

Univerzitet u Beogradu
Medicinski fakultet

Gordana Z. Jevtić Dožudić

**MITOHONDRIJALNA DISFUNKCIJA U
MOZGU PACOVA PERINATALNO
TRETIRANIH FENCIKLIDINOM –
EFEKAT ANTIPSIHOTIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

University of Belgrade
Faculty of Medicine

Gordana Z. Jevtić Dožudić

**MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN
THE BRAIN OF RATS PERINATALLY
TREATED WITH PHENCYCLIDINE –
EFFECTS OF ANTIPSYCHOTIC
TREATMENT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor: Prof. dr Nataša Petronijević, redovni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor: Doc. dr Aleksandar Mirčić, docent, Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. **Prof. dr Ivanka Marković**, redovni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. **Doc. dr Maja Ivković**, docent, Klinika za psihijatriju KCS, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. **Prof. dr Vladimir Jakovljević**, redovni profesor, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Zahvaljujem se

Prof. dr Nataši Petronijević, svom učitelju i mentoru, na ukazanom poverenju i bezrezervnoj podršci pri izradi ove teze. Naučila me je neusiljenom dostojanstvu, obzirnosti i strpljenju, ali i težnji da se ne zadovoljavam površnim shvatanjem problematike. Njena posvećenost i ljubav prema istraživačkom i eksperimentalnom radu, stručnost, humanost, upornost i optimizam su mi predstavljali ogromno nadahnuće i inspiraciju u laboratorijskom radu, kao i podstrek za dalje naučno usavršavanje.

Doc. dr Aleksandru Mirčiću, svom komentoru, na svesrdnoj podršci prilikom realizacije ovog rada.

Doc. dr Neveni Radonjić, koja me je uvela u svet eksperimanata i nesebično prenosila svoje znanje i iskustvo.

Doc. dr Neli Puškaš, koja mi je pružila veliku podršku a svojim iskustvom i stručnošću podržala moj eksperimentalni rad.

Institutu za biomedicinska istraživanja Galenika, dr Slavici Ristić i veterinarskom tehničaru Branki Veselinović, na svom angažovanju i pomoći u realizaciji ovog istraživanja.

Svojim kolegama - dr Tatjani Nikolić, dr Milici Velimirović, dr Tihomiru Stojkoviću, dr Mikanu Lazoviću, dr Milici Živković i medicinskom tehničaru Marku Boškoviću na nesebičnoj podršci, pomoći i prijateljskoj atmosferi tokom mog naučnog sazrevanja.

Svim članovima Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na ukazanoj dugogodišnjoj podršci, poverenju i prijateljskoj atmosferi.

Mojoj majci i sestri na bezrezervnoj podršci, beskrajnoj ljubavi i nesebičnoj spremnosti da podrže moje usavršavanje. Hvala vam što ste bile moj "vetar u leđa" i naučile me upornosti da istrajem u svojim stremljenjima.

Mom suprugu Aleksandru Dožudiću, na beskrajnoj ljubavi, безусловnoj podršci i razumevanju. Hvala ti što si bio moj veliki oslonac i što si me naučio da uvek dam sve od sebe nadajući se najboljem.

MITOHONDRIJALNA DISFUNKCIJA U MOZGU PACOVA PERINATALNO TRETIRANIH FENCIKLIDINOM – EFEKAT ANTIPSIHOTIKA

Rezime

Uvod: Shizofrenija je neuropsihijatrijski poremećaj složene etiologije, sa globalnom prevalencom oko 1%. U terapiji shizofrenije često je neophodna dugotrajna primena tipičnih i/ili atipičnih antipsihotika, koji se razlikuju po efikasnosti i imaju različite neželjene efekte. Postoji veliki broj hipoteza o poreklu bolesti, ali najveći broj istraživanja govori u prilog neurorazvojne hipoteze prema kojoj poremećaj tokom razvoja mozga dovodi do narušavanja procesa sinaptogeneze i neurotransmisije, pre svega dopaminergičkog i glutamatergičkog sistema. Fenciklidin (PCP) je nekompetitivni antagonist glutamatskih N-metil-D-aspartat receptora i njegova perinatalna administracija u pacova uzrokuje patofiziološke promene koje odgovaraju patološkim karakteristikama uočenim u shizofreniji. Mitohondrije imaju važnu ulogu u neurorazvoju i brojne studije povezuju abnormalnosti u strukturi i funkciji mitohondrija sa razvojem shizofrenije. Disfunkcija mitohondrija može rezultirati poremećajem u produkciji energije i aktivacijom procesa ćelijske smrti apoptozom i/ili autofagijom. Poremećaji odvijanja procesa apoptoze i autofagije su dokumentovani kod pacijenata obolelih od shizofrenije. Novije studije ukazuju na tesnu povezanost ova dva procesa. Međutim, još uvek ostaje nerazjašnjeno da li su uočene promene posledica tretmana antipsihoticima ili karakteristika same bolesti.

Cilj: Utvrđivanje neposrednih i dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina, kao i efekata haloperidola (tipičnog antipsihotika) i klozapina (atipičnog antipsihotika) na aktivnost enzima respiratornog lanca, ekspresiju proteinskih markera apoptoze i autofagije, zastupljenost pojedinih vrsta ćelija nervnog sistema i ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu pacova.

Materijal i metode: Deset grupa Wistar pacova je subkutano tretirano 2, 6, 9. i 12. postnatalnog dana (PN) fenciklidinom (10 mg/kg) ili fiziološkim rastvorom (0.9% NaCl). Jedna NaCl i jedna PCP grupa su žrtvovane PN13, dok su druge dve NaCl i PCP grupe žrtvovane PN70. Preostale grupe su žrtvovane PN100. Od PN35 do PN100, jedna

NaCl (NaCl-H) i jedna PCP (PCP-H) grupa su primale haloperidol (1 mg/kg/dan) dok su druga NaCl (NaCl-K) i PCP (PCP-K) grupa primale klopazin (20 mg/kg/dan) rastvoren u vodi za piće. Preostale NaCl (kontrola) i PCP grupa su primale vodu za piće bez rastvorenih supstanci. Aktivnost enzima respiratornog lanca, kompleksa I i citohrom c oksidaze (COX), su određivane spektrofotometrijski. Ekspresija markera apoptoze (kaspaza 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF)) i markera autofagije (Beklin 1 i p62) određivana je tehnikom *Western blot* u korteksu i hipokampusu. Zastupljenost neurona i glija ćelija ispitivana je određivanjem ekspresije markera neurona (neuron-specifični jedarni protein, NeuN), astrocita (glijalni fibrilarni kiseli protein, GFAP), oligodendrocita (mijelin oligodendrocitni glikoprotein, MOG) i mikroglije (jonizovani kalcijum-vezujući adapterski protein, Iba 1) u korteksu i hipokampusu tehnikama *Western blot* i imunohistohemije. Ultrastrukturne promene detektovane su primenom transmisiona elektronske mikroskopije.

Rezultati: Neposredni efekti perinatalne primene fenciklidina ispitivani su 13. postnatalnog dana (PN13). Pokazano je da PCP dovodi do povećanja aktivnosti kompleksa I u hipokampusu i COX u obe ispitivane moždane strukture ukazujući na povećanu aktivnost respiratornog lanca. Ove promene su praćene povećanom ekspresijom ezekutorske kaspaze 3, dok je ekspresija AIF nepromenjena u poređenju sa kontrolnom grupom. Određivanjem ekspresije markera autofagije u istom vremenskom preseku uočeno je povećanje ekspresije p62 u korteksu u poređenju sa kontrolom ukazujući da je ovaj proces suprimiran. Dugotrajni efekti perinatalne primene fenciklidina ispitivani su u dva vremenska intervala: PN70 i PN100. Pokazano je da je u PN70 aktivnost kompleksa I nepromenjena u obe ispitivane moždane strukture, a aktivnost COX smanjena u korteksu i povećana u hipokampusu životinja perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolom. Sedamdesetog postnatalnog dana, u pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom, zapažena je i intenzivnija apoptoza izražena preko povećanja ekspresije kaspaze 3 u obe moždane strukture i ekspresije AIF proteina u korteksu u poređenju sa kontrolom. Ove promene su praćene povećanjem ekspresije Beklina 1 u hipokampusu i smanjenjem ekspresije p62 u obe ispitivane moždane strukture. Ovo ukazuje da perinatalna primena fenciklidina indukuje i proces autofagije u mozgu odraslih pacova (PN70). Uočeno je da, kod pacova starih sto dana (PN100),

perinatalni tretman fenciklidinom kao i primena antipsihotika ne menjaju aktivnost kompleksa I u mozgu pacova, dok na aktivnost COX utiču oba antipsihotika uzrokujući značajno smanjenje aktivnosti ovog enzima i u korteksu i u hipokampusu u poređenju sa kontrolom. Dalje 100. PN dana još uvek je, kao i u PN70, prisutno povećanje ekspresije kaspaze 3 u korteksu PCP grupe. U ovoj strukturi primena haloperidola ne utiče na promene kaspaze 3 koje uzrokuje perinatalni tretman fenciklidinom ali smanjuje ekspresiju AIF i u NaCl-H i u PCP-H grupama, dok u hipokampusu izaziva smanjenje oba apoptotska markera nezavisno od perinatalnog tretmana u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Klozapin, s druge strane, ima izraženije efekte u korteksu gde utiče na povećanje ekspresije kaspaze 3 i AIF i u životinja perinatalno tretiranih NaCl-om i PCP-om. Za razliku od PN70, stotog postnatalnog dana se više ne uočava promena ekspresije ni jednog markera autofagije u životinja perinatalno tretiranih PCP-om. Haloperidol takođe nije uticao na ovaj proces dok je klozapin izazvao smanjenje ekspresije markera Beklin 1 nezavisno od perinatalnog tretmana. Zastupljenost neurona je smanjena u hipokampusu pacova (PN100) perinatalno tretiranih PCP-om i pacova tretiranih klozapinom, nezavisno od perinatalnog tretmana. Perinatalni tretman PCP-om redukuje ekspresiju GFAP u mozgu pacova. Haloperidol redukuje ekspresiju GFAP u korteksu, dok u hipokampusu vrši reverziju promene indukovane perinatalnom primenom PCP-a. Tretman klozapinom vrši reverziju redukcije ekspresije GFAP proteina indukovane perinatalnom primenom PCP-a u obe moždane strukture. U korteksu obe klase antipsihotika vrše reverziju redukcije ekspresije MOG indukovane perinatalne primenom PCP-a, dok u hipokampusu lekovi pokazuju tendenciju da suprimiraju povećanje ekspresije ovog proteina indukovano perinatalnom primenom PCP-a. Ekspresija Iba 1 proteina, markera mikroglije, je nepromenjena u mozgu pacova svih eksperimentalnih grupa u poređenju sa kontrolnom, ali je imunohistohemijski pokazano da perinatalni tretman fenciklidinom i tretman antipsihoticima uzrokuju morfološke promene ćelija mikroglije koje ukazuju na njihovu aktivaciju. U prilog uočenih promena uzrokovanih perinatalnim aplikovanjem fenciklidina i tretmanom antipsihoticima govore i rezultati transmisiona elektronske mikroskopije kojima je potvrđeno prisustvo ultrastrukturnih promena mitohondrija i promena karakterističnih za apoptozu i autofagiju u mozgu pacova u sva tri vremenska preseka.

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju da perinatalna administracija fenciklidina i hronični tretman antipsihoticima indukuju strukturne i funkcionalne promene mitohondrija i utiču na procese apoptoze i autofagije. Administracija fenciklidina rezultuje aktivacijom apoptoze neposredno po aplikovanju, dok se dugoročni efekti ogledaju u aktivaciji oba procesa. S druge strane dugotrajni efekti perinatalne primene fenciklidina praćeni PN100 dana se ogledaju u indukciji apoptoze u kortikalnim regionima, koja je praćena supresijom autofagije u ovom regionu. Tretman antipsihoticima indukuje apoptozu u kortikalnim regionima, dok neočekivano haloperidol suprimira ovaj proces i u korteksu i u hipokampusu. Klozapin utiče na autofagiju nezavisno od perinatalnog tretmana remećući odvijanje prve faze ovog procesa. Pored remećenja odvijanja procesa ključnih za održavanje homeostaze ćelija, antipsihotici ostvaruju efekte i na zastupljenost ćelija nervnog sistema, implicirajući na kritički stav prema dugogodišnjem tretmanu antipsihoticima. Uočene promene mogu biti osnova strukturnih i funkcionalnih defekata uočenih u mozgu obolelih od shizofrenije. Bolje razumevanje prirode ovih promena može doprineti rasvetljavanju patofiziologije shizofrenije i razvoju novih terapijskih strategija, usmerenih na poboljšanje mitohondrijske funkcije.

Ključne reči: fenciklidin, shizofrenija, antipsihotici, mitohondrije, respiratorni lanac, apoptoza, autofagija, animalni model

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Neuronauke

**MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE BRAIN OF RATS
PERINATALLY TREATED WITH PHENCYCLIDINE – EFFECTS OF
ANTIPSYCHOTIC TREATMENT**

Abstract

Introduction: Schizophrenia (SCH) is a neuropsychiatric disorder with complex etiology and global prevalence of 1%. Disease usually requires long-term medication with typical and atypical antipsychotics, that have different effectiveness and side effects. There are a number of hypotheses about the origin of SCH, but most research support neurodevelopmental hypothesis according to which alterations during the brain development lead to disturbances of synaptogenesis and neurotransmission, primarily dopaminergic and glutamatergic systems. Phencyclidine (PCP) acts as a non-competitive antagonist of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors, and its perinatal administration to rats causes pathophysiological changes that mimic some pathological features of schizophrenia. Mitochondria play a crucial role in the neurodevelopment and numerous data indicate that abnormalities in mitochondrial structure and function could be associated with the development of schizophrenia. Mitochondrial dysfunction may affect energy production and could lead to apoptotic cell death and/or autophagy. Altered apoptosis and autophagy processes have been identified in schizophrenia patients. Also, recent investigations indicate that these two processes are tightly correlated. However, remains unclear whether the observed changes are consequence of medication or disease itself.

Aim of this study: Assess immediate and long-term effects of perinatal PCP administration, as well as, the effects of typical (haloperidol) and atypical (clozapine) antipsychotics on mitochondrial function determining the activity of respiratory chain enzymes, expression of apoptosis and autophagy markers, density of nervous system cells and ultrastructural changes in the cortex and hippocampus of the rat brain.

Material and methods: Ten groups of Wistar rats were subcutaneously treated on 2nd, 6th, 9th and 12th postnatal days (PN), with either PCP (10 mg/kg) or saline (0.9% NaCl).

One NaCl and one PCP group were sacrificed on PN13; other two NaCl and PCP groups were sacrificed on PN70. Remaining groups were sacrificed on PN100. From PN35 to PN100, one NaCl (NaCl-H) and one PCP (PCP-H) group have received haloperidol (1 mg/kg/day) and other two NaCl (NaCl-K) and PCP (PCP-K) groups have received clozapine (20 mg/kg/day) dissolved in drinking water. Remaining NaCl (control) and PCP group received clear drinking water. Activities of respiratory chain enzymes, complex I and cytochrome c oxidase (COX), were assessed spectrophotometrically. Protein expression of apoptosis markers (caspase 3 and apoptosis inducing factor (AIF)) and autophagy markers (Beclin 1 and p62) in the cortex and hippocampus was assessed by *Western blot*. Density of neuronal and glial cells was assessed using *Western blot* and immunohistochemistry determining the expression of neuronal marker (Neuronal specific nuclear protein, NeuN), marker of astrocytes (Glial fibrillary acidic protein, GFAP), marker of oligodendrocytes (Myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG) and marker of microglial cells (Ionised calcium binding adaptor molecule 1, Iba 1). Morphological changes of cortical and hippocampal ultrastructure were determined by transmission electron microscopy.

Results: Early effects of perinatal PCP administration were assessed on PN13. It has been shown that perinatal PCP administration increases complex I activity in the hippocampus, as well as, COX activity in both investigated brain structures indicating increased activity of respiratory chain. These changes were followed by increased expression of executor caspase 3, while AIF expression remains unchanged compared to control. Determining the expression of autophagy markers at the same time point we noticed the increase of p62 expression in the cortex comparing to control, indicating that this process is suppressed. Long-term effects of perinatal PCP administration were assessed in two time points: PN70 and PN100. It has been shown that on PN70 activity of complex I remains unchanged in both investigated brain structures, while COX activity was reduced in the cortex and increased in the hippocampus of PCP perinatally treated rats compared to control. On PN70, in rats perinatally treated with PCP we detected intensified process of apoptosis, which is reflected in increase of caspase 3 expression in both investigated brain structures, and increase of AIF expression in the cortex compared to control. These changes are followed by increased Beclin 1

expression in the hippocampus, and reduced p62 expression in both investigated brain structures, implying that perinatal PCP administration also induces autophagy process in the brain of adult rats (PN70). On PN100 it has been observed that perinatal PCP administration, as well as, antipsychotic treatment do not alter the activity of complex I in the rat brain, while COX activity was significantly reduced in the cortex and hippocampus in groups treated with antipsychotics compared to control. Furthermore, on PN100 increase of caspase 3 expression in the cortex of PCP group was still present. In the cortex, haloperidol treatment does not affect changes of caspase 3 induced by perinatal PCP administration. However, haloperidol reduces AIF expression in the cortex of NaCl-H and PCP-H groups, while in the hippocampus haloperidol reduces expression of both apoptotic markers independently of perinatal treatment compared to control group. On the other hand, clozapine has more prominent effects in the cortex increasing the expression of caspase 3 and AIF both in NaCl and PCP perinatally treated groups. Unlike PN70, on PN100 we haven't noticed changes in the expression of autophagy markers. Haloperidol also does not affect this process, while clozapine induced decrease of Beclin 1 expression independently of perinatal treatment. Expression of NeuN was reduced in the hippocampus (PN100) of rats perinatally treated with PCP, as well as rats, treated with clozapine, independently of perinatal treatment. PCP perinatally administrated reduces GFAP expression in the rat brain. Haloperidol reduces GFAP expression in the cortex, while in the hippocampus it reverses changes induced by perinatal PCP administration. Clozapine treatment reverses reduction of GFAP expression induced by perinatal PCP administration in both investigated brain structures. In the cortex, treatment with both typical and atypical antipsychotics reverses reduction of MOG expression induced by PCP administration, while in the hippocampus these drugs shows tendency to suppress an increase of MOG expression induced by PCP. Expression of Iba 1 protein, marker of microglial cells, was unchanged in the brain of rats from all experimental groups compared to control, although immunohistochemical analysis showed that perinatal PCP treatment, as well as, treatment with antipsychotics induce morphological changes of microglial cells indicating their activation. Detected changes caused by perinatal PCP administration and antipsychotic treatment are supported by results of transmission electron microscopy, which confirmed the presence of ultrastructural changes of mitochondria

and changes characteristic of apoptosis and autophagy in the rat brain in all three time points.

Conclusion: Obtained data suggest that perinatal PCP administration and chronic antipsychotic administration induce structural and functional alterations of mitochondria and affect apoptosis and autophagy processes. Phencyclidine administration results in activation of apoptosis immediately after its application, while long-term effects are reflected in the activation of both processes. On the other hand, long-term effects of perinatal PCP administration observed on PN100 were induction of apoptosis in cortical regions, followed by suppression of autophagy in the same brain region. Antipsychotic treatment induce apoptosis in cortical regions, while, unexpectedly, haloperidol suppresses this process both in the cortex and hippocampus. Clozapine alters autophagy independently of perinatal treatment by repressing its first steps. Beside alterations of processes crucial for cell homeostasis, antipsychotics are capable to alter density of nervous system cells, indicating a critical attitude towards a long-term treatment with antipsychotics. Noticed alterations may be the basis of structural and functional brain deficits observed in SCH patients. Understanding the nature of these changes may contribute to the elucidation of pathophysiology of SCH and may offer new targets for drug development, directed to improvement of mitochondrial function.

Keywords: phencyclidine, schizophrenia, antipsychotics, mitochondria, respiratory chain, apoptosis, autophagy, animal model

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Neuroscience

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Patofiziologija shizofrenije.....	1
1.1.1. Poremećaj neurotransmiterskih sistema u shizofreniji.....	2
1.1.2. Morfološke promene u shizofreniji.....	5
1.1.3. Animalni modeli psihijatrijskih oboljenja.....	7
1.1.4. Fenciklidin – od farmakologije do modelovanje shizofrenije.....	8
1.1.4.1. Efekti fenciklidina na životinje i ljude.....	9
1.1.4.2. Fenciklidinski animalni model shizofrenije – Perinatalna primena fenciklidina.....	10
1.2. Poremećaj mitohondrijalnog metabolizma i procesa apoptoze i autofagije u mozgu obolelih od shizofrenije	12
1.2.1. Apoptoza	15
1.2.2. Autofagija	19
1.3. Efekti antipsihotika na mitohondrijski metabolizam i procese apoptoze i autofagije.....	22
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. Eksperimentalne životinje	29
3.2. Tretiranje životinja	29
3.3. Biohemijske analize	31
3.3.1. Izolovane struktura za određivanje enzimske aktivnosti	31
3.3.2. Određivanje sadržaja proteina	31
3.3.3. Određivanje aktivnosti kompleksa I.....	32
3.3.4. Određivanje aktivnosti citohrom c oksidaze.....	33
3.4. Određivanje ekspresije proteina tehnikom Western blot	34
3.5. Ispitivanje ultrastrukturnih promena metodom transmisione elektronske mikroskopije.....	35
3.6. Imunohistohemijska analiza	36

3.6.1. Priprema tkiva za imunohistohemijske analize (krioprezervacija)	36
3.6.2. Opšti protokol za imunohistohemijsko bojenje	37
3.7. Statistička analiza	38
4. REZULTATI	39
4.1. Ispitivanje neposrednih efekata perinatalne primene fenciklidina u korteksu i hipokampusu pacova (PN13)	39
4.1.1. Neposredni efekat perinatalne primene fenciklidina na aktivnost enzima respiratornog lanca – kompleksa I i citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu pacova.....	39
4.1.2. Neposredni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu pacova.....	40
4.1.3. Neposredni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju Beklin 1 i p62 proteina u korteksu i hipokampusu pacova	42
4.1.4. Ultrastrukturalne promene u korteksu i hipokampusu pacova neposredno nakon perinatalne primene fenciklidina	44
4.2. Ispitivanje dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina u korteksu i hipokampusu pacova (PN70)	46
4.2.1. Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na aktivnost enzima respiratornog lanca – kompleksa I i citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu pacova.....	46
4.2.2. Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu pacova.....	47
4.2.3. Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju Beklin 1 i p62 proteina u korteksu i hipokampusu pacova	49
4.2.4. Ultrastrukturalne promene u korteksu i hipokampusu odraslih pacova kao posledica dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina.....	51
4.3. Ispitivanje dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN100).....	53
4.3.1. Efekti perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika na aktivnost enzima respiratornog lanca – kompleksa I i citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu pacova (PN100).....	53
4.3.2. Efekti perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN100).....	55

4.3.3. Efekti perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika na ekspresiju Beklin 1 i p62 proteina u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN100).....	58
4.3.4. Ultrastrukturalne promene u korteksu i hipokampusu odraslih pacova nakon tretmana antipsihoticima (PN100)	60
4.3.5. Zastupljenost neurona i glija ćelija u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom (PN100).....	63
4.3.5.1. Zastupljenost neurona u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom.....	63
4.3.5.2. Zastupljenost astrocita u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom.....	66
4.3.5.3. Zastupljenost oligodendrocita u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom.....	69
4.3.5.4. Zastupljenost ćelija mikroglije u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapin.m.....	71
5. DISKUSIJA.....	74
6. ZAKLJUČCI	92
7. LITERATURA	95

1. UVOD

1.1. Patofiziologija shizofrenije

Shizofrenija je jedno od najtežih psihijatrijskih oboljenja, koje se najčešće javlja u ranom odraslom dobu između 16. i 25. godine (Mueser i McGurk, 2004). Etiopatologija oboljenja je izuzetno kompleksna i smatra se da niz genetskih, razvojnih i sredinskih faktora učestvuje u procesu koji dovodi do kliničkog ispoljavanja bolesti (Lewis i Lieberman, 2000; van Os i sar., 2010). Bolest je simptomatski veoma heterogena i simptomi se najčešće svrstavaju u tri kategorije – pozitivne, negativne i kognitivne. Pozitivni simptomi su vezani za poremećaje obrade informacije i doživljaja stvarnosti i u njih svrstavamo: halucinacije (najčešće auditorne prirode, mada mogu biti vizuelne, olfaktorne i taktilne prirode), sumanute ideje, poremećaje mišljenja i govora, poremećaj ponašanja. U negativne simptome spadaju alogija (promene u govoru koje odražavaju poremećaj mišljenja), afektivna zaravnjenost, apatija (bezzvoljnost), anhedonija (socijalno povlačenje), poremećaj pažnje i drugi simptomi (Kay i sar., 1987; Carpenter i Kirkpatrick, 1988). Bolest karakterišu i poremećaji kognicije koji se ogledaju u oštećenoj obradi informacija, oslabljenoj pažnji, teškoćama u učenju i komunikaciji (Paunović, 2004; Albus i sar., 2006; Goldman-Rakić, 1994). Shizofreniju karakteriše akutna faza u kojoj dominiraju pozitivni simptomi, koja je praćena fazama remisije psihoza u kojima dominiraju negativni simptomi bolesti. Prisustvo kognitivnih defekata je pouzdan pokazatelj recidiva i ujedno nepovoljnog dugoročnog ishoda bolesti (Robinson i sar., 2002; Andreasen i sar., 2005).

Shizofrenija je okarakterisana kao neurodegenerativno i neurorazvojno oboljenje. Krepelin je početkom 20. veka okarakterisao shizofreniju kao neurodegenerativno oboljenje na osnovu kliničke slike obolelih pacijenata, kod kojih se uočava pogoršanje stanja sa pojavom simptoma iako su imali naizgled normalno detinjstvo, tj. bez premorbidnih bihevioralnih, neurokognitivnih i fizičkih anomalija. U isto vreme u naučnim krugovima javlja se ideja da se u osnovi shizofrenije nalazi poremećaj u neurorazvoju. Istraživanja ukazuju na krucijalni uticaj i efekte gena, kao i faktora spoljašnje sredine na neurorazvoj, uzrokujući dijatezu za nastanak shizofrenije.

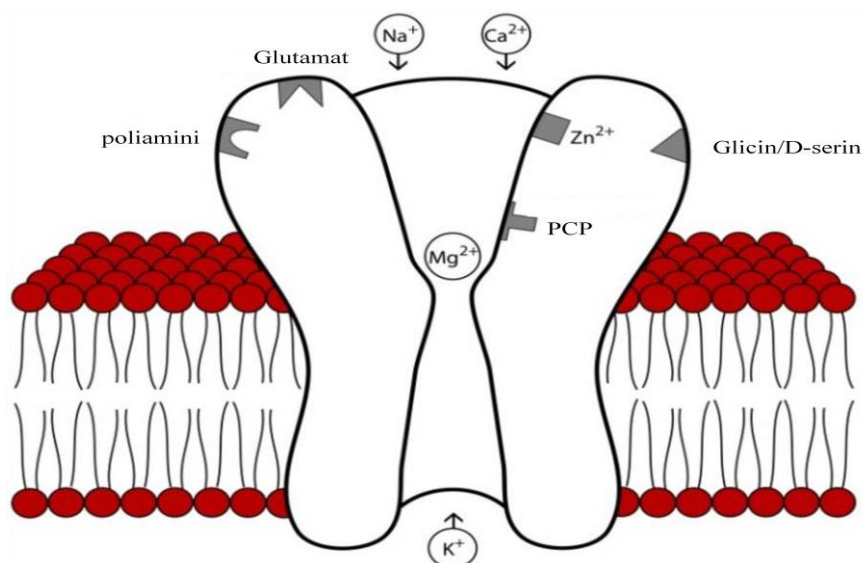
Studije genske povezanosti ukazuju na mogućnost da genetske varijacije u komponentama neurotransmiterskih sistema mogu dovesti do promena koje rezultuju promenama u razvoju mozga. Nadalje, pretpostavljeno je da se u osnovi različitih kliničkih stadijuma bolesti mogu nalaziti različiti patološki procesi. Naime, pretpostavlja se da neurorazvojni mehanizmi leže u osnovi premorbidne faze bolesti, dok progresivni patofiziološki procesi počinju sa neurohemijskom disregulacijom, koja može rezultirati neurodegeneracijom nakon kliničkog ispoljavanja simptoma bolesti (Lieberman i sar., 2001, 2008).

1.1.1. Poremećaji neurotransmisije u shizofreniji

Dosadašnja istraživanja ukazuju da shizofreniju karakterišu kompleksne promene neurotransmiterskih sistema i smatra se da su te promene povezane sa etiopatogeneзом bolesti. Prva istraživanja bila su bazirana na dopaminergičkoj neurotransmisiji, zbog činjenice da antipsihotici imaju visok afinitet za dopaminske D₂ receptore (Kabebian i Calne, 1979; Carlsson, 1995). Hipoteza dopaminergičke disfunkcije zasnovana je na hiperaktivnosti dopamina u limbičkom sistemu, koja se povezuje sa ispoljavanjem pozitivnih simptomima bolesti (Laruelle i sar., 1999). Međutim, negativni simptomi i kognitivna disfunkcija nisu prominentne karakteristike hiperdopaminergije (Crow, 1980) čime je klinička slika shizofrenije nepotpuna. Nedostaci dopaminergičke hipoteze podstakli su dalja istraživanja u ovoj oblasti i ispitivanja uloge drugih neurotransmiterskih sistema u patogenezi shizofrenije (Carlsson, 1995).

Usledile su studije koje su podržale ideju da je disfunkcija glutamatergičkog glutamatskog sistema primarna patofiziološka promena uočena u shizofreniji (Olney i Farber, 1995; Tsai i Coyle, 2002; Coyle i sar., 2003; Konradi i Heckers, 2003). Podatak o smanjenoj koncentraciji glutaminske kiseline u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od SCH po prvi put je ukazao na defekt glutamatergičke neurotransmisije (Kim i sar., 1980). Pored toga, *post mortem* istraživanjima ustanovljeno je smanjenje koncentracije glutamata u prefrontalnom korteksu i hipokampusu obolelih od shizofrenije u poređenju sa zdravim kontrolama (Tsai i sar., 1995).

Glutamatergička transmisija ima važnu ulogu kako tokom neurorazvoja tako i u modulaciji funkcija mozga u kasnijim životnim fazama. Efekti glutamata u mozgu posredovani su sa dva tipa receptora: jonotropnim (glutamat-zavisnim jonskim kanalima) i metabotropnim receptorima. NMDA (N-metil-D-aspartat) receptori su predstavnici klase jonotropnih glutamatskih receptora i predstavljaju primarnu terapijsku metu u psihijatrijskim oboljenjima. Navedeni receptori široko su rasprostranjeni u centralnom nervnom sistemu, ali glavna mesta lokalizacije su upravo one moždane strukture u kojima su uočene najupadljivije abnormalnosti kod osoba obolelih od shizofrenije, a to su prefrontalni korteks, limbički sistem i talamus (Bogerts, 1999; Shenton i sar., 2001). NMDA receptori pokazuju prilično neuobičajena svojstva. Kanal u sastavu receptora je istovremeno ligand-zavisni jonski kanal (otvara se vezivanjem glutamata) i voltažno-zavisni jonski kanal (otvara se nakon depolarizacije membrane). Na potencijalu mirovanja, kanal NMDA receptora je blokiran jonom Mg^{2+} , koji se uklanja tek nakon depolarizacije membrane. NMDA receptori, osim mesta za vezivanje glutamata, imaju i mesta za vezivanje endogenih aminokiselina mozga – glicina i D-serina. Glicin reguliše otvaranje kanala, ali sam ne uzrokuje njegovo otvaranje (Johnson i Archer, 1987). Pored ovih mesta, NMDA receptorski kompleks sadrži regulatorna mesta za poliamine i cink (Zn^{2+}) i oksido-redukcijske agense, kao što je glutation (Waterhouse, 2003). Mesto vezivanja fenciklidina, antagoniste ovog receptora, nalazi se unutar jonskog kanala NMDA receptora i dostupno je samo kada je kanal otvoren (Tsai i Coyle, 2002; Waterhouse, 2003).



Slika 1. Shematski prikaz NMDA receptora. Preuzeto i modifikovano iz Tomek, S.E., Lacrosse, A.L., Nemirovsky, N.E., Olive, M.F., 2013. NMDA Receptor Modulators in the Treatment of Drug Addiction. *Pharmaceuticals (Basel)* 6 (2), 251-268.

Farmakološki dokazi o ulozi glutamata u shizofreniji, zasnovani su na otkriću blokade glutamatskih NMDA receptora pomoću nekompetitivnih antagonista, kao što su fenciklidin i ketamin, i njihovog svojstva da indukuju simptome karakteristične za shizofreniju kod zdravih osoba (Javitt i Zukin., 1991; Krystal i sar., 1994; Tamminga, 1998). *Post mortem* studije ukazuju na abnormalnosti u ekspresiji (Dracheva i sar., 2001) i fosforilaciji (Emamian i sar., 2004) NMDA receptora u prefrontalnom korteksu, važnom regionu mozga za ispoljavanje negativnih simptoma bolesti i kognitivnu disfunkciju (Weinberger, 1988). Iz ovih saznanja proistekla je hipoteza o NMDA receptorskoj hipofunkciji, kao jednoj od mogućih patofizioloških osnova shizofrenije (Javitt i Zukin, 1991; Tamminga, 1998). Prema ovoj hipotezi, NMDA receptorska hipofunkcija može dovesti do prekomerne stimulacije drugih jonotropnih receptora, aktivirajući kaskadu ekscitotoksičnih događaja kao što su oksidativni stres i apoptoza (Deutsch i sar., 2001). U korist hipoteze o hipofunkciji glutamatskih NMDA receptora govori i činjenica da ona može objasniti nekoliko glavnih karakteristika bolesti: čitav dijapazon simptoma (pozitivne, negativne i neorganizovane), početak simptoma u ranoj

mladosti, strukturne promene mozga i kognitivne poremećaje (Paunović, 2004). Smatra se da se NMDA receptorska hipofunkcija uspostavlja u ranom životnom periodu kao latentno stanje koje ima potencijal da se aktivira i manifestuje u adolescenciji ili ranom odraslom dobu, odnosno periodu kada dolazi do maturacionih promena u neuronima neophodnih da se ispolji patološki potencijal (Olney i sar., 1999).

1.1.2. Morfološke promene u shizofreniji

Sve do polovine prošlog veka, nije bilo adekvatnih instrumenata za detekciju morfoloških promena u mozgu obolelih od shizofrenije. Prvo ispitivanje mozga tehnikom kompjuterizovane tomografije (CT) je ukazalo na uvećanje bočnih moždanih komora u mozgu obolelih od shizofrenije (Johnstone i sar., 1976), što je pobudilo interesovanje za dalja morfološka i *post mortem* istraživanja (Kovelman i Scheibel, 1984).

Sa razvojem tehnika vizuelizacije, brojne *post mortem* studije su ukazale na redukciju volumena hipokampusa (Heckers, 2001; Bogerts i sar., 1993). Takođe, evidentirana je i redukciju volumena prefrontalnog korteksa u poređenju sa zdravim kontrolama (John, 2009), a detaljnije volumetrijske analize ukazuju da je redukcija primarno prisutna u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu (Cannon i sar., 2002). Ovaj region je postao fokus istraživanja u patofiziologiji bolesti, zbog činjenice da je zadužen za brojne kognitivne funkcije (Minzenberg i sar., 2009; Barch i Ceaser, 2012). Uočene su promene normalne asimetrije prefrontalnog korteksa (desno>levo) i girifikacija kod obolelih od shizofrenije, što ukazuje da se poremećaj dešava tokom perinatalnog razvoja (Sallet i sar., 2003; Falkai i sar., 2007; Stanfield i sar., 2008). Daljim analizama, registrovan je smanjen broj neurona u prefrontalnoj i limbičkoj kori, kao i periventrikularno (Crow i sar., 1989, Benes, 1991, Falkai i sar., 1988). Međutim, ograničenje volumetrijskih studija je što ne preciziraju patološku promenu u regionu u kom je uočena redukcija volumena, niti omogućavaju utvrđivanje prisustva suptilnih promena, kao što su promene povezanosti među ćelijama (Mueser i Jeste, 2008). Promene povezanosti ekscitatornih i inhibitornih neurona opservirane su u prefrontalnom korteksu obolelih od shizofrenije (Volk i Lewis, 2010). Nejasno ostaje i

kako makroskopske abnormalnosti vode razvoju pozitivnih, negativnih i kognitivnih simptoma karakterističnih za shizofreniju (Mueser i Jeste, 2008).

Konzistentan nalaz svih patoloških studija je odsustvo glioze u mozgu obolelih od shizofrenije (Glantz i sar., 2006). Gliozna predstavlja proliferaciju glijalnih ćelija i uočava se u svim degenerativnim moždanim bolestima koje nastaju postnatalno. Odsustvo glioze u mozgu obolelih od shizofrenije ukazuje da se morfološke promene najverovatnije događaju u trećem tromesečju embrionalnog razvoja, pre nego što glija dostigne funkcionalnu zrelost da reaguje na oštećenje (Paunović, 2004) i podržavaju opšte prihvaćen stav o shizofreniji kao neurorazvojnog poremećaju. Za shizofreniju je karakterističan gubitak astrocita dokumentovan u raznim kortikalnim i subkortikalnim oblastima (Steffek i sar., 2008; Williams i sar., 2013). Pored toga, dokumentovan je niži nivo iRNK (informacione ribonukleinske kiseline) glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), markera astrocita, naročito u regionima bele mase (Webster i sar., 2005; Garey, 2010). Ono što ostaje nepoznato je da li je opservirani gubitak astrocita povezan sa terapijom antipsihoticima ili je posledica same bolesti.

Interesantan nalaz je i smanjenje volumena bele mase i poremećaj integriteta mijelinskog omotača kod pacijenata obolelih od shizofrenije u odnosu na zdrave osobe (Cannon i sar., 1998; Wright i sar., 2000). Neki autori uočenu redukciju volumena bele mase povezuju sa negativnim simptomima bolesti (Sigmundsson i sar., 2001; Ho i sar., 2003) i kognitivnim poremećajima (Fields, 2008). S druge strane, uočeno je i povećanje volumena bele mase u mozgu obolelih od shizofrenije (Taylor i sar., 2005). Povećanje volumena bele mase uočeno je prilikom egzacerbacije psihoza, dok se smanjenje uočava sa remisijom simptoma (Christensen i sar., 2004). Ovakvi oprečni rezultati ukazuju da se u mozgu dešavaju dinamične promene. Povećanje volumena bele mase može biti odraz aktivacije nekih procesa u ovom oboljenju, kao na primer: bubrenje mijelina, nekroza i apoptoza oligodendrocita, remodelovanje sinapsi što je povezano sa nastankom psihoza. Sa druge strane, gubitak bele mase može predstavljati odraz kompenzatornih promena po principu povratne sprege (Lieberman, 2008).

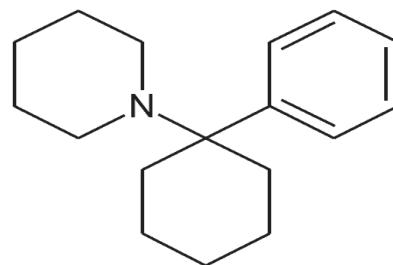
1.1.3. Animalni modeli psihijatrijskih oboljenja

Za proučavanje neurobiološke osnove bolesti kompleksnih heterogenih psihijatrijskih oboljenja od izuzetnog značaja su animalni modeli (Jones i sar., 2011). Pored toga, animalni modeli su ključni u istraživanjima čiji je cilj bolje razumevanje samih mehanizama bolesti, ali i dizajniranje novih terapeutika (Wilson i Terry, 2010). Za razliku od analiza na humanoj populaciji oni omogućavaju brže praćenje progresije bolesti, ali i proučavanje strukturnih i molekularnih promena koje leže u osnovi razvoja bolesti. Povrh svega, animalni modeli pružaju mogućnost konstruisanja novih terapeutika ispitivanjem novih meta i mehanizama delovanja (van der Staay i sar., 2009), ali i njihovo testiranje pre primene u humanoj populaciji (Jones i sar., 2011).

