14 dana na histološke promene u srcu kod nestresiranih pacova kao i pacova izloženih stresu socijalne izolacije u trajanju od 12 nedelja.

III MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJALI

U ovom radu su korišćene hemikalije p.a. stepena čistoće.

Svi korišćeni materijali biće navedeni u opisu korišćene metode u daljem tekstu.

3.2. METODE

3.2.1. Životinje

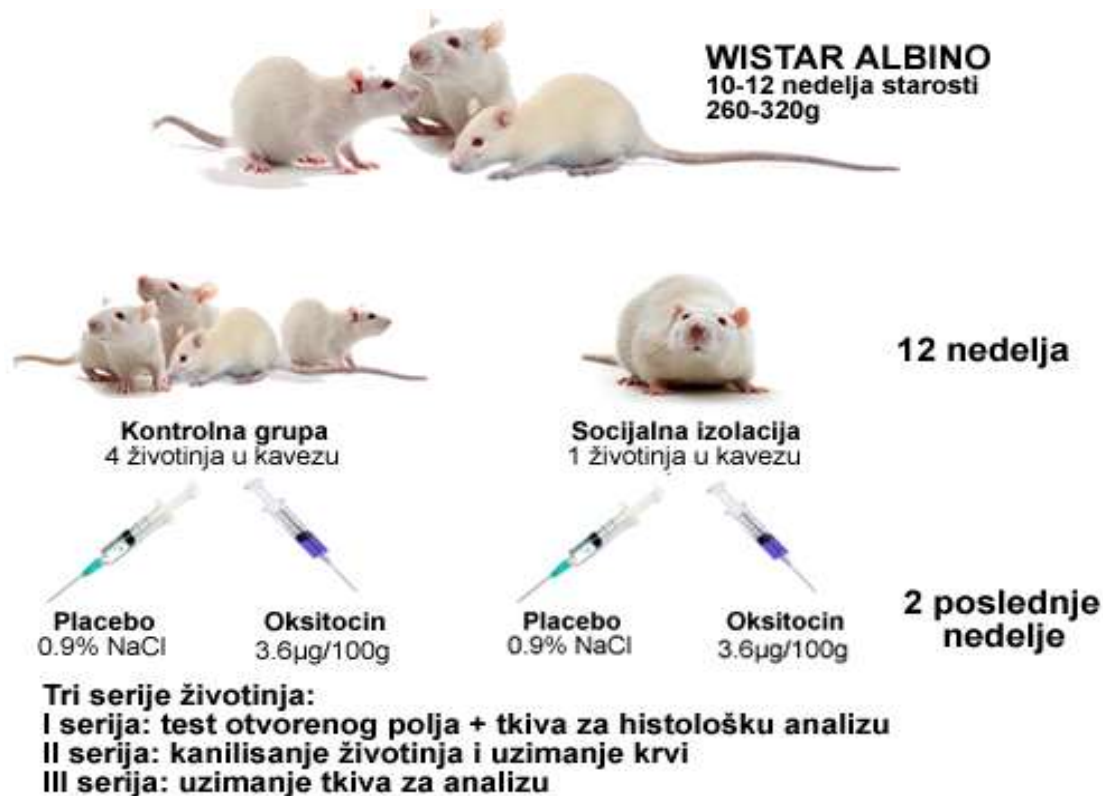
U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, starosti 10-12 nedelja. Masa životinja na početku eksperimenata bila je 260–320 g. Sve životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, u standardnim laboratorijskim uslovima (konstantna temperatura od $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, vlažnost vazduha od 55 %, svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak) u kavezima (dužina 59.5 cm, širina 38 cm i visina 20 cm) sa 3–4 životinje po kavezu i na *ad libitum* režimu ishrane.

Celokupan rad sa eksperimentalnim životinjama je izveden u saglasnosti sa principima koje propisuje direktiva Evropske komisije 2010/63/EU i eksperiment je odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa laboratorijskim životinjama Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu (rešenje o odobrenju zavedeno pod brojem 02/12).

3.2.2. Eksperimentalni protokol

3.2.2.1. Socijalna izolacija

Životinje se podeljene u dve grupe: kontrolnu grupu (po 4 životinje u kavezu) i stresiranu grupu (socijalno izolovane životinje). Socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja podrazumevala je po jednu životinju u kavezu koji je pregradom odvojen od drugih kaveza. Socijalna izolacija predstavlja vid hroničnog stresa tokom kojeg životinje imaju čulni i olfaktorni doživljaj drugih jedinki, ali su uskraćeni za bilo kakav vizuelni i taktilni kontakt sa drugim jedinkama.



Slika 1. Prikaz eksperimentalnog protokola

3.2.2.2. Tretman oksitocinom

Tretman oksitocinom je počeo 10-te nedelje izolacije i trajao je dve nedelje. Životinje obe grupe (kontrolne i socijalno izolovane) su bile podeljene na dve podgrupe: podgrupu koja je primala OXT i podgrupu koja je primala placebo. OXT (Bachem, Nemačka) je rastvoren u 0,9% NaCl i subkutano (s.c.) davan 14 dana u dozi od 3.6µg/100g težine životinje po danu. Placebo grupa je primala 0.9% NaCl rastvor u istom volumenu s.c. Telesna težina životinja je merena na početku i na kraju tretmana.

3.2.2.3. Kanilacija

Poslednjeg dana tretmana jednoj seriji životinja rađena je kanilacija koja nam omogućava uzimanje uzorka krvi bez kontakta i manipulacije životinjom. Tehnika se sastoji u tome što se anesteziranoj životinji (ketamidom 85 mg/kg s.c. i rometar 13 mg/kg s.c.) na ventralnoj strani repa napravi rez u dužini od 1 cm, pri

čemu se uoči repna arterija, koja se isprepariše i u nju se ubaci 1 cm polietilenskog katetera (VEB-Poliplast Halberstadt). Kateter se podvezivanjem učvrsti, potom se podvuče do dorzalne strane repa a zatim ispod kože do vrata gde je izvučen napolje i zaštićen metalnim štitnikom u dužini od 30 cm koji je učvršćen leukoplastom oko vrata. Kateter se napuni fiziološkim rastvorom koji sadrži 300 jedinica heparina u 1 ml. Prohodnost katetera je održavana povremenim ubrizgavanjem 0.5 ml heparizovanog fiziološkog rastvora (50 IJ). Posle 24h od ugradnje katetera, životinjama je uzimano 0,5 ml krvi.

3.2.2.4. Test otvorenog polja

Poslednjeg dana tretmana serija životinja je bila podvrgnuta testu otvorenog polja. Test se odvijao u slabo osvetljenoj i zvučno izolovanoj prostoriji u kojoj se nalazio system za video monitoring (video camcorder: 1/3 in. SSAM H EX VIEW HAD koji je privezan na kompjuter sa sistemom za praćenje: TiBeSplit). Test se izvodi u ograđenom polju 100cm širine i 100 cm dužine i 40 cm visine sa crnom podlogom. Trajanje testa je iznosilo 10 min. Pacov se postavlja na sredinu polja i prate se sledeći parametri:

1. Parametri lokomotorne aktivnosti: ukupno pređeno rastojanje (m); prosečna brzina kretanja (m/s); ukupno vreme provedeno u mirovanju (s); učestalost spontanih promena pravca kretanja; procenat horizontalnih pokreta (vreme provedeno u horizontalnom istraživanju/ukupno vreme u kojem je životinja bila aktivna); procenat vertikalnih pokreta (vreme provedeno u horizontalnoj aktivnosti, izdizanju, timarenju/ukupno vreme u kojem je životinja bila aktivna) i
2. Parametri aktivnosti koji ukazuju na anksiožnošću slično ponašanje: broj prelazaka preko centra; ukupno vreme provedeno na periferiji (s) (Prut i Belzung, 2003).

3.2.2.5. Žrtvovanje životinja i uzimanje tkiva

Životinje su žrtvovane 24 sata nakon poslednje primljene doze OXT/placeba dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus, Holliston, SAD). Merene su težine srca i nadbubrežnih žlezda a potom su izolovane i prikupljene leva i desna stelatna ganglija, leva i desna srčana pretkomora, leva i desna srčana komora i srž nadbubrežne žlezde. Odmah po izolaciji tkiva su zamrznuta u tečnom azotu a potom skladištena na -80°C do dalje obrade. Za histološke analize uzimana su po tri srca iz svake grupe životinja. Srca su stavljana u 10% puferisani neutralni formalin koji je služio kao fiksator i takva dalje išla na obradu za parafinske preseke.

3.2.3. Histološka analiza

Za histološku analizu, 5 μm preseki leve i desne pretkomore kao i leve i desne komore su dobijeni na kriokatu Microtome (Leica RM2135, Houston, Texas). Isečci su deparafinizirani i rehidrirani destilovanom vodom. Deparafinizirani rezovi su korišćeni za tkivno bojenje. Rađeno je bojenje hematoksilinom i eozinom (HE bojenje) i diferencijalno tkivno bojenje (Masson's trichome staining). Ovim bojenjem se odsečci tkiva boje s tri Massonove boje (Massonov kiseli fuksin, Massonovo anilinsko plavo, Massonovo svetlo zeleno). Rezultat je crno obojeno jedro, crveno obojena citoplazma i elementi u njoj i mišićna vlakna, narandasta crvena krvna zrnca, a zelena ili plava kolagena vlakna. Poprečni presek kardiomiocita u nivou jedra je meren na isečcima bojenim hematoksilinom i eozinom, dok su promene u novou kolagena u zidovima srčanog mišića praćene na presecima bojenim Masson's trichome staining. Fotomikrografske slike su dobijene uz pomoć s BX4 mikroskopa sa C50-60 ADU kamerom (Olympus, Japan) sa širokim zumom i softverskog sistema Olympus DP-soft 5.0.

3.2.4. Metoda određivanja oksitocina u plazmi

U probnom eksperimentu je praćena razlika u kolićini OXT u plazmi između kontrolnih životinja koje su primale placebo i životinja koje su 14 dana tretirane OXT. Krv je sakupljena u hladne polietilenske tube sa EDTA kao koagulatorom i odmah centrifugirana na 9000 obrtaja/min 5 min na +4°C da bi se odvojila plazma, koja je onda ćuvana na -20°C do analiziranja. Nivo OXT u plazmi je meren radioimunološkom metodom (S-2033, Bachem, Švajcarska), prema protokolu proizvođaća. Osetljivost eseja je bola 0.02ng/ml. Koeficijent varijanse je bio manji od 5%.

3.2.5. Metoda određivanja kateholamina (ADR i NA) u plazmi

Krv je sakupljena putem kanila u heparizovane epruvete i držana na ledu. Uzorci su centrifugirani na 5000 obrtaja/min 15 min, posle ćega je 200 µl plazme bilo deprotenizirano sa 200 µl 0,6 N HClO₄ koji je sadržao 2% etilen glikol tetra acilne kiseline (EGTA) i 0.2% MgCl₂ x 6 H₂O . Dobro izmiksani uzorak opet je bio centrifugiran na 5000 obrtaja/min 15 min, posle ćega je 200 µl supernata izdvojeno i ćuvano na -20°C do dalje obrade.

Za određivanje KA u plazmi korišćena je modifikovana metoda Peuler i Johnson (1977). Princip metode se sastoji u promeni kateholamina prisutnih u analiziranom uzorku u odgovarajuće O-metil derivate katalitićkim putem u prisustvu delimićno prećišćenog enzima COMT i radioaktivnog S-adenozil-L-(³H-metil)-metionina (SAmE-³H). Nastali O-metil derivati se oksiduju u ³H-vanilin, ćija se radioaktivnost meri.

Metoda poćinje inkubacijom 200 µl pripremljenog uzorka u trajanju od 90 min na temperaturi od 37°C kojem je dodato po 200 µl miksa sledećeg sastava (kolićina po uzorku): 0,5 mg ditiotretriola; 5.0 µl 3M MgCl₂ x 6 H₂O; 162,5 µl 2M TRIS HCl pufera koji sadrži 31,8 mM EGTA, pH 9.6; 10,0 µl mM inhibitora benzilhidroksiamina.HCl; 2,5 µl SAmE-³H i 0.5 mg COMT. Uzorci su zatim preneti u hladno gde se vrši proces zaustavljanja inkubacije dodavanjem 400µl sveže

pripremljenog rastvora: 350 μ l 1M boratnog pufera, pH 8,0; 50 μ l neradiokativnog nosača (normetadrenalina, metadrenalina i 3-metoksitiramina). Stvoreni ^3H -metilovani KA su ekstrahovani u organsku fazu sa 9 ml smeše toluol-izoamilalkohol (3:2). Posle centrifugiranja, 5 min 1500 obrtaja/min, odvojile su se dve faze. Nakon zamrzavanja na suvom ledu gornja organska faza je dekantovana u druge pripremljene epruvete koje su sadržale 500 μ l 0,1M sirćetne kiseline. Uzorci su ponovo centrifugirani i usledio je postupak vraćanja kateholamina iz organske u neorgansku fazu. Posle centrifugiranja opet je usledilo zamrzavanje na suvom ledu i odstranjivanje gornje organske faze a neorganska faza je isprana sa 2 ml smeše toluola i izoamilalkohola (3:2), posle čega je opet usledilo centrifugiranje, zamrzavanje i odstranjivanje organske faze. Epruvete sa zamrznutim uzorcima su zatvarane parafilmom i prenošene u liofilizator (Klein, Nemačka) na liofilizaciju preko noći.

Nakon liofilizacije osušeni uzorci u epruvetama su rastvarani sa 70 μ l smeše metanola i 0,001N HCl (4:1) i cela količina je naneta pasterovom pipetom na silikogelsku ploču (Silikol, Kavalier, Češka). Postupak je ponovljen 2 puta. Po nanošenju ploče su bile sušene, a zatim držane 30 min u sistemu opisanom od strane Da Prada i Zurcher (1976). Ploče su bile stavljane u smešu: 80 ml hloroforma; 15 ml 96% etanola; 10 ml 70% etilamina. Hromatografskom metodom se odvajaju metadrenalin od normetadrenalina. Nakon što su ploče izvučene iz smeše, dobro su osušene i pomoću UV lampe sa maksimumom od 254nm su detektovane razdvajane faze koje su predstavljale razdvojene amine. Faze su bile isečene i prenete u scintilacione bočice. Oba amina se odvajaju od silikogela rastvaranjem u 0.005 N amonijum-hidroksida. Uzorci ADR i NA su zatim oksidisani sa 4% Na_2O_4 a nakon 5 min reakcija je zaustavljena sa 10% glicerola i zakišeljena sa 200 μ l 1N CH_3COOH . U svaku bočicu je dodato po 10 ml Fosfor only smeše (PPO, POPOP, toluol). Radiokativnost uzorka je merena sa beta brojaču LKB-Wallac 1219 (LKB, Švedska) sa 40% efikasnošću za tricijum, sa senzitivnošću od 20 CPM.

3.2.6. Izolacija RNK i Real Time PCR

3.2.6.1. Izolacija ukupne RNK

Izolacija ukupne RNK je izvršena korišćenjem Trizol reagensa (Invitrogen, Kalifornija, SAD), prema uputstvima proizvođača. Izolacija je vršena u sterilnim uslovima. Na početku rada je napravljena DPC H₂O, tako što je sterilnoj ddH₂O dodato 0,1 ml dietilpirokarbonata 97% NMR (Sigma-Aldrich, Nemačka), pa je rastvor autoklaviran i resuspendovan u sterilne epruvete. Tkivo je preneto u tube u termo blokovima za hlađenje u kojima je u zavisnosti od veličine tkiva dodavano od 300 do 600 µl Trizola (+4°C).

Homogenizacija je vršena pomoću ultratureks homogenizera T8 IKA-WERKE (IKA, Nemačka). Pre rada homogenizer je ispran sa ddH₂O 1 minut, a zatim autoklaviranom DPC vodom, pa u Trizolu. Ovaj postupak je ponavljan između svakog uzorka. Tkivo je homogenizovano do 3 puta u trajanju od 20 sec a u pauzama između ponavljanja uzorak je držan na ledu da bi se sprečilo uništavanje RNK toplotom koju aparat proizvodi pri radu. Supernatant je potom inkubiran u termostatu (Eppendorf Termostat Plus, Nemačka) 5 min na +30°C. U tube je potom dodavan hloroform (Sigma-Aldrich, Nemačka) u zapremini od 1/5 volumena dodatog Trizola. Uzorci su ručno promućkani, pa inkubirani u termostatu 3 min na +30°C. Potom su uzorci centrifugirani na 12000 obrtaja/min 20min na +4°C (Mikro 200R HETTICH ZENTRIFUGEN, Nemačka). Ovako dolazi do razdvajanja tri



faze:

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

Slika 2. Razdvojene faze u procesu izolacije RNK

Gornja faza je zatim pažljivo prenetu u pripremljene, sterilne tube (+4°C). Uzorcima je dodat 3M CH₃COONa pH 5,0 i to u 1/10 od

zapremine dobijenog supernatanta, izmešan na vorteksu, pa je zatim dodato 96% etanola (-20°C), u količini od 2 zapremine ukupnog volumena u tubama, promešano i ostavljeno preko noći. Sutradan je uzorak vorteksovan, centrifugiran na 12000 obrtaja/min 10 min (+4°C). Gornja faza je odlivena i dodavan je 1 ml 75% etanola (-20°C), a potom centrifugiran na 12000 obrtaja/min 20 min (+4°C). Ponovo je odlivena gornja faza i dodavan je po 1 ml 96% etanola (-20°C).

3.2.6.2. Merenje koncentracije ukupne RNK

Uzorci RNK u etanolu su centrifugirani 15 min na 12000 obrtaja/min (+4°C), potom je etanol odliven i tube su ostavljene da se prosuše na filter papiru. RNK sa zidova tuba je rastvorena u 12 µl DPC vode. Koncentracija RNK određena je spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (Thermo Scientific, SAD), spektrofotometrijskim očitavanjem na 260 nm. Stepem prečišćenosti, odnosno, kontaminacije uzorka određen je iz odnosa apsorpcija na 260 nm i 280 nm (odnos $OD_{260}: OD_{280} \sim 2$ ukazuje na odsustvo proteina u analiziranom uzorku).

3.2.6.3. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Reverzna transkripcija je vršena korišćenjem Ready-To-Go You-Prime First-Strand Bead (GE Healthcare, Velika Britanija) i pd(N)₆ prajmera po protokolu proizvođača. Za potrebe prepisa uzorci su pripremani tako da je u 12 µl bilo 1500 ng RNK. U termostatu su uzorci inkubirani 10 min na +65°C. Uzorci su zatim držani na hladnom a za to vreme su po 2 kuglice reakcione smeše rastvarane sa 40 µl DPC vode i dodavano je po 2 µl pd(N)₆ prajmera rastvorenog u koncentraciji od 0,2 µg/ml. Svakom uzorku je dodavano po 21 µl ove reakcione smeše. Uzorak je blago izmešan i inkubiran 1h na +37°C.

3.2.6.4. Real-Time PCR

Za Real-Time PCR je pripremana reakciona smeša koja je sadržala sledeće komponente:

- Esej za kvantitativno utvrđivanje genske ekspresije sa specifičnim prajmerima za amplifikaciju ciljanog gena obeleženim 6-FAM bojom i Taqman MGB probom u zapremini od 1,25 µl po bunariću. Za TH, NET, VMAT2, β₃-AR, muskarinski receptor 2 (M₂ MR) i ciklofilin A korišćeni su eseji Assay-on-Demand Gene Expression Products (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD) koji su navedeni u Tabeli 1.

| Gen | Gen ID | Kat. Br. | Dužina amplicona |
|----------------|--------|---------------|------------------|
| <i>Th</i> | 25085 | Rn00562500_m1 | 60 |
| <i>Slc6a</i> | 79212 | Rn00580267_m1 | 94 |
| <i>Slc18a2</i> | 25549 | Rn00564688_m1 | 54 |
| <i>Chrm2</i> | 81645 | Rn02532311_m1 | 127 |
| <i>Adrb3</i> | 25645 | Rn00565393_m1 | 58 |
| <i>Ppia</i> | 25518 | Rn00690933_m1 | 149 |

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za Real-Time PCR, nabavljeni su od firme Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD

- Master mix u volumenu od 12,5 µl. Korišćen je TaqMan Universal Master Mix with AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD), koji u svojem sastavu ima Taqman polimerazu, dNTP, puffer, MgCl₂ i pasivnu boju ROX;

- Dodavana je DPC voda do ukupnog volumena od 15 µl po bunariću i miks sa esejem, master miksom i DPC vodom nanošen je na ploču. U bunariće su zatim dodavani cDNK uzorci (10 µl) u koncentraciji od 1-10 ng prepisane cDNK u zavisnosti od tkiva i ispitivanog gena.

PCR reakcija je izvođena na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD). Protokol reakcije je bio: 2 min na 50°C; zatim 10 min na 95°C; praćeno sa 40 ciklusa na 95°C po 15 sec i 60 sec na 60°C. Kvantifikacija je vršena korišćenjem kvantitativne C_T metode po Livak i Schmittgen (2001). Dobijeni rezultati su analizirani softwerom RQ Study Add ON. Svi transkripti su normalizovani u odnosu na ekspresiju gena za ciklofilin A

(endogena kontrola). Prethodno su proveravani nivoi ovog gena u uzorcima životinja različito tretiranih da bi se utvrdilo da sami tretmani nemaju efekat na njegovu ekspresiju. Svaki uzorak je meren u triplikatu i utvrđivana je njegova C_T vrednost. Zbog individualnih razlika među životinjama, kao kalibrator je uziman uzorak kontrolne grupe čija je vrednost blizu srednje vrednosti svih uzoraka i sa najmanjom greškom merenja.

3.2.7. Izolacija proteina i Western blot analiza

3.2.7.1. Izolacija ukupnih proteina

Tkiva su homogenizovana u 0.5M fosfatnom puferu (pH 6.65) sa 0.2% Triton X-100 (deterdžent) pomoću ultratureks homogenizera T8 IKA-WERKE na +4°C. Nakon homogenizacije, uzorci su ostavljeni da liziraju 1h na +4°C, a zatim su centrifugirani 20 min na 12000 obrtaja/min. Supernatant je pipetiran u prohladene epruvete. Tako pripremljeni uzorci su ostavljeni na -20°C do početka rada.

3.2.7.2. Merenje koncentracije ukupnih proteina

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

Za svaki uzorak (BSA STANDARD/UZORAK) su urađena merenja u duplikatu. Prvo je rastvorano 10 μ l uzorka u 990 μ l ddH₂O (100 puta razblaženje). Od toga je uzeto 25 μ l i rastvoreno u 75 μ l ddH₂O (4 puta razblaženje, ukupno razblaženje 400 puta). Uporedo su napravljena razblaženja sa albuminom iz goveđeg seruma (BSA) za standardnu krivu, u volumenu od 100 μ l. Slepna proba (blank) je sadržala 100 μ l ddH₂O, bez proteina. U slepu probu, BSA i uzorke dodavalo se 100 μ l 2 % SDS. Zatim se dodavalo po 1 ml radnog rastvora u sledećoj formi: 20 mg Na-K-tartarata se rastvaralo u 0.5% CuSO₄ x 5 H₂O; 1 ml ovog

rastvora se rastvorilo u 49 ml rastvora 10 % Na_2CO_3 + 2 % NaOH. Smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodavano 100 μl Folin & Ciocalteus Phenol (Sigma-Aldrich, Nemačka) i ddH₂O (1:2) i ostavljeno da stoji 20 min na sobnoj temperaturi, do razvijanja boje. U svim međufazama slepa proba, BSA i uzorak su mešani.

Optička gustina (OD) je merena na talasnoj dužini od 750 nm na spektrofotometru S-30 (Boeco, Nemačka). Na osnovu OD_{750nm} očitanih vrednosti za BSA konstruisana je prava i sa nje je određivana koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane OD_{750nm} za uzorak.

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

Koncentracije proteina u uzorcima su razblažene na 3 mg/ml sa ddH₂O. Neposredno pred upotrebu uzorci su pomešani sa Laemmli Sample Bufferom za pripremu uzoraka proteina za SDS-PAGE i β -merkaptoetanolom u odnosu 1:1, tako da su finalne koncentracije u uzorcima bile 1,5 mg/ml. Posle kuvanja na 100°C, 5 min, uzorci su ohlađeni i nanošeni na SDS-poliakrilamid gel.

Proteini su razdvajani po molekulskoj masi na denaturišućoj SDS-poliakrilamid gel elektroforezi (Laemmli, 1970). Elektroforeza je rađena na sistemu Mini Protean II (Bio Rad, Kalifornija, SAD). Proteini su prvo koncentrovani na 4% gelu (0.5M TRIS pH 6.8; 30% akrilamid-bisakrilamid, 10% SDS; TEMED; ddH₂O) i potom razdvajani na 12 % poliakrilamidnim denaturišućim gelovima u puferu za elektroforezu (1.5M TRIS pH 8.8; 30% akrilamid-bisakrilamid, 10% SDS; TEMED; ddH₂O). Na gel je nanošeno po 30 μl pripremljenih uzoraka (~ 45 μg ukupnih proteina). Elektroforeza je trajala oko 90 min pri konstantnom naponu od 100 V na sobnoj temperaturi i odvijala se u puferu za elektroforezu koji je sadržavao 0.25 M TRIS, 0.192 M glicin, 0.1% SDS i ddH₂O. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za Western blot analizu. Na svaki gel nanošeni su i proteini poznatih molekulskih masa PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD) koji se sastoji od 9 proteina različitih

molekulskih masa, radi lokalizovanja ispitivanih proteina po završetku elektroforeze i standardni uzorak radi anuliranja greške u proceduri.

3.2.7.4. Transfer proteina sa gela na membranu

Elektroforetski razdvojeni proteini su prenošeni sa gela na membranu. Nakon završene elektroforeze, gelovi su potapani u pufer za transfer (20 % metanol, 0.025 M TRIS HCl, 0.192 M glicin, pH 8.3). Poliviniliden difluorid (PVDF) membrana (Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD) odgovarajuće veličine prvo je aktivirana 15 sek u 100 % metanolu, zatim 2 min ispirana ddH₂O i potapana u transfer pufer. Nakon 5–10 min, formiran je sendvič koji se sastojao, redom, od jednog papira Whatman GB003 (Whatman Inc, Velika Britanija), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i jednog papira Whatman (svi natopljeni puferom za transfer). Ovako napravljen „sendvič“ postavljan je u ram aparata za transfer u Trans-Blott Cell sistemu (Bio Rad, Kalifornija, SAD) i potopljen u pufer za transfer. Prenos proteina sa gela na PVDF membranu odvijao se pri konstantnoj amperaži od 20mA po gelu, na 4°C, preko noći.

3.2.7.5. Imunodetekcija proteina

Nakon transfera, PVDF membrane su bojene 1 % rastvorom Ponceau S u 5 % sirćetnoj kiselini, da bi se utvrdila efikasnost transfera. Boja Ponceau S uklanjana je ispiranjem vodom. Potom su PVDF membrane inkubirane 1h u puferu za blokiranje, 5 % nemasnom mleku u prahu rastvorenom u TBST puferu (50 mM TRIS HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween-20), na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon toga tretirana membrana je sečena na određenim molekulskim težinama i inkubirana preko noći sa primarnim antitelima za tirozin hidroksilazu, noradrenalinski transporter, vezikularni monoaminski transporter 2, adrenalinski β_3 receptor, muskarinski receptor 2, inducibilnu azot-oksid sintetazu i β -aktin, na 4°C (Tabela 2.). Razblaženja primarnih antitela bila su sledeća: TH (1:1000, TBST); NET (1:1000, TBST); VMAT2 (1:5000, TBST); β_3 -AR (1:1000, TBST), M₂ MR (1:1000, TBST); inducibilna azot-oksid sintetaza (iNOS) (1:1000, TBST); β -aktin (1:2500, TBST). Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su

ispirane 3 x po 15 min TBST puferom na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 1.5 h uz mućkanje sa sekundarnim anti-mišjim ili anti-zečijim antitelom sa HRP (razblaženje 1:5000, TBST).

| Antitelo | Proizvođač | Kat. Br. | Karakteristike |
|--|--------------------|----------|--|
| Anti-TH | Abcam, UK | Ab51191 | Primarno žečje poliklonalno antitelo |
| Anti-NET | Abcam, UK | Ab41559 | Primarno žečje poliklonalno antitelo |
| Anti-VMAT | Abcam, UK | Ab81855 | Primarno žečje poliklonalno antitelo |
| Anti-beta 3 AR | Abcam, UK | Ab101095 | Primarno žečje poliklonalno antitelo |
| Anti-Muscarinic Acetylcholine receptor 2 | Abcam, UK | Ab2805 | Primarno mišje monoklonalno antitelo |
| Anti-iNOS | BD Bioscience, SAD | 610431 | Primarno mišje monoklonalno antitelo |
| Anti-beta Actin | Abcam, UK | Ab8226 | Primarno mišje monoklonalno antitelo |
| Goat Anti-Rabbit IgG HRP | Abcam, UK | Ab6721 | Sekundarno žečje poliklonalno antitelo |
| Goat Anti-Mouse IgG HRP | Abcam, UK | Ab6789 | Sekundarno mišje poliklonalno antitelo |

Tabela 2. Antitela korišćena u Western blot analizi

Nakon inkubacije, membrane su opet ispirane 3 x po 15 min u TBST puferu i nanošen je Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Fisher Scientific, Masačusets, SAD). Detekcija je vršena u mračnoj sobi sa crvenom svetlošću. Membrana je postavljena između dve providne folije u kaseti za detekciju Hypercassette (Amersham Life Science, SAD), a preko membrane je stavljan film Ortho CPU (Agfa, Belgija). Intenzitet signala na filmovima, koji predstavljaju koncentraciju određenog proteina, određeni su denzitometrijski. Filmovi su skenirani a intenzitet signala je kvantifikovan pomoću programa Image

J 2.0. Izmerene vrednosti OD signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražene u arbitrarnim jedinicama (AJ). Sve vrednosti su izražene u odnosu na β -aktin sa istog blota.

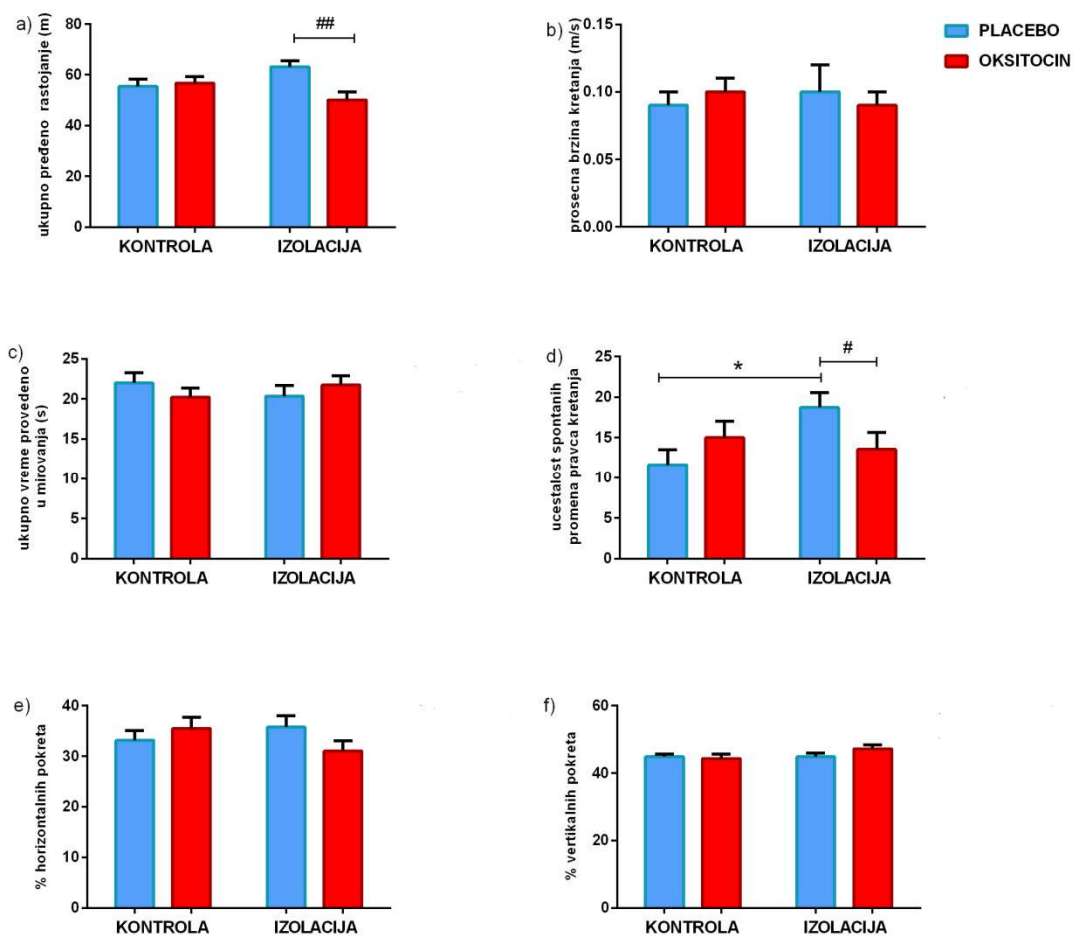
3.2.8. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška. Rezultati eksperimenta su statistički analizirani korišćenjem analize varijansi sa tri i dva faktora (Three-way ANOVA, Two-way ANOVA) sa ciljem da se utvrdi da li postoji razlike između srednjih vrednosti za zadate faktore različitih eksperimentalnih grupa. Tukey Post-hoc analizom je dalje utvrđivana statistička značajnost između grupa koje su se poredile. Za granične vrednosti značajnosti uzimane su vrednosti $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0.001$. Obrada rezultata je urađena u softverskom programu Origin, verzija 7.5 (Jandel Corporation, SAD) i ezANOVA, verzija 0.98 (Chris Roden).

