

Медицински факултет
Универзитет у Београду

Бранка Д. Марковић

**Дуготрајни ефекти матерналне
депривације на холинергички систем
и редокс регулацију у мозгу пацова**

Докторска дисертација

Београд, 2016.

University of Belgrade
School of medicine

Branka D. Marković

**Long-term effects of maternal
deprivation on cholinergic system and
redox regulation in rat brains**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Ментор :

Проф. др Бранислав Филиповић, редовни професор, Института за анатомију
„Нико Миљанић“, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

Коментор:

Проф. др Наташа Петронијевић, редовни професор, Института за медицинску и
клиничку биохемију, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

Чланови комисије :

1. Проф. др Видосава Радоњић, редовни професор, Института за анатомију
„Нико Миљанић“, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

2. Проф. др Иванка Марковић, редовни професор, Института за медицинску и
клиничку биохемију, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

3. Проф. др Раде Чукурановић, редовни професор анатомије, Медицинског
факултета, Универзитета у Нишу

Захваљујем се

Проф. др Браниславу Филиповићу, свом ментору, за указану безрезервну подршку и поверење у научном усавршавању без кога реализација овог рада не би била могућа.

Проф. др Наташи Петронијевић, свом коментору и учитељу, чија су ми научна визија и истраживачка посвећеност биле инспирација у истраживачком раду.

Проф. др Видосави Радоњић, која ме је својим искуством и стручношћу подржавала од самог почетка научно-истраживачког рада.

Доц. др Невени Радоњић, мом пријатељу по души и науци чије су ми знање, истраживачка посвећеност, ентузијазам и пријатељски однос учинили истраживачки рад испуњен пријатељском атмосфером и топлином.

Асист. др Татјани Николић, мед. техничарима Славиши Ђукићу и Марку Бошковићу за помоћ, подршку и ведрину у лабораторијском раду.

Вишњи Вуловић и колегама Ивану Стојаковићу и Предрагу Рацићу на несебичној техничкој помоћи и пријатељској подршци.

Свим члановима Института за анатомију и Института за биохемију Медицинског факултета у Београду.

Мојој Ленки

ДУГОТРАЈНИ ЕФЕКТИ МАТЕРНАЛНЕ ДЕПРИВАЦИЈЕ НА ХОЛИНЕРГИЧКИ СИСТЕМ И РЕДОКС РЕГУЛАЦИЈУ У МОЗГУ ПАЦОВА

Бранка Марковић

Увод: Анимални модел матерналне депривације заснован је на излагању стресу у раном постнаталном периоду. Показано је да рани перинатални стрес може изазвати различите краткотрајне и дуготрајне поремећаје у когнитивним, емоционалним и бихејвиоралним одликама (Koehl i sar., 2001; Viveros i sar., 2010), као и да рани постнатални стрес може повећати ризик за обољевање од схизофреније (Ellenbroek i Cools, 1998; Bramon i sar., 2001). Поремећај у холинергичкој неуротрансмисији често је описиван код схизофреније (Terry i Mahadik, 2007; Sarter i sar., 2005), а холинергички систем се сматра потенцијалном метом за развој нових лекова (Freedman i sar., 2008; Scarr, 2012) који би побољшали когнитивне поремећаје и негативне симптоме код оболелих.

Оксидативни стрес се сматра једним од етиопатогенетских фактора схизофреније. У овом раду је испитиван утицај матерналне депривације на структурне и биохемијске карактеристике појединих можданих региона *Wistar* пацова.

Циљеви: (1) Испитати утицај матерналне депривације на холинергички систем (активност ацетилхолинестеразе као и одређивање густине холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу и хипокампадној формацији), (2) испитати показатеље оксидативног стреса (садржај редукованог глутатиона, активности γ -глутамил цистеин лигазе, глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе, супероксид дизмутазе, затим експресије SOD1 и SOD2 као и садржаја липидних пероксида изражен преко концентрације малондиалдехида (MDA)), (3) испитати утицај на митохондријални метаболизам одређивањем активности ензима респираторног ланца (комплекса I и цитохром c оксидазе), и експресију мембранских (gp91^{phox}, p22^{phox}) и цитосолних (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) субјединица

NADPH оксидазе у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc.caudatus*-у мозга пацова.

Материјал и методе: Трудне женке *Wistar* пацова су појединачно чуване у кавезима са 12-часовним циклусом светло-мрак. Храна и вода били су доступни *ad libitum*. Дан порођаја смо означили као нулти постнатални дан (PN0). Деветог постнаталног дана (PN9) легла смо подвргнули матерналној депривацији (Ellenbroek i Cools, 1995b; Roceri i sar., 2002). Десетог постнаталног дана (PN 10) младунци су враћени у кавез са мајком (експериментална група). У контролној групи младунци остају са својом мајком све време. Након тога младунце нисмо узнемиравали, осим због рутинског чишћења кавеза, до PN 21 када смо извршили класификацију према полу. Животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом шездесетог постнаталног дана (PN60). За морфометријске и биохемијске студије користили смо мужјаке, како би избегли сексуални диморфизам (Vivinetto i sar., 2013; Own i Patel, 2013).

Активност ензима ацетилхолинестеразе, као и показатеље оксидативног стреса (садржај редукованог глутатиона, активности γ -глутамил цистеин лигазе, глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе, супероксид дизмутаза, садржаја липидних пероксида) и активности ензима респираторног ланца (комплекса I и цитохром *c* оксидазе) одређивани су одговарајућим спектрофотометријским методама. Техникама имунохистохемије одређивана је густина холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу и хипокампадној формацији. Техником *Western blota* испитивана је експресија SOD1 и SOD2, и експресија субјединица NADPH оксидазе (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc.caudatus*-у мозга пацова.

Резултати: Истраживање је показало да рани стрес изазван матерналном депривацијом проузрокује дуготрајне промене у холинергичком систему и редокс регулацији. Првенствено стрес проузрокован раним одвајањем младунаца од мајке доводи до смањења активности AChE у кортексу као и до повећања активности AChE у хипокампусу. Такође, доводи до смањења густине

холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу мозга пацова као и до повећања густине холинергичких влакана у CA1 подручју хипокампуса.

Матернална депривација доводи до снижења редукованог глутатиона у свим испитиваним структурама, доводи до повећања активности ензима GPx у кортексу, и смањења активности овог ензима у таламусу, али не доводи до промена у активности ензима γ -GCL и GR. Такође, у истраживању смо показали да матернална депривација узрокује повећање активности ензима SOD у кортексу и хипокампусу као и повећану експресију SOD1 и SOD2 у кортексу, као и да доводи до липидне пероксидације у кортексу и таламусу.

Матернална депривација узрокује поремећај митохондријалног метаболизма која се огледа у повећаној активности комплекса I у хипокампусу, таламусу и *nc.caudatus*-у, али не доводи до промена у активности COX.

Матернална депривација доводи до повећане експресије субјединице gp91^{phox} NADPH оксидазе у кортексу и хипокампусу, као и до снижења експресије у таламусу и *nc.caudatus*-у. Такође узрокује повећану експресију p22^{phox} субјединице NADPH оксидазе у хипокампусу и снижење експресије у *nc.caudatus*-у, као и снижење експресије p47^{phox} субјединице у хипокампусу и *nc.caudatus*-у. Матернална депривација узрокује повећање експресије субјединице p40^{phox} у хипокампусу, али не узрокује промене у експресији p67^{phox} субјединице NADPH оксидазе ни у једној од испитиваних структура мозга пацова.

Закључак: Наведени резултати ове докторске дисертације поткрепљују претпоставку да се редокс дисрегулација и поремећај функција холинергичког система јављају као дугорочне последице излагања раном постнаталном стресу. Наведени подаци могу бити од значаја у смислу сагледавања и разумевања етиопатогенетских механизма шизофреније, као и у развоју нових експерименталних модела и стратегија у лечењу ове болести.

Кључне речи: шизофренија, холинергички систем, оксидативни стрес, NADPH оксидаза

Научна област: неуронауке

Ужа научна област: неуробиохемија

Long-term effects of maternal deprivation on cholinergic system and redox regulation in rat brains

Branka Marković

Objective: Animal model of maternal deprivation is based on exposure to stress in early postnatal life. It has repeatedly been shown that early perinatal stress can cause various short and long-term disturbances in cognitive, emotional and other behavioral performances (Koehl et al. 2001; Viveros et al. 2010). Nonetheless, there is evidence that early stressful life events can increase the risk of developing schizophrenia (Ellenbroek and Cools, 1998; Bramon et al. 2001). Alterations in cholinergic neurotransmission have been commonly reported in schizophrenia (Terry and Mahadik, 2007; Sarter et al. 2005), cholinergic system is a target for drug development (Freedman et al. 2008; Scarr, 2012) against the negative symptoms and cognitive disorder. Growing body of evidence indicates that oxidative damage is connected to schizophrenia. Animal model of *Wistar* rats we used in order to investigate the influence of maternal deprivation to the structural and biochemical characteristics of certain brain regions.

Aim: The aims of present dissertation were elucidate the effects of maternal deprivation on: (1) cholinergic system (measure AChE activity and morphometric analysis density of cholinergic fibers in hippocampus and retrosplenial cortex) ,(2) to analyse oxidative stress parameters using appropriate spectrophotometric techniques (GSH content, activity of γ -glutamyl-cysteine-glycine, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, expression of SOD1 and SOD2 and levels of lipid peroxides (malondialdehyde-MDA)), (3) to analyse mitochondrial respiratory chain enzyme activity using appropriate spectrophotometric techniques (activity of Complex I and COX) and the expression of different NADPH oxidase subunits (gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox}, and p40^{phox}) in cortex, hippocampus, thalamus and caudate nucleus.

Methodology: Pregnant female Wistar rats was in single cages on a standard 12 h light/dark cycle, with water and food available *ad libitum*. The day of delivery was denoted as postnatal day P0. On P9, eight litters were subjected to the maternal deprivation procedure according to the previously published protocol (Roceri et al., 2002; Ellenbroek et al. 2005). On P10 pups was returned in their home cage with dam (experimental group). In control group pups left undisturbed with their mother. All litters were later left undisturbed except for the routine cleaning of the cages, until P21. On P21 the litters were weaned and classified according to sex. Animals were sacrificed by cervical dislocation at 2 months of age (P60). For morphometric and biochemical studies only male rats were used in order to avoid sexual dimorphism

Results: The result of our survey was shown that early perinatal stress, maternal deprivation, can cause long term effects in cholinergic system and redox regulation. Obtained results showed that AChE activity in the cortex is significantly decreased while in hippocampus AChE activity is significantly increased. Morphometric analysis density of cholinergic fibers in cortex is decreased while in hippocampus is significantly increased density only in CA1 region. Results of our study have confirmed the presence of oxidative stress in MD rats. We observed a decrease of GSH content in all investigated structures, the activity of was not changed, GPx activity was increased in the cortex, and decreased in thalamus. No changes observed in activity of γ -GCL and GR. Also, maternal deprivation leads to increased activity of SOD in cortex and hippocampus, as well as increased expression of SOD1 and SOD2 in cortex. Levels of lipid peroxides was increased in cortex and thalamus. Long term effects of maternal deprivation in our study include increased activity of Complex I in all structures except cortex, without changes of COX activity. In our study, in cortex, the single observed change in NOX2 was increased expression of membrane subunit gp91^{phox}. On the other hand, in hippocampus, increased expression of gp91^{phox} was accompanied by increased expression of p22^{phox} and p40^{phox}, as well as decreased expression of p47^{phox}. In thalamus only gp91^{phox} is decreased, while in the nucleus caudatus decreased expression of gp91^{phox}, p22^{phox} and p47^{phox} was observed.

Conclusion: The results of this doctoral dissertation support the assumption that early maternal deprivation produces long-term redox alterations and cholinergic disturbance in

the brain of rats. Understanding of the etiological role of oxidative stress and cholinergic disturbance in the pathogenesis of schizophrenia could offer new experimental models as well as therapeutic strategies.

Key words: schizophrenia, cholinergic system, oxidative stress, NADPH oxidase

Research area: Neuroscience

Special topics: Neurobiochemistry

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Појам матерналне депривације.....	2
1.1.1. Историјат.....	2
1.1.2. Ефекти матерналне депривације.....	2
1.2. Етиологија схизофреније.....	3
1.3. Анимални модели у психијатрији.....	5
1.4. Матернална депривација као анимални модел схизофреније.....	9
1.5. Холинергички систем и схизофренија.....	11
1.6. Оксидативни стрес у етиопатологији схизофреније.....	16
1.7. Митохондрије и етиопатогенеза схизофреније.....	22
1.8. Улога ензима NADPH оксидазе у етиопатогенези схизофреније.....	23
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	26
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	29
3.1. Третирање животиња.....	30
3.2. Изоловање структура за биохемијске анализе.....	31
3.2.1. Биохемијске анализе.....	31
3.2.1.1. Мерење садржаја протеина.....	32
3.2.1.2. Активност ензима ацетилхолинестеразе (AChE).....	32
3.2.1.3. Мерење садржаја редукованог глутатиона (GSH).....	33
3.2.1.4. Активност ензима γ -глутамил цистеин лигазе (γ -GCL).....	33
3.2.1.5. Активност ензима глутатион пероксидазе (GPx).....	33
3.2.1.6. Активност ензима глутатион редуктазе (GR).....	34
3.2.1.7. Активност ензима супероксид дизмутазе (SOD).....	34
3.2.1.8. Концентрација липидних пероксида (MDA).....	34
3.2.1.9. Активност комплекса I (NADH:koenzim Q oksidoreduktaza).....	35
3.2.1.10. Активност ензима цитохром C оксидазе (COX).....	35
3.2.2. Одређивање експресије протеина техником Western blot.....	35
3.3. Припрема узорака за имунохистохемију (криопресеци).....	37
3.3.1. Одређивање густине холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу и хипокампадној формацији.....	38
3.4. Статистичка анализа.....	40
4. РЕЗУЛТАТИ	41
4.1. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност AChE.....	42
4.2. Дуготрајни ефекти матерналне депривације на густину холинергичких влакана у мозгу пацова.....	43
4.3. Дуготрајни утицај матерналне депривације на садржај GSH.....	45
4.4. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност γ -GCL.....	46
4.5. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност GP _x	47
4.6. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност GR.....	48
4.7. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност SOD.....	49
4.8. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију ензима SOD1 и SOD2.....	50
4.9. Дуготрајни утицај матерналне депривације на вредности (MDA).....	52
4.10. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност Комплекса I и COX.....	53
4.11. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице gp91 ^{phox} NADPH оксидазе.....	54
4.12. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице p22 ^{phox} NADPH оксидазе.....	55

4.13. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице p47 ^{phox} NADPH оксидазе	56
4.14. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице p67 ^{phox} NADPH оксидазе	57
4.15. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице p40 ^{phox} NADPH оксидазе	58
5. ДИСКУСИЈА	59
6. ЗАКЉУЧЦИ	76
7. ЛИТЕРАТУРА	79

1. УВОД

1.1. Појам матерналне депривације

1.1.1. Историјат

Матернална депривација (MD) је термин уведен средином прошлог века у раду психијатара и психоаналитичара. У периоду Другог светског рата, *John Bowlby* (Bowlby, 1940; Bowlby, 1944; Bowlby, 1949), али и други истраживачи, (Spitz, 1946) и (Goldfarb, 1943; Goldfarb, 1945) су указивали на негативне ефекте одвајања одојчади и мале деце од мајке на њихов каснији психички развој. Светска Здравствена Организација је препознала значај овог проблема и ангажовала Џона Боулби-ја, да прикупи емпиријске доказе, који су постојали у то време широм послератне Европе и САД, како рано одвајње од мајке утиче на психолошки развој деце. Резултати су указивали на закључак да одојче и мало дете мора имати топао, интиман и континуиран однос са мајком како не би дошло до значајних и неповратних менталних поремећаја, за шта је тада постојало контраверзно мишљење (Bowlby, 1951). Резултати овог истраживања су објављени у монографији, “*Maternal Care and Mental Health*“ која је објављена на 14 различитих језика и продата у више од 400 000 примерака само у енглеској верзији.

1.1.2. Ефекти матерналне депривације

Развој мозга током периода гестације прати интензиван рани постнатални развој током прве године живота. Ово је период изражене осетљивости мозга на спољне чиниоце, како позитивне тако и негативне (Marco i sar., 2011). Обзиром да развој мозга није униформан, континуиран процес, већ дисконтинуиран процес карактерисан регионалном временском асинхронијом (Giedd i sar., 2009), овај

дисконтинуитет развоја се означава као критичан период развоја када је повећана осетљивост одређених структура мозга или неуротрансмитерских система на стимулусе. Излагање стресу као што је матернална депривација током овог критичног постнаталног периода развоја мозга узрокује различите краткорочне и дугорочне промене когнитивних, емоционалних и бихејворалних функција (Sillberman i sar., 2016). Клиничке студије су указале на повезаност између изложености стресу у раном постнаталном периоду и каснијем повећаном ризику за настанак психијатријских поремећаја као и схизофреније (SCH), те се стога матернална депривација сматра једним од етиолошких чиниоца схизофреније (Ellenbroek i Cools, 1998).

1.2. Етиологија схизофреније

Схизофренија је комплексна, хетерогена, бихејворална и когнитивна болест чија етиопатогенеза укључује поремећај развоја мозга изазван генетским и/или факторима околине. Међу најзаступљенијим факторима за које се сматрају да имају учешћа у етиологији схизофреније су генска експресија, неуроимунолошки поремећаји, пренатални и перинатални стрес. Сматра се да је дисфункција допаминергичке трансмисије у основи позитивних симптома код оболелих од схизофреније (Owenn i sar., 2016). Међутим, потврђена је улога и других неуротрансмитера (серотонина, глутамата, ацетилхолина, норадреналина) у настанку схизофреније. Сматра се да саме промене у неуротрансмитерским системима представљају само фазу обољења, а да се основе самог обољења јављају још у раним периодима развоја централног нервног система које се манифестују у каснијим фазама развоја, када долази до преструктурисања система и елиминације неких синаптичких веза. Такође, се сматра да је главни разлог погрешне процене информација код схизофреније биохемијски и структурни поремећај мозга (Paunović i Vabinski, 1995). Данас се сматра да значајну улогу у настанку схизофреније могу имати следећи гени: неурегулин (Nrg1), дисбиндин

(DTNBP1), регулатор Г протеин-сигнала-4 (RGS4), оксидаза Д-амино киселине (DAAO), катехол-о-метил трансфераза (COMT) (Crow, 2008).

Фактори окружења везани за развој шизофреније обухватају животну средину, коришћење психоактивних супстанци и пренаталне стресоре. Утврђено је са доследношћу да живот у урбаној средини током детињства или у зрелом добу повећава ризик од шизофреније (Jim van Os, 2004). Други фактори који играју важну улогу су социјална изолација и миграција везана за социјалне недаће, расну дискриминацију, нефункционалност породице, незапосленост и лоше услове становања (Selten i sar., 2007).

Фактори као што су хипоксија, инфекција, стрес и потхрањеност код мајке током феталног развоја, могу да доведу до незнатног повећања ризика од шизофреније током каснијег живота. Постоји већа вероватноћа да су људи са дијагнозом шизофреније рођени у зиму или пролеће, што може бити последица повећаног степена изложености вирусима *in utero* (Yolken, 2004).

Велико интересовање је усмерено и на неуротрансмитер глутамат и смањену функцију NMDA глутаматских рецептора код шизофреније, највећим делом због абнормално ниских нивоа глутаматних рецептора пронађених *post mortem* у мозгу особа са дијагнозом шизофреније (Konradi i Heckers, 2003) као и због открића да лекови који блокирају глутамат, као што су фенциклидин и кетамин, могу да опонашају симптоме и когнитивне проблеме повезане са овим стањем (Lahti i sar., 2001)

Смањена функција глутамата се повезује са слабијим резултатом на тестовима који захтевају функцију чеоног дела мозга и хипокампуса, а глутамат може да утиче на допаминску функцију, при чему су оба повезана са шизофренијом, што указује на значајну посредничку, а вероватно и узрочну улогу глутаматских путева код овог стања (Coyle i sar., 2003).

1.3. Анимални модели у психијатрији

Анимални модели значајно доприносе испитивању механизма који се налазе у основи хуманих болести као и у осмишљавању нових третмана. Идеалан анимални модел би требало да опонаша симптоме, етиологију, биохемијске параметре као и одговор на терапију датог обољења (McKinney i Bunney, 1969). Јасно је да, када су у питању неуролошка и психијатријска обољења, не постоји идеалан анимални модел.

Анимални модели се сматрају хомологим уколико су симптоми и ток обољења код животиње исти као код човека. Willner (Willner, 1984) је поделио анималне моделе у психијатријским истраживањима по степену хијерархије на анималне моделе са предиктивним, очигледним и узрочним валидитетом.

Предиктивним анималним моделом процењује се само исход предвиђене радне хипотезе. Понашање саме животиње у оваквом моделу може да буде потпуно неповезано са симптомима обољења.

Очигледни валидитет имају модели који процењују феноменолошку сличност модела и самог обољења. Ови модели по хијерархијској лествици би требало да имају и предиктивни валидитет.

Највиши степен веродостојности пружају модели са узрочним валидитетом. Ови модели покушавају да опонашају психопатолошки узрок који се налази у основи обољења.

Поремећај когнитивних функција представља значајан феномен у оквиру схизофреније. Тешко је одређивати и мерити модалитете понашања код животиња који би одговарали хуманој схизофренији, али је могуће регистровати извесне индиректне корелате:

-Условљени одговор избегавања (UOI) један је од најчешћих фармаколошких модела за изучавање инхибиторних ефеката неуролептичке терапије (Worms i sag., 1983). Тест каталепсије представља додатну могућност за тестирање ефеката неуролептичке терапије на анималном моделу. Значај теста каталепсије огледа се у студијама неурофармакологије екстрапирамидних функција, као и могућност

брзе предикције нежељених моторних ефеката потенцијалних антипсихотичних медикамената (Sanberg i sar., 1988).

-Тест шапе одражава ефекте примене медикамената код пацова на спонтану ретракцију њихових екстендираних предњих и задњих удова (Ellenbroek i Cools, 1998). Као фармаколошки модел схизофреније овај тест показује специфичност антипсихотика уз изостајући ефекат антихолинергика на продужење ретракционог времена код задњих екстремитета (Ellenbroek i sar., 1989).

-Парадигма ауто – стимулације је утицај неуролептика на инхибицију оперантно условљене интракранијалне стимулације посредством притиска експерименталне животиње на полугу (Worms i sar., 1983) или интравенских доза кокаина (Roberts i Vickers, 1994). Обе наведене парадигме представљају допаминергични фармаколошки модел у чијој је основи механизам церебралне награде, при чему се неуролептички ефекти интерпретирају као типична индукција анхедоничног стања (Ettenberg i sar., 1981).

-Хомологи модели имају претензију да укажу на директну повезаност између понашања које показује анимални модел и бихејвиоралног спецификаума који се виђа у схизофренији и/или као последица основног процеса за који се сматра да дефинише схизофренију. Ови модели могу бити подељени у три типа. Први тип се односи на могућност анализе знакова и симптома схизофреније. Други тип покушава да код експерименталних животиња репродукује упадљиве симптоме који се виђају у схизофренији, а односе се на поремећај социјалног функционисања. Трећи тип репродукује физиолошке поремећаје који су теоретски повезани са етиологијом схизофреније (Freedman i Waldo, 1991).

-Латентна инхибиција представља добро проучени модел селективне пажње. У оквиру овог модела предложено је да неутрална презентација стимулуса успорава асоцијативно условљено учење стимулуса који следе (Lubow, 1973). Феномен латентне инхибиције покушава да репродукује дефицит пажње у схизофренији који се јавља као последица неадекватне и нефлексибилне стратегије обраде и филтрирања стимулуса. Латентна инхибиција садржи паралелу са конструктима схизофреније код којих поремећај пажње није доминантан, као што је дефицит

контроле понашања у односу на контекст (Lubow, 1998) и утицај претходног искуства на перцепцију актуелних догађаја (Hemsley, 1997).

-Блокирајућа парадигма представља модел истраживања селективне пажње и утицаја контекста и претходног искуства на актуелну перцепцију и учење (Gray i sar., 1992). Задаци који обрађују проблем блокирајуће парадигме укључују претходну експозицију стимулусом, условљавање као и компоненту бихејвиоралног тестирања (Kamin, 1969). Блокирајући задаци су се иницијално користили као модел амфетамин – индукујућих психоза или егзацербираних психоза (Crider i sar., 1982).

-Социјална интеракција пацова предложена је као анимални модел за процену деловања психофармака на социјално понашање у оквиру схизофреније (Corbet i sar., 1997).

Деградација социјалних вештина представља значајну карактеристику схизофреније и повезана је са хроничном фазом и негативном формом овог поремећаја (Kibe i sar., 1993). Бихејвиорални ефекти амфетамином индуковане активације допаминских рецептора већ је релативно прихваћен као анимални модел психотичних симптома (Ellinwood i sar., 1972). Анимални бихејвиорални модели који се односе на индукцију хипердопаминергичког стања изведени су из тврдње о учешћу допамина у неурохемијској патологији схизофреније (Davis i sar., 1991). Индиректни подаци о хиперактивности допаминских неурона који инервишу субкортикалне структуре, односе се на бихејвиоралне симптоме пацијената, егзацербацију посредством допаминомиметика, као и на њихов терапеутски одговор на антидопаминергични третман (Crees i sar., 1976). Савременије реформулације допаминске хипотезе постулирају хипоактивност допаминских неурона који инервишу префронтални кортекс као неуралну базу негативних симптома у схизофренији (Davis i sar., 1991).

-Модел хроничне амфетаминске интоксикације представља анимални бихејвиорални аналог већине хуманих позитивних и негативних симптома схизофреније. Употреба техника за приказивања можданих функција („imaging“ техника) може да демонстрира паралелу између функционалне неуроанатомије

схизофреније (Tamminga i sar., 1999) и хроничне амфетаминске интоксикације, као и да представља значајан прилог у клиничкој валидизацији овог модела.

-Модели генетске селекције представљају пројекат мапирања хуманог генома, поред напора да се „дешифрује“ генска карта човека, креиране су и мапе мишјег и пацовског генома, које могу бити врло корисне у изналажењу гена који контролишу одређене модалитете понашања. Значајна област у којој се могу примењивати генетске селекције се односи на психофармакологију. Генетски, различити сојеви мишева показују и различите реакције у односу на деловање неуролептика и индукцију каталепсије (Fink i sar., 1982).