Do sada je procenjeno da postoji oko dvadesetak animalnih modela shizofrenije (Carpenter i Koenig, 2008). Idealni animalni model bi trebalo da oponaša simptome, etiologiju, biohemijske parametre kao i odgovor na terapiju datog oboljenja (McKinney i Bunney, 1969). Takođe, idealan model bi trebao da bude brz, lak, jeftin i jednostavan za reprodukovanje (Gobira i sar., 2013). Ukoliko su simptomi i tok oboljenja kod životinja isti kao i kod čoveka, takav animalni model se naziva homologim, dok se modeli kod kojih su animalni i humani simptomi oboljenja slični ali različite etiologije nazivaju izomorfim (Treit, 1985). Za psihijatrijska oboljenja uspostavljanje izomorfno animalnog modela je veoma teško jer je nekada teško utvrditi izomorfno ponašanje životinje, ukoliko ono kao takvo uopšte i postoji (Tkacs i Thompson, 2006). Od izuzetne važnosti je da model indukuje promene koje su stabilne tokom vremena čime se zadovoljava kriterijum oponašanja fenomena bolesti i omogućava predviđanje odgovora na terapiju (van der Staay, 2006).

1.1.4. Fenciklidin – od farmakologije do modelovanja shizofrenije

Fenciklidin (*phencyclidine*, PCP) je sintetička supstanca, čija sinteza je otpočela dvadesetih godina prošlog veka (Kotz i Merkel, 1926). Po svojoj hemijskoj strukturi fenciklidin (1-(1-fenilcikloheksil)piperidin, $C_{17}H_{25}N$) pripada grupi arilcikloheksilamina (slika 2). U čistoj formi je bezbojan do beličast kristalni prah molekulske mase 243,38. Fenciklidin je slaba organska baza rastvorljiva u većini organskih rastvarača i vodenim rastvorima kiselina. Fenciklidin hidrohlorid je bela kristalna supstanca, molekulske težine 279,83. Ova so je rastvorljiva u vodi i etanolu, slabo rastvorljiva u hloroformu, dok se u etru gotovo uopšte ne rastvara (Mozayani, 2003).



Slika 2. Hemijska struktura fenciklidina

Trideset godina nakon sinteze uočena su njegova odlična anestetička i analgetska svojstva uz odsustvo cirkulatorne ili respiratorne depresije, što je dovelo do toga da se 1963. godine uvede u humanu upotrebu kao nebarbituratni nenarkotični anestetik pod nazivom *Sernyl*. Međutim, fenciklidin veoma brzo postaje poznat po negativnim postoperativnim reakcijama nazvanim fenomen buđenja (*emergence phenomenon*), koji karakterišu halucinacije, paranoja, agitacija, dezorijentisano ponašanje i poremećaj govora. Uočeni negativni efekti usloveli su povlačenje fenciklidina iz humane upotrebe iste godine (Steinpreis, 1996), ali je ipak ostao u upotrebi kao ilegalni narkotik poznatiji pod različitim nazivima kao što su *Angel dust*, *Hog*, *Rocket fuel* (Morris i sar., 2005; Mozayani, 2003).

Fenciklidin se može uneti uobičajenim intravenskim ili oralnim načinima administracije, no njegova upotreba kao narkotičkog sredstva ukazala je na dodatne načine unošenja. Naime, on se može uneti i inhalacijom, insuflacijom, intravenski u formi vodenog rastvora, transdermalnom apsorpcijom, kao i oralnom, rektalnom i vaginalnom apsorpcijom. Interesantno je da se fenciklidin veoma brzo apsorbuje bez obzira na način administracije, dok brzina dejstva zavisi od načina administracije. Najbrže dejstvo ima intravenska administracija, nakon svega nekoliko sekundi, sa dostizanjem maksimalne koncentracije nakon 10 minuta. Inhalacijom fenciklidina efekti

se javljaju nakon par minuta, sa dostizanjem maksimalne koncentracije nakon 5-30 minuta. Sličan efekat se postiže insuflacijom ("ušmrkavanjem"). Efekti fenciklidina nakon oralne primene u vidu kapsula uočavaju se nakon 20-40 minuta, dok se maksimalna koncentracija dostiže nakon 90 minuta (Mozayani, 2003).

Osim od načina administracije, efekti fenciklidina zavise i od doze koja se unosi. Oralni unos 2-6 mg fenciklidina dovodi do letargije, halucinacija, dezorijentacije i gubitka koordinacije. Unos veće doze (7,5 mg) dovodi do posrtanja pri hodu i produženim vremenom reakcije na fenciklidin, a pri oralnom unosu visoke doze (20 mg) može doći do anestezije i kome. Inhalacija 2-5 mg fenciklidina uzrokuje nistagmus. Doza od 7 mg uzrokuje poremećaj pamćenja i ataksiju, a doza od 8-9 mg dovodi do analgezije. Pri dozi od 15 mg uočavaju se kolaps i prostracija. Intravenska administracija niskih doza (0,8-1 mg) uzrokuje stanje koje korisnici opisuju kao „*high*“, dok pri dozi od 15 mg nastupa opšta anestezija. Veoma visoke doze (>50 mg) mogu dovesti do epileptičkog napada (Lundberg i sar., 1976; Mozayani, 2003).

1.1.4.1. Efekti fenciklidina na životinje i ljude

Nakon svog pronalaska i sinteze, fenciklidin je prvobitno testiran na primatima. Doze do 5 mg/kg telesne težine (t.t.) se kod životinja smatraju niskim dozama. Umerenim dozama se smatraju doze od 5–10 mg/kg t.t., dok se doze od 10-50 mg/kg t.t. smatraju visokim dozama za životinje. Primenom nižih doza fenciklidina (0,03 mg/kg) životinja se dovodi u posebno stanje u kom je budna ali istovremeno disocijativna od spoljašnje sredine, što je uslovalo svrstavanje fenciklidina u klasu disocijativnih anestetika. Pri višim dozama prisutna je rigidna katatonija, slična onoj uočenoj kod obelelih od shizofrenije (Chen i Weston, 1960).

Efekte fenciklidina je moguće pratiti kod životinja i oni su vezani za promene kognitivnih i nekognitivnih funkcija. Na bihevioralnom nivou, perinatalna administracija fenciklidina glodarima remeti lokomotornu aktivnost (Wang i sar., 2001; Depoortere i sar., 2005), senzornomotorno sprovođenje (Wang i sar., 2001, 2003; Takahashi i sar., 2006), i dovodi do kognitivne disfunkcije (Andersen i Pouzet, 2004; Depoortere i sar., 2005; Sircar i Soliman, 2003).

Kod ljudi fenciklidin ima sposobnost da produkuje različite bihevioralne promene. S obzirom da ima anestetičko dejstvo, dovodi do ataksije i pojačava dejstvo depresora centralnog nervnog sistema (CNS), kao što su barbiturati i alkohol. S druge strane, fenciklidin ispoljava efekte slične psihostimulansima, kao što je amfetamin, zbog sposobnosti da poveća krvni pritisak, temperaturu i puls (Mozayani, 2003). Takođe, povećava lokomotornu aktivnost, dovodi do stereotipnog ponašanja i ataksije, klaćenja glave, hodanja unazad i kruženja (Steinpreis, 1996).

Šezdesetih godina prošlog veka fenciklidin je postigao veliku popularnost kao narkotičko sredstvo. Tada je uočeno da pojedinačne doze fenciklidina dovode do pojave psihoza, halucinacija, afektivnog zaravnjavanja, poremećaja mišljenja, kognitivne disfunkcije i socijalnog povlačenja (Luby i sar., 1959; Krystal i sar., 1994), odnosno izaziva simptome karakteristične za pacijente koji boluju od shizofrenije, čime je privukao pažnju na sebe i zauzeo važno mesto u neuronaukama. Bihevioralne promene koje izazivaju različiti psihotomimetici su heterogene zavisno od toga koji je psihotomimetik primenjen. Međutim, za razliku od drugih psihostimulansa fenciklidin je sposoban da indukuje i pozitivne i negativne simptome shizofrenije, kao i kognitivnu disfunkciju (Javitt i Zukin, 1991; Tamminga, 1998). Pozitivni simptomi shizofrenije koji mogu biti indukovani fenciklidinom su paranoja, halucinacije, impulsivnost, neorganizovanost misli i nasilno ponašanje (Javitt i Zukin, 1991), a negativni simptomi prouzrokovani fenciklidinom su emotivna nestabilnost i socijalna izolacija (Jentsch i Roth, 1999; Javitt, 1987). Takođe, fenciklidin je sposoban da oponaša i kognitivne aspekte shizofrenije, kao što su nemogućnost održavanja kognitivnog seta, blokada misli i nepravilna verbalizacija (Luby i sar, 1959).

1.1.4.2. Fenciklidinski animalni model shizofrenije - Perinatalna primena fenciklidina

Imajući u vidu da shizofreniju karakterišu kompleksne promene više neurotransmiterskih sistema, kao i činjenicu da psihotomimetici deluju na neurotransmiterske sisteme – glutamatergički, dopaminergički i serotonergički, dovele su do pojave farmakoloških modela shizofrenije (Gobira i sar., 2013).

Epidemiološke studije ukazuju da izlaganje neonatusa nepovoljnim sredinskim faktorima, tokom perioda gestacije ili u perinatalnom periodu, povećava rizik za razvoj shizofrenije. Različiti poremećaji kao što su infekcije, neuhranjenost, akušerske komplikacije (hipoksija), samo su neki od poremećaja koji povećavaju rizik za razvoj bolesti i ukazuju na neurorazvojno poreklo shizofrenije (Lewis i Levitt, 2002). Pored toga, poznato je da glutamat reguliše migraciju, diferencijaciju i preživljavanje neurona tokom razvoja (Komuro i Rakic, 1993; Guerrini i sar., 1995). Činjenica da NMDA receptor učestvuje u kontroli strukture i neuroplastičnosti (Scheetz i Constantine-Paton, 1994; Brooks i sar., 1997), dovela je do povećanog interesovanja naučnika za animalne modele shizofrenije zasnovane na perinatalnoj primeni antagonista NMDA receptora (Lipska i Weinberger, 2000). Životinje se najčešće tretiraju tokom prve dve nedelje života, koje kod glodara odgovaraju trećem trimestru trudnoće kod ljudi, odnosno periodu kada izlaganje virusnim i sredinskim faktorima povećava verovatnoću za razvoj shizofrenije u adultnom dobu (Clancy i sar., 2001).

Administracija fenciklidina može biti akutna, hronična ili subhronična. Akutna administracija fenciklidina uzrokuje bihevioralne promene kod glodara, kao što su hiperlokomocija (Kalinichev i sar., 2008), socijalno povlačenje (Sams-Dodd, 1995), poremećaj prepulsne inhibicije (Mansbach i Geyer, 1989) i kognicije (Egerton i sar., 2005). Međutim, smatra se da hronična primena fenciklidina mnogo vernije imitira simptome bolesti (Jentsch i Roth, 1999). Glavna kritika fenciklidinskog animalnog modela zasnovanog na hroničnoj administraciji fenciklidina je ta što se lek aplikuje odraslim životinjama, čime se ne reprodukuje indukujući faktor bolesti, odnosno neurorazvojno poreklo shizofrenije. Perinatalni fenciklidinski model shizofrenije pokušava da odgovori na ovo pitanje. Različiti timovi su razvili različite varijante subhroničnog tretmana fenciklidinom, koje se uglavnom razlikuju u varijacijama perioda administracije, dozi, polu i soju glodara. Brojni dokazi ukazuju da primena fenciklidina tokom perinatalnog perioda indukuje trajne bihevioralne promene u odraslom dobu (Mouri i sar., 2007). Važno je napomenuti da se primenom fenciklidina u tokom perinatalnog perioda konstruiše animalni model koji predstavlja kombinaciju neurorazvojne hipoteze shizofrenije i hipoteze o NMDA receptorskoj hipofunkciji. Naša dosadašnja istraživanja na ovom animalnom modelu shizofrenije su pokazala da perinatalna aplikacija fenciklidina glodarima ostvaruje neposredne i dugotrajne efekte

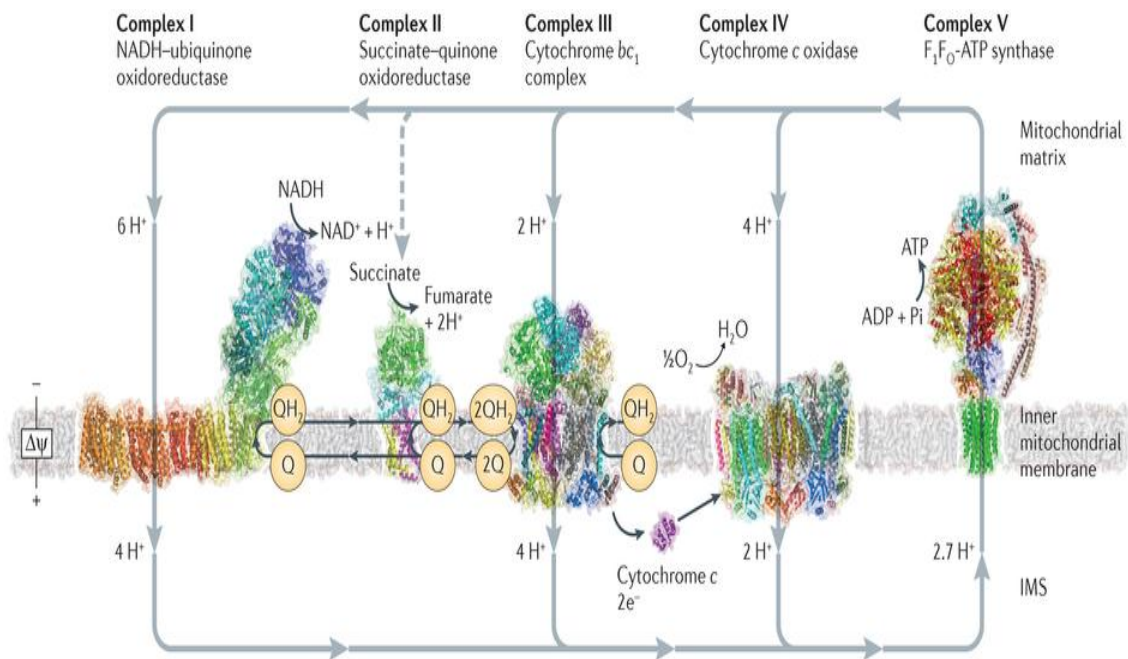
redukujući nivo glutationa i remeteći antioksidativnu zaštitu (Radonjić i sar., 2010; Stojković i sar., 2012), bazalnu temperaturu pacova (Radonjić i sar., 2008), a uočeno je i da redukuje zastupljenost glavnih klasa interneurona u mozgu pacova (Radonjić i sar., 2013).

1.2. Poremećaj mitohondrijalnog metabolizma i procesa apoptoze i autofagije u mozgu obolelih od shizofrenije

Brojne studije ukazuju da mitohondrijalna disfunkcija može imati ulogu u patogenezi shizofrenije. Moždano tkivo, koje je visoko energetska zavisno tkivo, sadrži veći broj mitohondrija i stoga je osjetljivije na poremećaj energetskog metabolizma (Magistretti i Allaman, 2013). Takođe, dokazano je da glutamatergička neurotransmisija zavisi od homeostaze kalcijuma (Ca^{2+}) i adekvatnog funkcionisanja mitohondrija (Smaili i sar., 2011). Mitohondrije su uključene u više esencijalnih procesa u razvoju i normalnom funkcionisanju mozga, kao što su produkcija energije, regulacija ćelijskog ciklusa, apoptoza, stvaranje slobodnih radikala (reaktivnih kiseoničnih vrsta). Pored toga, generišući energiju i regulišući homeostazu Ca^{2+} , mitohondrije su ključne u kontroli fundamentalnih procesa neuroplastičnosti, neuralne diferencijacije, oslobađanja neurotransmitera i remodelovanja dendrita i sinapsi (Nicholls i Budd, 2000; Levy i sar., 2003; Kann i Kovacs, 2007; Cheng i sar., 2010). Stoga možemo zaključiti da bi poremećaj funkcionisanja mitohondrija mogao da dovede do remećenja nekog od ovih procesa, što bi rezultiralo abnormalnom aktivnošću ćelija ili čak ćelijskom smrću (Ben-Shachar, 2002). Takođe, uočeno da je mitohondrijalna disfunkcija povezana sa oštećenjem elektron transportnog lanca i predstavlja važan faktor u patogenezi različitih neuropsihijatrijskih oboljenja, uključujući i shizofreniju (Fattal i sar., 2006; Rezin i sar., 2009).

Osnovni izvor energije u mozgu je energija nastala procesom oksidativne fosforilacije na mitohondrijalnom respiratornom lancu. Respiratorni lanac je lociran u unutrašnjoj membrani mitohondrija i čini ga serija od pet velikih enzimskih kompleksa, nazvanih kompleks I-V (Slika 3). Kompleksi su lateralno mobilni, ne formiraju rigidnu strukturu i prisutni su u ekvimolarnim odnosima sa specifičnom topološkom

organizacijom (Topisirović, 2005). Kompleks I je flavoprotein NADH-koenzim Q reduktaza, koji se sastoji od 26 subjedinica. Ovaj flavoproteinski kompleks predstavlja mesto na kom se NADH reoksiduje odajući svoje elektrone, koji se prenose do koenzim Q (ubikvinon, CoQ). Kompleks II je sukcinat-CoQ reduktaza, sačinjen od 5 subjedinica. Ovaj kompleks katališe prenos elektrona sa sukcinata na CoQ. Koenzim Q je glavni primalac elektrona sa svih dehidrogenaza koje kao koenzime imaju FAD, ali veoma često posrednim putem. Kompleks III je CoQ-citohrom c reduktaza i učestvuje u prebacivanju elektrona sa redukovanog CoQ na citohrom c, periferni membranski protein slabo vezan za spoljašnju stranu unutrašnje membrane mitohondrija. Citohrom c oksidaza (kompleks IV, COX) katalizuje finalnu reakciju respiratornog lanca - prenos 4 elektrona sa redukovanog citohroma c na molekularni kiseonik (O_2) (Boekema i Braun, 2007; Topisirović, 2005). Kompleks V je protein na kom se sintetise adenzin 5'-trifosfat (ATP) i naziva se F_0F_1 -ATP sintaza. Ovaj enzim se sastoji od dve subjedinice: F_0 i F_1 . F_0 deo enzima se sastoji od 12 subjedinica i lociran je u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Ova subjedinica predstavlja kanal za translokaciju protona. F_1 deo enzima se sastoji od 5 subjedinica – tri α , tri β i po jedna μ , δ i ϵ . Ovaj deo enzima je uronjen u matriks mitohondrija i ima funkciju ATP sintaze (Topisirović, 2005; Jonckheere i sar., 2012). Energija dobijena u elektron transportnom lancu se koristi za transfer protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija čime se stvara elektrohemijski gradijent. Ovaj gradijent funkcioniše kao izvor potencijalne energije za sparivanje adenzin difosfata (ADP) i neorganskog fosfora (P_i) i stvaranje ATP-a, koji se dalje koristi za aktivaciju jonskih pumpi koje održavaju potencijal mirovanja membrane i sintezu makromolekula i neurotransmitera (Wallace, 1994; Topisirović, 2005).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Slika 3. Mitohondrijalni respiratorni lanac. Preuzeto iz Sazanov, L.A., 2015. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 375–388.

Ulogu oksidativne fosforilacije u patogenezi shizofrenije po prvi put je pretpostavio Takahashi 1954. godine, uočivši redukciju unosa kiseonika u mozgu obolelih od shizofrenije (Takahashi, 1954). Istraživanja koja su usledila doprinela su teoriji o disfunkciji mitohondrija u shizofreniji. *Post mortem* analizama različitih moždanih regiona pacijenata obolelih od shizofrenije uočena je redukcija broja i volumena mitohondrija (Kung i Roberts, 1999; Uranova i sar., 2001), kao i promene u funkcionisanju mitohondrija, koje se ogledaju u hipoplaziji mitohondrija, poremećaju odvijanja procesa oksidativne fosforilacije i izmenjenoj ekspresiji mitohondrijskih gena (Ben-Shachar, 2002). Dokumentovan je poremećaj energetskeg metabolizma mozga i pojačana produkcija slobodnih radikala kod obolelih od shizofrenije (Prabakaran i sar., 2004). Disfunkcija mitohondrija se ogleda u prekomernom unosu kalcijuma u ćeliju, što dovodi do pojačane produkcije slobodnih radikala (Clay i sar., 2011). U trombocitima periferne krvi i *post mortem* uzorcima mozga pacijenata obolelih od shizofrenije uočene su promene u aktivnosti enzima respiratornog lanca, naročito kompleksa I i citohrom c

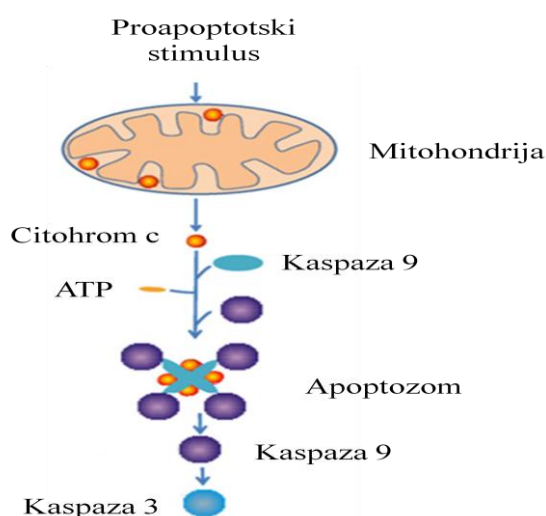
oksidaze (Rajasekaran i sar., 2015; Prabakaran i sar., 2004; Maurer i sar., 2001; Dror i sar., 2002). Povećana aktivnost kompleksa I uočena je analizom trombocita pacijenata sa shizofrenijom u poređenju sa zdravim kontrolama (Ben-Shachar i sar., 2007). Promene aktivnosti enzima respiratornog lanca uočene su i na ketaminskom animalnom modelu shizofrenije (de Oliveira i sar., 2011). Faizi i saradnici (2014) su dokazali da intraperitonealna administracija ketamina odraslim pacovima tokom pet uzastopnih dana dovodi do pojačane produkcije slobodnih radikala, koji uzrokuje kolaps membranskog potencijala mitohondrija.

Disfunkcija mitohondrija, usled poremećaja u funkcionisanju jednog ili više kompleksa respiratornog lanca i pojačane produkcije slobodnih radikala, može rezultirati promenom propustljivosti membrane, opadanjem unutrašnjeg mitohondrijskog membranskog potencijala, osmotskim bubrenjem matriksa, rupturom spoljašnje membrane mitohondrija i oslobađanjem citohroma c u citoplazmu. Na ovaj način aktivira se ćelijska smrt procesom apoptoze (Sas i sar., 2007; Faizi i sar., 2014).

1.2.1. Apoptoza

Apoptoza je visoko regulisan proces programirane ćelijske smrti esencijalan za rani embrionalni razvoj i tkivnu homeostazu (Lee i sar., 2012; Los i sar., 2002). Otkriće ovog mehanizma tokom 20. veka dovelo je do napuštanja teorije stare skoro čitav vek o pasivnom procesu ćelijske smrti (Surova i Zhivotovsky, 2013). Apoptoza je najbolje opisana forma programirane ćelijske smrti, koja se još naziva i tip I ćelijske smrti. Za apoptozu je karakteristično smanjenje volumena ćelije praćeno kondenzacijom hromatina i intranukleozomska fragmentacija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Kada ćelija uđe u proces programirane ćelijske smrti povećava se gustina citoplazme, organele se smanjuju, citoskelet razgrađuje i dolazi do pupljenja plazma membrane. Nakon toga nastupaju fragmentacija jedra i citoplazme na manje fragmente koji se nazivaju apoptotska tela. Procesom fagocitoze nastala apoptotska tela se degraduju (Wyllie i sar., 1980; Fadeel i Orrenius, 2005). Ultrastrukturalne promene koje se dešavaju tokom apoptoze omogućavaju detekciju ovog procesa mikroskopskim metodama (Dikranian i sar., 2001).

Veliki broj stimulusa može aktivirati proces apoptoze u mozgu. Među njima su glutamatska ekscitotoksičnost, mitohondrijska disfunkcija, prekomerni fluks kalcijuma i oksidativni stres, faktori koji su povezani sa patofiziologijom bolesti (Glantz i sar., 2006). Najčešći put aktivacije apoptoze u nervnom sistemu je mitohondrijski put, tzv. unutrašnji put apoptoze (Yuan i Yankner, 2000). Ovaj put karakteriše aktivacija kaspaza, familija cistein proteaza, kojih je do sada identifikovano 14 u sisarskim ćelijama. Kaspaze se sintetišu u inaktivnoj formi u vidu zimogena, a aktiviraju se nakon proteolitičkog isecanja (Li i Yuan, 2008). Citohrom c, koji se u zdravim ćelijama nalazi u intramembranskom prostoru mitohondrija, prilikom aktivacije procesa apoptoze se oslobađa u citosol i formira kompleks sa adapterskim proteinom Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) i prokaspazom 9, formirajući veliki proteinski kompleks koji se naziva apoptozom (Slika 4). Ovaj proteinski kompleks aktivira prokaspazu 9 i aktivirana forma ovog enzima je sposobna da aktivira egzekutorsku kaspazu 3 isecajući neaktivnu formu (prokaspazu 3) do aktivirane forme (Acehan i sar., 2002), koja sada aktivira proces fragmentacije DNK (Sas i sar., 2007).



Slika 4. Shematski prikaz kaspaza-zavisnog mitohondrijskog puta apoptoze. Preuzeto i modifikovano iz Li, Z., Sheng, M., 2012. Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain* 5, 15.

Pored kaspaza-zavisnog puta apoptoze, otkriveno je da se ovaj proces ćelijske smrti može odvijati i bez učešća kaspaza. Godine 1996. Guido Kroemer i njegovi saradnici su otkrili faktor indukcije apoptoze (*apoptosis-inducing factor*, AIF), prvi

protein sposoban da indukuje apoptozu na kaspaza-nezavisan način (Zamzami i sar., 1996; Susin i sar., 1999). Naziv ovog proteina potiče od njegove sposobnosti da izazove apoptotsku jedarnu morfologiju (kondenzacija hromatina i DNK fragmentacija) ali bez učestvovanja kaspaza u tom procesu (Joza i sar., 2001).

Faktor indukcije apoptoze je flavoprotein oksidoreduktaza od 62 kDa, lociran u intramembranskom prostoru, dok je N-terminusom usidren u unutrašnju membranu mitohondrija (Otera i sar., 2005; Sevrioukova, 2011). Iako se prvobitno smatralo da je prisutan samo u intramembranskom prostoru mitohondrija, Yu i saradnici (2009) su pokazali da se u mozgu oko 30% ukupnog mitohondrijskog faktora indukcije apoptoze nalazi sa citoplazmatske strane spoljašnje membrane mitohondrija. Takođe, smatra se da AIF ne učestvuje u svim procesima ćelijske smrti, već da to zavisi od tipa ćelije i stimulusa (Sevrioukova, 2011). Brojni dokazi ukazuju da ima krucijalnu ulogu u ćelijskoj smrti neurona i nekih tumorskih ćelija (Norberg i sar., 2008; Wang i sar., 2004; Cheung i sar., 2005).

Kao i u slučaju kaspaza-zavisnog puta apoptoze, tako i put posredovan faktorom indukcije apoptoze započinje povećanom permeabilnošću spoljašnje membrane mitohondrija (Moubarak i sar., 2007). Mehanizam translokacije faktora indukcije apoptoze iz mitohondrija u jedro je veoma kompleksan i nije u potpunosti definisan. S obzirom da ovaj protein N-terminusom ukotvljen u unutrašnju membranu mitohondrija, prvi korak je proteoliza N-terminusa. Studije su pokazale da u ovome učestvuje kalpain, kalcijum-zavisna mitohondrijalna cistein proteaza (Sevrioukova, 2011; Polster i sar., 2005; Cao i sar., 2007). Ono što je još uvek nepoznanica je način na koji AIF napušta mitohondriju. Jedna od pretpostavki je da disregulacija unutarćelijskog kalcijuma i opadanje mitohondrijskog membranskog potencijala, dovodi do ruptуре spoljašnje membrane mitohondrija. Druga pretpostavka je da poru na spoljašnjoj membrani mitohondrija pravi proapoptotska Bcl-2 familija proteina bez promene membranskog potencijala mitohondrija (Sevrioukova, 2011). Po oslobađanju iz mitohondrija u citosol, faktor indukcije apoptoze se translocira u jedro i dovodi do kondenzacije hromatina praćene isecanjem DNK na fragmente veće od 50kb (Artus i sar., 2010). S obzirom da faktor indukcije apoptoze nema nukleaznu aktivnost, pretpostavlja se da direktno

interaguje sa DNK remeteći strukturu hromatina i/ili regrutovanjem proteaza i nukleaza (Susin i sar., 1999, 2000).

AIF-deficijentni neuroni su oseljiviji na oksidativni stres (Ishimura i sar., 2008). Zbog ove korelacije između deficijencije faktora indukcije apoptoze i oksidativnog stresa, pretpostavljeno je da on ima antioksidativnu ulogu (Klein i sar., 2002; Vahsen i sar., 2004). *In vitro* istraživanja nisu potvrdila ovu pretpostavku (Churbanova i Sevrioukova, 2008). S druge strane, rezultati genetskih analiza su dali kontradiktorne rezultate, ukazujući da faktor indukcije apoptoze može dovesti do povećanja (Apostolova i sar., 2006), smanjenja (Pospisilik i sar., 2007) ili da uopšte nema efekata (Vahsen i sar., 2004) na nivo slobodnih radikala u ćeliji. Istraživanja bazirana na upotrebi *knockout/knockdown* modela ukazuju da faktor indukcije apoptoze indirektno reguliše energetska homeostazu i oksidativnu fosforilaciju u mozgu. Deficijencija faktora indukcije apoptoze utiče na stabilnost elektron transportnog lanca, remeteći aktivnost kompleksa koji ga čine. Međutim, još uvek ostaje nerazjašnjen način na koji faktor indukcije apoptoze utiče na elektron transportni lanac (Polster, 2013). Iako ovaj protein nije u direktnoj vezi ni sa jednim kompleksom respiratornog lanca i nema efekata na njihovu transkripciju (Vahsen i sar., 2004; Palmisano i sar., 2007), studije ukazuju da reguliše formiranje, stabilnost i funkcionisanje kompleksa I respiratornog lanca (Vahsen i sar., 2004; Klein i sar., 2002; Sevrioukova, 2011). Stoga su promene ovog faktora u vezi sa funkcionisanjem prvog enzimskog kompleksa u respiratornom lancu mitohondrija. Moguće je da faktor indukcije apoptoze remećenjem aktivnosti kompleksa I posredno remeti aktivnost i ostalih kompleksa respiratornog lanca, što za posledicu ima disfunkciju mitohondrija i abnormalnu produkciju energije u moždanom tkivu.

Otkriće da postnatalna administracija različitih antagonista NMDA receptora indukuje ćelijsku smrt apoptozom u različitim regionima mozga glodara ukazalo je na potencijalni značaj neurorazvojnih promena u patofiziologiji shizofrenije (Ikonomidou i sar., 1999; Jevtović-Todorović i sar., 2003; Wang i sar., 2001; Wang i Johnson, 2005). Jednokratni tretman fenciklidinom (10 mg/kg s.c.) sedmog postnatalnog dana, kao i ponovljena administracija fenciklidina sedmog, devetog i jedanaestog postnatalnog dana, indukuje neurodegeneraciju praćenu apoptotskim promenama u frontalnom

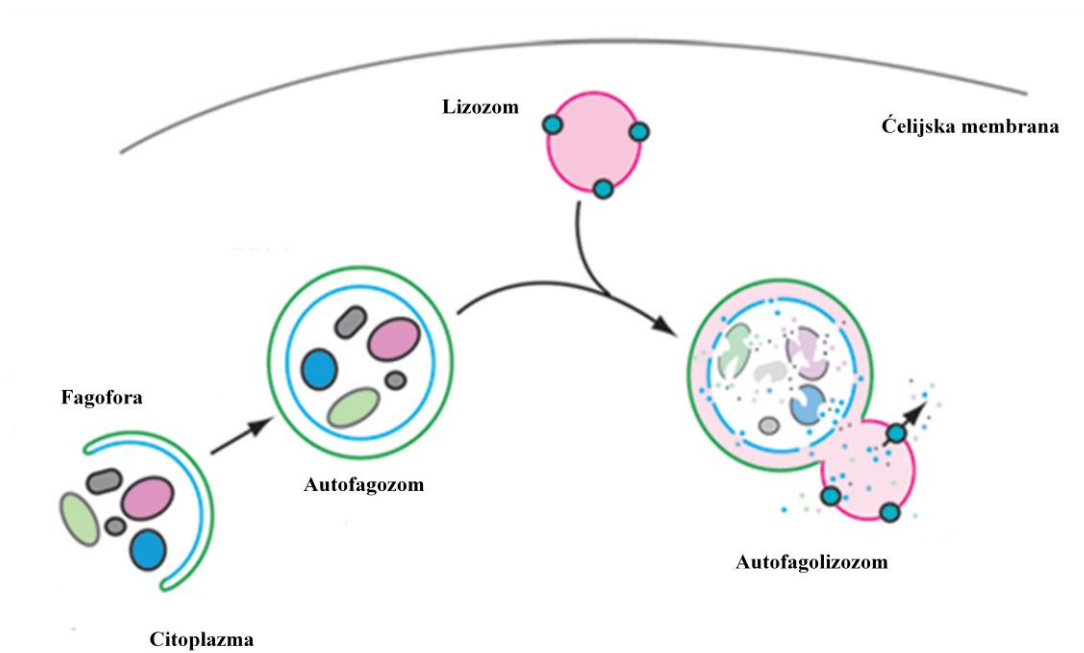
korteksu (Wang i Johnson, 2005; Wang i sar., 2003). *Post mortem* istraživanja (Jarskog i sar., 2004) i istraživanja bazirana na postnatalnoj administraciji ketamina ili fenciklidina pacovima (Scallet i sar., 2004; Wang i Johnson, 2007; Anastasio i sar., 2009) ukazuju na promene aktivnosti i ekspresije kaspaze 3 u mozgu. Usledile su brojne *post mortem* analize i studije na animalnim modelima, ali još uvek nije utvrđeno da li se apoptoza uočena u shizofreniji odvija pored kaspaza-zavisnog puta i/ili kaspaza-nezavisnim putem posredstvom faktora indukcije apoptoze.

1.2.2. Autofagija

Autofagija je evolutivno visoko očuvan proces koji omogućava ravnotežu između sinteze, degradacije i recikliranja ćelijskih komponenti, regulišući na taj način preživljavanje ćelija (Mizushima, 2007). Pored toga, autofagija je uključena u više fizioloških procesa, a neki od njih su normalan razvoj, ćelijska homeostaza i supresija tumora (Mizushima i Levine, 2010). Autofagija ima ulogu u održavanju homeostaze uklanjajući oštećene proteine i ćelijske organele onemogućavajući njihovo nagomilavanje u ćeliji. Stoga su dugo proučavane promene ili defekti u odvijanju procesa autofagije u neurodegenerativnim oboljenjima i kancerima (Nixon, 2006; Ravikumar i sar., 2010). Međutim, autofagija je veoma bitan proces u visoko osetljivim ćelijama, kao što su neuroni. Blokada ovog procesa u neuronima dovodi do ćelijske smrti i neurodegeneracije kod glodara, što ukazuje da autofagija ima važnu ulogu u regulaciji homeostaze u neuronima (Hara i sar., 2006; Mortensen i sar., 2010).

Istraživanja na ovom polju u poslednjih deset godina dovela su do toga da se autofagija smatra i tipom programirane ćelijske smrti, koju karakterišu akumulacije autofagnih vakuola u umirućim ćelijama (Maiuri i sar., 2007). Prekomerna aktivnost autofagije može voditi samouništenju i ćelijskoj smrti, dok sa druge strane i nedovoljna aktivnost ovog procesa takođe doprinosi ćelijskoj smrti. Na bazalnom nivou autofagija je aktivna i učestvuje u održavanju ćelijske homeostaze. Međutim, pod dejstvom različitih stimulusa, proces može biti aktiviran kako bi se ćelije adaptirale na promene (Lee, 2012).

Proces autofagije podrazumeva formiranje autofagnih vezikula koji se odvija kroz tri faze – inicijaciju, elongaciju i degradaciju, uz naknadno fuzionisanje sa lizozomima formirajući na taj način autofagolizozom (Slika 5) (Glick i sar., 2010). Sam proces je veoma kompleksan i uključuje veliki broj proteina. Inicijacija autofagije podrazumeva formiranje membranozne strukture, koja se naziva fagofora. Fagofora je prekursor autofagozoma (Wang i sar., 2011). Poreklo fagofore je još uvek tema debate. Nije u potpunosti rasvetljeno da li potiče od membrane endoplazmatskog retikuluma, Goldži kompleksa, mitohondrija ili plazma membrane klatrin-posredovanom endocitozom (Axe i sar., 2008; Geng i sar., 2010; Hailey i sar., 2010; Ravikumar i sar., 2010).



Slika 5. Shematski prikaz procesa autofagije. Preuzeto i modifikovano iz Klionsky i sar., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eucaryotes. Autophagy 4 (2), 151-175.

Beklin 1 je prvi identifikovan protein uključen u proces autofagije u sisarskim ćelijama (Kihara i sar., 2001). Ovaj protein je uključen u inicijaciju autofagije i formiranje autofagozoma regrutovanjem membrane (Cao i Klionsky, 2007). Ova

membrana progresivno prerasta u dvomembransku vezikulu, koja se naziva autofagozom, u kojoj je odvojen ćelijski otpad (Wang i sar., 2011). Jedan od glavnih markera autofagije je familija mikrotubula asociranih proteina lakog lanca 3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*; LC3) (Wu i sar., 2006). LC3 se isecanjem na C-terminusu prevodi u LC3-I formu, koja se dejstvom fosfatidiletanolamina prevodi u LC3-II. Ova forma se vezuje za unutrašnju membranu autofagozoma (Mizushima, 2007). Stoga je broj autofagozoma u korelaciji sa nivoom LC3-II (Nakatogawa i sar., 2007; Kabeya i sar., 2000). Protein p62 (*sequestosome 1*; SQSTM1) je ligand LC3 proteina i njegova degradacija je pozitivno korelisana sa procesom autofagije. Kako se p62 razgrađuje u procesu autofagije, brojne studije su pokazale korelaciju između inhibicije autofagije i povećanog nivoa p62 proteina (Mizushima i Hara, 2006; Pankiv i sar., 2007). Stoga, p62 može biti korišćen kao marker autofagije, a činjenica da ima manje difuznu lokalizaciju od LC3 proteina, čini ga boljim markerom za lakšu identifikaciju malih autofagnih vezikula (Pankiv i sar., 2007).

Nakon formiranja, autofagozom se fuzioniše sa lizozomom formirajući autofagolizozom (Lee, 2012). Proces fuzionisanja je posredovan mikrotubulama, citoskeletnim elementima, koji dovode ove dve vezikule u bliski kontakt (Ghavami i sar., 2014). U finalnom koraku dolazi do razgradnje citoplazmatskih komponenti u autofagolizozomima. Stoga je aktivnost lizozoma neophodna za njihovu degradaciju. Poremećaj lizozomalnih enzima, kao što je katepsin, indukuje blokadu degradacije autofagijom (Renna i sar., 2011). Važno je napomenuti da defekt u bilo kom koraku tokom procesa autofagije dovodi do abnormalnog nagomilavanja komponenti citosola što dovodi do razvoja bolesti. Stoga svaki korak autofagije mora biti precizno regulisan kako bi se degradacija odvijala efikasno (Lee, 2012).