IV REZULTATI

4.1. Parametri ponašanja pacova u testu otvorenog polja

4.1.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na parametre lokomocije u testu otvorenog polja kod nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

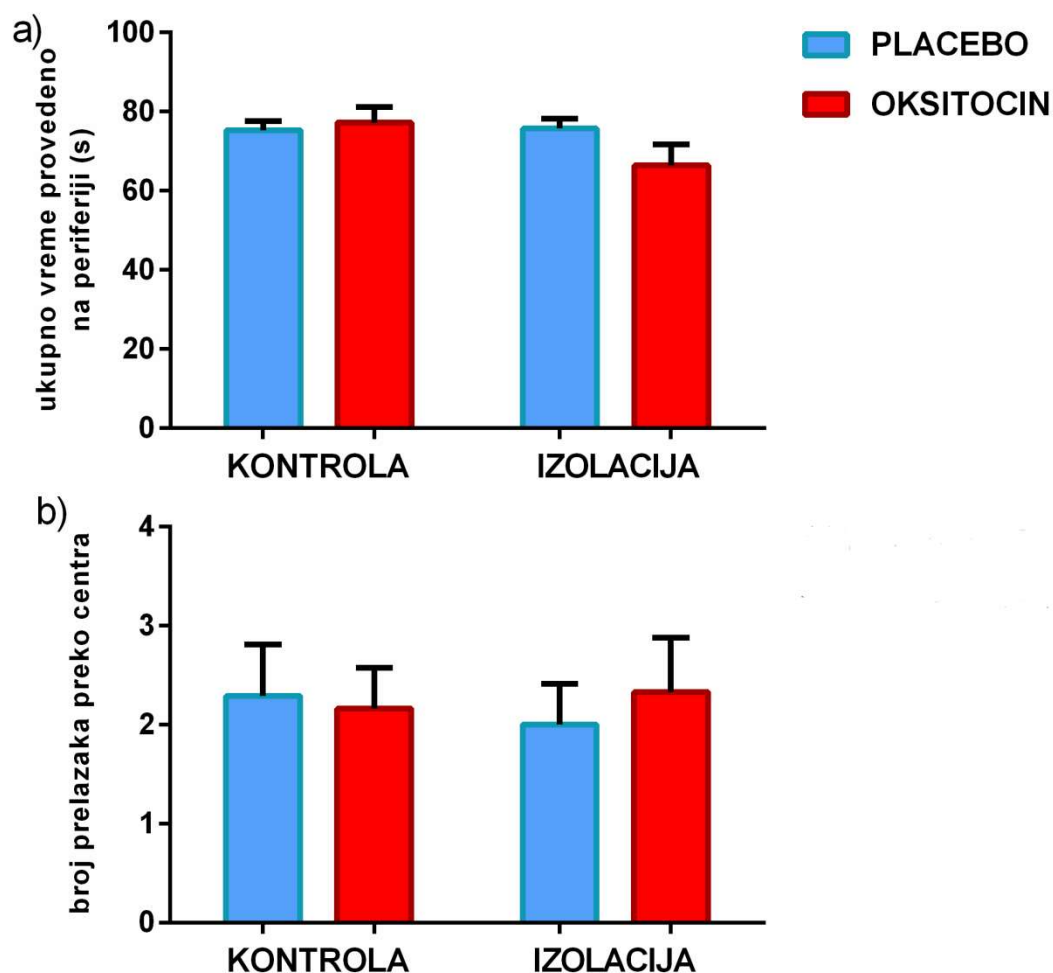


Slika 1. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na: a) ukupno pređeno rastojanje; b) prosečnu brzinu kretanja; c) ukupno vreme provedeno u mirovanju; d) učestalost spontanih promena pravca kretanja; e) procenat horizontalnih pokreta i f) procenat vertikalnih pokreta u testu otvorenog polja kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 8 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, placebo vs. oksitocin.

Rezultati prikazani na Slici 1. pokazuju dejstvo tretmana OXT na parametre lokomocije u testu otvorenog polja kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Na Slici 1a. vidimo da je tretman OXT značajno uticao na ukupni pređeni put u testu otvorenog polja ($F_{(1.31)}=4.96$; $p=.042$). Takođe dvofaktorijalna analiza varijansi je pokazala i značajnu interakciju između stresa i tretmana OXT ($F_{(1.31)}=6.79$; $p=.016$). Naknadnom analizom je utvrđeno da je ukupni pređeni put kod OXT tretiranih izolovanih pacova manji za 20% u odnosu na izolovane pacove koji su primali placebo ($p=.0081$, Tukey test). Naknadna analiza nije pokazala značajnost između drugih grupa. Hronični stres izolacije ni tretman OXT nisu imali efekta na prosečnu brzinu kretanja u testu otvorenog polja (Slika 1b.). Rezultati parametara učestalosti spontanijih promena pravca kretanja pokazuju značajnu interakciju između hroničnog stresa izolacije i tretmana OXT ($F_{(1.31)}=8.93$; $p=.0065$). Daljom analizom je utvrđeno povećanje učestalosti spontanijih promena pravca kretanja kod hronično izolovanih pacova koji su primali placebo za 60% u odnosu na kontrolnu grupu ($p=.022$, Tukey test). Značajno smanjenje od 20% je zabeleženo kod izolovanih pacova koji su primali OXT u odnosu na izolovanu grupu koja je primala placebo ($p=.036$, Tukey test) (Slika 1d.)

Analiza rezultata pokazuje da kod preostalih parametara lokomocije testa otvorenog polja (ukupno vreme provedeno u mirovanju, procenta velikih pokreta u odnosu na ukupno posmatrano vreme, procenta lokalnih pokreta u odnosu na ukupno posmatrano vreme) nema značajnih razlika između dejstva stresa i tretmana OXT kod ispitivanih grupa (Slika 1c., 1e., 1f.).

4.1.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na parametre koji ukazuju na anksiozno ponašanje životinja u testu otvorenog polja kod nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

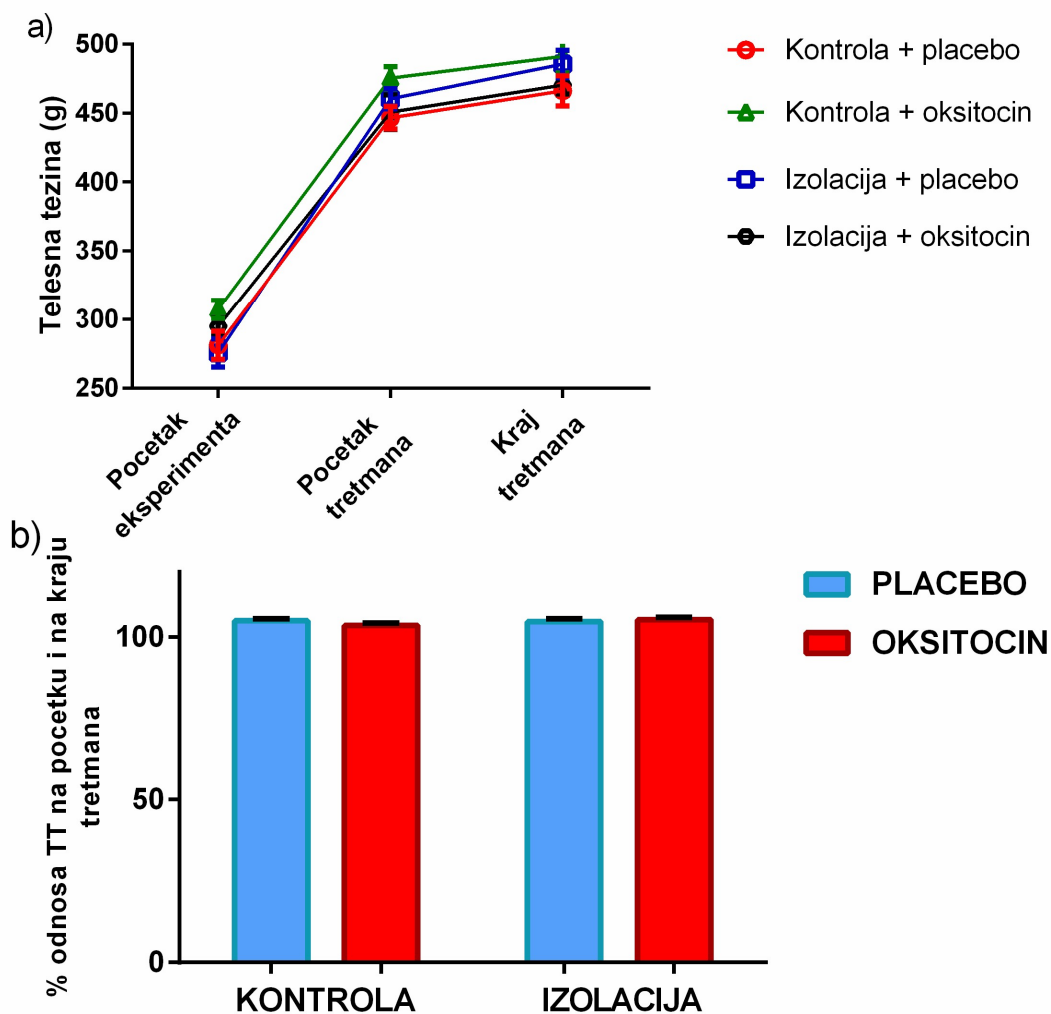


Slika 2. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na: a) ukupno vreme provedeno na periferiji i b) broj prelazaka preko centra u testu otvorenog polja kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 8 pacova

Analiza rezultata prikazanih na Slici 2., koja pokazuje parametare koji ukazuju na anksioznosti slično ponašanje kod pacova, je pokazala da ni hronična izolacija pacova ni tretman OXT nisu uticali na promene u ovim parametrima,

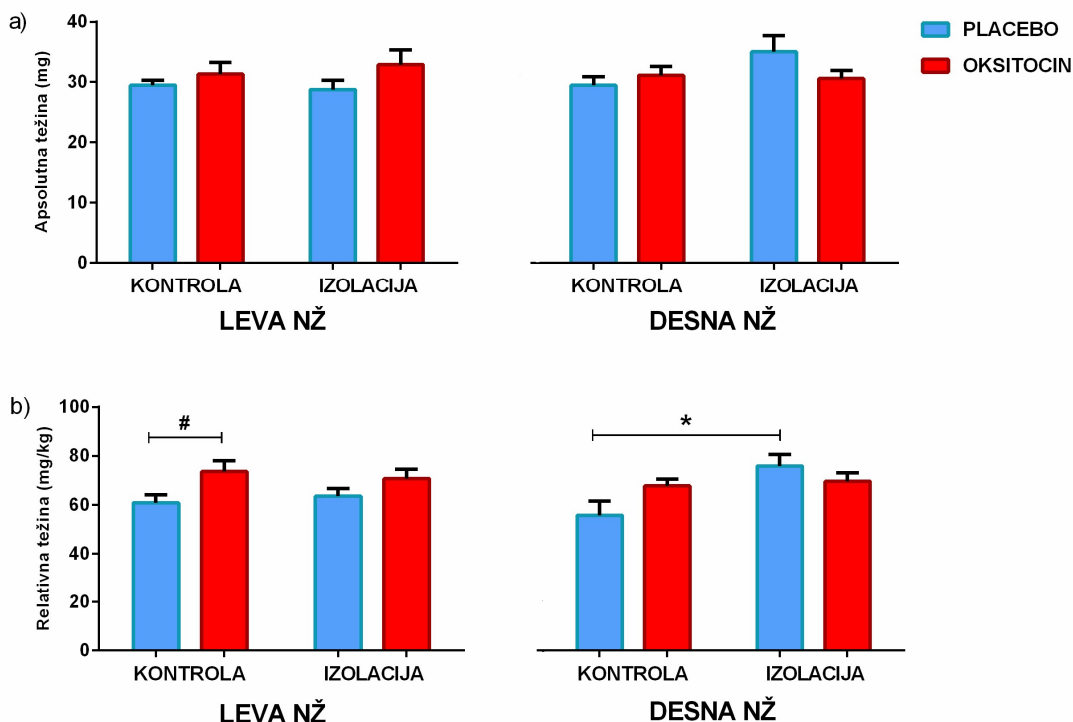
broju prelazaka preko centra i ukupno vreme provedeno na periferiji, ni kod jedne grupe životinja (Slika 2a, 2b.).

4.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na telesnu težinu životinja, apsolutne i relativne težine leve i desne nadbubrežne žlezde i srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije



Slika 3. a) Telesna težina životinja na početku eksperimenta, početku tretmana i na kraju tretmana, b) Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na % odnosa TT pre i posle tretmana kod nestresiranih kontrola i socijalno izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 8 pacova

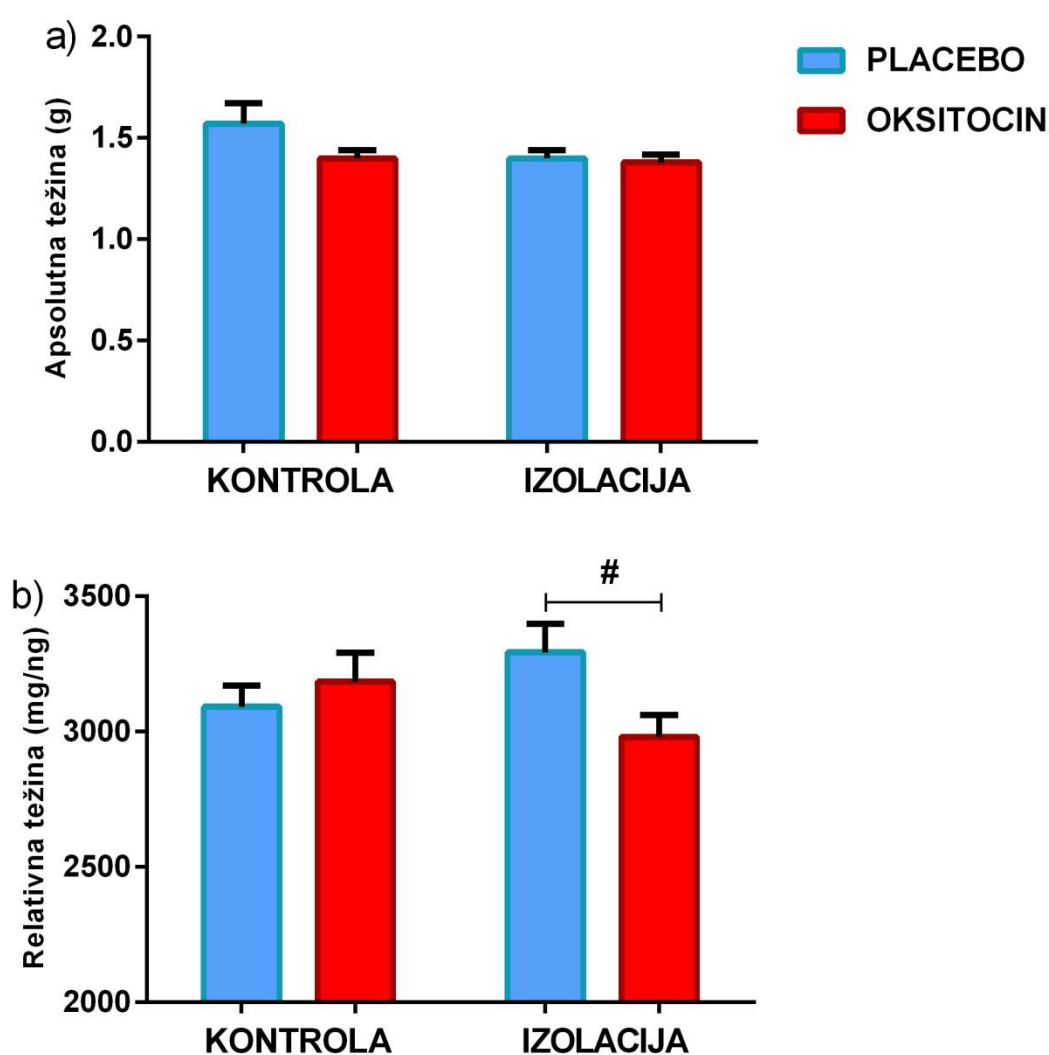
Prikazani rezultati na Slici 3. ukazuju da stres socijalne izolacije kao i tretman OXT nisu imali efekat na telesnu težinu pacova. Težine su merene na početku socijalne izolacije, početku tretmana OXT i na kraju tretmana OXT. U ovim mernim tačkama nisu uočene statistički značajne razlike između posmatranih grupa (Slika 3a., 3b.).



Slika 4. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na: a) apsolutne težine i b) relativne težine leve i desne nadbubrežne žlezde kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM za uzorak od 8 pacova. Statistička značajnost: * p<0.05, kontrola vs. izolacija; # p<0.05, placebo vs. oksitocin.

Three-way ANOVA analiza rezultata prikazanih na Slici 4a., apsolutnih težina leve i desne nadbubrežne žlezde, nije pokazala efekat ni stresa ni tretmana ni strane tela. Sa druge strane Three-way ANOVA analiza rezultata relativnih težina leve i desne nadbubrežne žlezde je pokazala značajnu interakciju između hroničnog stresa i tretmana OXT ($F_{(1,63)}=4.73$; $p=.034$) kao i između hroničnog stresa i strane tela ($F_{(1,63)}=4,20$; $p=.044$). Pokazan je i efekat hroničnog stresa ($F_{(1,63)}=4.01$; $p=.049$) i tretmana ($F_{(1,63)}=5,45$; $p=.023$). Two-way ANOVA analiza relativnih težina leve nadbubrežne žlezde je pokazala efekat tretmana ($F_{(1,31)}=6.92$;

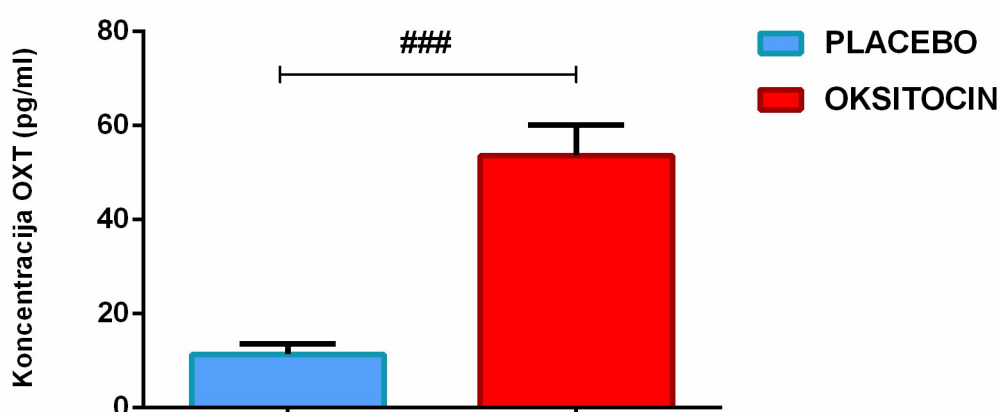
p=.015). Dalja analiza pokazala je statistički značajno povećanje relativne težine leve nadbubrežne žlezde kontrolne grupe koja je primala OXT u odnosu na onu koja je primala placebo (21%, p=.0081, Tukey test). Dvofaktorijalna analiza varijansi rezultata za relativne težine desnih nadbubrežnih žlezda je pokazala značajan efekat hroničnog stresa ($F_{(1,31)}=6.09$; p=.021). Daljom analizom je utvrđeno statistički značajno povećanje za 36% kao posledica socijalne izolacije kod grupa koje su primale placebo (p=.019, Tukey test) (Slika 4b.).



Slika 5. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na: a) apsolutnu težinu i b) relativnu težinu srca kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 8 pacova. Statistička značajnost: # p<0.05, placebo vs. oksitocin.

Na Slici 5. je prikazano dejstvo tretmana OXT na apsolutnu i relativnu težinu srca kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Analiza rezultata apsolutnih težina srca pacova nije pokazala ni efekat hronične izolacije ni tretmana OXT (Slika 5a.). Two-way ANOVA analiza relativnih težina srca pacova pokazala je značajnu interakciju između hroničnog stresa i tretmana ($F_{(1,31)}=4.46$; $p=.045$). Naknadna analiza je pokazala statistički značajno smanjenje za 10% kod hronično izolovanih pacova koji su primali OXT u odnosu na one koje su primali placebo ($p=.036$, Tukey test) (Slika 5b.).

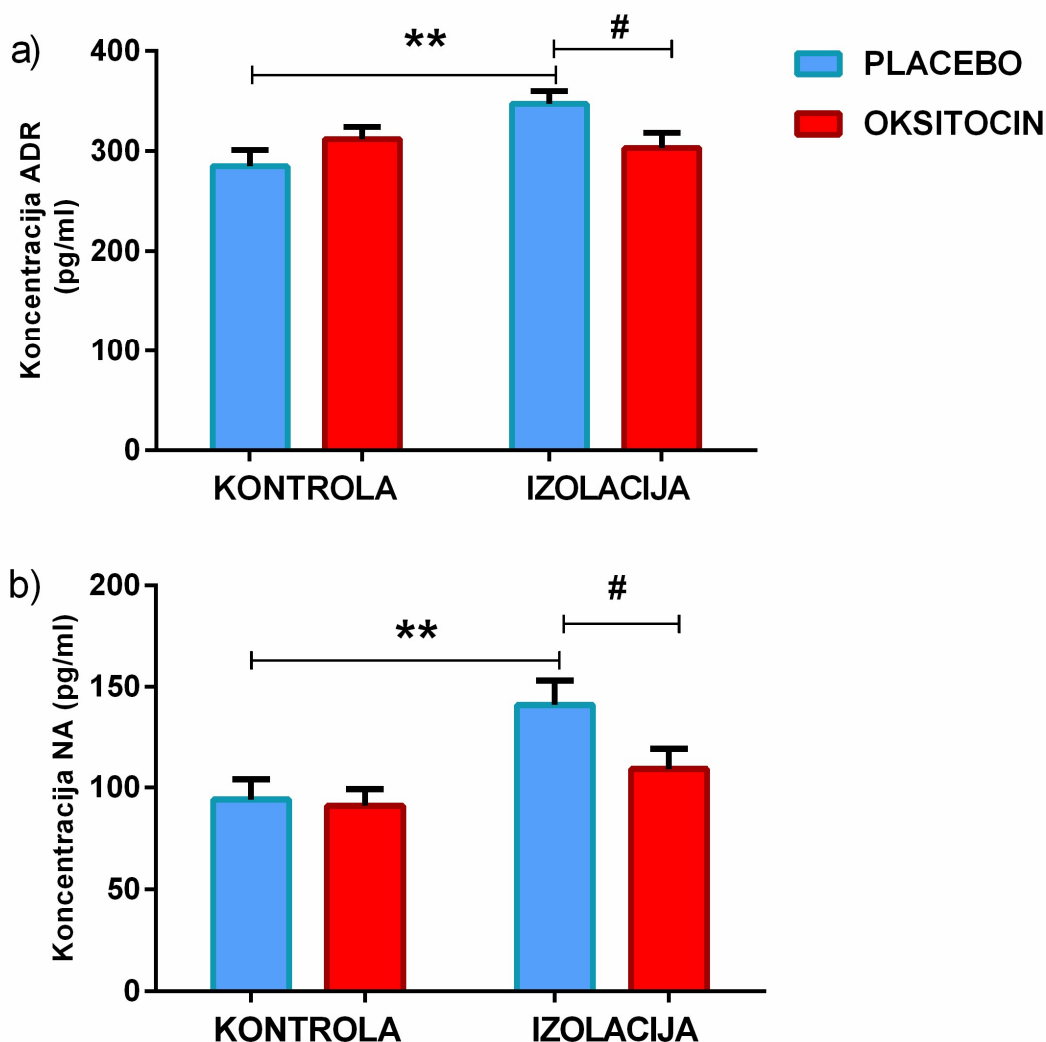
4.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju OXT u plazmi nestresiranih pacova



Slika 6. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju OXT u plazmi kod nestresiranih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: ### $p<0.001$, placebo vs. oksitocin.

Na Slici 6. je prikazana koncentracija OXT u plazmi nestresiranih pacova. Analiza je pokazala značajnu statističku značajnu razliku u koncentracijama OXT između životinja koje su primale placebo i onih koje su primale OXT u trajanju od 14 dana (374%, $p=.00078$, Tukey test).

4.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u plazmi nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije



Slika 7. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju: a) ADR i b) NA u plazmi kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: ** $p < 0.01$, kontrola vs. izolacija; # $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin.

Analiza varijansi pokazala je da postoje značajne interakcije između dejstva stresa i tretmana OXT na koncentraciju ADR u plazmi ($F_{(1,23)}=6.74$; $p=.015$). Daljom analizom je utvrđen statistički značajan efekat izolacije u grupama koje su primale placebo, a izolacija je dovela do povećanja koncentracije ADR za 22%

($p=.008$, Tukey test). Tretman OXT kod stresiranih pacova je doveo do statistički značajnog smanjenja nivoa ADR za 13% ($p=.043$, Tukey test) (Slika 7a.).

Dobijeni rezultati koncentracije NA u krvi pacova analizirani Two-way ANOVA testom pokazuju značajan efekat stresa ($F_{(1,23)}=10.8$; $p=.003$). Analiza između grupa je i ovde pokazala statistički značajan efekat izolacije kod grupe koja je primala placebo. Izolacija je dovela do povećanja koncentracije NA za 50% ($p=.009$, Tukey test). Tretman OXT u trajanju od 14 dana je statistički značajno smanjio koncentraciju NA kod stresiranih pacova (23%, $p=.043$, Tukey test) (Slika 7b.).

4.4. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u srži nadbubrežne žlezde nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Na Slici 8. su prikazani rezultati nivoa KA u srži nadbubrežne žlezde kod kontrolnih i izolovanih pacova tretiranih placebo i OXT. Kada govorimo o nivou kateholamina u tkivu, u srži nadbubrežne žlezde Two-way ANOVA je pokazala značajan efekat faktora tretmana OXT ($F_{(1,23)}=5.01$; $p=.041$) na nivoe koncentracije ADR. Dalja analiza između ispitivanih grupa je pokazala statistički značajno povećanje za 48% u kontrolnoj grupi koja je tretirana OXT u odnosu na placebo tretiranu grupu ($p=.042$, Tukey test) (Slika 8a.).

Two-way ANOVA analiza rezultata koncentracije NA u srži nadbubrežne žlezde je pokazala značajnu interakciju između faktora stresa i tretmana ($F_{(1,23)}=4.58$; $p=.047$). Tretman OXT je doveo do povećanja nivoa koncentracije NA za 33% u srži nadbubrežne žlezde nestresiranih životinja ($p=.035$, Tukey test) (Slika 8b.).

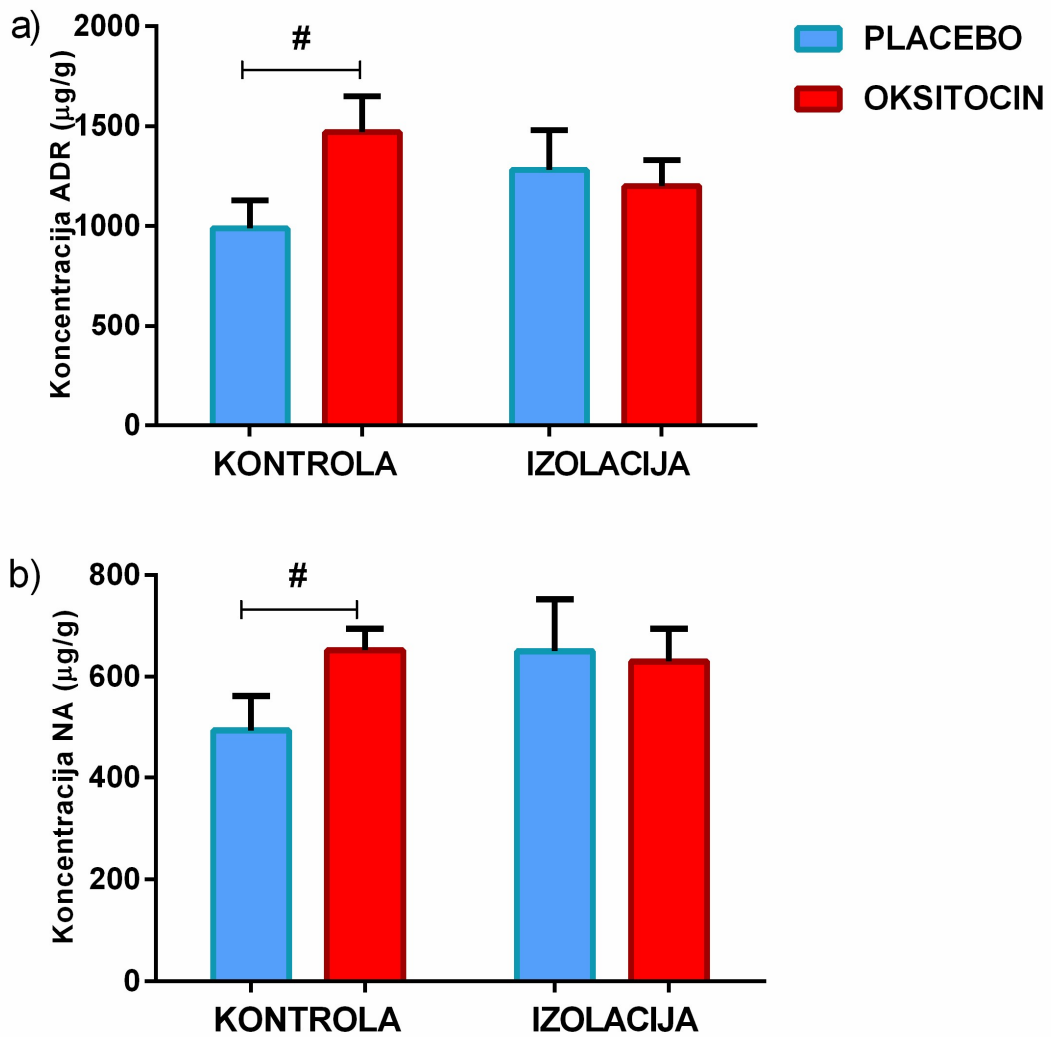
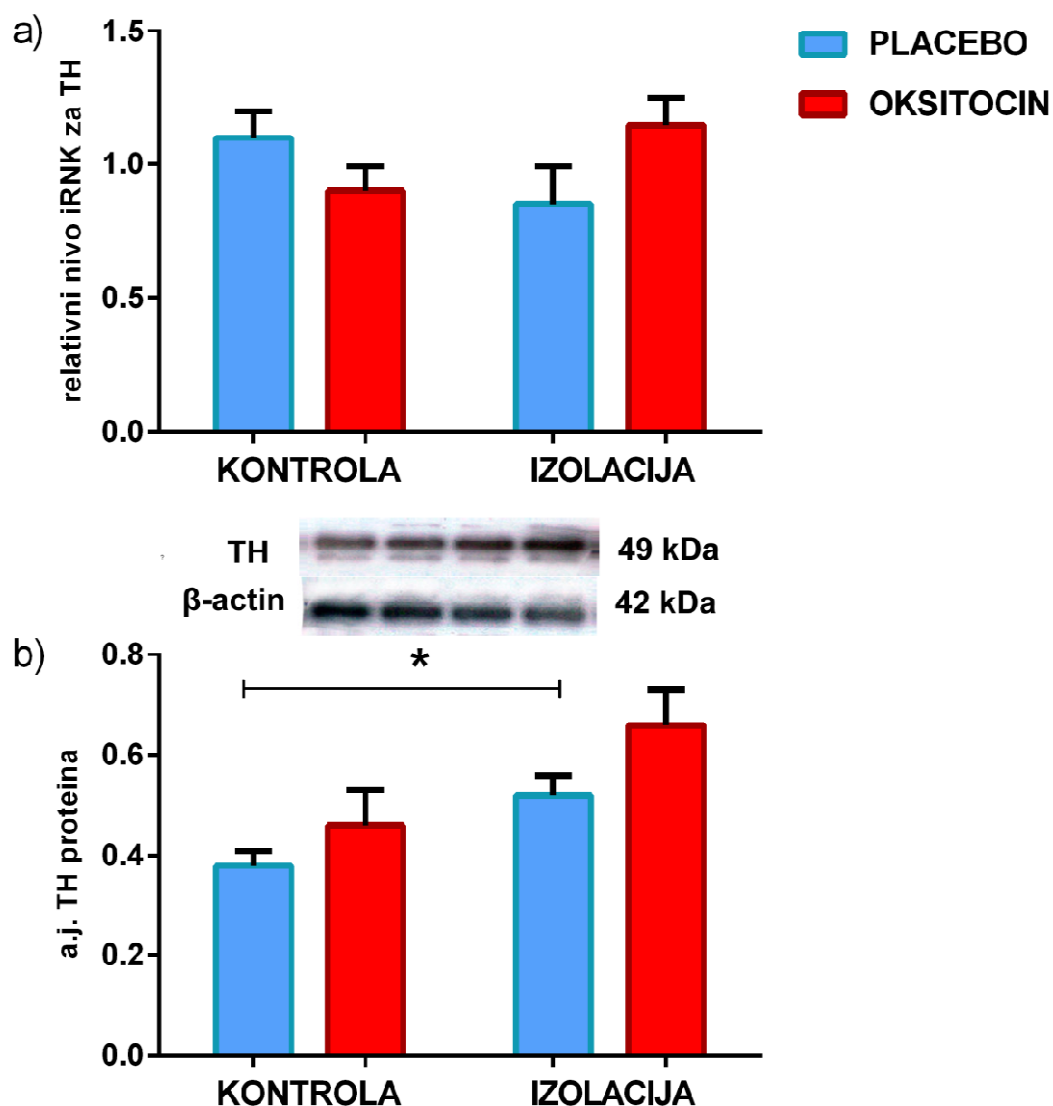


Figura 8. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju: a) ADR i b) NA u srži nadbubrežne zležde kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: # $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin.