-Фенциклидински модел схизофреније је углавном праћен на глодарима и приматима (мајмуни). Праћене су промене понашања везане за некогнитивне функције (некогнитивно понашање) и промене понашања везане за когнитивне функције (когнитивно понашање). Испитивани су локомоторна активност, сензомоторно спровођење, когнитивне функције, мотивација и понашање у друштву (Steinpreis, 1996). Студије су показале да администрација фенциклидин изазива промене код глодара које могу одговарати променама које се јављају код оболелих од схизофреније. Локомоторна активност код глодара може да представља користан показатељ способности неког једињења да изазове или погорша психозу (Moghaddam i sar., 1998). Једнократна доза фенциклидина код пацова доводи до оштећења препулсне инхибиције акустичног надражаја (Geyer i sar., 1984). Као последица дуготрајног третирања животиња фенциклидином долази до промена социјалног понашања у смислу смањења социјалне интеракције међу пацовима, затим појачане локомоторне активности (локомоторне сензитизације) као и измењених когнитивних функција (Jentsch, 1999)

Анимални модели схизофреније такође (Lipska i Weinberger, 2000) могу да представљају обољење на три различита нивоа :

-репродуковање индукујућег фактора (генетски дефицит и следствени патолошки процес)

-опонашање феномена (спектар симптома схизофреније) и

-предвиђање одговора на већ постојећу терапију (антипсихотични лекови).

У покушају да се разреши мистерија етиопатогенезе шизофреније, очекује се да ће анимални модели ове болести омогућити давање одговора на питања „када“ и „где“ се одигравају неуропатолошки процеси у мозгу који се налазе у основи шизофреније и на који начин захватају когнитивне процесе. Отуда је за очекивати да ће будући анимални модели шизофреније бити „конструисани“ посредством комплексне интеракције генски контролисаних неуротрансмitera што ће представљати значајан помак ка разумевању и третману шизофреније. Иако животињски модели не могу да понове људску психопатологију у сваком детаљу, они треба да буду правилно замишљени као експериментални систем у којем се специфична питања могу истражити на начине које је немогуће учинити код људи. У општем разматрању анималних модела, морају се утврдити протоколи за модел који је дизајниран да симулира специфичне симптоме, да тестира одређену етиолошку теорију, да студирају темељна понашања и неуробиолошке механизме и оних чија је главна улога да омогући клиничка истраживања лекова. Пошто се матернална депривација сматра једним од етиолошких чиниоца шизофреније, животињски модели нуде могућност анализе главних ефеката и интеракција на контролисан начин.

1.4. Матернална депривација као анимални модел шизофреније

Анимални модел матерналне депривације спада у неуроразвојне анималне моделе шизофреније. Овај модел подразумева рано одвајање младунаца од мајке, у одређеном постнаталном периоду на одређено време. Обзиром да је код већине сисара однос мајка-младунац веома важан за нормалан постнатални развој, губитак овог односа може представљати основ за развој психијатријских поремећаја у каснијем животном добу (Rice i Stan, 2000). Модел је првобитно коришћен за испитивање утицаја „раног стресног догађаја“, као што је одвајање младунаца од мајке у критичном периоду постнаталног неуроразвоја на нормалан развој хипоталамусно-хипофизно-надбубрежне осовине (НРА) (Rots i sar., 1996;

van Oers i sar., 1997). Литературни подаци описују неколико различитих протокола за овај анимални модел. Протоколи се разликују у постнаталном периоду када се младунци одвајају од мајке као и временском интервалу сепарације (Marco i sar., 2015).

Ellenbroek и sar. (Ellenbroek i sar., 1998) су 90-их година прошлог века први сугерисали да је матернална депривација валидан анимални за проучавање схизофреније, обзиром да су претходна истраживања указала да излагање стресу, као што је матернална депривација, узрокује различите бихејворалне промене код пацова, које веома подсећају на симптоме схизофреније код људи (Ellenbroek i sar., 2005; Ellenbroek i Riva, 2003; Ellenbroek i sar., 1998).

Термин „рани стресни догађај“ у овом моделу не подразумева само сепарациони стрес (Marco i sar., 2015) већ је то комбинација „стресних фактора“, пре свега хипогликемије и снижења нивоа лептина код матернално депривираних животиња (Viveros i sar., 2010a; Viveros i sar., 2010b).

Сматра се, да недостатак мајчиног присуства и неге игра улогу кључног стресора у овом моделу, обзиром да је запажено да одмах након поновног спајања мајке и младунаца долази до интензивирања мајчинске неге у смислу повећане тактилне стимулације (учесталост тимарења и лизања) (Llorente-Berzal i sar., 2011), што указује на чињеницу да мајка може/покушава да компензује или смањи негативне ефекте матерналне депривације (Macri i sar., 2008).

Други стресни фактор представља одсуство исхране током читавог периода сепарације, што узрокује драматичан пад нивоа лептина (чији је основни извор у овом периоду мајчино млеко) који заједно са значајном епизодом хипогликемије у овом периоду представља додатни стрес за младунце одвојене од мајке (Viveros i sar., 2010a).

На крају, али не и најмање важан стресор је хипотермија младунаца, због незрелог терморегулационог центра. Заправо, одавно је познато да температура, пре свега хипотермија матернално депривираних пацова доводи до појачане осетљивости пацова на администрацију амфетамина. Овај утицај која се огледа у појачаном

локомоторном одговору на амфетамин код матернално депривираних животиња, (Zimmerberg i Shartrand, 1992).

Осим самих стресора, од изузетног је значаја и временски период када се и на колико дуго врши одвајање младунаца од мајке. Ellenbroek и сар. (Ellenbroek i сар., 1998) су показали да матернална депривација деветог постнаталног дана (PN9) доводи до највећих промена у понашању пацова, пре свега у препулсној инхибији, док су новије студије указале и потврдиле да је PN9 критичан у постнаталном неуроразвоју развоју и да одвајање младунаца у овом периоду прати дугорочно оштећење емоционалног одговора, односно неспособност исказивања емоција различитог степена (LTP) (Gruss i сар., 2008).

На основу досадашњих литаратурних података може се закључити да је PN9 „критичан период“ у поснаталном неуроразвоју, али неуропатолошки механизми који стоје у основи ових поремећаја нису у потпуности разјашњени.

1.5. Холинергички систем и схизофренија

Холинергичка трансмисија представља нервну трансмисију која се обавља путем неуротрансмитера ацетилхолина (ACh). То је једини вид трансмисије у парасимпатичком систему, а одвија се и у свим аутономним синапсама као и на неуромишићној спојници и у CNS.

Ацетилхолин у централном нервном систему има важну улогу у многим функцијама, као што су ексцитабилност (Woody i Gryen, 1987), пажња (Bucci i сар., 1988; Voytko i сар., 1994), учење (Fine i сар., 1997; Miranda i Bermãõdez-Rattoni, 1999), памћење (Hasselmo i сар., 1992; Sarter i Bryno, 1997), одговор на стрес (Newman i сар., 2001), стање будности и спавање (Jiménez-Capdeville i Dykes, 1996) и кортикалну модулацију сензорних информација (Donoghue i Carroll, 1987; Lycas-Meynier i сар., 2003; Metherate i сар., 1992; Pepey i Blandina, 1998). Проучавање ACh у меморичким процесима показује да ACh има улогу у првој фази учења (у активацији), а не у фази препознавања (Miranda i Bermãõdez-Rattoni, 1999).

Такође, сматра се да је Асh укључен у просторну радну меморију (Переу и Blandina, 1998). Одговор на стрес индукује отпуштања АСh у великом мозгу. Ово отпуштање АСh је одговорно за физиолошке и емоционалне реакције, нарочито делујући на хипоталамо-хипофизни систем (Newman i sar., 2001).

Холинергичке пројекције у предњем мозгу су класификоване у 6 главних централних путева повезаних са телима неурона (Ch1-Ch6) одакле почиње пружање холинергичких влакана (Mesylam i sar., 1983). Тела холинергичких неурона у септуму (Ch1) и усправном краку *tr.diagonails-a* (Ch2) се пројектују у хипокампус док се тела холинергичких неурона у *nc.pedunculopontinus* (део Ch5) и *nc.tegmentalis dorsolateralis* (Ch6) пројектују из можданог стабла у таламус. Тела холинергичких неурона у спољашњем делу хоризонталног крака *tr.diagonalis-a* (Ch3), се пројектују у *bulbus alfactorius*. Пут који инервише кортекс (Ch4) углавном потиче из *nc.basalis magnocellylar*. Холинергичка влакна из *nc.basalis magnocellylare* се пројектују у кортекс са топографском организацијом према rostroкаудалном, вентродорзалном и медиолатералном градијенту. За разлику од примата, код пацова тела неурона нису јасно ограничена. Код пацова Ch4 група, поред *nc.basalis magnocellylare*, потиче и из неколико других једара, као што су *substantia innominata*, *nc.tractus diagonalis*, *nc. ansa lenticularis* и део *nc.preopticus magnocellulare* (Lycas-Meynier i sar., 2003).

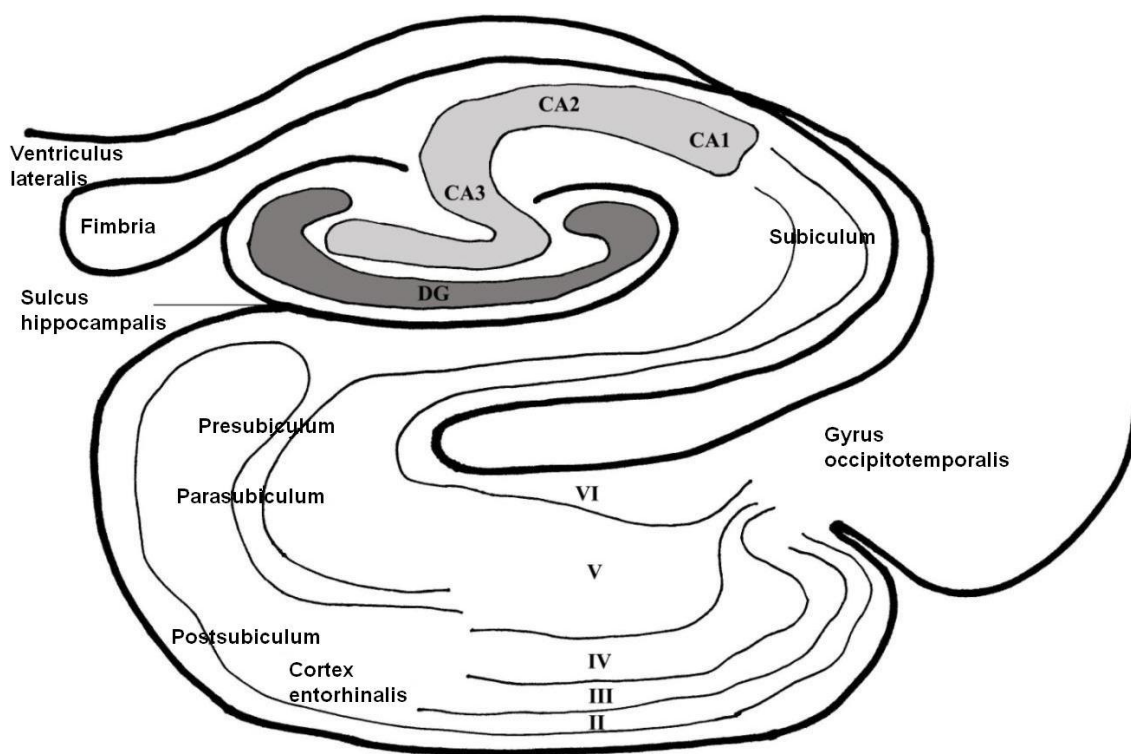
Хипокампус обухвата *hippocampus proper* и *gyrus dentatus*. Међутим, назив хипокампадна формација се често користи и обухвата *hippocampus proper*, *gyrus dentatus* и *subiculum* (слика 1). Бројни су били покушаји класификације слојева хипокампуса и *gyrus dentatus*-а. Најједноставнија подела дели хипокампус пацова на горње (*regio superior*) и доње подручје (*regio inferior*) (Cajal, 1911). Међутим, Lorente de No (Lorente de No, 1934) је поделио хипокампус на три поља, СА1, СА2 и СА3.

По његовој класификацији која се данас најчешће користи, горње подручје (*regio superior*) одговара СА1 пољу, а доње подручје (*regio inferior*) одговара пољу СА3. Пирамидалне ћелије СА1 региона имају на пресеку троугласти облик и релативно су мале и разбацане. Између СА1 и СА3 подручја налази се прелазни СА2 регион

који се састоји од великих, овалних и густо смештених тела неурона. Поље СА3 се налази на месту где Амонов рог прави колено.

У неуронским круговима хипокампуса појављују се готово сви познати неуротрансмитери и модулатори који на свој начин утичу на функцију хипокампуса.

Новија истраживања функционалном магнетном резонанцом (fMRI) показују да код психијатријских обољења постоји мањи број веза између хипокампуса, чеоног режња, таламуса и путамена (Knöchel i sar., 2014). Структурне промене у хипокампусу су најчешћи налаз код психијатријских болести међу којима је и схизофренија (Tamminga i sar., 2010).



Слика 1. Модификовано из Radonjić i sar., 2014.

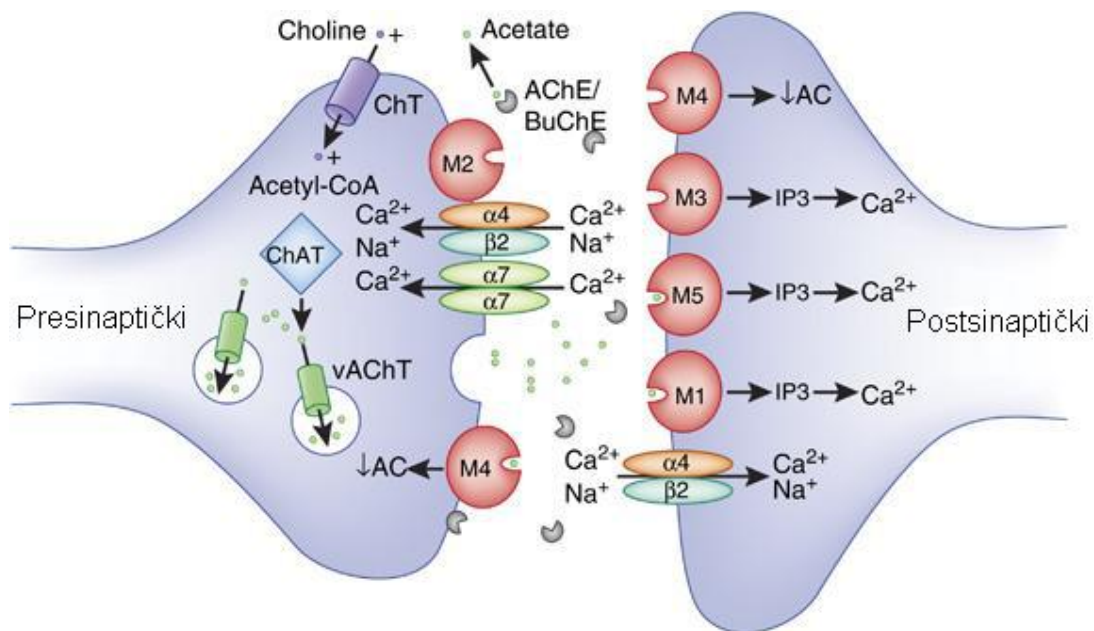
Схематски приказ хипокампадне формације која обухвата *hippocampus proper*, *gyrus dentatus* и *subiculum*, као и њен однос са околним структурама.

Једном отпуштен у синаптичку пукотину, АСh делује на две класе ацетилхолинских рецептора: никотинске и мускаринске.

Никотински рецептори припадају класи јонотропских рецептора и могу се наћи и у централном (СNS) и у периферном нервном систему. У CNS-у различите врсте никотинских рецептора имају карактеристичну анатомску дистрибуцију и физиолошке карактеристике (Lucas-Meynier i sar., 2003).

Мускарински рецептори имају важну улогу у можданим процесима као што су когниција, пажња и сећање (Hyde i Crook, 2001).

Мускарински рецептори представљају метаботропне рецепторе. Идентификовано је пет гена који кодирају пет типова мускаринских рецептора, M1-M5 (Kubo i sar., 1986).



Слика 2. Модификовано из Jones i sar., 2011.

Схематски приказ холинергичке синапсе и функције рецептора од значаја у етиопатогенези шизофреније.

M1 мускарински рецептори се примарно налазе постсинаптички и најзаступљенији су у кортексу. M2 рецептори су преобладајуће пресинаптички на аксонским терминалним холинергичких неурона, где инхибирају отпуштање ацетилхолина. M4 рецептори се налазе постсинаптички у кортексу.

Ензим ацетилхолин естераза (AChE) врши терминацију неуротрансмисије посредоване ацетилхолином, разарајући ACh на ацетат и холин. Поред своје класичне улоге, показано је да овај ензим има и изузетно значајну неензимску функцију.

AChE има структурну хомологију са групом неуронских адхезионих протеина, укључујући неуролигине и протеине *Drosophila*, гликотактин и неуротактин, који су због тога названи CLAMs (*cholinesterase-like adhesion molecules*).

Ово указује на могућу улогу AChE као адхезионог протеина који је укључен у синаптички развој и одржавање (Silman i Sussman, 2005). Такође, показано је да је AChE укључена у раст неурита: екзогенно пречишћени AChE је промовисао раст неурита у култури неурона пилета; антагонизовање овог ефекта је постигнуто применом инхибитора периферног (анјонског) места, док примена инхибитора активног места није имала утицај на промовисање раста неурита у култури (Soreq i Seidman, 2001).

Поремећај мускаринских рецептора и нивоа ацетилхолина је описан код пацијената са шизофренијом и повезан је са когнитивним оштећењем у овом обољењу (Deng i Nyang, 2005; Li i sar., 2007; Newell i sar., 2007). Такође, претходне студије су показале да ксаномелин (xanomeline), M1/4 рецепторски агониста побољшава когницију и смањује симптоме психозе код пацијената са шизофренијом (Shekhar i sar., 2008).

Типични антипсихотици показују високу ефективност у редуковању позитивних симптома али не показују ефективност у редуковању негативних симптома и когнитивних поремећаја (Foster i sar., 2012; King, 1998; Tandon i sar., 1991), због тога се сматра да је холинергички систем мета за развој нових лекова који ће успешније редуковати негативне симптоме SCH као и поремећаје когниције (Freedman i sar., 2008; Scarr, 2012).

1.6. Оксидативни стрес у етиопатологији схизофреније

Савремена дефиниција оксидативног стреса узима у обзир два различита исхода: макромолекуларно оштећење и нарушавање тиолних редокс путева, што доводи до аберантне ћелијске сигнализације и нефункционалне редокс контроле (Jones, 2008).

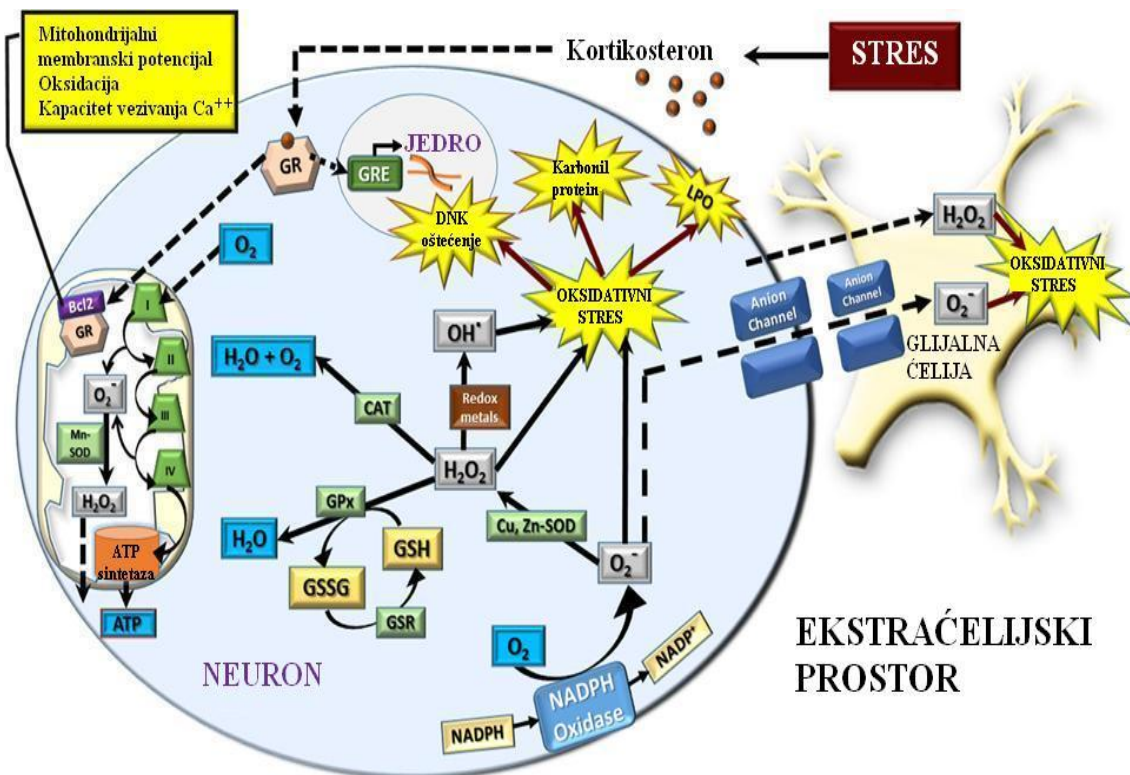
Слободни радикали су атоми, јони или молекули који у спољашњој електронској орбитали садрже један или више неспарених електрона, што их чини нестабилним и реактивним. Једном настао слободни радикал (фаза иницијације) може изазвати низ ланчаних реакција (фаза пропагације) реагујући са другима мање реактивним врстама, док се коначно (фаза терминације) не уклони помоћу неензимских антиоксиданаса, ензимским механизмима или у реакцији једних с другима.

Кисеонички слободни радикали (ROS) садрже кисеоник и имају способност да одузму електрон из мноштва органских и неорганских молекула и атома.

У кисеоничке слободне радикале спадају супероксидни анјон (O_2^-), хидроксил радикал (OH), перихидрокси радикал (HO_2), алкокси радикал (RO), перокси радикал (ROO), синглет кисеоник и ексцитирани карбонил. Водоник пероксид (H_2O_2) по својој хемијској структури не представља слободни радикал, али због своје способности да продукује слободне радикале убраја се у ову групу.

Кисеонички слободни радикали се стварају у физиолошким метаболичким реакцијама. Нормално, продукција слободних радикала је ниска и организам може да их неутралише, метаболише или користи као супстрат захваљујући молекулима који уклањају слободне радикале као што су ензимски и неензимски антиоксиданси. Ипак, под неким патофизиолошким условима, долази до накупљања кисеоничких слободних радикала који оштећују ћелију. Оксидативни стрес настаје као последица нарушене равнотеже између стварања прооксиданата и антиоксидативне одбране (Pora-Wagner i sar., 2013).

У току стресног одговора због повећане метаболичке активности мозга, те повећане потрошње кисеоника, као и због високе концентрације глукокортикоида, долази до оксидативног стреса мозга (слика 3). Ово се одвија преко два механизма: повећањем продукције реактивних кисеоничких врста и/или смањењем нивоа антиоксидативне заштите мозга. Оштећење протеина ћелијске мембране оксидативним стресом праћено је поремећајем сигналне трансдукције, док оштећења митохондрија воде ка смањењу продукције енергије, изласку калцијума из депоа у цитосол и смрти неурона. Повећани нивои глукокортикоида могу у стресу узроковати промене поларизације митохондријске мембране, излазак цитохрома С у цитосол, активацију каспазе 9 и апоптозу неурона (Du i sar., 2000).



Слика 3. Модификовано из Spiers i sar., 2015.

Схематски приказ неуронске редокс регулације као одговор на стрес.

Неколико биохемијских и физиолошких особина чини нервни систем изузетно осетљивим на оксидативно оштећење. То су: висок степен оксидативне

метаболичке активности, високе концентрације молекула који су осетљиви на напад кисеоничких слободних радикала (нпр. полинезасићене масне киселине) и низак ниво молекула који уклањају слободне радикале (Mrsulja, 1994).

У уклањање слободних радикала су укључена два нивоа одбране: ензимски антиоксидантни систем и ендogene супстанце које неутралишу слободне радикале. У примарне ензиме антиоксидативне заштите који уједно представљају и маркере оксидативног стреса, спадају супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPx), који уклањају слободне кисеоничке радикале и спречавају ланчану реакцију пропагације слободних радикала (Ђорђевић и сар., 2000).

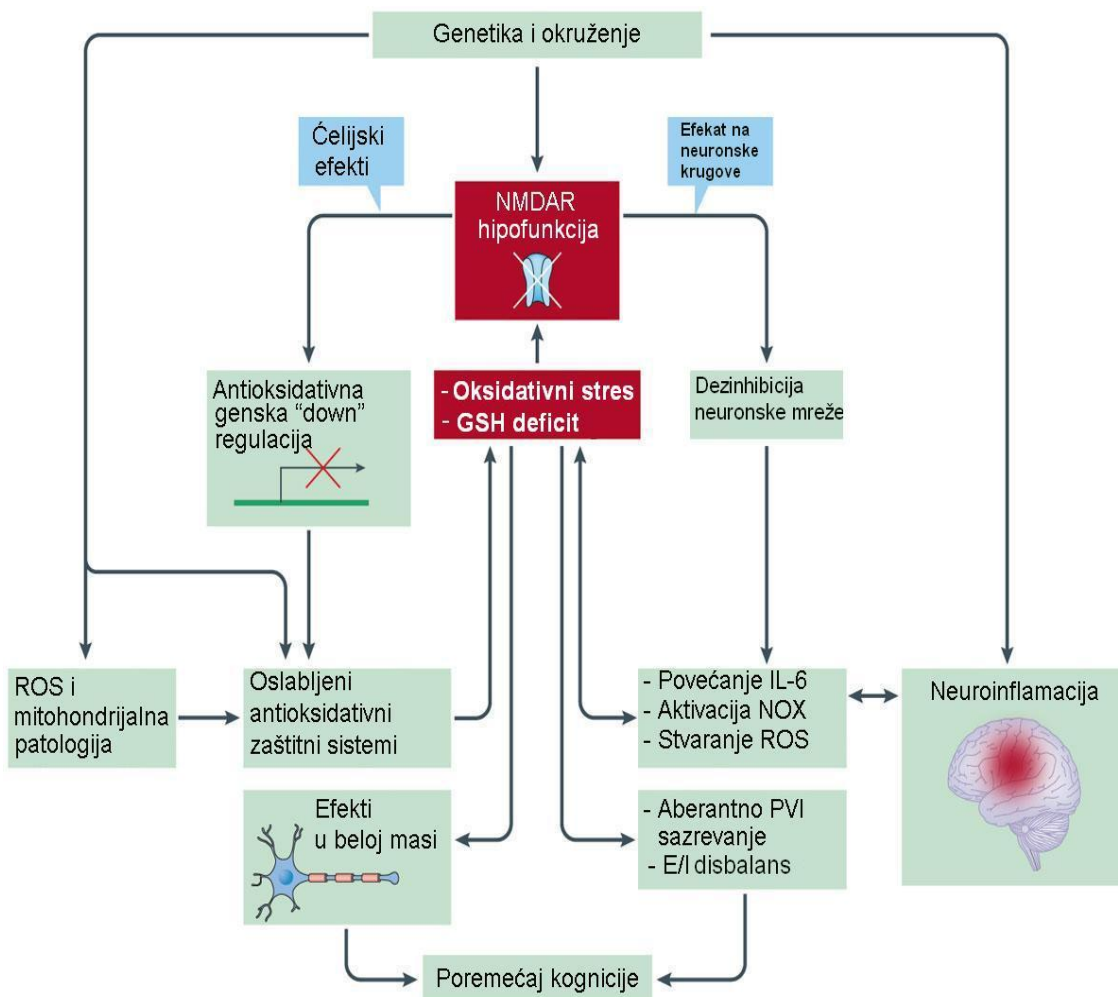
У ендogene супстанце које уклањају слободне радикале спадају глутатион (GSH), α -токоферол (витамин Е), аскорбинска киселина (витамин Ц), каротеноиди, флавоноиди, церулоплазмин, трансферин и лактоферин (Burton i Ingold, 1990; Haliwell i Gutteridge, 1990).