Najnovije studije ukazuju na poremećaj odvijanja procesa autofagije u mozgu obolelih od shizofrenije (Merenlender-Wagner i sar., 2015). Ovi autori su uočili smanjen nivo iRNK Beklin 1 proteina u hipokampusu obolelih od shizofrenije, koji se ne uočava u limfocitima periferne krvi pacijenata. Redukcija iRNK Beklin 1 proteina u hipokampusu je potvrđena i na mišjem animalnom modelu (*ADNP^{+/-} knockout* miševi).

Međutim, nedostaju istraživanja defekata ovog procesa na animalnim modelima zasnovanih na postnatalnoj administraciji antagonista NMDA receptora glodarima.

Poznato je da abnormalnosti u odvijanju procesa autofagije vode aktivaciji apoptoze (Debnath i sar., 2005; Lum i sar., 2005), što ukazuje na potencijalnu međusobnu povezanost ova dva procesa. Sve se više pretpostavlja da bliska veza između ova dva procesa zaista postoji jer oba mogu biti aktivirana sličnim signalima (Marquez i Xu, 2012; Kang i sar., 2011). Novije studije ukazuju da bi odgovor mogao da leži u Beklin 1 proteinu. Moguće je da je ovaj protein neka vrsta prenosnice između ova dva procesa, s obzirom da on sadrži BH3 domen kao ostali apoptotski molekuli (Kang i sar., 2011) i da je promena njegove ekspresije praćena promenom ekspresije Bcl-2 proteina, anti-apoptotskog proteina (Merenlender-Wagner i sar., 2015). Danas se smatra da ovaj protein predstavlja odlučujući faktor po pitanju toga da li ćelija ulazi u apoptozu ili autofagiju (Kang i sar., 2011). Međutim, Beklin 1 nije neophodan za odvijanje apoptoze, iako se zna da inhibira ovaj proces ćelijske smrti mada precizan mehanizam delovanja nije utvrđen (Yue i sar., 2003; Kang i sar., 2011).

1.3. Uticaj antipsihotika na mitohondrijski metabolizam i procese apoptoze i autofagije

Antipsihotici su lekovi koji se koriste u terapiji svih mentalnih poremećaja psihotične strukture, uključujući i shizofreniju (Miyamoto i sar., 2005). Pojava prvih antipsihotika pedesetih godina prošlog veka predstavljala je revoluciju u terapiji shizofrenije. Do danas sintetisano je preko 60 antipsihotika, koji se klasifikuju u dve kategorije: tipične (lekovi prve generacije) i atipične (lekovi druge generacije) antipsihotike (Tandon i sar., 2010). U tipične antipsihotike između ostalog spadaju haloperidol, hlorpromazin i trifluoperazin, dok su neki izraziti predstavnici atipičnih antipsihotika klozapin, risperidon, olanzapin i aripiprazol (Seeman, 2002). Dejstvo antipsihotika je zasnovano na činjenici da su oni blokatori dopaminskih receptora i da sprečavaju vezivanje prirodnog liganda dopamina za receptor, čime se blokira dopaminska neurotransmisija. Pored dopaminskih receptora, antipsihotici se vezuju i za receptore drugih neurotransmiterskih sistema (Tandon i sar., 2010). Antipsihotici prve

generacije ostvaruju svoje dejstvo blokirajući dopaminske D₂ receptore, za koje se jače vezuju nego prirodni agonisti (Seeman, 2002). Takođe, uočeno je da postoji korelacija između terapijske doze i afiniteta za vezivanje za D₂ receptore (Miyamoto i sar., 2005). Ova klasa antipsihotika je karakteristična po tome da uzrokuje akutne ekstrapiramidalne simptome i diskinezije, uključujući tardivnu diskineziju (Nasrallah i Tandon, 2009). Ukoliko su prisutni, ovi neželjeni efekti terapije su veoma neprijatni za pacijenta i često su razlog nepridržavanja prepisane terapije (Gaebel, 1997). Antipsihotici druge generacije imaju manji afinitet prema D₂ receptorima, a jače se vezuju za serotoninske 5HT receptore (Nandra i Agius, 2012). Poznato je da obe generacije antipsihotika utiču na pozitivne simptome, ali atipični antipsihotici poboljšavaju negativne simptome i kognitivne poremećaje, vrše prevenciju relapsa i uzrokuju u manjoj meri ekstrapiramidalne simptome (Tandon i sar., 2008; Miyamoto i sar., 2005). Primenu ovih antipsihotika često prate metabolički nusefekti, a neki od njih su gojaznost, hiperglikemija i dislipidemija (Miyamoto i sar., 2005; Nandra i Agius, 2012).

Klozapin je prvi antipsihotik druge generacije sintetisan 1959. godine od strane Schmutz i saradnika (Seeman, 2014), a u kliničku praksu je uveden šezdesetih godina prošlog veka. Ovaj lek ispoljava visok afinitet za serotoninske 5HT₂ receptore, dok je afinitet za dopaminske D₁ i D₂ receptore slabiji, čime se objašnjava efikasnost ovog leka u lečenju negativnog sindroma u odnosu na tipične antipsihotike. Činjenica da ne uzrokuje ekstrapiramidalne nusefekte takođe se smatra posledicom višeg afiniteta za serotoninske nego za dopaminske receptore (Miyamoto i sar., 2005). Pored toga, klozapin je jedinstven lek zbog efikasnosti u lečenju pacijenata rezistentnih na klasičnu terapiju (Tuunainen i sar., 2002; Miyamoto i sar., 2005), čak i pored činjenice da je jedan od neželjenih efekata ovog leka agranulocitoza koja se javlja kod 0,5-1% pacijenata (Alvir i sar., 1993). Zbog veće efikasnosti klozapina u odnosu na antipsihotike prve generacije u lečenju pacijenata rezistentnih na terapiju, došlo je do postepene pojave i ostalih predstavnika druge generacije antipsihotika. Smatralo se da je ovih 13 antipsihotika daleko uspešnije u terapiji od 51 antipsihotika prve generacije, pa su stoga nazvani atipičnim (Tandon i sar., 2010). Međutim, istraživanja na pacijentima sa prvim epizodama bolesti upućuju na odsustvo benefita lečenjem antipsihoticima druge generacije nad lečenjem antipsihoticima prve generacije (Kahn i sar., 2008; Sikich i sar., 2008; Davidson i sar., 2009). Uočeno je da antipsihotici druge generacije

prednjače po efikasnosti i tolerabilnosti u odnosu na antipsihotike prve generacije, ali da je korist ovih agenasa po pitanju svih simptoma bolesti, pozitivnih i negativnih, skromna u najboljem slučaju (Leucht i sar., 1999; Geddes i sar., 2000). Studije ukazuju i da među antipsihoticima druge generacije postoji razlika u efikasnosti, pa su klopazin, risperidon i olanzapin superiorniji od ostalih lekova iz ove klase (Davis i sar., 2003).

Iako se shizofrenija smatra neurorazvojnim poremećajem, prisutni su dokazi da je ona takođe progresivno i potencijalno neurodegenerativno oboljenje. S obzirom da su antipsihotici sposobni da moduliraju hemijsku neurotransmisiju i na taj način redukuju simptome bolesti, moguće je da imaju ulogu i u neuroprotekciji i neurotoksičnosti (Gassó i sar., 2012). Stoga se postavlja pitanje da li su promene uočene u mozgu obolelih od shizofrenije posledica tretmana antipsihoticima ili posledica same bolesti. Takođe, razumevanje mehanizama dejstva antipsihotika doprinosi boljem razumevanju shizofrenije.

Proučavanje dejstva antipsihotika na animalnim modelima je od važnog naučnog značaja (Lipska i Weinberger, 2000). Međutim, ono što predstavlja problem kod ovih studija je doziranje antipsihotika, koje je kod životinja otežano jer glodari imaju brži metabolizam i poluživot leka je kraći 4-6 puta nego kod čoveka (Kapur i sar., 2003). Tako je poluživot haloperidola kod glodara 1,5h dok je kod čoveka 12-36h, dok je poluživot klopazina kod glodara takođe 1,5h naspram 6-7h kod čoveka (Bezchlibnyk-Butler i Jeffries, 1999). Stoga se mora primeniti drugačije doziranje nego jednom do dvaput dnevno kao što je to najčešći slučaj tretmana kod ljudi (Kapur i sar., 2003). Takođe, mora se optimizovati doza i postizanje stabilne koncentracije u plazmi. Zbog toga se za hroničan tretman koristi lek rastvoren u vodi u koju se dodaje sirćetna kiselina koja omogućava stabilnu koncentraciju rastvorenog antipsihotika (Terry i sar., 2005).

Posledice dugotrajne terapije antipsihoticima, možda čak i višedecenijske, na enzimsku aktivnost su još uvek nepoznate (Maurer i sar., 2001). Pretpostavlja se da antipsihotici mogu doprineti nestabilnosti mitohondrija i promeni funkcije ovih organela. Što se tiče enzima respiratornog lanca, Whatley i saradnici (1996) su pokazali da nema razlike u aktivnosti citohrom c oksidaze između lečenih i nelečenih pacijenata obolelih od shizofrenije. Međutim, naredne godine je otkriveno da antipsihotici utiču na

aktivnost enzima respiratornog lanca. Primena različitih antipsihotika progresivno smanjuje aktivnost kompleksa I u korteksu zdravih osoba, pri čemu je ovaj efekat doznno zavisian (Maurer i Möller, 1997). Inhibicija aktivnosti kompleksa I posredstvom antipsihotika haloperidola i klozapina je potvrđena i u mozgu pacova, s' tim da klozapin ostvaruje inhibitorno dejstvo pri višim koncentracijama od haloperidola (Burkhardt i sar., 1993). Uočeno je da primena haloperidola redukuje aktivnost kompleksa I u mozgu odraslih pacova bez obzira da li se primenjuje hronično ili akutno, što se ne uočava nakon primene klozapina (Prince i sar., 1997). Međutim, oba antipsihotika uzrokuju povećanje aktivnosti citohrom c oksidaze u prefrontalnom korteksu. Ovo povećanje je prisutno i u hipokampusu životinja tretiranih klozapinom. Skorije studije na pacijentima potvrđuju da su obe klase antipsihotika sposobne da inhibiraju mitohondrijski respiratorni lanac (Casademont i sar., 2007).

Novije studije ukazuju na moguću vezu između dugogodišnjeg tretmana antipsihoticima i skraćenog životnog veka pacijenata. Međutim, rezultati ovih studija su prilično kontradiktorni, od nalaza da antipsihotici povećavaju mortalitet (Weinmann i sar., 2009), do toga da skraćuju (Tiihonen i sar., 2009) ili ne utiču na životini vek pacijenata (Ran i sar., 2009). Stoga su neophodna dodatna ispitivanja uticaja antipsihotika prve i druge generacije na preživljavanje i smrt neurona i da li ti efekti doprinose razlikama u ekstrapiramidalnim simptomima (Gassó i sar., 2012). Takođe, dugi niz godina se smatralo da su evidentirane progresivne promene volumena mozga prominentna karakteristika shizofrenije. Međutim, longitudinalna studija zasnovana na primeni tehnike neurovizuelizacije (magnetna rezonanca visoke rezolucije - MRI) je utvrdila da postoji korelacija između tretmana antipsihoticima i globalne redukcije volumena mozga kod obolelih od shizofrenije. Zanimljiv podatak je da redukciju uzrokuju i tipični i atipični antipsihotici (Ho i sar., 2011), što implicira na kritični stav prema dugogodišnjem tretmanu antipsihoticima. Ovi rezultati su potvrđeni i na primatima (Dorph-Petersen i sar., 2005). Primati su tretirani 17-27 meseci haloperidolom i olanzapinom u dozama koje u plazmi dostižu nivo kao doze koje se uočavaju kod obolelih od shizofrenije tretiranim istim lekovima. Kod ovih životinja je uočeno smanjenje težine i volumena mozga u odnosu na kontrolne životinje. Redukcijom su bili obuhvaćeni svi moždani regioni, ali su najzahvaćeniji promenom bili frontalni i parijetani lobus.

In vitro studije ukazuju da antipsihotici prve generacije, a među njima i haloperidol, smanjuju vijabilitet neurona (Gil-ad i sar., 2001), uzrokujući oksidativni stres i apoptozu (Galili i sar., 2000; Noh i sar., 2000). Primena haloperidola tokom šest nedelja dovodi do degenerativnih ultrastrukturnih promena koje su karakteristične za proces apoptoze (Altunkaynak i sar., 2012). Studije su utvrdile da je neurotoksični efekat haloperidola dozno zavisian (Reinke i sar., 2004; Agostinho i sar., 2007). Međutim, opservirano je i neuroprotektivno dejstvo haloperidola na neurotoksičnost izazvanu blokadom NMDA receptora (Zhuravliova i sar., 2007; Gardoni i sar., 2008), kao i na ćelijsku smrt indukovanu administracijom ketamina (Keilhoff i sar., 2010). Slično dualno dejstvo u ćelijama ima i atipični antipsihotik klopazin (Magliaro i Saldanha, 2009; Dwyer i sar., 2003). Klopazin je sposoban da inhibira efekte fenciklidina u mozgu pacova (Wang i Liang, 1998; Arvanov i sar., 1997; Arvanov i Wang, 1999) ali precizan mehanizam kojim deluje na NMDA receptorsku hipofunkciju, kada je poznato da nema afinitet za ove receptore, ostaje nerazjašnjen. Prema Contreras-Shannon i saradnicima (2013) primena klopazina dovodi do promene membranskog potencijala mitohondrija, morfologije i volumena mitohondrija u ćelijama neuroblastoma.

Postoji mogućnost da smanjenje vijabiliteta uzrokovano tretmanom antipsihoticima nije posledica aktivacije apoptoze, nego poremećaj u odvijanju procesa autofagije. Efekat antipsihotika na proces autofagije je mnogo manje proučavan nego efekat istih na procese apoptoze, iako lekovi mogu imati štetan efekat blokirajući proces autofagije u neuronima. Jedna od prvih studija koja se bavila proučavanjem veze autofagije i antipsihotika je pokazala da haloperidol i klopazin smanjuju vijabilitet ćelija remeteći uklanjanje autofagozoma i/ili njegovu fuziju sa lizozomima, čineći na taj način neurone podložnijim neurodegeneraciji (Park i sar., 2012). Prema ovim autorima, antipsihotici imaju negativan uticaj na preživljavanje neurona na vremenski i dozno zavisian način.

Osim na neurone, brojni autori su uočili da antipsihotici imaju efekat i na glija ćelije. Konopaske i saradnici (2008) su pokazali da hronično tretiranje antipsihoticima haloperidolom ili olanzapinom (oralna primena dva puta dnevno tokom 17-27 meseci) u mozgu makaki majmuna dovodi do smanjenja broja astrocita, a uočen je sličan trend u

broju oligodendrocita. Takođe, pokazano je da pretretman klozapinom, ali ne i haloperidolom, sprečava povećanje ekspresije GFAP indukovano primenom dizocilpina (MK-801), nekompetitivnog antagoniste NMDA receptora, u cingulatnom i retrosplenijalnom korteksu pacova (Arif i sar., 2007). Nakon primene haloperidola u dozi od 1 mg/kg u strijatumu zamoraca se uočava veći broj glija ćelija nego u kontrolnoj grupi životinja, kao i degeneracija mijelina, dok se ne uočavaju makrofagi mikroglialnog porekla (Altunkaynak i sar., 2012). Dugi niz godina, istraživanja su evidentirala gubitak i disfunkciju oligodendrocita u shizofreniji (Uranova i sar., 2004; Haroutunian i sar., 2007; Martins-De-Souza i sar., 2011; Bernstein i sar., 2015), što se u skorije vreme dovodi u vezu sa dugogodišnjom terapijom. Imajući na umu da su ćelije mikroglije uključene u imunski odgovor u mozgu i da postoje indicije da su infekcije povezane nastankom shizofrenije (neuroinflamatorna hipoteza), *post mortem* analize ne upućuju na izraženu mikrogliozu u mozgu obolelih od shizofrenije i ne ukazuju da terapija ima veliki uticaj na proliferaciju ovih ćelija (Steiner i sar., 2006, 2008). Međutim, Cotel i saradnici (2015) su uočili mikroglialnu proliferaciju i morfološke promene koje ukazuju na aktiviranu mikrogliju u mozgu pacova tretiranim haloperidolom u dozi 2 mg/kg tokom osam nedelja.

Iako pomenute studije ukazuju da tretman antipsihoticima utiče na ćelije CNS-a, nedostaju istraživanja efekata antipsihotika nakon primene antagonista NMDA receptora, tj. na animalnim modelima shizofrenije, koja bi mogla da doprinesu boljem razumevanju veze hronične primene psihofarmaka i shizofrenije. Pored toga, od posebnog interesa je utvrditi uticaj tipičnih i atipičnih antipsihotika na funkciju mitohondrija i procese apoptoze i autofagije, kako bi se razgraničili efekti antipsihotika od karakteristika same bolesti.

2. CILJEVI

I Ispitivanje neposrednih (PN13) i dugotrajnih (PN70) efekata perinatalne primene fenciklidina na:

- mitohondrijski metabolizam određivanjem aktivnosti enzima respiratornog lanca (kompleksa I i citohrom c oksidaze),
- proces apoptoze, određivanjem ekspresije kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF),
- proces autofagije, određivanjem ekspresije Beklina 1 i p62 proteina, i
- ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu mozga pacova primenom transmisiona elektronske mikroskopije.

II Ispitivanje dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina i efekata hronične primene tipičnog antipsihotika haloperidola i atipičnog antipsihotika klozapina (PN100) na:

- mitohondrijski metabolizam određivanjem aktivnosti enzima respiratornog lanca (kompleksa I i citohrom c oksidaze),
- proces apoptoze, određivanjem ekspresije kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF),
- proces autofagije, određivanjem ekspresije Beklina 1 i p62 proteina,
- ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu pacova, kao i
- zastupljenost ćelija centralnog nervnog sistema u korteksu i hipokampusu mozga pacova primenom markera neurona (NeuN), astrocita (GFAP), oligodendrocita (MOG) i mikroglije (Iba 1).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni pacovi muškog pola soja Wistar. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biomedicinska istraživanja Galenika u Beogradu.

3.2. Tretiranje životinja

Skotne ženke Wistar pacova su pojedinačno čuvane u kavezima sa 12-časovnim ciklusom svetlo-mrak, sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Po koćenju, u roku od 24 sata, mladunci iz više legala su nasumično pomešani. Eksperimentalne životinje su tretirane 2, 6, 9 i 12. postnatalnog (PN) dana fenciklidinom ili fiziološkim rastvorom natrijum hlorida (0,9% NaCl) subkutanom (s.c.) administracijom. Fenciklidin hidrohlorid (Sigma) je rastvoren u sterilnim uslovima u 0,9% NaCl u koncentraciji od 1mg/ml i aplikovan eksperimentalnim životinjama u dozi od 10 mg/kg telesne težine (t.t). Kontrolnoj grupi je u istoj zapremini subkutano aplikovan 0,9% NaCl.

Formirano je deset grupa eksperimentalnih životinja:

- 1) NaCl-PN13 grupa (n=16) – perinatalna administracija NaCl-a; životinje su žrtvovane 13. PN dana.
- 2) PCP-PN13 grupa (n=16) – perinatalna administracija PCP-a; životinje su žrtvovane 13. PN dana.
- 3) NaCl-PN70 grupa (n=16) – perinatalna administracija NaCl-a; životinje su žrtvovane 70. PN dana.
- 4) PCP-PN70 grupa (n=16) – perinatalna administracija PCP-a; životinje su žrtvovane 70. PN dana.
- 5) NaCl-PN100 grupa (n=21) – perinatalna administracija NaCl-a; od 35. PN dana do 100. PN dana pacovi su dobijali pijaću vodu u koju je dodata sirćetna kiselina (finalna

koncentracija 1 mM) u istovetnoj koncentraciji koja se koristi za rastvaranje antipsihotika (haloperidola i klopazina). Životinje su žrtvovane 100. PN dana.

6) PCP-PN100 grupa (n=21) – perinatalna administracija PCP-a; od 35. PN dana do 100. PN dana pacovi su dobijali pijaću vodu sa rastvorenom kiselinom kao i prethodna grupa, nakon čega su 100. PN dana žrtvovani.

7) NaCl-H grupa (n=21) – perinatalna administracija NaCl-a; od 35. PN dana do 100. PN dana pacovi su bili tretirani haloperidolom (H) (*Krka*, Slovenija) koji je rastvoren u vodi za piće u dozi 1 mg/kg t.t/dan (Steward i sar., 2012). Haloperidol je rastvaran u 0,1M sirćetnoj kiselini, a potom razblažen (1:100) za dnevnu administraciju leka u vodi za piće (Terry i sar., 2007). Doziranje leka je bilo u skladu sa prosečnom dnevnom potrošnjom vode u odnosu na telesnu težinu životinje. Lek je oralno administriran tokom devet nedelja (do 100. PN dana), nakon čega su životinje žrtvovane.

8) PCP-H grupa (n=21) – perinatalna administracija PCP-a; od 35. PN dana do 100. PN dana pacovi su bili tretirani haloperidolom po istom principu kao prethodna grupa. Žrtvovanje životinja je sprovedeno 100. PN dana.

9) NaCl-K grupa (n=21) – perinatalna administracija NaCl-a; od 35. PN dana do 100. PN dana pacovi su bili tretirani klopazinom (K) (*Sandoz*, Nemačka) koji je rastvoren u vodi za piće u dozi 20 mg/kg t.t/dan (Steward i sar., 2012). Klopazin je rastvaran u 0,1 M sirćetnoj kiselini, a potom razblažen (1:100) za dnevnu administraciju leka u vodi za piće (Terry i sar., 2007). Doziranje leka je bilo u skladu sa prosečnom dnevnom potrošnjom vode u odnosu na telesnu težinu životinje. Lek je oralno administriran tokom devet nedelja (do 100. PN dana), nakon čega su životinje žrtvovane.

10) PCP-K grupa (n=21) – perinatalna administracija PCP-a; od 35. PN dana do 100. PN dana pacovi su bili tretirani klopazinom po istom principu kao prethodna grupa, nakon čega su 100. PN dana žrtvovani.

Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine – Uprava za veterinu (dozvola broj 323-07-04083/2016-05/4).

3.3. Biohemijske analize

3.3.1. Izolovanje struktura za određivanje enzimskih aktivnosti

Za određivanje enzimskih aktivnosti korišćeno je po šest životinja iz svake eksperimentalne grupe. Wistar pacovi su žrtvovani 13, 70. i 100. PN dana cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom. Po dekapitaciji, glave su trenutno zamrzavane u tečnom azotu, a zatim čuvane u zamrzivaču na -85°C . Moždane strukture (prefrontalni korteks i hipokampus) su preparisane na hladno i homogenizovane u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25 M/L saharoza, 10 mmol/L K/NaPO₄ pufer pH 7,0 i 1 mmol/L EDTA) kako bi se sprovelo subcelularno frakcionisanje moždanih regiona po metodi Whittakera i Barkera (1972). Homogenizacijom usitnjeno tkivo je potom centrifugirano 15 minuta na 1000G. Supernatant je odvojen i čuvan na $+4^{\circ}\text{C}$. Talog je resuspendovan u saharoznom medijumu i centrifugiran 15 minuta na 1000G. Dobijeni supernatanti su spojeni i predstavljaju neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule (mikrozome) nastale od glatkog i granulisanog endoplazmatičnog retikuluma, Goldži aparata i ćelijske membrane, kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen tokom 60 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ uz povremeno mešanje. Ovako resuspendovan talog je centrifugiran 15 minuta na 1700G. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome. Neprečišćena mitohondrijalna frakcija je korišćena za dalje određivanje enzimskih aktivnosti.

3.3.2. Određivanje sadržaja proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana spektrofotometrijski po metodi Lowry-a i saradnika (1951). Kao standard je korišćen kristalizovani serumski albumin govečeta (BSA) (*Sigma Aldrich*, Nemačka). Količina proteina u uzorku određivana je neposredno po ekstrakciji. Razblaživanjem sa saharoznim medijumom koncentracija proteina u svim uzorcima je svedena na približno 1 mg/ml.

3.3.3. Određivanje aktivnosti kompleksa I

Aktivnost kompleksa I je određivana u neprečišćenoj mitohondrijskoj frakciji po metodi Janssen i saradnika (2007), praćenjem reakcije u kojoj kompleks I oksiduje NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) i stvoreni elektroni redukuju decilubihinon, sintetički analog ubihinona. Redukovani decilubihinon, decilubihinol, dalje prenosi elektrone do 2,6-dihloroindofenola (DCIP; *Sigma Aldrich*, Nemačka), plavo obojenog jedinjenja koje se redukcijom obezbojava. Intenzitet redukcije 2,6-dihloroindofenola se prati spektrofotometrijski na talasnoj dužini 600 nm. S obzirom na to da elektrone koje prenose druge NADH-zavisne dehidrogenaze ne prihvata decilubihinon, redukcija 2,6-dihloroindofenola se može smatrati gotovo isključivo posledicom aktivnosti kompleksa I. Reakcija se odvija u prisustvu antimicina A koji deluje kao inhibitor kompleksa III respiratornog lanca.

Reagensi:

1. 30 mM Kalijum-fosfatni pufer, pH=7,8
51,2 g/L K_2HPO_4
820 mg/L KH_2PO_4
2. 5 mM Kalijum-fosfatni pufer, pH=7,4
522,6 mg/L K_2HPO_4
272,2 mg/L KH_2PO_4
3. Goveđi serum albumin (BSA)
4. 3 mM 2,6-dihloroindofenol (DCIP) ($M_r=290,08$) (sc-203269, *Santa Cruz*, SAD)
5. 3,5 mM Decilubihinon (decilCoQ) u dimetil sulfoksidu (DMSO) ($M_r=322,4$) (sc-358659, *Santa Cruz*, SAD)
6. 50 μ M Antimicin-A (sc-202467, *Santa Cruz*, SAD)
7. 10 mM NADH ($M_r=709,4$) (N8129, *Sigma*, Nemačka)

U epruvetu dodati 850 μl fosfatog pufera $\text{pH}=7,8$, 50 μl BSA, 20 μl DCIP, 20 μL decilCoQ i 20 μL antimicina-A, pa dodati 20 μl uzorka. Inkubirati 3 minuta na 37°C . Dodati 20 μL NADH i meriti apsorbancu na 600 nm tokom 4 minuta, u intervalima od 30 sekundi na 37°C .

Molarni apsorpcioni koeficijent DCIP na 600 nm je $19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Aktivnost kompleksa I izraziti kao U/g proteina, pri čemu 1 U kompleksa odgovara 1 μmol redukovanog DCIP u minutu.

3.3.4. Određivanje aktivnosti citohrom c oksidaze

Aktivnosti citohrom C oksidaze (kompleksa IV), terminalne komponente respiratornog lanca, određivana je spektrofotometrijski u neprečišćenoj mitohondrijskoj frakciji po metodi Hess i Pope (1953). Metoda se zasniva na oksidaciji ferocitohrom C do fericitohroma C posredstvom citohrom c oksidaze, što je praćeno smanjivanjem ekstinkcije tokom 3-5 minuta na 550 nm. Uzorci se pripremaju sa deoksiholatom ili nekim drugim deterdžentom (za deoksiholat finalna koncentracija mora biti 0,75 %)

Reagensi:

1. 0,05 M Kalijum fosfatni pufer $\text{pH}=7,1$
 - A) K_2HPO_4 4,4 g / 500 ml vode
 - B) KH_2PO_4 680 mg / 100 ml vode
2. $2,5 \times 10^{-5}$ M citohroma c - 3,25 mg (0,00325 g) / 10ml kalijum fosfatnog pufera
3. 1 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (natrijum ditionat)
1,75 mg (0,00175 g) / 10 ml reagensa 2
4. 7,5% deoksiholat 300mg / 4ml vode (za 0,75% 90 mg / 12 ml vode)

Ekstinkcioni molarni koeficijent za redukovani citohrom c na 550 nm je 23,94. Molekulska težina citohroma c iz goveđeg srca je 12384.

U kivetu sipati 0,95 ml pripremljenog (redukovanog) rastvora citohroma c. Potom dodati 0,05 ml uzorka i energično promućkati. Pratiti promenu ekstinkcije u toku 3 minuta na talasnoj dužini 550 nm.

Izračunavanje:

$$\frac{\Delta E_{3\text{min}}}{\gamma \text{ proteina u uzorku}} \times 3061 = \frac{\text{mg citohroma c}}{\text{mg proteina}}$$

3.4. Određivanje ekspresije proteina tehnikom Western blot

Ekspresija kaspaze 3, faktora indukcije apoptoze (AIF), Beklin 1, p62 proteina, kao i markera neurona (NeuN), astrocita (GFAP), oligodendrocita (MOG) i mikroglije (Iba 1), određivana je tehnikom *Western blot*. Po pet životinja iz svake eksperimentalne grupe je žrtvovano cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom, nakon čega su moždane strukture (prefrontalni korteks i hipokampus) preparisane na hladno i homogenizovane u RIPA puferu za liziranje (300 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl (pH=7,4), 0,2% SDS, 2% Na-deoksiholat, 2% Triton X-100, 100 mM fenilmetilsulfonil fluopid, 200 mM Na-ortovanadat i koktel inhibitora proteaza). Zatim je homogenat tkiva je centrifugiran 15 minuta na 18000G na +4°C. Odvojeni supernatant predstavlja ćelijski lizat koji se koristi za dalje analize. Koncentracija proteina u uzorcima je određivana metodom po Bradford-u (1976).

Jednake količine proteina iz svakog uzorka (50 µg po bunariću) su razdvojene elektroforezom na 10% - 15% SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE gelu) u trajanju od skoro 120 minuta na 120V, a zatim je izvršen transfer proteina sa gela na nitroceluloznu membranu (*Bio-Rad*, SAD). Membrane su potom inkubirane u 5% nemasnom mleku u TBS-T (100 mM Tris baza, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH=7,6) radi blokiranja nespecifičnih mesta vezivanja. Po blokiranju, membrane su inkubirane preko noći na +4°C sa sledećim primarnim antitelima: kaspaza 3 (1:1000, zečje poliklonsko, *AnaSpec Inc*, SAD), AIF (1:1000, zečje poliklonsko, *AnaSpec Inc*,

SAD), Beklin 1 (1:1000, zečje monoklonsko, *Cell Signaling Technology*, SAD), p62 (1:5000, zečje poliklonsko, *Cell Signaling Technology*, SAD), NeuN (1:1000, mišje monoklonsko, *Millipore*, SAD), GFAP (1:2000, zečje poliklonsko, *DAKO*, Danska), MOG (1:1000, zečje monoklonsko, *Abcam*, Velika Britanija), Iba 1 (1:250, kozje poliklonsko, *Abcam*, Velika Britanija). Po isteku inkubacije, višak primarnog antitela je uklonjen ispiranjem u TBS-T, a zatim su membrane inkubirane sa odgovarajućim HRP-obežanim sekundarnim antitelom (1:2000, anti-zečje, anti-mišje ili anti-kozje, *Southern Biotech*, SAD) tokom 60 minuta. Višak sekundarnog antitela je uklonjen na isti način kao višak primarnog antitela. Membrane su zatim izložene aktiviranom luminol radnom rastvoru (aktivira ga 30% H₂O₂) tokom 2 minuta na sobnoj temperaturi i vizuelizacija specifičnih proteinskih traka je izvršena upotrebom ChemiDoc MP sistema (*Bio-Rad*, SAD). Sve membrane su „stripovane” (uklonjena su vezana antitela) i inkubirane sa anti-β-Aktin antitelom (1:10.000, mišje monoklonsko, *Sigma-Aldrich*, Nemačka) kako bi se proverilo da li su svi bunarići podjednako napunjeni. Stripovanje membrana je izvršeno inkubiranjem u puferu koji sadrži glicin, Tris bazu i Tween-20 (pH=7,4), koje prati inkubacija u fosfatnom puferu i TBS-T. Ekspresija proteina je kvantifikovana denzitometrijski upotrebom softvera *ImageQuant 5.2* i izražena je u odnosu na β-Aktin.

3.5. Ispitivanje morfoloških promena metodom transmisione elektronske mikroskopije

Za ispitivanje morfoloških promena u mozgu pacova je žrtvovano po pet životinja iz svake eksperimentalne grupe. Uzorci korteksa i hipokampusa su isečeni i fiksirani u 3% rastvoru glutaraldehida (*Merck*, Nemačka) u 0.1 M kakodilatnom puferu pH=7,4 (*Merck*, Nemačka) preko noći na +40°C. Nakon osmifikacije i dehidratacije u etanolu, isečci mozga su uronjeni u Epon (*Merck*, Nemačka). Pomoću dijamantskog noža na Leica Ultracut UCT EM FCS ultramikrotomu su isečeni ultratanki preseki, koji se sakupljaju na bakarnim mrežicama i boje uranil acetatom i olovo citratom (*SERVA Electrophoresis*, Nemačka). Isečci su analizirani pomoću FEI Morgagni 268D transmisionim elektronskim mikroskopom (*FEI Europe*, Holandija) i slikani pomoću

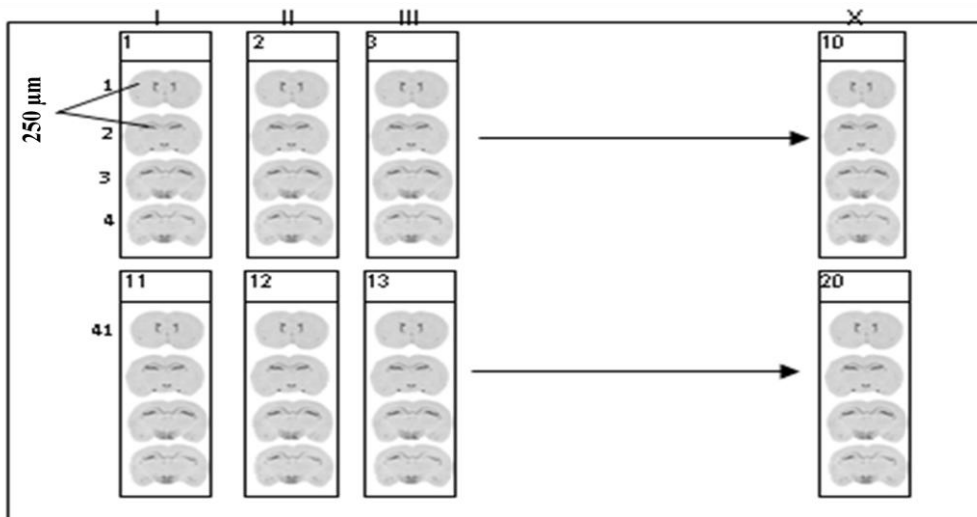
Mega View III Soft Imaging System digitalne kamere (*Olympus Soft Imaging Solutions*, Nemačka).

3.6. Imunohistohemijska analiza

3.6.1. Priprema tkiva za imunohistohemijske studije

Za imunohistohemijska ispitivanja po 5 životinja iz šest eksperimentalnih grupa (PN100) je anestetizirano 3,6% hloral hidratom (*Sigma Aldrich*, Nemačka) (10 ml/kg t.t.; intraperitonealno (i.p.)) i zatim perfundovano sveže pripremljenim 4% paraformaldehidom (*SERVA*, Nemačka) (ohladenim na +4°C). Mozgovi su izvađeni iz lobanja i ostavljeni 24h u 4% paraformaldehidu posle čega su prebačeni u rastući gradijent saharoze (10%, 20% i 30%) u 0,1 M fosfatnom puferu pH=7,4 (krioprezervacija). Mozgovi su trenutno zamrzavani na -80°C uranjanjem u 2-metilbutan (*Fluka Biochemika*, SAD).

Prilikom sečenja tkiva kaudalni pol svakog mozga je pričvršćen za kriostatski nosač korišćenjem kriostatskog medijuma (*Killik*, Italija). Ventralna površina mozga je orjentisana ka sečivu i serijski koronalni preseki debljine 25 µm za imunohistohemijske analize su sečeni na kriostatu *Leica* (*Leica Instruments*, Nemačka). Preseci su sakupljeni na specijalnim *SuperFrost Plus* pločicama (*Menzel Braunschweig*, Nemačka). Kako stereološke analize zahtevaju brojne preseke proučavanih struktura i upotrebu serijskih preseka, sakupljanje preseka je uvek vršeno na isti način. Na kraju sečenja na svakoj pločici je bilo po 4 preseka koji su udaljeni 250 µm (slika 6). Preseci su do trenutka bojenja čuvani u zamrzivaču na -20°C.



Slika 6. Shematski prikaz standardizovanog načina sakupljanja uzoraka na staklenim pločicama za imunohistohemijske analize. Bojenje isečaka iz jednog reda (npr. 1, 11, 21,...) sa određenim antitelom omogućava procenu ćelijske populacije koristeći prostorno razdvojene preseke strukture od interesa.

3.6.2. Opšti protokol za imunohistohemijsko bojenje

Pre bojenja, vršeno je demaskiranje antigena inkubiranjem pločica tokom 30 minuta na $+80^{\circ}\text{C}$ (u staklenoj kiveti u vodenom kupatilu) u 0,01 M citratnom puferu $\text{pH}=6$. Po završetku inkubacije, pločice su ostavljene da se ohlade na sobnoj temperaturi. Zatim je izvršeno nespecifično blokiranje 1h na sobnoj temperaturi koristeći Vectastain Elite Avidin/Biotin Kompleks kit (ABC kit; *Vector Laboratories*, SAD). Po isteku vremena predviđenog za blokiranje, pločice su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom (24h na $+4^{\circ}\text{C}$). Pločice su inkubirane u dobro zatvorenim vlažnim komorama. Korišćena su sledeća primarna antitela: anti-NeuN (1:1000, mišje monoklonsko, *Millipore*, Nemačka), anti-GFAP (1:200, zečje poliklonsko, *DAKO*, Danska), anti-MOG (1:200, mišje monoklonsko, *Abcam*, Velika Britanija) i anti-Iba 1 (1:500, zečje poliklonsko, *Abcam*, Velika Britanija). Nakon 24h, pločice su 3 puta po 15 min ispirane PBS-om pre stavljanja odgovarajućeg sekundarnog antitela (anti-mišje/anti-zečje/anti-kozje). Nakon reakcije sa sekundarnim antitelima sledila je inkubacija sa 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) koji je hromogeni supstrat za peroksidazu, što dovodi do pojave precipitata braon boje na mestu prisustva antigena. Obojeni isecci su analizirani svetlosnom mikroskopijom uz pomoć mikroskopa *Olympus BX41* sa kamerom *C-5060 wide zoom* i softvera *Olympus DP-Soft*.

3.7. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (S.E.M). Statistička obrada podataka vršena je pomoću programa *OriginPro 8.1* odgovarajućim statističkim testovima, pre svega jednofaktorskom analizom varijanse - univarijantna analiza ispitivanja uticaja odabranog prediktora za zavisnu varijablu – ANOVA, praćenom *Bonfferoni post hoc* testom. Podaci za pojedine parametre su podvrgnuti T testu za dva nezavisna uzorka. Ukoliko je verovatnoća da je nulta hipoteza (H_0 : postoji razlika između posmatranih veličina) tačna, bila jednaka ili manja od 5% ($p \leq 0,05$), razlika je smatrana statistički značajnom. Rezultati su prikazivani grafičkim stubičastim i linijskim dijagramima. Grafički prikaz rezultata urađen je u programu *OriginPro 8.1*.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje neposrednih efekata perinatalne primene fenciklidina u korteksu i hipokampusu pacova (PN13)

4.1.1. Neposredni efekat perinatalne primene fenciklidina na aktivnost enzima respiratornog lanca – kompleksa I i IV u korteksu i hipokampusu pacova

Aktivnost enzima respiratornog lanca, kompleksa I i citohrom c oksidaze određivana je spektrofotometrijski neposredno nakon perinatalnog tretmana natrijum hloridom ili fenciklidinom (PN13) u neprečišćenoj mitohondrijskoj frakciji korteksa i hipokampusu pacova. Statistička analiza rezultata ukazuje da neposredno nakon aplikacije fenciklidina dolazi do značajnog povećanja aktivnosti kompleksa I respiratornog lanca u hipokampusu ($t=-2.37$; $df=10$; $p<0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja, dok se u korteksu ne uočavaju značajne promene aktivnosti ovog enzima ($t=0.025$; $df=10$; $p>0,05$). Studentov T test je ukazao da aplikacija fenciklidina dovodi do povećanja aktivnosti citohom c oksidaze u korteksu ($t=-2.64$; $df=10$; $p<0,05$) i hipokampusu ($t=-7.07$; $df=10$; $p<0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Tabela 1).