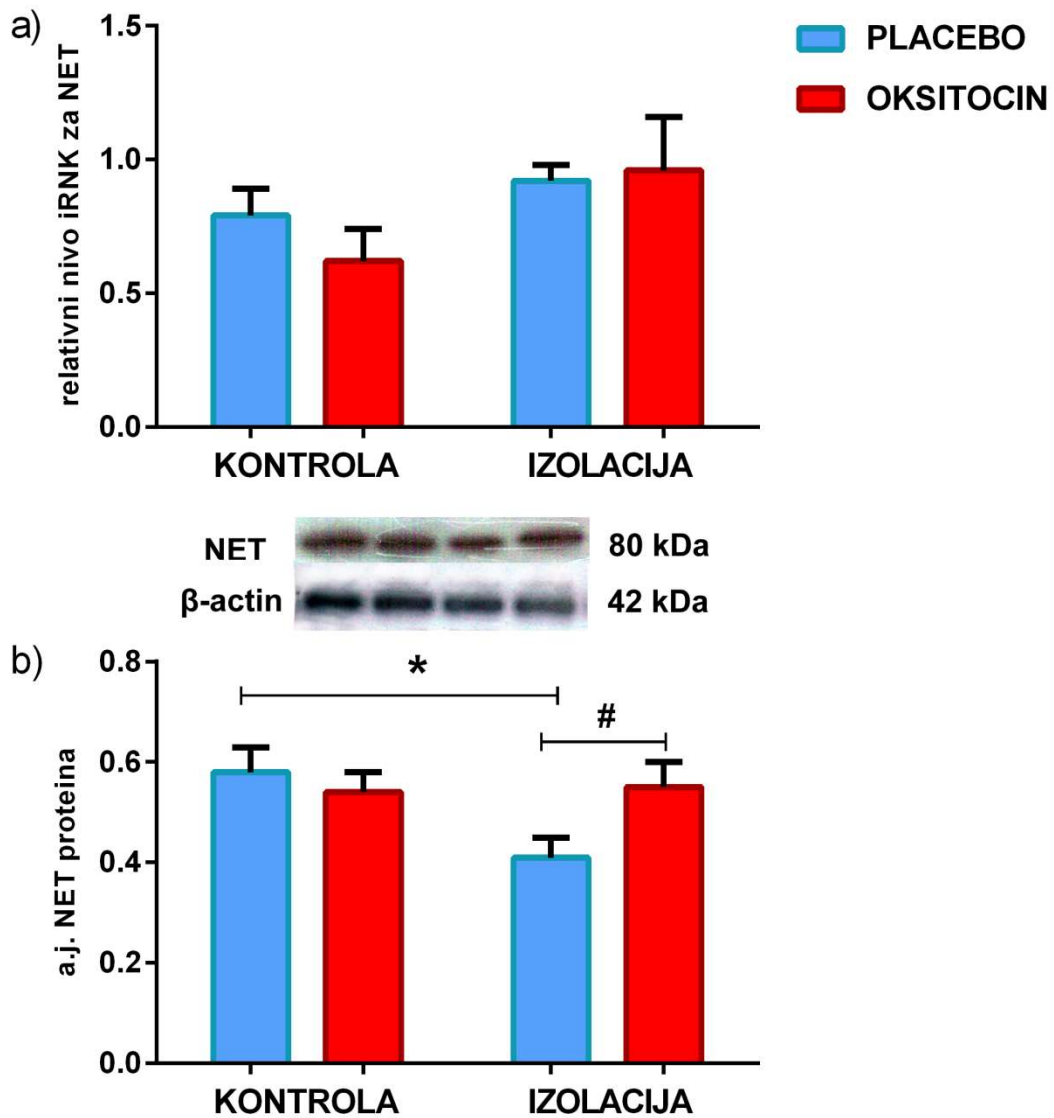
4.5. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu gensku ekspresiju TH, NET i VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije



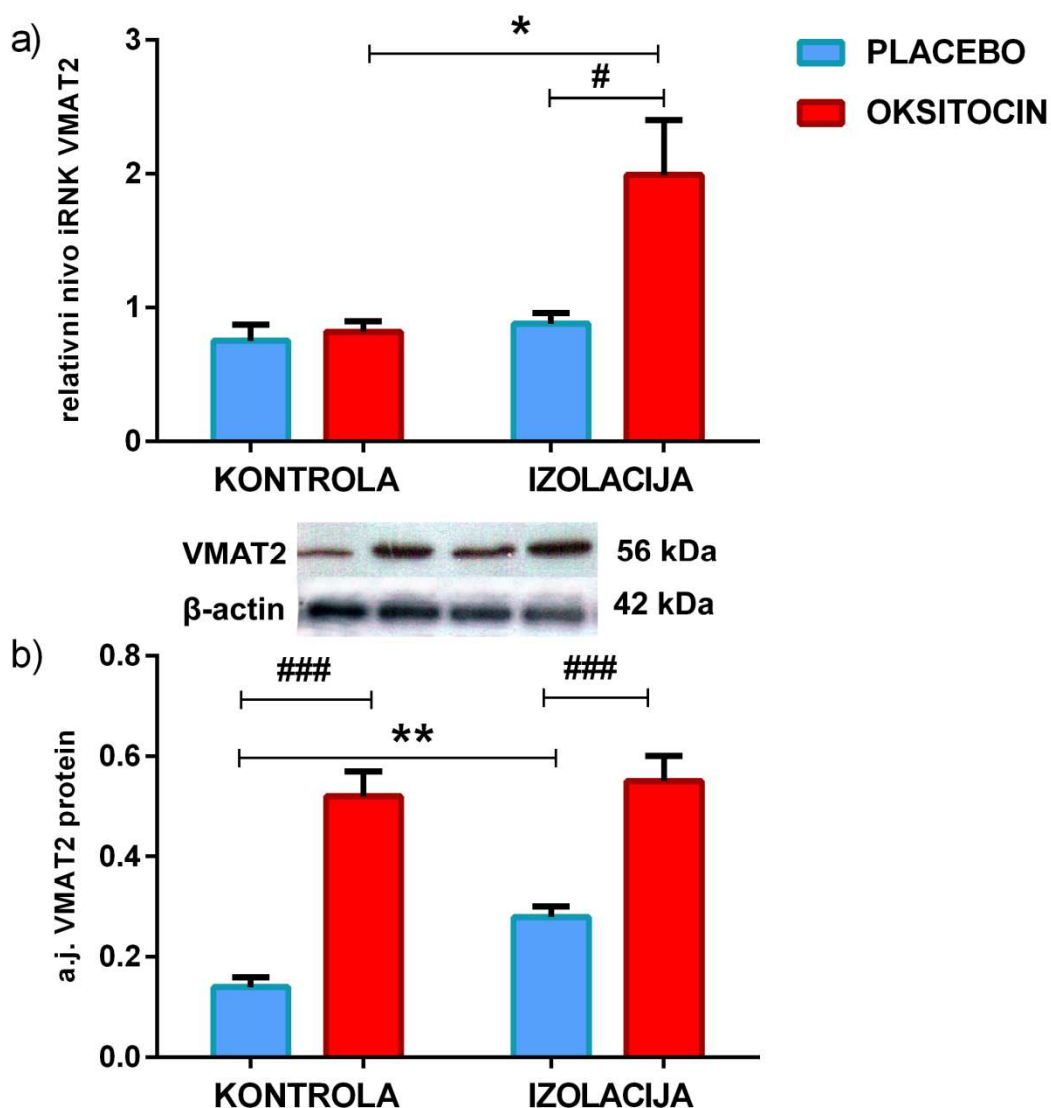
Slika 9. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina TH u srži nadbubrežne žlezde kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija.

Analiza rezultata nivoa iRNK za TH u srži nadbubrežne žlezde, koji su prikazani na Slici 9a. nije pokazala efekat stresa hronične socijalne izolacije kao ni tretmana OXT. Two-way ANOVA analiza nivoa TH proteina je pokazala značajan efekat hronične socijalne izolacije ($F_{(1,23)}=5.85$; $p=.041$) kao i značajnu interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,23)}=14.03$; $p=.0056$). Analiza rezultata između grupa je pokazala statistički značajno povećanje (37%, $p=.044$, Tukey test) u hronično izolovanoj grupi koja je primala placebo u odnosu na nestresiranu kontrolu (Slika 9b.).

Hronična socijalna izolacija kao i hronični tretman OXT nije doveo do promena nivoa iRNK za NET u srži nadbubrežne žlezde (Slika 10a.). Sa druge strane, dvofaktorijalna analiza varijansi rezultata nivoa NET proteina je utvrdila značajnu interakciju hroničnog stresa i tretmana ($F_{(1,23)}=6.09$; $p=.029$). Post-hoc analiza je pokazala statistički značajno smanjenje za 29% u grupi hronično izolovanih životinja koja je primala placebo u odnosu na kontrolu ($p=.038$, Tukey test). Pokazan je i statistički značajan efekat OXT na povećanje nivoa NET proteina za 34% u srži nadbubrežnih žlezda hronično izolovanih pacova ($p=.022$, Tukey test) (Slika 10b.).



Slika 10. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina NET u srži nadbubrežne žlezde kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija; # $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin

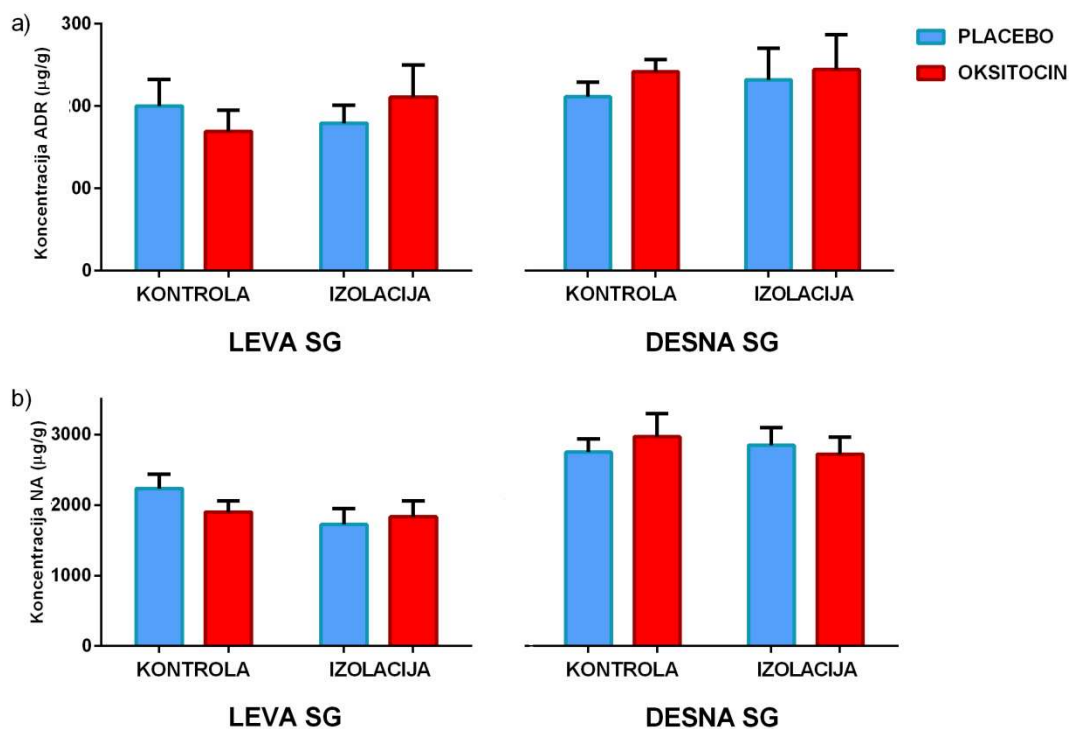


Slika 11. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, kontrola vs. izolacija; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, placebo vs. oksitocin.

Iz rezultata grafički prikazanih na Slici 11. uočava se da su hronična izolacija i tretman OXT ostvarili najveći efekat na nivou ekspresije gena za VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde. Two-way ANOVA analiza nivoa iRNK za VMAT2 je pokazala statistički značajnu interakciju između stresa hronične socijalne izolacije i tretmana OXT ($F_{(1.23)}=5,56$; $p=.037$). Dalja analiza između grupa je pokazala

značajno povećanje nivoa iRNK za VMAT2 u grupi socijalno izolovanih životinja koje su primale OXT u odnosu na kontrolne životinje koje su primale OXT (142%, $p=.032$, Tukey test). Takođe, utvrđeno je i značajno povećanje nivoa iRNK za VMAT2 za 126% u grupi hronično izolovanih životinja koje su primale OXT u odnosu na one koje su primale placebo ($p=.035$, Tukey test) (Slika 11a.). Two-way ANOVA analizom rezultata nivoa VMAT2 proteina u srži nadbubrežne žlezde utvrđen je statistički značajan efekat stresa ($F_{(1,23)}=4,62$; $p=.043$) kao i značajan efekat tretmana OXT u trajanju od 14 dana ($F_{(1,23)}=61,75$; $p=.0000015$). Dalja analiza je utvrdila statistički značajan efekat socijalne izolacije na povećanje nivoa VMAT2 proteina (100%, $p=.0015$, Tukey test) u grupi životinja koje su primale placebo. Tretman OXT je doveo do značajnog povećanja nivoa VMAT2 proteina za 271% kod kontrolne grupe ($p=.0000081$, Tukey test) kao i kod socijalno izolovanih životinja (96%, $p=.00081$, Tukey test) (Slika 11b.).

4.6. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u levoj i desnoj stelatnoj gangliji nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije



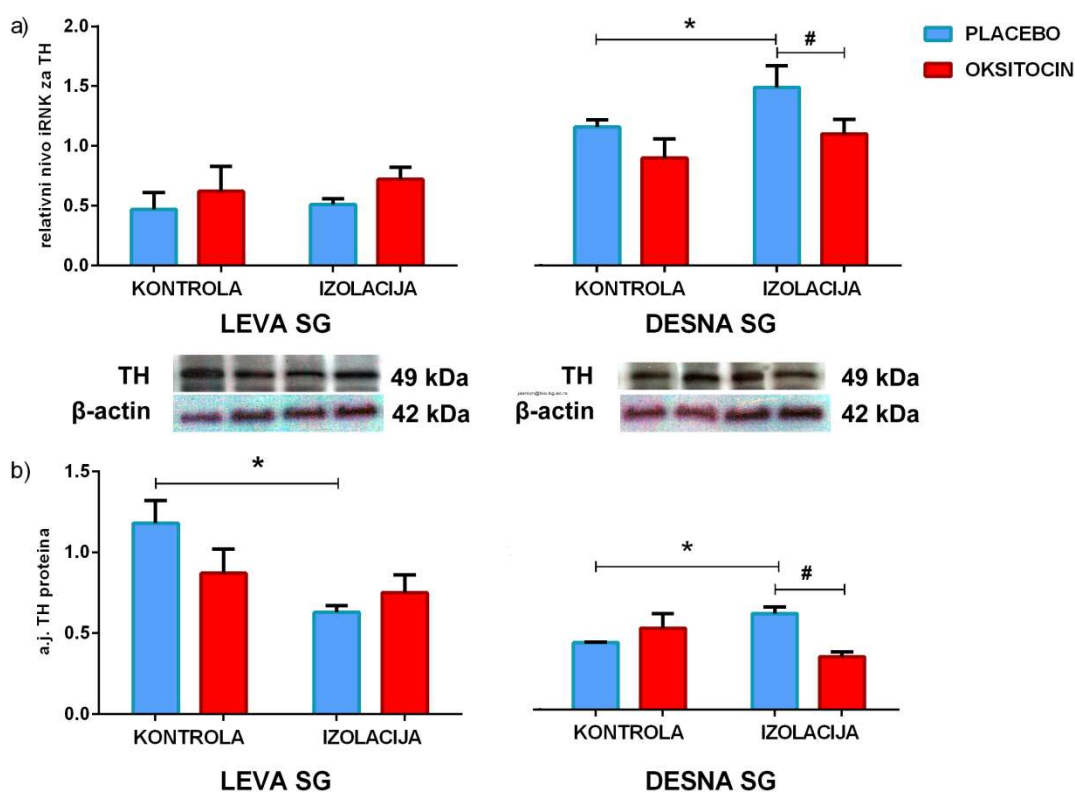
Slika 12. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju: a) ADR i b) NA u levoj i desnoj stelatnoj gangliji kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova.

Rezultati grafički prikazani na Slici 12. pokazuju dejstvo tretmana OXT na koncentraciju kateholamina u levoj i desnoj stelatnoj gangliji kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Three-way ANOVA analiza rezultata koncentracije ADR u stelatnim ganglijama je pokazala značajan efekat strane tela ($F_{(1,47)}=4.67$; $p=.039$). Dalje analize u okviru leve i desne stelatne ganglije nisu pokazale efekat stresa i hroničnog tretmana OXT (Slika 12a.).

Three-way ANOVA analiza rezultata koncentracije NA u levoj i desnoj stelatnoj gangliji pokazala je još veći efekat strane tela ($F_{(1,47)}=25.97$; $p=.0000019$).

Međutim, Two-way ANOVA analiza nije pokazala značajne razlike između ispitivanih grupa u levoj i desnoj stelatnoj gangliji (Slika 12b.).

4.7. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu gensku ekspresiju TH, NET i VMAT2 u levoj i desnoj stelatnoj gangliji nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

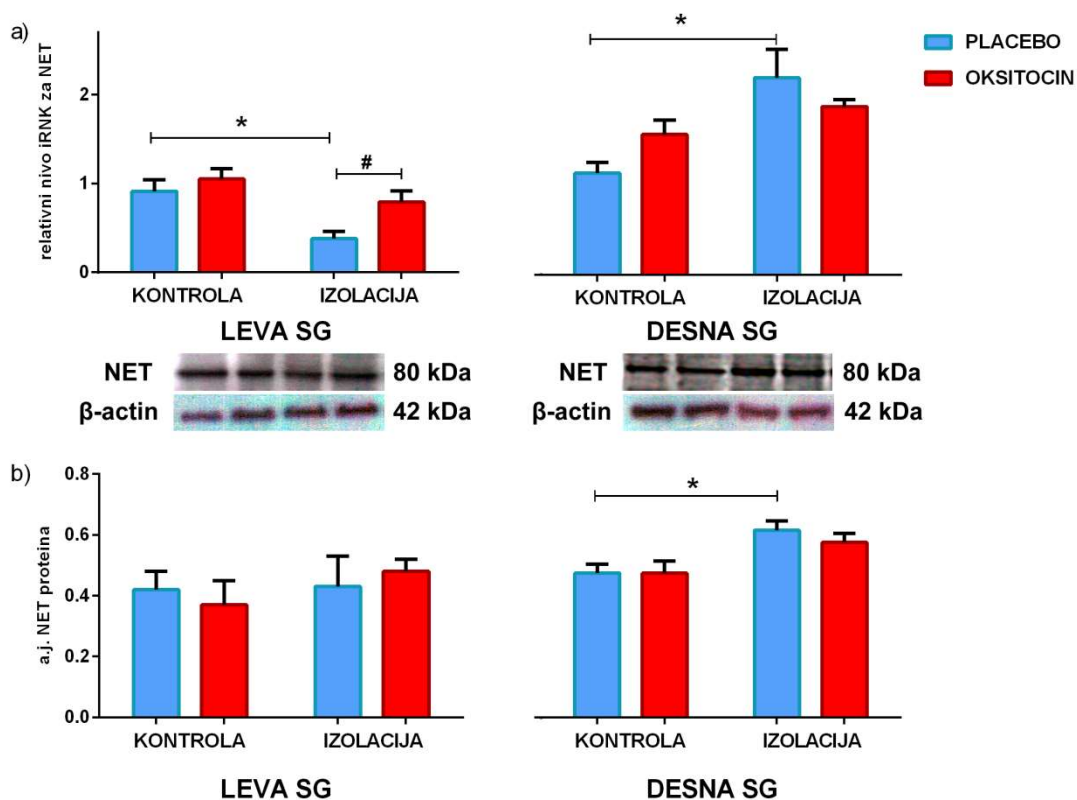


Slika 13. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina TH u levoj i desnoj stelatnoj gangliji kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 7 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija; # $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin.

Dejstvo hroničnog tretmana OXT na nivo iRNK za TH i TH proteina u levoj i desnoj stelatnoj gangliji kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih životinja su prikazani na Slici 13. Rezultati Three-way ANOVA analize nivoa iRNK za TH u stelatnim ganglijama su pokazali značajan efekat faktora stresa ($F_{(1.55)}=9.42$; $p=.0054$) i strane tela ($F_{(1.55)}=54.07$; $p=.0000017$). Takođe, analiza je pokazala i interakciju između stresa i strane tela ($F_{(1.55)}=4.41$; $p=.046$) kao i

interakciju između tretmana i strane tela ($F_{(1.55)}=18.65$; $p=.00025$). Dvofaktorijalna analiza varijansi rezultata nivoa iRNK za TH leve stelatne ganglije nije pokazala ni efekat hronične izolacije ni tretmana OXT. Analiza rezultata nivoa iRNK za TH desne stelatne ganglije je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1.27)}=19,45$; $p=.00084$) i tretmana ($F_{(1.27)}=26.70$; $p=.00023$). Post-hoc analiza je pokazala efekat stresa u vidu uvećanja nivoa iRNK za 28% u grupi hronično izolovanih životinja ($p=.0043$, Tukey test). Tretman OXT je doveo do smanjenja iRNK za TH u grupi hronično izolovanih životinja (26%, $p=.021$, Tukey test) (Slika 13a.).

Trofaktorijalna analiza varijansi rezultata nivoa TH proteina u stelatnim ganglijama je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1.55)}=28.84$; $p=.000066$) i značajnu interakciju između stresa, tretmana i strane tela ($F_{(1.55)}=15,29$; $p=.00041$). Two-way ANOVA analiza rezultata leve stelatne ganglije pokazala je efekat faktora stresa ($F_{(1.27)}=4.82$; $p=.048$) kao i značajnu interakciju između faktora stresa i tretmana ($F_{(1.27)}=9.39$; $p=.0098$). Dalja analiza između grupa je pokazala smanjenje nivoa TH proteina za 46% u grupi socijalno izolovanih životinja u odnosu na kontrolnu grupu ($p=.014$, Tukey test). Rezultati dvofaktorijalne analize varijansi nivoa TH proteina desne stelatne ganglije je pokazala značajnu interakciju između faktora stresa i tretmana ($F_{(1.27)}=13.57$; $p=.017$). Hronična izolacija je dovela do povećanja nivoa TH proteina za 43% ($p=.031$, Tukey test). Tretman OXT je doveo do smanjenja nivoa TH proteina za 45% u grupi stresiranih životinja u desnoj stelatnoj gangliji ($p=.024$, Tukey test). (Slika 13b.).

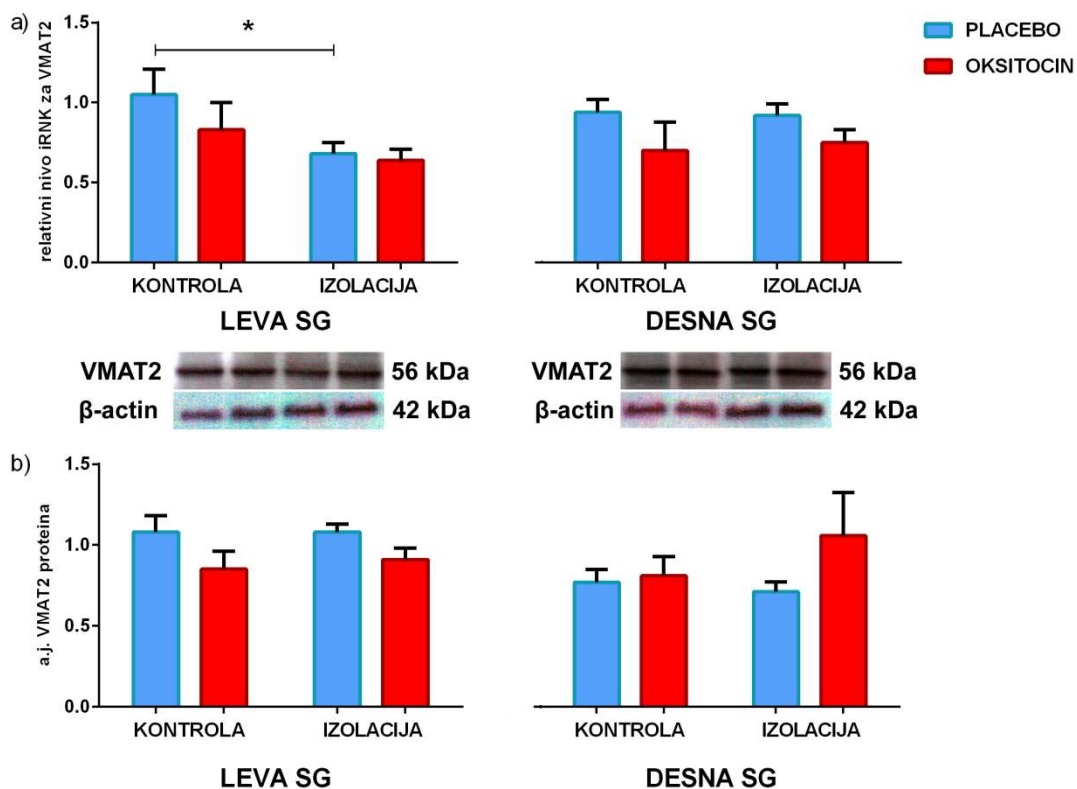


Slika 14. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina NET u levoj i desnoj stelatnoj gangliji kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 7 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija; # $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin.

Trofaktorijalna analiza varijansi rezultata prikazanih na Slici 14a., nivoa iRNK za NET u stelatnim ganglijama, pokazala je značajan efekat strane tela ($F_{(1,55)}=69.66$; $p=6,6 \times 10^{-7}$), značajnu interakciju stresa i strane tela ($F_{(1,55)}=24.19$; $p=.000095$) kao i značajnu interakciju između sva tri faktora (stres, tretman i strana tela) ($F_{(1,55)}=5.55$; $p=.039$). Two-way ANOVA analiza rezultata iRNK za NET u levoj stelatnoj gangliji je otkrila značajnost faktora stresa ($F_{(1,27)}=12.37$; $p=.0065$) i faktora tretmana ($F_{(1,27)}=6.13$; $p=.035$). Nivoi iRNK za NET u levoj stelatnoj gangliji su smanjeni za 58% kao posledica socijalne izolacije ($p=.014$, Tukey test). Tretman OXT u grupi hronično izolovanih životinja doveo je do povećanja nivoa iRNK za NET za 107% ($p=.030$, Tukey test). Dvofaktorijalna analiza varijansi rezultata nivoa iRNK za NET u desnoj stelatnoj gangliji je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,27)}=13.75$; $p=.0041$). Rezultati prikazani na Slici 14a. pokazuju da je

dugotrajni stres doveo do povećanja nivoa iRNK za NET u desnoj stelatnoj gangliji (94%, $p=0.0097$, Tukey test).

Three-way ANOVA je pokazala statistički značajan efekat stresa ($F_{(1.55)}=14.85$; $p=0.013$) na količinu NET proteina. Sa druge strane, Two-way ANOVA analiza je utvrdila značajan efekat faktora stresa u desnoj stelatnoj gangliji ($F_{(1.55)}=8.70$; $p=0.037$). Efekat stresa hronične izolacije se ogleda u statistički značajnom povećanju nivoa NET proteina za 30% u odnosu kontrolu ($p=0.041$, Tukey test) (Slika 14b.).



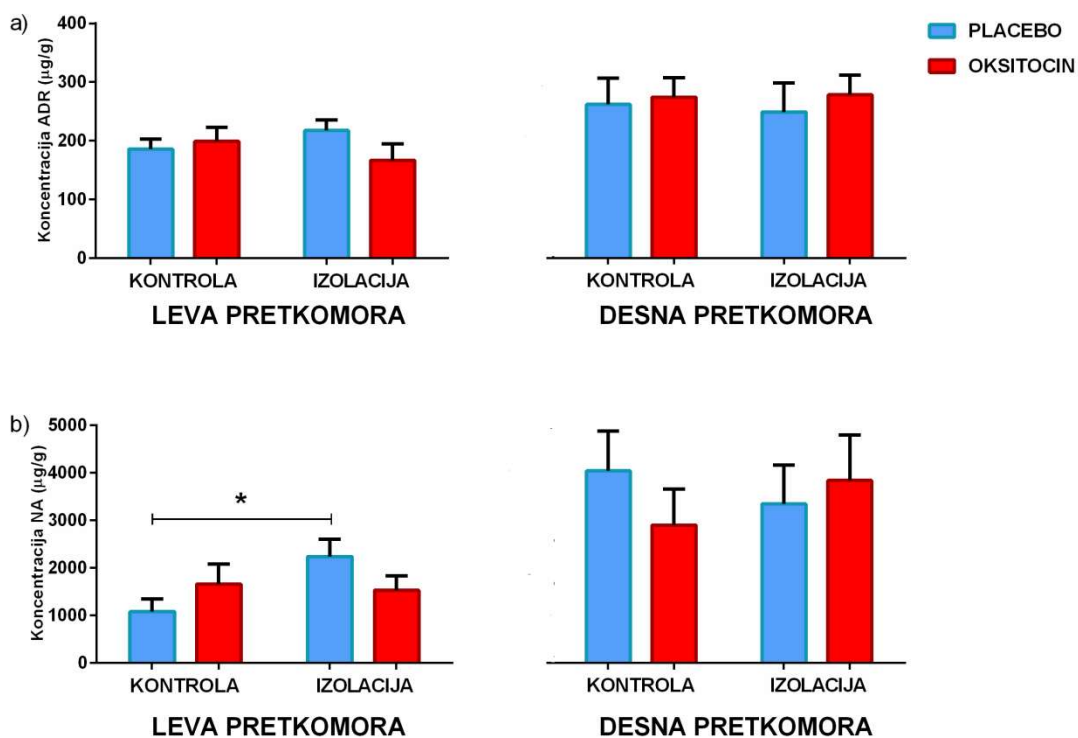
Slika 15. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina VMAT2 u levoj i desnoj stelatnoj gangliji kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 7 pacova. Statistička značajnost: * $p<0.05$, kontrola vs. izolacija.

Rezultati nivoa iRNK za VMAT2 i VMAT2 proteina kao posledica dejstva hroničnog tretmana OXT u levoj i desnoj stelatnoj gangliji kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih životinja su prikazani na Slici 15. Kada govorimo o

rezultatima nivoa iRNK za VMAT2, analizom je jedino primećeno značajno smanjenje nivoa vrednosti iRNK u levoj stelatnoj gangliji kao posledica hronične izolacije između grupa koje su primale placebo (35%, $p=.047$, Tukey test). U desnoj stelatnoj gangliji nije bilo značajnih promena nivoa iRNK za VMAT2 kao posledica hroničnog stresa i/ili tretmana OXT (Slika 15a.).

Three-way ANOVA analiza promena nivoa VMAT2 proteina u stelatnim ganglijama nije pokazala značajan efekat ni hroničnog stresa ni tretmana OXT, kao ni strane tela niti značajnu interakciju među ovim faktorima (Slika 15b.).