Глутатион (γ -glutamylcysteinylglycin) је главни ендогени антиоксидант у ћелији, који регулише редокс статус у ћелијама штитећи сулфхидрилне - групе протеина које су неопходне у редокс осетљивим процесима као што су регулација ћелијског циклуса, диференцијације, NMDA рецепторска модулација (Lipton i сар., 2002) и сигнална трансдукција (Слика 4).

Литературни подаци указују на снижење нивоа GSH у еритроцитима (Altuntas i сар., 2000; Raffa i сар., 2009, Raffa i сар., 2011) и ликвору (Do i сар., 2000) нелечених пацијената оболелих од шизофреније, као и префронталном кортексу и репатом једру пацијената оболелих од SCH (Matsuzawa i сар., 2008; Do i сар., 2004). *Postmortem* студије пацијената оболелих од SCH показале су снижење нивоа GSH у префронталном кортексу и репатом једру (Gawryluk i сар., 2011) код особа лечених од SCH. Студије рађене магнетном спектроскопијом (*magnetic resonance spectroscopy studies*) указују на опречне резултате.

Do i сар. (Do i сар., 2000) су указали на снижење нивоа GSH од 52% у префронталном кортексу код пацијената са првом епизодом SCH („drug-naive“),

док друге сличне студије нису детектовале снижење нивоа GSH у предњем цингуларном коректсу (Terpstra i sar., 2005), задњем медијалном кортексу (Matsuzawa i Hashimoto, 2011) и медијалном темпоралном лубусу (Wood i sar., 2009).



Слика 4. Модификовано из Hardingham i Do, 2016.

Схематски приказ повезаног деловања NMDA хипофункције и оксидативног стреса у етиопатогенези шизофреније.

Међутим, двогодишња лонгитудинална студија је показала да снижење нивоа GSH може предвидети губитак волумена мозга код деце и адолесцената са првом епизодом психозе (Fraguas i sar., 2012).

Ниво GSH у ћелији пре свега зависи од прекурсора и активности ензима укључених у његову синтезу. Ензим γ -глутамин цистеин лигаза (γ - GCL) катализује први корак у синтези и ограничава ток реакције синтезе GSH.

Глутатион пероксидаза је фамилија више различитих изоезима (GPx 1-8) чија је главна улога у ћелијама протективна у односу на оксидативни стрес. Овај селено протеин у свом активном центру уместо нормалног цистеина, садржи селеноцистеин.

Пероксидазе које садрже селен сачињавају фамилију ензима којој припадају најмање четири типа ензима.

„Класична“ глутатион пероксидаза (сGPx) делује на H_2O_2 и хидропероксиде масних киселина и холестерола, али не и на естерификоване липиде као што су они присутни у липопротеинима.

Фосфолипидна хидропероксидна глутатион пероксидаза (PHGPx) је једини ензим за који се зна да редукује липидне хидропероксиде из липопротеина. Ова изоформа је везана за мембрану, и као и сGPx се не налази у екстрацелуларним течностима (Maljak, 2009). Заправо, основна биолошка функција GPx је да редукује липидне хидропероксиде у одговарајуће алкоhole, а слободан водоник пероксид у молекуле воде, док ензим глутатион редуктаза (GR) регенерише оксидовани глутатион (GSSH) у редуковану форму GSH.

Раније *postmortem* студије пацијената оболелих од SCH показале су снижење активности GPx и GR у *nc.caudatus-u* (Yao i sar., 2006), снижење GPx, као и непромењену активност GR у префронталном кортексу (Gawryluk i sar., 2011).

Супероксид дизмутаза (супероксид-супероксид оксидоредуктаза, EC 1.15.1.1;) су фамилија металоензима који каталишу дизмутацију супероксидног анјона у водоник пероксид, који се даље под дејством каталазе или глутатион пероксидазе разграђује на воду и молекулски кисеоник.

У ћелијама сисара се налазе три форме супероксид дизмутаза са карактеристичним локализацијама: ванћелијска SOD (EcSOD), манган SOD и бакар-цинк SOD (Fridovich). Манган супероксид дизмутаза (MnSOD, SOD-2) се

налази у митохондријама, док се бакар-цинк SOD (Cu,Zn-SOD, SOD-1) преобладајно налази у цитосолу и нуклеоплазми (Slot, 1986).

SOD је широко распрострањена у мозгу чија се активност са годинама постепено повећава (Mavelli, 1982; Scarpa, 1987). О дистрибуцији овог ензима у централном нервном систему постоје опречни литерарни подаци. Морено и сарадници (Moreno i sar., 1997) су имунохистохемијским методама показали ексклузивну дистрибуцију Cu,Zn-SOD у неуронима и то преобладајно у церебралном кортексу, хипокампусу, таламусу, *colliculus superioris*-у, *substantia nigra*, церебеларном кортексу и кичменој мождини. За разлику од њих Lindenau и сарадници (Lindenau i sar., 2000) су такође имунохистохемијским методама показали присуство Cu,Zn-SOD преобладајно у астроцитима, док је локализација MnSOD била претежно у неуронима.

Такође литерарни подаци показују контрадикторне податке који се односи на активност SOD код пацијената оболелих од SCH. Различите студије показују повишење (Reddy i sar., 1991; Zhang i sar., 2003), снижење (Akyol i sar., 2002; Ranjekar i sar., 2003; Zhang i sar., 2006; Raffa i sar., 2009) или непромењену активност SOD у крви пацијената оболелих од схизофреније (Yao i sar., 1998; Raffa i sar., 2011). Скорашња студија је показала да код пацијента оболелих од SCH у акутној фази, активност серумске SOD је у негативној корелацији са активношћу серумске GPx, док је ниво серумског GSH у позитивној корелацији са активношћу серумске GPx (Tsai i sar., 2013).

С друге стране, мерењем нивоа продуката липидне пероксидације као директног показатеља оксидативног оштећења, показано је оксидативно оштећење код пацијената са схизофренијом (Dietrich-Muszalska i Olas, 2009; Zhang i sar., 2010).

Липидна пероксидација је оксидативно оштећење које захвата ћелијске мембране, липопротеине и друге молекуле који садрже липиде у условима постојања оксидативног стреса. Липиди ћелијске мембране представљају најчешће супstrate оксидативног напада. Једном покренута реакција пероксидације наставља се аутокаталитички и има прогредијентни ток (Anthonymuthu i sar.,

2016). Полинезасићене масне киселине у фосфолипидима и гликолипидима, као и холестерол у биолошким мембранама представља основни супстрат за оксидативно оштећење липида узроковано слободним радикалима. У току процеса липидне пероксидације настају примарни високореактивни интермедијери: алкил радикали, коњуговани диени, перокси- и алкокси- радикали, као и липидни хидропероксиди. Даљом разградњом ових примарних продуката настају секундарни продукти липидне пероксидације, кратколанчани испарљиви угљоводоници, алдехиди и крајњи производ липидне пероксидације, малондиалдехид (MDA) (Adibhatla i Hatcher, 2010).

1.7. Митохондрије и етиопатогенеза схизофреније

Митохондрије имају кључну улогу у процесу синтезе аденозин трифосфата-а (АТФ), али учествују и у ћелијским функцијама као што су пренос сигнала, ћелијска диференцијација, апоптоза као и контрола ћелијског циклуса и раста. За адекватно функционисање митохондрије, али и саме ћелије, неопходно је правилно функционисање респираторног ланца митохондрија смештеног на унутрашњој мембрани митохондрије. Сматра се да поремећај на нивоу респираторног ланца митохондрија, може имати значајну улогу у патофизиологији схизофреније (Marazziti i sar., 2012), обзиром да су митохондрије значајан потенцијални извор слободних радикала.

Скорашње студије су сугерисале да ултра-структурне промене одговорне за митохондријалну дисфункцију могу бити значајан чинилац у етиопатогенези схизофреније (Somerville i sar., 2011; Robicsek i sar., 2013). Такође је показано, да плурипотентне матичне ћелије фоликула длаке оболелих од схизофреније показују абнормалну неуралну диференцијацију услед дисфункције митохондрија (Robicsek i sar., 2013).

Post mortem студије су такође показале прогресивне поремећаје функције астроцита због дефицита митохондрија у оболелих од SCH (Kolomeets i Uranova, 2010). Осим тога, претпоставља се да би оксидативни/нитрозативни стресни

одговор услед митохондријалне дисфункције могао активирати имуноинфламаторне путеве и потом довести до неуропрогресивних промена које прате ово обољење (Rajasekaran i sar. 2014). Клиничка истраживања показала су повишен ниво активности комплекса I митохондријалног респираторног ланца у тромбоцитима пацијената оболелих од шизофреније (Ben-Shachar i sar., 1999).

Цитохром *c* оксидаза (COX) је терминални ензим у транспорту електрона у респираторном ланцу митохондрија. Важност овог ензима за ћелије огледа се у томе што се више од 90% сопственог биогеног кисеоника процесира у њему. Најновије постмортем студије су указале на поремећај експресије одређених субјединица (субјединица II и субјединица IV/1) овог ензима, код оболелих од шизофреније (Rice i sar., 2014). Стварање ROS-ау митохондријама се до недавно сматрало главним узроком оксидативног стреса.

1.8. Улога ензима NADPH оксидазе у етиопатогенези шизофреније

Најновија истраживања све више указује на улогу никотинамид аденозин динуклеотид фосфат оксидазе (NADPH oksidaza, NOX) у настанку оксидативног дисбаланса у шизофренији.

Фамилија NADPH оксидаза се састоји од најмање седам до сада откривених изоформи – NOX 1 до 5 и DUOX 1 и 2, које имају јединствену дистрибуцију у организму и могу се детектовати у разним ткивима и централном нервном систему (Sorice i Krause, 2009). Истраживања су такође показала значајну физиолошку функцију NADPH оксидаза у ћелијама сисара у модулацији мултиплих редокс сензитивних унутарћелијских образаца путем којих се могу генерисати ROS молекули (Bedard i Krause, 2007).

NOX ензими су широко распрострањени у CNS-у где, како се сматра, имају значајну улогу како у физиолошком функционисању тако и у настанку појединих обољења мозга.

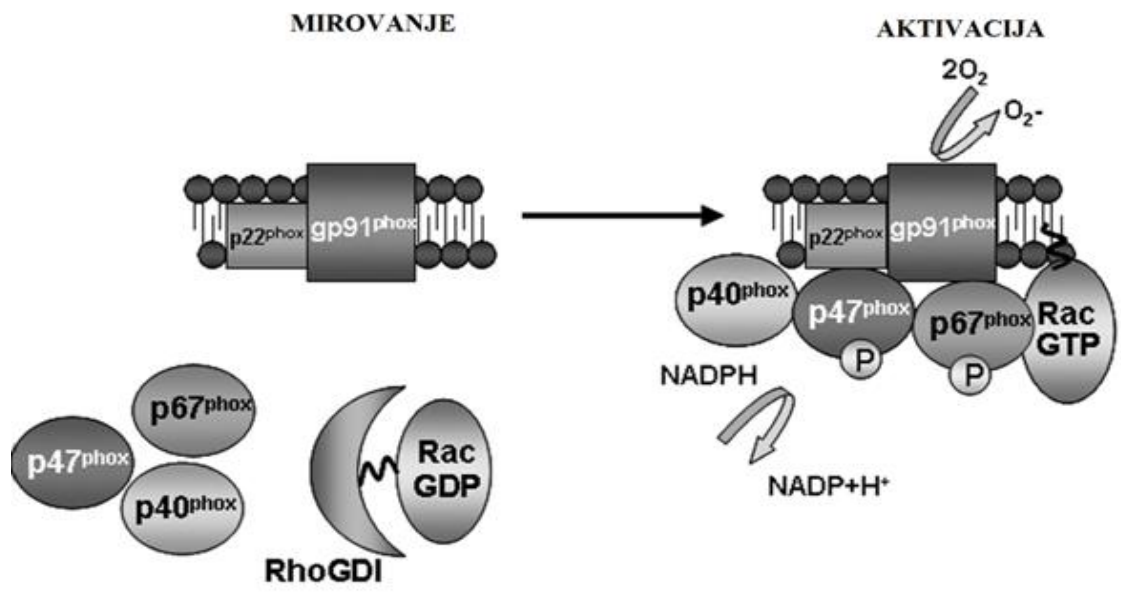
Експресија изоформи NOX₁₋₃ показана је у неуронима, микроглији и астроцитима (Sorice i Krause, 2009).

NOX₁ појачава осетљивост неурона на инфламаторни бол, док дефицијенција овог ензима снижава топлотну и механичку хипералгезију током инфламације али не утиче на ноцицептивни одговор на топлоту или механички стимуланс (Ibi i sag., 2008).

NOX₂ протеин је хетеродимер са већом субјединицом gp91^{phox} и трансмембранском субјединицом p22^{phox} док је је комплекс субјединица: p47^{phox}, p67^{phox} i p40^{phox} цитосолан и учествује у процесу активације фагоцита (Babior, 2014).

Познато је да макрофагна фагоцитна NOX2 комплекс и састоји се од два типа субјединица. Мембранске интегралне субјединице и цитосолне субјединице. Мембрански протеини, p22^{phox} и gp91^{phox} се везују за каталитичку субјединицу комплекса, хетеродимерни флавопротеин познат и као cytochrome b558. Цитосолне компоненте (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} i Rac1) дистрибуиране су у цитоплазми. Доказано је да се стимулацијом ове цитосолне компоненте активира сигнални образац, који иницира транслокацију мембранских субјединица и формирање активног комплекса (Bedard i Krause, 2007).

NOX се активира када се цитосолна субјединица фосфорилише заједно са Rac1 протеином резултирајући транслокацијом на мембрану, повезивањем са трансмембранским субјединицама и настанком активне формације комплекса NADPH oksidaze. Крајњи продукт је настајак супероксида (Lambeth, 2004; Bedard i Krause, 2007; William, 2008) (слика 5).



Слика 5. Модификовано из Wilkinson i Landreth, 2006. Активација макрофагног NADPH оксидаза комплекса. Стимулација микроглије индукује активацију цитоплазматских компоненти. Током активације долази до преласка Rac1 у активну форму, посредовану гуанозин трифосфатом (GTP) и фосфорилације субјединица p47^{phox} и p67^{phox}. Ове субјединице се транслоцирају на мембрану где реагују са p22^{phox} и p91^{phox} (NOX₂) изазивајући продукцију реактивних кисеоничких радикала.

Најбоље документовано хумано обољење везано за губитак функције NOX ензима је хронично грануломатозно обољење. У питању је имунодефицијенција изазвана мутацијом једног од гена који врше експерсију NOX₂ комплекса (Stasia i Li, 2008). Новија истраживања указују на значај улоге NOX-а у етиопатогенези схизофреније (Sorice i sar., 2012; Yuan i sar., 2015).

Берхенс и сар. (Behrens i sar., 2007) су на кетаминском анималном моделу схизофреније показали утицај NOX₂ зависне продукције ROS-а и утицај на кортикалне кругове. Разумевање улоге NADPH оксидазе у етиопатологији схизофреније може отворити нове терапијске приступе у лечењу оболелих од схизофреније.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Матернална депривација доводи до стреса у раном периоду живота, и праћена је различитим променама у понашању пацова које подсећају на симптоме шизофреније код људи и представља један од актуелних анималних модела ове болести. Досадашња испитивања су показала да стрес у раном периоду живота изазива комплексно дејство на различите неуротрансмитерске системе, док дуготрајни утицаји нарочито матерналне депривације као модела раног стреса још увек нису познати. Ова студија би требало да покаже дуготрајни утицај матерналне депривације на биохемијске и морфолошке промене у мозгу пацова које би могле бити узрок промена у понашању.

Сагледавање промена које се дешавају након матерналне депривације у мозгу експерименталних животиња може допринети разумевању процеса који представљају патогенетске механизме шизофреније, као и развоју нових потенцијалних терапијских стратегија у лечењу ове болести.

С обзиром на претходно изнете чињенице постављени су следећи циљеви ове докторске тезе:

1. Испитати утицај матерналне депривације на холинергички систем мозга пацова одређивањем активности AchE у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc.caudatus*-у мозга пацова, и одређивање густине холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу и хипокампадној формацији.

2. Испитати утицај матерналне депривације на садржај редукованог глутатиона и активност γ -глутамил цистеин лигазе, као и показатеље оксидативног стреса одређивањем активности супероксидизмутазе, глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе, мерењем експресије SOD1 и SOD2 и одређивањем садржаја липидних пероксида у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc.caudatus*-у мозга пацова.

3. Испитати утицај матерналне депривације на митохондријални метаболизам одређивањем активности ензима респираторног ланца (комплекс I и цитохром c оксидазе) и експресију мембранских (gp91^{phox}, p22^{phox}) и цитосолних (p47^{phox},

p67^{phox}, p40^{phox}) субјединица NADPH оксидазе у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у мозга пацова.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експерименталне животиње

У експериментима су коришћени пацови оба пола, соја Wistar који су узети из узгајалишта Института за биомедицинска истраживања Галеника у Београду.

3.1. Третирање животиња

Мужјак и четири женке Wistar пацова старе три месеца су чувани заједно у стандардном кавезу од плексигласа са пиљевином (26x42x15cm). Трудне женке Wistar пацова су појединачно чуване у кавезима са 12-часовним циклусом светло-мак. Храна и вода били су доступни *ad libitum*. Дан порођаја смо означили као нулти постнатални дан (PN0). Деветог постнаталног дана (PN9) легла смо подвргнути матерналној депривацији. Младунце мушког пола смо уклонили из кавеза на 24 часа (Ellenbroek i Cools, 1995b; Roceri i sar., 2002). Младунцима је измерена телесна тежина након чега су остали у кавезима на собној температури 24 часа без мајке. Десетог постнаталног дана (PN 10) младунцима смо опет мерили телесну тежину након чега су враћени у кавез са мајком (експериментална група). У контролној групи младунци остају са својом мајком све време уз мерење телесне тежине деветог и десетог постнаталног дана (PN9 и PN10). Након тога младунце нисмо узнемиравали, осим због рутинског чишћења кавеза, до PN 21 када смо извршили класификацију према полу. Животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом шездесетог постнаталног дана (PN60).. За морфометријске и биохемијске студије користили смо мужјаке, како би избегли сексуални диморфизам (Woolley i sar., 1992). јер су све претходне студије извођене на мужјацима (Vivinetto i sar., 2013; Own i Patel, 2013). Сви експерименти су у складу Водича за бригу и коришћење Лабораторијских Животиња НИИ - *National Institute for Health*.

3.2. Изоловање структура за биохемијске анализе

За биохемијске анализе коришћено је по шест животиња у експерименталној и контролној групи. Животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом и декапитацијом без анестезије, а затим су главе тренутно замрзаване у течном азоту а затим чуване на -80°C . Мождане структуре (кортекс, хипокампус, таламус и *nc.caudatus*) препарисане су на хладно и хомогенизоване у хладном пуферисаном сахарозном медијуму (0,25 M/L saharoze, 10 mmol/ K/NaPO₄ пуфер pH 7.0 и 1 mmol/L EDTA). За одређивање ензимске активности синаптозомална и митохондријална фракција појединих можданих региона, су изоловане по методи *Whittaker-a* и *Barker-a* (Whittaker i Barker, 1972). Хомогенизацијом уситњено ткиво је потом центрифугирано на 1000G 15 минута. Супернатанти су центрифугирани 30 минута на 20000G. Овако добијени супернатант представља непречишћену синаптозомалну фракцију која садржи мембранске везикуле (микрозоме) настале од глатког и гранулисаног ендоплазматичног ретикулума, Голџијевог апарата и плазма мембране као и све солубилне компоненте цитоплазме. Талог је ресуспендован у дејонизованој води и остављен 60 минута на $+4^{\circ}\text{C}$ уз повремено мешање. Овако ресуспендован талог је затим центрифугиран на 1700G 15 минута. Добијени супернатант представља непречишћену митохондријалну фракцију и садржи митохондрије, лизозоме и пероксизоме.

Непречишћена синаптозомална и митохондријална фракција су чуване на -80°C .

3.2.1. Биохемијске анализе

У узорцима непречишћене синаптозомалне фракције кортекса, хипокампуса, таламус и *nc.caudatus*-а спектрофотометријски је одређивана активност појединих ензимских система.

3.2.1.1. Мерење садржаја протеина

Концентрација протеина у узорцима је одређивана спектрофотометријски по методи *Lowry i sar.* (Lowry i sar., 1951). Као стандард је коришћен катализован серумски албумин говечета BSA (*Sigma*). Количина протеина је одређивана у супранатанту за одређивање ензимске активности непосредно по екстракцији. Разблаживањем са сахарозним медијумом концентрација протеина је у свим узорцима сведена на приближно 1мг/мл.

3.2.1.2. Активност ензима ацетилхолинестеразе (AChE)

Активност ацетилхолинестеразе је одређивана по методи *Ellman* и сар. (Ellman i sar., 1961). Принцип реакције је да ацетилхолинестераза разлаже ацетилтиохолин јодид чији се продукт разлагања везује за DTNB (5,5'-дитиобис-2 нитро бензојева киселина). Као резултат реакције настаје жуто обојени комплекс. Количина насталог комплекса мерена је спектрофотометријски и представља индекс активности ацетилхолинестеразе. У узорак је додаван тетраизопропилпирофосфоамин (*isoompa*) који је инхибитор псеудохолинестеразе. Епрувете су инкубиране на 37°C у трајању од 30 мин. Смеша је затим хлађена под млазом воде, и након тога је додата реакциона смеша која је садржала DTNB и натријум бикарбонат у 0,1 М фосфатном пуферу (pH=7,2). Након 5 мин (ради стабилизације температуре) додаван је ацетилтиохолин јодид и праћена је промена екстинкције спектрофотометријски на 412 nm у току 3 мин. Активност ацетилхолинестеразе одређивана је по формули:

$AChE = \Delta A / 1,36 \times 10^4 \times 1020 / 25 \times 1 / \text{конс. протеина}$, где је ΔA – промена апсорбанце у току 1 минута, $1,36 \times 10^4$ – моларни апсорбциони коефицијент жутог аниона, 25 – запремина узорка у μl , 1020 – укупна запремина у кивети у μl . Све коришћене

хемикалије и реагенси су аналитичког степена чистоће, произвођача *Merck* и *Sigma*.

3.2.1.3. Мерење садржаја редукованог глутатиона (GSH)

Садржај редукованог глутатиона (GSH) одређује се спектрофотомеријском методом употребом 5,5-дитиобис-2-нитробензојеве киселине (DTNB) (Елман-ов реагенс). DTNB реагује са алифатичним тиол једињењима у благо алкалној средини (pH 8.0) стварајући *p*-нитрофенол анјон жуте боје. Интензитет боје се користи за мерење концентрације GSH читавањем екстинкције на спектрофотометру при 412 nm (Ellman, 1959).

3.2.1.4. Активност ензима γ -глутамил цистеин лигазе (γ -GCL)

Активност ензима γ -GCL одређивана спектрофотомеријском методом *Seelig-Meister* (Seeling i Meister, 1985). Активност γ -GCL се одређује у реакционој смеши која садржи л-глутамат, *L*- α -аминобутират и АТФ, помоћу купловане ензимске реакције у којој се брзина формирања ADP-а у присуству пируват киназе, лактат дехидрогеназе, фосфоенолпирувата и NADH мери као смањење екстинкције на 340 nm као последица потрошње NADH. *L*- α -аминобутират се користи уместо *L*-цистеина.

3.2.1.5. Активност ензима глутатион пероксидазе (GPx)

Активност ензима глутатион пероксидазе је одређивана методом по *Günzler* (Gunzler i sar., 1974).

Метода се заснива на оксидацији редукованог глутатиона са искоришћавањем NADPH у реакцији коју катализује ензим глутатион редуктаза. Промена апсорбанце при 340 nm као последица потрошње NADPH+H⁺ представља меру

активности глутатион пероксидазе у везаној реакцији у којој учествује глутатион редуктаза.

3.2.1.6. Активност ензима глутатион редуктазе (GR)

Активност глутатион редуктазе је одређивана поступком по *Carlberg i Mannervik* (Carlberg i Mannervik, 1985).

Глутатион редуктаза конвертује оксидовани глутатион у редуковани, уз редукцију NADPH. Мери активности глутатион редуктазе представља промена апсорбанце мерена на 340 nm као последица потрошње NADPH.

3.2.1.7. Активност ензима супероксид дизмутаза (SOD)

Активност SOD одређивана је као проценат инхибиције аутооксидације адреналина у базној средини по методи *Sun i Zigman* (Sun i Zigman, 1978). Степен инхибиције сразмеран је активности ензима. Активност укупне SOD одређивана је кинетички, као промена екстинкције у времену (10 минута) на таласној дужини од 480nm.