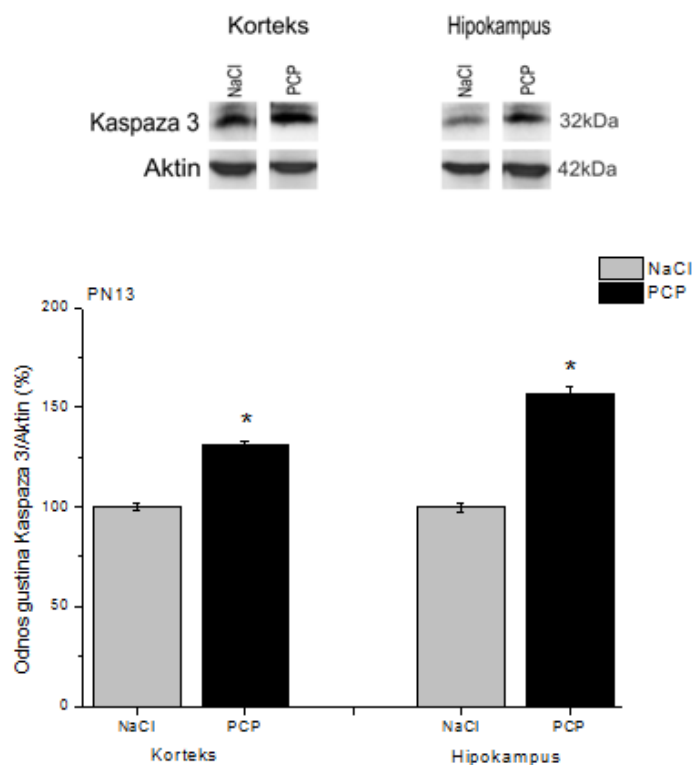
Tabela 1. Neposredni efekat perinatalne primene fenciklidina na aktivnost kompleksa I i citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu mladih pacova (PN13). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisan broj životinja.

	Kompleks I (U/mg proteina)		Citohrom c oksidaza (mmol/mg proteina/60min)	
	NaCl (n=6)	PCP (n=6)	NaCl (n=6)	PCP (n=6)
Korteks	54.78 \pm 3.97	54.51 \pm 9.97	8.53 \pm 1.03	10.71 \pm 0.7*
Hipokampus	48.71 \pm 6.67	74 \pm 8.36*	4 \pm 0.5	10.41 \pm 0.75*

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom

4.1.2. Neposredni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu pacova

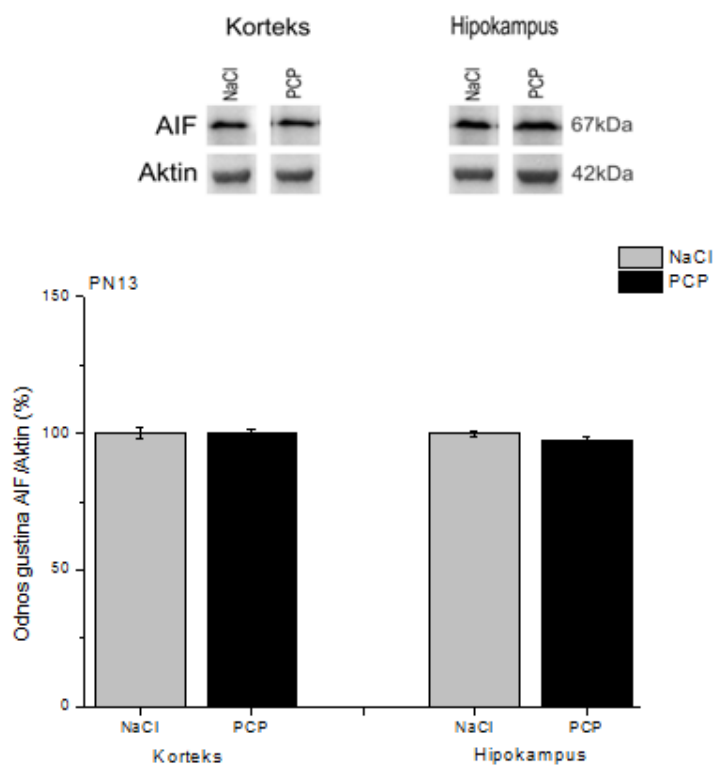
Upotrebom tehnike *Western blot* određivana je ekspresija kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF), markera procesa apoptoze, u korteksu i hipokampusu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom (PN13). Analiza dobijenih rezultata ukazuje na visoko statistički značajno povećanje ekspresije kaspaze 3 u korteksu ($t=-11.97$; $df=8$; $p<0,01$) i hipokampusu ($t=-13.3$; $df=8$; $p<0,01$) pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u odnosu na kontrolnu grupu (grafik 1).



Grafik 1. Ekspresija kaspaze 3 u korteksu i hipokampusu mladih pacova (PN13) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota uočeno je povećanje ekspresije kaspaze 3 u obe ispitivane moždane strukture u grupi perinatalno tretiranoj fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

Analizom rezultata nije utvrđena promena ekspresije faktora indukcije apoptoze (AIF) neposredno nakon perinatalne primene fenciklidina ni u korteksu ($t=0.04$; $df=8$; $p=0.969$) ni u hipokampusu ($t=1.39$; $df=8$; $p=0.203$) pacova u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (grafik 2).

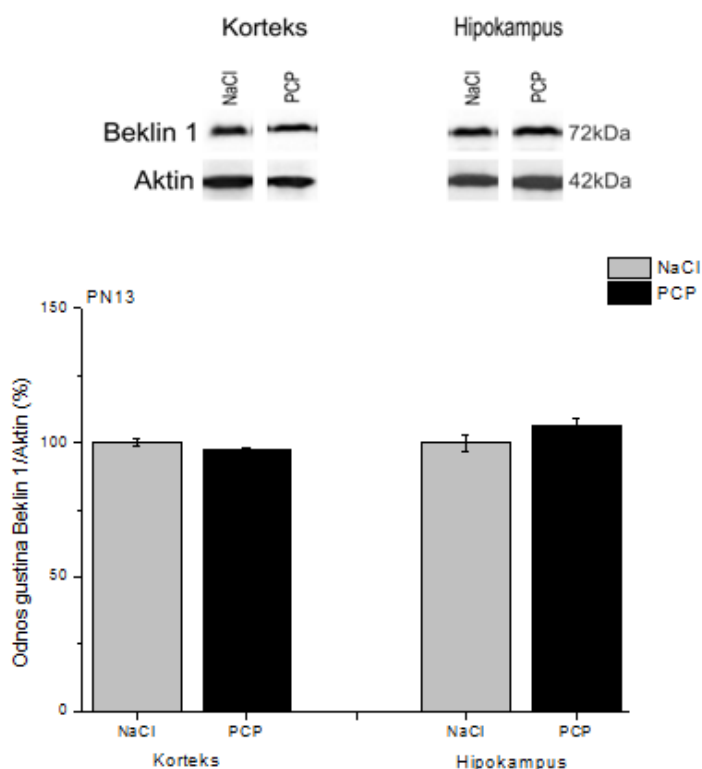


Grafik 2. Ekspresija faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu mladih pacova (PN13) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota ne uočava se promena ekspresije ovog proteina u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.1.3. Neposredni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju Beklin 1 i p62 proteina u korteksu i hipokampusu pacova

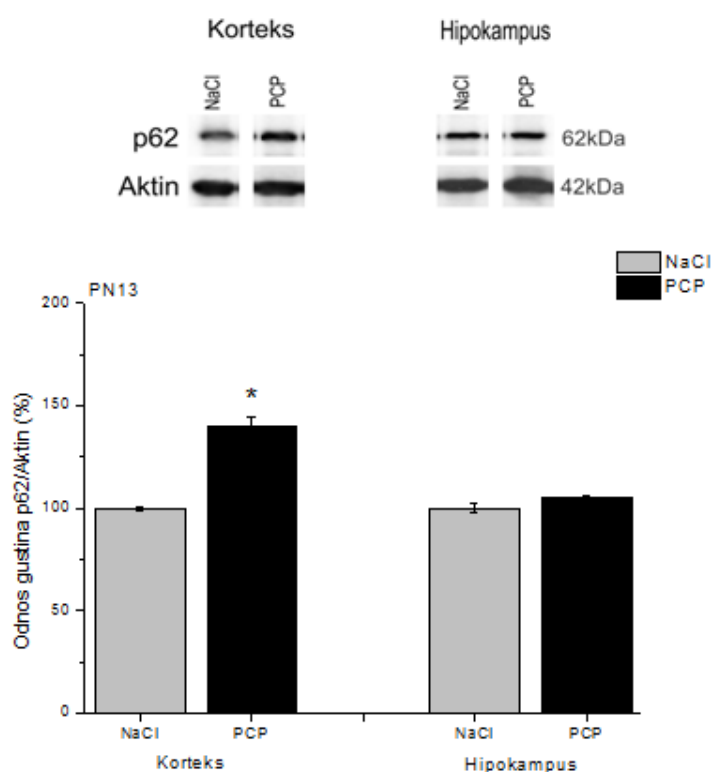
Tehnikom *Western blot*-a određivana je ekspresija Beklin 1 i p62 proteina, markera procesa autofagije, u korteksu i hipokampusu pacova neposredno nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom. Perinatalni tretman fenciklidinom ne dovodi do statistički značajnih promena u ekspresiji Beklin 1 proteina jer statistička analiza upotrebom Studentovog T testa nije utvrdila promene ni u korteksu ($t=-1.54$; $df=8$; $p=0.161$) ni u hipokampusu ($t=-1.57$; $df=8$; $p=0.155$) pacova u poređenju sa kontrolom (grafik 3).



Grafik 3. Ekspresija Beklin 1 proteina u korteksu i hipokampusu mladih pacova (PN13) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota ne uočava se promena ekspresije Beklin 1 proteina u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

Međutim, statistička analiza rezultata ukazuje da perinatalna administracija fenciklidina značajno povećava ekspresiju p62 proteina u korteksu ($t=-8.83$; $df=8$; $p<0,01$), dok se u hipokampusu ne uočavaju promene ($t=-1.7$; $df=8$; $p=0.133$) u ekspresiji ovog proteina u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (grafik 4).

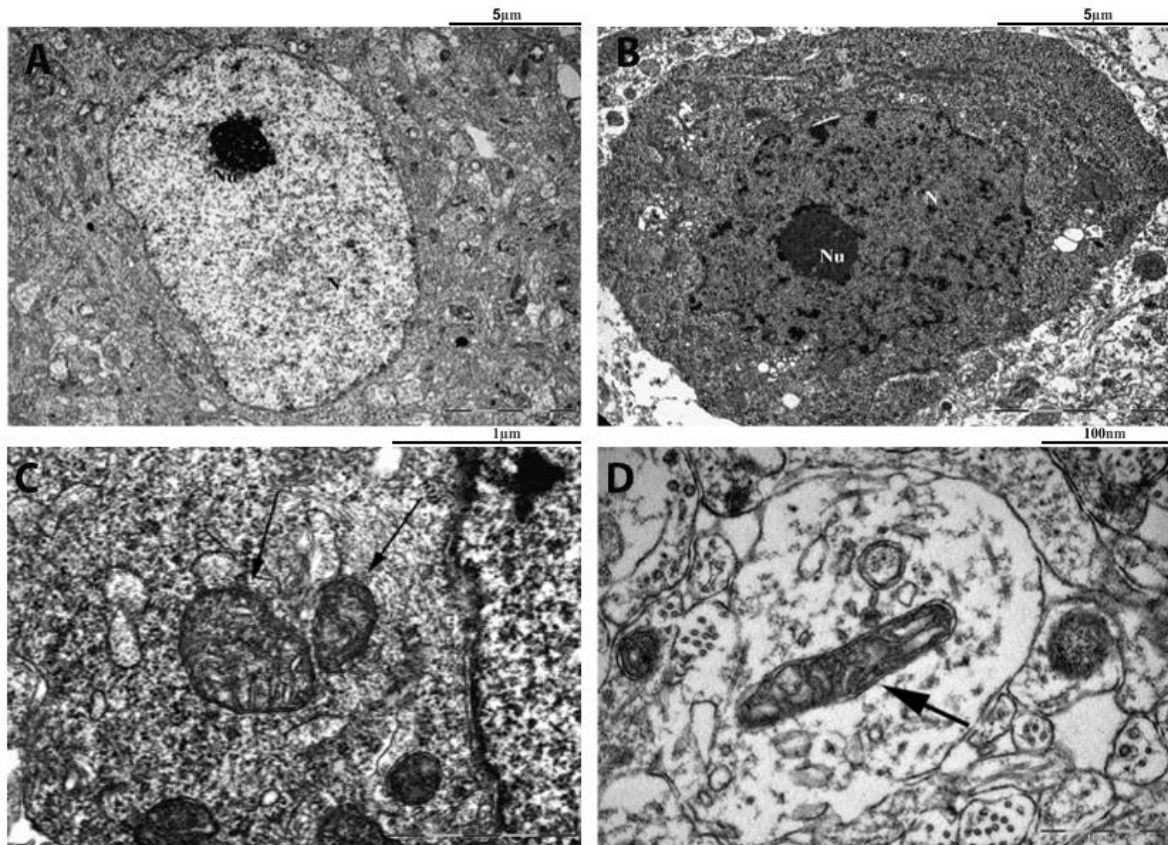


Grafik 4. Ekspresija p62 proteina u korteksu i hipokampusu mladih pacova (PN13) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota uočeno je povećanje ekspresije p62 proteina u korteksu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom, dok u hipokampusu fenciklidin ne ostvaruje efekat na ekspresiju ovog proteina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.1.4. Ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu pacova neposredno nakon perinatalne primene fenciklidina

Ispitivanje ultrastrukturnih promena u mozgu pacova vršeno je upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa. Promene su praćene neposredno nakon perinatalne primene fenciklidina u korteksu i hipokampusu pacova. Analize dobijenih rezultata su pokazale da su u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom neuroni kompaktni, a nukleus i nukleolus visoke elektronske gustine, dok se u citoplazmi teško uočavaju organele. Takođe, u hipokampalnim regionima mozga ovih životinja uočavaju se mitohondrije u ranom stadijumu degeneracije. Opservirane mitohondrije su nabubrele sa dezorganizovanim kristama uz primetno intrakristalno bubrenje, iako naizgled imaju nepromenjenu spoljašnju i unutrašnju membranu. U mozgovima kontrolnih jedinki uočavaju se neuroni sa euhromatinskim jedrom, sa mitohondrijama normalne strukture i bez znakova oštećenja ili bubrenja (slika 1 A-D).



Slika 1. Ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu mladih pacova (PN13) neposredno nakon perinatalne primene fenciklidina. (A) U kortikalnim regionima kontrolnih životinja, ćelije ispoljavaju normalne morfološke karakteristike, a uočavaju se euhromatinski nukleus i nukleolus. N-nukleus; N-nukleolus (Bar = 5 μ m). (B) U kortikalnim regionima životinja perinatalno tretiranih fenciklidinom uočavaju se tamni, kompaktni neuroni, nukleus i nukleolus visoke elektronske gustine. N-nukleus (Bar = 5 μ m). (C) U hipokampusu kontrolnih životinja uočavaju se mitohondrije (strelica) sa normalnom dvostrukom membranom i organizovanim kristama (Bar = 1 μ m). (D) U hipokampusu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom uočavaju se mitohondrije koje su u ranoj fazi degeneracije. Spoljašnja i unutrašnja membrana mitohondrije (strelica) izgledaju normalno, dok su kriste strukturno dezorganizovane uz intrakristalno bubrenje (Bar = 100nm).

4.2. Ispitivanje dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina u korteksu i hipokampusu pacova (PN70)

4.2.1. Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na aktivnost enzima respiratornog lanca – kompleksa I i citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu pacova

Dugotrajni efekti perinatalne primene fenciklidina (PN70) na respiratorni lanac utvrđivani su ispitivanjem aktivnosti prvog i terminalnog enzima respiratornog lanca, kompleksa I i citohrom c oksidaze, u neprečišćenoj mitohondrijalnoj frakciji homogenata korteksa i hipokampusu pacova. Statističkom analizom rezultata nije uočena značajna promena aktivnosti kompleksa I respiratornog lanca nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom ni u korteksu ($t=-0.02$; $df=10$; $p=0.984$) ni u hipokampusu ($t=2.18$; $df=10$; $p=0.0543$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Ipak, uočeno je smanjenje aktivnosti citohrom c oksidaze u korteksu ($t=5.6$; $df=10$; $p<0.01$), kao i povećanje aktivnosti u hipokampusu ($t=-7.99$; $df=10$; $p<0.01$) u grupi perinatalno tretiranoj fenciklidinom u poređenju sa kontrolom grupom životinja (Tabela 2).

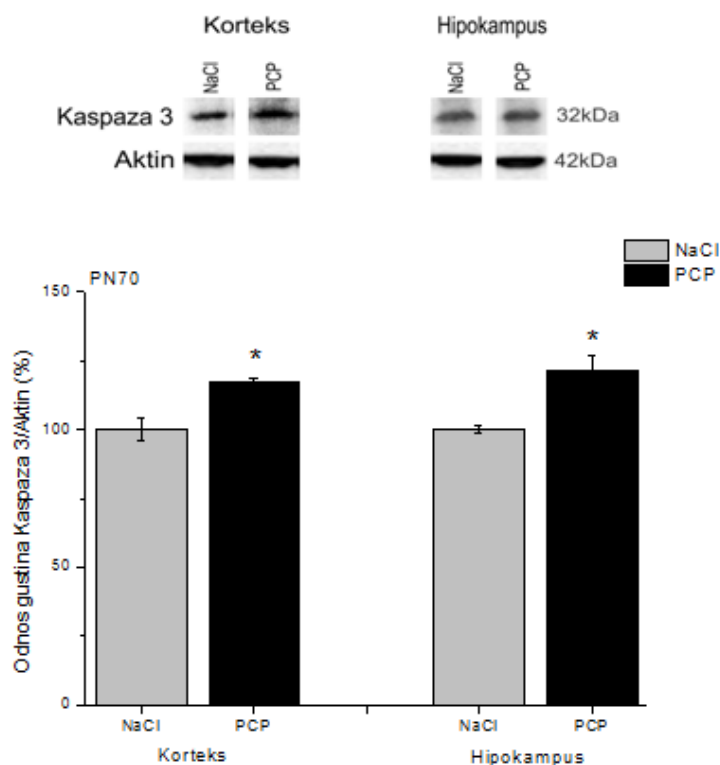
Tabela 2. Dugotrajni efekti perinatalne primene fenciklidina na aktivnost kompleksa I i kompleksa IV u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN70). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

	Kompleks I (U/mg proteina)		Citohrom c oksidaza (mmol/mg proteina/60min)	
	NaCl (n=6)	PCP (n=6)	NaCl (n=6)	PCP (n=6)
Korteks	35.43 \pm 3.35	35.54 \pm 4.31	9.4 \pm 0.89	3.87 \pm 0.4*
Hipokampus	37.66 \pm 3.56	29.45 \pm 1.24	8.22 \pm 0.32	13.54 \pm 0.59*

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.2.2. Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu pacova

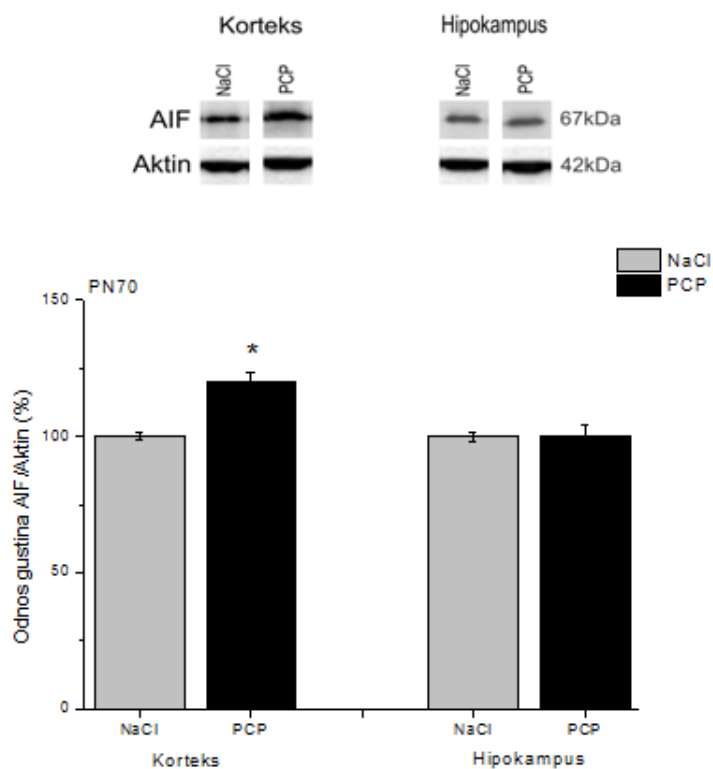
Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na proteinsku ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze, markera procesa apoptoze, procenjivan je tehnikom *Western blot*. Dobijeni rezultati ukazuju na statistički značajno povećanje ekspresije kaspaze 3 u korteksu ($t=-4.09$; $df=8$; $p<0.01$) i hipokampusu ($t=-4.14$; $df=8$; $p<0.01$) pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u odnosu na kontrolnu grupu životinja (grafik 5).



Grafik 5. Ekspresija kaspaze 3 u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN70) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota uočeno je povećanje ekspresije ovog proteina u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

Takođe, analiza rezultata ukazuje na povećanje ekspresije AIF proteina u korteksu životinja perinatalno tretiranih fenciklidinom ($t=-5.96$; $df=8$; $p<0.01$), dok je u hipokampusu ekspresija ovog proteina nepromenjena ($t=-0.08$; $df=8$; $p=0.936$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (grafik 6).

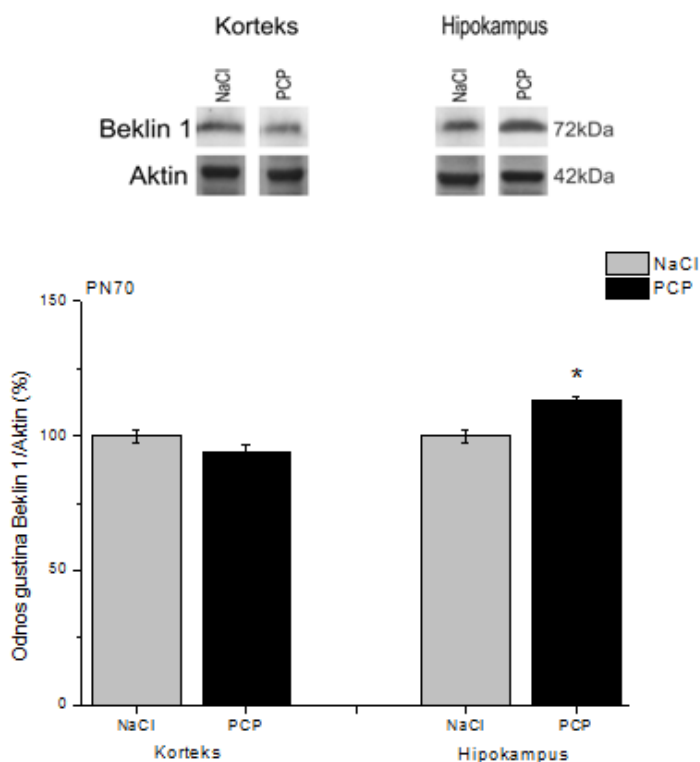


Grafik 6. Ekspresija faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN70) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota uočeno je povećanje ekspresije ovog proteina u korteksu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.2.3. Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju Beklin 1 i p62 proteina u korteksu i hipokampusu pacova

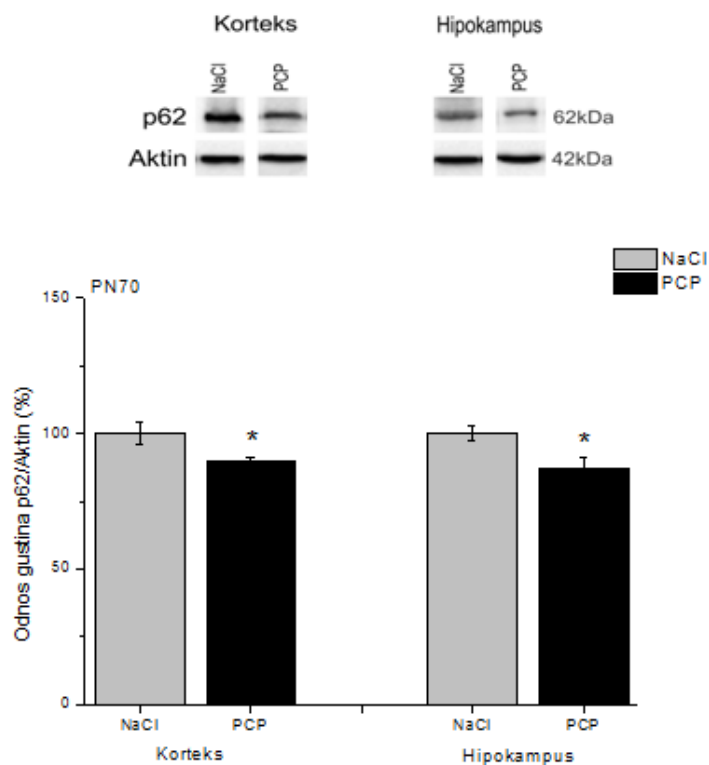
Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na proteinsku ekspresiju markera autofagije – Beklin 1 i proteina p62, procenjivan je tehnikom *Western blot*. Analiza dobijenih rezultata ukazuje na odsustvo dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju Beklin 1 proteina u korteksu ($t=1.61$; $df=8$; $p=0.146$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Sa druge strane, uočeno je statistički značajno povećanje ekspresije ovog proteina u hipokampusu ($t=-4.47$; $df=8$; $p<0.01$) pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (grafik 7).



Grafik 7. Ekspresija Beklin 1 u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN70) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota uočeno je povećanje ekspresije ovog proteina u hipokampusu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

Statistička analiza dobijenih rezultata ukazuje na značajno smanjenje ekspresije p62 proteina u korteksu ($t=2.47$; $df=8$; $p<0.05$) i hipokampusu ($t=2.77$; $df=8$; $p<0.05$) životinja perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (grafik 8).

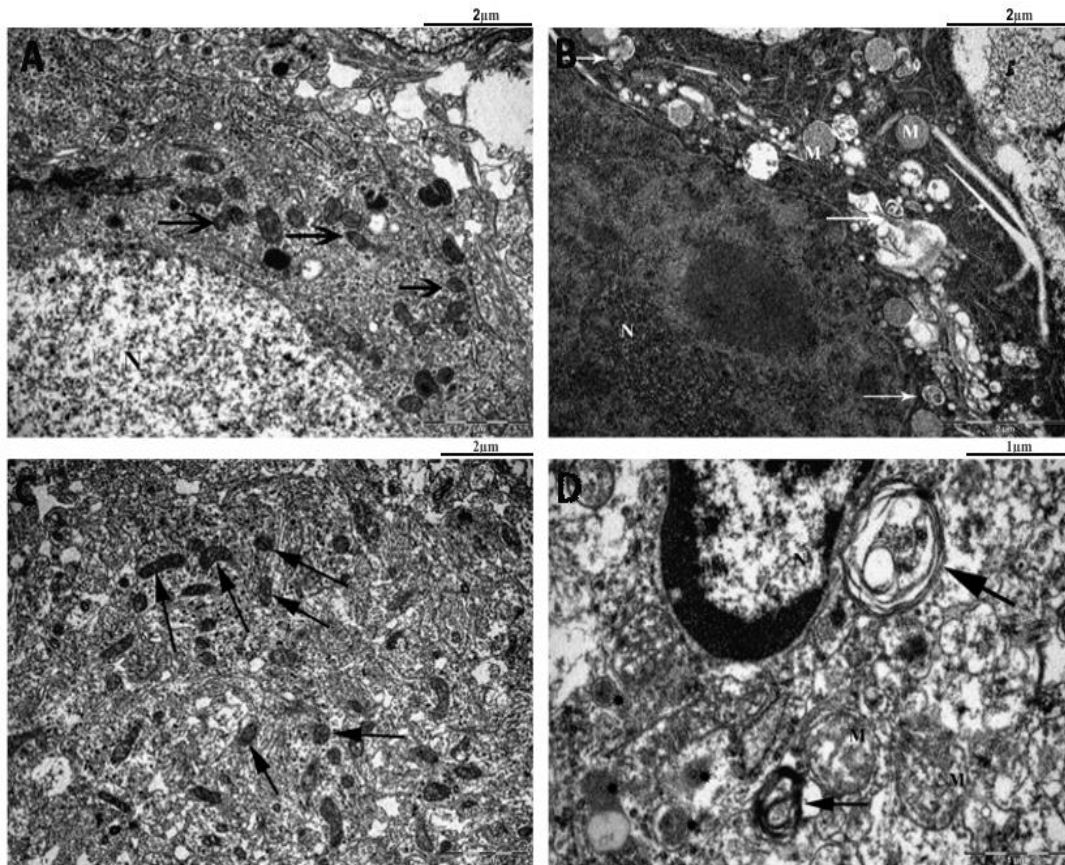


Grafik 8. Ekspresija proteina p62 u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN70) perinatalno tretiranih natrijum hloridom ($n=5$) ili fenciklidinom ($n=5$). Analizom imunoblota uočeno je smanjenje ekspresije ovog proteina u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.2.4. Ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu odraslih pacova kao posledica dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina

Upotrebom transmisiona elektronske mikroskopije ispitivane su ultrastrukturne promene u mozgu odraslih pacova, nastale kao posledica dugotrajnog efekta perinatalne primene fenciklidina. Mikroskopska analiza kortikalnih i hipokampalnih regiona ukazuje da je u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom izražena autofagna aktivnost. U kortikalnim neuronima pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom uočavaju se brojne autofagne vakuole rasute po citoplazmi, kao i delovi mitohondrija u stanju raspadanja. U hipokampalnim neuronima ovih životinja uočavaju se mitohondrije u kasnoj fazi degeneracije. Na mikrografijama, uočene mitohondrije su tamne, kondenzovane i skupljene, bez jasnih granica između spoljašnje i unutrašnje membrane. Pored defektnih mitohondrija, mikroskopskom analizom u ovom moždanom regionu uočavaju se i znaci aktiviranog procesa autofagije, koji se ogledaju u prisustvu velikog broja autofagozoma, lizozoma i vezikula rasutih po citoplazmi. Čelije mozga kontrolnih životinja, za razliku od životinja tretiranih fenciklidinom, ispoljavaju normalne morfološke karakteristike (slika 2).



Slika 2. Dugotrajni efekat perinatalne primene fenciklidina na ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN70). (A) U mozgu kontrolnih životinja, ćelije ispoljavaju normalne morfološke karakteristike, a uočavaju se euhromatinski nukleus, mala količina granulisanog endoplazmatičnog retikuluma i mitohondrije (strelice). N-nukleus (Bar = 2 μ m). (B) U kortikalnim regionima životinja perinatalno tretiranih fenciklidinom uočava se autofagna aktivnost u tamnim neuronima. Brojne autofagne vakuole (strelice) su rasute po citoplazmi, a uočavaju se i delovi uništenih mitohondrija (M) (Bar = 2 μ m). (C) U hipokampalnim regionima pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom uočavaju se mitohondrije u kasnoj fazi degeneracije – tamne, skupljene i kondenzovane bez jasne granice između spoljašnje u unutrašnje membrane (strelice). (Bar = 2 μ m). (D) U ovom moždanom regionu uočavaju se i brojni lizozomi (zvezdica) i velike autofagne vezikule rasute po citoplazmi ćelija, kao i brojni autofagozomi (strelice). M-mitohondrija; N-nukleus (Bar = 1 μ m).

4.3. Ispitivanje dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN100)

4.3.1. Efekti perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika na aktivnost enzima respiratornog lanca – kompleksa I i citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN100)

Aktivnosti enzima respiratornog lanca, kompleksa I i citohrom c oksidaze, utvrđivana je spektrofotometrijskom metodom u neprečišćenoj mitohondrijskoj frakciji korteksa i hipokampusa šest grupa pacova starih 100 dana. Rezultati ove analize prikazani su u tabelama 3 i 4. Statistička analiza rezultata ne ukazuje na promenu aktivnosti kompleksa I ni u korteksu [$F_{5,30}=0.64$; $p=0.667$] ni u hipokampusu [$F_{5,30}=0.43$; $p=0.823$] pacova starih 100 dana. Ovo ukazuje da izostaju dugotrajni efekti fenciklidina na aktivnost ovog enzima, kao i efekti tretmana antipsihoticima prve i druge generacije, nezavisno od vrste perinatalnog tretmana kojoj su životinje bile podvrgnute (Tabela 3).

Tabela 3. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika haloperidola i klopazina na aktivnost kompleksa I u korteksu i hipokampusu pacova starih 100 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

Kompleks I (U/mg proteina)						
	NaCl (n=6)	PCP (n=6)	NaCl-H (n=6)	PCP-H (n=6)	NaCl-K (n=6)	PCP-K (n=6)
Korteks	24.84 \pm 5.19	22.25 \pm 4.07	25.97 \pm 1.77	29.17 \pm 2.52	28.00 \pm 1.91	23.78 \pm 2.46
Hipokampus	23.46 \pm 4.24	22.76 \pm 4.02	23.57 \pm 3.81	27.34 \pm 1.23	24.7 \pm 2.28	29.36 \pm 6.22

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

Ipak, analiza dobijenih rezultata ukazuje na statistički značajnu promenu aktivnosti citohrom c oksidaze u korteksu [$F_{5,30}=4.62$; $p<0.01$] i hipokampusu [$F_{5,30}=4.46$; $p<0.01$]. *Bonferroni pos hoc* testom utvrđeno je značajno smanjenje ($p<0.05$) u PCP-H grupi i grupama tretiranim klozapinom (NaCl-K i PCP-K) u korteksu, dok je u hipokampusu statistički značajno smanjenje ($p<0.05$) aktivnosti ovog enzima utvrđeno samo u PCP-K grupi u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Tabela 4).

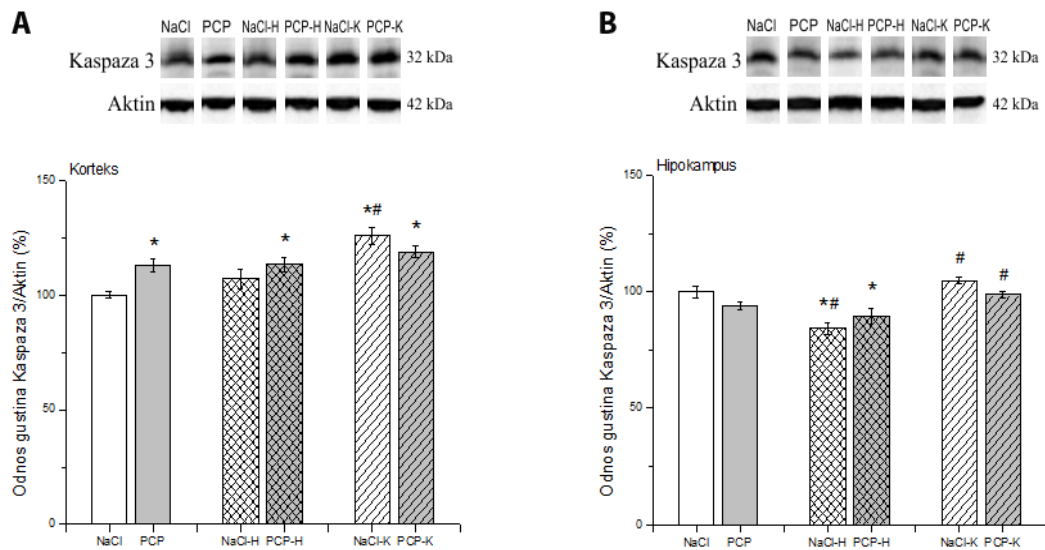
Tabela 4. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika haloperidola i klozapina na aktivnost citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu pacova starih 100 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M.

Citohrom c oksidaza (mmol/mg proteina/60 min)						
	NaCl (n=6)	PCP (n=6)	NaCl-H (n=6)	PCP-H (n=6)	NaCl-K (n=6)	PCP-K (n=6)
Korteks	14.24 \pm 1.57	10.19 \pm 1.61	10.43 \pm 1.48	8.69 \pm 0.48*	8.43 \pm 0.76*	6.48 \pm 0.94*
Hipokampus	11.34 \pm 1.54	8.22 \pm 0.82	12.62 \pm 1.48	11.04 \pm 1.41	7.91 \pm 0.94	5.68 \pm 1.04*

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.3.2. Efekti perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika na ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN100)

Tehnikom *Western blot* procenjivani su efekti hronične primene antipsihotika haloperidola i klozapina na proteinsku ekspresiju kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze (AIF) u mozgu 100 dana starih pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom ili natrijum hloridom. Analizom dobijenih rezultata uočavaju se statistički značajne promene ekspresije kaspaze 3 u korteksu [$F_{5,24}=8.59$; $p<0.01$] i hipokampusu [$F_{5,24}=11.91$; $p<0.01$]. *Post hoc* analizom je utvrđeno povećanje ekspresije kaspaze 3 ($p<0.01$) u korteksu PCP, PCP-H, NaCl-K i PCP-K grupa životinja u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je u NaCl-K grupi ekspresija povećana i u odnosu na PCP grupu. U hipokampusu ekspresija je smanjena u grupama tretiranim haloperidolom ($p<0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja, bez obzira da li su životinje perinatalno tretirane fenciklidinom ili natrijum hloridom, dok je u NaCl-H grupi ekspresija značajno smanjena ($p<0.05$) i u odnosu na PCP grupu. U grupama tretiranim klozapinom uočava statistički značajno povećanje ($p<0.05$) ekspresije kaspaze 3 u odnosu na PCP grupu, nezavisno od perinatalnog tretmana (grafik 9 A i B).

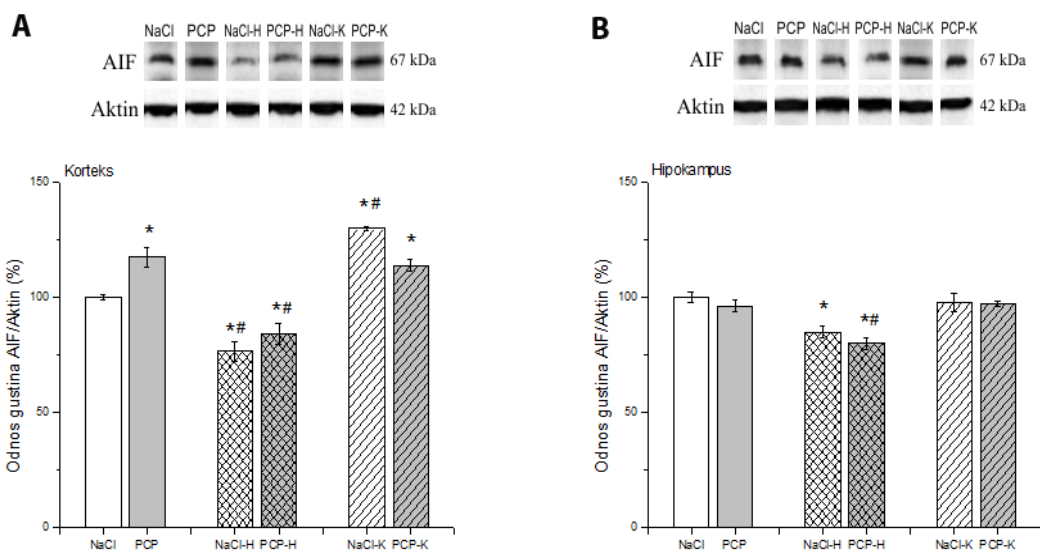


Grafik 9. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na ekspresiju kaspaze 3 u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

$p < 0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

Statistički značajne razlike u ekspresiji AIF proteina između eksperimentalnih grupa detektovane su u korteksu [$F_{5,24}=57.47$; $p < 0.01$] i hipokampusu [$F_{5,24}=10.24$; $p < 0.01$] odraslih pacova (PN100). *Bonferroni post hoc* test ukazuje na značajno povećanje ($p < 0.01$) ekspresije u korteksu u PCP grupi i grupama tretiranim klozapinom (NaCl-K i PCP-K). U grupi NaCl-K ekspresija ovog proteina je značajno povećana i u poređenju sa PCP grupom. U grupama tretiranim haloperidolom (NaCl-H i PCP-H) *post hoc* analiza detektuje smanjenje ekspresije ($p < 0.01$) u poređenju i sa kontrolnom grupom i sa PCP grupom životinja. U hipokampusu *post hoc* analizom značajno smanjenje ekspresije ($p < 0.01$) detektovano je u grupama tretiranim haloperidolom u poređenju sa kontrolnom grupom životinja, dok je ekspresija u PCP-H grupi značajno smanjena i u poređenju sa PCP grupom (grafik 10 A i B).