4.8. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije



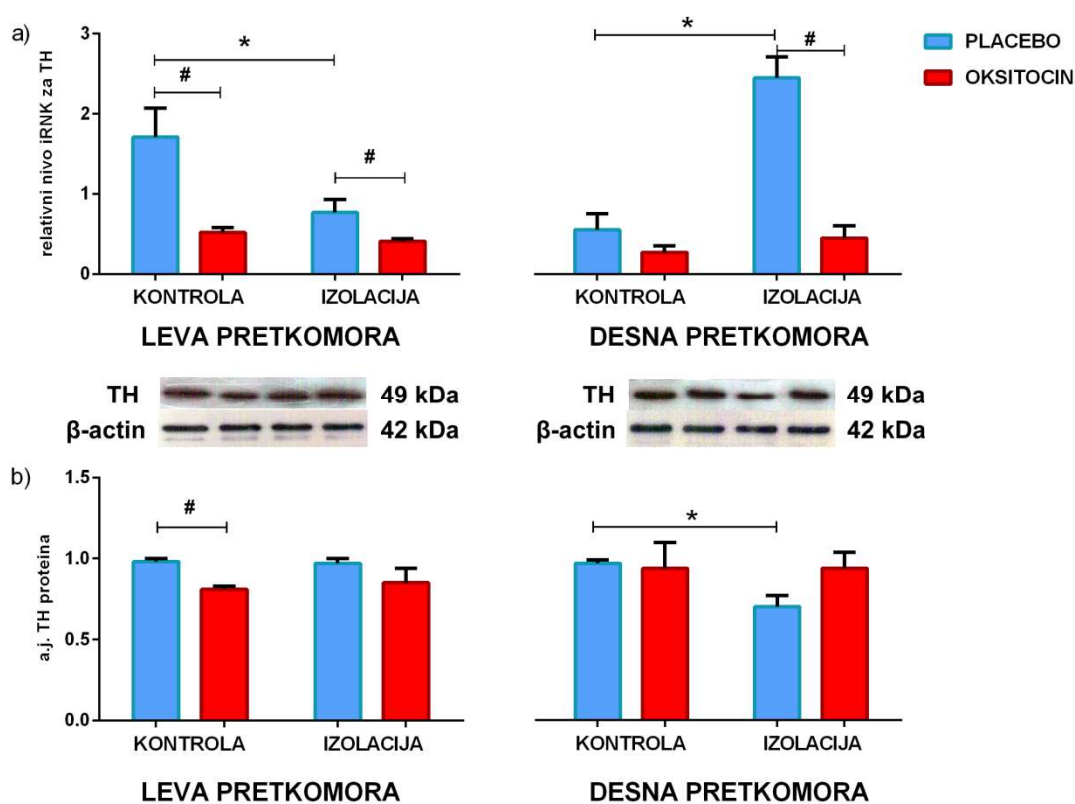
Slika 16. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju: a) ADR i b) NA u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija.

Dejstvo hroničnog tretmana OXT na koncentraciju ADR u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih životinja je prikazano na Slici 16a. Trofaktorijalna analiza varijansi je pokazala značajan efekat regionalne raspodele ($F_{(1,43)}=7.96$; $p=.0094$) pokazujući da su količine ADR veće u desnoj pretkomori. Two-way ANOVA rezultata u levoj srčanoj pretkomori nije pokazala značajan efekat stresa hronične izolacije i tretmana OXT. Značajnosti nije bilo ni u desnoj srčanoj pretkomori.

Analiza rezultata koncentracije NA u levoj i desnoj srčanoj pretkomori, prikazana je na Slici 16b. Three-way Anova je pokazala značajan efekat regionalne

distribucije ($F_{(1,47)}=6.86$; $p=.013$). Dvofaktorijalna analiza varijansi rezultata leve srčane pretkomore je pokazala značajnu interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,23)}=4.97$; $p=.042$). Stres hronične socijalne izolacije doveo je do statistički značajnog povećanja koncentracija NA u levoj pretkomori (106%, $p=.021$, Tukey test).

4.9. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za TH, NET i VMAT2 u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

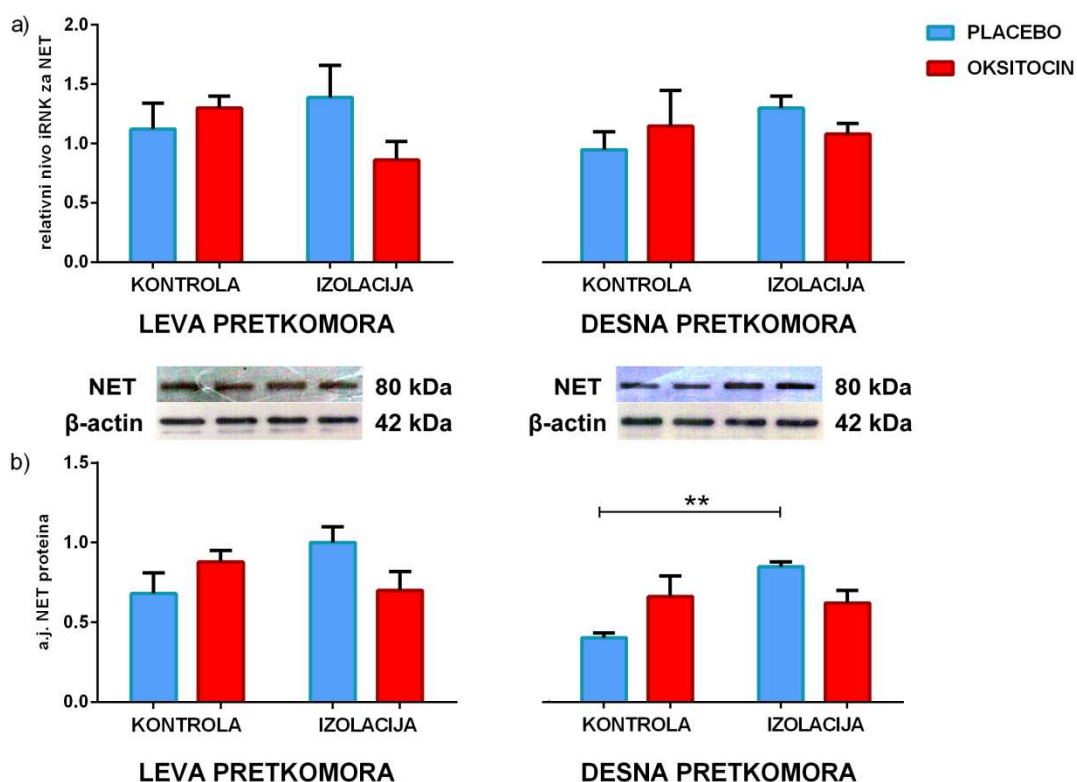


Slika 17. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina TH u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p<0.05$, kontrola vs. izolacija; # $p<0.05$, placebo vs. oksitocin.

Three-way ANOVA analiza rezultata iRNK za TH u levoj i desnoj pretkomori, predstavljenih na Slici 17a., pokazuje značajan efekat tretmana ($F_{(1,47)}=40.19$; $p=2.8 \times 10^{-6}$) i značajnu interakciju stresa i dela srca ($F_{(1,47)}=36.12$; $p=5.7 \times 10^{-6}$) kao i interakciju stresa, tretmana i regiona srca ($F_{(1,47)}=24.85$;

$p=3,4 \times 10^{-5}$). Dalja analiza rezultata iRNK za TH u levoj srčanoj pretkomori je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,23)}= 6.75$; $p=.022$) i tretmana ($F_{(1,23)}= 6.75$; $p=.022$). Post-hoc analiza je pokazala statistički značajano smanjenje iRNK za TH za 55% u grupi hronično izolovanih životinja u odnosu na kontrolne ($p=.036$, Tukey test). Tretman OXT doveo je do statistički značajnog smanjenja nivoa iRNK za TH u levoj pretkomori kontrolne grupe (70%, $p=.017$, Tukey test) i u grupi socijalno izolovanih životinja (45%, $p=.047$, Tukey test). Sa druge strane, Two-way ANOVA analiza rezultata nivoa iRNK za TH u desnoj pretkomori pokazala je značajan efekat stresa ($F_{(1,23)}= 30.19$; $p=.00035$) i tretmana ($F_{(1,23)}= 26.16$; $p=.00063$) kao i interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,23)}= 6.75$; $p=.022$). Stres hronične socijalne izolacije je pokazao značajan efekat u vidu povećanja nivoa iRNK za TH za 345% ($p=.014$, Tukey test). Tretman OXT je pokazao efekat u grupi socijalno izolovanih životinja u vidu smanjenja nivoa iRNK za TH (81%, $p=.0041$, Tukey test).

Dejstvo hroničnog tretmana OXT na nivo TH proteina u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih životinja je prikazano na Slici 17b. Trofaktorijska analiza varijansi rezultata je pokazala statistički značajan efekat stresa ($F_{(1,47)}= 4.86$; $p=.037$) i značajnu interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,47)}= 7.42$; $p=.018$), stresa i dela srca ($F_{(1,47)}= 6.07$; $p=.021$) i tretmana i dela srca ($F_{(1,47)}= 17.08$; $p=3.78 \times 10^{-4}$). Two-way ANOVA analiza rezultata nivoa TH proteina u levoj pretkomori je pokazala značajan efekat tretmana ($F_{(1,23)}= 6,27$; $p=.039$). Utvrđen je značajan efekat tretmana OXT u vidu smanjenja nivoa TH proteina u kontrolnoj grupi (18%, $p=.043$, Tukey test). U desnoj pretkomori je pokazano statistički značajno smanjenje nivoa TH proteina u grupi socijalno izolovanih životinja u odnosu na kontrolnu grupu (28%, $p=.030$, Tukey test).

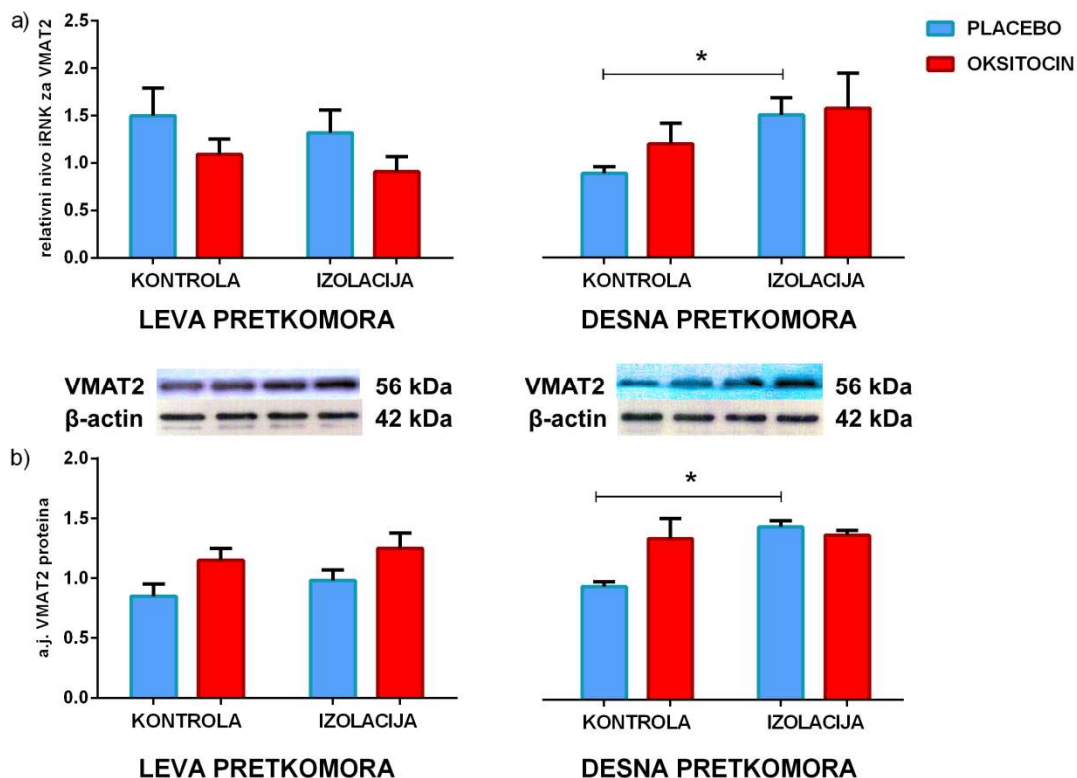


Slika 18. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina NET u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: ** $p < 0.01$, kontrola vs. izolacija.

Rezultati prikazani na Slici 18. pokazuju dejstvo tretmana OXT na ekspresiju gena za NET u levoj i desnoj srčanoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Analiza rezultata iRNK za NET u levoj i desnoj srčanoj pretkomori nije pokazala statistički značajne razlike između grupa (Slika 18a.)

Analiza rezultata nivoa NET proteina u levoj i desnoj pretkomori je pokazala značajan efekat dela srca ($F_{(1,47)} = 8.84$; $p = 0.017$) i značajnu interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,47)} = 25.39$; $p = 0.001$). Dvofaktorijalna analiza varijansi u desnoj srčanoj pretkomori je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,23)} = 17.43$; $p = 0.0012$) i interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 39.22$; $p = 4.2 \times 10^{-5}$). Dalja analiza je pokazala statistički značajan efekat stresa u desnoj pretkomori u grupi koja je primala

placebo u vidu povećanja nivoa NET proteina za 110% ($p=.0087$, Tukey test) (Slika 18b.).



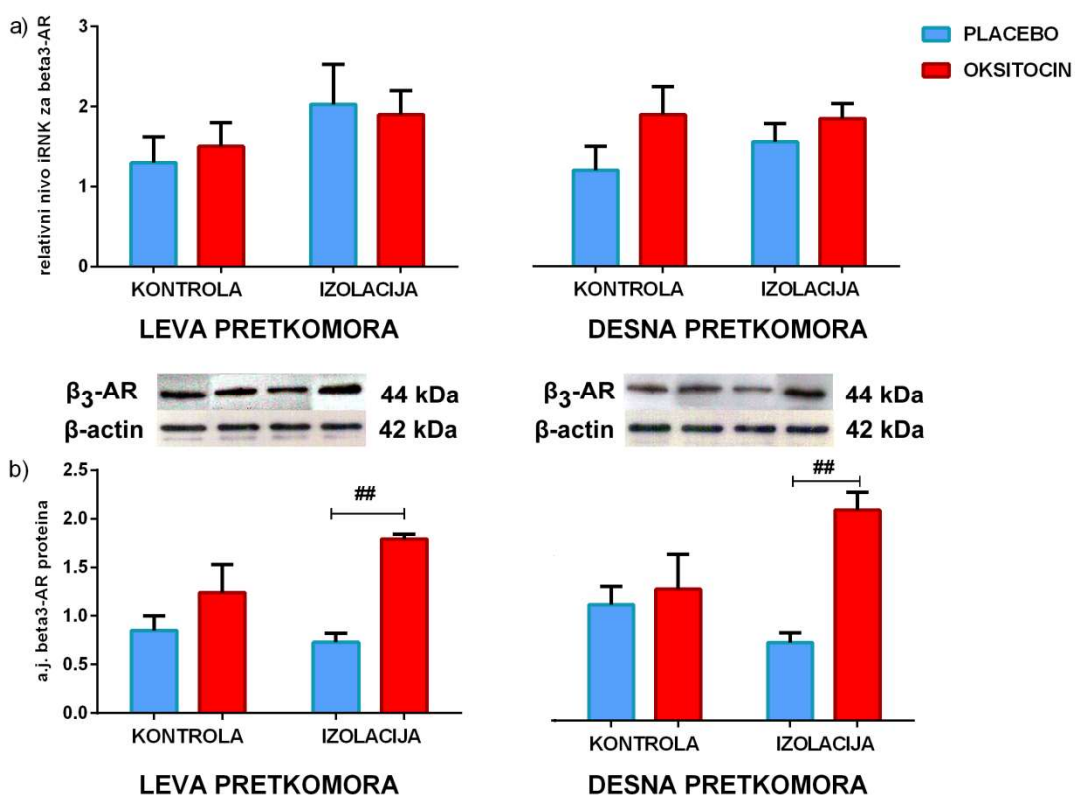
Slika 19. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina VMAT2 u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p<0.05$, kontrola vs. izolacija.

Na Slici 19a. predstavljeni su rezultati nivoa iRNK za VMAT2 u levoj i desnoj pretkomori. Three-way ANOVA analiza rezultata je pokazala značajnu interakciju stresa i dela srca ($F_{(1,47)}= 4.66$; $p=.042$). Dalja analiza je pokazala statistički značajan efekat stresa hronične socijalne izolacije u vidu povećanja nivoa iRNK za VMAT2 za 70% u desnoj pretkomori ($p=.028$, Tukey test). Nisu primećene statistički značajne razlike između grupa u levoj pretkomori.

Analiza rezultata nivoa VMAT2 proteina u levoj i desnoj pretkomori grafički prikazanih na Slici 19b. pokazuje značajan efekat stresa ($F_{(1,47)}= 8.41$; $p=.0019$), efekat tretmana ($F_{(1,47)}= 12.65$; $p=.0074$) i efekta dela srca ($F_{(1,47)}= 14.79$; $p=.0049$). Two-way ANOVA analiza rezultata nivoa proteina u levoj pretkomori je

pokazao značajan efekat tretmana ($F_{(1,23)} = 16.06$; $p = .016$). U desnoj pretkomori je pokazan značajan efekat stresa ($F_{(1,23)} = 8.19$; $p = .045$). Post-hoc analiza razlika između grupa je pokazala statistički značajno uvećanje nivoa proteina VMAT2 u desnoj pretkomori u grupi socijalno izolovanih životinja za 70% u odnosu na kontrolnu grupu ($p = .012$, Tukey test).

4.10. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za β_3 -AR i M_2 MR u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

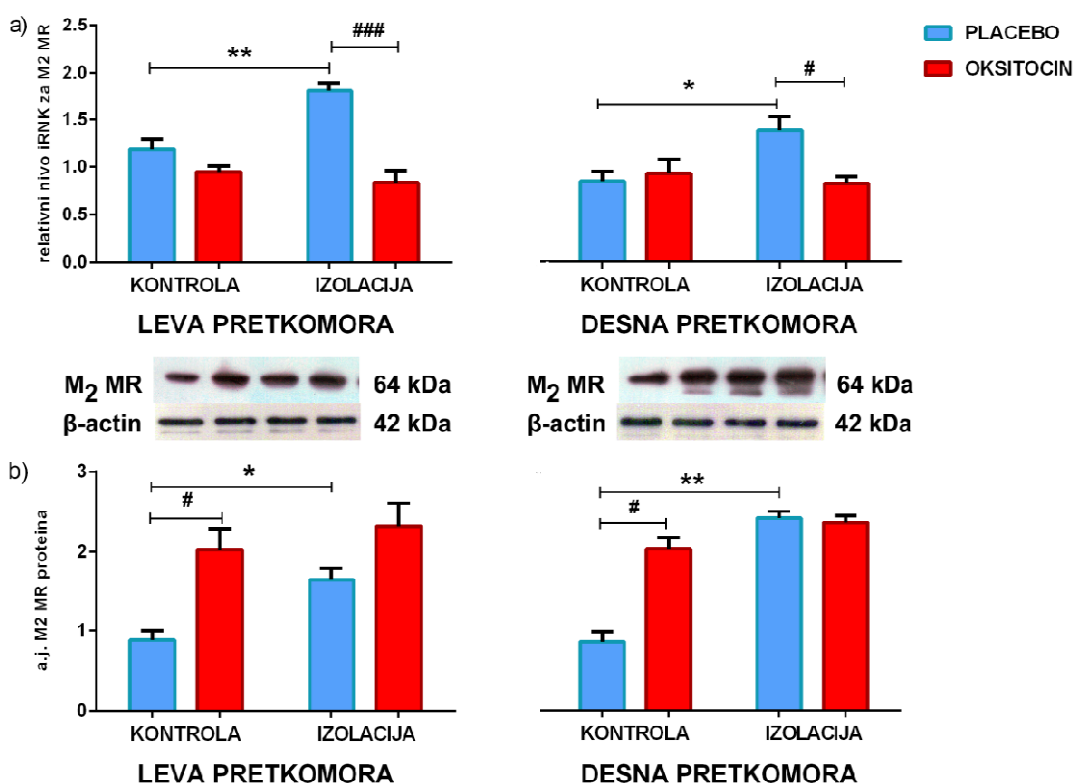


Slika 20. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina β_3 -AR u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: ## $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin.

Na Slici 20. grafički je prikazan efekat stresa i tretmana OXT na nivo ekspresije gena za β_3 -AR u levoj i desnoj pretkomori. Analiza rezultata nivoa iRNK

za β_3 -AR u levoj i desnoj srčanoj pretkomori nije pokazala značajan efekat nijednog ispitivanog faktora kao ni značajne razlike između ispitivanih grupa (Slika 20a.).

Three-way ANOVA analiza rezultata nivoa β_3 -AR proteina u levoj i desnoj pretkomori, predstavljenih na Slici 20b., pokazuje značajan efekat tretmana ($F_{(1,47)} = 45.66$; $p = .00014$) kao i značajnu interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,47)} = 21.46$; $p = .0017$). Two-way ANOVA analiza pokazuje značajan efekat tretmana u levoj ($F_{(1,23)} = 31.12$; $p = .0005$) i u desnoj pretkomori ($F_{(1,23)} = 19.79$; $p = .011$) kao i interakciju između stresa i tretmana u levoj ($F_{(1,23)} = 10.66$; $p = .031$) i u desnoj pretkomori ($F_{(1,23)} = 11.62$; $p = .027$). Dalja analiza je pokazala značajano povećanje nivoa β_3 -AR proteina u levoj pretkomori za 145% ($p = .004$, Tukey test) i u desnoj pretkomori za 195% ($p = .0095$, Tukey test) u grupi socijalno izolovanih životinja koje su primale OXT u odnosu na životinje koje su primale placebo.



Slika 21. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina M₂ MR u levoj i desnoj pretkomori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička

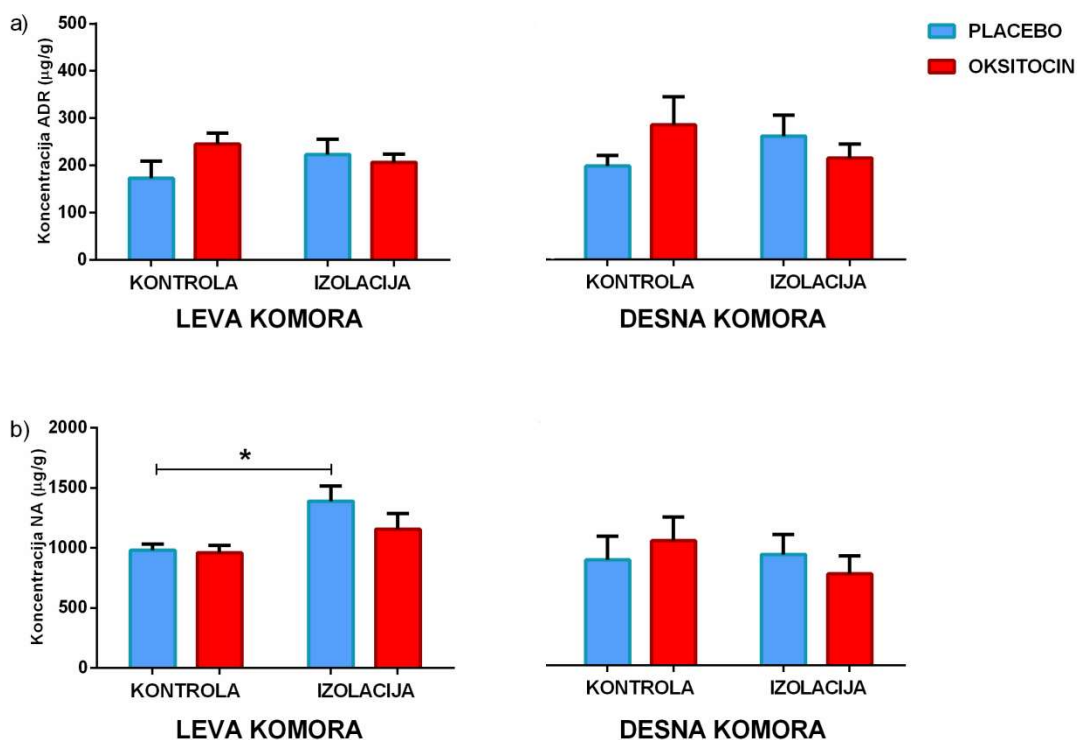
značajnost: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, kontrola vs. izolacija; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ placebo vs. oksitocin.

Analiza rezultata nivoa iRNK za M₂ MR u pretkomorama, predstavljenih na Slici 21a., je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,47)} = 11.15$; $p = .0011$) i tretmana ($F_{(1,47)} = 54.16$; $p = 9.85 \times 10^{-5}$) i interakciju između ova dva faktora ($F_{(1,47)} = 21.17$; $p = .00011$). Two-way ANOVA analiza rezultata u levoj pretkomori je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,23)} = 7.86$; $p = .013$) i tretmana ($F_{(1,23)} = 44.72$; $p = 7.26 \times 10^{-6}$) i interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 9.74$; $p = .00097$). Analiza u desnoj pretkomori je pokazala efekat stresa ($F_{(1,23)} = 6.04$; $p = .025$) i tretmana ($F_{(1,23)} = 35.65$; $p = 5.25 \times 10^{-5}$) i interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 10.15$; $p = .00037$). Dalja post-hoc analiza rezultata u levoj i desnoj pretkomori je pokazala značajan efekat stresa u vidu povećanja za 52% u levoj ($p = .0017$, Tukey test) i za 64% u desnoj ($p = .026$, Tukey test) u odnosu na kontrolnu grupu. Tretman OXT je pokazao značajan efekat u grupi socijalno izolovanih životinja u vidu smanjenja nivoa iRNK M₂ MR za 54 % u levoj pretkomori ($p = .00012$, Tukey test) i smanjenja za 40% u desnoj pretkomori ($p = .017$, Tukey test).

Trofaktorijalna analiza varijansi rezultata nivoa proteina M₂ MR u pretkomorama je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,47)} = 40.05$; $p = .00023$), tretmana ($F_{(1,47)} = 82.50$; $p = 1.73 \times 10^{-5}$) i dela srca ($F_{(1,47)} = 15.42$; $p = .0044$) kao i značajnu interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,47)} = 11.04$; $p = .010$). Analiza rezultata leve pretkomore je pokazala značajan efekat tretmana ($F_{(1,23)} = 17.89$; $p = .013$) i značajnu interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 8.70$; $p = .041$). Dalja analiza je pokazala statistički značajan efekat stresa socijalne izolacije u grupi koja je primala placebo u vidu povećanja nivoa proteina M₂ MR u levoj pretkomori (85%, $p = .048$, Tukey test). Tretman OXT je doveo do značajnog povećanja nivoa proteina M₂ MR u levoj pretkomori u kontrolnoj grupi (128%, $p = .046$, Tukey test). Two-way ANOVA analiza rezultata desne pretkomore je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,23)} = 67.89$; $p = .0012$), tretmana ($F_{(1,23)} = 93.13$; $p = .00038$) i značajnu interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 32.74$; $p = .0037$). Post-hoc analiza je pokazala statistički značajno povećanje nivoa proteina M₂ MR za 179% u desnoj pretkomori kod socijalno izolovanih životinja koje su primale placebo u odnosu na kontrolu.

Tretman OXT je i u desnoj pretkomori doveo do značajnog povećanja nivoa proteina M₂ MR u kontrolnoj grupi (134%, p=.011, Tukey test) (Slika 21b).

4.11. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju ADR i NA u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije



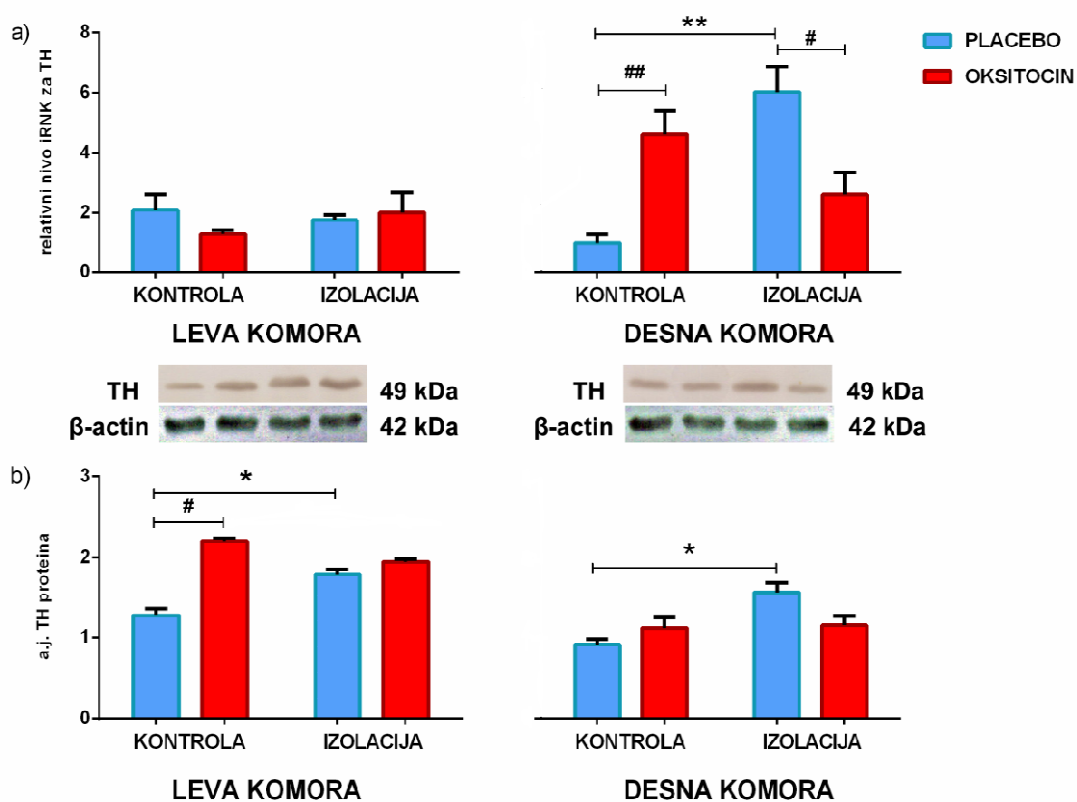
Slika 22. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju: a) ADR i b) NA u levoj i desnoj komori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * p<0.05, kontrola vs. izolacija.

Na Slici 22. su prikazani rezultati nivoa kateholamina u levoj i desnoj komori kod kontrolnih i izolovanih pacova tretiranih placebo i OXT. Rezultati koncentracije ADR u levoj i desnoj komori nisu pokazali značajan efekat nijednog posmatranog faktora (Slika 22a.).

Two-way ANOVA analiza rezultata količine NA u levoj srčanoj komori je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,23)}=7.24$; p=.018). Naknadna analiza je

pokazala statistički značajno povećanje za 41% u grupi socijalno izolovanih životinja koje su primale placebo u odnosu na kontrolu ($p=0.048$, Tukey test). U desnoj komori nisu uočene značajne razlike između grupa u količini NA u tkivu (Slika 22b.).

4.12. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na relativnu ekspresiju gena za TH, NET i VMAT2 u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

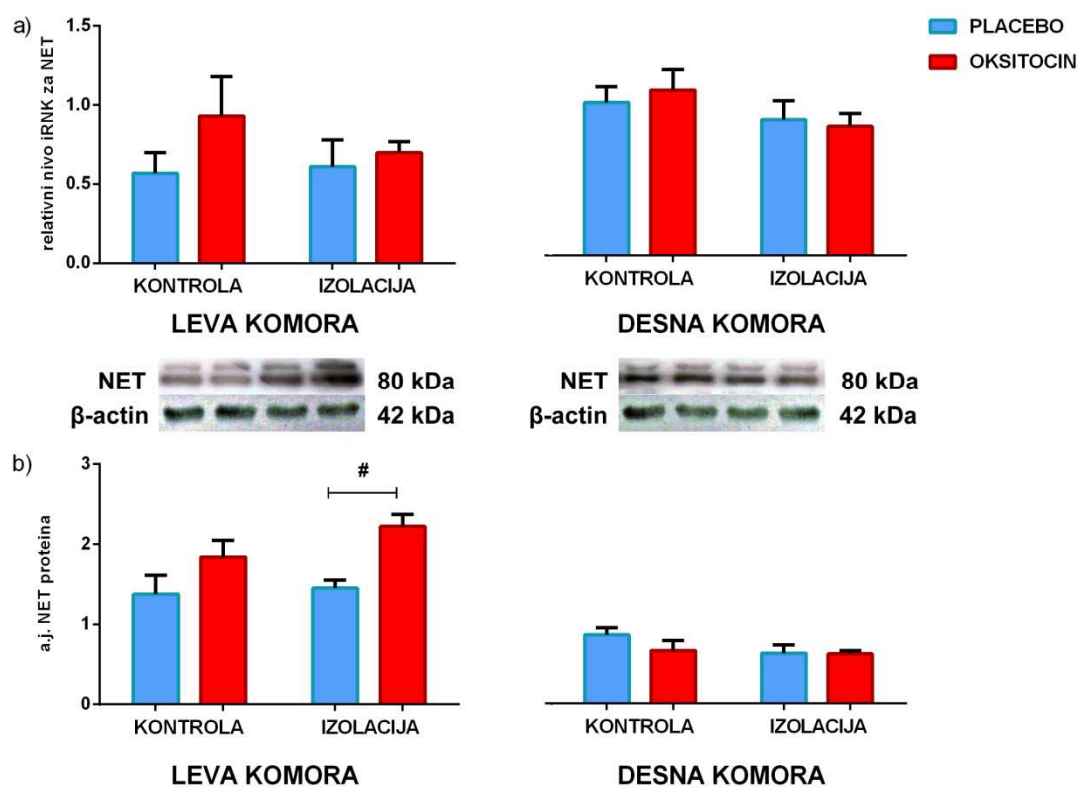


Slika 23. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina TH u levoj i desnoj komori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ kontrola vs. izolacija; # $p<0.05$, ## $p<0.05$ placebo vs. oksitocin.