3.2.1.8. Концентрација липидних пероксида (MDA)

Степен липидне пероксидације одређиван је на основу садржаја MDA у синаптозомалној фракцији по методи *Rehncrona* и сар. (Rehncrona i сар., 1980). Малонилдиалдехид настао из полинезасићених масних киселина у процесу липидне пероксидације реагује са тиобарбитуратна киселином (ТВА) стварајући обојени комплекс. Количина створеног MDA+ТВА мерна је спектрофотометријски на 533nm и представља индекс липидне пероксидације.

3.2.1.9. Активност комплекса I (NADH:koenzim Q oksidoreduktaza)

Активност комплекса I одређује се по методи *Janssen* (Janssen i sar., 2007). Комплекс I оксидује NADPH и створени електрони редукују децилубихинон који даље преноси електроне до 2,6-дихлориндофенола (DCIP). Редукција DCIP-а прати се спектрофотометријски на 600 nm.

3.2.1.10. Активност ензима цитохром C оксидазе (COX)

Активност цитохром c оксидазе, последње компоненте у митохондријалном респираторном ланцу, одређивана је на основу пада апсорбанце током оксидације цитохром C-феро оксида у *цитохром C*-фери оксид. Кинетика је праћена у калијумфосфатном пуферу (0.05 M, pH = 7.1) током 3-5 минута спектофотометријском методом са максималном апсорбанцијом на 550 nm, по методи *Hess i Pope* (Hess i Pope, 1960).

3.2.2. Одређивање експресије протеина техником Western blot

Одређивање експресије мембранских (gp91^{phox} и p22^{phox}) и цитосолних (p47^{phox}, p67^{phox} и p40^{phox}) субјединица NADPH оксидазе, као и SOD₁ и SOD₂, вршено је методом *Western blot*-а. По четири животиње из експерименталне и контролне групе су жртвоване цервикалном дислокацијом. Изоловане моздане структуре су препарисане на хладно: кортекс (dIFC; 4.2 mm up to _1.32 mm from bregma), хипокампус, таламус и *nc.caudatus*. Након изоловања поједине структуре су хомогенизоване у пуферу за лизирање (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0,25% Na-deoksiholat), који садржи протеазне инхибиторе (протеаза инхибитор коктел, 100mM PMSF, 200mM Na-ortovanadat i 1M NaF).

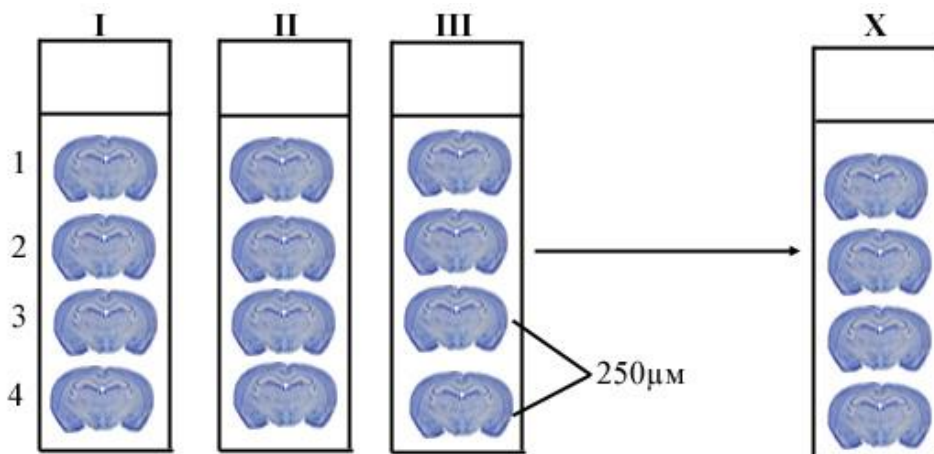
Након центрифугирања (14000rpm, 15minuta на 4°C), одвојени су супернатанти који су коришћени за даља испитивања.

Укупна концентрација протеина у хомогенту одређена је методом по *Bradford*-у. Као стандард коришћен је серумски албумин говечета (BSA). На основу утврђене концентрације протеина у узорцима прерачуната је запремина којој се додаје пуфер (Lemli 2x (1m Tris HCl pH6.8, 80% glicerola, 10% SDS, 1% bromfenol plavo) i β -merkaptoetanol)) у односу 1:1, како би у сваком узорку било 50 μ g протеина. Овако припремљени узорци се кувају око 3 мин на 100° C.

Једнаке количине протеина из сваког узорка су раздвојене SDS-PAGE електрофорезом на 10 и 15% гелу и извршен је трансфер на нитроцелулозну мембрану (Biorad, Hercules, CA). Мембране су блокиране у немасном млеку (5% млеко у TBS-Т пуферу (TBS 100 mL, dH₂O 900 mL, Tween-20 0,5 mL)) у трајању од 60 минута. Након блокирања мембране су инкубирани са следећим примарним антителима: gp91^{phox} (1:1000, мишије поликлонско, *Santa Cruz, USA*), p22^{phox} (1:1000, зечије поликлонско, *Santa Cruz, USA*), p47^{phox} (1:1000, зечије поликлонско, *Santa Cruz, USA*), p67^{phox} (1:1000, зечије поликлонско, *Santa Cruz, USA*), gp40^{phox} (1:1000, зечије поликлонско, *Santa Cruz, CA*), SOD1 (1:1000, козије поликлонско, *Santa Cruz, USA*) и SOD2 (1:1000, козије поликлонско, *Santa Cruz, USA*). Потом су мембране инкубирани са одговарајућим HRP-обележеним секундарним антителима: анти-мишијим, анти-зечијим или анти-козијим антителом. Мембране се преливају активираним луминол радним раствором (активира га 30% H₂O₂) и тако активира визуелизација специфичних протеинских трака хемилуминисценцијом која се детектује применом *ChemiDoc* система. Све мембране су стриповане (уклоњена су претходно везана антитела) и инкубирани са анти-актин антителом (1:10000, мишије моноклонско, *Sigma-Aldrich, Germany*) како би се проверило да су сви бунарићи на гелу били подједнако напуњени. Блотови су дензитометријски анализирани коришћењем софтвера *ImageQuant5.2*.

3.3. Припрема узорака за имунохистохемију (криопресеци)

За имунохистохемијска испитивања жртвовано је по пет животиња из експерименталне и контролне групе. Животиње смо анестезирали 3.6% хлорал хидратом (10мл/кг i.p.) и затим перфундовали свеже припремљеним 4% параформалдехидом (4°C). Извађене мозгове смо остављали 24 h у 4% параформалдехиду после чега смо их пребацили у раствор сахарозе (растућег градијента концентрације 10%, 20%, 30%) у 0.1М фосфатном пуферу рН=7.4 (криопрезервација). Након тога, мозгове смо тренутно замрзавали на -80°C урањањем у 2-метилбутан (*Fluka Biochemika*), који је претходно охлађен на -80°C. За сечење ткива, каудални пол сваког мозга је причвршћен за криостатски носач коришћењем криостатског медијума (*Kilik*, Италија). Вентрална површина мозга је оријентисана према сечиву и серијски коронални пресеци дебљине 25µм за имунохистохемијске анализе су сечени на криокату *Leica* (*Leica Instruments*, Немачка). Пресеци су сакупљани на *SuperFrost Plus* плочицама (*Menzel Braunschweig*, Немачка). Како стереолошке анализе захтевају бројне пресеке проучаваних структура и употребу серијских пресека, сакупљање пресека је увек вршено на исти начин. На крају на свакој плочици је било по 4 пресека који су међусобно удаљени 250µм (слика 6). Пресеци су до тренутка бојења чувани на -20°C.



Слика 6. Стандардизовани начин сакупљања узорака на стакленим плочицама

3.3.1. Одређивање густине холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу и хипокампадној формацији

За имунохистохемијске студије, прво је извршено демаскирање антигена у цитратном пуферу, pH=9 (30 min на 80°C). По завршетку инкубације, плочице су остављене да се охладе на собној температури. Затим је извршено неспецифично блокирање током 1h на собној температури користећи нормалан козји серум (0,2% Triton X-100, 0,02% NaN₃, 5% нормални козји серум у PBS-у pH=7.3). Након тога, раствор за блокирање је аспириран, а плочице су инкубирани са примарним антителима (72h на +4°C) која су растворена у PBS-у који садржи 0.5% λ carrageenan (омогућава бољу пенетрацију антитела кроз релативно дебео исечак) и 0.02% NaN₃. а потом су узорци инкубирани (72 h на +4°C) са примарним антителима на холин ацетилтрансферазу (ChaT ,1:100; Chemicon, Hofheim, Germany). Након испирања у PBS (три пута за 15 мин на собној температури), вршила се инкубација са одговарајућим секундарним антителом коњугованим са Cy3 (1 : 200 у PBS-Carrageenan раствору) у току 2 сата на собној температури. Њелије једра су се бојиле бисбензимином (Hoechst dye 33258, µg/mL in PBS; Sigma) 10 мин на собној температури. На крају, пресеци су поново испирани PBS-ом, у медијуму који спречава обезбојавање (Fluoromount G; Southern Biotechnology Associates via Biozol, Eching, Germany).

За процену густине имуно-обележених влакана, на конфокалном микроскопу Leica LSM510 прављени су оптички пресеци на 2 μm дебљине. За испитивање густине ChAT+ влакана -слике резолуције 1024 x 1024 су сликане у CA1, CA3 и GD региону хипокампуса и то у следећим слојевима:

CA1: *stratum oriens, stratum pyramidale, stratum radiatum*

CA3: *stratum oriens, stratum pyramidale, stratum radiatum*

GD: *stratum moleculare, stratum granulosum, stratum polymorphe.*

За сваку животињу и сваки слој, сликане су 4 слике. Да би се проценила густина влакана, добијене слике су преклопљене стереолошком мрежом (мрежа C4; Howard i Reed, 1998) користећи Adobe Photoshop 7.0 при чему је бројан број пресека влакана са мрежом (слика 7).

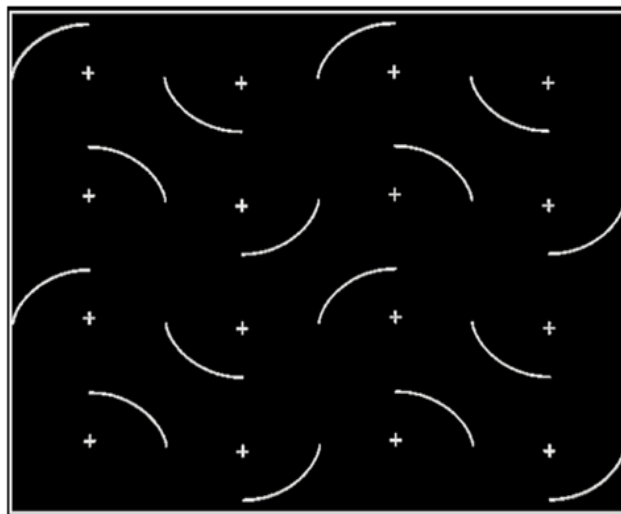
Дужина пројекционих влакана је израчунавана у m по m^3 тј. m^{-2} по следећој формули:

$$L_v = 2P_L/t$$

где је:

t - дебљина пресека (25 μm)

P_L - број избројаних пресека/укупна дужина тест линија мреже (1,061)



Слика 7. Стереолошка мрежица C4

3.4. Статистичка анализа

Статистичка обрада добијених резултата између контролне и експериманталне групе вршена је помоћу програма *Statistica StatSoft*, одговарајућим статистичким тестовима, пре свега Студентовим т-тестом за два независна узорка. Уколико је вероватноћа да је радна хипотеза („постоји разлика између посматраних група“) тачна, била једнака или мања од 5% ($p \leq 0.05$), разлика је сматрана за статистички значајну. Резултати су приказани графичким стубичастим дијаграмима. Графички приказ је урађен у програму *OriginPro8*.

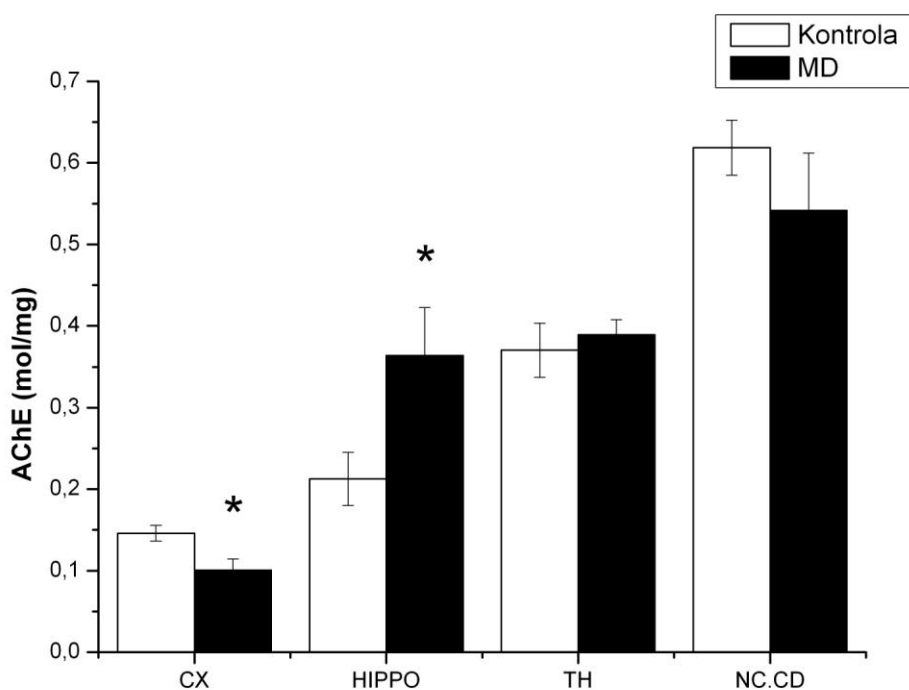
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност АСhЕ

Промене активности АСhЕ у испитиваним можданим структурама матернално депривираних и контролних животиња приказане су на Графикону 1.

Истраживање је показало да је активност АСhЕ сигнификантно нижа у кортексу матернално депривираних животиња у односу на контролну групу пацова ($p < 0.05$).

С друге стране, резултати су показали сигнификантно повећање активност АСhЕ у хипокампусу матернално депривираних животиња у односу на контролну групу пацова ($p < 0.05$). У таламусу и *nc. caudatus*-у матернално депривираних и контролних животиња, активност АСhЕ је непромењена.



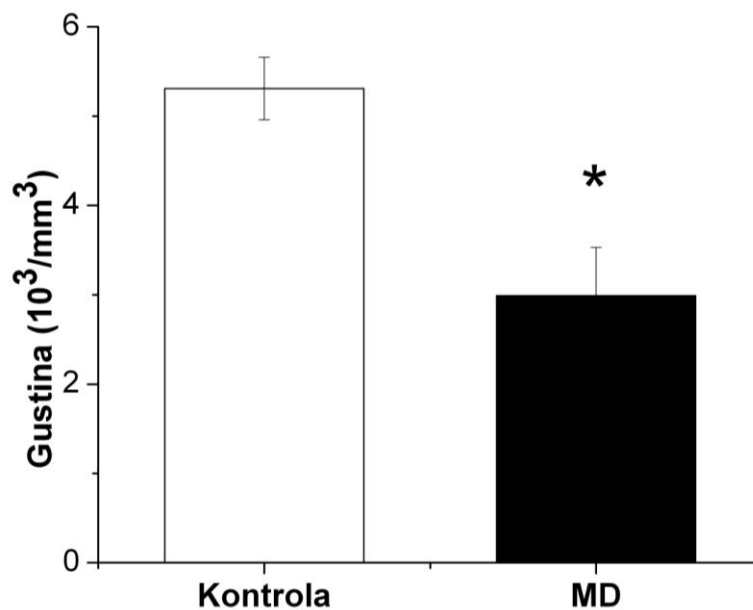
Графикон 1. Ацетилцхолинестеразна (AChE) активност у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а, у контролној групи ($n=6$) и експерименталној групи животиња ($n=6$). Вредности су репрезентоване у форми средња вредност \pm S.E.M

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.2. Дуготрајни ефекти матерналне депривације на густину холинергичких влакана у мозгу пацова

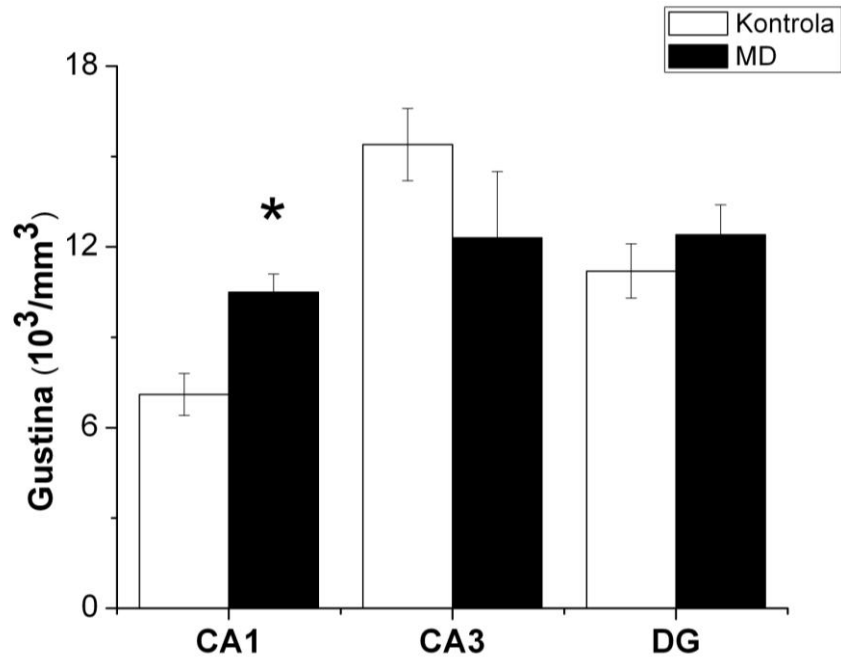
На имунохистохемијски обојеним препаратима ретроспленијалног кортекса и хипокампуса мозга пацова на ChAT позитивна влакна, испитиван је дуготрајни утицај матерналне депривације на густину холинергичких влакана.

У хипокампусу мозга пацова је испитивана густина ChAT позитивних влакана у CA1, CA3 и GD субрегионима. Статистичком обрадом добијених резултата применом т теста за два независна узорка показано је смањење густине ChAT позитивних влакана у ретроспленијалном кортексу (Графикон 2) матернално депривираних пацова у односу на контролну групу животиња, док је у хипокампусу само у CA1 субрегиону показано статистички значајно повећање густине ChAT позитивних влакана у експерименталној групи животиња (Графикон 3).

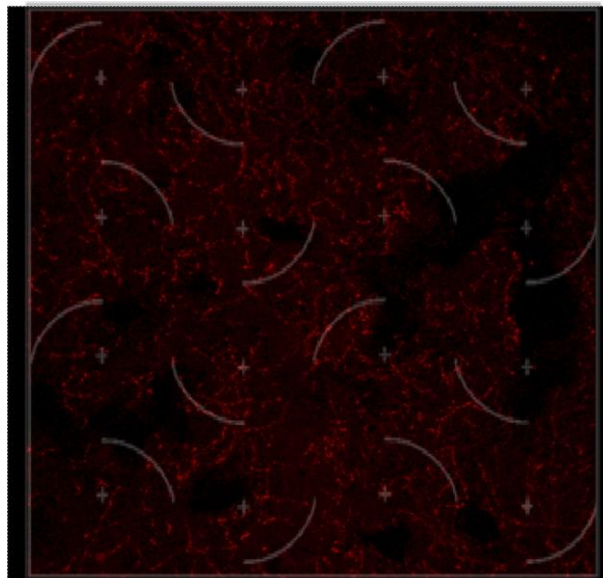


Графикон 2. Густина ChAT позитивних влакана у ретроспленијалном кортексу матернално депривираних (n=5) и контролне групе животиња (n=5). Вредности су репрезентоване у форми средња вредност \pm S.E.M

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.



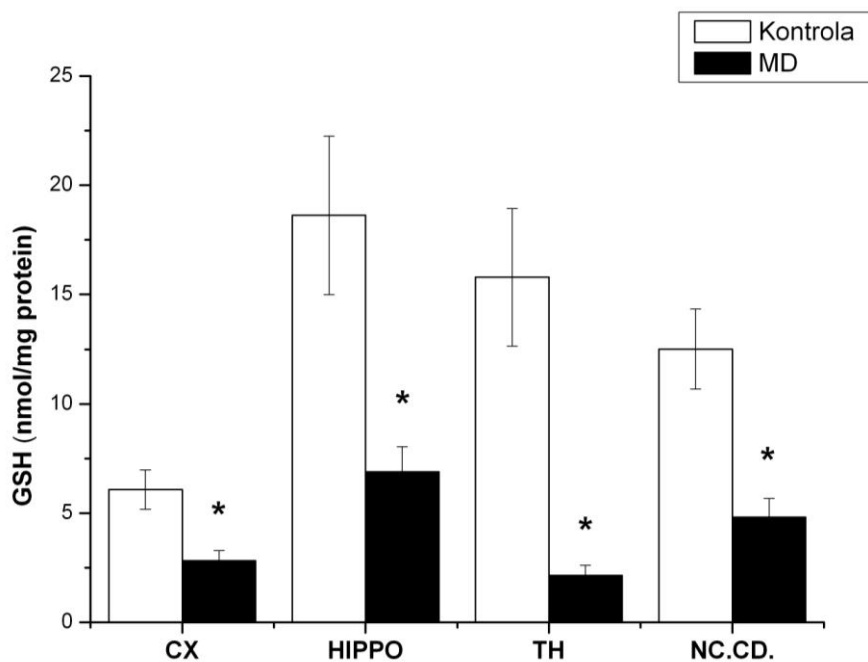
Графикон 3. Густина ChAT позитивних влакана у субрегионима хипокампуса CA1, CA3 и GD матернално депривирани (n=5) и контролне групе животиња (n=5). Вредности су репрезентоване у форми средње вредности ± S.E.M *p<0.05 у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.



Слика 6. Репрезентативни приказ имунохистохемијског бојења на ChAT позитивна влакна у хипокампусу пацова.

4.3. Дуготрајни утицај матерналне депривације на садржај GSH

Промене садржаја GSH у испитиваним можданим структурама матернално депривираних и контролних животиња приказане су на Графикону 4. Истраживање је показало да је активност GSH нижа у свим испитиваним можданим структурама матернално депривираних у односу на контролну групу пацова ($p < 0.05$).

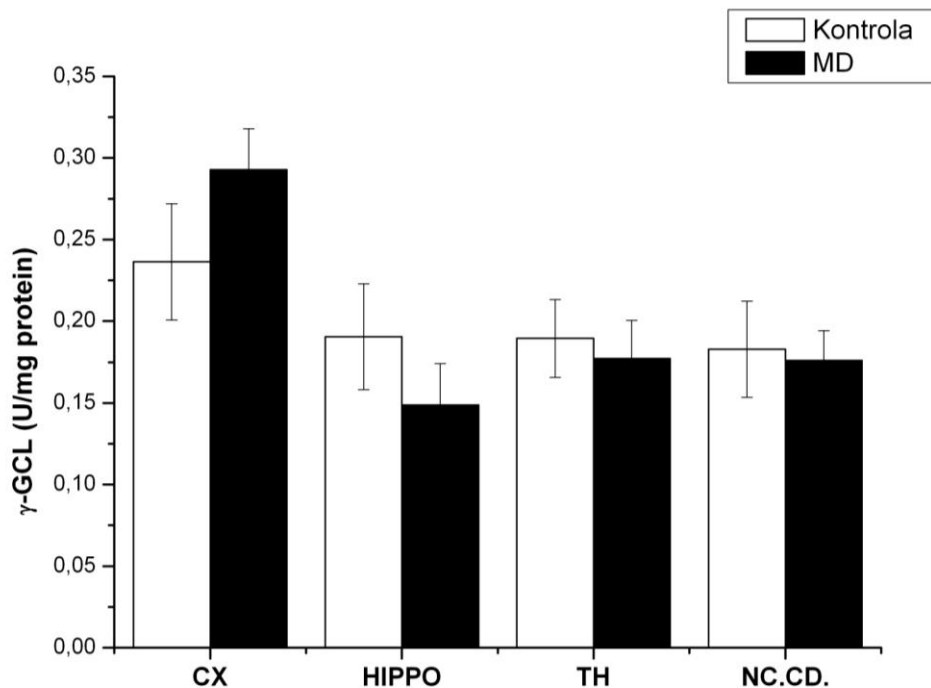


Графикон 4. Садржај редукованог глутатиона (GSH) у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а, у контролној групи ($n=6$) и експерименталној групи животиња ($n=6$). Вредности су приказане као средња вредност \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.4. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност γ -GCL

Активност ензима γ -GCL у испитиваним можданим структурама матернално депривираних и контролних животиња приказане су на Графикону 5. Матернална депривација не узрокује дугорочне сигнификантне промене у активности овог ензима.



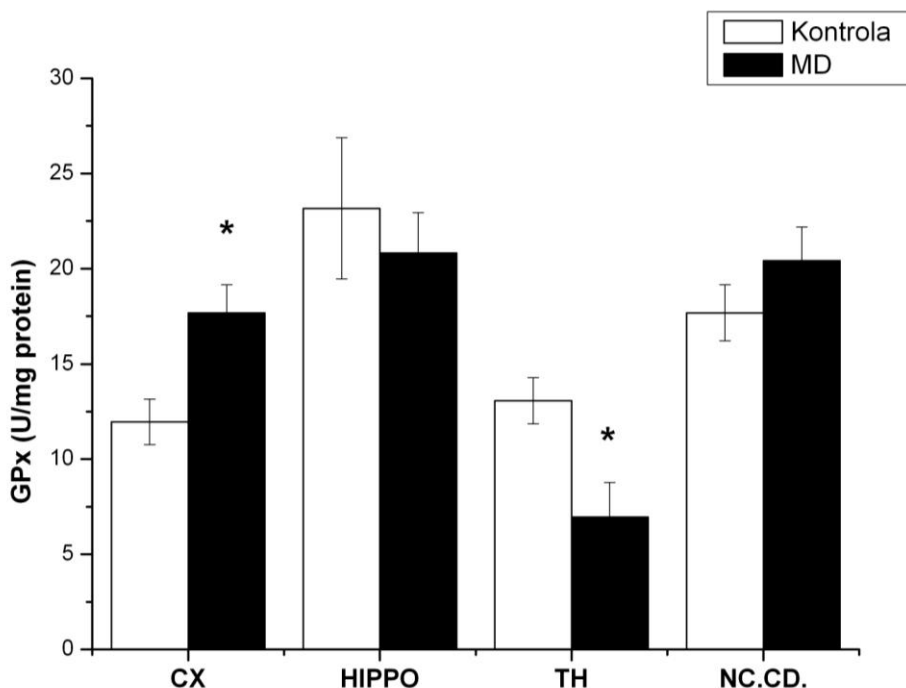
Графикон 5. Активност ензима γ -GCL у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а, у контролној групи (n=6) и експерименталној групи животиња (n=6). Вредности су репрезентоване у форми средње вредности \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.5. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност GP_x

Активност ензима глутатион пероксидазе је повишена у кортексу матернално депривираних животиња у односу на контролну групу животиња, док је у таламусу снижена активност овог ензима у односу на контролну групу животиња. Матернална депривација не узрокује сигнификантне дугорочне промене у активности овог ензима у хипокампусу и *nc. caudatus*-у.