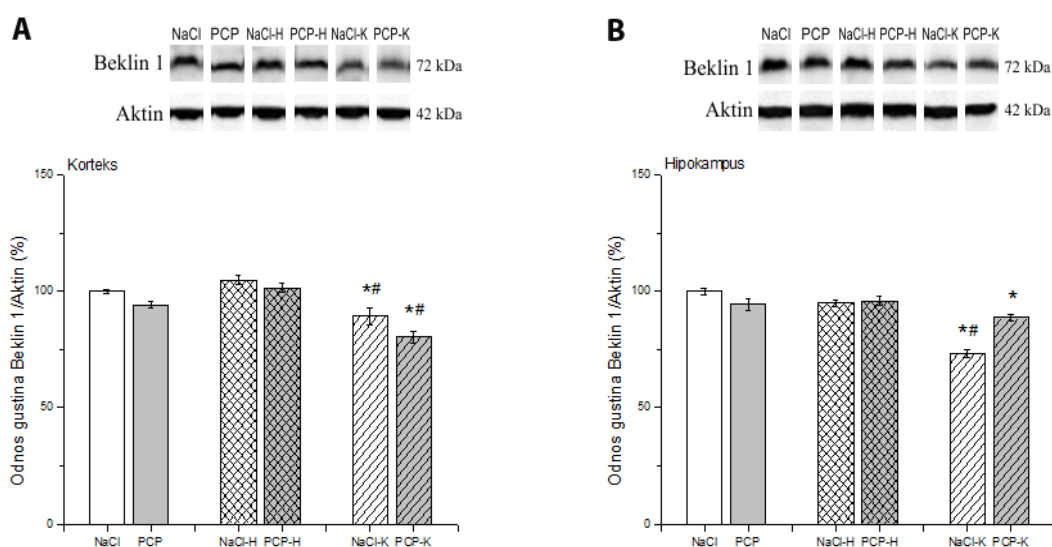
Grafik 10. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na ekspresiju faktora indukcije apoptoze (AIF) u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

$p < 0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.3.3. Efekti perinatalne primene fenciklidina i hronične primene antipsihotika na ekspresiju Beklin 1 i protein p62 u korteksu i hipokampusu odraslih pacova (PN100)

Efekti hronične primene antipsihotika haloperidola (antipsihotik prve generacije) i klopazina (antipsihotik druge generacije) na ekspresiju proteina Beklin 1 i p62 u mozgu pacova starih 100 dana procenjivani su tehnikom *Western blot*. Statistički značajne rezlike u ekspresiji Beklin 1 proteina uočavaju se u korteksu [$F_{5,24}=17.77$; $p<0.01$] i hipokampusu [$F_{5,24}=28.40$; $p<0.01$]. *Post hoc* analiza dobijenih rezultata ukazuje na značajno smanjenje ekspresije ovog proteina ($p<0.01$) u korteksu u grupama tretiranim klopazinom u poređenju sa kontrolnom i PCP grupom. U hipokampusu ekspresija je statistički značajno smanjena u grupama tretiranim klopazinom (NaCl-K i PCP-K) u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u NaCl-K grupi ekspresija značajno smanjena i u odnosu na PCP grupu životinja (grafik 11 A i B).

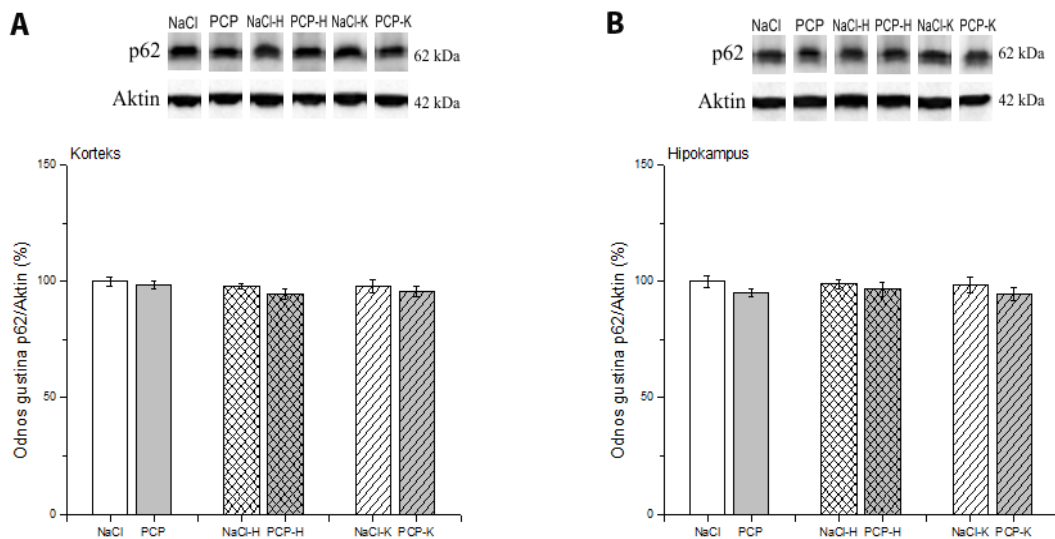


Grafik 11. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klopazinom (K) na ekspresiju Beklin 1 proteina u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

$p<0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

Analizom dobijenih rezultata ne uočavaju se statistički značajne promene ni u korteksu [$F_{5,24}=0.68$; $p=0.64$] ni u hipokampusu [$F_{5,24}=0.72$; $p=0.62$] pacova svih eksperimentalnih grupa u poređenju sa kontrolnom i PCP grupom (grafik 12 A i B).



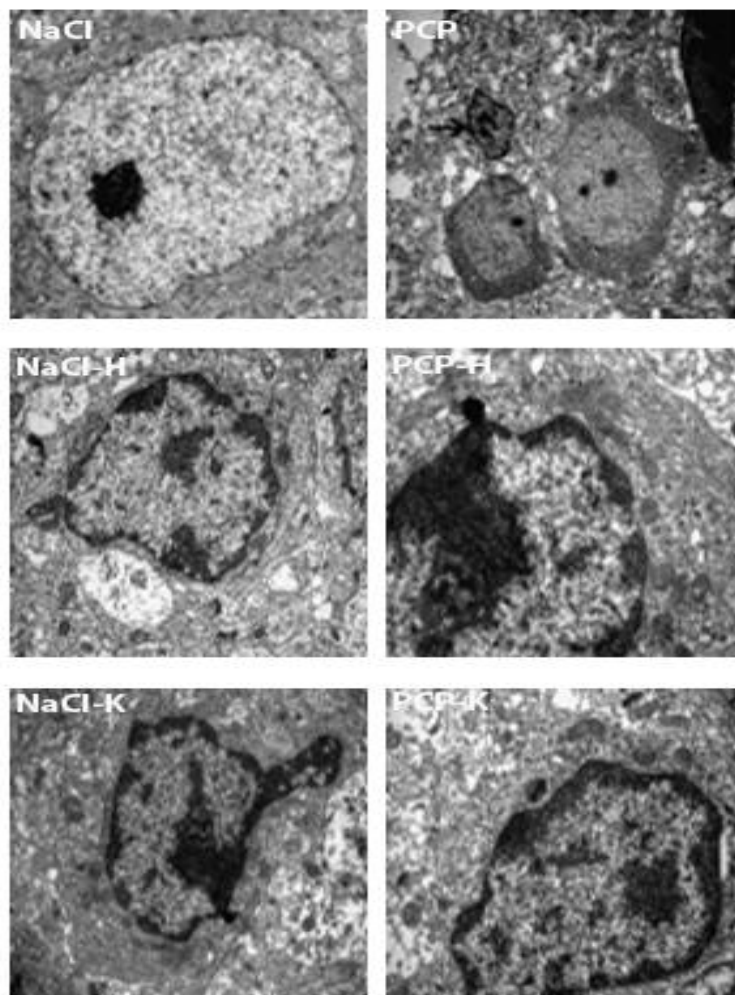
Grafik 12. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na ekspresiju proteina p62 u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

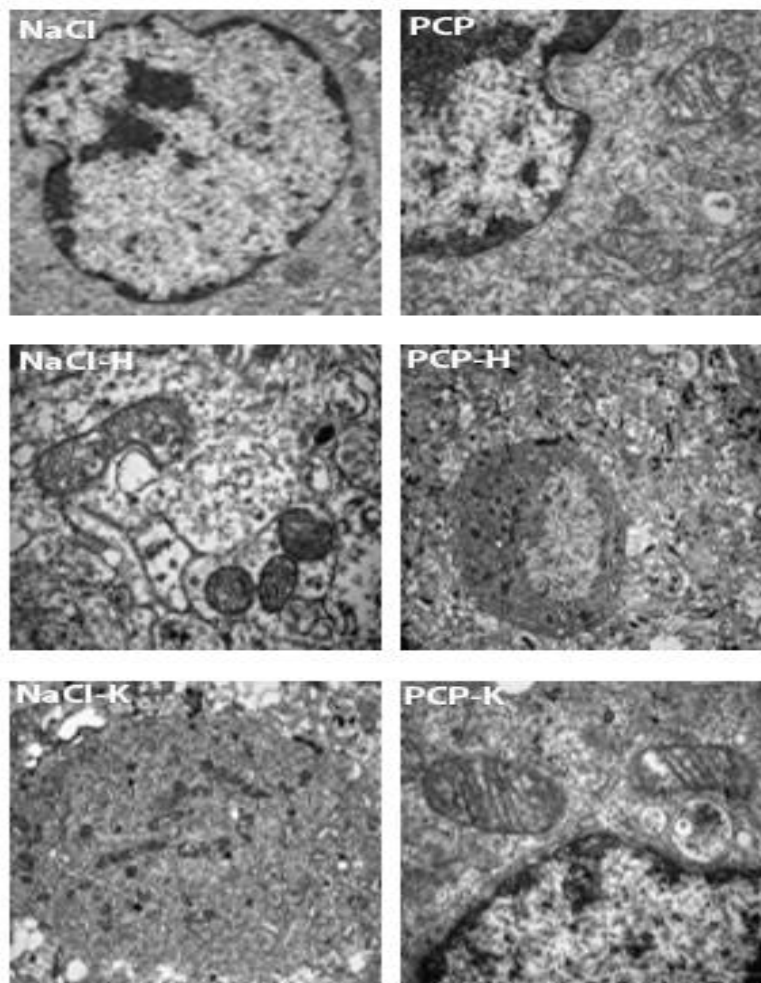
$p < 0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.3.4. Ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu odraslih pacova nakon hronične primene antipsihotika (PN100)

Transmisionom elektronskom mikroskopijom detektovane su ultrastrukturne promene u kortikalnim (Slika 3) i hipokampalnim (Slika 4) regionima mozga odraslih pacova starih 100 dana, nakon tretmana antipsihoticima haloperidolom i klozapinom tokom devet nedelja. Čelije korteksa i hipokampusa kontrolne grupe ispoljavaju normalne morfološke karakteristike, okruglastog su oblika sa euhromatičnim nukleusom, vidljivim nukleolusom i disperznim heterohromatinom. U ovim ćelijama zapažaju se i sekretorne organele, očuvane membrane mitohondrija. S druge strane, mikroskopska analiza je pokazala da perinatalna primena fenciklidina uzrokuje dugoročne promene u mozgu pacova. U isečcima korteksa ovih životinja uočavaju se neuroni smanjenog volumena sa kondenzovanom citoplazmom i heterohromatičnim nukleusom, koje predstavljaju tipične morfološke karakteristike ranog stadijuma apoptoze. U hipokampusu istih životinja zapažaju se dilatirane mitohondrije sa izduženim kristama, kao i prisustvo autofagozoma. Promene se uočavaju i u grupama tretiranim haloperidolom. U grupi koja je primala samo haloperidol od 35. do 100. PN dana (NaCl-H grupa) detektovane su morfološki izmenjene mitohondrije i u korteksu i u hipokampusu ovih životinja. Kod životinja koje su perinatalno tretirane fenciklidinom a potom tretirane haloperidolom (PCP-H grupa) takođe se uočavaju morfološke promene mitohondrija. Mitohondrije su tamne i kondenzovane, smanjenog volumena sa nejasnim granicama između spoljašnjih i unutrašnjih membrana ili su blago dilatirane sa očuvanim membranama. Dilatirane membrane se uočavaju u korteksu pacova koji su tretirani klozapinom (NaCl-K grupa), dok se u hipokampusu istih životinja uz dilataciju mitohondrija uočavaju ćelije sa povećanjem heterohromatina u nukleusu, dezintegracija membrana i vakuole. U grupi koja je perinatalno tretirana fenciklidinom pa tretirana klozapinom od 35. do 100. PN dana (PCP-K grupa) transmisionom elektronskom mikroskopijom u korteksu se uočavaju mitohondrije u početnoj fazi dezintegracije kod kojih je struktura unutrašnje mitohondrijalne membrane narušena, dok se u hipokampusu uočavaju neuroni sa izraženo dilatiranim mitohondrijama.



Slika 3. Dugotrajni efekti perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidola i klozapina na ultrastrukturne promene u korteksu pacova (PN100). U korteksu kontrolne grupe (NaCl) ćelije ispoljavaju normalne morfološke karakteristike (Bar = 5 μ m). S druge strane, u korteksu PCP grupe uočavaju se neuroni u apoptozi (strelica), pored neurona normalne morfologije (zvezdice) (Bar = 10 μ m). Kod životinja NaCl-H grupe u korteksu uočavaju se izmenjene mitohondrije i početni znaci apoptoze (Bar = 2 μ m). U korteksu životinja PCP-H grupe ćelije imaju heterohromatinski nukleus i izmenjene mitohondrije (Bar = 1 μ m). Apoptotske promene i izmenjene mitohondrije detektovane su u korteksu NaCl-K grupe (Bar = 2 μ m). Slične apoptotske promene i početna dezintegracija mitohondrija uočava se i u korteksu PCP-K grupe (Bar = 2 μ m).



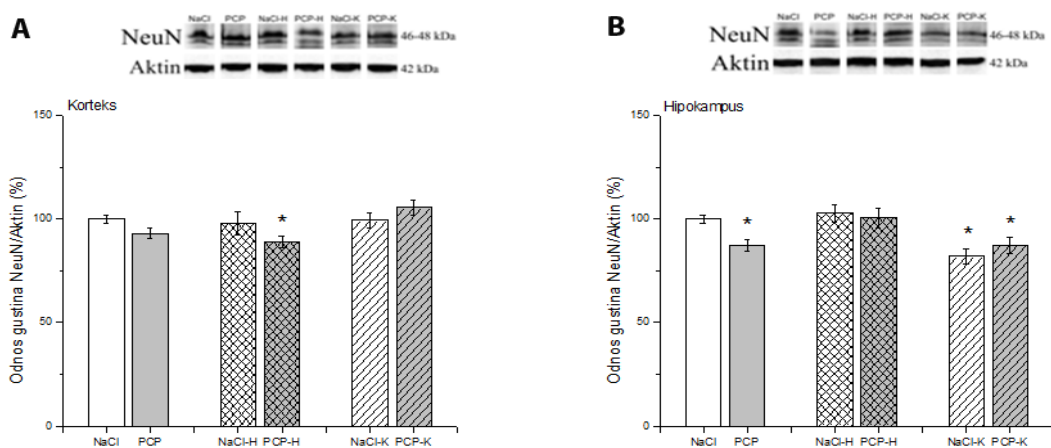
Slika 4. Dugotrajni efekti perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidola i klozapina na ultrastrukturne promene u hipokampusu pacova (PN100). U hipokampusu kontrolnih životinja (NaCl grupa) ćelije ispoljavaju normalne morfološke karakteristike (Bar = 500nm), dok se u hipokampusu PCP grupe uočavaju dilatirane mitohondrije i autofagozomi (Bar = 200nm). Dilatirane mitohondrije se uočavaju i u hipokampusu NaCl-H grupe (Bar = 1 μ m), dok su u hipokampusu PCP-H grupe prisutne brojne kondenzovane mitohondrije (Bar = 2 μ m). U hipokampusu NaCl-K grupe uočavaju se dilatirane mitohondrije i autofagne vakuole (Bar = 1 μ m), a slične promene uočavaju se u ćelijama hipokampusu PCP-K grupe (Bar = 1 μ m).

4.3.5. Zastupljenost neurona i glija ćelija u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom (PN100)

Pratili smo dugoročne efekte perinatalne primene fenciklidina kao i efekte tretmana antipsihoticima haloperidolom i klozapinom na ekspresiju markera ćelija CNS-a stotog postnatalnog dana. Praćena je ekspresija neuron-specifičnog jedarnog proteina (NeuN), glijalnog kiselog fibrilarnog proteina (GFAP), mijelin oligodendrocitnog glikoproteina (MOG) i jonizovanog kalcijum-vezujućeg adapterskog proteina (Iba 1) u korteksu i hipokampusu pacova imunohistohemijским bojenjem i tehnikom *Western blot*.

4.3.5.1. Zastupljenost neurona u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom

Dugoročni efekti perinatalne aplikacije fenciklidina i efekti hroničnog tretmana antipsihoticima na proteinsku ekspresiju markera nervnih ćelija CNS-a određivani su tehnikom *Western blot*. Analiza dobijenih rezultata ukazuje na smanjenje ekspresije NeuN, markera neurona, u hipokampusu pacova starih 100 dana koji su perinatalno tretirani fenciklidinom. Nakon hronične primena haloperidola tokom devet nedelja uočeno je statistički značajno smanjenje ekspresije ovog proteina u korteksu [$F_{5,24}=2.73$; $p<0.05$] i to u grupi koja je perinatalno tretirana fenciklidinom (PCP-H), dok efekti tretmana klozapinom izostaju u ovoj strukturi. Smanjenje ekspresije NeuN je uočeno i u hipokampusu [$F_{5,24}=5.93$; $p<0.01$]. U ovoj moždanoj strukturi značajno smanjenje ($p<0.01$) ekspresije NeuN proteina u odnosu na kontrolnu grupu uočava se u PCP grupi i grupama tretiranim klozapinom nezavisno od perinatalnog tretmana (grafik 13 A i B).

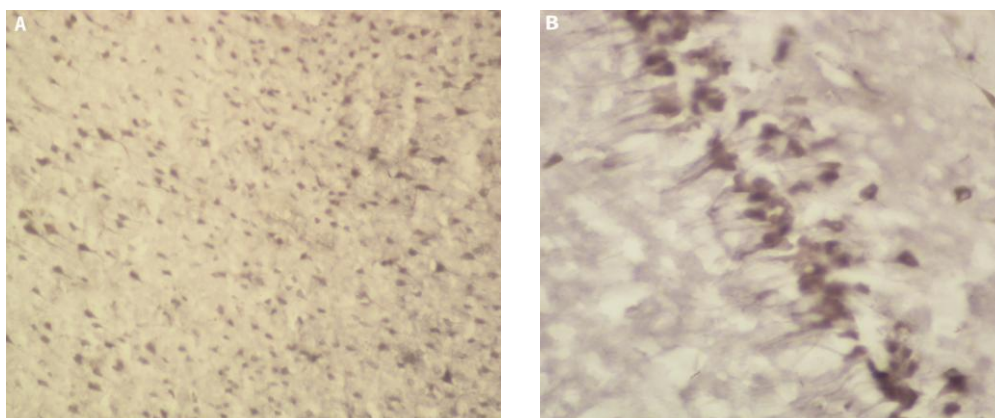


Grafik 13. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na ekspresiju NeuN u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

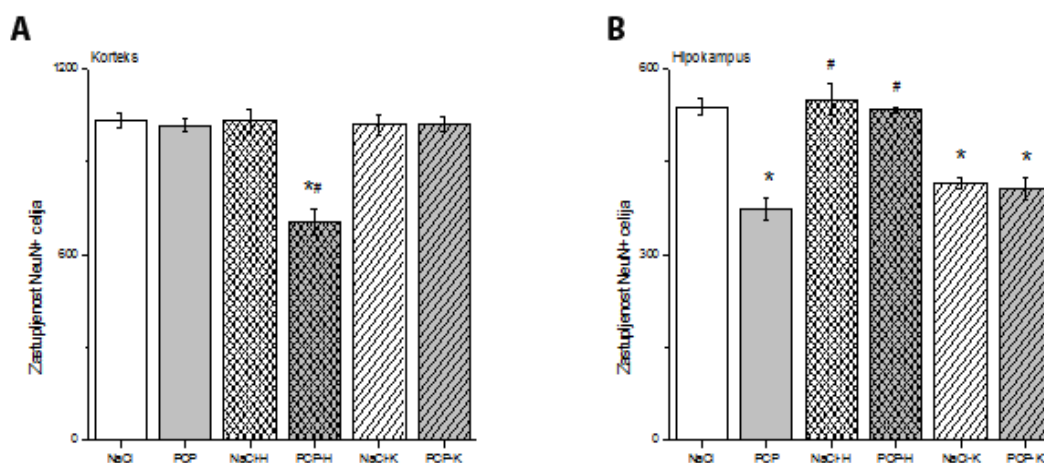
* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

$p < 0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

Imunohistohemijским bojenjem smo pratili zastupljenost neurona u mozgu ovih životinja, određivanjem zastupljenosti NeuN⁺ ćelija. Na slici 5. predstavljeno je reprezentativno imunohistohemijско bojenje NeuN⁺ ćelija u korteksu i hipokampusu kontrolne grupe. Statistička analiza rezultata zastupljenosti NeuN⁺ ćelija u korteksu i hipokampusu na šest vidnih polja na uveličanju 200x prikazana je grafički (grafik 14). Analizom rezultata detektovana je redukcija broja NeuN⁺ ćelija u korteksu PCP-H grupe i u hipokampusu u PCP grupi i grupama tretiranim klozapinom (NaCl-K i PCP-K) u poređenju sa kontrolom. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima proteinske ekspresije.



Slika 5. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja NeuN+ ćelija u (A) korteksu (uveličanje 200x) i (B) hipokampusu (uveličanje 400x) pacova kontrolne grupe (PN100).



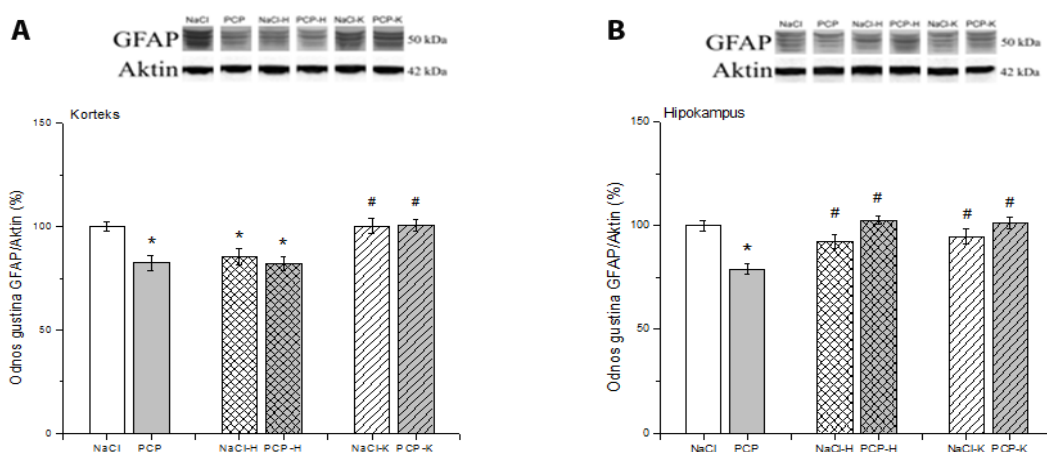
Grafik 14. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na zastupljenost NeuN⁺ ćelija u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

$p < 0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.3.5.2. Zastupljenost astrocita u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom

Statističkom analizom dobijenih rezultata uočava se smanjenje ekspresije GFAP, markera astrocita, i u korteksu [$F_{5,24}=8.17$; $p<0.01$] i u hipokampusu [$F_{5,24}=9.68$; $p<0.01$]. Smanjenje je uočeno u obe ispitivane moždane strukture u grupi perinatalno tretiranoj fenciklidinom ($p<0.01$). Hronična primena haloperidola smanjuje ekspresiju ovog proteina u korteksu bez obzira na tip perinatalnog tretmana ($p<0.01$) u poređenju sa kontrolnom grupom, dok klozapin povećava ($p<0.05$) ekspresiju ovog proteina u poređenju sa PCP grupom. Ekspresija GFAP u hipokampusu je povećana ($p<0.01$) u grupama tretiranim antipsihoticima u poređenju sa PCP grupom (grafik 15 A i B).

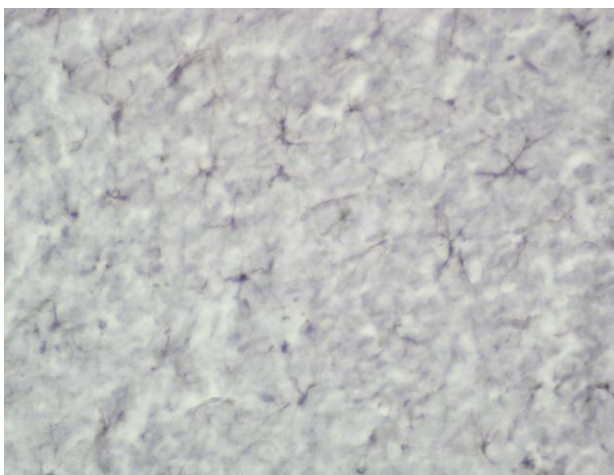


Grafik 15. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na ekspresiju GFAP u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

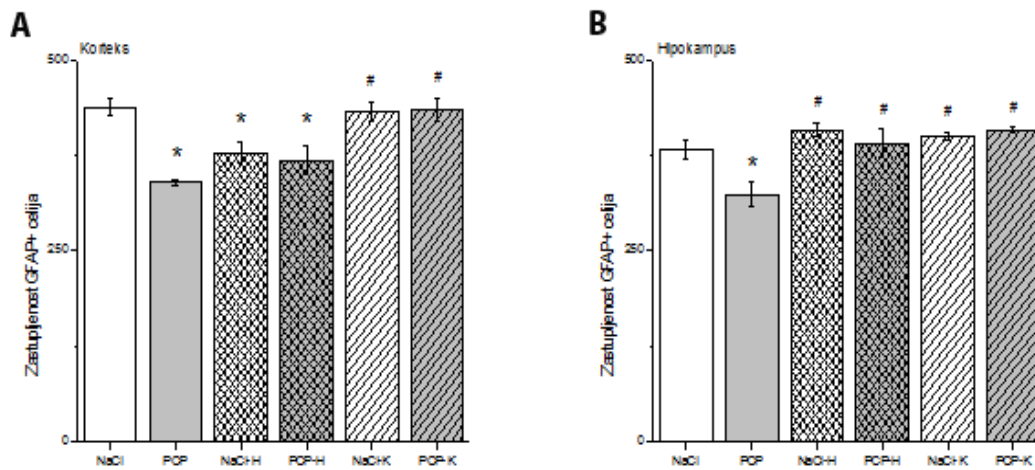
* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

$p<0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

Određivanjem broja GFAP⁺ ćelija imunohistochemijskim bojenjem pratili smo zastupljenost astrocita u mozgu ovih životinja. Na slici 6. predstavljeno je reprezentativno imunohistochemijsko bojenje GFAP⁺ ćelija u korteksu kontrolne grupe. Statistička analiza rezultata zastupljenosti GFAP⁺ ćelija u korteksu i hipokampusu na šest vidnih polja na uveličanju 400x prikazana je grafički (grafik 16). Analiza dobijenih rezultata ukazuje na značajnu redukciju zastupljenosti GFAP⁺ ćelija u korteksu u PCP grupi i grupama tretiranim haloperidolom (NaCl-H i PCP-H), dok je u hipokampusu redukcija prisutna samo u PCP grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovi rezultati potvrđuju promene detektovane primenom *Western blot-a*.



Slika 6. Reprezentativni prikaz imunohistochemijskog bojenja GFAP⁺ ćelija u korteksu pacova kontrolne grupe (PN100).



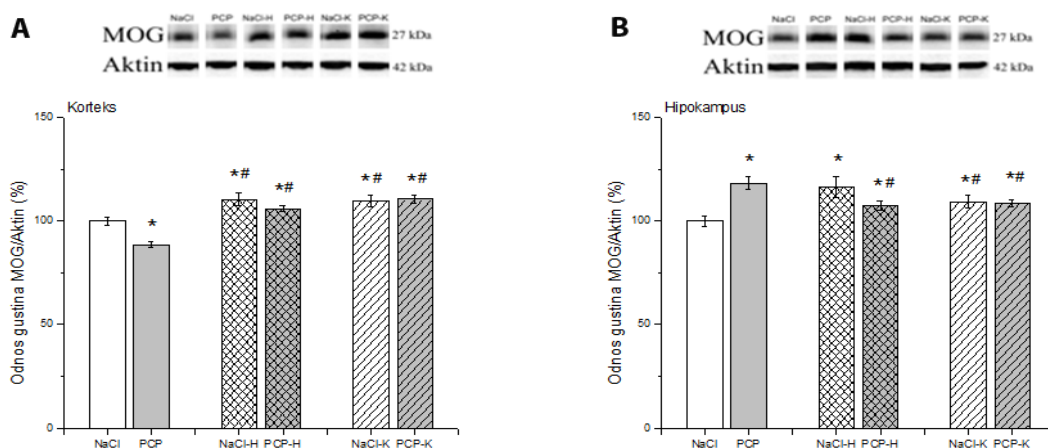
Grafik 16. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na zastupljenost GFAP⁺ ćelija u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* p<0.05 u poređenju sa kontrolnom grupom.

p<0.05 u poređenju sa PCP grupom.

4.3.5.3. Zastupljenost oligodendrocita u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom

Rezultati naše studije ukazuju da je ekspresije MOG proteina, markera oligodendrocita, statistički značajno promijenjena u korteksu [$F_{5,24}=14.23$; $p<0.01$] i hipokampusu [$F_{5,24}=4.65$; $p<0.01$]. U korteksu je uočeno značajno smanjenje u grupi perinatalno tretiranoj PCP-om ($p<0.01$) u poređenju sa kontrolnom grupom. Značajno povećanje u grupama tretiranim antipsihoticima haloperidolom i klozapinom ($p<0.05$) u poređenju sa kontrolnom grupom i PCP grupom. U hipokampusu je ekspresija povećana u svim eksperimentalnim grupama ($p<0.05$) u poređenju sa kontrolom, dok je u PCP-H i grupama tretiranim klozapinom ekspresija smanjena ($p<0.05$) u poređenju sa PCP grupom (grafik 17 A i B).

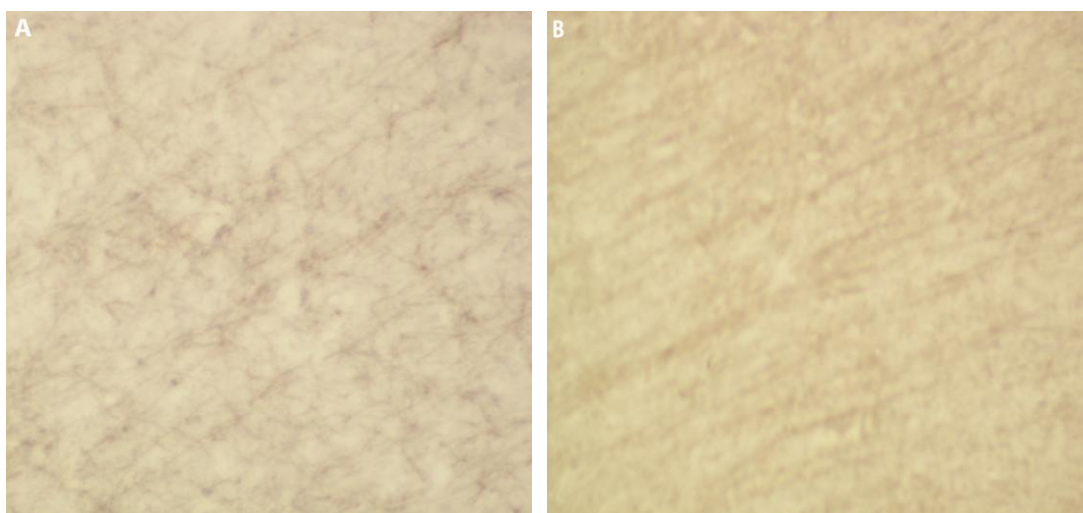


Grafik 17. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na ekspresiju MOG proteina u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

$p<0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

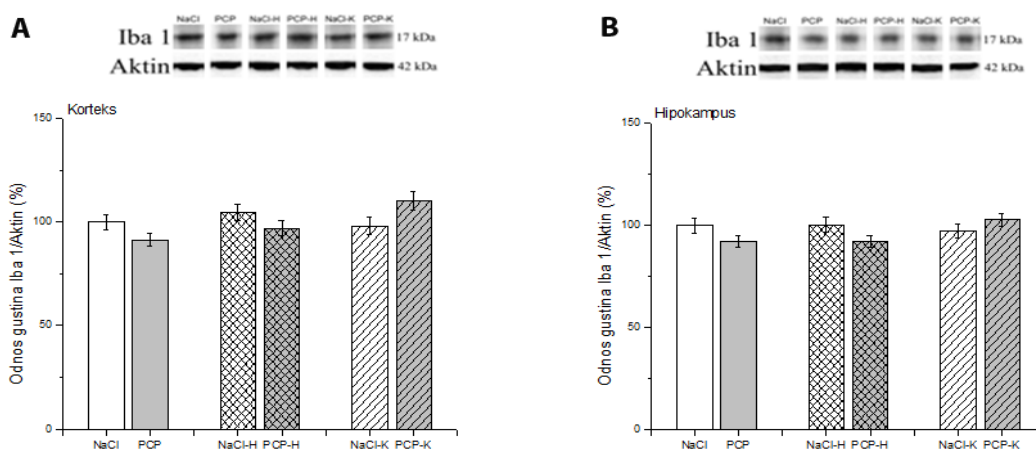
Imunohistochemijskim bojenjem smo pratili zastupljenost oligodendrocita u mozgu pacova starih 100 dana, koristeći mijelin oligodendrocitni glikoprotein MOG kao marker ovih ćelija. Na slici 7. predstavljeno je reprezentativno imunohistochemijsko bojenje MOG⁺ ćelija u korteksu kontrolne grupe. Kao što se uočava na slici, ovaj marker boji mijelinska vlakna koja se na preparatima uočavaju kao paralelna vlakna različitih dužina i usmerenja. Na preparatima se ne uočavaju značajniji znaci demijelinizacije.



Slika 7. Reprezentativni prikaz imunohistochemijskog bojenja MOG⁺ ćelija u (A) korteksu i (B) hipokampusu pacova kontrolne grupe (PN100) na uveličanju 400x.

4.3.5.4. Zastupljenost ćelija mikroglije u mozgu odraslih pacova nakon tretmana haloperidolom i klozapinom

Analizom dobijenih rezultata nisu uočeni promene ekspresije Iba 1 proteina, markera mikroglije, ni u korteksu [$F_{5,24}=2.18$; $p=0.09$] ni u hipokampusu [$F_{5,24}=1.92$; $p=0.13$] pacova starih 100 dana. Dobijeni rezultati ukazuju da izostaju efekti perinatalne primene fenciklidina kao i tretmana antipsihoticima na ekspresiju ovog proteina u mozgu pacova (grafik 18 A i B).



Grafik 18. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na ekspresiju Iba 1 proteina u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova (PN100). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* $p<0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

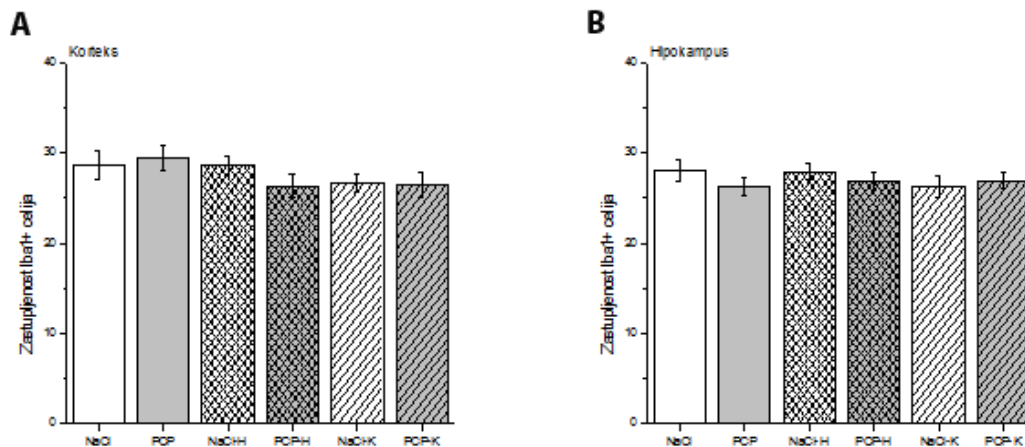
$p<0.05$ u poređenju sa PCP grupom.

Imunohistohemijski smo pratili zastupljenost Iba 1⁺ ćelija u mozgu ovih životinja. Na slici 8. predstavljeno je reprezentativno imunohistohemijsko bojenje Iba 1⁺ ćelija u korteksu kontrolne grupe.



Slika 8. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja Iba 1⁺ ćelija u korteksu pacova kontrolne grupe (PN100).

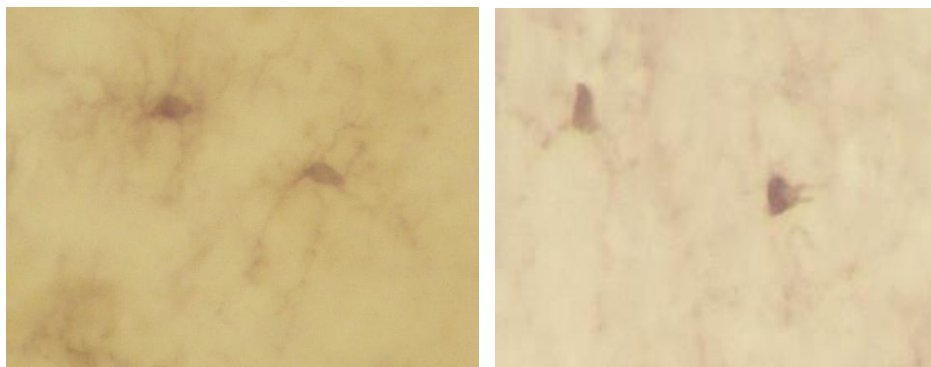
Statistička analiza rezultata zastupljenosti Iba 1⁺ ćelija na šest vidnih polja na uveličanju 400x u korteksu i hipokampusu prikazana je na grafiku 19. Analiza dobijenih rezultata ne ukazuje da postoje statistički značajne promene u zastupljenosti mikroglialnih ćelija u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu, što je u skladu sa rezultatima imunoblota. Međutim, primetili smo da ćelije u mozgu životinja iz eksperimentalnih grupa menjaju morfologiju. Naime, u kontrolnoj grupi u obe ispitivane moždane strukture uočene ćelije su razgranate, dok se u eksperimentalnim grupama razgranatost smanjuje i ćelije izgledaju ameboidnije u odnosu na ćelije iz kontrolne grupe (Slika 9).