Grafički prikaz rezultata relativne ekspresije gena za TH enzima u levoj i desnoj komori prikazan je na Slici 23. Three-way ANOVA rezultata nivoa iRNK za TH u komorama pokazuje značajan efekat strane srca ($F_{(1,47)}= 13,60$; $p=0.0011$) i značajnu interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,47)}= 9,78$; $p=0.0044$) i između

stresa, tretmana i strane srca ($F_{(1,47)} = 17.79$; $p = .00028$). Dalja analize rezultata nivoa iRNK za TH u levoj komori nije pokazala značajan efekat stresa i tretmana. Two-way ANOVA analiza rezultata nivoa iRNK za TH u desnoj komori je pokazala značajnu interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 16,60$; $p = .0013$). Naknadna analiza rezultata u desnoj komori je pokazala statistički značajan efekat stresa u grupi koja je primala placebo u vidu povećanja nivoa iRNK za TH za 510% ($p = .0016$, Tukey test). Tretman OXT je pokazao efekat u vidu statistički značajnog povećanja iRNK za TH u kontrolnoj grupi (220%, $p = .0053$, Tukey test). Tretman OXT je doveo i do statistički značajnog smanjenja za 57% nivoa iRNK za TH u grupi socijalno izolovanih životinja ($p = .015$, Tukey test) (Slika 23a.).

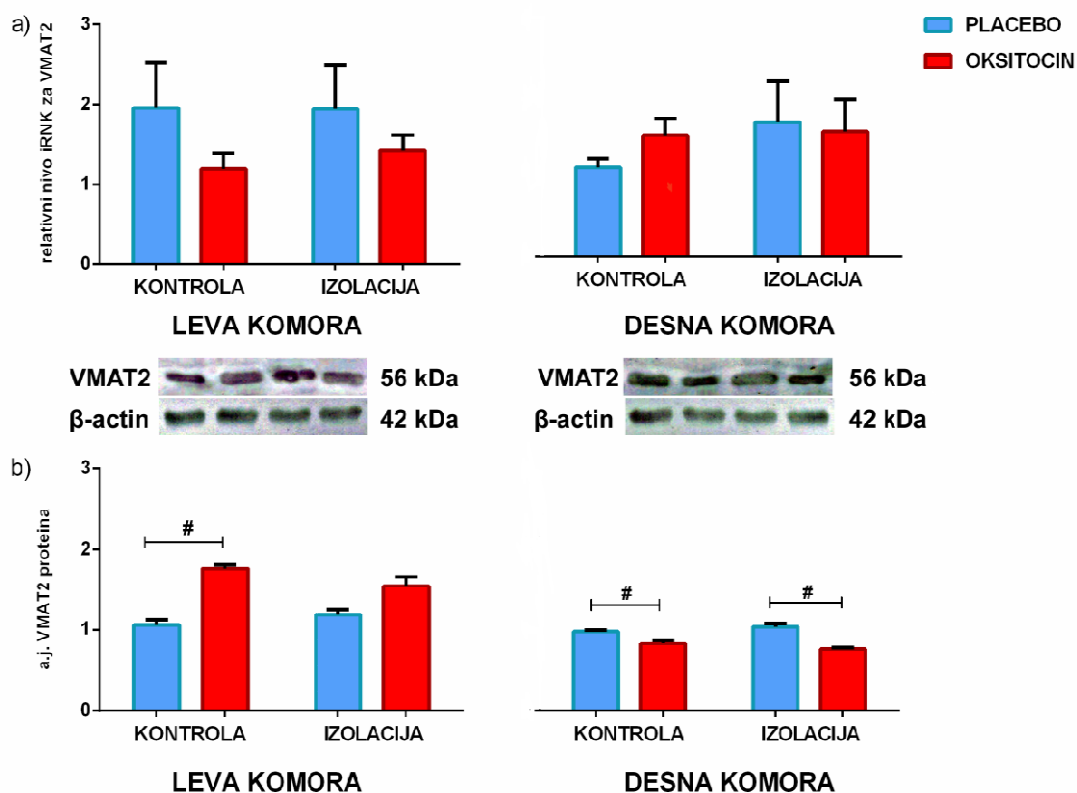
Analiza rezultata nivoa TH proteina u levoj i desnoj srčanoj komori, predstavljenih na Slici 23b., je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,47)} = 7.64$; $p = .024$), tretmana ($F_{(1,47)} = 8.11$; $p = .021$) i strane ($F_{(1,47)} = 82.78$; $p = 1.17 \times 10^{-5}$) kao i značajnu interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,47)} = 24.09$; $p = .00012$) i tretmana i strane srca ($F_{(1,47)} = 28.30$; $p = .00071$). Dvofaktorijalna analiza rezultata u levoj komori pokazala je značajan efekat tretmana ($F_{(1,23)} = 82.23$; $p = .00082$) i interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 40.31$; $p = .0032$). Post-hoc analiza rezultata leve komore je pokazala statistički značajan efekat stresa u grupi koja je primala placebo u vidu povećanja nivoa TH proteina za 40% ($p = .039$, Tukey test). Tretman OXT je doveo do značajnog povećanja nivoa vrednosti TH proteina u kontrolnoj grupi (72%, $p = .011$, Tukey test). Analiza rezultata u desnoj komori je pokazala značajnu interakciju između stresa i tretmana ($F_{(1,27)} = 11.23$; $p = .029$). Socijalna izolacija je dovela do statistički značajnog povećanja nivoa TH proteina za 73% u grupi koja je primala placebo ($p = .042$, Tukey test).



Slika 24. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina NET u levoj i desnoj komori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: # $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin.

Rezultati nivoa iRNK za NET u levoj i desnoj srčanoj komori su predstavljeni na Slici 24a. Analiza rezultata u levoj i desnoj komori nije pokazala efekat stresa niti tretmana OXT.

Three-way ANOVA analiza rezultata vrednosti NET proteina u komorama je pokazala značajan efekat tretmana ($F_{(1,47)} = 6.16$; $p = .037$) i strane ($F_{(1,47)} = 94.65$; $p = 1.04 \times 10^{-5}$) kao i značajnu interakciju između tretmana i strane ($F_{(1,47)} = 12.20$; $p = .0082$). Two-way ANOVA analiza rezultata u levoj komori je pokazala značajan efekat tretmana ($F_{(1,23)} = 11.74$; $p = .027$). Daljom analizom rezultata u levoj komori je pokazano statistički značajno povećanje u grupi socijalno izolovanih životinja koja je primala OXT u odnosu na grupu koja je primala placebo (53%, $p = .042$, Tukey test). U desnoj komori nisu pokazane značajne razlike između grupa (Slika 24b).



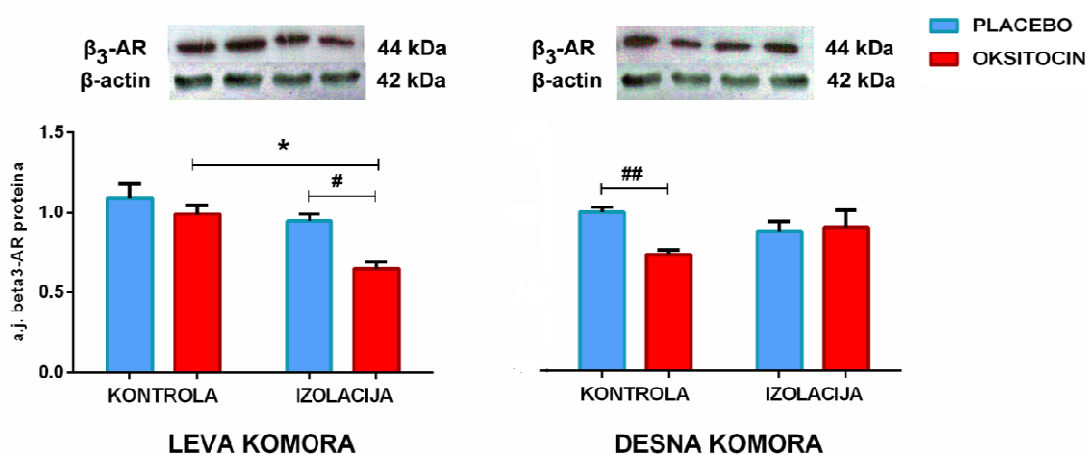
Slika 25. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina VMAT2 u levoj i desnoj komori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: # $p < 0.05$, placebo vs. oksitocin.

Na Slici 25a. je prikazan nivo iRNK za VMAT2 u levoj i desnoj komori. Analiza ovih rezultata nije pokazala značajan efekat nijednog ispitivanog faktora a nije pokazana ni značajna razlika između grupa u levoj i desnoj komori.

Analiza rezultata nivoa VMAT2 proteina u levoj i desnoj komori, grafički prikazanih na slici 25b., utvrdila je značajan efekat tretmana ($F_{(1,47)} = 13.30$; $p = .0067$) i strane srca ($F_{(1,47)} = 109.51$; $p = 4.36 \times 10^{-6}$) kao i značajne interakcije između stresa i tretmana ($F_{(1,47)} = 13.30$; $p = .0067$) i tretmana i strane srca ($F_{(1,47)} = 75.70$; $p = 2.37 \times 10^{-5}$). Two-way ANOVA analiza rezultata je pokazala značajan efekat tretmana u levoj komori ($F_{(1,23)} = 43.56$; $p = .0027$) i u desnoj komori ($F_{(1,23)} = 50.20$; $p = .0021$). Dalja analiza rezultata u levoj komori je pokazala efekat tretmana OXT u vidu povećanja nivoa VMAT2 proteina za 66% u kontrolnoj grupi ($p = .013$, Tukey test). U desnoj komori naknadna analiza je pokazala efekat tretmana OXT u vidu

smanjenja nivoa proteina kako u kontrolnoj grupi (15%, $p=0.049$, Tukey test) tako i u grupi socijalno izolovanih životinja (27%, $p=0.030$, Tukey test).

4.13. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na nivo proteina β_3 -AR i relativnu ekspresiju gena za M_2 MR u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

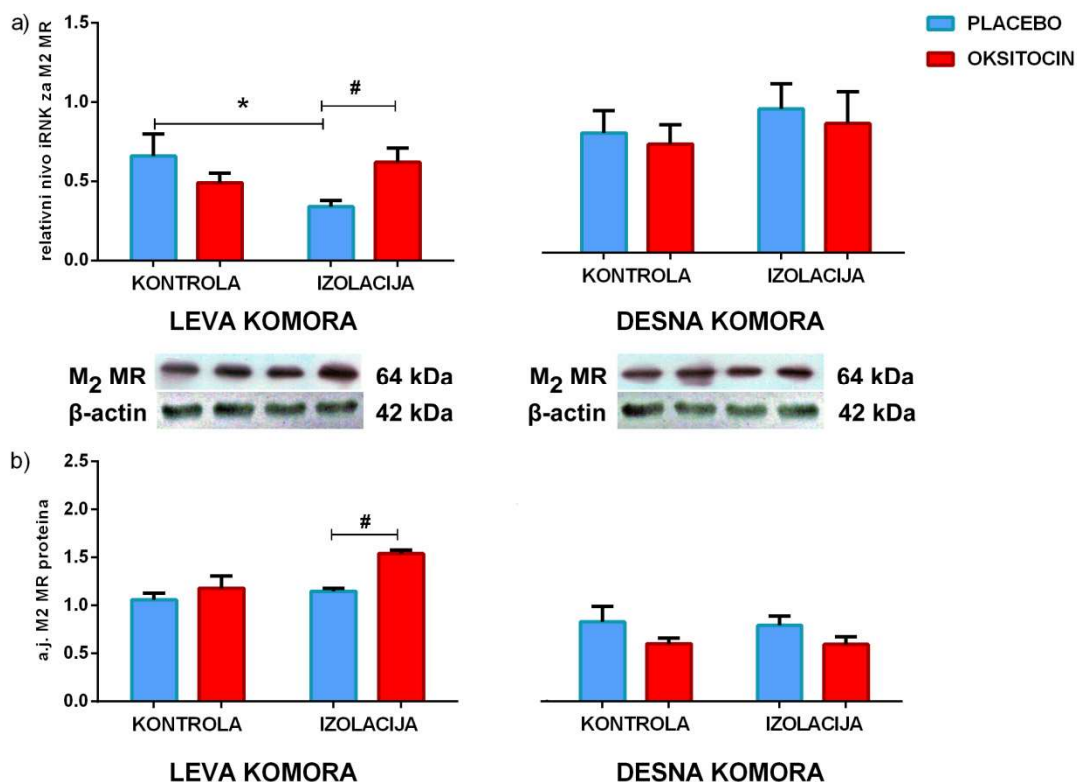


Slika 26. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo β_3 -AR proteina u levoj i desnoj komori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p<0.05$, kontrola vs. izolacija; # $p<0.05$, ## $p<0.05$ placebo vs. oksitocin.

Rezultati nivoa iRNK za β_3 -AR nisu dobijeni jer ni u jednom uzorku u okviru kontrolne grupe nije došlo do ekspresije iRNK za β_3 -AR.

Na Slici 26. predstavljeni su rezultati nivoa proteina β_3 -AR u levoj i desnoj komori. Three-way ANOVA analiza rezultata vrednosti β_3 -AR proteina u komorama je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,47)}= 7.69$; $p=0.024$) i tretmana ($F_{(1,47)}= 7.63$; $p=0.025$) i značajnu interakciju između stresa i strane srca ($F_{(1,47)}= 7.78$; $p=0.023$) i interakciju između stresa, tretmana i strane srca ($F_{(1,47)}= 12.19$; $p=0.0071$). Two-way ANOVA analiza rezultata nivoa β_3 -AR u levoj komori je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,23)}= 16.01$; $p=0.016$) i tretmana ($F_{(1,23)}= 10.03$; $p=0.0021$). Dalja analiza rezultata u levoj komori je pokazala statistički značajno smanjenje nivoa proteina u grupi socijalno izolovanih životinja koje su primale

OXT u odnosu na kontrole koje su primale OXT (34%, $p=0.037$, Tukey test) kao i u odnosu na socijalno izolovane životinje koje su primale placebo (32%, $p=0.038$, Tukey test). U desnoj komori je pokazano statistički značajno smanjenje nivoa β 3-AR proteina za 27% kao posledica tretmana OXT u kontrolnoj grupi ($p=0.0036$, Tukey test).



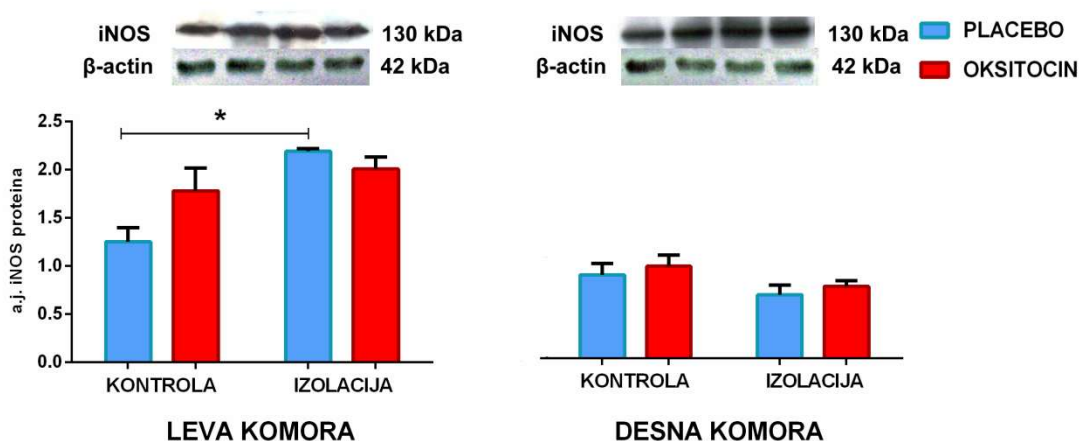
Slika 27. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo: a) iRNK i b) proteina M₂ MR u levoj i desnoj komori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija.

Na Slici 27. su prikazani rezultati nivoa ekspresije gena za M₂ MR u levoj i desnoj komori. Trofaktorijalna analiza varijansi rezultata nivoa M₂ MR iRNK je pokazala značajan efekat strane srca ($F_{(1,47)} = 10.35$; $p = 0.0028$). Dalja analiza rezultata u levoj komori je pokazala značajnu interakciju stresa i tretmana ($F_{(1,23)} = 8.25$; $p = 0.011$). Post-hoc analiza rezultata je pokazala statistički značajno smanjenje nivoa iRNK za 48% u grupi socijalno izolovanih životinja koje su primale placebo u odnosu na kontrolu ($p = 0.047$, Tukey test). Tretman OXT je doveo do značajnog

povećanja za 82% u grupi socijalno izolovanih životinja ($p=.020$, Tukey test) (Slika 27a.)

Analiza rezultata nivoa M_2 MR proteina u levoj i desnoj komori pokazala je značajan efekat strane ($F_{(1,47)}= 43,87$; $p=.00017$) kao i interakciju između tretmana i strane srca ($F_{(1,47)}= 10,86$; $p=.011$). Analiza rezultata između grupa je pokazala značajan efekat tretmana OXT u vidu povećanja nivoa M_2 MR proteina za 25% u grupi socijalno izolovanih životinja u levoj komori ($p=.031$, Tukey test) (Slika 27b.).

4.14. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na nivo proteina iNOS u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

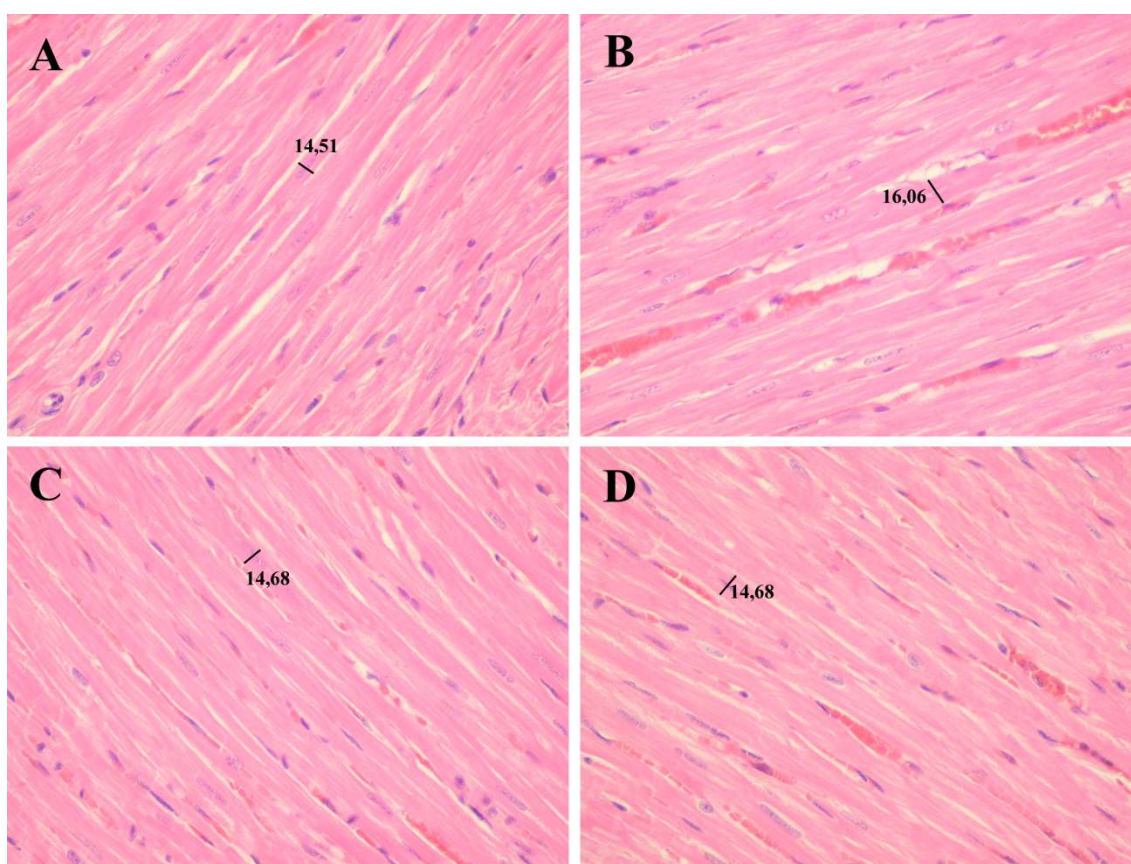


Slika 28. Efekat hroničnog tretmana oksitocinom na nivo iNOS proteina u levoj i desnoj komori kod nestresiranih kontrola i hronično izolovanih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za uzorak od 6 pacova. Statistička značajnost: * $p < 0.05$, kontrola vs. izolacija.

Na Slici 28. su predstavljeni rezultati nivoa iNOS proteina u levoj i desnoj srčanoj komori. Three-way ANOVA analiza je pokazala značajan efekat strane srca ($F_{(1,47)}= 119,48$; $p=4.35 \times 10^{-6}$) kao i značajnu interakciju između stresa i strane srca ($F_{(1,47)}= 21,07$; $p=.0018$). Dvofaktorijalna analiza varijansi rezultata u levoj komori je pokazala značajan efekat stresa ($F_{(1,23)}= 14.39$; $p=.0019$). Dalja

analiza u levoj komori je pokazala statistički značajno povećanje nivoa iNOS proteina za 75% u socijalno izolovanoj grupi životinja koja je primala placebo u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0.026$, Tukey test). U desnoj komori nisu utvrđene statistički značajne razlike između grupa.

4.15. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na histološke parametre u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije



Slika 29. Reprezentativne fotografije preseka srčanog mišićnog tkiva zida leve komore. A) kontrolna grupa + placebo ($n=200$) B) socijalna izolacija + placebo ($n=200$) C) kontrolna grupa + oksitocin ($n=200$) D) socijalna izolacija + oksitocin ($n=220$), H/E, uvelicanje 400x

Analiza rezultata veličine kardiomiocita u levoj i desnoj komori srca je pokazala da postoji statistički značajno povećanje od 11% u veličini kardiomiocita u grupi socijalno izolovanih životinja u odnosu na kontrolu u levoj komori ($p=0.037$, Tukey test). Tretman OXT je doveo do značajnog smanjenja za 9% u prečniku

kardiomiocita u grupi socijalno izolovanih životinja u zidu leve srčane komore ($p=0.035$, Tukey test) (Slika 29.). U desnoj komori srca nisu uočene značajne razlike između grupa.

Praćena je i količina kolagenih vlakana u vanćelijskom matriksu u levoj i desnoj komori. Analiza ovih rezultata nije pokazala značajne razlike između grupa.

V DISKUSIJA

5.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na parametre u testu otvorenog polja kod nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Originalno razvijen kao test za praćenje promena u ponašanju kod pacova, nastalih kao posledica emocionalnih promena (Hall, 1934), test otvorenog polja omogućava jedinstvenu priliku za sistemsku procenu ponašanja koja se ogleda u istraživanju nove sredine, generalne lokomotorne aktivnosti i pruža inicijalne podatke o anksioznom ponašanju kod glodara. Lokomotorna aktivnost u novoj, nepoznatoj sredini se može posmatrati kao parametar promena u ponašanju u odgovoru organizma na stres (Gray, 1987). Promena aktivnosti u testu otvorenog polja je oblik kompleksnog ponašanja, koja s jedne strane uključuje neofobiju, strah od nove, nepoznate sredine, a sa druge pojačanu aktivnost kao posledicu uzbuđenja životinje i želje za istraživanjem. Stoga, povećana ali i smanjena lokomotorna aktivnost mogu biti indikatori stanja straha ili anksioznosti kod životinja (Archer, 1973).

Naši rezultati su pokazali da je socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja imala efekat samo na jedan parametar lokomotorne aktivnosti koji smo pratili na testu otvorenog polja, dok u svim ostalim ispitivanim parametrima efekta nije bilo. Hronični stres socijalne izolacije je doveo do statistički značajnog povećanja učestalosti spontanih promena pravca kretanja u odnosu na kontrolnu grupu, dok je lokomotorna aktivnost nepromenjena. Weiss i sar. (2004) su u svom eksperimentu izlagali pacove oba pola stresu socijalne izolacije u trajanju od 13 nedelja. Oni su, analogno našim rezultatima, pokazali da posle 13 nedelja socijalne izolacije nije došlo do promene u lokomotornoj aktivnosti ni kod mužjaka ni kod ženki pacova. Duncko i sar. (2001) su utvrdili da hronični blagi nepredvidivi stres takođe, nema uticaja na ukupnu lokomotornu aktivnost u testu otvorenog polja. Nasuprot ovim rezultatima, Liu i sar. (2013) su pokazali da socijalna izolacija u trajanju od 21 dan dovodi do značajnog smanjenja lokomotorne aktivnosti koja se ogleda u smanjenju ukupno pređene razdaljine kod socijalno izolovanih životinja. Osim toga, veći broj studija je pokazalo povećanu lokomotornu aktivnost kod

socijalno izolovanih Wistar pacova u uslovima nove sredine (Garzon i Del Rio, 1981, Domeney i Feldon, 1998, Weiss i sar., 2000). Moramo imati u vidu da metodološke razlike, kao što je sam protokol socijalne izolacije ili okruženje u kojem se test izvodi (Einon i Morgan, 1976), mogu da budu razlog neslaganja naših rezultata o efektu stresa socijalne izolacije na lokomotornu aktivnost životinja u odnosu na one koji su prisutni u literaturi.

Tretman OXT u našem eksperimentu dovodi do značajnog smanjenja dužine pređenog puta u grupi hronično izolovanih životinja u odnosu na grupu koja je primala placebo. U kontrolnoj grupi životinja OXT nije uticao na lokomotornu aktivnost. Studija u kojoj se C57BL/6J miševi hronično izlažu tretmanu OXT (0.15 i 0.30 IU) intranazalno, takođe pokazuje da dolazi do smanjenja ukupno pređene razdaljine u testu otvorenog polja (Huang i sar., 2014). Uvnas-Moberg i sar. (1994) su u svom eksperimentu ispitivali vezu između doze OXT i spontane motorne aktivnosti u testu otvorenog polja. Kod pacova tretiranih sa manjim dozama OXT (1-4 µg/kg, s.c) pokazano je smanjenje lokomotorne aktivnosti na periferiji testa otvorenog polja ali je ukupna lokomotorna aktivnost ostala nepromenjena, dok veće doze OXT (250-1000 µg/kg, s.c) pokazuju sedativni efekat koji se ogleda u smanjenju lokomotorne aktivnosti. Do sličnih zaključaka o vezi doze i lokomotorne aktivnosti došli su i Klenerova i sar. (2009). Oni su pokazali da manja doza od 0.3 mg/kg, i.p. ima pozitivan efekat na hipolokomociju indukovanu stresom, dok doza od 1 mg/kg, i.p. vodi daljem smanjenju lokomotorne aktivnosti kod stresiranih životinja. Ove studije potvrđuju da dejstvo OXT na lokomotornu aktivnost u mnogome zavisi od doze leka i trajanja tretmana.

Socijalna izolacija se u brojnim studijama pokazala kao model koji indukuje anksiozno ponašanje (Jankowska i sar., 1991, Hall i sar., 2000, Weiss i sar., 2000). Sa druge strane je pokazano da OXT dovodi do smanjenja promena u ponašanju kao reakcije na stres kako kod mužjaka tako i kod ženki i ovaj efekat OXT u literaturi se tumači kao anksiolitički efekat OXT (Uvnas-Moberg i sar., 1994, Windle i sar., 1997, Windle i sar., 2006, Waldherr i Neumann, 2007). Značajno povećanje učestalosti spontanih promena pravca kretanja nakon 12 nedelja socijalne izolacije, koji su dobijeni u našoj studiji, mogu biti posmatrani kao

odgovor životinje na novu veliku sredinu u kojoj se test izvodi i pokazatelj stepena anksioznosti. Tretman OXT je u našoj studiji izazvao smanjenje učestalosti spontanih promena pravca kretanja u grupi socijalno izolovanih životinja. Ako imamo u vidu već rečeno, da se povećanje učestalosti posmatranog parametra uzima kao pokazatelj anksioznosti, onda ovo smanjenje učestalosti spontanih promena pravca kretanja ukazuje da je OXT ispoljio blagi anksiolitički efekat u grupi socijalno izolovanih životinja. Jedan od bitnih parametara koji ukazuje na anksiozno ponašanje je i vreme provedeno na periferiji otvorenog polja. U situaciji kada se nađu u novoj sredini, glodari spontano više vremena provode na periferiji novog prostora blizu zidova aparature u odnosu na vreme provedeno u centralnom delu polja za testiranje. Ovaj oblik ponašanja se naziva trigmotaksija. Povećanje vremena provedenog u centralnom delu odnosno smanjenje vremena provedenog na periferiji u odnosu na ukupno vreme trajanja testa je indikator anksiolitičkog efekta tretmana (Pruet i Belzung, 2003). Pored ovog parametra i povećanje broja prelazaka preko centra ukazuje na anksiolitički efekat tretmana. Socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja kao i hronični tretman OXT nisu doveli do značajnih promena u vremenu provedenom na periferiji kao i u broju prelaska preko centra. Do sličnih rezultata došli su Bales i sar. (2013) koji su pokazali da hronični tretman OXT u tri različite doze ne dovodi do promene u vremenu provedenom na periferiji/centru u odnosu na kontrolnu grupu.

Rezultati naše studije pokazali su diskretne promene u ponašanju životinja koje su bile dugotrajno izložene izolaciji. Osim toga, potvrđeno je da OXT pozitivno deluje na ponašanje životinja, smanjujući uočene znake anksioznosti. Naši rezultati su tako potvrdili anksiolitičko dejstvo oksitocina.

5.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na telesnu težinu životinja, apsolutne i relativne težine leve i desne nadbubrežne žlezde i srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Dobijeni rezultati pokazuju da hronična socijalna izolacija kao i tretman OXT nema efekat na telesnu težinu pacova. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Cruz i sar. (2016) koji su pokazali da tronedeljna izolacija nema efekta na telesnu težinu odraslih mužjaka pacova, za razliku od onih u adolescentskom uzrastu. Thorsell i sar. (2006) su takođe, našli da socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja nema efekat na telesnu težinu pacova i da ne postoji interakcija između protoka vremena u izolaciji i uslova odgajanja. Sa druge strane kada govorimo o tretmanu OXT danas je jasno da postoji više načina na koji OXT, bilo da se daje periferno ili centralno, može da utiče na telesnu težinu, uglavnom kroz smanjeni unos hrane, povećanjem trošenja energije i lipolizom. U svetlu otkrića da se OXT sintetiše u gastrointestinalnom traktu i zapažanja da periferna administracija OXT može stimulisati oslobađanje OXT u CNS (Blevins i Ho, 2013), svakako su potrebne dodatne studije koje bi pokazale značaj perifernog OXT u energetsom balansu. Huang i sar. (2014) su pokazali da hronično intranazalno davanje OXT u dužini od 21 dan nema efekat na telesnu težinu životinje. Sama dužina tretmana je veoma bitna u pogledu dejstva OXT na telesnu težinu životinja jer su Maejima i sar. (2011) pokazali da periferalni tretman OXT (s.c.) ima efekat na redukciju telesne težine životinje u prvih 6 dana tretmana, dok se taj efekat kasnije gubi.