Активност ензима глутатион пероксидазе у свим испитиваним можданим структурама матернално депривираних животиња у односу на контролну групу пацова приказана је на Графикону 6 ($p < 0.05$).

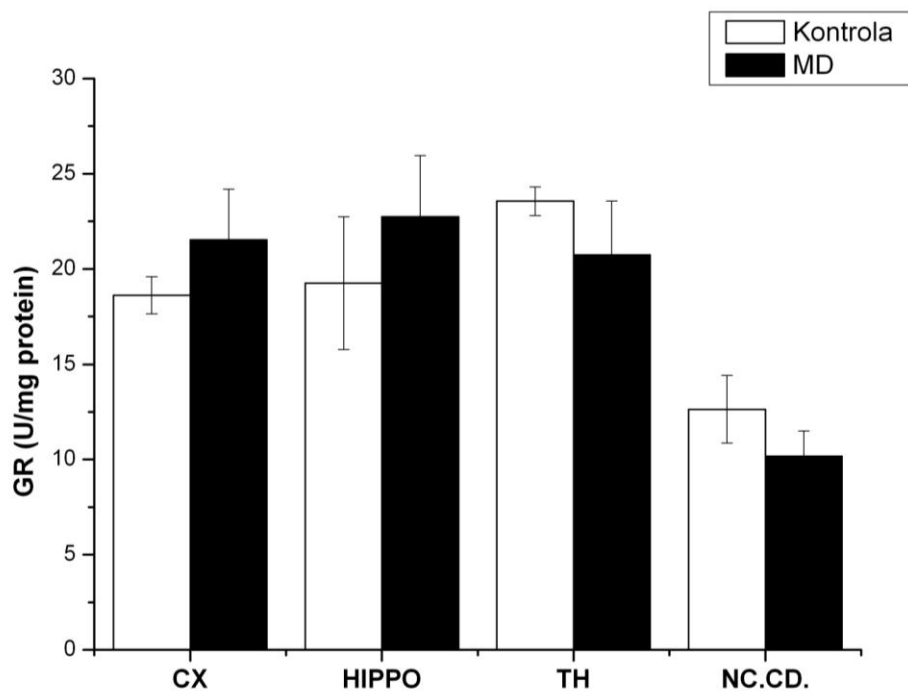


Графикон 6. Активност ензима GP_x у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а, у контролној групи (n=6) и експерименталној групи животиња (n=6). Вредности су репрезентоване у форми средње вредности \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.6. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност GR

Активност ензима глутатион редуктазе у испитиваним можданим структурама матернално депривираних и контролних животиња приказане су на Графикону 7. Матернална депривација не узрокује сигнификантне дугорочне промене у активности овог ензима (Графикон 7).



Графикон 7. Активност ензима GR у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а, у контролној групи (n=6) и експерименталној групи животиња (n=6). Вредности су репрезентоване у форми средње вредности \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.7. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност SOD

Дуготрајни ефекти промене активности укупне SOD након матерналне депривације у испитиваним мозданим структурама пацова приказане су у табели 1. Активност SOD је повишена у кортексу и хипокампусу матернално депривираних пацова у односу на контролну групу ($p < 0.05$).

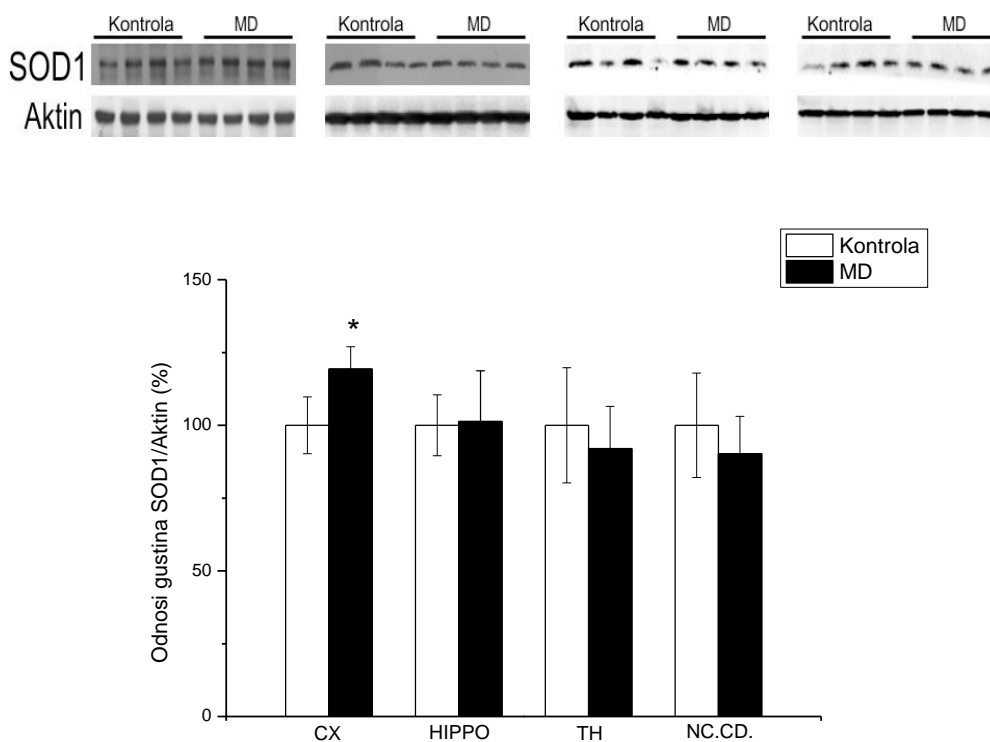
Табела 1. Супероксид дисмутазна (SOD) активност у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а у контролној и експерименталној групи животиња. Вредности су репрезентоване у форми средње вредности \pm S.E.M за методолошки дефинисани број животиња ($n=6$)

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

	SOD (U/mg протеина)	
	Контрола	МД
Кортекс	354.5 \pm 42.5	552.7 \pm 68.1*
Хипокампус	339.4 \pm 55.6	524.0 \pm 43.0*
Таламус	369.9 \pm 29.9	419.4 \pm 40.0
<i>Nc. caudatus</i>	621.0 \pm 58.2	604.5 \pm 65.1

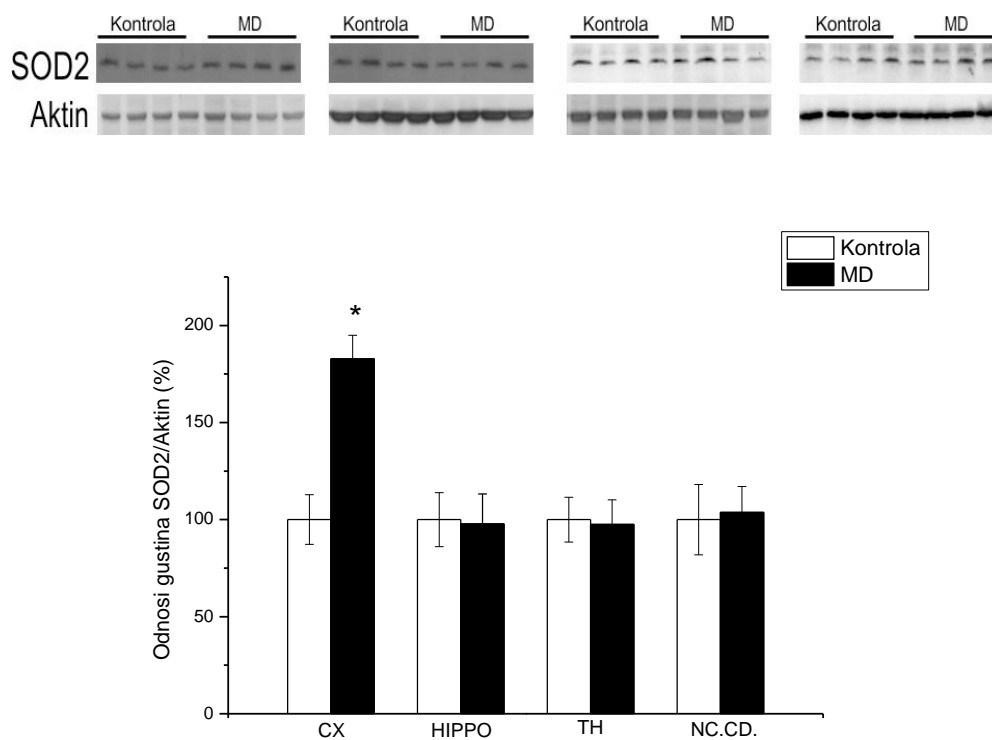
4.8. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију ензима SOD1 и SOD2

Техником *Western blot-a* одређивана је експресија ензима SOD1 и SOD2 у матернално депривираној и контролној групи животиња. Резултати указују на статистички значајно повишену експресију оба изоензима, цитосолног SOD₁ (Графикон 8) као и митохондријалног SOD₂ (Графикон 9) у кортикалним структурама у поређењу са контролним вредностима. У осталим испитиваним структурама нема статистички значајне разлике између испитиваних група.



Графикон 8. Експресија ензима SOD1 у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној (n=5) и групи експерименталних животиња (n=5). Приказан је репрезентативни имуноблот и одговарајући график добијен анализом гела. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.



Графикон 9. Експресија ензима SOD2 у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној (n=5) и групи експерименталних животиња (n=5).

Приказан је репрезентативни имуноблот и одговарајући график добијен анализом гела. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.9. Дуготрајни утицај матерналне депривације на вредности (MDA)

Липидна пероксидација као дуготрајни ефекат матерналне депривације у мозгу пацова показала је регион специфичне промене. Статистички значајан пораст MDA показан је у кортексу и таламусу матернално депривираних животиња, док у хипокампусу и *nc. caudatus*-у нема статистички значајне разлике између контролне и експерименталне групе животиња. Ниво липидних пероксида у испитиваним можданим структурама матернално депривираних и контролних животиња приказани су у Табели 2.

Табела 2. Ниво липидних пероксида (MDA) у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а у контролној и експерименталној групи животиња. Вредности су репрезентоване у форми средње вредности \pm S.E.M за методолошки дефинисани број животиња (n=6)

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

	MDA (nmol/mg протеина)	
	Контрола	МД
Кортекс	32.0 \pm 3.2	44.0 \pm 4.2*
Хипокампус	66.0 \pm 8.8	66.5 \pm 7.0
Таламус	57.4 \pm 2.8	82.6 \pm 8.4*
<i>Нс. caudatus</i>	73.8 \pm 3.6	80.9 \pm 10.4

4.10. Дуготрајни утицај матерналне депривације на активност Комплекса I и СОХ

Активност ензима СОХ и Комплекса I у испитиваним можданим структурама матернално депривираних и контролних животиња приказане су у Табели 3. Матернална депривација не узрокује дугорочне сигнификантне промене у активности СОХ, терминалног ензима респираторног ланца, али доводи до промена у активности Комплекса I, који је значајно статистички значајно повишен у свим испитиваним структурама осим у кортексу.

Табела 3. Активност ензима Комплекса I и СОХ у непречишћеној синаптозомалној фракцији кортекса, хипокампуса, таламуса и *nc. caudatus*-а у контролној и експерименталној групи животиња. Вредности су репрезентоване у форми средње вредности \pm S.E.M за методолошки дефинисани број животиња (n=6).

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

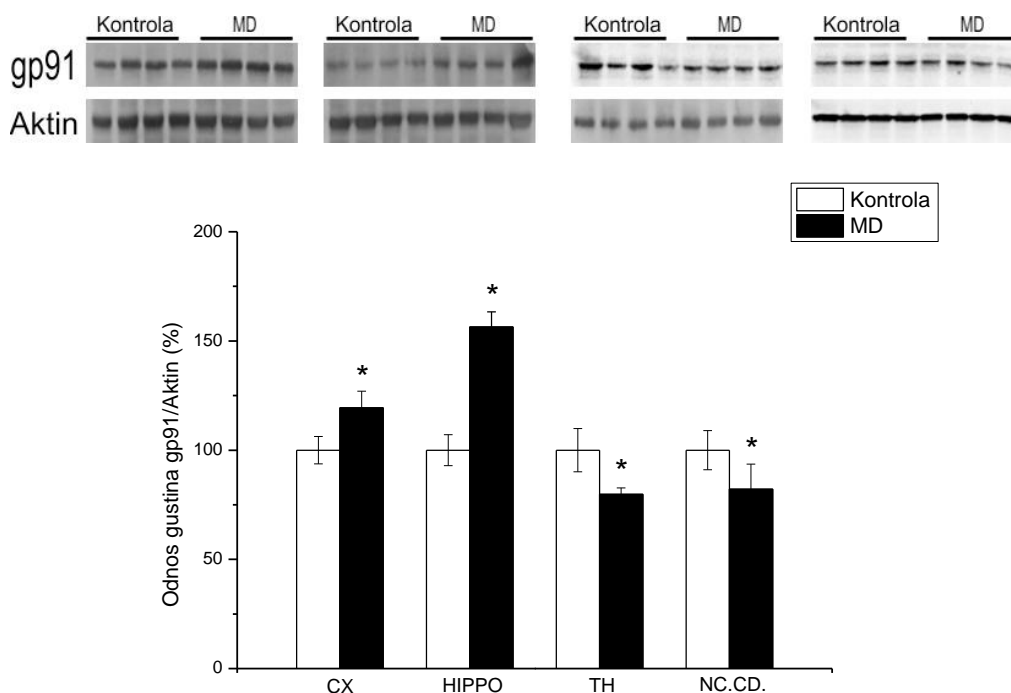
	Комплекс I (U/mg протеина)		СОХ (U/mg протеина)	
	Контрола	МД	Контрола	МД
Кортекс	186.3 \pm 15.29	194.73 \pm 53.25	11.2 \pm 2.08	10.01 \pm 1.74
Хипокампус	43.4 \pm 17.59	136.64 \pm 29.39*	3.89 \pm 1.86	3.69 \pm 0.93
Таламус	80.41 \pm 23.55	178.24 \pm 49.12*	3.73 \pm 1.99	3.48 \pm 1.6
<i>Nc. caudatus</i>	49.95 \pm 17.97	95.29 \pm 17.57*	2.4 \pm 0.93	2.82 \pm 1.02

4.11. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице gp91^{phox} NADPH оксидазе

Техником *Western blot-a* одређивана је експресија појединих субјединица NADPH оксидазе у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној и групи експерименталних животиња.

Резултати указују на субјединичне и структуралне специфичности.

Експресија мембранске субјединице gp91^{phox} показује статистички значајно повећање у кортексу и хипокампусу, док је у таламусу и *nc. caudatus*-у експресија снижена у односу на контролну групу животиња. (Графикон 10).



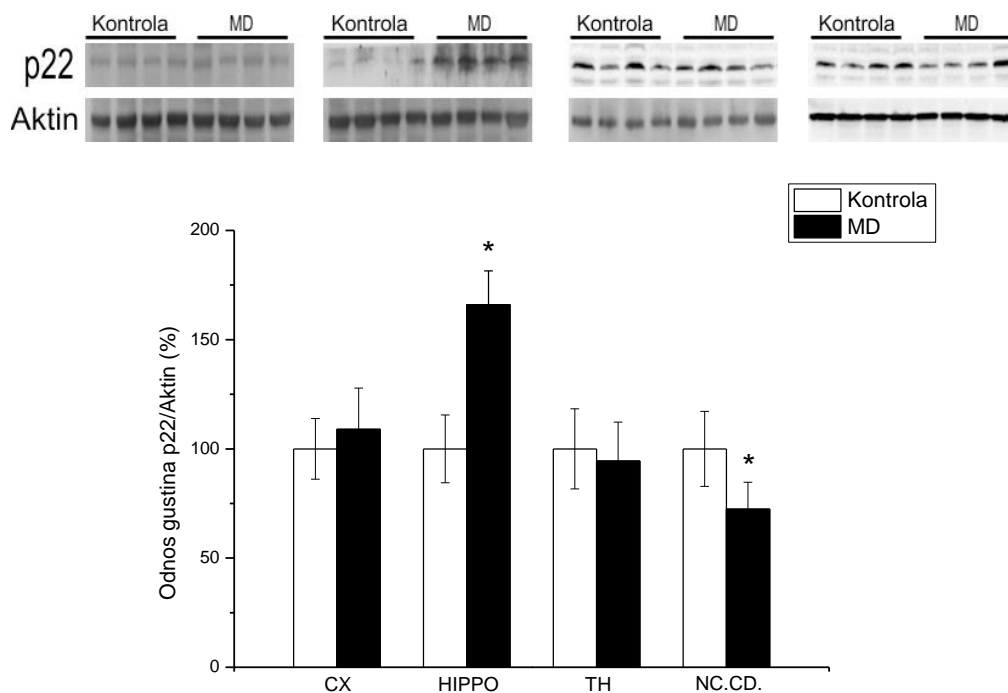
Графикон 10. Експресија субјединице ензима NADPH oksidaze, gp91^{phox} у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној и групи експерименталних животиња. Приказан је репрезентативни имуноблот и одговарајући графикон добијен анализом гела. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.12. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице $p22^{phox}$ NADPH оксидазе

Техником *Western blot-a* одређивана је експресија субјединице $p22^{phox}$ NADPHоксидазе .

Експресија мембранске субјединице $p22^{phox}$ статистички је повишена у хипокампусу , а снижена у *nc. caudatus*-у у односу на контролну групу животиња (Графикон 11). У кортексу и таламусу субјединица $p22^{phox}$ не показује статистичку значајност у експресији између контролне и експерименталне групе животиња.



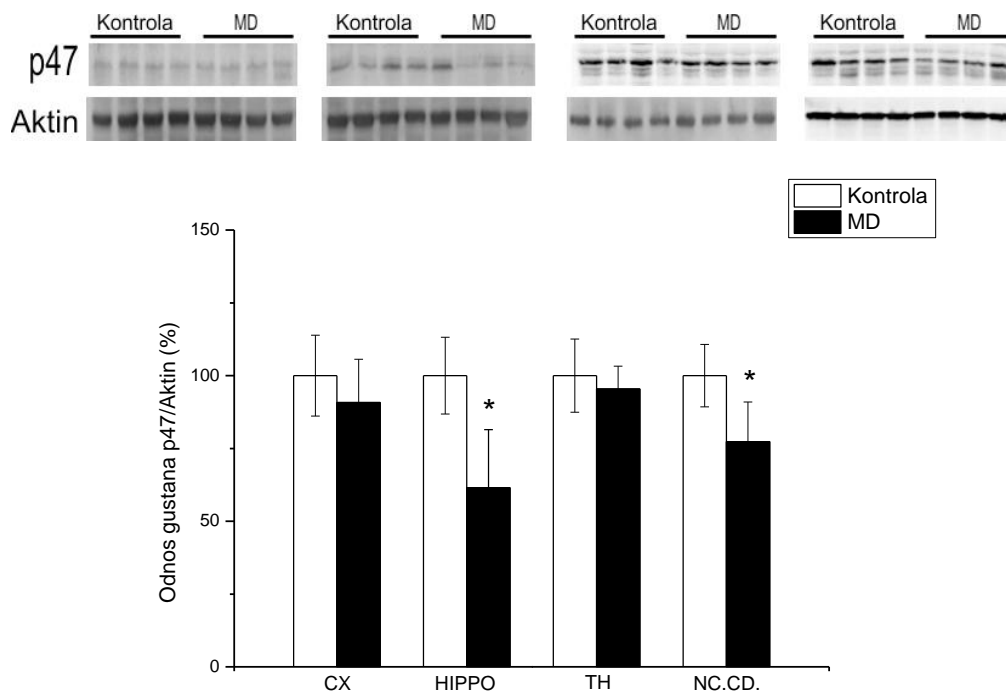
Графикон 11. Експресија субјединице ензима NADPH oksidaze, $p22^{phox}$ у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној и групи експерименталних животиња. Приказан је репрезентативни имуноблот и одговарајући графикон добијен анализом гела. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.13. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице p47^{phox} NADPH оксидазе

Техником *Western blot-a* одређивана је експресија субјединице p47^{phox} NADPH . оксидазе.

Експресија субјединице p47^{phox} статистички је снижена у хипокампусу и *nc. caudatus*-у у односу на контролну групу животиња (Графикон 12). У кортексу и таламусу субјединица p47^{phox} не показује статистичку значајност у експресији између контролне и експерименталне групе животиња.

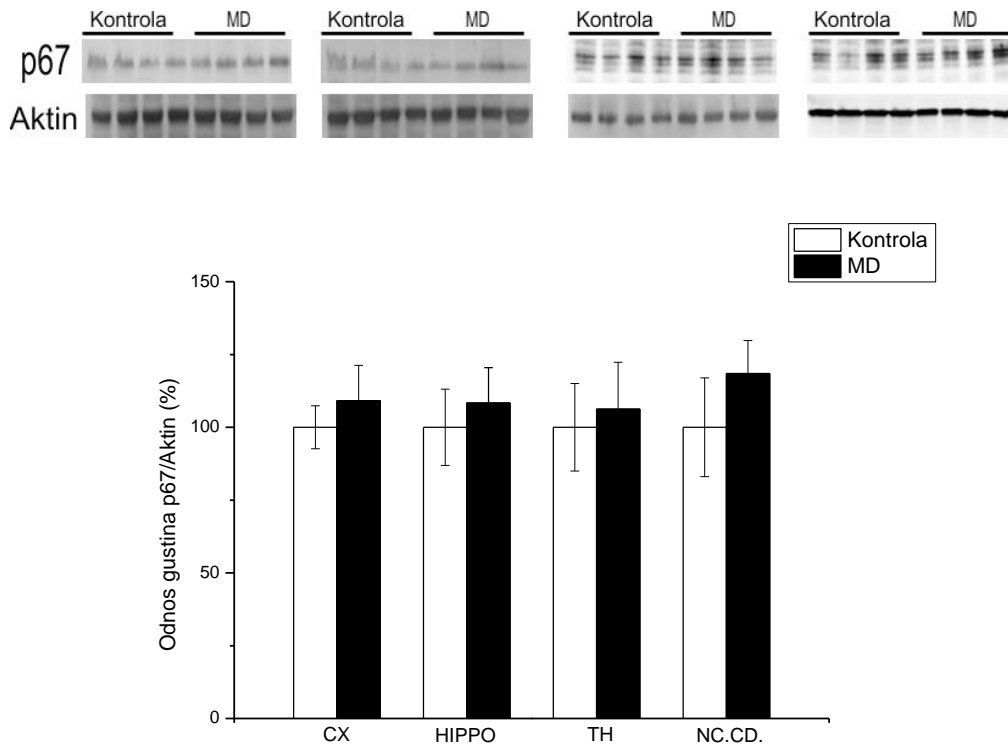


Графикон 12. Експресија субјединице ензима NADPH oksidaze, p47^{phox} у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној и групи експерименталних животиња. Приказан је репрезентативни имуноблот и одговарајући графикон добијен анализом гела. Вредности су приказане као средња вредност ±SD.

*p<0.05 у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.14. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице $p67^{phox}$ NADPH оксидазе

Техником *Western blot-a* одређивана је експресија субјединице $p67^{phox}$ NADPH оксидазе. Експресија субјединице $p67^{phox}$ не показује статистичку значајност ни у једној од испитиваних структура између контролне и експерименталне групе животиња (Графикон 13).



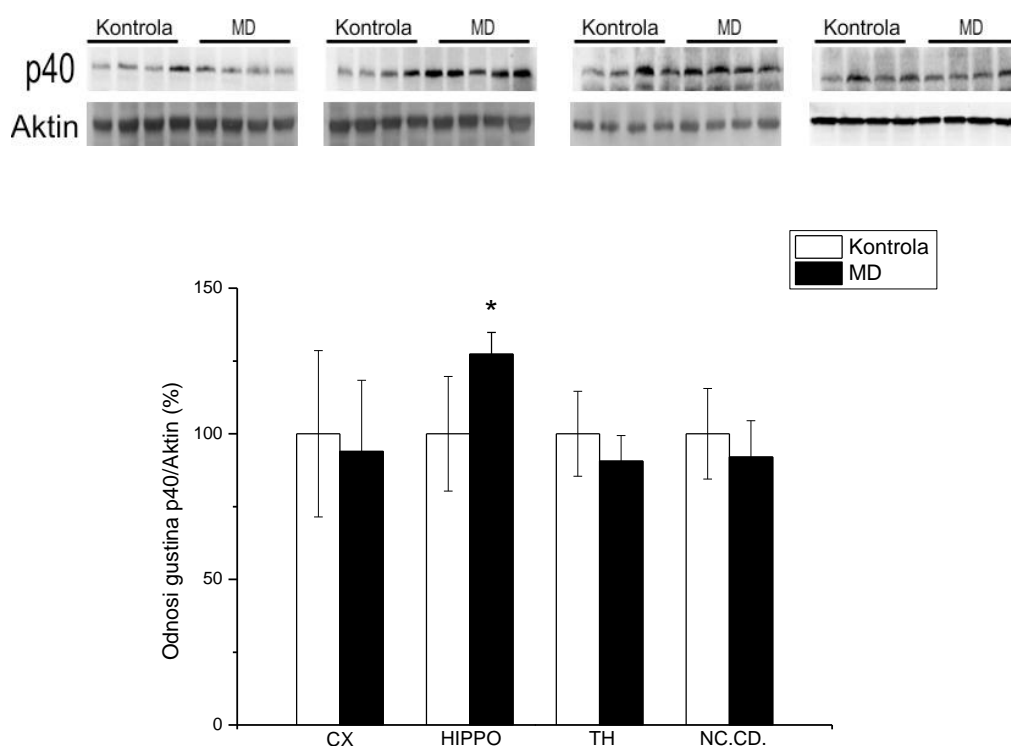
Графикон 13. Експресија субјединице ензима NADPH oksidaze, $p67^{phox}$ у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној и групи експерименталних животиња. Приказан је репрезентативни имуноблот и одговарајући графикон добијен анализом гела. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

4.15. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију субјединице $p40^{phox}$ NADPH оксидазе

Техником *Western blot-a* одређивана је експресија субјединице $p40^{phox}$ NADPH Оксидазе.