Grafik 19. Efekat perinatalne primene fenciklidina i hroničnog tretmana haloperidolom (H) i klozapinom (K) na zastupljenost Iba 1⁺ ćelija u korteksu (A) i hipokampusu (B) odraslih pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.E.M. za metodološki definisan broj životinja.

* p<0.05 u poređenju sa kontrolnom grupom.

p<0.05 u poređenju sa PCP grupom.



Slika 9. Reprezentativni prikaz promene morfologije ćelija mikroglije nakon tretmana fenciklidinom i/ili antipsihoticima. Na slici levo je prikazana razgranata ćelija iz kontrolne grupe, dok su u ostalim grupama ćelije ameboidnije i manje razgranate kao što je prikazano na slici desno.

5. DISKUSIJA

Promene mitohondrijske funkcije koje uzrokuju promenu energetskeg statusa ćelije i utiču na razvoj nervnog sistema remeteći povezanost neurona, neurotransmisiju i mijelinizaciju, često se opisuju u obolelih od shizofrenije i sugerišu direktnu povezanost mitohondrijske disfunkcije i patogeneze ove bolesti (Rajasekaran i sar., 2015; Rezin i sar., 2009). Pokazano je takođe da različiti faktori rizika za razvoj shizofrenije, kao što su genetski i/ili sredinski faktori, toksini, poremećaji neurotransmiterskih sistema, prenatalna neuhranjenost, infekcije i zloupotreba narkotika, mogu dovesti do patoloških promena mitohondrija (Meyer i sar., 2013; Park i sar., 2010; Brisch i sar., 2014; Jousse i sar., 2014).

Prva istraživanja koja su ukazivala da shizofreniju karakterišu promene produkcije energije u mozgu sprovedena su sredinom prošlog veka. Tako je razvoj tehnika vizuelizacije omogućio da se poremećaji energetskeg metabolizma uočene u mozgu obolelih od SCH, kako *post mortem* tako i *in vivo* (Takahashi, 1954; Cohen i sar., 1988; Asarnow i sar., 1990). Do danas su uočeni poremećaji aktivnosti kompleksa mitohondrijskog respiratornog lanca (Maurer i sar., 2001), kao i redukcija broja i volumena mitohondrija u različitim moždanim regionima pacijenata obolelih od SCH u poređenju sa zdravim kontrolama (Kung i Roberts, 1999; Uranova i sar., 2001). Redukovana aktivnost citohrom c oksidaze, četvrtog kompleksa u respiratornom lancu koji prenosi elektrone na kiseonik, dokumentovana je u frontalnom i temporalnom korteksu obolelih od SCH (Cavelier i sar., 1995; Maurer i sar., 2001). Maurer i saradnici (2001) su u mozgu obolelih od SCH uočili i redukciju aktivnosti kompleksa I, prvog enzima respiratornog lanca, ali je redukcija bila ograničena samo na temporalne kortikalne regione obolelih u poređenju sa zdravim kontrolama. Važno je napomenuti da su promene aktivnosti kompleksa I i citohrom c oksidaze u tesnoj vezi sa mitohondrijalnom disfunkcijom zbog činjenice da subjedinice koje ulaze u sastav ovih enzima kodira najvećim delom mitohondrijalna DNK, za razliku od subjedinica ostalih kompleksa respiratornog lanca koje kodira jedarna DNK (Wallace, 1994).

Ispitivanje mitohondrijalne disfunkcije na animalnim modelima shizofrenije su malobrojna, a naše istraživanje je, koliko je nama poznato, jedino koje je izvedeno na

modelu perinatalne primene PCP-a. Istraživanja na ketaminskom animalnom modelu SCH sprovedena su od strane de Oliveira i saradnika (2011) i potvrđuju postojanje promena aktivnosti enzima respiratornog lanca. Pokazano je da u prefrontalnom korteksu i hipokampusu odraslih Wistar pacova dolazi do različite dinamike povećanja aktivnosti kompleksa I i citohrom c oksidaze nakon administracije ketamina u dozi od 25 mg/kg tokom 7 uzastopnih dana (de Oliveira i sar., 2011). Aktivnost enzima respiratornog lanca je praćena u tri vremenska intervala – nakon jednog, tri i šest sati od poslednje aplikacije ketamina. Zanimljivo je da su ovi autori našli da je aktivnost kompleksa I značajno povećana u prefrontalnom korteksu i hipokampusu u poređenju sa kontrolom u toku čitavog perioda praćenja, dok je aktivnost citohrom c oksidaze u obe ispitivane strukture bila povećana posle prvog sata ali se vratila na nivo u kontroli već u trećem satu po aplikaciji ketamina. Naše istraživanje je međutim pokazalo da se 24 sata nakon poslednje perinatalne aplikacije fenciklidina (PN13) u korteksu i hipokampusu pacova povećava aktivnost citohrom c oksidaze, dok je aktivnost kompleksa I povećana samo u hipokampusu ovih životinja. Međutim, osnovna razlika između studije de Oliveira i saradnika i naše studije ogleda se u starosti jedinki kojima je aplikovan blokator NMDA receptora. Naime, de Oliveira i saradnici su aplikovali ketamin odraslim jedinkama, a mi smo PCP-om tretirali novorođene pacove u periodu intenzivnog razvoja mozga. Promene aktivnosti enzima respiratornog lanca u mozgu pacova uočene neposredno nakon administracije fenciklidina u našem istraživanju ukazuju na povećanu potrebu za energijom. S druge strane, povećan fluks kroz respiratorni lanac može rezultirati povećanom produkcijom slobodnih radikala i oksidativnim stresom, stanjem koje je u mozgu pacova perinatalno tretiranih PCP-om dokumentovano u našim prethodnim istraživanjima (Radonjić i sar., 2010; Stojković i sar., 2012).

S obzirom da se simptomi shizofrenije ispoljavaju u ranom adultnom dobu i da se smatra da bolest ima neurorazvojno poreklo, pratili smo efekte perinatalne primene fenciklidina kod pacova starih 70 dana, što u životnom ciklusu pacova odgovara ranoj adolescenciji (Sengupta, 2013). U pacova ove starosti nisu evidentirane promene aktivnosti kompleksa I ni u jednoj ispitivanoj strukturi mozga ali je zapažen različit tip promene aktivnosti citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu. Naime u korteksu se pacova perinatalno tretiranih PCP-om se u PN70 zapaža smanjenje aktivnosti citohrom c

oksidaze dok se u hipokampusu registruje povećanje aktivnosti ovog enzima u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Dualna priroda promene aktivnosti citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu može biti objašnjena promenama u broju pojedinih klasa neurona u mozgu životinja perinatalno tretiranih PCP-om. Studija Radonjić i saradnika (2013) je pokazala da je u mozgu pacova starih 70 dana koji su perinatalno tretirani PCP-om smanjen broj parvalbumin pozitivnih (PV^+) interneurona, koji su elektrofiziološki brzo-okidajući (*fast-spiking*) i koji koriste veliku količinu energije generisane oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijama, čiji broj je znatno veći u odnosu na druge klasa interneurona (Kann, 2015). Međutim, u ovoj studiji je smanjenje PV^+ interneurona uočeno i u korteksu i u hipokampusu pacova perinatalno tretiranih PCP-om, tako da se na osnovu njenih rezultata ne može objasniti povećanje aktivnosti citohrom c oksidaze koje smo mi zapazili u hipokampusu ovih životinja. Region zavisne promene aktivnosti citohrom c oksidaze, uočene u našem istraživanju se eventualno mogu objasniti povećanim energetske zahtevima drugih klasa interneurona, kao što su kalretinin pozitivne ćelije, čiji broj nije redukovano u hipokampusu (Radonjić i sar., 2013). Koristeći kompjutacione modele, Moujahid i saradnici (2014) su dokazali da postoji razlika u energetske zahtevima interneurona u korteksu, hipokampusu i talamusu. Ovaj savremeniji metodološki pristup ukazuje da se energija koja se oslobađa hidrolizom jednog molekula ATP-a razlikuje među pomenutim regionima, pri čemu je energija koja se stvara u pacovskim hipokampalnim interneuronima znatno niža u odnosu na energiju u kortikalnim brzo-okidajućim interneuronima. Pored toga, ovi autori su dokazali da su osobine neurona temperaturno zavisne i da je potreba za energijom u hipokampusu veća pri nižim temperaturama. Stoga, uticaj temperature može biti važan za objašnjenje uočenih promena aktivnosti citohrom c oksidaze u hipokampusu, s obzirom da je u prethodnom istraživanju pokazana redukcija bazalne temperature kod životinja perinatalno tretiranih fenciklidinom (Radonjić i sar., 2008). Skupa ove promene ukazuju na poremećaj u energetske snabdevanju različitih moždanih regiona, što može rezultirati produkcijom slobodnih radikala i uzrokovati oksidativni stres koji je dokumentovan u shizofreniji (Do i sar., 2009; Stojković i sar., 2012; Reddy i Yao, 1996).

Zanimljivo je da su rezultati našeg istraživanja delimično u suprotnosti sa *post mortem* rezultatima, naročito po pitanju aktivnosti kompleksa I. Ono što može biti

objašnjenje ovog fenomena je činjenica da je aktivnost kompleksa I u negativnoj korelaciji sa *post mortem* intervalom, tj. vremenom koje prođe od trenutka smrti do uzorkovanja moždanog tkiva (Mizuno i sar., 1990). Pored toga, pretpostavlja se da odstupanja *post mortem* rezultata od rezultata *in vivo* studija mogu biti posledica terapije antipsihoticima. Dror i saradnici (2002) su uočili pojačanu aktivnost kompleksa I kod pacijenata sa akutnim psihotičnim epizodama, dok se kod pacijenata sa rezidualnom shizofrenijom uočava smanjenje aktivnosti ovog enzima u poređenju sa zdravim kontrolama. Maurer i saradnici (2001) su ustanovili da antipsihotici progresivno inhibiraju aktivnost kompleksa I i citohrom c oksidaze u mozgu obolelih od SCH, upućujući da je taj efekat dozno zavisian. Smanjenje aktivnosti kompleksa I uočeno je u frontalnom korteksu pacova hronično tretiranih antipsihoticima, dok je aktivnost citohrom c oksidaze povećana u frontalnim regionima mozga pacova. Sve ovo ukazuje na mogućnost da je promena aktivnosti enzima respiratornog lanca u moždanom tkivu obolelih od SCH posledica tretmana antipsihoticima (Maurer i sar., 2001). Stoga je drugi deo našeg istraživanja usmeren na ispitivanje uticaja hroničnog tretmana antipsihoticima haloperidolom i klopazinom tokom devet nedelja aktivnost enzima respiratornog lanca i procese apoptoze i autofagije kod životinja perinatalno tretiranih NaCl-om i PCP-om. Tretman od devet nedelja smatra se hroničnim jer odgovara trajanju terapijskog tretmana nešto više od pet ljudskih godina, imajući na umu da 11,8 pacovskih dana odgovara jednoj godini kod čoveka (Quinn, 2005). Opredelili smo se za upotrebu karakterističnih predstavnika svojih grupa koji su u širokoj upotrebi među pacijentima. Takođe, jedan od razloga za izbor klopazina kao predstavnika atipičnih antipsihotika bila je činjenica da se on smatra superiornijim od bilo kog drugog antipsihotika prve ili druge generacije (Meltzer, 2013; Wenthur i Lindsley, 2013). Doze primenjene u ovoj studiji odgovaraju kliničkim dozama, za razliku od brojnih prethodnih animalnih studija koje su se zasnivale na jednokratnoj aplikaciji antipsihotika najčešće u mnogo višoj dozi od kliničke. Tretman antipsihoticima tokom devet nedelja nije uslovio promenu aktivnosti kompleksa I ni u korteksu ni u hipokampusu pacova bez obzira da li su perinatalno tretirani NaCl-om ili PCP-om. S druge strane, tretman klopazinom je uzrokovao smanjenje aktivnosti citohrom c oksidaze u obe moždane strukture nezavisno od perinatalnog tretmana, dok je tretman haloperidolom doveo do smanjenja aktivnosti ovog enzima samo u korteksu životinja

perinatalno tretiranih PCP-om. Ovi rezultati nam ukazuju da antipsihotici utiču na oksidativnu fosforilaciju remeteći aktivnost terminalnog enzima u tom procesu. Istovremeno ovi rezultati nam sugerišu mogućnost da uočen kompromitovani mitohondrijalni metabolizam kod pacijenata nije karakteristika same bolesti već je posledica dugogodišnje medikacije posebno kada se radi o primeni klozapina.

Defekti u aktivnosti respiratornog lanca mogu rezultirati smanjenim snabdevanjem mozga energijom, povećanim unosom kalcijuma u ćeliju i aktivacijom NMDA receptora što je praćeno ćelijskom smrću usled ekscitotoksičnosti (Maurer i sar., 2001). Rezultati novije studije Faizi i saradnika (2014) potkrepljuju pretpostavku o prisustvu mitohondrijalne disfunkcije i oksidativnog stresa u etiopatologiji SCH, upućujući da opservirane promene uzrokuju povećanje permeabilnosti mitohondrijalne membrane i pad membranskog potencijala, bubrenje mitohondrija i oslobađanje citohroma c u citoplazmu, čime se aktivira proces programirane ćelijske smrti. Takođe, pokazano je da antagonisti NMDA receptora, kao što su PCP, MK-801 i ketamin, imaju sposobnost da pokrenu široko rasprostranjenu apoptotsku neurodegeneraciju u ranijim postnatalnim fazama razvoja mozga pacova (Ikonomidou i sar., 1999; Wang i sar., 2001; Jevtović-Todorović i sar., 2003). Prve tri postnatalne nedelje u životnom ciklusu pacova predstavljaju period kada je mozak najosetljiviji tokom razvoja (Ikonomidou i sar., 1999, 2000) i predstavlja period intenzivne sinaptogeneze i brzog razvoja mozga (Dobbing i Sands, 1979). Istraživači su pre nešto više od jedne decenije tehnikama vizuelizacije uočili znake prisustva apoptoze u mozgu obolelih od SCH uočivši progresivnu redukciju sive mase kortikalnih regiona u ranim fazama SCH, iako sam mehanizam koji leži u osnovi ove redukcije nije potvrđen (Jarskog i sar., 2005; Glantz i sar., 2006).

Proces programirane ćelijske smrti, odnosno apoptoza, se može odvijati na više načina, ali je u mozgu najčešći mitohondrijski put, tzv. unutrašnji put apoptoze (Yuan i Yanker, 2000). Ruptura spoljašnje membrane mitohondrija može rezultirati aktivacijom procesa apoptoze na dva načina od kojih jedan zahteva prisustvo kaspaza za svoje odvijanje, a drugi ne. Međutim, u shizofreniji je do sada proučavan samo kaspaza zavisni put apoptoze. *Post mortem* studije na uzorcima mozga pacijenata obolelih od SCH ne ukazuju na značajne promene nivoa egzekutorske kaspaze 3 u temporalnim

kortikalnim regionima u poređenju sa zdravim kontrolama, iako je odnos pro-apoptotskog Bax i anti-apoptotskog Bcl-2 proteina povišen ukazujući na povišenu vulnerabilnost ćelija (Jarskog i sar., 2004). Rezultati jedne od pionirskih studija u ovoj oblasti ukazali su na široko rasprostranjenu apoptozu u mozgu pacova nakon perinatalne primene MK-801, još jednog poznatog antagoniste NMDA receptora (Ikonomidou i sar., 1999). Autori Wang i Johnson (2007) su utvrdili da aplikovanje fenciklidina pacovima starim sedam dana dovodi do dozno i region zavisne aktivacije kaspaze 3. Pored toga, subkutana aplikacija fenciklidina u dozi od 10 mg/kg sedmog, devetog i jedanaestog postnatalnog dana povećava aktivnost kaspaze 3 u frontalnom korteksu pacova u poređenju sa kontrolnim životinjama (Anastasio i sar., 2009). Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa prethodnim studijama i pokazuju da neposredno nakon perinatalne aplikacije fenciklidina (PN13) dolazi do povećanja ekspresije kaspaze 3 u mozgu pacova, ukazujući na aktivaciju procesa apoptoze. Međutim, interesantan nalaz je da se povećanje ekspresije ovog proteina uočava i kao dugotrajan efekat perinatalne primene fenciklidina (PN70). Takođe, uočeno povećanje ekspresije kaspaze 3 se održava i do narednog vremenskog preseka (PN100) u korteksu životinja perinatalno tretiranih PCP-om. Prema Glantz i saradnicima (2006) početak psihoza je povezan sa povećanjem kaspaze 3, ali se taj nivo u kasnijim fazama bolesti stabilizuje. U skladu sa ovim saznanjem, postoji mogućnost da povećanje ekspresije ovog proteina ne bismo uočili da smo je pratili kod još starijih životinja. S druge strane, moguće je da povećanje ekspresije kaspaze 3 ne znači nužno i gubitak ćelija. Naime, studije ukazuju da redukcija sive mase u mozgu obolelih od SCH uočena tehnikama vizuelizacije nije posledica gubitka ćelija, već atrofije neurona, redukcije neuropila i sinaptičkih defekata. Samim tim efekat apoptoze u mozgu ne mora biti letalan po ćeliju (Glantz i sar., 2006).

Iako uticaj antipsihotika na apoptotske promene uočene *post mortem* studijama nije u potpunosti definisan, istraživači ukazuju na moguću povezanost tretmana antipsihoticima i regulacije procesa apoptoze. Naime, dugo se smatralo da antipsihotici imaju neuroprotektivno dejstvo, naročito klozapin, ali skorije longitudinalne studije zasnovane na praćenju promena mozga upotrebom magnetne rezonance dovode u pitanje takve tvrdnje (Ahmed i sar., 2015). Danas je poznato da su neke neuroanatomske promene prisutne već u početnim stadijumima bolesti i da se sa pojavom novih epizoda produbljuju. Međutim, uočeno je da neke izmene nastaju po progresiji bolesti i da su

karakteristične za kasnije stadijume oboljenja, što dodatno ukazuje na moguć neurodegenerativan efekat antipsihotika. Usled indicija da antipsihotici imaju kumulativno i neurodegenerativno dejstvo, javile su se kontroverze i oprez po pitanju efekata njihove dugoročne upotrebe (Veijola i sar., 2014; Husa i sar., 2014).

Jednu od prvih *in vivo* studija koja svedoči o efektima antipsihotika sproveo je Frederick Jarskog sa svojim saradnicima (2007) i tom prilikom su uočili da tretman haloperidolom i klozapinom tokom četiri nedelje dovodi do povećanja ekspresije egzekutorske kaspaze 3 u frontalnom korteksu pacova. Kasnije je utvrđeno da tretiranje ćelija humanog neuroblastoma haloperidolom dovodi do aktivacije kaspaze 3 i smanjenog vijabiliteta ćelija na dozno zavisani način (Gassó i sar., 2012). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da primena obe klase antipsihotika tokom devet nedelja povećava ekspresiju ovog proteina u prefrontalnom korteksu pacova u poređenju sa kontrolom. Haloperidol ostvaruje efekat samo u korteksu životinja koje su perinatalno tretirane fenciklidinom, ali u tom slučaju promena je slična onoj koja se uočava u PCP grupi. Kako se promena ne uočava u NaCl-H grupi, tj. grupi koja omogućava praćenje samostalnog efekta antipsihotika, to nam ukazuje da u PCP-H grupi haloperidol sam po sebi nema velikog uticaja na ekspresiju kaspaze 3 u korteksu ovih životinja, već da je uočena promena efekat fenciklidina. U hipokampusu ekspresija kaspaze 3 je smanjena u grupama tretiranim haloperidolom u poređenju sa kontrolnom grupom. S druge strane, tretman klozapinom nezavisno od perinatalnog tretmana povećava ekspresiju kaspaze 3 u korteksu u poređenju sa kontrolnom grupom, dok u hipokampusu ovaj antipsihotik dovodi do povećanja ekspresije kaspaze 3 u poređenju sa PCP grupom. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost klozapin da intenzivira kaspaza zavisni put apoptoze. Takođe, kako je povećanje kaspaze 3 karakteristično za neurodegenerativna oboljenja kao što su Alchajmerovo oboljenje i Parkinsonovo oboljenje (Jarskog i sar., 2004), rezultati naše studije ukazuju da dugotrajni tretman antipsihoticima može imati neurodegenerativni efekat na mozak. U prilog ove pretpostavke ide i nalaz da efekat antipsihotika postoji nezavisno od perinatalnog tretmana, tj. antipsihotici kada se samostalno primenjuju izazivaju isti tip promene kao i kada primeni antipsihotika prethodi perinatalni tretman fenciklidinom, naročito kada je u pitanju tretman klozapinom.

S obzirom da se nalazi *post mortem* i *in vivo* studija razlikuju po pitanju aktivnosti kaspaze 3, otvara se mogućnost da se apoptoza opservirana u SCH odvija i kaspaza nezavisnim putem. Jedan od njih je posredovan faktorom indukcije apoptoze. Faktor indukcije apoptoze, flavoprotein oksidoreduktaza ukotvljena u unutrašnju membranu mitohondrija, ima važnu ulogu u održavanju morfologije mitohondrija i energetskog metabolizma (Norberg i sar., 2010; Sevrioukova, 2011). Kada se nalazi unutar mitohondrija, ovaj protein je inertan. Međutim, usled mitohondrijalne disfunkcije i ruptur membrane faktor indukcije apoptoze se translocira u citoplazmu, a zatim u jedro aktivirajući apoptozu i degradujući nasledni materijal bez učešća kaspaza u ovom koraku (Candé i sar., 2004). Brojne *in vivo* studije ukazuju na značaj uloge faktora indukcije apoptoze u procesu smrti neurona (Cheung i sar., 2005; Zhu i sar., 2007). Takođe, prethodne studije ukazuju da je translokacija faktora indukcije apoptoze iz mitohondrija u jedro uključena u mehanizam glutamatergičke ekscitotoksičnosti u kortikalnim neuronima (Wang i sar., 2004; Yu i sar., 2002), jer aktivacija NMDA receptora uzrokuje povećanje unutarćelijskog kalcijuma i direktnu aktivaciju kalpaina, za koji se smatra da učestvuje u oslobađanju faktora indukcije apoptoze iz mitohondrija (Norberg i sar., 2008; 2010). Analizom rezultata naše studije ne uočavaju se promene u ekspresiji faktora indukcije apoptoze u mozgu pacova neposredno nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PN13). Sve skupa ukazuje da je neposredan efekat PCP-a u mozgu pacova oslobađanje citohroma c i aktivacija ćelijske smrti apoptozom na kaspaza zavisian način. S druge strane, u kortikalnim regionima mozga odraslih životinja (PN70) uočava se povećanje ekspresije AIF proteina u grupi perinatalno tretiranoj PCP-om. Uočeno povećanje u kortikalnim regionima odraslih životinja se održava i do narednog vremenskog preseka (PN100). Candé i saradnici (2002) su utvrdili da faktor indukcije apoptoze i kaspaze mogu udruženo učestvovati u kaskadnom procesu apoptoze u zavisnosti od tipa ćelije i stimulusa koji indukuje apoptozu. Ova činjenica može biti objašnjenje za uočeno povećanje ekspresije oba markera apoptoze u kortikalnim regionima odraslih pacova.

S obzirom da smo utvrdili da antipsihotici utiču na proces apoptoze ostvarujući efekat na ekspresiju kaspaze 3, logično je bilo za pretpostaviti da utiču i na ekspresiju faktora indukcije apoptoze. Zaista, rezultati naše studije ukazuju da hronična primena antipsihotika menja ekspresiju ovog proteina u mozgu pacova i da su promene

izraženije u kortikalnim nego u hipokampalnim regionima. Tako primena haloperidola tokom devet nedelja smanjuje ekspresiju faktora indukcije apoptoze u korteksu i hipokampusu pacova nezavisno od perinatalnog tretmana u poređenju sa kontrolom. S obzirom da je u korteksu promena koju haloperidol indukuje značajna i u odnosu na PCP grupu, važno je napomenuti da haloperidol u ovoj moždanoj strukturi vrši reverziju promene ekspresije indukovane perinatalnom primenom PCP-a. Smanjenje ekspresije ovog proteina uslet tretmana haloperidolom se uočava i u hipokampusu. Uočeni rezultati ukazuju da haloperidol vrši inhibiciju procesa apoptoze kaspaza nezavisnim putem u mozgu pacova bez obzira da li su perinatalno tretirani NaCl-om ili PCP-om. S druge strane, tretman klozapinom ima drugačiji efekat na ekspresiju ovog proteina u odnosu na haloperidol i ide u smeru povećanja ekspresije bez obzira da li su životinje perinatalno tretirane NaCl-om ili PCP-om. Međutim, kada se samostalno primeni (NaCl-K grupa) klozapin povećava ekspresiju faktora indukcije apoptoze u korteksu pacova i u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na PCP grupu, što ukazuje da ovaj antipsihotik intenzivira kaspaza nezavisni put apoptoze u ovoj moždanoj strukturi, dok u hipokampusu ne ostvaruje efekat na ovaj proces. Sudeći po opserviranim rezultatima za markere apoptoze, antipsihotici remete proces programirane ćelijske smrti u mozga pacova. Pri tome, haloperidol deluje u smeru inhibicije i kaspaza zavisnog i kaspaza nezavisnog načina aktivacije apoptoze, dok klozapin intenzivira oba puta aktivacije apoptoze u kortikalnim regionima.

Apoptoza i autofagija su fiziološki procesi koji učestvuju u održavanju ćelijske homeostaze. Kao što je već napomenuto, abnormalnosti u odvijanju procesa autofagije mogu dovesti do aktivacije procesa apoptoze (Debnath i sar., 2005; Lum i sar., 2005). Međutim, pitanje koje je još uvek bez odgovora je da li postoji i šta bi moglo biti sprega između ova dva procesa. Skorije studije ukazuju da bi to mogao biti Beklin 1 protein. Čak se smatra da je Beklin 1 ključni faktor koji odlučuje da li će ćelija ući u proces apoptoze ili autofagije. Ideja o dvojnoj ulozi ovog proteina potekla je iz onkoloških istraživanja. Naime, Beklin 1 protein poseduje BH3 domene koji su karakteristični za apoptotske proteine i preko njih stupa u interakciju sa anti-apoptotskim proteinima Bcl-2 familije. U toj interakciji sprečava formiranje autofagozoma i odvijanje autofagije (Marquez i Xu, 2012). Pored toga, iako sam protein nije neophodan za odvijanje procesa apoptoze, Beklin 1 je uključen u inhibiciju ovog procesa (Yue i sar., 2003;

Kang i sar., 2011). Ova činjenica je bila podstrek za istraživanja procesa autofagije u shizofreniji. Najnovije studije ukazuju da autofagija može imati ulogu u patogenezi SCH (Merenlender-Wagner i sar., 2015). U ovoj studiji je utvrđena redukcija transkripta iRNK za Beklin 1 u hipokampusu *ADNP⁺/ knockout* miševa, dok se ista ne uočava u limfocitima periferne krvi pacijenata obolelih od SCH. Ispitivanja procesa autofagije, kao i veze ova dva procesa na animalnim modelima shizofrenije izostaju. Stoga smo imajući u vidu da apoptozu i autofagiju mogu aktivirati isti signali i da ishod u nekim slučajevima može biti aktivacija oba procesa (Maiuri i sar., 2007), sproveli ispitivanje sa ciljem utvrđivanja proteinske ekspresije markera autofagije u svim ispitivanim eksperimentalnim grupama životinja. Rezultati naše studije su pokazali da promena ekspresije Beklin 1 proteina u mozgu pacova neposredno nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PN13) izostaje. S obzirom da smo utvrdili aktivaciju procesa apoptoze u mozgu ovih pacova, postoji mogućnost da je proces autofagije inhibiran kod ovih životinja. Promena ekspresije Beklin 1 proteina se ne uočava ni u korteksu odraslih životinja (PN70). Međutim, u hipokampusu ovih životinja uočava se povećanje ekspresije Beklin 1 proteina ukazujući na aktivaciju procesa autofagije, i u skladu je sa prethodnom studijom (Merenlender-Wagner i sar., 2015). Međutim, ni u narednom vremenskom preseku (PN100) ne uočavaju se promena ekspresije Beklin 1 proteina u mozgu pacova perinatalno tretiranih PCP-om. Sve ovo skupa ukazuje da perinatalna primena PCP-a ne remeti odvijanje početnih faza procesa autofagije. Uočeni efekti hroničnog tretmana antipsihoticima na proces apoptoze nametnuli su pitanje da li ostvaruju efekat i kakav na proces autofagije. Tretiranje životinja haloperidolom ne menja ekspresiju ovog proteina u mozgu pacova, dok se nakon tretmana klozapinom u obe ispitivane moždane strukture uočava smanjenje ekspresije ovog proteina nezavisno od perinatalnog tretmana kom su životinje bile podvrgnute. Ovi rezultati nam ukazuju da je klozapin sposoban da remeti odvijanje procesa autofagije i to već u početnim fazama ovog procesa.

Pored Beklina 1 pratili smo ekspresiju još jednog markera autofagije - p62 proteina, za koji je utvrđeno da je u negativnoj korelaciji sa procesom autofagije. Naime, imajući u vidu da se protein p62 degraduje u autofagiji, istraživači su pronašli vezu između inhibicije autofagije i povećanog nivoa p62 proteina u ćeliji (Pankiv i sar., 2007; Mizushima i Hara, 2006; Bjřrkřy i sar., 2005). Kako naša studija pokazuje,

neposredno nakon primene PCP-a uočava se povećanje ekspresije p62 proteina u korteksu, dok je u hipokampusu ekspresija nepromenjena u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Ovi rezultati ukazuju da aplikovanje fenciklidina tokom prve dve nedelje perinatalnog života ne aktivira proces autofagije u mozgu mladih pacova, upućujući čak i na inhibiciju ovog procesa u kortikalnim regionima. S druge strane, dugotrajni efekti perinatalne primene PCP-a se ogledaju u smanjenju ekspresije p62 proteina u obe ispitivane moždane strukture, ukazujući da je proces autofagije aktiviran u mozgu ovih životinja. Međutim, smanjenje se ne uočava u mozgu pacova starih 100 dana koji su perinatalno tretirani PCP-om, kao ni u grupama tretiranim antipsihoticima, što ukazuje da antipsihotici ne remete formiranje autofagolizozoma, ali kako je uočeno da klopazipin remeti inicijaciju procesa autofagije, to nam ukazuje na mogućnost neadekvatnog uklanjanja i recikliranja ćelijskih komponenti ovim procesom, što posledično može poremetiti neke druge procese u ćeliji i rezultirati ćelijskom smrću ili oksidativnim stresom koji su dokumentovani u shizofreniji.

Skupa gledano, sve ukazuje na prisustvo mitohondrijske disfunkcije u mozgu pacova perinatalno tretiranih PCP-om koja se održava tokom vremena. S druge strane, antipsihotici remete procese neophodne za održavanje ćelijske homeostaze, čak i nezavisno od perinatalnog tretmana kom su životinje izložene. Stoga smo primenom tehnike transmisiona elektronske mikroskopije pratili ultrastrukturne promene mitohondrija sa ciljem ispitivanja njihovog integriteta, imajući u vidu da mitohondrijska ultrastruktura diktira njenu funkcionalnost (Mannella, 2006). Ultrastrukturna analiza moždanih uzoraka pacova iz svih eksperimentalnih grupa potvrđuje rezultate dobijene analizom proteinske ekspresije. Naime, u mozgu mladih pacova (PN13) perinatalno tretiranih PCP-om ćelije ispoljavaju promene karakteristične za proces apoptoze, nasuprot ćelija kontrolnih životinja koje ispoljavaju normalne morfološke karakteristike. Mikroskopskom analizom uzoraka odraslih životinja perinatalno tretiranih fenciklidinom (PN70) uočavaju se autofagozomi i druge ultrastrukturne promene koje upućuju na proces autofagije u obe ispitivane moždane strukture. U mozgu pacova starih 100 dana, ćelije korteksa i hipokampusa kontrolne grupe ispoljavaju normalne morfološke karakteristike, dok analiza uzoraka korteksa i hipokampusa pacova perinatalno tretiranih PCP-om ukazuje na dugoročne efekte perinatalne primene ovog psihotomimetika. U korteksu se uočavaju neuroni u ranom stadijumu apoptoze, dok se u

hipokampusu istih životinja zapažaju dilatirane mitohondrije sa izduženim kristama, kao i prisustvo autofagozoma. U moždanim regionima pacova tretiranih antipsihoticima uočavaju se mitohondrije izmenjene morfologije. Ove organele su tamne i kondenzovane, smanjenog volumena sa nejasnim granicama između spoljašnjih i unutrašnjih membrana ili su blago dilatirane sa očuvanim membranama. Slične morfološke promene mitohondrija se uočavaju i u moždanom tkivu životinja tretiranim klopazinom, potvrđujući da primena obe klase antipsihotika uzrokuje morfološke promene mitohondrija koja najverovatnije stoji u osnovi poremećaja procesa apoptoze i autofagije. Stoga treba biti obazriv u primeni ovih antipsihotika na duge staze.

Opservirane promene u procesima neophodnim za održavanje ćelijske homeostaze u mozgu pacova tretiranih antipsihoticima koje su praćene ultrastrukturnim promenama u korteksu i hipokampusu, navele su nas da sprovedemo niz eksperimenata sa ciljem utvrđivanja uticaja antipsihotika na zastupljenost ćelija centralnog nervnog sistema – neurona i glija ćelija (astrocita, oligodendrocita i mikroglije). Poznato je da shizofreniju karakterišu redukcija sive mase i smanjenje volumena kortikalnih regiona (John, 2009). Moguće je da remećenje odvijanja procesa apoptoze, s obzirom da je reč o kaskadnom procesu, remeti vijabilitet neuronskih i glijalnih ćelija u različitim fazama razvoja i time doprinosi volumetrijskim i funkcionalnim defektima dokumentovanim u shizofreniji (Jarskog i sar., 2005). Međutim, novije studije neurovizuelizacije primenom magnetne rezonance dovode u vezu tretman antipsihoticima sa uočenim reduktivnim promenama mozga kod pacijenata obolelih od SCH (Ho i sar., 2011; Fusar-Poli i sar., 2013; Ahmed i sar., 2015). Kliničke nalaze potkrepila su istraživanja na primatima i Sprague-Dawley pacovima (Konopaske i sar., 2008; Vernon i sar., 2011). Ove dve animalne studije su prve koje su potvrdile da hronični tretman antipsihoticima remeti morfologiju mozga. Međutim, u ovim studijama praćen je efekat samo antipsihotika ali ne i njihov efekat na animalnom modelu shizofrenije, odnosno na životinjama tretiranim nekim antagonistom NMDA receptora. Imajući u vidu da smo utvrdili da antipsihotici remete adekvatno odvijanje procesa apoptoze i autofagije, zanimalo nas da li tretman antipsihoticima menja ekspresiju markera neurona NeuN u mozgu pacova i da li je možda gubitak neurona posledica remećenja ovih procesa. Prvo smo ispitali da li perinatalna primena PCP-a ostvaruje dugoročni efekat (PN100) na ekspresiju ovog markera, s obzirom da je naša prethodna studija pokazala da fenciklidin kod pacova

starih 70 dana ostvaruje dugotrajni efekat koji se ogleda u redukciji glavnih klasa interneurona u mozgu pacova (Radonjić i sar., 2013). U ovoj studiji detektovali smo redukciju ekspresije NeuN u hipokampusu ovih životinja, što upućuje da je hipokampus region koji je osetljiviji na perinatalni tretman fenciklidinom i da se remećenje fizioloških procesa primenom ovog psihotomimetika održavaju dugo nakon tog tretmana a manifestuju se u vidu redukcije ekspresije proteinskog markera neuronskih ćelija, što može ukazivati i na smanjenje zastupljenosti ovih ćelija u mozgu. Haloperidol ostvaruje efekat samo u grupi perinatalno tretiranoj fenciklidinom (PCP-H grupa) i taj efekat je ograničen na korteks. Zanimljivo je da je druga grupa autora uočila povećanje volumena hipokampusa pacova nakon tretmana haloperidolom (Schmitt i sar., 2004). Međutim, ovaj tretman je trajao samo četiri nedelje i kada se tretman produži na osam nedelja ne uočavaju se promene volumena ove moždane strukture što je u saglasnosti sa kliničkim podacima (Vernon i sar., 2011; Arango i sar., 2003). S druge strane, klopazapin ostvaruje svoj efekat samo u hipokampusu i to nezavisno od perinatalnog tretmana kojem su životinje bile izložene. Zastupljenost NeuN proteina je dodatno ispitivana imunohistohemijski na moždanim presecima životinja iz svih eksperimentalnih grupa i dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima imunoblota. S obzirom da rezultati imunohistohemijskog bojenja ukazuju da je u hipokampusu zastupljenost NeuN povećana u grupama tretiranim haloperidolom u odnosu na PCP grupu nezavisno od perinatalnog tretmana, to ukazuje da haloperidol vrši supresiju redukcije ovog proteina indukovane perinatalnom primenom fenciklidina. Kako su uočeni efekti klopazapina statistički značajni samo u odnosu na kontrolnu grupu ali ne i na PCP grupu, to nam ne ukazuje da ima protektivno dejstvo u mozgu. Ono što je zanimljivo i definitivno zahteva dodatna ispitivanja je nalaz smanjenja ekspresije NeuN proteina nakon tretmana atipičnim antipsihotikom klopazapinom, koji se u terapiji smatra efikasnijim od bilo kog drugog antipsihotika. Međutim, ovaj rezultat možda i nije iznenađujući imajući na umu da je u prvoj animalnoj studiji koja se bavila dugoročnim efektima antipsihotika (medikacija životinja tokom dve i po godine) otkriveno da je atipični antipsihotik olanzapin sposoban da redukuje ukupnu težinu i volumen mozga primata (Konopaske i sar., 2008). Dosadašnje studije su mahom bile zasnovane na efektima hroničnog tretmana haloperidolom, ali su i one davale oprečne rezultate što je bilo objašnjeno razlikama u starosti životinja i dužini trajanja tretmana (Vernon i sar., 2011; Schmitt i

sar., 2004). Stoga je važno ispitati kakav je efekat hroničnog tretmana antipsihoticima obe klase na mozak pacova kada se primene drugačije doze leka ili je trajanje tretmana duže. Pored toga, neophodno je utvrditi da li antipsihotici ostvaruju efekat na pojedine klase interneurona, čija redukcija je dokumentovana u shizofreniji a koje nismo bili u mogućnosti da detektujemo primenom ovog markera, kao i to da li su promene ograničene na neke druge kortikalne i subkortikalne regione.

Kao što je već napomenuto, shizofreniju karakteriše uvećanje lateralnih ventrikula, za koje je utvrđeno da se, za razliku od promena u drugim regionima, dešava nezavisno od starosti i trajanja bolesti i da ima progresivni karakter (Kempton i sar., 2010). Stoga je pretpostavljeno da se javlja sekundarno, usled redukcije ili sakupljanja tkiva (Harrison, 1999). Dorph-Petersen i saradnici (2005) smatraju da se u osnovi ove promene nalazi smanjenje broja ili veličine različitih tipova neurona i glija ćelija. Pored toga, tretman atipičnim antipsihoticima doveden je u vezu sa uočenim proširenjem ventrikula (Crespo-Facorro i sar., 2008).