Rezultati našeg eksperimenta nisu pokazali nikakve značajne promene apsolutnih težina leve i desne nadbubrežne žlezde kao posledicu izlaganja socijalnoj izolaciji u toku 12 nedelja kao ni tretmana OXT u trajanju od 14 dana. Sa druge strane, do promena je došlo ako posmatramo relativnu težinu nadbubrežnih žlezdi koja predstavlja odnos između apsolutne težine žlezde i telesne težine životinje. Utvrđeno je postojanje asimetrije u težinama nadbubrežnih žlezda, pa je tako kod čoveka desna nešto veća, dok je kod pacova leva neznatno veća od desne nadbubrežne žlezde (Gerendai i Halasz, 1997). Efekat socijalne izolacije na

relativnu težinu žlezde je izražen u slučaju desne nadbubrzne žlezde, dok je efekta tretmana OXT izražen u slučaju leve nadbubrežne žlezde. Desna žlezda je pokazala značajno povećanje u relativnoj težini kao posledica izolacije za razliku od leve nadbubrežne žlezde. Za razliku od naših rezultata, Weiss i sar. (2004) nisu dobili nikakve promene u relativnim težinama nadbubrežne žlezde u uslovima socijalne izolacije u trajanju od 13 nedelja. Ieraci i sar. (2016) su potvrdili asimetriju u težinama između leve i desne nadbubrežne žlezde na početku socijalne izolacije, dok socijalna izolacija nije imala značajan efekat na težinu nadbubrežne žlezde ni sa jedne strane. Sa druge strane, Carnevali i sar. (2012) su pokazali da kod pacova koji su bili izloženi epizodi sukoba sa dominantnom jedinkom, a kasnije socijalno izolovani, dolazi do značajnog povećanja kako u apsolutnim tako i u relativnim težinama nadbubrežne žlezde, odnosno dolazi do adrenalne hipertrofije prvenstveno usled aktivacije HHA osovine ali i adrenomedularnog sistema. Tretman OXT u trajanju od 14 dana je pokazao svoj efekat na kontrolnoj grupi životinja u levoj nadbubrežnoj žlezdi a ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim od strane Ondrejčakova i sar. (2010). Plecas i sar. (1989), su pokazali da tretman OXT povećava broja hromafinih ćelija, kao i povećanje nivoa ADR, NA i DOP u srži nadbubrežne žlezde pacova. Na osnovu njihovih rezultata, možemo pretpostaviti da je povećanje relativne težine nadbubrežnih žlezda posledica povećanja broja ćelija u srži nadbubrežne žlezde, pri čemu ne možemo isključiti mogućnost da je povećanje nastalo i usled promena u kori nadbubrežne žlezde.

Naši rezultati su pokazali da hronična socijalna izolacija nije imala efekat na apsolutne kao i na relativne težine srca. Slični rezultati su predstavljeni i od strane Kop i sar. (2015) i Cruz i sar. (2016) koji su pokazali da socijalna izolacija u trajanju od 17 nedelja u prvom slučaju, odnosno 3 nedelje u drugom slučaju ne dovodi do promena kako u apsolutnim tako i u relativnim težinama pretkomora i komora između kontrolnih i socijalno izolovanih životinja. Tretman OXT nije uticao na apsolutne težine dok je smanjio relativne težina srca socijalno izolovanih životinja.

5.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentraciju kateholamina u plazmi nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Izlaganje socijalnoj izolaciji u trajanju od 12 nedelja dovodi do značajnog povećanja nivoa ADR i NA u plazmi. Poznato je da promene u sintezi KA, njihovo preuzimanje i skladištenje predstavljaju sastavni deo kateholaminskog metabolizma. Koncentracija KA u plazmi zavisi kako od nivoa oslobađanja kateholamina u krvotok tako i od nivoa njihovog uklanjanja iz krvotoka (Goldstein i sar., 2003). Stoga povećanje nivoa koncentracije ADR a posebno NA ne ukazuje samo na povećanu simpatičku aktivaciju već i na smanjeno uklanjanje KA iz krvotoka koje može dovesti do povećanja nivoa KA u plazmi. Pored toga što dobijeni rezultati pokazuju značajno povećanje koncentracije ADR i NA u plazmi socijalno izolovanih pacova, oni mogu ukazivati da je u srži nadbubrežne žlezde nivo NET, transportera odgovornog za ponovno preuzimanje oslobođenih KA, smanjen kao posledica socijalne izolacije. Kao rezultat smanjene količine NET dolazi do smanjenog preuzimanja KA i povećanja njihove koncentracije u cirkulaciji. Gavrilovic i sar. (2010) su takođe pokazali da socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja dovodi do povećanja nivoa ADR i NA u plazmi, za razliku od socijalne izolacije u trajanju od 21 dan koja nije uticala na promenu količine ADR i NA u plazmi (Gavrilovic i Dronjak, 2005). Uočene razlike u nivoima KA u plazmi se mogu najverovatnije pripisati različitim dužinama trajanja psihosocijalne izolacije. Naši rezultati pokazuju da dvonedeljni tretman OXT kod socijalno izolovanih pacova dovodi do statistički značajnog smanjenja nivoa ADR i NA u plazmi. Grewen i Light (2011) su utvrdili da postoji obrnuta srazmera u nivoima OXT i NA u plazmi. Veća koncentracija OXT u cirkulaciji je povezana sa nižim nivom NA u plazmi. Merenjem nivoa KA u plazmi pre i posle tretmana OXT ustanovljeno je smanjenje ADR za 53% i NA za 43% , što ukazuje da se inhibicija lučenja KA od strane OXT *in vivo* dešava direktno u nadbubrežnoj žlezdi (Gibbs, 1986).

5.4. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Fiziološki odgovor organizma na stresni događaj aktivira simpato-adrenomedularni sistem, a to podrazumeva lučenje i otpuštanje kateholamina i glukokortikoida iz nadbubrežne žlezde. Neuroendokrina funkcija hromafinih ćelija srži nadbubrežne žlezde tokom stresa ogleda se u oslobađanju ADR i NA u cirkulaciju i na taj način uspostavlja se fiziološka homeostaza kao odgovor organizma na stres. Aktivnost adrenomedularnog sistema se može sagledati praćenjem sinteze kateholamina, koja zavisi od nivoa TH, prvog enzima u procesu sinteze kateholamina, njihovog ponovnog preuzimanja nakon oslobađanja od strane NET, kao i vezikularnog transporta i skladištenja posredstvom VMAT2.

Prve studije koje su se bavile aktivnošću TH enzima u uslovima stresa potvrđuju da promene u aktivnosti TH indukovane IMO ili stresom hladnoće, rezultiraju povišenim nivoom enzima i njegovom sintezom (Kvetnansky i sar., 1970, Thoenen, 1970, Kvetnansky i sar., 1971). Drugi stresori takođe utiču na biosintezu kateholamina i aktivnost enzima. Kontinuirano izlaganje hladnoći (4°C) povećava nivo adrenalne TH. Posle nekoliko nedelja kontinuiranog izlaganju hladnoći, nivo TH enzima nije više značajno povećan (Baruchin i sar., 1993). Ponovljeno plivanje u vodi temperature 15°C povećava aktivnost TH u nadbubrežnoj žlezdi (Otten i sar., 1973). Kod hroničnog izlaganja toploti (34°C) zabeleženo je smanjenje aktivnosti TH (Petrović, 1980). Kada je u pitanju hronični stres, on za razliku od akutnog stresa pokreće stalnu aktivaciju gena za TH u srži nadbubrežne žlezde, što može biti proces koji je odgovoran za adaptaciju u uslovima stresa. U poređenju sa nestresiranim kontrolama pacovi koji su izlagani stresu IMO po 2 sata u periodu od 7 dana imaju značajno povećanje nivoa iRNK za TH u srži nadbubrežne žlezde i 24 sata po prestanku izlaganja stresoru (Kubovcakova i sar., 2004).

Naši rezultati pokazuju da socijalna izolacija ne dovodi do promene u nivou ADR i NA u srži nadbubrežne žlezde. Rezultati našeg eksperimenta su pokazali da stres hronične izolacije dovodi do statistički neznačajne promene u nivou iRNK za TH dok je kao što je već rečeno nivo TH proteina značajno povećan kao posledica stresa. Nivoi iRNK za NET i za VMAT2 nisu promenjeni kod socijalno izolovanih pacova. Sa druge strane, socijalna izolacija je dovela do značajnog povećanja nivoa VMAT2 proteina i smanjenja nivoa NET proteina. Nedavno je pokazano da izlaganje životinja blagim hroničnim nepredvidivim stresorima smanjuje nivo iRNK za NET u srži nadbubrežne žlezde (Spasojevic i sar., 2015). Uočeno smanjenje ekspresije ovog transportera može se objasniti povećanim potrebama organizma za kateholaminima u uslovima stresa. Stoga je ponovno preuzimanje oslobođenih KA u uslovima hronične socijalne izolacije smanjeno a njihovo otpuštanje u cirkulaciju je povećano. Kao što je već rečeno, i naši rezultati su pokazali povećanje nivoa ADR i NA u plazmi životinja izloženih hroničnoj socijalnoj izolaciji. Primećeno povećanje nivoa VMAT2 proteina kod hronične socijalne izolacije je u skladu sa povećanim kapacitetom skladištenja KA kao važan adaptacioni mehanizam tokom hroničnog stresa. Vezikularno curenje amina je važan mehanizam u odgovoru organizma na uslove stresa (Eisenhofer i sar., 2004). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Tillinger i sar. (2010) i Sabban i sar. (2012) koji su pokazali da akutno izlaganje stresu imobilizacije i ponovljena imobilizacija povećavaju nivo ekspresije VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde. Ovi rezultati podržavaju hipotezu po kojoj KA iz srži nadbubrežne žlezde imaju fiziološku ulogu u odgovoru organizma na stres.

Rezultati koji se odnose na ispitivanje dejstva OXT na aktivnost srži nadbubrežne žlezde su malobrojni. Naši rezultati su pokazali da hronični tretman OXT u dužini od 14 dana kod nestresiranih životinja dovodi do povećanja nivoa ADR i NA u srži nadbubrežne žlezde, ali bez promena nivoa oslobođenih KA u plazmi. Povećana količina kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda usled tretmana OXT ukazuje na postojanje dodatnog kapaciteta koji im omogućava oslobađanje KA u uslovima izmenjene homeostaze. Rezultati su pokazali i da tretman OXT u trajanju od 14 dana kod nestresiranih životinja ne dovodi do promena u ekspresiji

gena za TH i NET u srži nadbubrežne žlezde. Činjenica da hronični tretman OXT ne menja ekspresiju TH i NET sugeriše da u uslovima smanjene simpatičke aktivnosti OXT nema efekta na gene odgovorne za sintezu i transport kateholamina. Sa druge strane, tretman OXT dovodi do značajnog povećanja nivoa VMAT2 proteina u srži nadbubrežne žlezde, dok je nivo iRNK za VMAT2 nepromenjen. Ideker i sar. (2001), su pokazali da nivo ispitivanog proteina ne mora da bude u direktnoj korelaciji sa nivoom iRNK, što ukazuje na kompleksnu relaciju između transkripcije i translacije. Slično su i Kvetnansky i sar. (2002) primetili da se nivo iRNK za TH kod životinja izloženih stresu hladnoće ne razlikuje u odnosu na kontrolnu grupu, dok je nivo TH proteina značajno povećan. Zaključili su da ova razlika između nivoa iRNK za TH i TH proteina kao posledica efekta stresa hladnoće najverovatnije posledica njihovog poluživota. Imajući u vidu da je VMAT2 odgovoran za skladištenje i regulaciju otpuštanja kateholamina, povećan nivo VMAT2 kao posledica tretmana OXT može da ukazuje na pripremu hromafinih ćelija da u uslovima stresa adekvatno odgovore na povećanu potrebu za kateholaminima. Neurohemijska istraživanja su utvrdila da su promene nivoa VMAT2 uključene u nastanak mentalnih i neuroloških bolesti. Schwartz i sar. (2003) smatraju da smanjena ekspresija VMAT2 u limbičkom sistemu može biti relevantna kao parametar u sagledavanju depresivnog ponašanja kod životinja. Studije Sala i sar. (2010) kao i Goldstein i sar. (2011) su pokazale da pacijenti sa Parkinsonovom bolešću odnosno demencijom sa Levijevim telima imaju smanjeni nivo VMAT2 u trombocitima odnosno smanjenu aktivnost VMAT u srčanom mišiću.

Kod hronično izolovanih životinja koje su bile tretirane OXT u trajanju od dve nedelje, tretman nije doveo do promena u količini ADR i NA i ekspresiji gena za enzim TH ali je došlo do značajnih promena u ekspresiji gena za oba transportera. Tretman OXT dovodi do povećanja nivoa NET proteina u srži nadbubrežne žlezde hronično izolovanih pacova i sa tim povećanjem vraća vrednost ovog transportera na nivo kontrolne grupe. Imajući u vidu činjenicu da tretman OXT ne menja vrednosti iRNK i proteina za NET kod nestresiranih životinja možemo pretpostaviti da efekat OXT na ekspresiju NET zavisi od dodatnog uticaja psihosocijalne interakcije i psihofiziološke aktivacije. Ovakvi

suprotni efekti su pokazani u slučaju efekta OXT na HHA osovinu. Petersson i sar. (1999) su pokazali da injekcija OXT (1 mg/kg s.c.) dovodi do prolaznog povećanja nivoa ACTH i CORT. Šest sati posle tretmana Ova doza dovodi do smanjenja koncentracije CORT ali ne i ACTH. Ista doza davana 5 dana dovodi do smanjenja koncentracije CORT i 10 dana posle poslednje injekcije. Izgleda da OXT može i da stimuliše i da inhibira aktivnost HHA osovine kako u kratkom tako i u dužem vremenskom periodu. Na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da OXT pokazuje različite efekte na gene odgovorne za preuzimanje NA u srži nadbubrežne žlezde kod stresiranih i nestresiranih životinja. Jedno od mogućih objašnjenja može biti povezano sa indirektnim efektom OXT na NET putem CORT. Wakade i sar. (1996) su dokazali da glukokortikoidi smanjuju ekspresiju gena za NET i funkcionalnu aktivnost hromafinih ćelija pacova u ćelijskoj kulturi. Pokazano je da je stres hronične socijalne izolacije povezan sa povećanjem nivoa CORT (Grippe i sar., 2009) kao i da tretman OXT umanjuje stresom indukovanu aktivnost HHA osovine na taj način dovodeći do promena u regulaciji odgovora organizma na stres kod glodara (Neumann, 2002). Na osnovu iznetih podataka moguće je pretpostaviti da povećan nivo CORT tokom hronične socijalne izolacije dovodi do smanjenja NET, dok tretman OXT, smanjujući nivo CORT, indirektno dovodi do povećanja preuzimanja kateholamina u srži nadbubrežne žlezde. Imajući u vidu ulogu NET u procesu preuzimanja kateholamina, uočeno povećanje nivoa ekspresije NET kod socijalno izolovanih pacova tretiranih OXT, možemo pretpostaviti da je odgovorno i za smanjenje nivoa NA u plazmi koje je utvrđeno kod ovih životinja. Rezultati eksperimenta su takođe pokazali da pored povećanja nivoa VMAT2 proteina kod socijalno izolovanih životinja, tretman OXT dovodi do daljeg povećanja nivoa iRNK i proteina VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde. Ova povećana ekspresija NET i VMAT2 u srži nadbubrežne žlezde, kao posledica tretmana OXT, omogućava hromafinim ćelijama da adekvatno odgovore na povećane zahteve za kateholaminima.

Sumirajući ovde prikazane rezultate možemo zaključiti da periferni tretman OXT u trajanju od 14 dana kod nestresiranih životinja ima efekta na kateholamine u srži nadbubrežne žlezde, menjajući ekspresiju VMAT2 proteina i

dovodeći do povećanja nivoa kateholamina. Kada govorimo o hronično izolovanim životinjama izgleda da tretman OXT ima veći uticaj na proces preuzimanja i skladištenja kateholamina nego na sintezu kateholamina. Dobijeni rezultati pokazuju da tretman OXT ne samo da pospešuje skladištenje kateholamina u stanjima neizmenjene homeostaze, već pospešuje procese i preuzimanja i skladištenja u srži nadbubrežne žlezde hronično izolovanih životinja.

5.5. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u levoj i desnoj stelatnoj gangliji nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Simpatički neuroni iz stelatne ganglije utiču na rad srca, stimulišu srčane otkucaje, srčanu provodljivost i snagu kontrakcije putem oslobađanja NA (Pardini i sar., 1990). Kod pacova su svi delovi srca bilateralno inervisani od strane leve i desne stelatne ganglije (Armour i sar., 1998, Lujan i sar., 2012). Studije su pokazale da leva i desna stelatna ganglija mogu da imaju drugačije i specifične efekte na srčane funkcije. Postganglijska vlakna iz desne stelatne ganglije izgleda da utiču više na očuvanje snage srčanih kontrakcija i srčanih otkucaja u odnosu na levu stelatnu gangliju (Li i sar., 2001). Gangliektomija leve stelatne ganglije, za koju se smatra da pokazuje više inotropno nego hronotropno dejstvo, ne utiče na smetnje u srčanim otkucajima, dok je sa druge strane primećeno smanjenje ovih smetnji kada je došlo do prekida u inervaciji od strane desne stelatne ganglije. Simpatički nervni sistem ima veoma značajan uticaj na funkcije srčanog mišića, posebno u uslovima stresa. Grippo i sar. (2007) su pokazali da stres socijalne izolacije kod voluharica menja srčanu frekvenciju i varijabilnost srčane frekvencije. Funkcionalna noradrenalinska transmisija sastoji se od uspostavljene ravnoteže između procesa noradrenalinske sinteze, preuzimanja i skladištenja. Pokazano je da emocionalni stres može da utiče na smanjenje aktivnosti enzima TH i da utiče na povećanje NA i nivoa iRNK za TH u stelatnim ganglijama stresiranih zečeva u odnosu na kontrole (Gorbunova, 2000). Bobrovskaya i sar. (2013) su pokazali da povećanje sistolnog krvnog pritiska i povećanje fosforilacije TH u simpatičkim

ganglijama pacova izloženih nepredvidivim elektrošokovima, dok su Gavrilovic i sar. (2009) utvrdili povećanje nivoa iRNK za TH i iRNK za DBH, enzime koji učestvuju u sintezi kateholamina, u stelatnim ganglijama kod hronično izolovanih pacova. Grippo i sar. (2008) su pokazali da socijalni stresori dovode do disfunkcije u autonomnom nervnom sistemu i srčane disfunkcije kod životinja i ljudi, sugerišući da stresor zajedno sa nedostatkom socijalne interakcije značajno utiče na promene u ponašanju.

Morfološke studije su pokazale asimetriju u veličini i broju ćelija između leve i desne stelatne ganglije, ukazujući na veći broj ćelija i veličinu desne ganglije (Nozdrachev i sar., 2002). Ova asimetrija se takođe reflektuje i na bazične strukturalne parametre neurona, kao što su prosečna zona koju neuron zauzima i dijametar perikariona. Funkcionalna asimetrija između leve i desne stelatne ganglije je bila predmet još nekih studija (Wood i sar., 2010, Chen i sar., 2013).

Rezultati našeg eksperimenta su pokazali da socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja nije promenila nivo NA i ADR u levoj i desnoj stelatnoj gangliji i da tretman OXT nije uticao na dalje promene.

Naši rezultati su pokazali da hronična socijalna izolacija dovodi do veće ekspresije gena za NET i TH u desnoj stelatnoj gangliji u odnosu na levu gangliju. Dobijeni rezultati povećanih vrednosti ekspresije TH i NET u desnoj stelatnoj gangliji su u skladu sa rezultatima dobijenim od strane Hefti i sar. (1982) i Li i sar. (2003). Oni su pokazali da stimulacija simpatičkih nerava *in vivo* ili depolarizacija simpatičkih neurona *in vitro* dovodi do povećane sinteze NA usled povećane ekspresije TH, kao i do povećanog procesa preuzimanja NA usled povećane ekspresije NET. Ove promene na nivou gena u desnoj stelatnoj gangliji tokom stresa hronične izolacije ukazuju na pojačanu aktivnost simpatičkih nerava tokom stresa. U levoj stelatnoj gangliji, stres hronične izolacije smanjuje nivo TH proteina kao i nivoe iRNK za NET i VMAT2, dok količina NET i VMAT2 proteina nije promenjena. Sniženi nivoi TH proteina kao i nepromenjene vrednosti proteina dva transportera navode na zaključak da je smanjena aktivnost leve stelatne ganglije

tokom stresa. Naši rezultati se slažu sa podacima Li i sar. (2001) koji su pokazali da je ekspresija NET značajno veća u desnoj stelatnoj gangliji nego u levoj.

Dobijeni rezultati jasno pokazuju asimetriju u regulaciji aktivnosti gena između uključenih u promet noradrenalina leve i desne stelatne ganglije u stresu. Asimetrija između ganglija je bila i predmet studije od strane Zhou i sar. (2005) koji su pokazali da tretman faktorom rasta nervnih ćelija (NGF) u desnoj stelatnoj gangliji ima antiaritmični efekat, dok proaritmični efekat pokazuje kada se tretira leva stelatna ganglija. Oni su takođe pokazali i značajno povećanje u nivou imunoreaktivnosti β_3 AR kod pasa koji su tretirani NGF u levoj stelatnoj gangliji i značajno smanjenje u desnoj kada se tretira NGF. Stimulacija leve stelatne ganglije povećala je nivo NA u intersticijalnom prostoru za 200%, dok je stimulacija desne stelatne ganglije povećala nivo NA za 260% (Vaseghi i sar., 2012). Pokazano je da su i promene u srčanoj frekvenciji veće tokom stimulacije desnog simpatičkog kraka u poređenju sa stimulacijom levog simpatičkog kraka (Winter i sar., 2012). Rezultati eksperimenta koji pokazuju asimetriju u aktivnosti između leve i desne ganglije u stresu pružaju dodatni dokaz koji može biti od koristi u daljem razjašnjavanju ovih razlika u uslovima narušene homeostaze.

OXT predstavlja deo endogenog sistema koji ima kapacitet da amortizuje posledice fizičkog i emocionalnog stresa. On koordinira endokrini i autonomni odgovor organizma na stres, tako što pojačava parasimpatički odgovor i/ili umanjuje simpatički odgovor (Grippo i sar., 2009). Dobijeni rezultati su pokazali da kada se hronično izolovani pacovi izlože tretmanu OXT u trajanju od 14 dana dolazi do smanjenja nivoa ekspresije gena za TH enzim u desnoj stelatnoj gangliji, dok nivo ekspresije gena za oba transportera ostaje nepromenjen. U levoj stelatnoj gangliji tretman OXT nije uticao na nivoe ekspresije gena za TH, NET i VMAT2 kod stresiranih životinja. Grippo i sar. (2009) su pokazali da izolacija dovodi do značajnog povećanja srčane frekvencije i smanjenja varijabilnosti srčane frekvencije i da ove promene mogu biti sprečene tretmanom OXT. Rezultati dobijeni u desnoj stelatnoj gangliji pokazuju da je OXT deo sistema koji ima ulogu

da ograniči promene u kardiovaskularnoj homeostazi nastale stresom, dovodeći do smanjenog oslobađanja NA u srce, smanjenjem ekspresije gena za TH.

Na osnovu dobijenih rezultata ekspresije gena za TH, NET i VMAT2 u stelatnim ganglijama možemo zaključiti da postoji asimetrija u aktivnosti leve i desne stelatne ganglije u uslovima narušene homeostaze i povećane simpatičke aktivnosti. Aktivnost desne stelatne ganglije u uslovima hronične izolacije u trajanju od 12 nedelja je značajno veća u odnosu na levu, koja se ogleda u povećanju ekspresije gena za TH i NET. Tretman OXT u trajanju od 14 dana je doveo do smanjenja TH proteina u desnoj stelatnoj gangliji kod socijalno izolovanih životinja. Ovi rezultati navode na zaključak da OXT može da utiče na odgovor kardiovaskularnog sistema u uslovima stresa na način da reguliše smanjeno oslobađanje NA u srcu.

5.6. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na srce nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Redosled reakcija koje povezuju psihološki stres sa kardiovaskularnim bolestima nije u potpunosti razjašnjen, međutim poznato je da je reakcija autonomnog nervnog sistema u nastanku ovih bolesti među najvažnijim. Preterana reakcija autonomnog nervnog sistema na hroničan, nepredvidiv ili nepromenjivi stresor može da dovede vremenom do poremećaja u regulaciji kardiovaskularnog sistema. Simpatička stimulacija dovodi do povećanja srčanog volumena, koji se manifestuje povećanim brojem srčanih otkucaja i srčanih kontrakcija koji su posledica oslobađanja NA i njegovog dejstva na β -AR (Bers, 2002). Jača reakcija simpatičkog u odnosu na parasimpatički nervni sistem dovodi i do nastanka tahikardije, povećanog krvnog pritiska i smanjenja varijabilnosti srčane frekvencije (Barton i sar., 2007). Hipersenzitivnost i hiperaktivnost simpatičkog nervnog sistema, koja se dešava tokom izloženosti organizma hroničnim stresnim uslovima, može dovesti do nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Povećana aktivnost simpatičkih nerava u srčanom mišiću je jedna od osnovnih karakteristika srčanog udara (Swedberg i sar., 1984). Poznato je da hronična izloženost

kateholaminima ima toksični efekat na ćelije miokarda (Rona, 1985). Mann i sar. (1992) su pokazali da kada se u primarnu ćelijsku kulturu kardiomiocita mačaka doda NA dolazi do spontanijih kontrakcija velikog broja ćelija a kao posledica ove produžene kontraktibilnosti dolazi do hiperkontrakcija kardiomiocita koje dovode do ćelijske smrti u narednih 2 do 3 dana. Ovaj citotoksični efekat NA, koji je u uskoj sprezi sa povećanim nivoom kreatinin kinaze, je značajno smanjen blokadom β -AR propranololom. Kontinuirana aktivnost simpatičkog nervnog sistema dovodi do smanjenja količine raspoloživog srčanog NA (Chidsey i sar., 1963), verovatno kao posledica povećanog otpuštanja NA (Chidsey i sar., 1965) kao i nedovoljnog preuzimanja NA (Eisenhofer i sar., 1996) i gubitka simpatičkih nerava. Visok nivo kateholamina u krvi smanjuje koronarni protok u mikrocirkulaciji dovodeći do srčane disfunkcije (Kurisu i sar., 2002). Veća gustina adrenalinskih receptora u apikalnom regionu srca koja na neki način kompenzuje ređu simpatičku inervaciju u tom delu srca, može dovesti do disfunkcije komora i apikalnog baloniranja (Mori i sar., 1993). Takotsubo kardiomiopatija (TC) ili stresom indukovana kardiomiopatija, karakteriše se prolaznim apikalnim baloniranjem leve komore. Smatra se da veliko oslobađanje KA koje prati stanje emocionalnog stresa ima vodeću ulogu u patogenezi ove kardiomiopatije. Wittstein i sar. (2005) su pratili i poredili uporedo vrednosti KA i moždanog natriuretskog peptida (BNP) kod pacijenata sa takotsubo kardiomiopatijom i zaključili da je nivo kateholamina 2-3 puta veći kod bolesnika sa sindromom apikalnog baloniranja, što ukazuje na značajnu ulogu kateholamina u nastanku ove bolesti.

Druga grana autonomnog nervnog sistema, parasimpatički nervni sistem, ima važnu ulogu u regulaciji kardiovaskularnog sistema. Parasimpatička stimulacija dovodi do odgovora koji predstavlja protivtežu odgovoru koji daje aktivacija simpatičkog sistema. Primarni efekat povezan sa stimulacijom parasimpatičkog sistema je smanjenje minutnog volumena srca i to smanjenjem broja srčanih otkucaja posredovanog delovanjem neurotransmitera acetilholina (ACh) na muskarinske receptore (MR) (Loffelholz i Pappano, 1985). Stoga je i interakcija i uspostavljeni balans između simpatičkog i parasimpatičkog odgovora

važan u očuvanju homeostaze kardiovaskularnog sistema u promenjenim uslovima.

5.6.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na levu i desnu pretkomoru srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

5.6.1.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Rezultati našeg eksperimenta su pokazali značajno povećanje količine NA u levoj pretkomori srca u uslovima stresa, dok je količina NA nepromenjena u desnoj pretkomori. Stres socijalne izolacije nije doveo do značajnih promena u količini ADR u levoj i desnoj pretkomori. Količina iRNK za TH je smanjena u levoj srčanoj pretkomori kao posledica stresa hronične socijalne izolacije, dok je količina proteina nepromenjena. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Gavrilovic i sar. (2009) koji su pokazali smanjenje od 70% u nivou iRNK za TH usled 12 nedeljne socijalne izolacije. Stres hronične socijalne izolacije nije doveo do promene ekspresije gena za NET i VMAT2. Povećan nivo NA uz nepromenjenu količinu TH proteina kao i nepromenjeni nivo ekspresije gena za NET i VMAT2, ukazuje na njegovo povećano oslobađanje u uslovima stresa u levoj srčanoj pretkomori. Sa druge strane, socijalna izolacija dovodi do smanjena nivoa TH proteina u desnoj srčanoj pretkomori, dok je nivo iRNK za TH povećan. Nivo NET proteina u desnoj pretkomori je povećan kao posledica stresa socijalne izolacije. Povećana ekspresija NET u desnoj srčanoj pretkomori je pokazana i od strane Wehrwein i sar. (2008) u njihovoj studiji sa DOCA salt hipertenzivnim pacovima. Naši rezultati su pokazali da je hronična socijalna izolacija dovela do povećanja ekspresije gena za VMAT2 u desnoj srčanoj pretkomori. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da smanjena sinteza NA uz njegovo povećano preuzimanje i skladištenje, koje dovodi do očuvanja depoa NA u desnoj pretkomori, predstavlja mogući adaptacioni mehanizam u uslovima hroničnog stresa.

Tretman OXT kod izolovanih pacova nije doveo do promena u količini ADR i NA u obe pretkomore. Kod hronično izolovanih pacova tretman OXT je doveo do smanjenja količine iRNK za TH u levoj i u desnoj srčanoj pretkomori, dok je količina proteina ostala nepromenjena, kao i ekspresija gena za NET i VMAT2.

Dobijeni rezultati ukazuju na različitu regulaciju sinteze, preuzimanja i skladištenja NA u uslovima stresa između leve i desne pretkomore. Leva pretkomora je reagovala povećanim otpuštanjem NA, dok se u desnoj pretkomori razvio adaptacioni mehanizam koji omogućava očuvanje kateholaminskih depoa. Tretman OXT nije značajnije uticao na sintezu, preuzimanje i skladištenje kateholamina u pretkomorama.

5.6.1.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na ekspresiju gena za β_3 -AR i M_2 MR u levoj i desnoj pretkomori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

U slučajevima povećanog nivoa NA dolazi do povećane ekspresije i stimulacije adrenalinskog β_3 receptora što dovodi do značajnog smanjenja jačine srčanih kontrakcija. Ovo negativno inotropno dejstvo je pokazano u slučajevima kada je korišćen β_3 -AR agonist (Gauthier i sar., 1998, Tavernier i sar., 2003). Takođe je pokazano da za razliku od β_1 -AR i β_2 -AR, β_3 -AR ne pokazuje *in vivo* i *in vitro* desintetizaciju kao posledicu tretmana agonistom (Nantel i sar., 1993). Kao što je već rečeno, ekspresija β_3 -AR u srcu može imati patofiziološku značajnost. U normalnim uslovima odnos β_1/β_3 -AR u srcu je 8:1 dok je taj odnos u slučaju kardiomiopatije 2:1 (Dincer i sar., 2001). U komorama ljudskog srca β_3 -AR aktivira G_i protein koji dalje aktivira azot-oksidi (NO) signalni put, najverovatnije uključivanjem eNOS, koji se eksprimira u endotelijalnim ćelijama i kardiomiocitima (Gauthier i sar., 1998, Moens i sar., 2010).

Rezultati našeg eksperimenta nisu pokazali promene u nivou ekspresije gena za β_3 -AR ni u levoj ni u desnoj srčanoj pretkomori kod hronično izolovanih životinja. Za razliku od naših rezultata pokazano je da ponovljeni stres

imobilizacije u trajanju od 7 dana dovodi do povećanja iRNK za β_3 -AR u levoj pretkomori (Laukova i sar., 2014).

Pet podtipova muskarinskih receptora je identifikovano do današnjeg dana (M_{1-5}). M_2 MR je podtip koji je najzastupljeniji u srcu sisara. Pokazano je da preko 90% ukupne iRNK za MR u srcu pacova pripada M_2 MR podtipu (Krejci i Tucek, 2002). Muskarinski receptori kao i adrenalinski receptori pripadaju familiji G-kuplovanih proteina (GPCR). M_2 MR aktivira G_i i G_o proteine koji vrše inhibiciju enzima adenilat ciklaze, koji konvertuje ATP u cAMP, i na taj način smanjuje njegov nivo i aktivnost PKA. Funkcija MR u srcu je negativno inotropna i hronotropna. Aktivacija M_2 MR smanjuje broj srčanih otkucaja smanjivanjem spontanog akcionog potencijala u sinoatrijalnom čvoru (Irisawa i sar., 1993). Kod soja miševa kojima je isključen gen za M_2 MR (M_2 KO), odsustvo M_2 MR u levoj komori je praćeno smanjenjem nivoa iRNK i proteina za β_1 - i β_2 -AR i ovo smanjenje adrenalinski receptora verovatno predstavlja mehanizam odgovora organizma na izmenjenu holinergičku transmisiju kod ovog soja i omogućava skoro normalnu srčanu funkciju (Benes i sar., 2012).