Експресија субјединице $p40^{phox}$ NADPH оксидазе статистички је повишена у хипокампусу у односу на контролну групу животиња (Графикон 14). У осталим испитиваним структурама нема статистичке значајности између контролне и експерименталне групе.



Графикон 14. Експресија субјединице ензима NADPH oksidaze, $p40^{phox}$ у кортексу, хипокампусу, таламусу и *nc. caudatus*-у у контролној и групи експерименталних животиња. Приказан је репрезентативни имуноблот и одговарајући графикон добијен анализом гела. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD.

* $p < 0.05$ у односу на вредност у одговарајућој структури контролне групе.

5. ДИСКУСИЈА

Матернална депривација представља један од актуелних анималних модела схизофреније. Схизофренија или група схизофрених болести је једно од најтежих психијатријских обољења које је заступљено у приближно 0.5-1% популације. Клинички се манифестује смањеним социјалним интеракцијама, губитком контакта с околином, поремећајем мисаоних процеса, као и халуцинацијама (Andreasen, 1995).

Код већине сисара адекватан однос мајка-новорођенче кључан је за нормалан развој, а рани губитак материнске бриге може утицати на повећану осетљивост новорођенчета на стресоре (Rice i Stan, 2000), Мајка може бити кључни узрок стреса у животу са трајним последицама на развој мозга (Francis i Meaney, 1999). Ово је веома честа појава међу животињама, где абнормално понашање мајки развија хронични стресно окружење које се манифестује дугорочним поремећајима понашања код пацова, касније током живота јединки (Joëls i Varam, 2009). Стрес је неизбежан део људског живота али познато је да екстремни облици акутног и хроничног стреса представљају факторе ризика за психијатријска оболења (Roberts i Vickers, 1994).

Постоје бројне хипотезе о етиологији схизофреније. Међу најзаступљенијим факторима који имају учешћа у етиологији схизофреније су поремећаји генске експресије, неуроимунолошки поремећаји, пренатални и перинатални стрес. Комбинација генетике и фактора окружења утиче на развој схизофреније. Схизофренија се између осталог сматра наследном болешћу, а особе које су у породици имале оболеле од схизофреније, а који пате од пролазне или ограничавајуће психозе имају 20 – 40% шанси да им се после годину дана дијагностикује схизофренија (Drake i Lewis, 2005). Процене наслеђа варирају због тешкоће у раздвајању генетских фактора од фактора окружења (O'Donovan i sar., 2003). Највећи ризик од развоја схизофреније имају особе чији је најближи крвни сродник оболео од те болести. Интеракције генетских фактора и стресора животне средине у раним фазама живота представљају важан узрок у настанку схизофреније (Cirulli i sar., 2009; Nestler i Hyman, 2010).

Анимални модел матерналне депривације је корисна парадигма која изазива повећану осетљивост пацова на акутни стрес у постнаталном периоду. Постнатални стрес је повезан са неколико дугорочних епигенетских и неуронских промена, које се пре свега односе на развој ГАВАнергичког систем (Zhang i sar., 2010). Познато је да рани перинатални стрес изазива разне краткорочне и дугорочне сметње у когнитивним, емоционалним и другим бихејвиоралним карактеристикама, сличним онима уоченим код схизофреније (Koehl i sar., 2001; Oomen i sar., 2009; Viveros i sar., 2010), што указује на то да је матернална депривација адекватан модел ове болести (Ellenbroek i Cools, 1990; Ellenbroek i Cools, 2000; Ellenbroek i Riva, 2003). Међутим, мало тога се зна о молекуларним механизмима који доводе до уочених дугорочних последица. Обзиром да етиологија и неуропатологија схизофреније још нису довољно разјашњене, све више доказа указује на то да је оксидативни стрес повезан с овим обољењем (Bošković i sar., 2011; Emiliani i sar., 2014; Steullet i sar., 2014). У овом истраживању смо испитивали биохемијске и морфолошке промене у мозгу пацова након раног одвајања младунаца од мајке.

У сагласности са подацима из литературе одабране су морфолошке структуре CNS-а, кортекс, хипокампус, таламус и *nc. caudatus*. Испитиване су последице стреса на активност АСhЕ мозга пацова, као и густина холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу и хипокампалној формацији мозга пацова. Такође, испитиване су последице стреса на ензимску активност и експресију ензима укључених у антиоксидативну заштиту, као и ниво липидне пероксидације као показатеља оксидативног стреса у наведеним структурама мозга пацова након матерналне депривације.

Интересовање за функције централног холинергичког система је нагло порасло седамдесетих година прошлог века када је у церебралном кортексу оболелих од Алцхајмерове болести неуропатолошким испитивањем показано снижење холинергичких маркера као и корелација овог снижења са кортикалном патологијом и са степеном когнитивног оштећења (Bowen i sar., 1976). Студије лезија холинергичког система као и примена антагониста холинергичких рецептора су показале да је холинергички систем неопходан за извођење великог

броја функција зависних од пажње као и за способност учења које такође зависи од пажње (Sarter i sar., 2008). Такође је испитивана и способност AChE инхибитора (донепезил, галантамил, ривастигмин) да побољшају когнитивне дефиците код оболелих од схизофреније, али резултати нису конзистентни (Lenzi i sar., 2003; Buchanan i sar., 2003).

Ензим AChE катализује деградацију ацетил-холина и сам по себи представља погодан маркер за испитивање функционисања холинергичког система у истраживањима (Hyde i Crook, 2001).

У овом истраживању проучавани су дуготрајни ефекти матерналне депривације на холинергички неуротрансмитерски систем у мозгу пацова. Показане су регион-специфичне промене у активности ензима AChE. У кортексу матернално депривираних пацова активност ензима AChE је била снижена док је у хипокампусу активност ензима AChE била повишена, у односу на контролну групу пацова.

Поред класичне ензимске улоге AChE има и изузетно значајну некаталитичку улогу током неуроразвоја. Истраживања последњих тридесетак година су показала неколико значајних некаталитичких улога AChE у CNS.

AChE је присутна у виду мембранског протеина и у виду секреторног протеина на местима која не захтевају хидролизу ацетилхолина, што указује да овај молекул има и додатну некаталитичку функцију (Massoulié i sar., 1993). Показано је да AChE директно модулише електрична својства неурона и смањује долазну усмерену калијумску струју. Инфузија AChE индукује бихејворалне промене код пацова путем нон-холинергичких путева (Greenfield i sar., 1984).

Затим, показано је да AChE промовише регенерацију неурита и раст примарне културе одраслих допаминергичких неурона путем некаталитичких механизма. Прекомерно експримирана AChE промовише раст неурита у неуронима пацова, а пречишћена AChE промовише раст неурита симпатичких неурона пацова, али механизми који се налазе у основи ових значајних некаталитичких особина нису у потпуности разјашњени (Srivatsan, 2006).

Испитивање дуготрајних последица матерналне депривације на холинергички систем у мозгу пацова обухватило је и одређивање густине холинергичких влакана (CHAT+ влакана) у ретроспленијалном кортексу и у субрегионима хипокампуса мозга пацова.

Тела холинергичких неурона у септуму (Ch1) и усправном краку *tr.diagonalis-a* (Ch2) се пројектују у хипокампус. Септохипокампадна аферентна влакна се састоје из холинергичких и ГАВАнергичких влакана која имају значајан утицај на хипокампадану неуронску активност (Ma i sar., 2004). У нашем истраживању стереолошко испитивање густине холинергичких влакана (CHAT+ влакана) у ретроспленијалном кортексу матернално депривираних пацова показало је смањење густине CHAT+ влакана. Смањен број холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу у сагласности је са налазом смањењем активности ензима АСhЕ у овој структури у нашем истраживању.

Стереолошко испитивање густине холинергичких влакана (CHAT+ влакана) у GD, CA1 и CA3 хипокампуса показује регион-специфичне промене.

Наше истраживање је показало повећање густине CHAT+ влакана у CA1 региону, док у другим испитиваним регионима хипокампуса нема промене у густини холинергичких влакана. Повећан број влакана је у сагласности са повећањем активности ензима АСhЕ у овој структури. Ови резултати су важни јер су хипокампус и церебрални кортекс кључни делови мозга за процесе људског памћења и когниције (Morgan i sar., 2004).

Литературни подаци указују да холинергички систем доприноси патофизиологији схизофреније вероватно као резултат неравнотеже између централног холинергичког и допаминергичког система (Tandon i Greden, 1989). Сматра се да управо холинергичка трансмисија посредована никотинским рецепторима игра кључну улогу у модулацији активности допаминергичког система обзиром да постоји близак анатомски и функционални однос између холинергичког и главних допаминергичких путева у CNS-у укључујући мезолимбички, мезокортикални и нигростријатни пут (Bencherif i sar., 2012).

Postmortem студије су показале распрострањено смањење никотинских $\alpha 7$ NNRs рецептора у хипокампусу, стријатуму и фронталном кортексу оболелих од схизофреније (Freedman i sar., 2000), као и смањење мускаринских рецептора код оболелих од схизофреније (Zavitsanou 2004; Newell 2007; Gibbons 2013). Такође, све је више доказа који показују да је когнитивни дефицит код пацијената оболелих од схизофреније у вези са холинергичким абнормалностима (Gibbons i Dean, 2016; Carruthers i sar., 2015; Drusch i sar., 2013).

Значај холинергичких влакна у етиопатогенези схизофреније у сагласности је са резултатима студије Barak i sar., (Barak i sar., 2009) који су показали да мускарински антагонисти могу изазвати психотично стање, које укључује низ когнитивних и психотичних симптома сличних схизофренији. Ово стање су назвали „антимускаринска психоза“ односно „антимускарински синдром“.

Мускарински рецептори (mAChRs) су G-протеин зависни Ach рецептори, који садрже 5 различитих подтипова означених као $M_1 - M_5$. Бројне предклиничке и клиничке студије неселективним mAChR агонистима указују да активација mAChRs побољшава когнитивне функције код оболелих од различитих обољења централног нервног система, стога ове студије заједно са генетским студијама указују да су M_1 рецептори посредници у когнитивним ефектима холинергичког система. Скорашње студије показују снижење рецептора и ниво mRNA M_1 рецептора у фронталном кортексу пацијената оболелих од схизофреније. Осим тога, циркулишућа M_1 антитела су доказана у серуму пацијената оболелих од схизофреније што указује на повезаност имуног система и M_1 рецепторске дисфункције у етиопатогенези схизофреније (Melancon, 2013).

Никотински рецептори (nAChRs) су пентамери сачињени од сличних али различитих субјединица $\alpha 1 - \alpha 10$, $\beta 1 - 4$, γ , δ , и ϵ . Најдоминатнији никотински рецептор у мозгу сисара је $\alpha 4 \beta 2$ nAChR, али је такође висока експресија и $\alpha 7$ nAChR. Оба рецептора су широко распрострањена у хипокампусу, таламусу и кортексу, структурама од значаја за когнитивне функције. Сматра се да повећана инциденца пушења цигарета код оболелих од схизофреније може да указује на потребу за активацијом $\alpha 7$ nAChR. Литературни подаци указују на присуство полиморфизма у регијама промотора $\alpha 7$ nAChR као и снижење експресије $\alpha 7$ nAChR у фронталном кортексу пацијената оболелих од схизофреније (Young i

Geyer, 2013). Стога се може закључити да $\alpha 7$ nAChR може бити значајан фармаколошки циљ за третман когнитивног дефицита код шизофреније.

С друге стране, поремећаји холинергичког система јављали су се у другим анималним моделима шизофреније. Примена фенциклидина (PCP), антагонисте NMDA глутаматних рецептора који се користи јер опонаша неке знакове и симптоме шизофреније код пацова праћена је повећаним ослобађањем ацетилхолина (Hanania i Johnson, 1999) као и алтерацијама у понашањима модулираним мускаринским рецепторима (Mouri i sar., 2007). Осим тога, Du Bois и sar. (du Bois i sar., 2009) уочили су промене у експресији рецептора M1/4 у префронталном кортексу и хипокампусу у различитим тренуцима у развоју након перинаталне примене PCP.

Недавно су Zugno и sar (Zugno i sar., 2013) показали да трочасовна матернална депривација сваког дана, током првих десет постнаталних дана (P1 to P10), доводи до повећања активности AChE у префронталном кортексу, хипокампусу и стријатуму као и до бихевиоралних поремећаја код одраслих животиња. Аутори су такође испитивали утицаје три различите дозе кетамина на одраслим пацовима који су перинатално били изложени матерналној депривацији према описаном протоколу и закључили да су животиње постале подложне утицају кетамина због перинаталне матерналне депривације. Наше истраживање друготрајних ефеката двадесетчетворочасовне матерналне депривације у деветом постнаталном дану, је показало да долази до снижења активности AChE у кортексу матернално депривираних животиња, које је пратило и снижење густине холинергичких влакана у кортексу. Резултати мерења активности AChE у хипокампусу у нашем истраживању подударују се са резултатима Zugno и sar. Интересантно је да повећање активности AChE у хипокампусу у нашем истраживању прати и регион специфично повећење густине холинергичких влакана, али само у CA1 подручју хипокампуса.

Различите схеме промена активности AChE у нашем и у истраживању Zugno и sar. указује на то да се различити протоколи матерналне депривације различито одражавају на биохемијске промене у мозгу одраслих животиња.

Обзиром на изнете резултате и литературне податке можемо претпоставити да изложеност раном стресу у различитом тренутку постнаталног живота пацова може бити праћен различитим биохемијским променама као и да може утицати на развојни процес.

С друге стране, прекомерна експресија АСhЕ ремети глутаматергички систем и доводи до оштећења синаптичких структура и ексцитаторне функције (Dong i sar., 2004).

Сва ова сазнања указују да вишак АСhЕ који се јавља приликом стреса (Nijholt i sar., 2003) може допринети патофизиолошким процесима који су настали након матерналне депривације.

Наше истраживање подудара се са претходним студијама које су указале на холинергичке абнормалности код оболелих од схизофреније и подупире потребу за даљим истраживањем стратегија лечења у вези с овим неуротрансмитерским системом.

Иако лекови, типични и атипични антипсихотици, којима је мета деловања допаминергички систем, ефективно смањују позитивне симптоме схизофреније, они нису довољно ефикасни против негативних симптома и когнитивних поремећаја код овог обољења (Karam i sar., 2010), стога холинергички систем, може бити од кључног значаја за развој нових лекова (Giacobini i sar., 2004).

Оксидативни стрес настаје као последица дисбаланса између продукције реактивних кисеоничких радикала и способности њиховог купирања антиоксидантским ензимским системима. Продукција је заправо деструктивни аспект оксидативног стреса који настаје у случајевима хиперпродукције или поремећају уклањања кисеоничких радикала. Хиперпродукција ROS доводи до оштећења и деструкције ћелијске архитектонике и њених компоненти укључујући градивне липиде, протеине па и саму DNK (Imlay, 2003).

Мождано ткиво је веома осетљиво на поремећај оксидације свакако зато и што на њега отпада око 20% укупне оксигенације организма, као и чињенице да су ћелијске мембране неурона састављене од полусахаризованих масних киселина,

због присуства високог садржаја гвожђа и ниске антиоксидативне ензимске активности (Youdim, 1988).

Резултати нашег истраживања потврдили су присуство оксидативног стреса код матерално депривираних пацова.

Трипептид, GSH представља основни ендогени антиоксиданс и редокс пуфер ћелије, а смањење његовог садржаја је често документовано код оболелих од схизофреније (Magalhães i sar., 2016).

Једна од најочљивијих промена запажених у овом истраживању било је смањење садржаја GSH у свим испитиваним структурама мозга пацова, као дугорочна последица ране матерналне депривације а што је у сагласности са литаратурним подацима других анималних модела. Истраживања на анималном фенциклидинском моделу схизофреније такође су указала на смањење концентрације GSH, као једне од најважнијих промена параметара оксидативног стреса (Radonjić i sar., 2010; Stojković i sar., 2012;).

Студије магнетне резонантне спектроскопије (MRS) показале су негативну корелацију између нивоа GSH у мозгу и тежине негативних симптома у клиничкој слици оболелих од схизофреније. Ово може указивати на протективну улогу GSH у односу на развој и тежину негативних симптома у клиничкој слици оболелих (Matsuzawa i Hashimoto, 2011).

Генетска истраживања такође указују на значај смањења нивоа GSH као и ензима укључених у њихов метаболизам у етиопатогенези схизофреније. GCLC ген кодира каталитичку субјединицу γ -GCL, првог корака у GSH синтези. Студија Gysin и сар. (Gysin i sar. 2007) је указала на значај алелне веријанте GCLC гена у етиопатогенези схизофреније.

Полиморфизам овог гена је удружен са смањеном синтезом GSH, активношћу ензима γ -GCL и експресијом GCLC у ћелијским културама фибробласта пацијената оболелих од схизофреније (Gysin i sar. 2007). Такође, студије су показале да бројне копије и полиморфизми гена који кодирају глутатион-с-трансферазу могу бити предиспонирајући фактори у етиопатогенези схизофреније (Rodriguez-Santiago i sar. 2010).

Међутим, иако су нивои GSH у испитаним можданим структурама код матерално депривираних пацова у нашој студији статистички значајно снижени, активност γ -GCL, првог корака у GSH синтези, није се променила. Овај налаз указује на одговарајућу синтезу GSH као и на конверзију GSH у оксидовани облик (GSSG).

Осим тога, испитивања у нашој студији су открила повећану активност GPx само у кортексу матерално депривираних пацова. Овај ензим претвара пароксиде и хидроксилне радикале у нетоксичне облике истовремено претварајући GSH у оксидовани облик. Активност ензима GR који регенерише GSSG у његов редуковани облик такође је остао непромењен. Повећање активност GPx и недостатак адекватног повећања активности GR могло би објаснити промене уочене у кортексу, али промене у активностима GR и GPx у другим испитаним структурама не разјашњавају смањење нивоа GSH забележеног у тим структурама.

Супероксид дизмутаза конвертује O₂⁻ (у присуству супстрата који обезбеђују протон) у H₂O₂. Верује се да су хидроксилни радикали једни од покретача оксидативног оштећења. Са друге стране, супероксидни радикали су такође биолошки токсични продукти. Стога се ензим SOD, са оправданим разлогом, сматра једним од најпотентнијих антиоксидантских система и погодним маркером у испитивању промена које прате оксидативни стрес. Наше истраживање је показало повећану активност SOD у кортексу и хипокампусу матерално депривираних пацова. Такође, у кортексу је показана и повећана експресије и цитосолних (SOD1) и митохондријалних (SOD2) изоформи овог ензима. Посматрани заједно ови налази у нашем истраживању указују на поремећај равнотеже редокс регулације.

У прилог поремећају редокс регулације говоре и студије на другим анималним моделима схизофреније, као што је анимални модел схизофреније посредован МК-801 неуротоксичношћу код пацова (Ozyurt i sar., 2014). Резултати ове студије су показали повећање активности SOD, GSH-Px, и MDA у префронталном кортексу код пацова којима је администриран МК-801 као и да антиоксидант

мелатонин, има потенцијално протективни ефекат на оксидативни стрес који је показан и у овом анималном моделу схизофреније.

Липидна пероксидација је један од централних догађаја у оксидативном стресу и може се верификовати различитим есејима укључујући квантификацију пероксида и његових продуката. Малондиалдехид је један од крајњих продуката липидне пероксидација и стога погодан параметар за праћења степена оштећења. Међутим, оксидативни стрес, изражен повећањем концентрације MDA у нашем истраживању уочен је само у кортексу и таламусу матернално депривираних пацова што указује на закључак да је у тим структурама производња слободних радикала превазишла одбрамбене антиоксидативне механизме заштите и довела до оштећење структуре липида.

Неколико студија је испитивало утицај матерналне депривације на оксидативни стрес у мозгу пацова, али нема резултата о дуготрајним последицама ове перинаталне процедуре. Uysal и сар. (Uysal i sar., 2005) испитивали су непосредне последице матерналне депривације на оксидативни стрес у мозгу. Ови аутори су показали да промене у липидној пероксидацији и активностима антиоксидантних ензима у мозгу зависе од старости и пола пацова подвргнутих матерналној депривацији. Двадесетчетворочасовна матернална депривација у раном постнаталном периоду пацова у PN6, изазвала је знатно смањење липидне пероксидације у мозгу и знатно повећање активности GPx у хипокампусу, префронталном кортексу и стријатуму, као тренутну реакцију, то јест у PN7. Матернална депривација (24 сата) у каснијем постнаталном животу (P20) изазвала је знатно повећање липидне пароксидације у мозгу и знатно повећање активности SOD у мозгу у PN21. Осим тога, иако је примећено повећање активности SOD ензима и повећање липидне пероксидације у мозгу мушких пацова одвојених од мајке, ови параметри били су стабилни код женских пацова што указује на то да женски хормони имају заштитну улогу, вероватно уз помоћ способности естрогена да неутралишу слободне радикале (Miura i sar., 1996).

Резултати нашег истраживања у складу су с резултатима које су добили Diehl и сар. (Diehl i sar., 2012) према којима периодична матернална сепарација, на три сата сваког дана током првих десет дана живота, доводи до повећања оксидативног стреса која се манифестује повећаним бројем прекида DNK код животиња старих три месеца. Прекомерна производња ROS-а може довести до оксидативне смрти неурона.

Наше претходно истраживање (Aksić i sar., 2014) показало је да матернална депривација има дугорочни утицај на морфологију мозга, пре свега да доводи до укупног смањења волумена хипокампуса, као и смањења кортикалне дебљине у префронталном, ретроспленијалном и моторном делу коре, као и смањење експресије NeuN, маркера неурона, који се сада обзиром на резултате из овог истраживања може повезати с прекомерном производњом ROS-а и поремећајем одбране од оксидативног стреса представљеним у овом раду.

На значај оксидативног стреса у етиопатогенези психијатријских обољења указују и најновија клиничка истраживања. Недавно су Vargas и сар. (Vargas i sar., 2013) показали присуство оксидативног дисбаланса у крви психијатријских пацијената који у својој историји имају покушаја суицида. Код ових пацијената сигнификантно су повишени параметри оксидативног стреса као што су NO и липидни пероксиди, као и снижени укупни антиоксиданти плазме (TRAP) .

С друге стране, циљ нашег истраживања је био потенцијални извор повећане продукције слободних радикала који може бити узрок оксидативном оштећењу. Ланац транспорта електрона повезује електронски трансфер између донора електрона и акцептора електрона са трансфером H⁺ јона кроз мембрану, стога митохондријална дисфункција може представљати водећи генератор слободних радикала у настанку оксидативног дисбаланса.

Литературни подаци недвосмислено указују на постојање митохондријалне дисфункције у сложеној, патологији схизофреније (Toker i Agam, 2015).

У нашем истраживању је испитиван дугорочни утицај матерналне депривације на активност комплекса I и цитохром C оксидазе респираторног ланца митохондрија.

Резултати нашег истраживања су показала повећану активност комплекса I у свим испитиваним структурама мозга матернално депривираних пацова осим у кортексу док је активности COX у свим испитиваним структурама била непромењена.

Повећана активност комплекса I без истовременог повећања активности COX могло би довести до повећаног директног преношења електрона из конзима Q на кисеоник и до формирања слободних радикала.

Ензим цитохром C оксидаза, односно комплекс IV, је значајан трансмембрански протеински комплекс који је последњи ензимски систем у респираторном ланцу инкорпориран у митохондријалној мембрани ћелија. Његова улога је је транспорт електрона са сва четири цитохром c молекула и њихов пренос на молекул кисеоника претварајући их у два молекула воде.

Отежано ћелијско дисање и нарушена динамика митохондријалног ланца (Ben-Shachar i sar., 1999; Rosenfeld i sar 2011) представљене су као последице измењене активности комплекса I.

Литературни подаци испитивања митохондријалних поремећаја код оболелих од схизофреније указују на другачије резултате. У истраживању које су извршили Gubert и сар. (Gubert i sar., 2013) забележено је знатно смањење активности митохондријалног комплекса I и повећање липидних пероксида као маркера оксидативног стреса у мононуклеарним ћелијама периферне крви оболелих од схизофреније. С друге стране Drog и сар. (Drog i sar., 2002) запазили су изузетно специфичне и осетљиве алтерације активности комплекса I у тромбоцитима схизофрених пацијената у зависности од стадијума болести. Повећање активности доведено је у везу са психотичном симптоматологијом, док је смањење активности запажено код пацијената с резидуалном схизофренијом.

Post mortem истраживања такође су показале недостатке у производњи АТФ-а у митохондријама код схизофрених пацијената. Cavalier и сар. (Cavelier i sar., 1995) показали су знатну редукцију активности COX (43% у фронталном кортексу и 63% у *pc.caudatus* -у) и повећање делеција mtDNK сразмерно годинама, лечених схизофрених пацијената.

Међутим, током недавних испитивања *substantia nigra*-е и вентралне тегменталне области код схизофрених пацијената нису уочене промене активности COX, што је у сагласности са резултатима наше студије, мада је запажено знатно смањење експресија COX субјединица II и IV-I (Rice i sar., 2014).

Митохондријална дисфункција такође је показана и код анималног модела схизофреније индуковане применом субанестетских доза кетаминa на пацовима где су се запажене повећане активности комплекса I, II, I-III и IV митохондријалног респираторног ланца у префронталном кортексу, стријатуму и хипокампусу мозга пацова на структурно-специфичан начин и у различитим временским интервалима након администрације кетаминa (de Oliveira i sar., 2011).

Дуго су митохондрије сматране најважнијим извором слободних радикала, али актуелна истраживања потенцирају улогу ензима NADPH оксидазе у редокс дисрегулацији (Sorice i Krause, 2009), као и на значајну улогу NOX ензима у патогенези схизофреније (Sorice i sar., 2012). Чини се да ROS које производе NADPH оксидазе имају две физиолошке улоге. Супероксид који производи NOX₂ неопходан је за респираторни прасак који се дешава у фагоцитима. Друга улога NOX налази се у сигнализацији: O₂⁻ и водоник-пероксид (H₂O₂) који произведени из NOX ензима могу деловати специфично и реверзибилно са протеинима, мењајући њихову активност, локализацију и полувреме живота (Brown i Griendling, 2009).