Naša studija pratila je dugoročni efekat perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju GFAP, markera astrocita. Poseban razlog je činjenica da iako su neke starije studije dokumentovale astrogliozu (Stevens, 1982), veliki broj dokaza povezuje shizofreniju sa redukcijom astrocita (Jarskog i sar., 2005; Rajkowska i sar., 2002). Astrociti imaju ključnu ulogu u centralnom nervnom sistemu. Ove ćelije kontrolišu ekstracelularnu homeostazu regulišući balans vode i elektrolita u ekstracelularnom prostoru, regulišu oslobađanje neurotransmitera, produkuju neurotrofne faktore, učestvuju u migraciji neurona tokom razvoja i kontrolišu formiranje sinapsi (De Keyser i sar., 2008; Erglou i Barres, 2010). Takođe, novije *post mortem* studije sugerišu da defekti mitohondrija dovode do poremećaja funkcije astrocita u shizofreniji (Kolomeets i Uranova, 2010). Analizom rezultata naše studije uočava se da PCP ostvaruje dugoročne efekte (PN100) na ekspresiju GFAP proteina smanjujući je u mozgu pacova, što je u skladu sa prethodnim kliničkim studijama (Cotter i sar., 2002; Rajkowska i sar., 2002; Stark i sar., 2004). Uočena redukcija ekspresije GFAP proteina u mozgu pacova potvrđena je i imunohistohemijским bojenjem. Moguće je da uočeno smanjenje zastupljenosti astrocita u mozgu pacova doprinosi smanjenju zastupljenosti neurona i doprinosi redukciji volumena mozga dokumentovanoj u SCH. Pored toga, utvrdili smo

da haloperidol ostvaruje efekte na ekspresiju markera astrocita, redukujući je u prefrontalnom korteksu, što je u skladu sa rezultatima studije sprovedene na primatima (Konopaske i sar., 2008). S druge strane, u hipokampusu haloperidol dovodi do povećanja ekspresije GFAP u poređenju sa PCP grupom, bez obzira da li su životinje perinatalno tretirane NaCl-om ili PCP-om. Ovo ukazuje da haloperidol u hipokampusu vrši reverziju redukcije ekspresije GFAP proteina indukovane perinatalnom primenom fencikidina. Interesantno je da efekti klopazina na ove ćelije izostaju u poređenju sa kontrolom nezavisno od perinatalnog tretmana kojem su životinje bile izložene. Međutim, u poređenju sa PCP grupom klopazin dovodi do povećanja ekspresije GFAP i u korteksu i u hipokampusu. Opservirani rezultati ukazuju na mogućnost da obe klase antipsihotika vrše reverziju promena ekspresije GFAP indukovane perinatalnom primenom fenciklidina, pri čemu je efekat klopazina intenzivniji i nije ograničen na jedan moždani region. Rezultati imunoblota su u korelaciji sa rezultatima imunohistohemijskog bojenja moždanih preseka. S obzirom da astrociti obezbeđuju neuronima nutritivnu i strukturnu podršku, kao i to da su ključni u formiranju sinapsi i sinaptičkoj plastičnosti (Barker i Ullian, 2010; De Keyser i sar., 2008), treba uzeti u obzir mogućnost da promene koje hronično izlaganje antipsihoticima indukuje astrocitima za posledicu mogu imati promenjenu zastupljenost neuronskih ćelija u mozgu ovih životinja, i obratno. Takođe, ovi rezultati upućuju na potrebu za dodatnim ispitivanjem potencijalnih poremećaja metabolizma astrocita u uslovima hroničnog tretmana antipsihoticima, s obzirom da je neosporno da hronični tretman antipsihoticima ostvaruje efekat na zastupljenost ovih ćelija u mozgu pacova.

Sve veći broj studija neurovizuelizacije, genetske i *post mortem* analize ukazuju na poremećaje u beloj masi kortikalnih i subkortikalnih regiona obolelih od SCH (Takahashi i sar., 2011; Uranova i sar., 2004, 2007; Bernstein i sar., 2009). Redukcija oligodendrocita i poremećaj mijelinizacije dovode se u vezu sa neurokognitivnim defektima zabeleženim u SCH (Roalf i sar., 2015; Fields, 2008). Korišćenjem različitih savremenih tehnika detektovano je smanjenje različitih komponenti mijelinskog omotača: mijelin-asociranog glikoproteina (MAG), mijelin baznog proteina (MBP) i 2',3'-ciklične nukleotid 3'-fosfodiesteraze (CNP) (Dracheva i sar., 2006; Aston i sar., 2004). Ovi rezultati ukazuju da se sam razvoj oligodendrocita ne remeti mnogo, ali da je proces mijelinizacije narušen. Otkriće da haloperidol uzrokuje redukciju strukturnih

proteina mijelinskog omotača i smanjenje broja oligodendrocita kod odraslih miševa (Martins-de-Souza i sar., 2009a, 2009b), dovelo je do spekulacija da je redukcija mijelinizacije uočena kod hroničnih pacijenata obolelih od shizofrenije posledica medikacije. Međutim, studije sprovedene na primatima nisu detektovale redukciju broja oligodendrocita nakon hronične primene antipsihotika haloperidola i olanzapina (Konopaske i sar., 2008). Praćenjem dugoročnih efekata perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju mijelin oligodendrocitnog glikoproteina (MOG) u mozgu pacova, uočili smo smanjenje ekspresije ovog proteina u korteksu, dok je u hipokampusu detektovano povećanje ekspresije ovog proteina, što ukazuje na postojanje region-specifičnih promena ove komponente mijelinskog omotača. Smanjenje ekspresije MOG proteina utvrdili su Lindahl i saradnici (2008) nakon intrauterine primene PCP-a i uočili da dolazi do usporavanja diferencijacije oligodendrocita u prefrontalnom korteksu, upućujući na gubitak oligodendrocita u kasnijem periodu, što je u skladu sa rezultatima naše studije u ovoj moždanoj strukturi. S obzirom na detektovanu redukciju ekspresije NeuN proteina u hipokampusu pacova starih 100 dana i uočene redukcije interneurona u ovoj strukturi (Radonjić i sar., 2013), moguće je da je uočeno povećanje ekspresije MOG proteina, koji je u direktnoj vezi sa mijelinizacijom, u ovoj strukturi kompenzatorna promena, tj. tendencija da se održi konektivnost među ćelijama i što adekvatniji prenos signala. Što se tiče efekata medikacije na mijelinizaciju, naša studija je utvrdila da hronični tretman tipičnim i atipičnim antipsihoticima menja ekspresiju ovog proteina. Naime, i haloperidol i klopazapin povećavaju ekspresiju MOG proteina u obe ispitivane moždane strukture nezavisno od perinatalnog tretmana kom su životinje bile podvrgnute i u poređenju sa kontrolom i u poređenju sa PCP grupom. U korteksu primena antipsihotika vrši reverziju promene ekspresije MOG proteina indukovane primenom PCP-a, dok u hipokampusu ovi lekovi pokazuju težnju da vrate ekspresiju na kontrolni nivo iako ona ostaje i dalje statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Dobijeni rezultati takođe upućuju da tretman antipsihoticima najverovatnije ne stoji iza redukovane mijelinizacije uočene u *post mortem* studijama. Jedno od objašnjenja je mogućnost da su promene mijelinizacije uočene *post mortem* povezane sa starošću pacijenata (Hof i sar., 2003).

U CNS-u prisutan je još jedan tip glija ćelija – ćelije mikroglije. Ove ćelije su uključene u imunski odgovor u mozgu i njihova uloga u etiologiji shizofrenije je tema

debata već skoro dve decenije (Bernstein i sar., 2009). Jedan od razloga je činjenica da su prenatalne infekcije majke često povezane sa nastankom shizofrenije kod potomaka (Brown i Derkits, 2010). Tokom razvoja mozga ćelije mikroglije imaju ulogu u uspostavljanju sinapsi (Schafer i sar., 2012), kao i fagocitozi neurona tokom neurorazvoja (Mallat i sar., 2005). Mikroglijalne ćelije su prva linija odbrane u inflamatornom odgovoru mozga na infekciju ili povredu (Venneti i sar., 2006). Za ovaj postupak je karakteristična promena fenotipa ćelija mikroglije iz mirujućeg stanja u aktivirano stanje sa promenom morfologije u ameboidiniji oblik, praćeno migracijom do mesta povrede i oslobađanjem citokina (Kettenmann i sar., 2013). Iako su prve *post mortem* studije dokumentovale povećanu zastupljenost ćelija mikroglije u korteksu i hipokampusu pacijenata obolelih od SCH (Bayer i sar., 1999; Radewicz i sar., 2000; Busse i sar., 2012), rezultati narednih studija su bili ili oprečni (Kurumaji i sar., 1997) ili promena nije detektovana (Arnold i sar., 1998; Falke i sar., 2000; Wierzba-Bobrowicz i sar., 2005). Pored toga, sprovedjeni su i *in vivo* eksperimenti koji su takođe davali kontradiktorne rezultate i jedno od objašnjenja ovih odstupanja bilo je prisustvo ili odsustvo medikamenata kod ispitanika (Cotel i sar., 2015). Međutim, uticaj hroničnog tretmana antipsihoticima na mikrogliju još uvek nije precizno definisan. Iako postoje dokazi da antipsihotici mogu posedovati neke antiinflamatorne karakteristike, ovi podaci su najčešće bazirani na rezultatima *in vitro* studija ili studija u kojima se aplikuje neklinička doza antipsihotika (Kato i sar., 2011; Zhu i sar., 2014). Naša studija nije detektovala promenu ekspresije Iba 1 proteina, markera mikroglije, ni u grupi perinatalno tretiranoj PCP-om ni u grupama tretiranim antipsihoticima. Ovaj rezultat nam posredno potvrđuje da se proces ćelijske smrti u mozgu odvija procesom apoptoze ili autofagije jer nepromenjena ekspresija Iba 1 proteina ukazuje da nema zapaljenskog odgovora koji je karakterističan za proces nekroze. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima imunohistohemijskog bojenja moždanih preseka kortikalnih i hipokampalnih regiona. Ono što je ipak zanimljivo napomenuti je da se imunohistohemijski uočavaju promene morfologije ćelija mikroglije u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na ćelije kontrolne grupe, iako nismo uočili promene ekspresije u tim grupama. Naime, rezgranatost se smanjuje i ćelije zadobijaju ameboidniji izgled karakterističan za aktiviranu mikrogliju, što ukazuje da možda ipak postoje neke fine promene koje nismo detektovali tehnikom *Western blot* i koje je

neophodno dodatno ispitati. Slični rezultati koji ukazuju da primena antipsihotika menja morfologiju ćelija mikroglije dobijeni su u studiji sprovedenoj su na odraslim pacovima tretiranim antipsihoticima (Cotel i sar., 2015). Iako se u studiji Cotel i saradnika radi o pacovima koji nisu tretirani nekim antagonistom NMDA receptora i samim tim ne modeluju animalni model shizofrenije, rezultati ukazuju na mogućnost da kod pacijenata obolelih od shizofrenije tretman antipsihoticima pogoršava postojeće inflamatorne promene. Stoga je neophodno na animalnom modelu ispitati ovu pretpostavku.

Izazov za nova istraživanja jesu i biće nedoumice koje prate kompleksnu etiopatologiju shizofrenije. U ovom radu pokazali smo da perinatalna primena fenciklidina ostvaruje kako neposredne tako i dugoročne efekte na mitohondrijalnu strukturu i funkciju. Kao rezultat tih promena dolazi do poremećaja odvijanja procesa apoptoze i autofagije i remećenja ćelijske homeostaze, što se ogleda u detektovanim ultrastrukturnim promenama koje prate ove procese. Vrlo je verovatno da su oba procesa uključena u patofiziologiju shizofrenije. Takođe, ova studija je pokazala da hronični tretman antipsihoticima obe klase remeti zastupljenost glavnih klasa ćelija centralnog nervnog sistema. U tom smislu, naši rezultati su pokušaj da se načini još jedan pomak i podsticaj u rasvetljavanju mehanizama koji stoje u osnovi ovog teškog psihijatrijskog oboljenja, kao i sagledavanja uzgrednih efekata dugotrajne primene antipsihotika.

6. ZAKLJUČCI

1. Perinatalna administracija fenciklidina neposredno (PN13) remeti funkcionisanje mitohondrijalnog metabolizma što se ogleda u povećanju aktivnosti kompleksa I i citohrom c oksidaze u korteksu i hipokampusu mozga pacova.
2. Perinatalna administracija fenciklidina neposredno (PN13) indukuje proces apoptoze povećavajući ekspresiju kaspaze 3 u mozgu pacova, što potvrđuju i uočene ultrastrukturalne promene karakteristične za ovaj proces.
3. Perinatalna administracija fenciklidina ostvaruje neposredne efekte (PN13) na odvijanje procesa autofagije u mozgu pacova u smeru inhibicije, što se ogleda u povećanju ekspresije p62 proteina u korteksu pacova.
4. Dugotrajni efekti (PN70) perinatalne administracije fenciklidina na respiratorni lanac ogledaju se u promeni aktivnosti citohrom c oksidaze u mozgu pacova u vidu smanjenja aktivnosti ovog enzima u korteksu i povećanja aktivnosti u hipokampusu u poređenju sa kontrolnim životinjama. U narednom vremenskom preseku (PN100) dugoročni efekti perinatalne primene fenciklidina na aktivnost enzima respiratornog lanca se više ne uočavaju.
5. Perinatalna primena fenciklidina ostvaruje dugotrajne efekte (PN70 i PN100) na proces apoptoze u smeru indukcije povećavajući ekspresiju egzekutorske kaspaze 3 i faktora indukcije apoptoze u obe ispitivane strukture mozga pacova.
6. Perinatalna primena fenciklidina ispoljava dugotrajno dejstvo na proces autofagije u PN70. U ovom vremenskom preseku se zapažaju promene ekspresije proteinskih markera autofagije koje ukazuju na intenziviranje ovog procesa. Ultrastrukturalne promene uočene u mozgu ovih životinja su u skladu sa zapaženim promenama ekspresije. Stotog postnatalnog dana više se ne uočavaju dugotrajni efekti perinatalne primene fenciklidina na ekspresiju markera autofagije ni u korteksu ni u hipokampusu.

7. Primena haloperidola i klopazina tokom devet nedelja (PN100) remeti mitohondrijalni metabolizam smanjujući aktivnost citohrom c oksidaze, terminalnog enzima respiratornog lanca u u obe ispitivane strukture mozga pacova.
8. Primena haloperidola smanjuje ekspresiju kaspaze 3 i AIF markera, što ukazuje na inhibiciju procesa apoptoze u obe ispitivane strukture mozga pacova. Primena klopazina povećava ekspresiju oba ispitivana markera apoptoze u korteksu ukazujući na intenziviran i kaspaza zavisni i kaspaza nezavisni put apoptoze u ovoj strukturi.
9. Hronična primena haloperidola ne utiče na proces autofagije u ispitivanim strukturama mozga pacova bez obzira na perinatalni tretman, dok primena klopazina izaziva smanjenje ekspresije Beklina 1 u korteksu i hipokampusu ukazujući na suprimiranje početnih koraka procesa autofagije.
10. Ultrastrukturnom analizom mozgova pacova tretiranih antipsihoticima (PN100) potvrđeno je prisustvo mitohondrijalne disfunkcije i promene karakteristične za procese apoptoze i autofagije.
11. Perinatalna primena fenciklidina (PN100) i tretman klopazinom redukuju zastupljenost neurona u hipokampusu. Rezultati imunohistohemijskog bojenja ukazuju da haloperidol suprimira promene ekspresije NeuN indukovane perinatalnom primenom PCP-a u hipokampusu.
12. Zastupljenost astrocita je u PN100 smanjena u obe ispitivane strukture mozga pacova perinatalno tretiranih PCP-om, kao i u korteksu pacova tretiranih haloperidolom. Klopazin vrši reverziju redukcije ekspresije GFAP indukovane primenom PCP-a.
13. Perinatalna primena fenciklidina (PN100) smanjuje ekspresiju MOG proteina u korteksu a povećava u hipokampusu eksperimentalnih životinja. Tretman antipsihoticima obe klase vrši reverziju redukcije MOG u korteksu pacova, dok

u hipokampusu antipsihotici pokazuju težnju da suprimiraju povećanje ekspresije ovog proteina izazvano primenom PCP-a.

14. Analizom ekspresije Iba 1 proteina, markera mikroglije, kao i imunohistohemijском analizom zastupljenosti ovih ćelija nisu detektovane promene u mozgu pacova u poređenju sa kontrolnim jedinkama. Imunohistohemijско ispitivanje, međutim, ukazuje da tretman antipsihoticima indukuje morfološke promene ćelija mikroglije karakteristične za njihovu aktivaciju.

15. Perinatalna administracija fenciklidina i hronični tretman antipsihoticima indukuju strukturne i funkcionalne promene mitohondrija, remete odvijanje procesa apoptoze i autofagije i utiču na zastupljenost ćelija centralnog nervnog sistema. Iako je zapaženo da obe klase antipsihotika ostvaruju efekte na pomenute procese u obe ispitivane strukture mozga pacova, neželjeni efekti klozapina su izraženiji. Bolje razumevanje prirode promena uzrokovanih primenom fenciklidina i antipsihotika doprinosi rasvetljavanju patofiziologije shizofrenije i razvoju novih terapijskih strategija za lečenje ovog kompleksnog oboljenja.

7. LITERATURA

1. Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W., 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 9 (2), 423-432.
2. Agostinho, F.R., Jornada, L.K., Schröder, N., Roesler, R., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., 2007. Effects of chronic haloperidol and/or clozapine on oxidative stress parameters in rat brain. *Neurochem Res*. 32 (8), 1343-1350.
3. Ahmed, M., Cannon, D.M., Scanlon, C., Holleran, L., Schmidt, H., McFarland, J., Langan, C., McCarthy, P., Barker, G.J., Hallahan, B., McDonald, C., 2015. Progressive brain atrophy and cortical thinning in schizophrenia after commencing clozapine treatment. *Neuropsychopharmacology* 40 (10), 2409–2417.
4. Albus, M., Hubmann, W., Mohr, F., Hecht, S., Hinterberger-Weber, P., Seitz, N.N., Küchenhoff, H., 2006. Neurocognitive functioning in patients with first-episode schizophrenia: results of a prospective 5-year follow-up study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 256 (7), 442-451.
5. Altunkaynak, B.Z., Ozbek, E., Unal, B., Aydin, N., Aydin, M.D., Vuraler, O., 2012. Chronic treatment of haloperidol induces pathological changes in striatal neurons of guinea pigs: a light and electron microscopical study. *Drug Chem Toxicol*. 35 (4), 406-411.
6. Alvir, J.M., Liebermman, J.A., Safferman, A.Z., Schwimmer, J.L., Schaaf, J.A., 1993. Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. *N Engl J Med*. 329, 162-167.
7. Anastasio, N.C., Xia, Y., O'Connor, Z.R., Johnson, K.M., 2009. Differential role of N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in mediating phencyclidine-induced perinatal neuronal apoptosis and behavioral deficits. *Neuroscience* 163 (4), 1181–1191.
8. Andersen, J.D., Pouzet, B., 2004. Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine. *Neuropsychopharmacology* 29 (6), 1080–1090.

9. Andreasen, N.C., Carpenter, W.T. Jr, Kane, J.M., Lasser, R.A., Marder, S.R., Weinberger, D.R., 2005. Remission in schizophrenia: proposed criteria and rationale for consensus. *Am J Psychiatry* 162 (3), 441-449.
10. Apostolova, N., Cervera, A.M., Victor, V.M., Cadenas, S., Sanjuan-Pla, A., Alvarez-Barrientos, A., Esplugues, J.V., McCreath, K.J., 2006. Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. *Cell Death Differ.* 13, 354–357.
11. Arango, C., Breier, A., McMahon R., Carpenter, W.T.Jr, Buchanan, R.W., 2003. The relationship of clozapine and haloperidol treatment response to prefrontal, hippocampal, and caudate brain volumes. *Am J Psychiatry* 160, 1421–1427.
12. Arif, M., Chikuma, T., Ahmed, M.M., Yoshida, S., Kato, T., 2007. Suppressive effect of clozapine but not haloperidol on the increases of neuropeptide-degrading enzymes and glial cells in MK-801-treated rat brain regions. *Neurosci Res.* 57 (2), 248-258.
13. Arnold, S.E., Trojanowski, J.Q., Gur, R.E., Blackwell, P., Han, L.Y., Choi, C., 1998. Absence of neurodegeneration and neural injury in the cerebral cortex in a sample of elderly patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 225–232.
14. Artus, C., Boujrad, H., Bouharrou, A., Brunelle, M.N., Hoos, S., Yuste, V.J., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Namane, A., England, P., Lorenzo, H.K., Susin, S.A., 2010. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J.* 29, 1585–1599.
15. Arvanov, V.L., Liang, X., Schwartz, J., Grossman, S., Wang, R.Y., 1997. Clozapine and haloperidol modulate N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 226–234.
16. Arvanov, V.L., Wang, R.Y., 1999. Clozapine, but not haloperidol, prevents the functional hyperactivity of N-methyl-D-aspartate receptors in rat cortical neurons induced by subchronic administration of phencyclidine. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 1000–1006.
17. Asarnow, R., Potkin, S., Guich, S., 1990. Glucose metabolic rate in normals and schizophrenics during the continuous performance test assessed by positron emission topography. *Br J Psychiatry* 156, 217–227.

18. Aston, C., Jiang, L., Sokolov, B.P., 2004. Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J Neurosci Res* 77 (6), 858-866.
19. Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N.T., 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 182, 685-701.
20. Barch, D.M., Ceaser, A., 2012. Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms. *Trends Cogn Sci.* 16 (1), 27-34.
21. Barker, A.J., Ullian, E.M., 2010. Astrocytes and synaptic plasticity. *Neuroscientist* 16, 40-50.
22. Bayer, T.A., Buslei, R., Havas, L., Falkai, P., 1999. Evidence for activation of microglia in patients with psychiatric illnesses. *Neurosci. Lett.* 271, 126–128.
23. Benes, F.M., 1991. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry* 48, 996-1001.
24. Ben-Shachar, D., 2002. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J Neurochem.* 83 (6), 1241-1251.
25. Ben-Shachar, D., Bonne, O., Chisin, R., Klein, E., Lester, H., Aharon-Peretz, J., Yona, I., Freedman, N., 2007. Cerebral glucose utilization and platelet mitochondrial complex I activity in schizophrenia: A FDG-PET study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31 (4), 807-813.
26. Bernstein, H.G., Steiner, J., Bogerts, B., 2009. Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert Rev Neurother.* 9 (7), 1059-1071.
27. Bernstein, H.G., Steiner, J., Guest, P.C., Dobrowolny, H., Bogerts, B., 2015. Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy. *Schizophr Res* 161 (1), 4-18.
28. Bezchlibnyk-Butler, K.Z., Jeffries, J.J., 1999. *Clinical Handbook of Psychotropic Drugs.* Hogrefe & Huber Publishers, Toronto.
29. Bjřrkřy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Rřvervatn, A., Stenmark, H., Johansen, T., 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded

- by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 171, 603–614.
30. Boekema, E.J., Braun, H.P., 2007. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem.* 282 (1), 1-4.
 31. Bogerts, B., 1999. The neuropathology of schizophrenic diseases: historical aspects and present knowledge. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 4, 2-11.
 32. Bogerts, B., Lieberman, J.A., Ashtari, M., Bilder, R.M., Degreef, G., Lerner, G., Johns, C., Masiar, S., 1993. Hippocampus-amygdala volumes and psychopathology in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 33, 236-246.
 33. Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
 34. Brisch, R., Saniotis, A., Wolf, R., Bielau, H., Bernstein, H.G., Steiner, J., Bogerts, B., Braun, A.K., Jankowski, Z., Kumaritlake, J., Henneberg, M., Gos, T., 2014. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Front. Psychiatry* 19 (5), 47.
 35. Brooks, W.J., Weeks, A.C., Leboutillier, J.C., Petit, T.L., 1997. Altered NMDA sensitivity and learning following chronic developmental NMDA antagonism. *Physiol. Behav.* 62, 955-962.
 36. Brown, A.S., Derkits, E.J., 2010. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry* 167 (3), 261-280.
 37. Burkhardt, C., Kelly, J.P., Lim, Y.H., Filley, C.M., Parker, W.D., 1993. Neuroleptic medications inhibit complex I of the electron transport chain. *Ann. Neurol.* 33, 512-517.
 38. Busse, S., Busse, M., Schiltz, K., Bielau, H., Gos, T., Brisch, R., Mawrin, C., Schmitt, A., Jordan, W., Muller, U.J., Bernstein, H. G., Bogerts, B., Steiner, J., 2012. Different distribution patterns of lymphocytes and microglia in the hippocampus of patients with residual versus paranoid schizophrenia: further evidence for disease course-related immune alterations? *Brain Behav. Immun.* 26, 1273–1279.

39. Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P., Kroemer, G., 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci.* 115 (Pt 24), 4727-4734.
40. Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C., Kroemer, G., 2004. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* 11 (6), 591-595.
41. Cannon, T.D., Thompson, P.M., van Erp, T.G., Toga, A.W., Poutanen, V.P., Huttunen, M., Lonnqvist, J., Standerskjold-Nordenstam, C.G., Narr, K.L., Khaledy, M., Zoumalan, C.I., Dail, R., Kaprio, J., 2002. Cortex mapping reveals regionally specific patterns of genetic and disease-specific gray-matter deficits in twins discordant for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 99 (5), 3228-3233.
42. Cannon, T.D., van Erp, T.G., Huttunen, M., Lonnqvist, J., Salonen, O., Valanne, L., Poutanen, V.P., Standerskjold-Nordenstam, C.G., Gur, R.E., Yan, M., 1998. Regional gray matter, white matter, and cerebrospinal fluid distributions in schizophrenic patients, their siblings, and controls. *Arch Gen Psychiatry* 55, 1084–1091.
43. Cao, Y., Klionsky, D.J., 2007. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res.* 17, 839–849.
44. Cao, G., Xing, J., Xiao, X., Liou, A.K., Gao, Y., Yin, X.M., Clark, R.S., Graham, S.H., Chen, J., 2007. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J Neurosci.* 27, 9278–9293.
45. Carlsson, A., 1995. The dopamine theory revisited. U: Hirsch, S.R., Weinberger, D.R. (eds) *Schizophrenia*. Belckwell Science Ltd., Oxford, str. 379-400.
46. Carpenter, W.T. Jr, Kirkpatrick, B., 1988. The heterogeneity of the long term course of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 14, 645-652.
47. Carpenter, W.T., Koenig, J.I., 2008. The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. *Neuropsychopharmacology* 33, 2061–2079.
48. Casademont, J., Garrabou, G., Miró, O., López, S., Pons, A., Bernardo, M., Cardellach, F., 2007. Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol.* 27 (3), 284-288.

49. Cavelier, L., Jazin, E.E., Eriksson, I., Prince, J., Bave, U., Orelund, L., Gyllensten, U., 1995. Decreased cytochrome-c oxidase activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics. *Genomics* 29, 217–224.
50. Chen, G.M., Weston, J.K., 1960. The Analgesic and Anesthetic Effects of 1-(1-Phenylcyclohexyl)-Piperidine HCl on Monkey. *Anesthesia and Analgesia* 39, 132-137.
51. Cheng, A., Hou, Y., Mattson, M.P., 2010. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN. Neuro.* 2 (5), e00045.
52. Cheung, E.C., Melanson-Drapeau, L., Cregan, S.P., Vanderluit, J.L., Ferguson, K.L., McIntosh, W.C., Park, D.S., Bennett, S.A., Slack, R.S., 2005. Apoptosis inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX dependent and BAX-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 25, 1324–1334.
53. Christensen, J., Holcomb, J., Garver, D.L., 2004. State-related changes in cerebral white matter may underlie psychosis exacerbation. *Psychiatry Res* 130, 71-78.
54. Churbanova, I.Y., Sevrioukova, I.F., 2008. Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.* 283, 5622–5631.
55. Clancy, B., Darlington, R.B., Finlay, B.L., 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105, 7-17.
56. Clay, H.B., Sullivan, S., Konradi, C., 2011. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci.* 29 (3), 311-324.
57. Cohen, R.M., Semple, W.E., Gross, M., Nordahl, T.E., Holcomb, H.H., Dowling, S., Pickar, D., 1988. The effects of neuroleptics on dysfunction in a prefrontal substrate of sustained attention in schizophrenia. *Life Sci.* 43, 1138–1150.
58. Contreras-Shannon, V., Heart, D.L., Paredes, R.M., Navaira, E., Catano, G., Maffi, S.K., Walss-Bass, C., 2013. Clozapine-induced mitochondria alterations and inflammation in brain and insulin-responsive cells. *PLoS One* 8 (3), e59012.
59. Cotel, M.C., Lenartowicz, E.M., Natesan, S., Modo, M.M., Cooper, J.D., Williams, S.C., Kapur, S., Vernon, A.C., 2015. Microglial activation in the rat brain following

- chronic antipsychotic treatment at clinically relevant doses. *Eur Neuropsychopharmacol.* 25 (11), 2098-2107.
60. Cotter, D., Mackay, D., Chana, G., Beasley, C., Landau, S., Everall, I.P., 2002. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb. Cortex* 12, 386–394.
61. Coyle, J.T., Tsai, G., Goff, D., 2003. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann NY Acad Sci.* 1003, 318-327.
62. Crespo-Facorro, B., Pérez-Iglesias, R., González-Blanch, C., Mata, I., 2008. Treatment of the first episode of schizophrenia: an update on pharmacologic and psychological interventions. *Curr Psychiatry Rep.* 10 (3), 202-209.
63. Crow, T.J., 1980. Molecular pathology of schizophrenia: More than one disease process? *Br Med J* 280, 66-68.
64. Crow, T.J., Ball, J., Bloom, S.R., Brown, R., Bruton, C.J., Colter, N., Frith, C.D., Johnstone, E.C., Owens, D.G., Roberts, G.W., 1989. Schizophrenia as an anomaly of development of cerebral asymmetry: A postmortem study and a proposal concerning the genetic basis of the disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 1145-1150.
65. Davidson, M., Galderisi, S., Weiser, M., Werbeloff, N., Fleischhacker, W.W., Keefe, R.S., Boter, H., Keet, I.P., Prelipceanu, D., Rybakowski, J.K., Libiger, J., Hummer, M., Dollfus, S., López-Ibor, J.J., Hranov, L.G., Gaebel, W., Peuskens, J., Lindfors, N., Riecher-Rössler, A., Kahn, R.S., 2009. Cognitive effects of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: a randomized, open-label clinical trial (EUFEST). *Am. J. Psychiatry* 166, 675–682.
66. Davis, J.M., Chen, N., Glick, I.D., 2003. A meta-analysis of the efficacy of second-generation antipsychotics. *Arch Gen Psychiatry* 60, 553–564.
67. Debnath, J., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2005. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1, 66–74.
68. De Keyser, J., Mostert, J.P., Koch, M.W., 2008. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J. Neurol. Sci.* 267, 3-16.

69. de Oliveira, L., Fraga, D.B., De Luca, R.D., Canever, L., Ghedim, F.V., Matos, M.P., Streck, E.L., Quevedo, J., Zugno, A.I., 2011. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab. Brain Dis.* 26 (1), 69–77.
70. Depoortere, R., Dargazanli, G., Estenne-Bouhtou, G., Coste, A., Lanneau, C., Desvignes, C., Poncelet, M., Heaulme, M., Santucci, V., Decobert, M., Cudennec, A., Voltz, C., Boulay, D., Terranova, J.P., Stemmelin, J., Roger, P., Marabout, B., Sevrin, M., Vigé, X., Biton, B., Steinberg, R., Françon, D., Alonso, R., Avenet, P., Oury-Donat, F., Perrault, G., Griebel, G., George, P., Soubrié, P., Scatton, B., 2005. Neurochemical, electrophysiological and pharmacological profiles of the selective inhibitor of the glycine transporter-1 SSR504734, a potential new type of antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 30 (11), 1963–1985.
71. Deutsch, S.I., Rosse, R.B., Schwartz, B.L., Mastropaolo, J., 2001. A revised excitotoxic hypothesis of schizophrenia: therapeutic implications. *Clin. Neuropharmacol.* 24, 43–49.
72. Dikranian, K., Ishimaru, M.J., Tenkova, T., Labruyere, J., Qin, Y.Q., Ikonomidou, C., Olney, J.W., 2001. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiology of Disease* 8, 359-379.
73. Do, K.Q., Cabungcal, J.H., Frank, A., Steullet, P., Cuenod, M., 2009. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 220–230.
74. Dobbing, J., Sands, J., 1979. The brain growth spurt in various mammalian species. *Early Hum. Dev.* 3, 70–84.
75. Dorph-Petersen, K.A., Pierri, J.N., Perel, J.M., Sun, Z., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2005. The influence of chronic exposure to antipsychotic medications on brain size before and after tissue fixation: a comparison of haloperidol and olanzapine in macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology* 30 (9), 1649–1661.
76. Dracheva, S., Davis, K.L., Chin, B., Woo, D.A., Schmeidler, J., Haroutunian, V., 2006. Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizyphrenia patients. *Neurobiol Dis* 21 (3), 3-16.

77. Dracheva, S., Marras, S.A., Elhakem, S.L., Kramer, F.R., Davis, K.L., Haroutunian, V., 2001. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizyphrenia. *Am. J. Psychiatry* 158, 1400-1410.
78. Dror, N., Karry, R., Mazor, M., Kirsh, Z., Mazor, M., Tzukerman, M., Ben-Shachar, D., 2002. State dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7, 995–1001.
79. Dwyer, D.S., Lu, X.H., Bradley, R.J., 2003. Cytotoxicity of conventional and atypical antipsychotic drugs in relation to glucose metabolism. *Brain Res.* 971 (1), 31-39.
80. Egerton, A., Reid, L., McKerchar, C.E., Morris, B.J., Pratt, J.A., 2005. Impairment in perceptual attentional set-shifting following PCP administration: a rodent model of set-shifting deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 179 (1), 77-84.
81. Ellison-Wright, I., Glahn, D.C., Laird, A.R., Thelen, S.M., Bullmore, E., 2008. The anatomy of first-episode and chronic schizophrenia: an anatomical likelihood estimation meta-analysis. *Am J Psychiatry.* 165 (8), 1015-1023.
82. Emamian, E.S., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., 2004. Decreased phosphorylation of NMDA receptor type 1 at serine 897 in brains of patients with Schizophrenia. *J Neurosci.* 24 (7), 1561-1564.
83. Erglou, C., Barres, B.A., 2010. Regulation od synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223-231.
84. Fadeel, B., Orrenius, S., 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258, 479–517.
85. Faizi, M., Salami, A., Rasoulzadeh, M., Naserzadeh, P., Pourahmad, J., 2014. Schizophrenia induces oxidative stress and cytochrome c release in isolated rat brain mitochondria: a possible pathway for induction of apoptosis and neurodegeneration. *Iran J. Pharm. Res.* 13, 93–100.
86. Falkai, P., Bogerts, B., Rozumek M., 1988. Limbic pathology in schizophrenia: the entorhinal region – a morphometric study. *Biol. Psychiatry* 24, 515-521.
87. Falkai, P., Honer, W.G., Kamer, T., Dustert, S., Vogeley, K., Schneider-Axmann, T., Dani, I., Wagner, M., Rietschel, M., Müller, D.J., Schulze, T.G., Gaebel, W., Cordes, J., Schönell, H., Schild, H.H., Block, W., Träber, F., Steinmetz, H., Maier,

- W., Tepest, R., 2007. Disturbed frontal gyrification within families affected with schizophrenia. *J Psychiatry Res.* 41(10), 805-813.
88. Falke, E., Han, L.Y., Arnold, S.E., 2000. Absence of neurodegeneration in the thalamus and caudate of elderly patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 93 (2), 103-110.
89. Fattal, O., Budur, K., Vaughan, A.J., Franco, K., 2006. Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases. *Psychosomatics* 47 (1), 1-7.
90. Fields, R.D., 2008. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci.* 31 (7), 361-370.
91. Frankle, G.W., Lerma, J., Laruelle, M., 2003. The Synaptic Hypothesis of Schizophrenia. *Neuron* 39, 205-216.
92. Fusar-Poli, P., Smieskova, R., Kempton, M.J., Ho, B.C., Andreasen, N.C., Borgwardt, S., 2013. Progressive brain changes in schizophrenia related to antipsychotic treatment? A meta-analysis of longitudinal MRI studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 37 (8), 1680-1691.
93. Gaebel, W., 1997. Towards the improvement of compliance: the significance of psycho-education and new antipsychotic drugs. *Int Clin Psychopharmacol* 12(Suppl 1), S37-S42.
94. Galili, R., Gil-Ad, I., Weizman, A., Melamed, E., Offen, D., 2000. Haloperidol-induced neurotoxicity—possible implications for tardive dyskinesia. *J. Neural. Transm.* 107, 479–490.
95. Gardoni, F., Frasca, A., Zianni, E., Riva, M.A., Di Luca, M., Fumagalli, F., 2008. Repeated treatment with haloperidol, but not olanzapine, alters synaptic NMDA receptor composition in rat striatum. *European Neuropsychopharmacology* 18, 531–534.
96. Garey, L., 2010. When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J Anat* 217 (4), 324–333.
97. Gassó, P., Mas, S., Molina, O., Bernardo, M., Lafuente, A., Parellada, E., 2012. Neurotoxic/neuroprotective activity of haloperidol, risperidone and paliperidone in neuroblastoma cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 36(1), 71-77.

98. Geddes, J., Freemantle, N., Harrison, P., Bebbington, P., 2000. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: systematic overview and meta-regression analysis. *BMJ* 321, 1371–1376.
99. Geng, J., Nair, U., Yasumura-Yorimitsu, K., Klionsky, D.J., 2010. Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 21, 2257-2269.
100. Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S.R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani, H.H., Hashemi, M., Owji, A.A., Łos, M.J., 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 112, 24-49.
101. Gil-ad, I., Shtaf, B., Shiloh, R., Weizman, A., 2001. Evaluation of the neurotoxic activity of typical and atypical neuroleptics: relevance to iatrogenic extrapyramidal symptoms. *Cell. Mol. Neurobiol.* 21, 705–716.
102. Glantz, L.A., Gilmore, J.H., Lieberman, J.A., Jarskog, L.F., 2006. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 81, 47–63.
103. Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.
104. Gobira, P.H., Ropke, J., Aguiar, D.C., Crippa, J.A., Moreira, F.A., 2013. Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. *Rev Bras Psiquiatr.* 35 Suppl 2, S132-139.
105. Goldman-Rakić, P.S., 1994. Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 6, 348-357.
106. Guerrini, L., Blasi, F., Denis-Donini, S., 1995. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9077-9081.
107. Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., Lippincott-Schwartz, J., 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656-667.
108. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N.,

2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.
109. Haroutunian, V., Katsel, P., Dracheva, S., Stewart, D.G., Davis, K.L., 2007. Variations in oligodendrocyte-related gene expression across multiple cortical regions: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 10 (4), 565-573.
110. Harrison, P.J., 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (4), 593-624.
111. Heckers, S., 2001. Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus* 11, 520-528.
112. Hess, H.H., Pope, A., 1953. Ultramicrospectrophotometric determination of cytochrome oxidase for quantitative histochemistry. *J Biol Chem.* 204, 295-306.
113. Ho, B.C., Andreasen, N.C., Nopoulos, P., Arndt, S., Magnotta, V., Flaum, M., 2003. Progressive structural brain abnormalities and their relationship to clinical outcome: a longitudinal magnetic resonance imaging study early in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 585-594.
114. Ho, B.C., Andreasen, N.C., Ziebell, S., Pierson, R., Magnotta, V., 2011. Long-term antipsychotic treatment and brain volumes: a longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 68 (2), 128-137.
115. Hof, P.R., Haroutunian, V., Friedrich Jr., V.L., Byne, W., Buitron, C., Perl, D.P., Davis, K.L., 2003. Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 53, 1075– 1085.
116. Husa, A.P., Rannikko, I., Moilanen, J., Haapea, M., Murray, G.K., Barnett, J., Jones, P.B., Isohanni, M., Koponen, H., Miettunen, J., Jääskeläinen, E., 2014. Lifetime use of antipsychotic medication and its relation to change of verbal learning and memory in midlife schizophrenia - An observational 9-year follow-up study. *Schizophr Res.* 158 (1-3), 134-141.
117. Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dirkanian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W., 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283, 70–74.

118. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Prince, M.T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T.I., Dirkanian, K., Olney, J.W., 2000. Ethanolinduced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.
119. Ishimura, R., Martin, G.R., Ackerman, S.L., 2008. Loss of apoptosis-inducing factor results in cell-type-specific neurogenesis defects. *J Neurosci* 28, 4938–4948.
120. Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T., Stoltenberg-Hogenkamp, B.J., Rodenburg, R.J., 2007. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem* 53, 729-734.
121. Jarskog, L.F., Gilmore, J.H., Glantz, L.A., Gable, K.L., German, T.T., Tong, R.I., Lieberman, J.A., 2007. Caspase-3 activation in rat frontal cortex following treatment with typical and atypical antipsychotics. *Neuropsychopharmacology* 32 (1), 95-102.
122. Jarskog, L.F., Selinger, E.S., Lieberman, J.A., Gilmore, J.H., 2004. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *Am. J. Psychiatry* 161, 109–115.
123. Jarskog, L.F., Glantz, L.A., Gilmore, J.H., Lieberman, J.A., 2005. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 846–858.
124. Javitt, D.C., 1987. Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J. Clin. Psychiatry* 9, 12-35.
125. Javitt, D.C., Zukin, S.R., 1991. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148, 1301-1308.
126. Jentsch, J.D., Roth, R.H., 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20, 201-225.
127. Jevtović-Todorović, V., Hartman, R.E., Izumi, Y., Benshoff, N.D., Dirkanian, K., Zorumski, C.F., Olney, J.W., Wozniak, D.F., 2003. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J. Neurosci.* 23, 876–882.

128. John, J.P., 2009. Fronto-temporal dysfunction in schizophrenia: A selective review. *Indian J Psychiatry* 51(3), 180-190.
129. Johnson, J.W., Archer, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529-531.
130. Johnstone, E.C., Crow, T.J., Frith, C.D., Husband, J., Kreel, L., 1976. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 2 (7992), 924-926.
131. Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A., Rodenburg, R.J., 2012. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 35 (2), 211-225.
132. Jones, C.A., Watson, D.J.G., Fone, K.C.F., 2011. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol.* 164 (4), 1162-1194.
133. Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Montaurier, C., Even, P., Launay, J.M., Carraro, V., Maurin, A.C., Averous, J., Chaveroux, C., Bruhat, A., Mallet, J., Morio, B., Fafournoux, P., 2014. Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity. *PLoS One* 9 (8), e104896.
134. Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., Penninger, J.M., 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549–554.
135. Kabebian, J.W., Calne, D.B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 271, 93-96.
136. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.
137. Kahn, R.S., Fleischhacker, W.W., Boter, H., et al., 2008. Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomized clinical trial. *Lancet* 371, 1085–1097.
138. Kalinichev, M., Robbins, M.J., Hartfield, E.M., Maycox, P.R., Moore, S.H., Savage, K.M., Austin, N.E., Jones, D.N., 2008. Comparison between

- intraperitoneal and subcutaneous phencyclidine administration in Sprague-Dawley rats: a locomotor activity and gene induction study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32 (2), 414-422.
139. Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., Tang, D., 2011. The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 571–580.
140. Kann, O., 2015. The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. *Neurobiol. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.005> (Epub ahead of print).
141. Kann, O., Kovacs, R., 2007. Mitochondria and neuronal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C641–C657.
142. Kapur, S., VanderSpek, S.C., Brownlee, B.A., Nobrega, J.N., 2003. Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J Pharmacol Exp Ther.* 305 (2), 625-631.
143. Kato, T.A., Monji, A., Mizoguchi, Y., Hashioka, S., Horikawa, H., Seki, Y., Kasai, M., Utsumi, H., Kanba, S., 2011. Anti-Inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a 'fire extinguisher' in the brain of schizophrenia? *Mini Rev Med Chem.* 11 (7), 565-574.
144. Kay, S.R., Fisz-Bein, A., Ople, L.A., 1987. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 13, 261-274.
145. Keilhoff, G., Grecksch, G., Bernstein, H.G., Roskoden, T., Becker, A., 2010. Risperidone and haloperidol promote survival of stem cells in the rat hippocampus. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 260, 151–162.
146. Kempton, M.J., Stahl, D., Williams, S.C., DeLisi, L.E., 2010. Progressive lateral ventricular enlargement in schizophrenia: a meta-analysis of longitudinal MRI studies. *Schizophr Res.* 120 (1-3), 54-62.
147. Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77, 10–18.
148. Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2001. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-golgi network. *EMBO Rep* 2, 330–335.
149. Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B., 1980. Loe cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Letters* 20, 379-382.

150. Kim, N.R., Park, S.W., Lee, J.G., Kim, Y.H., 2008. Protective effects of olanzapine and haloperidol on serum withdrawal-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 633–642.
151. Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., Ackerman, S.L., 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367–374.
152. Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., i saradnici, 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eucaryotes. *Autophagy* 4 (2), 151-175.
153. Kolomeets, N.S., Uranova, N., 2010. Ultrastructural abnormalities of astrocytes in the hippocampus in schizophrenia and duration of illness: a postmortem morphometric study. *World J Biol. Psychiatry* 11(2), 282-292.
154. Komuro, H., Rakic, P., 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95-97.
155. Konopaske, G.T., Dorph-Petersen, K.A., Sweet, R.A., Pierri, J.N., Zhang, W., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2008. Effect of chronic antipsychotic exposure on astrocyte and oligodendrocyte numbers in macaque monkeys. *Biol Psychiatry* 63 (8), 759-765.
156. Konradi, C., Heckers, S., 2003. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther.* 97 (2), 153-179.
157. Kotz, A., Merkel, P., 1926. Hydromatic alkamines. *J Fuer Prakt Chem* 113, 49-76.
158. Kovelman, J.A., Scheibel, A.B., 1984. A neurohistological correlate of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 19(12), 1601-1621.
159. Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers, M.B. Jr, Charney, D.S., 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 199-214.
160. Kung, L., Roberts, R.C., 1999. Mitochondrial pathology in human schizophrenic striatum: a postmortem ultrastructural study. *Synapse* 31, 67-75.

161. Kurumaji, A., Wakai, T., Toru, M., 1997. Decreases in peripheral-type benzodiazepine receptors in postmortem brains of chronic schizophrenics. *J. Neural Transm.* 104, 1361–1370.
162. Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., Innis, R., 1999. Increased dopamine transmission in schizophreia: Relationship to illness phases. *Biol Psychiatry* 46, 56-72.
163. Lee, E.W., Seo, J., Jeong, M., Lee, S., Song, J., 2012. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep.* 45, 496–508.
164. Lee, J.A., 2012. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival? *Exp Neurobiol.* 21 (1), 1-8.
165. Leucht, S., Pitschel-Walz, G., Abraham, D., Kissling, W., 1999. Efficacy and extrapyramidal side-effects of the new antipsychotics olanzapine, quetiapine, risperidone, and sertindole compared to conventional antipsychotics and placebo. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Schizophr Res* 35, 51–68.
166. Levy, M., Faas, G.C., Saggau, P., Craigen, W.J., Sweatt, J.D., 2003. Mitochondrialregulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 278 (20), 17727–17734.
167. Lewis, D.A., Levitt, P., 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 409-432.
168. Lewis, D.A., Lieberman, J.A., 2000. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28 (2), 325-334.
169. Li, Z., Sheng, M., 2012. Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain* 5, 15.
170. Li, J., Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.
171. Lieberman, J.A., Bymaster, F.P., Meltzer, H.Y., Deutch, A.Y., Duncan, G.E., Marx, C.E., Aprille, J.R., Dwyer, D.S., Li, X.M., Mahadik, S.P., Duman, R.S., Porter, J.H., Modica-Napolitano, J.S., Newton, S.S., Csernansky, J.G., 2008.

- Antipsychotic drugs: comparison in animal models of efficacy, neurotransmitter regulation, and neuroprotection. *Pharmacol Rev.* 60 (3), 358-403.
172. Lieberman, J.A., Perkins, D., Belger, A., Chakos, M., Jarskog, F., Boteva, K., Gilmore, J., 2001. The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology and therapeutic approaches. *Biol Psychiatry* 50, 884–897.
 173. Lindahl, J.S., Kjellsen, B.R., Tigert, J., Miskimins, R., 2008. In utero PCP exposure alters oligodendrocyte differentiation and myelination in developing rat frontal cortex. *Brain Res.* 1234, 137-147.
 174. Lipska, B.K., Weinberger, D.R., 2000. To model a psychotic disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23, 223-239.
 175. Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z.Q., Schulze-Osthoff, K., 2002. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell* 13, 978–988.
 176. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
 177. Luby, E.D., Cohen, B.D., Rosenbaum, G., Gottlieb, J.S., Kelly, R., 1959. Study of a new schizophrenic-like drug: Sernyl. *Arch. Neurol Psychiat.* 81, 363-369.
 178. Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., Thompson, C.B., 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237–248.
 179. Lundberg, G., Gupta, R., Montgomery, S., 1976. Phencyclidine – Patterns seen in street drug analysis. *Clin. Toxicol.* 9, 503.
 180. Magistretti, P. J., Allaman, I., 2013. Brain energy metabolism, in *Neuroscience in the 21st Century*, New York Springer, str. 1591–1620.
 181. Magliaro, B.C., Saldanha, C.J., 2009. Clozapine protects PC-12 cells from death due to oxidative stress induced by hydrogen peroxide via a cell-type specific mechanism involving inhibition of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Brain Res.* 1283, 14-24.
 182. Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G., 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (9), 741-752.

183. Mallat, M., Marin-Teva, J.L., Cheret, C., 2005. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15 (1), 101-107.
184. Mannella, C.A., 2006. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 140–147.
185. Mansbach, R.S., Geyer, M.A., 1989. Effects of phencyclidine and phencyclidine biologists on sensorimotor gating in the rat. *Neuropsychopharmacology* 2 (4), 299-308.
186. Marquez, R.T., Xu, L., 2012. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res* 2 (2), 214-221.
187. Martins-de-Souza, D., Gattaz, W.F., Schmitt, A., Maccarrone, G., Hunyadi-Gulyas, E., Eberlin, M.N., Souza, G.H., Marangoni, S., Novello, J.C., Turck, C.W., Dias-Neto, E., 2009a. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 43 (11), 978-986.
188. Martins-de-Souza, D., Gattaz, W.F., Schmitt, A., Rewerts, C., Marangoni, S., Novello, J.C., Maccarrone, G., Turck, C.W., Dias-Neto, E., 2009b. Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe and revealed by shotgun proteome analysis. *J Neural Transm* 116 (3), 275-289.
189. Martins-de-Souza, D., Harris, L.W., Guest, P.C., Bahn, S., 2011. The role of energy metabolism dysfunction and oxidative stress in schizophrenia revealed by proteomics. *Antioxid Redox Signal*. 15 (7), 2067-2079.
190. Maurer, I., Möller, H.J., 1997. Inhibition of complex I by neuroleptics in normal human brain cortex parallels the extrapyramidal toxicity of neuroleptics. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 255-259.
191. Maurer, I., Zierz, S., Moller, H.J., 2001. Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 48, 125-136.
192. McKinney, W.T. Jr, Bunney, W.E. Jr., 1969. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry* 21 (2), 240-248.

193. Meltzer, H.Y., 2013. Update on typical and atypical antipsychotic drugs. *Annu Rev Med.* 64, 393-406.
194. Merenlender-Wagner, A., Malishkevich, A., Shemer, Z., Udawela, M., Gibbons, A., Scarr, E., Dean, B., Levine, J., Agam, G., Gozes, I., 2015. Autophagy has a key role in the pathophysiology of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 20, 126–132.
195. Meyer, J.N., Leung, M.C., Rooney, J.P., Sendoel, A., Hengartner, M.O., Kisby, G.E., Bess, A.S., 2013. Mitochondria as a target of environmental toxicants? *Toxicol. Sci.* 134(1), 1–17.
196. Minzenberg, M.J., Laird, A.R., Thelen, S., Carter, C.S., Glahn, D.C., 2009. Meta-analysis of 41 functional neuroimaging studies of executive function in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 66 (8), 811-822.
197. Miyamoto, S., Duncan, G.E., Marx, C.E., Lieberman, J.A., 2005. Treatment for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry* 10, 79-104.
198. Mizuno, Y., Suzuki, K., Ohta, S., 1990. Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 96, 49-57.
199. Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21: 2861-2873.
200. Mizushima, N., Hara, T., 2006. Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration? *Autophagy* 2, 302–304.
201. Mizushima, N., Levine, B., 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell. Biol.* 12, 823-830.
202. Morris, B.J., Cochran, S.M., Pratt, J.A., 2005. PCP: from pharmacology to modeling schizophrenia. *Current Opinion in Pharmacology* 5, 101-106.
203. Mortensen, M., Ferguson, D.J., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K.J., Komatsu, M., Simon, A.K., 2010. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 832–837.
204. Moubarak, R.S., Yuste, V.J., Artus, C., Bouharrou, A., Greer, P.A., Menissier-de, M.J., Susin, S.A., 2007. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase

- 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol. Cell Biol.* 27, 4844–4862.
205. Moujahid, A., D'Anjou, A., Graña, M., 2014. Energy demands of diverse spiking cells from the neocortex, hippocampus, and thalamus. *Front. Comput. Neurosci.* 8, 41.
206. Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., Nabeshima, T., 2007. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Int.* 51 (2-4), 173-84.
207. Mozayani, A., 2003. Phencyclidine - effects on human performance and behavior. *Forensic Science Review* 15, 61-74.
208. Mueser, K.T., Jeste, D.V., 2008. *Clinical handbook of schizophrenia*. The Guilford Press, New York, str.35-44.
209. Mueser, K.T., McGurk, S.R., 2004. Schizophrenia. *The Lancet* 363, 2063-2072.
210. Nakatogawa, H., Ichimura, Y., Ohsumi, Y., 2007. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165-178.
211. Nandra, K.S., Agius, M., 2012. The differences between typical and atypical antipsychotics: the effects on neurogenesis. *Psychiatria Danubina Suppl* 1, S95-99.
212. Nasrallah, H.A., Tandon, R., 2009. Classic antipsychotic medications, In: Nemeroff, C., Schatzberg, A. (Eds.), *American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology*, 4th edition. Washington D.C, American Psychiatric Press, str. 533–554.
213. Nicholls, D.G., Budd, S.L., 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80, 315–360.
214. Nixon, R.A., 2006. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci.* 29 (9), 528-535.
215. Noh, J.S., Kang, H.J., Kim, E.Y., Sohn, S., Chung, Y.K., Kim, S.U., Gwag, B.J., 2000. Haloperidol-induced neuronal apoptosis: role of p38 and c-Jun-NH(2)-terminal protein kinase. *J. Neurochem.* 75, 2327–2334.

216. Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlen, P., Orrenius, S., Zhivotovsky, B.B., 2008. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1857–1864.
217. Norberg, E., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2010. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396, 95–100.
218. Olney, J.W., Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor Dysfunction and Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 998-1007.
219. Olney, J.W., Newcomer, J.W., Farber, N.B., 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 33 (6), 523-533.
220. Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z., Ishihara, N., Mihara, K., 2005. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *Embo J.* 24, 1375–1386.
221. Palmisano, G., Sardanelli, A.M., Signorile, A., Papa, S., Larsen, M.R., 2007. The phosphorylation pattern of bovine heart complex I subunits. *Proteomics* 7, 1575–1583.
222. Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T., 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282 (33), 24131–24145.
223. Park, J., Chung, S., An, H., Kim, J., Seo, J., Kim, D.H., Yoon, S.Y., 2012. Haloperidol and clozapine block formation of autophagolysosomes in rat primary neurons. *Neuroscience* 209, 64-73.
224. Park, Y.U., Jeong, J., Lee, H., Mun, J.Y., Kim, J.H., Lee, J.S., Nguyen, M.D., Han, S.S., Suh, P.G., Park, S.K., 2010. Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with Mitofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (41), 17785–17790.
225. Paunović, V.R., 2004. Shizofrenija na razmeđu milenijuma. Medicinski fakultet, Beograd.

226. Polster, B.M., 2013. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: A “complex” problem. *Neurochemistry International* 62, 695–702.
227. Polster, B.M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., Nicholls, D.G., 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 6447–6454.
228. Pospisilik, J.A., Knauf, C., Joza, N., Benit, P., Orthofer, M., Cani, P.D., Ebersberger, I., Nakashima, T., Sarao, R., Neely, G., Esterbauer, H., Kozlov, A., Kahn, C.R., Kroemer, G., Rustin, P., Burcelin, R., Penninger, J.M., 2007. Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* 131, 476–491.
229. Prabakaran, S., Swatton, J.E., Ryan, M.M., Huffaker, S.J., Huang, J.T., Griffin, J.L., Wayland, M., Freeman, T., Dudbridge, F., Lilley, K.S., Karp, N.A., Hester, S., Tkachev, D., Mimmack, M.L., Yolken, R.H., Webster, M.J., Torrey, E.F., Bahn, S., 2004. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol. Psychiatry* 9, 684–697.
230. Prince, J.A., Yassin, M.S., Orelund, L., 1997. Neuroleptic-induced mitochondrial enzyme alterations in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 261-267.
231. Quinn, R., 2005. Comparing rat’s to human’s age: How old is my rat in people years? *Nutrition* 21, 775–777.
232. Radewicz, K., Garey, L.J., Gentleman, S.M., Reynolds, R., 2000. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 137–150.
233. Radonjić, N.V., Petronijević, N.D., Vucković, S.M., Prostran, M.S., Nesić, Z.I., Todorović, V.R., Paunović, V.R., 2008. Baseline temperature in an animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. *Physiol. Behav.* 93 (3), 437–443.
234. Radonjić, N.V., Knezević, I.D., Vilimanovich, U., Kravić-Stevović, T., Marina, L.V., Nikolić, T., Todorović, V., Bumbasirević, V., Petronijević, N.D., 2010. Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of

- schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. *Neuropharmacology* 58 (4–5), 739–745.
235. Radonjić, N.V., Jakovcevski, I., Bumbaširević, V., Petronijević, N.D., 2013. Perinatal phencyclidine administration decreases the density of cortical interneurons and increases the expression of neuregulin-1. *Psychopharmacology* 227 (4), 673–683.
236. Rajasekaran, A., Venkatasubramanian, G., Berk, M., Debnath, M., 2015. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 48, 10–21.
237. Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Makkos, Z., Meltzer, H., Overholser, J., Stockmeier, C., 2002. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 57, 127–138.
238. Ran, M.S., Chan, C.L., Chen, E.Y., Mao, W.J., Hu, S.H., Tang, C.P., Lin, F.R., Conwell, Y., 2009. Differences in mortality and suicidal behavior between treated and never-treated people with schizophrenia in rural China. *Br. J. Psychiatry* 195 (2), 126–131.
239. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., Rubinsztein, D.C., 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell. Biol.* 12, 747-757.
240. Reddy, R.D., Yao, J.K., 1996. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 55, 33–43.
241. Reinke, A., Martins, M.R., Lima, M.S., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., 2004. Haloperidol and clozapine, but not olanzapine, induces oxidative stress in rat brain. *Neurosci Lett.* 372 (1-2), 157-160.
242. Renna, M., Schaffner, C., Winslow, A.R., Menzies, F.M., Peden, A.A., Floto, R.A., Rubinsztein, D.C., 2011. Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *J. Cell. Sci.* 124, 469-482.
243. Rezin, G.T., Amboni, G., Zugno, A.I., Quevedo, J., Streck, E.L., 2009. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res.* 34 (6), 1021-1029.

244. Roalf, D.R., Gur, R.E., Verma, R., Parker, W.A., Quarmley, M., Ruparel, K., Gur, R.C., 2015. White matter microstructure in schizophrenia: associations to neurocognition and clinical symptomatology. *Schizophr Res.* 161 (1), 42-49.
245. Robinson, D.G., Woerner, M.G., Alvir, J.M., Bilder, R.M., Hinrichsen, G.A., Lieberman, J.A., 2002. Predictors of medication discontinuation by patients with first-episode schizophrenia and schizoaffective disorder. *Schizophr Res.* 57 (2-3), 209-219.
246. Sallet, P.C., Elkis, H., Alves, T.M., Oliveira, J.R., Sassi, E., Campi de Castro, C., Busatto, G.F., Gattaz, W.F., 2003. Reduced cortical folding in schizophrenia: an MRI morphometric study. *Am J Psychiatry* 160 (9), 1606-1613.
247. Sams-Dodd, F., 1995. Automation of the social interaction test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment. *J Neurosci Methods* 59 (2), 157-167.
248. Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vecsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 257, 221-239.
249. Sazanov, L.A., 2015. A giant molecular pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 375-388.
250. Scallet, A.C., Schmued, L.C., Slikker, W. Jr, Grunberg, N., Faustino, P.J., Davis, H., Lester, D., Pine, P.S., Sistare, F., Hanig, J.P., 2004. Developmental neurotoxicity of ketamine: morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons. *Toxicol Sci.* 81 (2), 364-370.
251. Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., Stevens, B., 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74 (4), 691-705.
252. Scheetz, A.J., Constantine-Paton, M., 1994. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J* 8, 745-752.
253. Schmitt, A., Weber, S., Jatzko, A., Braus, D.F., Henn, F.A., 2004. Hippocampal volume and cell proliferation after acute and chronic clozapine or haloperidol treatment. *J Neural Transm* 111, 91-100.

254. Seeman, P., 2002. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can. J. Psychiatry* 47, 27-38.
255. Seeman, P., 2014. Clozapine, a Fast-Off D2 Antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 24-29.
256. Sengupta, P., 2013. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int. J. Prev. Med.* 4 (6), 624–630.
257. Sevrioukova, I.F., 2011. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 2545–2579.
258. Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M., McCarley, R.W., 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 49, 1-52.
259. Sigmundsson, T., Suckling, J., Maier, M., Williams, S., Bullmore, E., Greenwood, K., Fukuda, R., Ron, M., Toone, B., 2001. Structural abnormalities in frontal, temporal, and limbic regions and interconnecting white matter tracts in schizophrenic patients with prominent negative symptoms. *Am. J. Psychiatry* 158, 234-243.
260. Sikich, L., Frazier, J.A., McClellan, J., Findling, R.L., Vitiello, B., Ritz, L., Ambler, D., Puglia, M., Maloney, A.E., Michael, E., De Jong, S., Slifka, K., Noyes, N., Hlastala, S., Pierson, L., McNamara, N.K., Delpuerto-Bedoya, D., Anderson, R., Hamer, R.M., Lieberman, J.A., 2008. Double-blind comparison of first- and second-generation antipsychotics in early-onset schizophrenia and schizoaffective disorder: findings from the treatment of early-onset schizophrenia spectrum disorders (TEOSS) study. *Am. J. Psychiatry* 165, 1420–1431.
261. Sircar, R., Soliman, K.F., 2003. Effects of postnatal PCP treatment on locomotor behavior and striatal D2 receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74 (4), 943–952.
262. Smaili, S.S., Ureshino, R.P., Rodrgiues, L., Rocha, K.K., Carvalho, J.T., Oseki, K.T., Bincoletto, C., Lopes, G.S., Hirata, H., 2011. The role of mitochondrial function in glutamate-dependent metabolism in neuronal cells. *Curr. Pharm. Des.* 17 (3), 3865-3877.
263. Stanfield, A.C., Moorhead, T.W., Harris, J.M., Owens, D.G., Lawrie, S.M., Johnstone, E.C., 2008. Invearsed right prefrontal cortical folding in adolescents at risk of schizophrenia for cognitive reasons. *Biol. Psychiatry* 63 (1), 80-85.

264. Stark, A.K., Uylings, H.B., Sanz-Arigita, E., Pakkenberg, B., 2004. Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 161, 882–888.
265. Steen, R.G., Mull, C., McClure, R., Hamer, R.M., Lieberman, J.A., 2006. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry*. 188, 510-518.
266. Steffek, A.E., McCullumsmith, R.E., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., 2008. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 103 (1–3), 71–82.
267. Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H.G., Bogerts, B., 2008. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res.* 42 (2), 151-157.
268. Steiner, J., Mawrin, C., Ziegeler, A., Bielau, H., Ullrich, O., Bernstein, H.G., Bogerts, B., 2006. Distribution of HLA-DR-positive microglia in schizophrenia reflects impaired cerebral lateralization. *Acta Neuropathol.* 112 (3), 305-316.
269. Steinpreis, R.E., 1996. The behavioral and neurochemical effects of phencyclidine in humans and animals: some implications for modeling psychosis. *Behavioral Brain Research* 74, 45-55.
270. Stevens, J.R., 1982. Neuropathology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 39 (10), 1131-1139.
271. Steward, L.J., Kennedy, M.D., Morris, B.J., Pratt, J.A., 2012. Chronic phencyclidine (PCP)-induced modulation of muscarinic receptor mRNAs in rat brain : Impact of antipsychotic drug treatment. *Neuropharmacology* 62 (3), 1554–1563.
272. Stojković, T., Radonjić, N.V., Velimirović, M., Jevtić, G., Popović, V., Doknić, M., Petronijević, N.D., 2012. Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39 (1), 192–199.

273. Surova, O., Zhivotovsky, B., 2013. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 32 (33), 3789-3797.
274. Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C., Kroemer, G., 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp. Med.* 192, 571–580.
275. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441–446.
276. Takahashi, Y., 1954. An enzymological study on brain tissue of schizophrenic patients. *Carbohydrate metabolism. Fol. Psychiatr. Neurol. Jpn.* 7, 214-237.
277. Takahashi, M., Kakita, A., Futamura, T., Watanabe, Y., Mizuno, M., Sakimura, K., Castren, E., Nabeshima, T., Someya, T., Nawa, H., 2006. Sustained brain-derived neurotrophic factor up-regulation and sensorimotor gating abnormality induced by postnatal exposure to phencyclidine: comparison with adult treatment. *J. Neurochem.* 99, 770–780.
278. Takahashi, N., Sakurai, T., Davis, K.L., Buxbaum, J.D., 2011. Linking oligodendrocyte and myelin dysfunction to neurocircuitry abnormalities in schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 93 (1), 13-24.
279. Tamminga, C.A., 1998. Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12, 21-36.
280. Tandon, R., Belmaker, R.H., Gattaz, W.F., Lopez-Ibor, J.J., Okasha, A., Singh, B., Stein, D.J., Olie, J.P., Fleischhacker, W.W., Moeller, H.J., 2008. World Psychiatric Association Pharmacopsychiatry Section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 100, 20-38.
281. Tandon, R., Nasrallah, H.A., Keshavan, M.S., 2010. Schizophrenia, "just the facts" 5. Treatment and prevention. Past, present, and future. *Schizophr Res.* 122 (1-3), 1-23.

282. Taylor, J.L., Blanton, R.E., Levitt, J.G., Caplan, R., Nobel, D., Toga, A.W., 2005. Superior temporal gyrus differences in childhood-onset schizophrenia. *Schizophr. Res.* 73, 235-241.
283. Terry, A.V. Jr, Gearhart, D.A., Mahadik, S.P., Warsi, S., Davis, L.W., Waller, J.L., 2005. Chronic exposure to typical or atypical antipsychotics in rodents: temporal effects on central alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 136 (2), 519-529.
284. Terry, A.V., Gearhart, D.A., Warner, S.E., Zhang, G., Bartlett, M.G., Middlemore, M., Beck, W.D. Jr, Mahadik, S.P., Waller, J.L., 2007. Oral haloperidol or risperidone treatment in rats: temporal effects on nerve growth factor receptors, cholinergic neurons, and memory performance. *Neuroscience* 146 (3), 1316-1332.
285. Tiihonen, J., Lonnqvist, J., Wahlbeck, K., Klaukka, T., Niskanen, L., Tanskanen, A., Haukka, J., 2009. 11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study). *Lancet* 374, 620–627.
286. Tkacs, N.C., Thompson, H.J., 2006. From bedside to bench and back again: research issues in animal models of human disease. *Biol Res Nurs.* 8 (1), 78-88.
287. Tomek, S.E., Lacrosse, A.L., Nemirovsky, N.E., Olive, M.F., 2013. NMDA Receptor Modulators in the Treatment of Drug Addiction. *Pharmaceuticals (Basel)* 6 (2), 251-268.
288. Topisirović, Lj., 2005. Dinamička biohemija. U: Stanković, S. Biološki fakultet, Beograd, str. 200-220.
289. Treit, D., 1985. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 9 (2), 203-222.
290. Tsai, G., Coyle, J.T., 2002. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 165–179.
291. Tsai, G., Passani, L.A., Slusher, B.S., Carter, R., Baer, L., Kleinman, J.E., Coyle, J.T., 1995. Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch Gen Psychiatry.* 52 (10), 829-836.
292. Tuunainen, A., Wahlbeck, K., Gilbody, S., 2002. Newer atypical antipsychotic medication in comparison to clozapine: a systematic review of randomized trials. *Schizophr Res.* 56 (1-2), 1-10.

293. Uranova, N., Orlovskaya, D., Vikhрева, O., Zimina, I., Kolomeets, N., Vostrikov, V., Rachmanova, V., 2001. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res. Bull.* 55, 597–610.
294. Uranova, N.A., Vostrikov, V.M., Orlovskaya, D.D., Rachmanova, V.I., 2004. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res.* 67 (2-3), 269-275.
295. Uranova, N.A., Vostrikov, V.M., Vikhрева, O.V., Zimina, I.S., Kolomeets, N.S., Orlovskaya, D.D., 2007. The role of oligodendrocyte pathology in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 10 (4), 537-545.
296. Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schagger, H., Rustin, P., Kroemer, G., 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23, 4679–4689.
297. van der Staay, J.F., 2006. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Review* 52, 131-159.
298. van der Staay, F.J., Arndt, S.S., Nordquist, R.E., 2009. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behavioral and Brain Functions*, 5:11.
299. van Os, J., Kenis, G., Rutten, B.P., 2010. The environment and schizophrenia. *Nature* 468 (7321), 203-212.
300. Veijola, J., Guo, J.Y., Moilanen, J.S., Jääskeläinen, E., Miettunen, J., Kyllönen, M., Haapea, M., Huhtaniska, S., Alaräisänen, A., Mäki, P., Kiviniemi, V., Nikkinen, J., Starck, T., Remes, J.J., Tanskanen, P., Tervonen, O., Wink, A.M., Kehagia, A., Suckling, J., Kobayashi, H., Barnett, J.H., Barnes, A., Koponen, H.J., Jones, P.B., Isohanni, M., Murray, G.K., 2014. Longitudinal changes in total brain volume in schizophrenia: relation to symptom severity, cognition and antipsychotic medication. *PLoS One.* 9 (7), e101689.

301. Venneti, S., Lopresti, B.J., Wiley, C.A., 2006. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein18 kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog. Neurobiol.* 80, 308–322.
302. Vernon, A.C., Natesan, S., Modo, M., Kapur, S., 2011. Effect of chronic antipsychotic treatment on brain structure: a serial magnetic resonance imaging study with ex vivo and postmortem confirmation. *Biol Psychiatry* 69 (10), 936-944.
303. Vita, A., De Peri, L., Silenzi, C., Dieci, M., 2006. Brain morphology in first-episode schizophrenia: a meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies. *Schizophr Res.* 82 (1), 75-88.
304. Volk, D.W., Lewis, D.A., 2010. Prefrontal cortical circuits in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci* 4, 485-508.
305. Wallace, D.C., 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8739-8746.
306. Wang, C., McInnis, J., Ross-Sanchez, M., Shinnick-Gallagher, P., Wiley, J.L., Johnson, K.M., 2001. Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. *Neuroscience* 107, 535–550.
307. Wang, C., McInnis, J., West, J.B., Bao, J., Anastasio, N., Guidry, J.A., Ye, Y., Salvemini, D., Johnson, K.M., 2003. Blockade of phencyclidine-induced cortical apoptosis and deficits in prepulse inhibition by m40403, a superoxide dismutase mimetic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 266–271.
308. Wang, C., Wang, Y, McNutt, M.A., Zhu, W.G., 2011. Autophagy process is associated with anti-neoplastic function. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43, 425-432.
309. Wang, C.Z., Johnson, K.M., 2005. Differential effects of acute and subchronic administration on phencyclidine-induced neurodegeneration in the perinatal rat. *J. Neurosci. Res.* 81 (2), 284–292.

310. Wang, C.Z., Johnson, K.M., 2007. The role of caspase-3 activation in phencyclidine-induced neuronal death in postnatal rats. *Neuropsychopharmacology* 32 (5), 1178–1194.
311. Wang, H., Yu, S.W., Koh, D.W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2004. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J. Neurosci.* 24 (48), 10963–10973.
312. Wang, R.Y., Liang, X., 1998. M100907 and clozapine, but not haloperidol or raclopride, prevent phencyclidine-induced blockade of NMDA responses in pyramidal neurons of the rat medial prefrontal cortical slice. *Neuropsychopharmacology* 19, 74–85.
313. Waterhouse, R.N., 2003. Imaging the PCP site of the NMDA ion channel. *Nuclear Medicine and Biology* 30 (8), 869-878.
314. Webster, M.J., O'Grady, J., Kleinman, J.E., Weickert, C.S., 2005. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience* 133 (2), 453–461.
315. Weinberger, D.R., 1988. Schizophrenia and the frontal lobe. *Trends Neurosci.* 11 (8), 367-370.
316. Weinmann, S., Read, J., Aderhold, V., 2009. Influence of antipsychotics on mortality in schizophrenia: systematic review. *Schizophr. Res.* 113, 1–11.
317. Wenthur, C.J., Lindsley, C.W., 2013. Classics in chemical neuroscience: clozapine. *ACS Chem Neurosci.* 14 (7), 1018-1025.
318. Whatley, S.A., Curti, D., Marchbanks, R.M., 1996. Mitochondrial involvement in schizophrenia and other functional psychoses. *Neurochem. Res.* 21, 995-1004.
319. Whittaker, V.P., Barker, L.A., 1972. The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. In Freid R (ed) *Methods of Neurochemistry*, volumen 2. Dekker, New York, str. 1–52.
320. Wierzbica-Bobrowicz, T., Lewandowska, E., Lechowicz, W., Stepień, T., Pasennik, E., 2005. Quantitative analysis of activated microglia, ramified and

- damage of processes in the frontal and temporal lobes of chronic schizophrenics. *Folia Neuropathol.* 43, 81–89.
321. Williams, M.R., Hampton, T., Pearce, R.K., Hirsch, S.R., Ansorge, O., Thom, M., Maier, M., 2013. Astrocyte decrease in the subgenual cingulate and callosal genu in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 263 (1), 41–52.
322. Wilson, C., Terry, A.V. Jr, 2010. Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: role in novel drug discovery and development. *Clin Schizophr Relat Psychoses* 4 (2), 124-137.
323. Wright, I.C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P.W., David, A.S., Murray, R.M., Bullmore, E.T., 2000. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157, 16–25.
324. Wu, J., Dang, Y., Su, W., Liu, C., Ma, H., Shan, Y., Pei, Y., Wan, B., Guo, J., Yu, L., 2006. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B - two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 339, 437–442.
325. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cyt.* 68, 251–306.
326. Yu, S.W., Wang, Y., Frydenlund, D.S., Ottersen, O.P., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2009. Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro.* 1(5), e00021.
327. Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259–263.
328. Yuan, J., Yankner, B.A., 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407(6805), 802-809.
329. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., Heintz, N., 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haplosufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15077–15082.

330. Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., Kroemer, G., 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 183, 1533–1544.
331. Zhu, C., Wang, X., Deinum, J., Huang, Z., Gao, J., Modjtahedi, N., Neagu, M.R., Nilsson, M., Eriksson, P.S., Hagberg, H., Luban, J., Kroemer, G., Blomgren, K., 2007. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *J Exp Med.* 204 (8), 1741-1748.
332. Zhu, F., Zheng, Y., Ding, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wu, R., Guo, X., Zhao, J., 2014. Minocycline and Risperidone Prevent Microglia Activation and Rescue Behavioral Deficits Induced by Neonatal Intrahippocampal Injection of Lipopolysaccharide in Rats. *PLoS One* 9 (4), e93966.
333. Zhuravliova, E., Barbakadze, T., Natsvlshvili, N., Mikeladze, D.G., 2007. Haloperidol induces neurotoxicity by the NMDA receptor downstream signaling pathway, alternative from glutamate excitotoxicity. *Neurochem Int.* 50 (7-8), 976-982.

SPISAK SKRAĆENICA

ADP	Adenozin difosfat
AIF	Faktor indukcije apoptoze; <i>apoptosis inducing factor</i>
ANOVA	Jednofaktorska analiza varijanse
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
ATP	Adenozin 5' - trifosfat
BSA	Serumski albumin govečeta
Ca ²⁺	Jon kalcijuma
CNP	2',3'-ciklična nukleotid 3'-fosfodiesteraza
CNS	Centralni nervni sistem
CoQ	Koenzim Q
COX	Citohrom c oksidaza
CT	Kompjuterizovana tomografija
D1 i D2	Tipovi dopaminskih receptora
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DCIP	2,6-dihloroindofenol
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
GFAP	Glijalni kiseli fibrilarni protein
H	Haloperidol
5HT	Serotoninski receptor
Iba 1	Jonizovani kalcijum-vezujući adapterski protein
i.p.	Intraperitonealno
iRNK	Informaciona RNK
K	Klozapin
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
MAG	Mijelin-asocirani glikoprotein
MBP	Mijelin bazni protein
Mg ²⁺	Jon magnezijuma
MK-801	Dizocilpin
MOG	Mijelin oligodendrocitni glikoprotein
MRI	Magnetna rezonanca

NaCl	Natrijum hlorid
Na ₂ SO ₄	Natrijum ditionat
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NeuN	Neuron-specifični jedarni protein
NMDA	N-metil-D-aspartat
O ₂	Molekulski kiseonik
PAGE	Poliakrilamidna gel elektroforeza
PCP	Fenciklidin, <i>phencyclidine</i>
P _i	Neorganski fosfor
PN	Postnatalni
PV+	Parvalbumin pozitivne ćelije
RNK	Ribonukleinska kiselina
s.c.	Subkutano
SCH	Shizofrenija
t.t.	Telesna težina
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
Zn ²⁺	Jon cinka

BIOGRAFIJA AUTORA

Gordana Z. Jevtić Dožudić rođena je 04.08.1986. godine u Beogradu. U svom rodnom gradu završila je osnovnu školu i Petnaestu beogradsku gimnaziju sa odličnim uspehom. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2005. godine, a na istom fakultetu diplomirala je 2011. godine sa prosečnom ocenom 9.06 i stekla zvanje Diplomiranog molekularnog biologa i fiziologa. Iste godine upisuje doktorske studije iz oblasti Neuronauka na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od februara 2012. godine zaposlena je kao Istraživač saradnik na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu, na kom se bavi naučnim radom iz oblasti neuronauka u okviru projekta “Strukturne i biohemijske karakteristike poremećaja sinaptičke plastičnosti u psihijatrijskim oboljenjima” finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Fokus svoje istraživačke i eksperimentalne delatnosti usmerava na izučavanje etiopatogeneze shizofrenije, iz čega ima publikovane radove u stručnim časopisima i na međunarodnim kongresima. Pored shizofrenije, bavi se ispitivanjem etiopatogeneze Alchajmerove bolesti i posledicama prolazne globalne ishemije mozga.

Tokom svoje istraživačke karijere usavršavala se na brojnim radionicama u zemlji i inostranstvu, a tokom oktobra i novembra 2016. godine boravila je na istraživačkom usavršavanju u laboratoriji Emeritus prof. dr Melite Šahner u Centru za molekularnu neurobiologiju u Hamburgu, Nemačka.

Autor je više radova publikovanih u inostranim časopisima iz oblasti neuronauka. Do sada je izlagala svoje radove na brojnim međunarodnim, kao i domaćim kongresima i konferencijama iz oblasti neuronauka i psihijatrije. Komentor je više studentskih radova.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana **Gordana Jevtić Dožudić**

broj upisa NN-05/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom **Mitohondrijalna disfunkcija u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom - Efekat antipsihotika**

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.02.2017.

Gordana Jevtić Dožudić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Gordana Jevtić Dožudić

Broj upisa: NN05/11

Studijski program: Doktorske studije iz Neuronauka

Naslov rada: Mitohondrijalna disfunkcija u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom - Efekat antipsihotika

Mentor: Prof.dr Nataša Petronijević

Potpisana Gordana Jevtić Dožudić


izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.02.2017.

_____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: **Mitohondrijalna disfunkcija u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom - Efekat antipsihotika** koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.02.2017.

Jelena Lomogork