Naš eksperiment je pokazao povećanu ekspresiju M_2 MR u levoj i u desnoj srčanoj pretkomori kao posledicu stresa hronične izolacije. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim od strane Myslivecek i sar. (2004) koji su pokazali da stres imobilizacije u trajanju od 2 sata ne dovodi do promena u levoj pretkomori, dok u desnoj dovodi do smanjenja gustine M_2 MR. U drugoj studiji Myslivecek i sar. (2008) su takođe pokazali smanjenje nivoa iRNK za M_2 MR u desnoj pretkomori kao posledicu akutnog izlaganja imobilizaciji. Tomankova i sar. (2015) su utvrdili da u uslovima stresa obuzdavanja pokreta (engl. restrain) ne dolazi do promene ukupnog broja M_2 MR receptora dok se broj receptora na površini membrane smanjuje kao posledica stresa. Na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da povećanje nivoa ekspresije gena za M_2 MR u uslovima stresa hronične socijalne izolacije može predstavljati adaptacioni mehanizam kojim se nadoknađuje smanjena dostupnost receptora na površini membrane u uslovima stresa.

Tretman OXT u trajanju od 14 dana je doveo do povećanja nivoa proteina M₂ MR u levoj i desnoj pretkomori kod kontrolnih grupa. Ovi rezultati mogu biti posledica njihove smanjene dostupnosti ili izmenjene aktivnosti i zahtevaju dodatna ispitivanja signalnih puteva da bi se došlo do relevantnih zaključaka o fiziološkoj ulozi ovog povećanja kao posledice tretmana OXT u uslovima stresa. Naši rezultati pokazuju da tretman OXT dovodi do povećanja nivoa proteina β_3 -AR, kao i do značajnog smanjenja nivoa iRNK za M₂ MR dok je nivo proteina nepromenjen kod socijalno izolovanih životinja u levoj i desnoj srčanoj pretkomori.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da OXT ostvaruje kardioinhibitorno dejstvo na pretkomorama povećanjem broja β_3 -AR. O vezi β_3 -AR i M₂ MR kardioinhibitorna receptora u uslovima stresa govori studija sprovedena od strane Benes i sar. (2012) koji su pokazali da kod M2 KO nedostatak M₂ MR može biti prenebregnut preuzimanjem njihove uloge od strane β_3 -AR. S obzirom da je pokazano da stres hronične socijalne izolacije dovodi do povećanja broja srčanih otkucaja i smanjene varijabilnosti srčane frekvencije (Grippeo i sar., 2007), ovo povećanje broja kardioinhibitornog β_3 -AR u levoj i desnoj pretkomori predstavlja kardioprotektivni efekat OXT.

5.6.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na levu i desnu komoru srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

5.6.2.1. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na koncentracije kateholamina i ekspresiju gena za TH, NET, VMAT2 u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Stres hronične socijalne izolacije u trajanju od 12 nedelja u našem eksperimentu je povećao nivo NA u levoj komori, bez promena u desnoj komori dok nije uticao na nivoe ADR u komorama. Dobijeni rezultati pokazuju da je stres izolacije doveo do povećanja nivoa TH proteina u levoj komori i do povećanja nivoa iRNK za TH i TH proteina u desnoj komori. Gavrilovic i sar. (2010) u svojoj studiji nisu pokazali promene na nivou ekspresije gena za TH kod grupe socijalno

izolovanih životinja. Različite podatke za gensku ekspresiju TH kod hronično izolovanih životinja je moguće objasniti različitim eksperimentalnim protokolom. Socijalno izolovane životinje u našem eksperimentu su poslednje dve nedelje bile podvrgnute tretmanu koji je podrazumevao injekcije placebo, što može predstavljati dodatni stres za životinje. Za razliku od promena na nivou TH enzima stres hronične socijalne izolacije nije doveo do promena na nivou ekspresije gena za NET i VMAT2 u levoj i desnoj komori.

Tretman OXT nije doveo do promena u količini ADR i NA u levoj i desnoj komori. Naši rezultati pokazuju da je OXT doveo do povećanja nivoa TH proteina u levoj komori kod kontrolne grupe dok kod socijalno izolovanih životinja nije doveo do promene vrednosti ekspresije gena za TH. Povećanje nivoa TH proteina u kontrolnoj grupi kao posledica tretmana OXT može biti usled smanjene aktivnosti TH enzima i zahteva dalja ispitivanja pre svega odnosa ukupne količine proteina i fosforilisane forme TH, da bi se doneo zaključak o količini aktivne forme TH proteina. U desnoj komori nivo TH proteina nije promenjen tretmanom OXT ni u kontrolnoj grupi ni u grupi socijalno izolovanih životinja. U levoj komori tretman OXT je kod izolovanih životinja doveo do povećanja nivoa NET proteina, dok je nivo iRNK za NET nepromenjen kao i ekspresija gena za NET u desnoj komori. Nepromenjena vrednost iRNK za NET uz povećan nivo proteina može biti posledica i smanjene stabilnosti i poluživota iRNK za NET uzimajući u obzir da eksperimentalni dizajn, koji podrazumeva tretman od 14 dana, na kraju omogućava samo jednu monitoring tačku za nivo iRNK za NET. Takođe mora se imati u vidu da kada se meri nivo iRNK on ne mora nužno da prati nivo proteina, jer RT-PCR meri ukupnu količinu iRNK a ne aktivnu ribozom-vezanu iRNK (Serikawa i sar., 2003, MacKay i sar., 2004). S obzirom da je aktivnost NET smanjena kod srčane insuficijencije (Meredith i sar., 1993, Backs i sar., 2001) kao i da je pokazano da inhibicija NET dovodi do oštećenja na nivou kardiovaskularnog sistema bilo direktno na nivou tkiva ili indirektno preko povećanja krvnog pritiska (Schroeder i Jordan, 2012), ovo povećanje se može posmatrati kao kardioprotektivni efekat OXT na nivou leve komore. Naši rezultati pokazuju da tretman OXT povećava količinu VMAT2 proteina u levoj, dok u desnoj komori

dovodi do smanjenja njegove količine kod kontrolne grupe. Za razliku od kontrolne grupe, tretman OXT kod socijalno izolovanih životinja smanjuje nivo VMAT2 proteina u desnoj komori, dok u levoj komori ostaje ne promenjena. Ova asimetrija u nivoima VMAT2 proteina kao posledica tretmana OXT ukazuje na različiti mehanizam regionalne regulacije procesa skladištenja KA u levoj i desnoj komori.

5.6.2.2. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na ekspresiju gena za β_3 -AR i M_2 MR levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Rezultati našeg eksperimenta su pokazali da stres hronične socijalne izolacije ne dovodi do promena u nivou proteina β_3 -AR u levoj i desnoj komori. Podaci za iRNK za β_3 -AR nisu dobijeni jer ni u jednom uzorku u okviru kontrolne grupe nije došlo do ekspresije iRNK za β_3 -AR. Suprotno našim rezultatima pokazano je da ponovljeni stres imobilizacije u trajanju od 7 dana dovodi do povećanja iRNK za β_3 -AR u levoj komori (Laukova i sar., 2014) kao i u desnoj komori (Tillinger i sar., 2014) dok akutno izlaganje imobilizaciji nije dovelo do povećanja ovih vrednosti. Slične povećane vrednosti β_3 -AR u levoj komori kao efekat ponovljenog stresa hladnoće u trajanju od 7 dana dobili su i Benes i sar. (2012). Imajući u vidu da je za aktivaciju β_3 -AR neophodna velika količina NA, možemo pretpostaviti da povećana količina NA u levoj komori u uslovima hroničnog stresa izolacije nije prelazila nivoe vrednosti koji bi zahtevali dalju ekspresiju β_3 -AR.

Naši rezultati pokazuju da je nivo iRNK za M_2 MR značajno smanjen u uslovima stresa, dok je nivo proteina u levoj komori nepromenjen, kao i ekspresija gena za muskarinski receptor u desnoj komori. Do sličnih rezultata došli su i Tomankova i sar. (2015) koji su pokazali da akutno i ponovljeno izlaganje stresu obuzdavanja pokreta u trajanju od 7 dana dovodi do smanjenja ekspresije gena za M_2 MR u levoj komori. Sa druge strane Benes i sar. (2012) su pokazali da ni akutni ni ponovljeni stres hladnoće nije doveo do promena u nivou ekspresije gena za M_2 MR.

Hronični tretman OXT je u kontrolnoj grupi u desnoj srčanoj komori doveo do smanjenja nivoa β_3 -AR proteina, bez promena u levoj komori. Kod hronično izolovanih životinja OXT je smanjio količinu β_3 -AR proteina i povećao nivo proteina i iRNK za M_2 MR u levoj komori, dok nije uticao na nivoe ova dva receptora u desnoj komori. Dobijeni rezultati idu u prilog podacima Jankowski i sar. (2010) koji su pokazali da tretman OXT aktivira unutrašnje srčane holinergičke neurone, oslobađa NO i na taj način inhibira simpatičku nervnu aktivnost u srcu i poboljšava kontraktilnost leve komore kod srčanih oboljenja.

5.6.2.3. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na nivo iNOS proteina u levoj i desnoj komori srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Azot-oksidi (NO) je važan signalni molekul u organizmu sisara. U kardiovaskularnom sistemu, NO ima ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa, kontraktilnosti srčanog mišića, vaskularnog remodelinga i barorefleksne funkcije. NO je sintetisan od prekursora L-arginina posredstvom azot-oksidi sintetaza (NOS). Familija NOS uključuje neuralnu NOS (nNOS) koja je u najvećoj meri prisutna u nervnim tkivima, inducibilnu NOS (iNOS) koja je uključena u imuni odgovor i endotelijalnu NOS (eNOS) prisutnu u endotelijalnom tkivu i vrši regulaciju vaskularnog tonusa. Indukcija iNOS je uglavnom u vezi sa infekcijama i nastankom upalnih procesa i deluje kao deo odbrambenog odgovora organizma, dok je njegova ekspresija minimalna u fiziološkim uslovima, stoga iNOS u normalnim fiziološkim uslovima nije prisutan u zdravom srcu, a njegova ekspresija je najčešće indukovana inflamacijom. iNOS proizvodi NO za duži vremenski period i dovodi do određenih patofizioloških efekata. Ova prevelika količina NO u dužem vremenskom periodu može da ima štetne efekte na funkcionisanje kardiovaskularnog sistema. Iako povišena ekspresija iNOS u kardiomiocitima ima malo efekta na bazalnu kontraktilnost, dovoljna je da indukuje kardiomiopatiju i aritmiju (Lee i sar., 2016).

Naši rezultati su pokazali značajno povećanje nivoa iNOS proteina u levoj komori dok u desnoj srčanoj komori nije došlo do promena kod socijalno

izolovanih pacova. Drexler i sar. (1998) su pokazali da je ekspresija i aktivnost iNOS povećana u levoj komori kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom i da je povećana aktivnost iNOS u levoj komori u vezi sa skraćenom relaksacijom i smanjenjem pozitivnog inotropnog odgovora indukovano stimulacijom β -AR.

Tretman OXT nije imao efekta na nivo iNOS proteina u levoj i desnoj komori kod hronično izolovanih pacova. Das i Sarkar (2012) su u svojoj studiji pokazali da tretman OXT pre koronarne okluzije i reperfuzije dovodi do značajnog smanjenja veličine srčanog ožiljka i antiaritmičnog efekta. Ovaj efekat je zadržan samo kada je u kombinaciji sa OXT davan i inhibitor 1400W (specifični inhibitor iNOS), ali ne i u kombinaciji sa nespecifičnim inhibitorom NOS L-NAME. Na ovaj način je kardioprotektivna uloga OXT dovedena u vezu sa nivoom iNOS, odnosno njegovo kardioprotektivno dejstvo u slučaju posledica koronarne okluzije i reperfuzije je bilo moguće samo uz odsustvo iNOS. Kao što je već rečeno, u našem eksperimentu hronični tretman OXT nije uticao na količinu iNOS kod hronično izolovanih životinja.

5.6.2.4. Dejstvo hroničnog tretmana oksitocinom na histološke parametre u komorama srca nestresiranih i pacova izloženih stresu hronične izolacije

Stres hronične socijalne izolacije u trajanju od 12 nedelja u našem eksperimentu je doveo do značajnog povećanja prečnika kardiomiocita u levoj srčanoj komori u odnosu na kontrolnu grupu, dok u desnoj komori nisu primećene promene u veličini kardiomiocita u uslovima stresa. Nisu uočene razlike u količini kolagenih vlakana u vanćelijskom matriksu leve i desne komore između kontrolne grupe i grupe socijalno izolovanih životinja. Carlier i sar. (1988) su pokazali da socijalna izolacija u trajanju od nedelju dana dovodi do povećanja aktivnosti L-ornitin dekarboksilaze (markera hipertrofije) u desnoj srčanoj komori a da izolacija od 6 nedelja dovodi do hipertrofije i u levoj i u desnoj komori, dok socijalna izolacija u trajanju od 12 nedelja pokazuje kao rezultat hipertrofiju leve komore dok ona u desnoj više nije izražena. Uvećanje leve komore kao posledica

nedostatka socijalnog kontakta je potvrđena i u studiji na ljudima (Rodriguez i sar., 2011). Pokazano je da se povećana ekspresija iNOS u kardiomiocitima dovodi u vezu sa srčanom hipertrofijom i fibrozom (Mungrue i sar., 2002). Zhang i sar. (2007) su pokazali da kod soja miševa sa isključenim genom za iNOS dolazi do smanjenja hipertrofije leve komore indukovane hroničnom konstrikcijom aorte. Takođe i tretman specifičnim inhibitorom iNOS 1400W kod divljeg soja miševa dovodi do značajnog antihipertrofičnog efekta u levoj komori. Do sličnih rezultata su došli i Shibata i sar. (2010) koji su utvrdili odsustvo hipertrofije kod miševa starosti 5 meseci kod kojih je isključen gen za iNOS i nNOS, dok je ona bila prisutna kod soja sa isključenim genom za sve eNOS i e/i/nNOS u odnosu na miševe divljeg soja. U skladu sa ovim rezultatima su i naši rezultati dobijeni kod socijalno izolovanih životinja kod kojih je povećan nivo iNOS proteina i gde je pokazana hipertrofija leve srčane komore. Ovo navodi na zaključak da povećana aktivnost iNOS u srčanim ćelijama ima bitnu ulogu u remodelovanju koje se karakteriše hipertrofijom komora.

Tretman OXT je doveo do značajnog smanjenja veličine kardiomiocita u grupi hronično izolovanih životinja u levoj komori, bez efekta u desnoj srčanoj komori. Sličan antihipertrofičan efekat OXT su pokazali i Menaouar i sar. (2014) u svojoj studiji na kulturi ćelija kardiomiocita komora novorođenih i odraslih pacova. Tretman ćelijske kulture OXT pre tretmana endotelinom 1(ET-1) i angiotenzinom 2, koji indukuju srčanu hipertrofiju, sprečava pojavu hipertrofije u ćelijskoj kulturi komora kako novorođenih tako i odraslih pacova. Pokazali su da za inhibiciju hipertrofije indukovane ET-1 od strane OXT dolazi aktivacijom više posrednika. Tretman OXT dovodi do povećanja nivoa ANP kao i cGMP u kardiomiocitima. Ovo povećanje ANP u kardiomiocitima kao posledica tretmana OXT izgleda da inhibira hipertrofiju kardiomiocita, najverovatnije posredstvom cGMP zavisnog procesa. Kako su i NO i ANP odgovorni za stvaranje cGMP, oni su pokazali da tretman OXT u kombinaciji sa tretmanom nespecifičnim inhibitorom NOS L-NAME blokira antihipertrofni efekat OXT. Činjenica da tretman nespecifičnim inhibitorom NOS L-NAME blokira aktivnost OXT ukazuje da NO vezana guanil ciklaza takođe doprinosi inhibiciji hipertrofije.

Stres socijalne izolacije u trajanju od 12 nedelja je doveo do hipertrofije leve srčane komore bez promene na mišićnom tkivu srca, dok je tretman OXT je pokazao kardioprotektivni antihipertrofni efekat.

VI ZAKLJUČAK

Stres hronične socijalne izolacije:

- doveo je do promena u ponašanju životinja, povećanjem simptoma anksioznog ponašanja
- uticao je na povećanje relativne težine desne nadbubrežne žlezde i nije doveo do promena u telesnoj težini životinja i u težini srca
- doveo je do povećanja koncentracije ADR i NA u plazmi
- u srži nadbubrežne žlezde doveo je do povećanja nivoa TH i VMAT2 proteina i smanjenja nivoa NET proteina, bez promena u količini ADR i NA
- doveo je do ispoljavanja asimetrije u aktivnosti leve i desne stelatne ganglije tako što je povećao ekspresiju gena za TH i NET u desnoj stelatnoj gangliji, dok je u levoj smanjio nivo TH proteina i nivo iRNK za NET i VMAT2, bez menjanja koncentracije ADR i NA u obe stelatne ganglije
- u levoj pretkomori uticao je na povećanje nivoa NA, smanjenje nivoa iRNK za TH, nije promenio ekspresiju gena za transportere, dok je u desnoj pretkomori uticao na smanjenje nivoa TH proteina, povećanje nivoa NET proteina i ekspresije gena za VMAT2 i nije menjao količinu NA
- u levoj i desnoj pretkomori doveo je do povećanja nivoa ekspresije gena za M₂ MR receptor, bez promena u ekspresiji gena za β₃-AR
- u levoj komori doveo je do povećanja nivoa NA i TH proteina bez promena ekspresije gena za transportere, dok je u desnoj komori povećao ekspresiju gena za TH bez promena nivoa transportera i količine NA
- nije doveo do promena u nivou β₃-AR u levoj i desnoj komori, dok je smanjio nivo iRNK za M₂ MR samo u levoj komori
- doveo je do povećanja nivoa iNOS proteina u levoj komori
- uticao je na povećanje prečnika kardiomiocita u zidu leve komore

Tretman OXT:

- pokazao je anksiolitičko dejstvo kod socijalno izolovanih životinja
- doveo je do povećanja relativne težine leve nadbubrežne žlezde kod kontrolnih životinja i smanjenja relativne težine srca kod socijalno izolovanih životinja
- uticao je na smanjenje koncentracije ADR i NA u plazmi kod socijalno izolovanih pacova
- u srži nadbubrežne žlezde uticao je na povećanje nivoa NET proteina i ekspresije gena za VMAT2, dok nije uticao na količinu ADR, NA i ekspresije gena za TH
- u desnoj stelatnoj gangliji doveo je do smanjenja nivoa ekspresije gena za TH, dok u levoj stelatnoj gangliji nije uticao na ekspresiju gena za TH kao i ekspresiju gena za NET i VMAT2 u levoj i desnoj stelatnoj gangliji
- u levoj i desnoj pretkomori uticao je na smanjenje nivoa iRNK za TH bez promena u količini TH proteina, NA i ekspresije gena za NET i VMAT2
- u levoj i desnoj pretkomori doveo je do povećanja nivoa β_3 -AR proteina i smanjenja nivoa iRNK za M_2 MR uz nepromenjenost vrednosti proteina
- u levoj i desnoj komori nije uticao na nivo ADR, NA i ekspresiju gena za TH, dok je povećao nivo NET proteina u levoj komori i doveo do različite regulacije VMAT2 u komorama
- doveo je do smanjenja nivoa β_3 -AR proteina i povećanja nivoa ekspresije gena za MR M_2 u levoj komori bez promene nivoa ova dva receptora u desnoj komori
- nije doveo do daljih promena u nivou iNOS proteina u komorama
- uticao je na smanjenje veličine kardiomiocita u levoj srčanoj komori kod socijalno izolovanih životinja

Na osnovu ovih rezultata mogu se izvesti sledeći generalni zaključci:

- OXT je potvrdio svoje anksiolitičko dejstvo kod socijalno izolovanih životinja kod kojih je došlo do promena u ponašanju kao posledica stresa
- U srži nadbubrežne žlezde OXT je pospešio skladištenje kateholamina u uslovima neizmenjene homeostaze, dok je u uslovima stresa socijalne izolacije pored povećanog skladištenja, povećao i proces preuzimanja kateholamina, bez uticaja na sintezu kateholamina
- OXT je smanjio povećanu simpatičku aktivnost desne stelatne ganglije u uslovima stresa, smanjujući sintezu kateholamina
- OXT nije značajnije uticao na sintezu, preuzimanje i skladištenje kateholamina u pretkomorama u uslovima stresa, dok je povećanjem nivoa NET proteina u levoj komori ispoljio kardioprotektivni efekat u uslovima stresa
- OXT je ostvario kardioprotektivno dejstvo u srcu, povećanjem nivoa β_3 -AR u pretkomorama i povećanjem nivoa M_2 MR receptora u levoj komori
- OXT je pokazao antihipertrofično dejstvo u levoj komori, tako što je smanjio uvećane kardiomiocyte nastale kao posledica izlaganja životinja hroničnoj socijalnoj izolaciji u trajanju od 12 nedelja

VII LITERATURA

- Antoni, F. A., M. C. Holmes i M. T. Jones (1983).** "Oxytocin as well as vasopressin potentiate ovine CRF in vitro." Peptides 4(4): 411-415.
- Archer, J. (1973).** "Test for emotionality in rats and mice: a review." Animal Behaviour 21: 205-235.
- Armour, J. A., K. Collier, G. Kember i J. L. Ardell (1998).** "Differential selectivity of cardiac neurons in separate intrathoracic autonomic ganglia." Am J Physiol 274(4 Pt 2): R939-949.
- Arpin-Bott, M. P., B. Kaissling, E. Waltisperger, M. Rabhi, P. Saussine, M. J. Freund-Mercier i M. E. Stoeckel (2002).** "Historadioautographic localization of oxytocin and V1a vasopressin binding sites in the kidney of developing and adult rabbit, mouse and merione and of adult human." Exp Nephrol 10(3): 196-208.
- Backs, J., A. Haunstetter, S. H. Gerber, J. Metz, M. M. Borst, R. H. Strasser, W. Kubler i M. Haass (2001).** "The neuronal norepinephrine transporter in experimental heart failure: evidence for a posttranscriptional downregulation." J Mol Cell Cardiol 33(3): 461-472.
- Bales, K. L., A. M. Perkeybile, O. G. Conley, M. H. Lee, C. D. Guynes, G. M. Downing, C. R. Yun, M. Solomon, S. Jacob i S. P. Mendoza (2013).** "Chronic intranasal oxytocin causes long-term impairments in partner preference formation in male prairie voles." Biol Psychiatry 74(3): 180-188.
- Barton, D. A., T. Dawood, E. A. Lambert, M. D. Esler, D. Haikerwal, C. Brenchley, F. Socratous, D. M. Kaye, M. P. Schlaich, I. Hickie i G. W. Lambert (2007).** "Sympathetic activity in major depressive disorder: identifying those at increased cardiac risk?" J Hypertens 25(10): 2117-2124.
- Baruchin, A., R. R. Vollmer, L. L. Miner, S. L. Sell, E. M. Stricker i B. B. Kaplan (1993).** "Cold-induced increases in phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) mRNA are mediated by non-cholinergic mechanisms in the rat adrenal gland." Neurochem Res 18(7): 759-766.
- Bediako, S. M. i R. Friend (2004).** "Illness-specific and general perceptions of social relationships in adjustment to rheumatoid arthritis: the role of interpersonal expectations." Ann Behav Med 28(3): 203-210.
- Benes, J., M. Novakova, J. Rotkova, V. Farar, R. Kvetnansky, V. Riljak i J. Myslivecek (2012).** "Beta3 adrenoceptors substitute the role of M(2) muscarinic

receptor in coping with cold stress in the heart: evidence from M(2)KO mice." Cell Mol Neurobiol 32(5): 859-869.

Benes, J., E. Varejkova, V. Farar, M. Novakova i J. Myslivecek (2012). "Decrease in heart adrenoceptor gene expression and receptor number as compensatory tool for preserved heart function and biological rhythm in M(2) KO animals." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 385(12): 1161-1173.

Bernard, C. (1859). Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme. Paris, Baillière.

Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature 415(6868): 198-205.

Blevins, J. E. i J. M. Ho (2013). "Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight." Reviews in endocrine & metabolic disorders 14(4): 311-329.

Bobrovskaya, L., D. Beard, E. Bondarenko, M. I. Beig, P. Jobling, F. R. Walker, T. A. Day i E. Nalivaiko (2013). "Does exposure to chronic stress influence blood pressure in rats?" Auton Neurosci 177(2): 217-223.

Boden-Albala, B., E. Litwak, M. S. Elkind, T. Rundek i R. L. Sacco (2005). "Social isolation and outcomes post stroke." Neurology 64(11): 1888-1892.

Bosch, O. J., H. P. Nair, T. H. Ahern, I. D. Neumann i L. J. Young (2009). "The CRF System Mediates Increased Passive Stress-Coping Behavior Following the Loss of a Bonded Partner in a Monogamous Rodent." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 34(6): 1406-1415.

Brodde, O. E. (1993). "Beta-adrenoceptors in cardiac disease." Pharmacol Ther 60(3): 405-430.

Cacioppo, J. T. i L. C. Hawkley (2009). "Perceived social isolation and cognition." Trends Cogn Sci 13(10): 447-454.

Cannon, W. B. (1929). "Organization for physiological homeostasis." Physiological Reviews 9(3): 399-431.

Carlier, P. G., A. F. Crine, N. M. Yerna i G. L. Rorive (1988). "Cardiovascular structural changes induced by isolation-stress hypertension in the rat." J Hypertens Suppl 6(4): S112-115.

Carnevali, L., F. Mastorci, G. Graiani, M. Razzoli, M. Trombini, M. A. Pico-Alfonso, R. Arban, A. J. Grippo, F. Quaini i A. Sgoifo (2012). "Social defeat and isolation induce clear signs of a depression-like state, but modest cardiac alterations in wild-type rats." Physiol Behav 106(2): 142-150.

Chen, Y., G. Hu, Q. Fu i X. Jin (2013). "Effect of stellate ganglion block on reconstruction of the left ventricle in spontaneously hypertensive rats." Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 38(1): 43-47.

Chidsey, C. A., E. Braunwald i A. G. Morrow (1965). "Catecholamine excretion and cardiac stores of norepinephrine in congestive heart failure." Am J Med 39: 442-451.

Chidsey, C. A., E. Braunwald, A. G. Morrow i D. T. Mason (1963). "Myocardial norepinephrine concentration in man effects of reserpine and of congestive heart failure." N Engl J Med 269: 653-658.

Chrousos, G. P. i P. W. Gold (1992). "The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis." JAMA 267(9): 1244-1252.

Colucci, W. S., R. F. Wright i E. Braunwald (1986). "New positive inotropic agents in the treatment of congestive heart failure. Mechanisms of action and recent clinical developments. 2." N Engl J Med 314(6): 349-358.

Communal, C., K. Singh, D. B. Sawyer i W. S. Colucci (1999). "Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein." Circulation 100(22): 2210-2212.

Cruz, F. C., J. O. Duarte, R. M. Leao, L. F. Hummel, C. S. Planeta i C. C. Crestani (2016). "Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: Immediate and long-term effects of social isolation during adolescence." Dev Neurobiol 76(1): 34-46.

Da Prada, M. i Zurcher (1976). "Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within the femtomole range." Life Sci 19(8): 1161-1174.

Danalache, B. A., J. Gutkowska, M. J. Slusarz, I. Berezowska i M. Jankowski (2010). "Oxytocin-Gly-Lys-Arg: a novel cardiomyogenic peptide." PLoS One 5(10): e13643.

- Das, B. i C. Sarkar (2012).** "Is preconditioning by oxytocin administration mediated by iNOS and/or mitochondrial K(ATP) channel activation in the in vivo anesthetized rabbit heart?" Life Sci 90(19-20): 763-769.
- DeVries, A. C., T. K. Craft, E. R. Glasper, G. N. Neigh i J. K. Alexander (2007).** "2006 Curt P. Richter award winner: Social influences on stress responses and health." Psychoneuroendocrinology 32(6): 587-603.
- Dewey, K. G. (2001).** "Maternal and fetal stress are associated with impaired lactogenesis in humans." J Nutr 131(11): 3012S-3015S.
- Diaz Borges, J. M., Urbina, M.,Drujan, B. D. (1978).** "Some properties of phenylethanolamine-N-methyltransferase of rat brain." Neurochem Res 3(1): 15-26.
- Dimond, M. (1979).** "Social support and adaptation to chronic illness: the case of maintenance hemodialysis." Res Nurs Health 2(3): 101-108.
- Dincer, U. D., K. R. Bidasee, S. Guner, A. Tay, A. T. Ozcelikay i V. M. Altan (2001).** "The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts." Diabetes 50(2): 455-461.
- Domeney, A. i J. Feldon (1998).** "The Disruption of Prepulse Inhibition by Social Isolation in the Wistar Rat: How Robust Is the Effect?" Pharmacology Biochemistry and Behavior 59(4): 883-890.
- Douglas, A. J., Brunton, P. J., Bosch, O. J., Russell, J. A., Neumann, I. D. (2003).** "Neuroendocrine responses to stress in mice: hyporesponsiveness in pregnancy and parturition." Endocrinology 144(12): 5268-5276.
- Drexler, H., S. Kastner, A. Strobel, R. Studer, O. E. Brodde i G. Hasenfuss (1998).** "Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart." J Am Coll Cardiol 32(4): 955-963.
- Dronjak, S., D. Jezova i R. Kvetnansky (2004).** "Different effects of novel stressors on sympathoadrenal system activation in rats exposed to long-term immobilization." Ann NY Acad Sci 1018: 113-123.
- Duncko, R., A. Kiss, I. Skultetyova, M. Rusnak i D. Jezova (2001).** "Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decrease in both sexes." Psychoneuroendocrinology 26(1): 77-89.

Ebert, S. N., Q. Rong, S. Boe i K. Pfeifer (2008). "Catecholamine-synthesizing cells in the embryonic mouse heart." Ann N Y Acad Sci 1148: 317-324.

Eiden, L. E., Schutz, B., Anlauf, M., Depboylu, C., Schafer, M.K.H. i E. Weihe. (2002). The vesicular monoamine transporters (VMATs): role in the chemical coding of neuronal transmission and monoamine storage in amine-handling immune and inflammatory cells. Catecholamine Research: From Molecular Insights to Clinical Medicine. T. Nagatsu, Nabeshima, T., McCarty, R., Goldstein, D.S. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 23–33.

Einon, D. i M. Morgan (1976). "Habituation of object contact in socially-reared and isolated rats (*Rattus norvegicus*)." Animal Behaviour 24(2): 415-420.

Eisenhofer, G. (2001). "The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines." Pharmacol Ther 91(1): 35-62.

Eisenhofer, G., H. S. Cox i M. D. Esler (1990). "Parallel increases in noradrenaline reuptake and release into plasma during activation of the sympathetic nervous system in rabbits." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 342(3): 328-335.

Eisenhofer, G., M. D. Esler, I. T. Meredith, C. Ferrier, G. Lambert i G. Jennings (1991). "Neuronal re-uptake of noradrenaline by sympathetic nerves in humans." Clin Sci (Lond) 80(3): 257-263.

Eisenhofer, G., P. Friberg, B. Rundqvist, A. A. Quyyumi, G. Lambert, D. M. Kaye, I. J. Kopin, D. S. Goldstein i M. D. Esler (1996). "Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure." Circulation 93(9): 1667-1676.

Eisenhofer, G., D. S. Goldstein, T. G. Ropchak, H. Q. Nguyen, H. R. Keiser i I. J. Kopin (1988). "Source and physiological significance of plasma 3,4-dihydroxyphenylglycol and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol." J Auton Nerv Syst 24(1-2): 1-14.

Eisenhofer, G., I. J. Kopin i D. S. Goldstein (2004). "Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine." Pharmacol Rev 56(3): 331-349.

Eisenhofer, G., I. J. Kopin i D. S. Goldstein (2004). "Leaky catecholamine stores: undue waste or a stress response coping mechanism?" Ann N Y Acad Sci 1018: 224-230.

Empana, J. P., X. Jouven, R. Lemaitre, N. Sotoodehnia, T. Rea, T. Raghunathan, G. Simon i D. Siscovick (2008). "Marital status and risk of out-of-hospital sudden cardiac arrest in the population." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 15(5): 577-582.

Esler, M., G. Jackman, A. Bobik, D. Kelleher, G. Jennings, P. Leonard, H. Skews i P. Korner (1979). "Determination of norepinephrine apparent release rate and clearance in humans." Life Sci 25(17): 1461-1470.

Feldman, D. S., C. A. Carnes, W. T. Abraham i M. R. Bristow (2005). "Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure." Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2(9): 475-483.

Garzon, J. i J. Del Rio (1981). "Hyperactivity induced in rats by long-term isolation: further studies on a new animal model for the detection of antidepressants." Eur J Pharmacol 74(4): 287-294.

Gauthier, C., V. Leblais, L. Kobzik, J. N. Trochu, N. Khandoudi, A. Bril, J. L. Balligand i H. Le Marec (1998). "The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle." J Clin Invest 102(7): 1377-1384.