Породица NADPH оксидаза једна је од основних произвођача реактивних врста кисеоника који играју важну улогу у трансдукцији сигнала. Као што је већ наведено NOX₂ је одговоран за респираторни оксидативни прасак у неутрофилима, али јавља се и у CNS-у. Експресија NOX ензима у регионима CNS-а је веома сложена и предмет је многобројних истраживања. Доказано је, на хуманом и експерименталном материјалу, да је NOX₂ присутна у готово свим релевантним структурама мозга: у адултном кортексу (Kim i sar., 2005; Infanger i sar., 2006), *corpus callosum* и кичменој мождини (Green i sar., 2001), хипокампусу (Park i Jin, 2008), можданом стаблу и церебелуму (Tejada-Simon i sar., 2005), амигдалама, стријатуму и таламусу (Serrano i sar., 2003; Ma i Zhou, 2006), хипоталамусу и *Locus coeruleus* (Ye i sar., 2006).

NOX₂ ензимски комплекс локализован је интрацелуарно и плазма мембрански, и катализатор је продукције супероксида из кисеоничких радикала.

Улога NOX-а у процесу развоја CNS-а и при нормалној експресији обухвата низ догађања укључујући пре свега целуларну диференцијацију, процесе апоптозе, неуралну сигнализацију, пластичност можданих структура уплив у процесе меморисања и учења (Tejada-Simon i sar., 2005).

NOX-зависна ROS продукција откривена је микроглији, астроцитима и неуронима. ROS се генеришу махом у каскадној реакцији која започиње продукцијом супероксида. Реактивни слободни радикали настају у ланчаној реакцији имају дужи полуживот и већи потенцијал за оштећење ћелија.

Микроглијалне ћелије су основне ћелије које садрже NOX₂ у CNS-у. Показано је да NOX₂ има изражену усходну регулацију у различитим CNS поремећајима где ствара велике количине ROS (Sorice i Krause, 2009; Sorice i sar., 2012).

Behrens i sar., (Behrens i sar., 2008) су на кетаминском анималном моделу показали да је неуронска продукција интерлеукина-6 (IL-6) неопходна за кетамин-посредовану активацију NADPH ооксидаза у мозгу. Ово истраживање је такође показало да уклањање IL-6 у култури неурона (блокирањем анти- IL-6 антителима) , или *in vivo* коришћењем IL-6-дефицирних мишева спречава пораст супероксида и настанак оксидативног стреса што има протективну улогу у односу на интернеуроне. Снижење нивоа цитокина може имати протективан утицај на NADPH ооксидаза посредован оксидативни стрес и његов утицај у етиопатогензи кетамин индуковане психозе.

Најновија студија Jiang i sar., (Jiang i sar., 2016) је показала да метаболити клозапина, атипичног антипсихотика, имају неуропротективни ефекат управо кроз инактивацију микроглијалног NOX₂ што такође говори у прилог да NADPH ооксидазе јесу извор слободних радикала од значаја у етиопатогензи схизофреније.

У нашем истраживању кортекса матернално депривираних животиња једина примећена промена у NOX била је повећана експресија мембранске субјединице gp91^{phox}. Промене примећене у кортексу указују да би NADPH ооксидаза могла бити значајан извор слободних радикала.

С друге стране, дугорочни ефекат матерналне депривације у хипокампусу је показао повећање експресије *gp91^{phox}* која је праћена повећањем експресије *p22^{phox}* и *p40^{phox}* као и смањењем експресије *p47^{phox}*.

Ове промене у експресији мембранских и регулаторних субјединица које су примећене у хипокампусу могле би се објаснити присуством негативне повратне спреге која регулише ниво ROS-а у мозгу. Присуство негативне повратне спреге би могао бити заштитни механизам против даље активације NOX и производње реактивних врста кисеоника. Шта више, обзиром на синаптичку локализацију NOX ензимског комплекса у хипокампусу, NOX је значајан извор супероксид сигналних молекула који су неопходни за адекватно функционисање когнитивног одговора као што су дугорочни емоционални одговор и хипокампадна меморија, (Tejada-Simon *et al.*, 2005). Узимајући у обзир ову физиолошку функцију, може се претпоставити да то захтева и прецизнију регулацију као превенцију редокс дисрегулације и оштећења. Литературни подаци указују да експресију NOX2 гена регулишу активирајући и инхибирајући фактори који су укључени у многе ћелијске процесе, као што су ембриогенеза и канцерогенеза (Bedard *et al.*, 2007).

Наше истраживање је показало да у таламусу постоји снижење експресије *gp91^{phox}* док су се дугорочни ефекти матерналне депривације у *nc.caudatus*-у огледали у смањеној експресији *gp91^{phox}*, *p22^{phox}* и *p47^{phox}*. Ово може указивати на смањену активност NADPH оксидазе у овој структури.

NADPH оксидаза/ ROS-посредовано ћелијско сигнализирање може се описати као целуларни “аларм систем” чини ћелију будном и спремном или да се адаптира на стрес или да подлегне апоптози (Jiang *et al.*, 2011). Обзиром на физиолошку улогу у функционисању ћелија у мозгу, смањена активност могла би да буде у основи поремећаја код схизофреније.

Литературни подаци такође указују на значај NOX-а и у етиопатогенези других обољења CNS-а. Показано је да до активације NOX₂ ензима долази у можданим структурама пацијента оболелих од Алцхајмерове болести и да NADPH оксидаза активирањем микроглије доводи до продукције ROS који показују потенцијалну токсичност за околне неуроне оболелих пацијента (Shimohama *et al.*, 2000).

Такође је показано и да NOX₂ инхибиторни пептид gp91ds-tat, редукује оксидативни стрес и настанак патолошког амилода β на експерименталном моделу мишева (Park i Jin, 2008).

Обзиром на релативно мало литературних података и актуелност NADPH оксидазе и њене потенцијалне улоге у етиопатологији психијатријских обољења као и шизофреније, резултати нашег истраживања могу бити од значаја у сагледавања и разумевању етиопатогенетских механизма шизофреније,

6. ЗАКЉУЧЦИ

У складу са постављеним циљевима овог истраживања, а на основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

У складу са постављеним циљевима овог истраживања, а на основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

1. Матернална депривација доводи до смањења активности АСhЕ у кортексу као и до повећања активности АСhЕ у хипокампусу.
2. Матернална депривација доводи до смањења густине холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу мозга пацова као и до повећања густине холинергичких влакана у СА1 подручју хипокампуса.
3. Матернална депривација доводи до снижења редукованог глутатиона у свим испитиваним структурама мозга пацова
4. Матернална депривација не доводи до промена у активности γ -GCL и GR у свим испитиваним структурама мозга пацова.
5. Матернална депривација доводи до повећања активности ензима GPx у кортексу, и смањења активности овог ензима у таламусу.
6. Матернална депривација узрокује повећање активности ензима SOD у кортексу и хипокампусу, као и повећану експресију SOD1 и SOD2 у кортексу.
7. Матернална депривација доводи до повећања липидне пероксидације у кортексу и таламусу пацова.
8. Матернална депривација узрокује повећану активност комплекса I у хипокампусу, таламусу и *nc.caudatus*-у.
9. Матернална депривација не доводи до промена у активности COX у испитиваним структурама мозга пацова.
10. Матернална депривација доводи до повећане експресије gp91^{phox} NOX субјединице у кортексу и хипокампусу, као и до снижене експресије у таламусу и *nc.caudatus* –у.
11. Матернална депривација узрокује повећану експресију субјединице p22^{phox} у хипокампусу и снижење експресије у *nc.caudatus*–у.
12. Матернална депривација узрокује снижење експресије NOX субјединице p47^{phox} у хипокампусу и *nc.caudatus*-у.

13. Матернална депривација не узрокује промене у експресији NOX субјединице p67^{phox} у испитиваним структурама мозга пацова.
14. Матернална депривација узрокује повећање експресије NOX субјединице p40^{phox} у хипокампусу.
15. На основу резултата ових истраживања можемо закључити да матернална депривација узрокује дугорочне промене у мозгу пацова. Запажени поремећај редокс баланса у кортексу је највероватније последица промена на нивоу NOX ензима, у хипокампусу су за овај дисбаланс одговорни и респираторни ланац и NOX, док су у осталим структурама примарне промене на нивоу респираторног ланца.
16. Разумевање биохемијских промена у мозгу животиња које настају као дугорочна последица матерналне депривације може бити од значаја за сагледавање патогенетских механизма шизофреније и развој нових потенцијалних терапијских стратегија у лечењу ове болести.

7. ЛИТЕРАТУРА

Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2010. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 12(1):125-69. doi: 10.1089/ARS.2009.2668.

Aksić, M., Radonjić, N.V., Aleksić, D., Jevtić, G., Marković, B., Petronijević, N., Radonjić, V., Filipović, B., 2014. Long-term effects of maternal deprivation on the neuronal soma area in the rat neocortex. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/235238.

Aksić, M., Radonjić, N.V., Aleksić, D., Jevtić, G., Marković, B., Petronijević, N., Radonjić, V., Filipović, B., 2013. Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 73(3): 394-403.

Akyol, O., Herken, H., Uz, E., Fadillioglu, E., Unal, S., Sogut, S., et al., 2002. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 26:995-1005.

Altuntas, I., Aksoy, H., Coskun, I., Cayköylü, A., Akçay, F., 2000. Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients. *ClinChem Lab Med*. 38:1277-81.

Andreasen, N.C., 1995. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *The Lancet* 346;8973:477-481.

Anthonymuthu, T.S., Kenny, E.M., Bayır, H., 2016. Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Res*. pii: S0006-8993(16)30040-3. doi: 10.1016/j.brainres.2016.02.006.

Babior, B.M., 2004. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 16:42-47.

Barak, S., 2009. Modeling cholinergic aspects of schizophrenia: Focus on the antimuscarinic syndrome. *Behav Brain Res*. 204(2):335-351.

Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 87:245-313.

Behrens, M.M., Ali, S.S., Dao, D.N., Lucero, J., Shekhtman, G., Quick, K.L., Dugan, L.L., 2007. Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science*. 318:1645-1647.

Bencherif, M., Stachowiak, M.K., Kucinski, A.J., Lippiello, P.M., 2012. Alpha7 nicotinic cholinergic neuromodulation may reconcile multiple neurotransmitter hypotheses of schizophrenia. *Med Hypotheses*. 78(5):594-600.

Benetti, S., Mechelli, A., Picchioni, M., Broome, M., Williams, S., McGuire, P., 2009. Functional integration between the posterior hippocampus and prefrontal cortex is

impaired in both first episode schizophrenia and the at risk mental state. *Brain: journal of neurology*. 132(9):2426-2436.

Ben-Shachar, D., Zuk, R., Gazawi, H., Reshef, A., Sheinkman, A., Klein, E., 1999. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2: 245-253.

Bowlby, J., 1940. The influence of early environment in the development of neurosis and neurotic character. *International Journal of Psycho-Analysis*, XXI, 1-25.

Bowlby, J., 1944. Forty-four juvenile thieves: Their characters and home lives. *International Journal of Psycho-Analysis*, XXV, 19-52.

Bowlby, J., 1949. The study and reduction of group tensions in the family. *Human Relations*. 2, 123-128.

Bowlby, J., 1951. Maternal care and mental health. World Health Organization Monograph (Serial No. 2).

Bošković, M., Vovk, T., Kores Plesničar, B., Grabnar, I., 2011. Oxidative Stress in Schizophrenia. *Current Neuropharmacology*. 9(2):301-312. doi:10.2174/157015911795596595

Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P., Davison, A.N., 1976. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 99(3):459-96.

Bramon, E., Kelly, J. van Os, J., Murray, R.M., 2001. The cascade of increasingly deviant development that culminates in the onset of schizophrenia. *NeuroScience News*. 4; 5-19.

Brown, D.I., Griendling, K.K., 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 47:1239-53.

Brown, R.W, Beale, K.S., Jay Frye, G.D., 2002. Mecamylamine blocks enhancement of reference memory but not working memory produced by post-training injection of nicotine in rats tested on the radial arm maze. *Behav Brain Res*. 134(1-2):259-265.

Buchanan, R.W., Summerfelt, A., Tek, C., Gold, J., 2003. An open-labeled trial of adjunctive donepezil for cognitive impairments in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 59(1):29-33.

Bucci, D.J., Holland, P.C., Gallagher, M., 1998. Removal of cholinergic input to rat posterior parietal cortex disrupts incremental processing of conditioned stimuli. *J Neurosci*. 18(19): 8038-46.

Burton, G.W., Ingold, K.U., 1989. Mechanisms of antioxidant action: preventive and chain-breaking antioxidants. U:CRC Handbook of Free radicals and Antioxidants in Biomedicine. Vol.II CRC Press Inc. Boca Raton, FL. 29-43.

Cajal, S.R., 1911. Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. A. Maloine, Paris. English translation by N. Swanson and L.W. Swanson, Histology of the Nervous System, Vol. 2. Oxford University Press, New York, Oxford, 1995.

Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113:484-90.

Carruthers, S.P., Gurvich, C.T., Rossell, S.L., 2015. The muscarinic system, cognition and schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 55:393-402. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.011.

Cavelier, L., Jazin, E.E., Eriksson, I., Prince, J., Bave, U., Oreland, L., Gyllensten, U., 1995. Decreased cytochrome-c oxydase activity and lack of age related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics. *Genomics.* 29:217-224.

Cirulli, F., Francia, N., Berry, A., Aloe, L., Alleva, E., Suomi, S.J., 2009. Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 33(4):573-85.

Corbet, R., Hartmna, H., Kerman, L., 1997. Effects of atypical antipsychotic agents on social behaviour in rodents. *Pharmacol Biochem Behav.* 45:9-17.

Coyle, J.T., Tsai, G., Goff, D., 2003. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003:318-27.

Crees, I., Burt, D., Snyder, S., 1976. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antipsychophrenic drugs. *Natura.* 261:717.

Crider, A., Solomon, P., Mc Mahon, P., 1982. Disruption of selective attention in the rat following chronic d-amphetamine administration: relationship to schizophrenic attention disorders. *Biol Psych.* 17:351-360.

Crow, T.J., 2008. The 'big bang' theory of the origin of psychosis and the faculty of language. *Schizophrenia Research.* 102(1-3):31-52.

Davis, K., Kahn, R., Ko, G., 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry.* 148:1474-1486.

Deng C., Huang, X.F., 2005. Decreased density of muscarinic receptors in the superior temporal gyrus in schizophrenia. *J Neurosci Res.* 81(6):883-90.

de Oliveira, L., Fraga, D.B., De Luca, R.D., Canevar, L., Ghedim, F.V., Matos, M.P., Streck, E.L., Quevedo, J., Zugno, A.I., 2011. Behavioral changes and mitochondrial

dys-function in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis.* 26(1):69–77.

Diehl, L.A., Alvares, L.O., Noschang, C., Engelke, D., Andreazza, A.C., Gonçalves C.A., Quillfeldt, J.A., Dalmaz, C., 2012. Long-Lasting Effects of Maternal Separation on an Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder: Effects on Memory and Hippocampal Oxidative Stress. *Neurochem Res.* 37(4):700-707.

Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., 2009. Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 10:27–3.

Do, K.Q., Trabesinger, A.H., Kirsten-Kruger, M., Lauer, C.J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., Cuenod, M., 2000. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci.* 12:3721–3728.

Dong, H., Xiang, Y.Y., Farchi, N., Ju, W., Wu, Y., Chen, L., Wang, Y., Hochner, B., Yang, B., Soreq, H., Lu, W.Y., 2004. Excessive expression of acetylcholinesterase impairs glutamatergic synaptogenesis in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience.* 24(41):8950-8960.

Donoghue, J.P., Carroll, K.L., 1987. Cholinergic modulation of sensory responses in rat primary somatic sensory cortex. *Brain Res.* 408(1-2):367-71.

Drake, R.J, Lewis, S.W., 2005. Early detection of schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry.* 18(2):147–50.

Dror, N., Klein, E., Karry, R., Sheinkman, A., 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(9):995–1001.

Drusch, K., Lowe, A., Fisahn, K., Brinkmeyer, J., Musso, F., Mobascher, A., Warbrick, T., Shah, J., Ohmann, C., Winterer, G., Wolwer, W., 2013. Effects of nicotine on social cognition, social competence and self-reported stress in schizophrenia patients and healthy controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 263(6):519-527.

du Bois, T.M., Newell, K.A., Han, M., Deng, C., Huang, X-F., 2009. Perinatal PCP treatment alters the developmental expression of prefrontal and hippocampal muscarinic receptors. *Prog NeuroPsychopharmac and Biol Psychiatry.* 33(1):37-40.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 7;102(1):33-42.

Đorđević, B.V., Pavlović, D.D., Kocić, M.G, 2000. Biohemija slobodnih radikala. Niš: Medicinski fakultet.

- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 1990. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmac.* 1:469-490.
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 1995b. Maternal separation reduces latent inhibition in the conditioned taste aversion paradigm. *Neurosci Res Commun.* 17:27-33.
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 1998. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: clinical evidence and animal models. *Neurosci Res Commun.* 22:127–136.
- Ellenbroek, B., Cools, A., 1998. The paw test: an animal model for neuroleptic drugs which fulfills the criteria for pharmacological isomorphism. *Life sci.* 42:1205-1213.
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 2000. The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. *Neuropsychopharmacology.* 23:99-106.
- Ellenbroek, B.A., Derks, N., Park, H.J., 2005. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress.* 8:247–257.
- Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2003. Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clin. Neurosci. Res.* 3:297–302.
- Ellenbroek, B.A., van den Kroonenberg, P.T., Cools, A.R., 1998. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr. Res.* 30:251–260.
- Ellenbroek, B.A., Willeman, A., Cools, A., 1989. Are antagonists of dopamine D1 receptors drugs that attenuate both positive and negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2(3):191-199.
- Ellinwood, E., Sudilovsky, A., Nelson, L., 1972. Behavioral analysis of chronic amphetamine intoxication. *Biol Psych.* 4:215-225.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82:70–7.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., et al., 1959. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
- Emiliani, F.E., Sedlak, T.W., Sawa, A., 2014. Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old story. *Curr Opin Psychiatry.* 27(3):185-90. doi: 10.1097/YCO.000000000000054. Review. PubMed PMID: 24613987; PubMed Central PMCID: PMC4054867.
- Ettenberg, A., Koob, Z., Bloom, F., 1981. Response artifact in the measurement of neuroleptic induced anhedonia. *Science.* 213:357.
- Fine, A., Hoyle, C., Maclean, C.J., Levatte, T.L., Baker, H.F., Ridley, R.M., 1997. Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin,

ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys. *Neuroscience*. 81(2):331-43

Fink, J., Swerdloff, A., Reis, D., 1982. Genetic control of dopamine receptors in mouse caudate nucleus: relationship of cataleptic response to neuroleptic drugs. *Neurosci Lett*. 32:301-305.

Foster, D. J., Jones, C. K., Conn, P. J., 2012. Emerging approaches for treatment of schizophrenia: modulation of cholinergic signaling. *Discovery Medicine*. 14(79):413–420.

Fraguas, D., Gonzalez-Pinto, A., Micó, J.A., Reig, S., Parellada, M., Martínez-Cengotitabengoa, M., 2012. Decreased glutathione levels predict loss of brain volume in children and adolescents with first-episode psychosis in a two-year longitudinal study. *Schizophr Res*. 137:58-65.

Francis, D.D., Meaney, M.J., 1999. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol*. 9:128-34.

Freedman, R., Adams, C.E., Leonard, S., 2000. The alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 20:299–306.

Freedman, R., Olincy, A., Buchanan, R. W., et al., 2008. Initial phase 2 trial of a nicotinic agonist in schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*. 165(8):1040–1047.

Freedman, R., Waldo, M., 1991. Elementary neuronal dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Res*. 4:233-243.

Gawryluk, J.W., Wang, J.F., Andreatza, A.C., Shao, L., Young, L.T., 2011. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 14:123-130.

Geyer, M.A., Segal, D.S., Greenberg, B.D., 1984. Increased startle responding in rats treated with phencyclidine. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 6:1-4.

Giacobini, E., 2004. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res*. 50(4):433–440.

Gibbons, A., Dean, B., 2016. The Cholinergic System: An Emerging Drug Target for Schizophrenia. *Curr Pharm Des* 22(14):2124-33.

Gibbons, A.S., Scarr, E., Boer, S., Money, T., Jeon, W.J., Felder, C., et al., 2013. Widespread decreases in cortical muscarinic receptors in a subset of people with schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 16(1):37-46. doi: 10.1017/S1461145712000028.

- Giedd, J.N., Lalonde, F.M., Celano, M.J., White, S.L., Wallace, G.L., Lee, N.R., Lenroot, R.K., 2009. Anatomical brain magnetic resonance imaging of typically developing children and adolescents. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 48:465–470.
- Gold, P.E., 2003. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.* 80(3):194-210.
- Goldfarb, W., 1943. The effects of early institutional care on adolescent personality. *Journal of Experimental Education.* 14:441-447.
- Goldfarb, W., 1945. Psychological privation in infancy and subsequent adjustment. *American Journal of Orthopsychiatry.* 15:247-255.
- Gray, J., Feldon, J., Rawlins, J., 1992. The neuropsychology of schizophrenia. *Behavior and Brain science.* 14:1-35.
- Green, S.P., Cairns, B., Rae, J., Errett-Baroncini, C., Hongo, J.A., Erickson, R.W., Curnutte, J.T., 2001. Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21:374–384.
- Greenfield, S.A., Chubb, I.W., Grünewald, R.A., Henderson, Z., May, J., Portnoy, S., Weston, J., Wright, M.C., 1984. A non-cholinergic function for acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioural evidence. *Exp Brain Res.* 54(3):513-20.
- Gruss, M., Braun, K., Frey, J.U., Korz, V., 2008. Maternal separation during a specific postnatal time window prevents reinforcement of hippocampal long-term potentiation in adolescent rats. *Neuroscience,* 152:1–7.
- Gubert, C., Stertz, L., Pfaffenseller, B., Panizzutti, B.S., Rezin, G.T., Massuda, R., et al. 2013. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res.* 47(10): 1396–1402.
- Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tosic, M., Werge, T., Cuenod, M., Do, K.Q., 2007. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci USA .* 104:16621–16626.
- Günzler, W.A., Kremers, H., Flohé, L., 1974. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 12:444-8.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280(1):1-8.

- Hanania, T., Johnson, K.M., 1999. Regulation of NMDA-stimulated [14C]GABA and [3H]acetylcholine release by striatal glutamate and dopamine receptors. *Brain Res.* 844(1-2):106-117.
- Hardingham, G.E., Do, K.Q., 2016. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* 17(2):125-34. doi: 10.1038/nrn.2015.19. Epub 2016 Jan 14. PMID:26763624.
- Hasselmo, M.E., Anderson, B.P., Bower, J.M., 1992. Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *J Neurophysiol.* 67(5):1230-46.
- Hemsley, D., 1997. An experimental psychological model for schizophrenia, in *Search for the Causes of Schizophrenia*. Springer-Verlag. 179-188.
- Hess, H.H., Pope, A., 1960. Intralaminar distribution of cytochrome oxidase activity in human frontal isocortex. *J Neurochem.* 5:207-217.
- Hyde, T.M., Crook, J.M., 2001. Cholinergic systems and schizophrenia: primary pathology or epiphenomena? *J Chem Neuroanat.* 22(1-2):53-63.
- Ibi, M., Matsuno, K., Shiba, D., Katsuyama, M., Iwata, K., Kakehi, T., Nakagawa, T., Sango, K., Shirai, Y., Yokoyama, T., Kaneko, S., Saito, N., Yabe-Nishimura, C., 2008. Reactive oxygen species derived from NOX1=NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci.* 28:9486–9494.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 395–418.
- Infanger, D.W., Sharma, R.V., Davisson, R.L., 2006. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal.* 8(9-10):1583-96. Review.
- Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T., Stoltenberg-Hogenkamp, B.J., 2007. Rodenburg RJ. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *ClinChem.* 53:729-34.
- Jentsch, J.D., Roth, R.H., 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NmMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20, 201-225.
- Jiang, F., Zhang, Y. I., Gregory, J., Dustin, G.J., 2011. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress tolerance, and Tissue Repair. *Pharmacol Rev.* 63:218–242.
- Jiang, L., Wu, X., Wang, S., Chen, S.H., Zhou, H., Wilson, B., Jin, C.Y., Lu, R.B., Xie, K., Wang, Q., Hong, J.S., 2016. Clozapine metabolites protect dopaminergic neurons through inhibition of microglial NADPH oxidase. *J Neuroinflammation* 16;13(1):110. doi: 10.1186/s12974-016-0573-z. PMID: 27184631 Free PMC Article.

Jim, van Os., 2004. Does the urban environment cause psychosis?. *British Journal of Psychiatry*. 184(4):287–288.

Jiménez-Capdeville, M.E., Dykes, R.W., 1996. Changes in cortical acetylcholine release in the rat during day and night: differences between motor and sensory areas. *Neurosci*. 71(2):567-79.

Jones, C.K., Byun, N., Bubser, M., 2012. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 37(1):16-42. doi: 10.1038/npp.2011.199.

Jones DP., 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295:849–68.

Joëls, M., Baram, T.Z., 2009. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. 10(6):459-66.

Kamin, Lj., 1969. Predictability, surprise, attention and conditioning, in *Punishment and Aversive Behaviour*. New York, Appelton-Century-Crofts. 279- 296.

Karam, C.S., Ballon, J.S., Bivens, N.M., Freyberg, Z., Girgis, R.R., Lizardi-Ortiz, J.E., Markx, S., Lieberman, J.A., Javitch, J.A., 2010. Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 31(8):381-390.

Kibe, L.D., Lafont, I., Liddle, P., 1993. The composition of the negative syndrome of chronic schizophrenia. *Br J Psych*. 162:744.

Kim, M.J., Shin, K.S., Chung, Y.B., Jung, K.W., Cha, C.I., Shin, D.H., 2005. Immunohistochemical study of p47PHOX and gp91phox distributions in rat brain. *Brain Res*. 1040:178–186.

King, D. J., 1998. Drug treatment of the negative symptoms of Schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 8(1):33–42.

Knöchel, C., Stäblein, M., Storchak, H., Reinke, B., Jurcoane, A., Prvulovic, D., Linden, D.E., van de Ven, V., Ghinea, D., Wenzler, S., Alves, G., Matura, S., Kröger, A., Oertel-Knöchel, V., 2014. Multimodal assessments of the hippocampal formation in schizophrenia and bipolar disorder: evidences from neurobehavioral measures and functional and structural MRI. *Neuroimage Clin*. 23;6:134-44.

Koehl, M., Lemaire, V., Vallee, M., Abrous, N., Piazza, P.V., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M., 2001. Long term neurodevelopmental and behavioral effects of perinatal life events in rats. *Neurotox Res*. 3:65–83.

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.

- Konradi, C., Heckers, S., 2003. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther* 97(2):153–79.
- Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K, et al., 1986. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2-8;323(6087):411-6.
- Lahti, A.C., Weiler, M.A., Tamara Michaelidis, B.A., Parwani, A., Tamminga, C.A., 2001. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 25(4):455–67.
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 4:181–189.
- Lenzi, A., Maltinti, E., Poggi, E., Fabrizio, L., Coli, E., 2003. Effects of rivastigmine on cognitive function and quality of life in patients with schizophrenia. *Clin Neuropharmacol*. 26(6):317-21.
- Lindenau, J., Noack, H., Possel, H., Asayama, K., Wolf, G., 2000. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia*. 29(1):25-34.
- Lipska, B.K., Weinberger, D.R., 2000. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 23(3):223-39.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godzik, A., Bankston, L.A., 2002. Cysteine regulation of protein function— as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci*. 25:474-80.
- Llorente-Berzal, A., Fuentes, S., Gagliano, H., Lopez-Gallardo, M., Armario, A., Viveros, M.P., Nadal, R., 2011. Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict. Biol*. 16:624–637.
- Lorente de No, R., 1934. Studies of the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol*. 46:113-117.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265–275.
- Lubow, R., 1973. Latent inhibition. *Psychol. Bull*. 79:398-407.
- Lubow, R., 1998. Latent inhibition and conditioned Attention Theory. New York, Cambridge University Press. ISBN 0-521-36307-1.
- Lucas-Meunier, E., Fossier, P., Baux, G., Amar, M., 2003. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch*. 446(1):17-29.

- Ma, J., Shen, B., Rajakumar, N., Leung, L.S., 2004. The medial septum mediates impairment of prepulse inhibitor of acoustic startle induced by a hippocampal seizure or phencyclidine. *Behav Brain Res.* 155(1):153-66.
- Ma, L., Zhou, J., 2006. Dopamine promotes the survival of embryonic striatal cells: involvement of superoxide and endogenous NADPH oxidase. *Neurochem Res.* 31:463–471.
- Macri, S., Chiarotti, F., Wurbel, H., 2008. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav. Brain Res.* 191:227–234.
- Magalhães, P.V., Dean, O., Andreazza, A.C., Berk, M., Kapczinski, F., 2016. Antioxidant treatments for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Feb 5;2:CD008919.doi: 10.1002/14651858.CD008919.pub2.
- Maljak, G., 2009. Parametri antioksidativne zaštite i ateroskleroza. Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Marazziti, D., Baroni, S., Picchetti, M., Landi, P., Silvestri, S., Vatteroni, E., Catena, Dell'Osso, M., 2012. Psychiatric disorders and mitochondrial dysfunctions. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 16:270-5.
- Marco, E.M., Llorente, R., López-Gallardo, M., Mela, V., Llorente-Berzal, Á., Prada, C., Viveros, M.P., 2015. The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 51:151-63. doi: 10.1016.
- Marco, E.M., Macri, S., Laviola, G., 2011. Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox. Res.* 19:286–307.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol.* 41(1):31-91.
- Matsuzawa, D., Hashimoto, K., 2011. Magnetic resonance spectroscopy study of the antioxidant defense system in schizophrenia. *Antioxid Redox Signal.* 15:2057-65.
- Matsuzawa, D., Obata, T., Shirayama, Y., Nonaka, H., Kanazawa, Y., Yoshitome, E., Takanashi, J., Matsuda, T., Shimizu, E., Ikehira, H., Iyo, M., Hashimoto, K., 2008. Negative correlation between brain glutathione level and negative symptoms in schizophrenia: a 3T 1H-MRS study. *PLOS ONE.* 3:1944.
- Mavelli, I., Rigo, A., Federico, R., Ciriolo, M.R., Rotilio, G., 1982. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Biochem J.* 204(2):535-40.
- 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):240-8.

Melancon, B.J., Tarr, J.C., Panarese, J.D., Wood, M.R., Lindsley, C.W., 2013. Allosteric modulation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: improving cognition and a potential treatment for schizophrenia and Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*. 18(23-24):1185–1199.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., Levey, A.I., 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. 10(4):1185-201.

Metherate, R., Cox, C.L., Ashe, J.H., 1992. Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *J Neurosci*. 12(12):4701-11.

Miranda, M.I., Bermúdez-Rattoni, F., 1999. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(11):6478-82

Miura, T., Muraoka, S., Ogiso, T., 1996. Inhibition of lipid peroxidation by estradiol and 2-hydroxyestradiol. *Steroids*. 61:379–383.

Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A., Daly, D., 1997. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*. 17:2921-2927.

Mognaddam, B., Jakson, M.E., 2003. Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1003:131-137.

Monpays, C., Deslauriers, J., Sarret, P., Grignon, S., 2016. Mitochondrial Dysfunction in Schizophrenia: Determination of Mitochondrial Respiratory Activity in a Two-Hit Mouse Model. *J Mol Neurosci*.

Moreno, S., Mugnaini, E., Cerù, MP., 1995. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem*. 43(12):1253-67.

Morgan, C.J., Mofeez, A., Brandner, B., Bromley, L., Curran, H.V., 2004. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacol*. 29(7):208–218.

Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., Nabeshima, T., 2007. Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Internat*. 51(2-4):173-184.

Mrsulja, B.B., Kostic, V.S., 1994. U:Neurohemija u neuroloskim bolestima. *Medicinska knjiga Beograd-Zagreb*. 141-142.

- Nestler, E.J., Hyman, S.E., 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 13(10):1161-9.
- Nijholt, I., Farchi, N., Kye, M., Sklan, E.H., Shoham, S., Verbeure, B., Owen, D., Hochner, B., Spiess, J., Soreq, H., Blank, T., 2003. Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Mol Psychiatry.* 9(2):174-183.
- Newman, M.B., Nazian, S.J., Sanberg, P.R., Diamond, D.M., Shytle, R.D., 2001. Corticosterone-attenuating and anxiolytic properties of mecamylamine in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 25(3):609-20.
- Newell, K.A., Zavitsanou, K., Jew, S.K., Huang, X.F., 2007. Alterations of muscarinic and GABA receptor binding in the posterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 31(1):225-33.
- O'Donovan, M.C., Williams, N.M., Owen, M.J., 2003. Recent advances in the genetics of schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 12(2):R125–33.
- Oomen, C.A., Girardi, CEN., Cahyadi, R., Verbeek, E.C., Krugers, H., Joels, M., Lucassen, P.J., 2009. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLOS ONE* 4(1):e3675. doi: 10.1371/journal.pone.0003675
- Owen, M.J., Sawa, A., Mortensen, P.B., 2016. Schizophrenia. *Lancet.* pii: S0140-6736(15)01121-6. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01121-6.
- Own, L.S., Patel, P.D., 2013. Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in C57B/6 mice. *Horm Behav.* 60:411-419.
- Ozyurt, H., Ozyurt, B., Sarsilmaz, M., Kus, I., Songur, A., Akyol, O., 2014. Potential role of some oxidant/antioxidant status parameters in prefrontal cortex of rat brain in an experimental psychosis model and the protective effects of melatonin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 18(15):2137-44.
- Park, K.W., Jin, B.K., 2008. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons: role of neuronal NADPH oxidase. *J Neurosci Res.* 86:1053–1063.
- Paunović, V., Babinski, T., 1995. *Biološka psihijatrija 1. Molekularna osnova mentalnih procesa.* Medicinski fakultet. Beograd.
- Pepcu, G., Blandina, P., 1998. The acetylcholine, GABA, glutamate triangle in the rat forebrain. *J Physiol Paris.* 92(5-6):351-5.
- Popa-Wagner, A., Mitran, S., Sivanesan, S., Chang, E., Buga, A.M., 2013. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxid Med Cell Longev.* vol. 2013, Article ID 963520, 14 pages.. doi:10.1155/2013/963520.

Radonjić, N.V., Knežević, I.D., Vilimanovich, U., Kravić-Stevović, T., Marina, L.V., Nikolić, T., et al., 2010. Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. *Neuropharmacology*. 58:739–45.

Radonjić, V., Malobabić, S., Radonjić, V., Puskas, L., Stijak, L., Aksić, M., Filipović, B., 2014. Hippocampus--why is it studied so frequently? *Vojnosanit Pregl*. 71(2):195-201.

Raffa, M., Atig, F., Mhalla, A., Kerkeni, A., Mechri, A., 2011. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naive first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry*. 11:124.

Raffa, M., Mechri, A., Othman, L.B., Fendri, C., Gaha, L., Kerkeni, A., 2009. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33:1178–83.

Rajasekaran, A., Venkatasubramanian, G., Berk, M., Debnath, M., 2015. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 48:10-21.

Ranjekar, P.K., Hinge, A., Hegde, M.V., Ghate, M., Kale, A., Sitasawad, S., Wagh, U.V., Debsikdar, V.B., Mahadik, S.P., 2003. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res*. 121:109–122.

Reddy, R., Mahadik, S.P., Mukherjee, M., et al., 1991. Enzymes of the antioxidant system in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 30:409–12.

Rehncrona, S., Smith, D.S., Akesson, B., et al., 1980. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem*. 34:1630-8.

Rice, D., Stan, B.J., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 108:511–533.

Rice, M.W., Smith, K.L., Roberts, R.C., Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M., 2014. Assessment of cytochrome C oxidase dysfunction in the substantia nigra/ventral tegmental area in schizophrenia. *PLoS One*. 18: e100054. doi: 10.1371/journal.pone.

Roberts, D., Vickers, G., 1994. Atypical neuroleptics increase self-administration of cocaine: an evaluation of behavioural screen for antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 82:135- 139.

Robicsek, O., Karry, R., Petit, I., Salman-Kesner, N., Müller, F-J., Klein, E., et al., 2013. Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hairfollicle-

derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*. 18(10):1067–1076.

Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus: implications for cellular plasticity. *Mol. Psychiatry*. 7:609-616.

Rodriguez-Santiago, B., Brunet, A., Sobrino, B., Serra-Juhé, C., Flores, R., Armengol, L., Vilella, E., Gabau, E., Guitart, M., Guillamat, R., Martorell, L., Valero, J., Gutiérrez-Zotes, A., Labad, A., Carracedo, A., Estivill, X., Pérez-Jurado, LA., 2010. Association of common copy number variants at the glutathione S-transferase genes and rare novel genomic changes with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 15:1023–1033.

Rosenfeld, M., Brenner-Lavie, H., Ari, S.G.B., Kavushansky, A., Ben-Shachar, D., 2011. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 69(10):980–988.

Rots, N.Y., de Jong, J., Workel, J.O., Levine, S., Cools, A.R., De Kloet, E.R., 1996. Neonatally maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J. Neuroendocrinol*. 8:501–506.

Sanberg, P., Bunsey, M., Giordano, M., 1988. The catalepsy test: its ups and down. *Behav Neurosci*. 102:748-759.

Sarter, M., Bruno, J.P., 1997. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev*. 23(1-2):28-46.

Sarter, M., Nelson, C.L., Bruno, J.P., 2005. Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia," *Schizophrenia Bulletin* 31;1:117-138, 2005.

Sarter, M., Martinez, V., Kozak, R., 2009. A neurocognitive animal model dissociating between acute illness and remission periods of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 202(1-3):237-58. doi: 10.1007/s00213-008-1216-6.

Scarpa, M., Rigo, A., Viglino, P., Stevanato, R., Bracco, F., Battistin, L., 1987. Age dependence of the level of the enzymes involved in the protection against active oxygen species in the rat brain. *Proc Soc Exp Biol Med*. 185(2):129-33.

Scarr, E., 2012. Muscarinic receptors: their roles in disorders of the central nervous system and potential as therapeutic targets. *CNS Neurosci Ther*. 18(5):369–379.

Seelig, G.F., Meister, A., 1985. Glutathione biosynthesis; gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol*. 113:379–90.

Selten, J.P., Cantor-Graae E., Kahn R.S., 2007. Migration and schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*. 20(2):111–115.

- Serrano, F., Kolluri, N.S., Wientjes, F.B., Card, J.P., Klann, E., 2003. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res.* 988:193–198.
- Shekhar, A. Potter, W. Z., Lightfoot, J. et al., 2008. Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *American J Psychiatry.* 165(8):1033–1039.
- Shimohama, S., Tanino, H., Kawakami, N., Okamura, N., Kodama, H., Yamaguchi, T., Hayakawa, T., Nunomura, A., Chiba, S., Perry, G., Smith, M.A., Fujimoto, S., 2000. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res* 273: 5–9.
- Slot, J.W., Geuze, H.J., Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1986. Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest.* 55(3):363-71.
- Silberman, D.M., Acosta, G.B., Zorrilla Zubilete, M.A., 2016. Long-term effects of early life stress exposure: Role of epigenetic mechanisms. *Pharmacol Res.* pii: S1043-6618(15)00298-4. doi: 10.1016/j.phrs.2015.12.033.
- Silman, I., Sussman, J.L., 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.* 5(3):293-302.
- Somerville, S.M., Conley, R.R., Roberts, R.C., 2011. Mitochondria in the striatum of subjects with schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry.* 12(1):48–56.
- Sorce, S., Krause, K.H., 2009. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal.* 11:2481–2504.
- Sorce, S., Krause, K.H., Jaquet, V., 2012. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 69(14): 2387-407. doi:10.1007/s00018-012-1014-5.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* 2(4):294-302.
- Spiers JG, Chen HJ, Sernia C, Lavidis NA. 2015. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Front Neurosci.* 2015 Jan 19;8:456. doi: 10.3389/fnins.2014.00456. eCollection 2014. Review.
- Spitz, R. A., 1946. Anaclitic depression. *Psychoanalytic Study of the Child.* 2:313-342.
- Stasia, M.J., Li, X.J., 2008. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol.* 30:209–235.
- Srivatsan M. 2006. An analysis of acetylcholinesterase sequence for predicting mechanisms of its non-catalytic actions. *Bioinformation.* 1(8):281-4.

Steinpreis, R.E., 1996. The behavioral and neurochemical effects of phencyclidine in humans and animals: some implications for modeling psychosis. *Behav Brain Res.* 74:45-55.

Steullet, P., Cabungcal, J.H., Monin, A., Dwir, D., O'Donnell, P., Cuenod, M., Do, K.Q., 2014. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A "central hub" in schizophrenia pathophysiology? *Schizophr Res.* pii:S0920-9964(14)00313-2. doi: 10.1016/j.schres.2014.06.021. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 25000913; PubMed Central PMCID: PMC4282982.

Stojković, T., Radonjić, N.V., Velimirović, M., Jevtić, G., Popovic, V., Doknić, M., Petronijević, N.D., 2012. Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 39:192-199.

Sun, M., Zigman, S., 1978. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 90:81-9.

Tamminga, C., Thaker, G., Buchanan, R., 1999. Limbic systems abnormalities identified in schizophrenia using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose and neocortical alteration with deficit syndrome. *Arch Gen Psych.* 49:522-530.

Tamminga, C.A., Stan, A.D., Wagner, A.D., 2010. The hippocampal formation in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 167(10):1178-93.

Tandon, R., Greden, J.F., 1989. Cholinergic hyperactivity and negative schizophrenic symptoms. A model of cholinergic/dopaminergic interactions in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 46(8):745-753.

Tandon, R., Shipley, J. E., Greden, J. F., Mann, N. A., Eisner, W. H., Goodson, J.-A., 1991. Muscarinic cholinergic hyperactivity in schizophrenia. Relationship to positive and negative Symptoms. *Schizophrenia Research.* 4(1):23-30.

Tejada-Simon, M.V., Serrano, F., Villasana, L.E., Kanterewicz, B.I., Wu, G.Y., Quinn, M.T., Klann, E., 2005. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 29:97-106.

Terry, A.V. Jr., Mahadik, S.P., 2007. Time dependent cognitive deficits associated with first and second generation antipsychotics: cholinergic dysregulation as a potential mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 320;3:961-968, 2007.

Terpstra, M., Vaughan, T.J., Ugurbil, K., Lim, K.O., Schulz, S.C., Gruetter, R., 2005. Validation of glutathione quantitation from STEAM spectra against edited 1H NMR spectroscopy at 4T: application to schizophrenia. *MAGMA.* 18:276-82.

Toker, L., Agam, G., 2015. Mitochondrial dysfunction in psychiatric morbidity: current evidence and therapeutic prospects. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 11:2441-7.

Tsai, M.C., Liou, C.W., Lin, T.K., Lin, I.M., Huang, T.L., 2013. Changes in oxidative stress markers in patients with schizophrenia: the effect of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 209:284-90.

Uysal, N., Gonenc, S., Acikgoz, O., Pekcetin, C., Kayatekin, B.M., Sonmez, A., Semin, I., 2005. Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. *Neurosci Lett.* 384:98–101.

van Oers, H.J., de Kloet, E.R., Levine, S., 1997. Persistent, but paradoxical, effectson HPA regulation of infants maternally deprived at different ages. *Stress.* 1:249–262.

Vargas, H.O., Nunes, S.O., Pizzo de Castro, M., Bortolasci, C.C., Sabbatini Barbosa, D., Kaminami Morimoto, H., Venugopal, K., Dodd, S., Maes, M., Berk, M., 2013. Oxidative stress and lowered total antioxidant status are associated with a history of suicide attempts. *J Affect Disord.* 150(3):923-30. doi: 10.1016/j.jad.2013.05.016.

Viveros, M.P., Diaz, F., Mateos, B., Rodriguez, N., Chowen, J.A., 2010a. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm. Behav.* 57:405–414.

Viveros, M.P., Diaz, F., Mateos, B., Rodriguez, N., Chowen, J.A., 2010. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm Behav.* 58:808-19.

Viveros, M.P., Llorente, R., Diaz, F., Romero-Zerbo, S.Y., Bermudez-Silva, F.J., Rodriguez de Fonseca, F., Argente, J., Chowen, J.A., 2010b. Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, bodyweight and circulating hormone levels. *Horm. Behav.* 58:808–819.

Vivinetto, A.L., Suarez, M.M., Rivarola, M.A., 2013. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res.* 240:110-118.

Voytko, M.L., Olton, D.S., Richardson, R.T., Gorman, L.K., Tobin, J.R., Price, D.L., 1995.

Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J Neurosci.* 14(1):167-86. Erratum in: *J Neurosci.* (3 Pt 2)

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: R. Fried, Editor, *Methods in Neurochemistry.* vol. 2, Marcel Dekker, New York.

Wilkinson, B.L., Landreth, G.E., 2006. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 9;3:30.

- Willner, P., 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 83(1):1-16.
- William, M.N., 2008. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *J. Biol. Chem.* 283:16961-16965.
- Worms, P., Broekkamp, C., Lloyd, K., 1983. Behavioral effects of neuroleptics, in *Neuroleptics: Neurochemistry, Behavioral, and Clinical Perspectives*. Edited by Coyle, J. , Enna, S. New York, Raven Press. 93-117.
- Wood, S.J., Berger, G.E., Wellard, R.M., Proffitt, T.M., McConchie, M., Berk, M., McGorry, P.D., Pantelis, C., 2009. Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: a 1H-MRS investigation. *Neurobiol Dis.* 33:354–357.
- Woody, C.D., Gruen, E., 1987. Acetylcholine reduces net outward currents measured in vivo with single electrode voltage clamp techniques in neurons of the motor cortex of cats. *Brain Res.* 424(1):193-8.
- Woolley, C.S., McEwen, B.S., 1992. Estradiol mediates fluctuations in hippocampal synapses density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci.* 12:2549-2554.
- Yao, J.K., Leonard, S., Reddy, R., 2006. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis Markers.* 22:83-93.
- Yao, J.K., Reddy, R., McElhinny, L.G., et al., 1998. Effect of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 32:385-91.
- Ye, S., Zhong, H., Yanamadala, S., Campese, V.M., 2006. Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypertension. *Hypertension.* 48:309–315.
- Yolken, R., 2004. Viruses and schizophrenia: a focus on herpes simplex virus. *Herpes.* 11(2): 83A–88A.
- Youdim, M.B., 1988. Iron in the brain: implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Mt Sinai J Med.* 55:97–101.
- Young, W., Geyer, M.A., 2013. Evaluating the role of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Biochem Pharmacol.* 86(8):1122–1132.
- Yuan, L., Wu, J., Liu, J., Li, G., Liang, D., 2015. Intermittent Hypoxia-Induced Parvalbumin-Immunoreactive Interneurons Loss and Neurobehavioral Impairment is Mediated by NADPH-Oxidase-2. *Neurochem Res* 40(6):1232-42. doi: 10.1007/s11064-015-1586-1.

Zavitsanou, K., Katsifis, A., Mattner, F., Xu-Feng, H., 2004. Investigation of m1/m4 muscarinic receptors in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression disorder. *Neuropsychopharmacol.* 29(3):619–625.

Zhang, M., Zhao, Z., He, L., Wan, C., 2010. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci.* 53:112–124.

Zhang, T.Y., Hellstrom, I.C., Bagot, R.C., Wen, X., Diorio, J., Meaney, M.J., 2010. Maternal care and DNA methylation of a glutamic acid decarboxylase 1 promoter in rat hippocampus. *J Neurosci.* 30(39):13130-7.

Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Cao, L.Y., Zhang, P.Y., Wu, G.Y., Shen, Y.C., 2003. The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol.* 23:128–131.

Zhang, X.Y., Tan, Y.L., Cao, L.Y., Wu, G.Y., Xu, Q., Shen, Y., et al., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res.* 81:291-300.

Zierhut, K.C., Schulte-Kemna, A., Kaufmann, J., Steiner, J., Bogerts, B., Schiltz, K., 2012. Distinct structural alterations independently contributing to working memory deficits and symptomatology in paranoid schizophrenia. *Cortex.* 49(4):1063–1072.

Zimmerberg, B., Shartrand, A.M., 1992. Temperature-dependent effects of maternalseparation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. *Dev.Psychobiol.* 25:213–226.

Zugno, A.I., de Miranda, I.M., Budni, J., Volpato, A.M., Luca, R.D., et al., 2013. Effect of maternal deprivation on acetylcholinesterase activity and behavioral changes on the ketamine-induced animal model of schizophrenia. *Neuroscience.* 248:252–260.

СКРАЋЕНИЦЕ КОРИШЋЕНЕ У ТЕКСТУ

Ach - acetilholin	GPx - glutathion peroxidaza
AchE - acetilholin esteraza	GR - glutathione reductaza
ATP - adenzin trifosfat	MD – maternalna deprivacija
CLAMs - cholinesterase-like adhesion molecules	MDA – malondialdehid
CAT- katalaza	NADPH oksidaza - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
COMT – katehol - o-metil transferaza	Nrg1 – neuregulin
COX - citohrom c oksidaza	NOX - NADPH oksidaza
CNS - centralni nervni sistem	O ₂ ⁻ superoksid anjon
DAAO - oksidaza D-amino kiseline	OH· - hidroksilni radikal
DCIP - 2,6-dihlorindofenol	PBS - fosfatni rastvor pufera
DTNB - 5-ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline	P – postnatalni dan
DTNBP1 – disbindin	RGS4 – regulator G protein-signala-4
GSH - guanozin trifosfat	RO· - alkoksi radikal
GDP - guanozin trifosfat	ROO· - peroksi radikal
HPA - hipotalamusno-hipofizno-nadbubrezne osovine	SCH - shizofrenija
HO ₂ ⁻ - perihidroksi radikal	SOD - superoksid dizmutaza
H ₂ O ₂ - hidrogen peroksid	TBA - tiobarbituratna kiselina
GSH - glutation	UOI – uslovljen odgovor izbegavanja
γ GCL - γ-glutamin cystein ligaza	

Биографија

Бранка Марковић је рођена 23.02.1981. године у Бору.

На Медицинском факултету Универзитета у Београду. дипломирала је 2007. године са просечном оценом током студирања 8,60. У периоду од 2009. до 2011.године била је запослена на Медицинском факултету Универзитета у Београду као истраживач на пројектима „Старосне и полне, морфолошке и структуралне разлике базалног теленцефалона“ и „ Морфолошке промене на мозгу код особа са транссексуализмом, другим поремећајима полног идентитета и развојних психијатријских поремећаја“ Министарства науке и технолошког развоја Републике Србије. Од децембра 2011.године до данас, запослена је на Факултету спорта и физичког васпитања Универзитета у Београду, у звању асистента на предмету Функционална анатомија, ужа научна област Биомедицинске науке у физичком васпитању, спорту и рекреацији. Специјалистичке студије из области Физикалне медицине и рехабилитације уписала је октобра 2012. године на Медицинском факултету у Београду. Специјалистичке академске студије из области Клиничке и примењене анатомије уписала је 2008. године на Медицинском факултету у Београду. Докторске студије из области Молекуларне медицине уписала је 2009. године на Медицинском факултету у Београду под менторством Проф. др Бранислава Филиповића.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а : Бранка Марковић _____
број уписа _____ ММ-02/09 _____

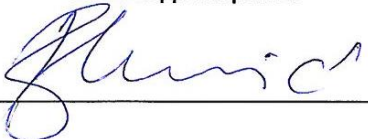
Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
ДУГОТРАЈНИ ЕФЕКТИ МАТЕРНАЛНЕ ДЕПРИВАЦИЈЕ НА ХОЛИНЕРГИЧКИ СИСТЕМ И РЕДОКС
РЕГУЛАЦИЈУ У МОЗГУ ПАЦОВА

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

У Београду, _____

Потпис докторанта



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Бранка Марковић

Број уписа: ММ-02/09

Студијски програм : Молекуларна медицина

Наслов рада : ДУГОТРАЈНИ ЕФЕКТИ МАТЕРНАЛНЕ ДЕПРИВАЦИЈЕ НА ХОЛИНЕРГИЧКИ
СИСТЕМ И РЕДОКС РЕГУЛАЦИЈУ У МОЗГУ ПАЦОВА

Ментор: Проф.др Бранослав Филиповић

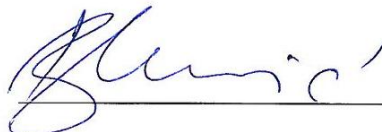
Потписани Бранка Марковић

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

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

Потпис докторанта

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:
ДУГОТРАЈНИ ЕФЕКТИ МАТЕРНАЛНЕ ДЕПРИВАЦИЈЕ НА ХОЛИНЕРГИЧКИ СИСТЕМ И РЕДОКС РЕГУЛАЦИЈУ У МОЗГУ ПАЦОВА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима


5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанта

У Београду, _____



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

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

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

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

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се

наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

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