Gavrilovic, L. i S. Dronjak (2005). "Activation of rat pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary system in response to different stressors." Neuro Endocrinol Lett 26(5): 515-520.

Gavrilovic, L., N. Spasojevic i S. Dronjak (2009). "Psychosocial stress-related changes in gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in stellate ganglia of adult rats." Auton Neurosci 150(1-2): 144-146.

Gavrilovic, L., N. Spasojevic i S. Dronjak (2010). "Chronic individual housing-induced stress decreased expression of catecholamine biosynthetic enzyme genes and proteins in spleen of adult rats." Neuroimmunomodulation 17(4): 265-269.

Gavrilovic, L., N. Spasojevic i S. Dronjak (2010). "Subsequent stress increases gene expression of catecholamine synthetic enzymes in cardiac ventricles of chronic-stressed rats." Endocrine 37(3): 425-429.

Gavrilovic, L., N. Spasojevic, N. Tanic i S. Dronjak (2008). "Chronic isolation of adult rats decreases gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes in adrenal medulla." Neuro Endocrinol Lett 29(6): 1015-1020.

- Gavrilovic, L., N. Spasojevic, M. Zivkovic i S. Dronjak (2009).** "Effect of immobilization stress on gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes in heart auricles of socially isolated rats." Braz J Med Biol Res 42(12): 1185-1190.
- Gerendai, I. i B. Halasz (1997).** "Neuroendocrine asymmetry." Front Neuroendocrinol 18(3): 354-381.
- Gibbs, D. M. (1985).** "Immunoneutralization of oxytocin attenuates stress-induced corticotropin secretion in the rat." Regul Pept 12(4): 273-277.
- Gibbs, D. M. (1986).** "Oxytocin inhibits ACTH and peripheral catecholamine secretion in the urethane-anesthetized rat." Regul Pept 14(2): 125-132.
- Gimpl, G. i F. Fahrenholz (2001).** "The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation." Physiol Rev 81(2): 629-683.
- Glymour, M. M., J. Weuve, M. E. Fay, T. Glass i L. F. Berkman (2008).** "Social ties and cognitive recovery after stroke: does social integration promote cognitive resilience?" Neuroepidemiology 31(1): 10-20.
- Goldstein, D. S. (1995).** "Stress as a scientific idea: A homeostatic theory of stress and distress." Homeostasis 4(177-215).
- Goldstein, D. S. (2001).** The autonomic nervous system in health and disease. New York, Marcel Bekker
- Goldstein, D. S. (2003).** "Catecholamines and stress." Endocrine Regulations 37: 69-80.
- Goldstein, D. S., J. E. Brush, Jr., G. Eisenhofer, R. Stull i M. Esler (1988).** "In vivo measurement of neuronal uptake of norepinephrine in the human heart." Circulation 78(1): 41-48.
- Goldstein, D. S., G. Eisenhofer i I. J. Kopin (2003).** "Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans." J Pharmacol Exp Ther 305(3): 800-811.
- Goldstein, D. S., G. Eisenhofer, R. Stull, C. J. Folio, H. R. Keiser i I. J. Kopin (1988).** "Plasma dihydroxyphenylglycol and the intraneuronal disposition of norepinephrine in humans." J Clin Invest 81(1): 213-220.

- Goldstein, D. S., C. Holmes, I. J. Kopin i Y. Sharabi (2011).** "Intra-neuronal vesicular uptake of catecholamines is decreased in patients with Lewy body diseases." The Journal of Clinical Investigation 121(8): 3320-3330.
- Goldstein, D. S. i I. J. Kopin (2007).** "Evolution of concepts of stress." Stress 10(2): 109-120.
- Gorbunova, A. V. (2000).** "Autonomic ganglionic neurones in rabbits with differing resistance to emotional stress." Stress 3(4): 309-318.
- Gray, J. A. (1987).** The psychology of fear and stress. Problems of behaviour science. J. A. Gray. Cambridge, Cambridge University Press.
- Grewen, K. M. i K. C. Light (2011).** "Plasma oxytocin is related to lower cardiovascular and sympathetic reactivity to stress." Biological psychology 87(3): 340-349.
- Grippe, A. J., D. G. Lamb, C. S. Carter i S. W. Porges (2007).** "Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors." Biol Psychiatry 62(10): 1162-1170.
- Grippe, A. J., D. M. Trahanas, R. R. Zimmerman, 2nd, S. W. Porges i C. S. Carter (2009).** "Oxytocin protects against negative behavioral and autonomic consequences of long-term social isolation." Psychoneuroendocrinology 34(10): 1542-1553.
- Grippe, A. J., K. D. Wu, I. Hassan i C. S. Carter (2008).** "Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety." Depress Anxiety 25(6): E17-26.
- Gutkowska, J. i M. Jankowski (2011).** Oxytocin as an Inducer of Cardiomyogenesis. In Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis. C. Atwood, InTech: 537-556.
- Gutkowska, J., M. Jankowski, C. Lambert, S. Mukaddam-Daher, H. H. Zingg i S. M. McCann (1997).** "Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart." Proc Natl Acad Sci U S A 94(21): 11704-11709.

- Hall, C. S. (1934).** "Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality." Journal of Comparative Psychology 18(3): 385-403.
- Hall, F. S., S. Huang, G. W. Fong, J. M. Sundstrom i A. Pert (2000).** "Differential basis of strain and rearing effects on open-field behavior in Fawn Hooded and Wistar rats." Physiology & Behavior 71(5): 525-532.
- Hefti, F., H. Gnahn, M. E. Schwab i H. Thoenen (1982).** "Induction of tyrosine hydroxylase by nerve growth factor and by elevated K⁺ concentrations in cultures of dissociated sympathetic neurons." J Neurosci 2(11): 1554-1566.
- Holahan, C. J., R. H. Moos, C. K. Holahan i P. L. Brennan (1997).** "Social context, coping strategies, and depressive symptoms: an expanded model with cardiac patients." J Pers Soc Psychol 72(4): 918-928.
- Holt-Lunstad, J., T. B. Smith i J. B. Layton (2010).** "Social relationships and mortality risk: a meta-analytic review." PLoS Med 7(7): e1000316.
- Huang, H., C. Michetti, M. Busnelli, F. Manago, S. Sannino, D. Scheggia, L. Giancardo, D. Sona, V. Murino, B. Chini, M. L. Scattoni i F. Papaleo (2014).** "Chronic and acute intranasal oxytocin produce divergent social effects in mice." Neuropsychopharmacology 39(5): 1102-1114.
- Huang, M. H., J. J. Bahl, Y. Wu, F. Hu, D. F. Larson, W. R. Roeske i G. A. Ewy (2005).** "Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol 288(2): H497-503.
- Ideker, T., V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. Eng, R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold i L. Hood (2001).** "Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network." Science 292(5518): 929-934.
- Ieraci, A., A. Mallei i M. Popoli (2016).** "Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice." Neural Plasticity 2016: 6212983.
- Irisawa, H., H. F. Brown i W. Giles (1993).** "Cardiac pacemaking in the sinoatrial node." Physiol Rev 73(1): 197-227.

- Iversen, L. L. (1997).** "The uptake of catechol amines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catechol amine uptake process. 1964." Br J Pharmacol 120(4 Suppl): 267-282; discussion 264-266.
- Jankowska, E., O. Pucilowski i W. Kostowski (1991).** "Chronic oral treatment with diltiazem or verapamil decreases isolation-induced activity impairment in elevated plus maze." Behav Brain Res 43(2): 155-158.
- Jankowski, M., V. Bissonauth, L. Gao, M. Gangal, D. Wang, B. Danalache, Y. Wang, E. Stoyanova, G. Cloutier, G. Blaise i J. Gutkowska (2010).** "Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction." Basic Res Cardiol 105(2): 205-218.
- Jankowski, M., Hajjar W., D., Mukaddam-Daher F., McCann S. M. i J. Gutkowska (2000).** "Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A 97(11): 6207-6211.
- Kennedy, B., H. Elayan i M. G. Ziegler (1993).** "Glucocorticoid elevation of mRNA encoding epinephrine-forming enzyme in lung." Am J Physiol 265(2 Pt 1): L117-120.
- Kennedy, B. i M. G. Ziegler (1991).** "Cardiac epinephrine synthesis. Regulation by a glucocorticoid." Circulation 84(2): 891-895.
- Klenerova, V., I. Krejci, P. Sida, Z. Hlinak i S. Hynie (2009).** "Modulatory effects of oxytocin and carbetocin on stress-induced changes in rat behavior in the open-field." J Physiol Pharmacol 60(2): 57-62.
- Kop, W. J., T. F. Galvao, S. J. Synowski, W. Xu, A. Can, K. M. O'Shea, T. D. Gould i W. C. Stanley (2015).** "Effects of environmental stress following myocardial infarction on behavioral measures and heart failure progression: The influence of isolated and group housing conditions." Physiol Behav 152(Pt A): 168-174.
- Krejci, A. i S. Tucek (2002).** "Quantitation of mRNAs for M(1) to M(5) subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex." Mol Pharmacol 61(6): 1267-1272.
- Krizanova, O., L. Micutkova, J. Jelokova, M. Filipenko, E. Sabban i R. Kvetnansky (2001).** "Existence of cardiac PNMT mRNA in adult rats: elevation by stress in a glucocorticoid-dependent manner." Am J Physiol Heart Circ Physiol 281(3): H1372-1379.

Kubovcakova, L., L. Micutkova, Z. Bartosova, E. L. Sabban, O. Krizanova i R. Kvetnansky (2006). "Identification of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression in stellate ganglia and its modulation by stress." J Neurochem 97(5): 1419-1430.

Kubovcakova, L., K. Tybitanclova, E. L. Sabban, J. Majzoub, S. Zorad, I. Vietor, E. F. Wagner, O. Krizanova i R. Kvetnansky (2004). "Catecholamine synthesizing enzymes and their modulation by immobilization stress in knockout mice." Ann N Y Acad Sci 1018: 458-465.

Kulandavelu, S. i J. M. Hare (2012). "Alterations in beta3-adrenergic cardiac innervation and nitric oxide signaling in heart failure." J Am Coll Cardiol 59(22): 1988-1990.

Kurisu, S., H. Sato, T. Kawagoe, M. Ishihara, Y. Shimatani, K. Nishioka, Y. Kono, T. Umemura i S. Nakamura (2002). "Tako-tsubo-like left ventricular dysfunction with ST-segment elevation: a novel cardiac syndrome mimicking acute myocardial infarction." Am Heart J 143(3): 448-455.

Kurz, T., G. Richardt, M. Seyfarth i A. Schomig (1996). "Nonexocytotic noradrenaline release induced by pharmacological agents or anoxia in human cardiac tissue." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 354(1): 7-16.

Kvetnansky, R. (2004). "Stressor specificity and effect of prior experience on catecholamine biosynthetic enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase." Ann N Y Acad Sci 1032: 117-129.

Kvetnansky, R., J. Jelokova, M. Rusnak, S. Dronjak, L. Serova, B. Nankova i E. L. Sabban (2002). Novel stressors exaggerate tyrosine hydroxylase gene expression in the adrenal medulla of rats exposed to long-term cold stress. Stress neural, endocrine and molecular studies. R. McCarty, Aguilera, G., Sabban, E.L., Kvetnansky, R. . New York, Gordon and Breach Science Publishers: 121-128.

Kvetnansky, R., L. Micutkova, N. Rychkova, L. Kubovcakova, B. Mravec, M. Filipenko, E. L. Sabban i O. Krizanova (2004). "Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic Ganglia of stressed rats." Ann N Y Acad Sci 1018: 356-369.

Kvetnansky, R. i L. Mikulaj (1970). "Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress." Endocrinology 87(4): 738-743.

Kvetnansky, R., M. Rusnak, S. Dronjak, O. Krizanova i E. L. Sabban (2003). "Effect of novel stressors on tyrosine hydroxylase gene expression in the adrenal medulla of repeatedly immobilized rats." Neurochem Res 28(3-4): 625-630.

Kvetnansky, R., E. L. Sabban i M. Palkovits (2009). "Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches." Physiol Rev 89(2): 535-606.

Kvetnansky, R., V. K. Weise, G. P. Gewirtz i I. J. Kopin (1971). "Synthesis of adrenal catecholamines in rats during and after immobilization stress." Endocrinology 89(1): 46-49.

Kvetnansky, R., V. K. Weise i I. J. Kopin (1970). "Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase by repeated immobilization of rats." Endocrinology 87(4): 744-749.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.

Laukova, M., A. Tillinger, M. Novakova, O. Krizanova, R. Kvetnansky i J. Myslivecek (2014). "Repeated immobilization stress increases expression of beta3 -adrenoceptor in the left ventricle and atrium of the rat heart." Stress Health 30(4): 301-309.

Lee, H. J., A. H. Macbeth, J. H. Pagani i W. S. Young, 3rd (2009). "Oxytocin: the great facilitator of life." Prog Neurobiol 88(2): 127-151.

Lee, J., E. H. Bae, S. K. Ma i S. W. Kim (2016). "Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases." Chonnam Med J 52(2): 81-90.

Li, H., S. K. Ma, X. P. Hu, G. Y. Zhang i J. Fei (2001). "Norepinephrine transporter (NET) is expressed in cardiac sympathetic ganglia of adult rat." Cell Res 11(4): 317-320.

Li, W., D. Knowlton, W. R. Woodward i B. A. Habecker (2003). "Regulation of noradrenergic function by inflammatory cytokines and depolarization." J Neurochem 86(3): 774-783.

- Liu, X., R. Wu, F. Tai, L. Ma, B. Wei, X. Yang, X. Zhang i R. Jia (2013).** "Effects of group housing on stress induced emotional and neuroendocrine alterations." Brain Res 1502: 71-80.
- Livak, K. J. i T. D. Schmittgen (2001).** "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-408.
- Loffelholz, K. i A. J. Pappano (1985).** "The parasympathetic neuroeffector junction of the heart." Pharmacol Rev 37(1): 1-24.
- Lohse, M. J., S. Engelhardt i T. Eschenhagen (2003).** "What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?" Circ Res 93(10): 896-906.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr i R. J. Randall (1951).** "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem 193(1): 265-275.
- Luanaigh, C. O. i B. A. Lawlor (2008).** "Loneliness and the health of older people." Int J Geriatr Psychiatry 23(12): 1213-1221.
- Lujan, H. L., H. Janbaih i S. E. DiCarlo (2012).** "Dynamic interaction between the heart and its sympathetic innervation following T5 spinal cord transection." J Appl Physiol (1985) 113(8): 1332-1341.
- MacKay, V. L., X. Li, M. R. Flory, E. Turcott, G. L. Law, K. A. Serikawa, X. L. Xu, H. Lee, D. R. Goodlett, R. Aebersold, L. P. Zhao i D. R. Morris (2004).** "Gene expression analyzed by high-resolution state array analysis and quantitative proteomics: response of yeast to mating pheromone." Mol Cell Proteomics 3(5): 478-489.
- Maejima, Y., Y. Iwasaki, Y. Yamahara, M. Kodaira, U. Sedbazar i T. Yada (2011).** "Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass." Aging (Albany NY) 3(12): 1169-1177.
- Mann, D. L., R. L. Kent, B. Parsons i G. t. Cooper (1992).** "Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte." Circulation 85(2): 790-804.
- Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber i N. E. Tolbert (1978).** "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." Anal Biochem 87(1): 206-210.
- Marteau, T. M., S. Bloch i J. D. Baum (1987).** "Family life and diabetic control." J Child Psychol Psychiatry 28(6): 823-833.

McEwen, B. S. (1998). "Protective and damaging effects of stress mediators." N Engl J Med 338(3): 171-179.

Menaouar, A., M. Florian, D. Wang, B. Danalache, M. Jankowski i J. Gutkowska (2014). "Anti-hypertrophic effects of oxytocin in rat ventricular myocytes." Int J Cardiol 175(1): 38-49.

Meredith, I. T., G. Eisenhofer, G. W. Lambert, E. M. Dewar, G. L. Jennings i M. D. Esler (1993). "Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure. Evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake." Circulation 88(1): 136-145.

Moens, A. L., R. Yang, V. L. Watts i L. A. Barouch (2010). "Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system." J Mol Cell Cardiol 48(6): 1088-1095.

Mori, H., S. Ishikawa, S. Kojima, J. Hayashi, Y. Watanabe, J. I. Hoffman i H. Okino (1993). "Increased responsiveness of left ventricular apical myocardium to adrenergic stimuli." Cardiovasc Res 27(2): 192-198.

Morita, K., A. Kuwada, A. Sano, M. Sakata, H. Sei i Y. Morita (2001). "Semi-quantitative RT-PCR analysis of environmental influence on P450_{scc} and PNMT mRNA expression in rat adrenal glands." Life Sci 70(1): 73-80.

Mungrue, I. N., R. Gros, X. You, A. Pirani, A. Azad, T. Csont, R. Schulz, J. Butany, D. J. Stewart i M. Husain (2002). "Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death." J Clin Invest 109(6): 735-743.

Murrell, T. G. (1995). "The potential for oxytocin (OT) to prevent breast cancer: a hypothesis." Breast Cancer Res Treat 35(2): 225-229.

Myslivecek, J., J. Ricny, M. Palkovits i R. Kvetnansky (2004). "The effects of short-term immobilization stress on muscarinic receptors, beta-adrenoceptors, and adenylyl cyclase in different heart regions." Ann N Y Acad Sci 1018: 315-322.

Myslivecek, J., A. Tillinger, M. Novakova i R. Kvetnansky (2008). "Regulation of adrenoceptor and muscarinic receptor gene expression after single and repeated stress." Ann N Y Acad Sci 1148: 367-376.

Nagatsu, T. (1995). "Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology." Essays Biochem 30: 15-35.

Nankova, B., R. Kvetnansky, B. Hiremagalur, B. Sabban, M. Rusnak i E. L. Sabban (1996). "Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids." Endocrinology 137(12): 5597-5604.

Nankova, B., R. Kvetnansky, A. McMahon, E. Viskupic, B. Hiremagalur, G. Frankle, K. Fukuhara, I. J. Kopin i E. L. Sabban (1994). "Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by a nonneuronal nonpituitary-mediated mechanism in immobilization stress." Proc Natl Acad Sci U S A 91(13): 5937-5941.

Nantel, F., H. Bonin, L. J. Emorine, V. Zilberfarb, A. D. Strosberg, M. Bouvier i S. Marullo (1993). "The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization." Mol Pharmacol 43(4): 548-555.

Neumann, I. D. (2002). "Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis." Prog Brain Res 139: 147-162.

Niu, X., V. L. Watts, O. H. Cingolani, V. Sivakumaran, J. S. Leyton-Mange, C. L. Ellis, K. L. Miller, K. Vandegaer, D. Bedja, K. L. Gabrielson, N. Paolucci, D. A. Kass i L. A. Barouch (2012). "Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase." J Am Coll Cardiol 59(22): 1979-1987.

Nozdrachev, A. D., B. Jimenez, M. A. Morales i M. M. Fateev (2002). "Neuronal organization and cell interactions of the cat stellate ganglion." Auton Neurosci 95(1-2): 43-56.

Ondrejčáková, M., J. Bakos, A. Garafova, L. Kovacs, R. Kvetnansky i D. Jezova (2010). "Neuroendocrine and cardiovascular parameters during simulation of stress-induced rise in circulating oxytocin in the rat." Stress 13(4): 314-322.

Otten, U., U. Paravicini, F. Oesch i H. Thoenen (1973). "Time requirement for the single steps of trans-synaptic induction of tyrosine hydroxylase in the peripheral sympathetic nervous system." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 280(2): 117-127.

Pacak, K. i M. Palkovits (2001). "Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders." Endocr Rev 22(4): 502-548.

- Pacak, K., M. Palkovits, G. Yadid, R. Kvetnansky, I. J. Kopin i D. S. Goldstein (1998).** "Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity." Am J Physiol 275(4 Pt 2): R1247-1255.
- Pardini, B. J., D. D. Lund i P. G. Schmid (1989).** "Organization of the sympathetic postganglionic innervation of the rat heart." J Auton Nerv Syst 28(3): 193-201.
- Pardini, B. J., D. D. Lund i P. G. Schmid (1990).** "Innervation patterns of the middle cervical--stellate ganglion complex in the rat." Neurosci Lett 117(3): 300-306.
- Petersson, M., A. L. Hulting i K. Uvnas-Moberg (1999).** "Oxytocin causes a sustained decrease in plasma levels of corticosterone in rats." Neurosci Lett 264(1-3): 41-44.
- Petrović, V. M., Janić-Sibalić, V. (1980).** Catecholamine synthesizing and degrading enzymes in the heat stressed or adapted rats. Catecholamines and stress: Recent advances. E. K. Usidin, R. Kopin, I.J. New York, Elsevier North Holland: 365-370.
- Peuler, J. D. i G. A. Johnson (1977).** "Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine." Life Sci 21(5): 625-636.
- Plecas, B., N. Ugresic, M. Hristic, A. Popovic i D. Jovovic (1989).** "The response of rat adrenal medulla to oxytocin." Arch Int Physiol Biochim 97(3): 303-308.
- Prut, L. i C. Belzung (2003).** "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review." Eur J Pharmacol 463(1-3): 3-33.
- Pullar, C. E., A. Rizzo i R. R. Isseroff (2006).** "beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis." J Biol Chem 281(30): 21225-21235.
- Rodriguez, C. J., M. S. V. Elkind, L. Clemow, Z. Jin, M. Di Tullio, R. L. Sacco, S. Homma i B. Boden-Albala (2011).** "Association between Social Isolation and Left Ventricular Mass." The American journal of medicine 124(2): 164-170.
- Rona, G. (1985).** "Catecholamine cardiotoxicity." J Mol Cell Cardiol 17(4): 291-306.

- Rozec, B., M. Erfanian, K. Laurent, J. N. Trochu i C. Gauthier (2009).** "Nebivolol, a vasodilating selective beta(1)-blocker, is a beta(3)-adrenoceptor agonist in the nonfailing transplanted human heart." J Am Coll Cardiol 53(17): 1532-1538.
- Russell, J. A., Leng, G., Bicknell, R. J. (1995).** "Opioid tolerance and dependence in the magnocellular oxytocin system: a physiological mechanism?" Exp Physiol 80(3): 307-340.
- Rutledge, T., S. E. Linke, M. B. Olson, J. Francis, B. D. Johnson, V. Bittner, K. York, C. McClure, S. F. Kelsey, S. E. Reis, C. E. Cornell, V. Vaccarino, D. S. Sheps, L. J. Shaw, D. S. Krantz, S. Parashar i C. N. Merz (2008).** "Social networks and incident stroke among women with suspected myocardial ischemia." Psychosom Med 70(3): 282-287.
- Sabban, E. L., A. Tillinger, R. Nostramo i L. Serova (2012).** "Stress triggered changes in expression of genes for neurosecretory granules in adrenal medulla." Cell Mol Neurobiol 32(5): 795-800.
- Sala, G., L. Brighina, E. Saracchi, S. Fermi, C. Riva, V. Carrozza, M. Pirovano i C. Ferrarese (2010).** "Vesicular monoamine transporter 2 mRNA levels are reduced in platelets from patients with Parkinson's disease." J Neural Transm (Vienna) 117(9): 1093-1098.
- Schroeder, C. i J. Jordan (2012).** "Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease." Am J Physiol Heart Circ Physiol 303(11): H1273-1282.
- Schwartz, K., G. Yadid, A. Weizman i M. Rehavi (2003).** "Decreased limbic vesicular monoamine transporter 2 in a genetic rat model of depression." Brain Res 965(1-2): 174-179.
- Selye, H. (1950).** "Stress and the General Adaptation Syndrome." British Medical Journal 4667(1): 1383-1392.
- Selye, H. (1956).** The stress of life. New York, McGraw-Hill.
- Selye, H. (1976).** Stress without distress. Psychopathology of Human Adaptation: 137-146.
- Serikawa, K. A., X. L. Xu, V. L. MacKay, G. L. Law, Q. Zong, L. P. Zhao, R. Bumgarner i D. R. Morris (2003).** "The transcriptome and its translation during

recovery from cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Proteomics 2(3): 191-204.

Sgoifo, A., J. Koolhaas, E. Alleva, E. Musso i S. Parmigiani (2001). "Social stress. Acute and long-term effects on physiology and behavior." Physiol Behav 73(3): 253-254.

Shibata, K., Y. Yatera, Y. Furuno, K. Sabanai, N. Morisada, S. Nakata, T. Morishita, F. Yamazaki, A. Tanimoto, Y. Sasaguri, H. Tasaki, Y. Nakashima, H. Shimokawa, N. Yanagihara, Y. Otsuji i M. Tsutsui (2010). "Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases." Circ J 74(12): 2681-2692.

Skeberdis, V. A., V. Gendviliene, D. Zablockaitė, R. Treinys, R. Macianskiene, A. Bogdelis, J. Jurevicius i R. Fischmeister (2008). "beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca²⁺ current." J Clin Invest 118(9): 3219-3227.

Spasojevic, N., P. Jovanovic i S. Dronjak (2015). "Differential regulation of catecholamine synthesis and transport in rat adrenal medulla by fluoxetine treatment." An Acad Bras Cienc 87(1): 343-350.

Srisawat, R., M. Ludwig, P. M. Bull, A. J. Douglas, J. A. Russell i G. Leng (2000). "Nitric oxide and the oxytocin system in pregnancy." J Neurosci 20(17): 6721-6727.

Sterling, P., Eyer, J. (1981). Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. Handbook of life stress, cognition, and health. R. H. Fisher S. New York, John Wiley and Sons.

Swedberg, K., C. Viquerat, J. L. Rouleau, M. Roizen, B. Atherton, W. W. Parmley i K. Chatterjee (1984). "Comparison of myocardial catecholamine balance in chronic congestive heart failure and in angina pectoris without failure." Am J Cardiol 54(7): 783-786.

Tai, T. C., R. Claycomb, B. J. Siddall, R. A. Bell, R. Kvetnansky i D. L. Wong (2007). "Stress-induced changes in epinephrine expression in the adrenal medulla in vivo." J Neurochem 101(4): 1108-1118.

Tavernier, G., G. Toumaniantz, M. Erfanian, M. F. Heymann, K. Laurent, D. Langin i C. Gauthier (2003). "beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease

of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor." Cardiovasc Res 59(2): 288-296.

Toenen, H. (1970). "Induction of tyrosine hydroxylase in peripheral and central adrenergic neurones by cold-exposure of rats." Nature 228(5274): 861-862.

Toenen, H. (1972). "Comparison between the effect of neuronal activity and nerve growth factor on the enzymes involved in the synthesis of norepinephrine." Pharmacol Rev 24(2): 255-267.

Thorsell, A., C. J. Slawecki, A. El Khoury, A. A. Mathe i C. L. Ehlers (2006). "The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats." Pharmacol Biochem Behav 83(1): 28-34.

Tillinger, A., M. Novakova, O. Krizanova, R. Kvetnansky i J. Myslivecek (2014). "Heart ventricles specific stress-induced changes in beta-adrenoceptors and muscarinic receptors." Gen Physiol Biophys 33(3): 357-364.

Tillinger, A., A. Sollas, L. I. Serova, R. Kvetnansky i E. L. Sabban (2010). "Vesicular monoamine transporters (VMATs) in adrenal chromaffin cells: stress-triggered induction of VMAT2 and expression in epinephrine synthesizing cells." Cell Mol Neurobiol 30(8): 1459-1465.

Tomankova, H., P. Valuskova, E. Varejkova, J. Rotkova, J. Benes i J. Myslivecek (2015). "The M2 muscarinic receptors are essential for signaling in the heart left ventricle during restraint stress in mice." Stress 18(2): 208-220.

Trendelburg, U. (1988). The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. Handbook of experimental physiology. U. Trendelburg. Berlin, Springer-Verlag: 279-319.

Uvnas-Moberg, K., S. Ahlenius, V. Hillegaard i P. Alster (1994). "High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats." Pharmacol Biochem Behav 49(1): 101-106.

Vaseghi, M., W. Zhou, J. Shi, O. A. Ajijola, J. Hadaya, K. Shivkumar i A. Mahajan (2012). "Sympathetic innervation of the anterior left ventricular wall by the right and left stellate ganglia." Heart Rhythm 9(8): 1303-1309.

Wakade, A. R., T. D. Wakade, M. Poosch i M. J. Bannon (1996). "Noradrenaline transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells are controlled by dexamethasone and nerve growth factor." J Physiol 494 (Pt 1): 67-75.

- Waldherr, M. i I. D. Neumann (2007).** "Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats." Proc Natl Acad Sci U S A 104(42): 16681-16684.
- Webb, J. G., K. R. Berv i I. J. Kopin (1975).** "Induction of dopamine-beta-hydroxylase in superior cervical ganglia in organ culture." Neuropharmacology 14(9): 643-648.
- Wehrwein, E. A., L. M. Parker, A. A. Wright, J. M. Spitsbergen, M. Novotny, D. Babankova, G. M. Swain, B. A. Habecker i D. L. Kreulen (2008).** "Cardiac norepinephrine transporter protein expression is inversely correlated to chamber norepinephrine content." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 295(3): R857-R863.
- Weinshilboum, R. i J. Axelrod (1971).** "Serum dopamine-beta-hydroxylase activity." Circ Res 28(3): 307-315.
- Weiss, I. C., L. Di Iorio, J. Feldon i A. M. Domeney (2000).** "Strain differences in the isolation-induced effects on prepulse inhibition of the acoustic startle response and on locomotor activity." Behav Neurosci 114(2): 364-373.
- Weiss, I. C., C. R. Pryce, A. L. Jongen-Relo, N. I. Nanz-Bahr i J. Feldon (2004).** "Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat." Behav Brain Res 152(2): 279-295.
- Windle, R. J., L. E. Gamble, Y. M. Kershaw, S. A. Wood, S. L. Lightman i C. D. Ingram (2006).** "Gonadal steroid modulation of stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activity and anxiety behavior: role of central oxytocin." Endocrinology 147(5): 2423-2431.
- Windle, R. J., N. Shanks, S. L. Lightman i C. D. Ingram (1997).** "Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats." Endocrinology 138(7): 2829-2834.
- Winter, J., A. S. Tanko, K. E. Brack, J. H. Coote i G. A. Ng (2012).** "Differential cardiac responses to unilateral sympathetic nerve stimulation in the isolated innervated rabbit heart." Auton Neurosci 166(1-2): 4-14.
- Wittstein, I. S., D. R. Thiemann, J. A. Lima, K. L. Baughman, S. P. Schulman, G. Gerstenblith, K. C. Wu, J. J. Rade, T. J. Bivalacqua i H. C. Champion (2005).**

"Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress." N Engl J Med 352(6): 539-548.

Wood, A., S. Docimo i D. E. Elkowitz (2010). "Cardiovascular disease and its association with histological changes of the left stellate ganglion." Clin Med Insights Pathol 3: 19-24.

Young III, W. S. i H. Gainer (2009). Vasopressin/oxytocin and receptors. Encyclopedia of Neuroscience. L. Squire. Oxford, Academic Press: 51-59.

Zhang, P., X. Xu, X. Hu, E. D. van Deel, G. Zhu i Y. Chen (2007). "Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure." Circ Res 100(7): 1089-1098.

Zhou, S., O. Paz, J. M. Cao, K. Asotra, N. N. Chai, C. Wang, L. S. Chen, M. C. Fishbein, B. Sharifi i P. S. Chen (2005). "Differential beta-adrenoceptor expression induced by nerve growth factor infusion into the canine right and left stellate ganglia." Heart Rhythm 2(12): 1347-1355.

Predrag Jovanović, diplomirani biolog, rođen je 26. 01. 1982. u Kraljevu, gde je završio osnovnu školu i Gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Diplomirao je sa prosečnom ocenom 8.75 na studijskoj grupi Biologija, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, 2008. godine. Diplomski rad je uradio na katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta u Beogradu na temu "Antimutageni potencijal 1,8-cineola na UV-indukovanu mutagenezu u Testu A *E.coli* K12 test sistemu", sa ocenom 10.

Upisao je doktorske studije, školske 2010/2011, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Animalna i humana fiziologija.

Od 01. 02. 2011. godine počinje sa radom kao istraživač pripravnik u grupi Dr Slađane Dronjak Čučaković u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u okviru projekta „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara i moguća protekcija“ (173044), čiji je rukovodilac Dr Anica Horvat, naučni savetnik.

Koautor je 15 naučnih radova u časopisima od međunarodnog značaja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Предраг З. Јовановић

Број индекса Б3053/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Дејство окситоцина на симпатоадреномедуларни систем и срце пацова хронично

излаганих стресу изолације

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

Потпис аутора

У Београду, _____

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

Име и презиме аутора __Предраг З. Јовановић_____

Број индекса _____Б3053/2010_____

Студијски програм _____Анимална и хумана физиологија_____

Наслов рада __Дејство окситоцина на симпатоадреномедуларни систем и срце
пацова хронично излаганих стресу изолације_____

Ментор __Др Слађана Дроњак Чучаковић, Др Небојша Јаснић_____

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Дејство окситоцина на симпатоадренормедуларни систем и срце пацова хронично

излаганих стресу изолације

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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