

Univerzitet u Beogradu
Medicinski fakultet

Petrović Lj. Romana

Morfološke i biohemijske promene u
prefrontalnom korteksu, amigdaloidnom telu i
hipokampalnoj formaciji mozga pacova
uslovljene pojedinačnim produženim stresom

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

University of Belgrade
School of Medicine

Romana Lj. Petrović

Morphological and biochemical changes in
the prefrontal cortex, amygdala and
hippocampus of the rat brain conditioned by
single prolonged stress

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR:

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

KOMENTOR:

dr Laslo Puškaš, redovni profesor, Institut za anatomiju „Niko Miljanić“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Maja Ivković, docent, Klinika za psihijatriju, Klinički centar Srbije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Milan Aksić, docent, Institut za anatomiju „Niko Miljanić“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Ljubica Stojšić-Džunja, redovni profesor, Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Nataše Petronijević i prof. dr Lasla Puškaša. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoju Republike Srbije, broj 175058: „Strukturne i biohemijske karakteristike poremećaja sinaptičke plastičnosti u psihijatrijskim oboljenjima“, kojim rukovodi prof. dr Nataša Petronijević.

Izradi ove doktorske teze su svojim znanjem, podrškom, razumevanjem, strpljenjem i ljubavlju doprineli moji učitelji, saradnici, prijatelji i moja porodica.

Prvenstveno se zahvaljujem svom učitelju i mentoru, prof. dr Nataši Petronijević, na ogromnoj energiji i trudu koji je uložila u ovaj rad, kao i na ukazanom poverenju i bezrezervnoj ličnoj i profesionalnoj podršci. Njena ingenioznost, kreativnost, etičnost i nesebična ljubav su mi bili neiscrpna inspiracija i u najtežim trenucima tokom izrade ove teze. Osećam veliku zahvalnost prema životu, što sam jedan deo svog profesionalnog života podelila sa vrhovnim neuronaučnikom iz ovog regiona Evrope, profesorkom Petronijević.

Prof. dr Laslu Puškašu, svom komentoru, koji mi je pružio veliku podršku tokom izrade ove teze. Profesor je svojim iskustvom i stručnošću podržavao moj eksperimentalni rad i bio uvek pozitivnog i vedrog duha. Njegova stručnost, disciplina, optimizam, kao i energičnost kojom je prenosio svoja znanja su mi bili veliki podsticaj i smernica za dalje usavršavanje.

Dr sci med José Luis Lanciego Pérez, sa Univerziteta u Navari, velikom neuronaučniku i velikom prijatelju, mom velikom dobrotvoru, neizmerno sam zahvalna na pomoći, podršci i saradnji u izradi ove teze. Pored ogromne psihološke i profesionalne podrške koju mi je pružio tokom rada, bez njega kao velikodušnog darodavca nedostajućeg materijala za istraživanje, ova teza ne bi ni postojala.

Dr sci med Gordani Jevtić-Dožudić i dr Tihomiru Stojkoviću, mojim saradnicima i prijateljima, zahvaljujem se na ogromnoj stručnoj pomoći u realizaciji ovog istraživanja, nesebičnom ličnom angažovanju i empatiji u mnogim teškim trenucima tokom izrade ove teze.

Doc. dr Milanu Aksiću, mom učitelju neuroanatomije eksperimentalnih životinja, veliko hvala, na nesebičnom prenošenju znanja i naučnom entuzijazmu koji me je duboko inspirisao.

Svojim kolegama i saradnicima sa Klinike za psihijatrijske bolesti "Dr Laza Lazarević", naročito prof. dr Milutinu Nendoviću, prof. dr Dijani Lazić i doc. dr Ivani Stašević, zahvaljujem se na bezrezervnoj podršci i podsticajima tokom izrade ove teze. Kolegama i saradnicima sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, naročito dr Milici Velimirović i dr Milici Živković i med.tehničaru Marku Bošković, kao i kolegama i saradnicima sa Instituta za anatomiju „Niko Miljanić, Medicinskog fakulteta u Beogradu naročito dr Đorđu Đoroviću i med. tehničaru Slaviši Đukić za nesebičnu podršku i bezrezervnu pomoć u laboratorijskom radu. Prof. dr Svetlani Nikolić i Vladimiru Lauševiću, zahvaljujem se na nesebičnoj pomoći tokom realizacije teze.

Zahvaljujem se mojoj srodnoj duši, suprugu Ivanu, mojoj majci Ljiljani, ocu Ljubomiru i ćerki Ivoni, svecima i svetionicima mog života, kojima stoga, ovu tezu i posvećujem

*U Beogradu, jun 2018. godine
Mr sci dr med Romana Petrović*

Morfološke i biohemijske promene u prefrontalnom korteksu, amigdaloidnom telu i hipokampalnoj formaciji mozga pacova uslovljene pojedinačnim produženim stresom

REZIME

Uvod: Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) je veoma rasprostranjeno i onesposobljavajuće oboljenje. Uprkos raspoloživoj psihofarmakološkoj i na dokazima zasnovanoj kognitivno-bihejvioralnoj terapiji, kod značajnog broja PTSP pacijenata nema odgovora na konvencionalnu terapiju, što pokazuje da su patogenetski mehanizmi u PTSP-u još uvek nedovoljno ispitani. Pojedinačni produženi stres (PPS) predstavlja koristan animalni model PTSP-a za razumevanje patofiziologije oboljenja i razvoj novih terapijskih strategija. Preovlađujući neuroanatomski model PTSP-a, naglašava centralni značaj amigdale kao i njene interakcije sa medijalnim prefrontalnim korteksom i hipokampusom. Mnoge studije pokazuju da su neuropatološke i psihološke alteracije kod PTSD pacijenata povezane sa oksidativnim stresom u mozgu. Glavni izvori slobodnih radikala u ćeliji su mitohondrijalni respiratorni lanac i sistem nikotinin adenin dinukleotid fosfat (NADPH) fosfataze. Ekscitatorno/inhibitorni disbalans zbog disfunkcionalne GABA-ergičke neuronske mreže, ima patofiziološki značaj u mnogim psihijatrijskim oboljenjima. Parvalbumin inhibitorni interneuroni su veoma značajni za održavanje odgovarajuće ekscitatorno/inhibitorne ravnoteže i u sinhronizaciji visokofrekventnog neuronskog pražnjenja i mogu biti uključeni u patološko učenje straha u PTSP-u. Takođe, mnoge studije su pokazale učešće različitih neuropeptida u procesiranju stresnih stimulusa i stresnom odgovoru.

Cilj: Cilj ove disertacije se sastojao u ispitivanju uticaja pojedinačnog produženog stresa na: (1) parametre oksidativnog stresa uključujući nivo malondialdehida (MDA), sadržaj redukovano glutationa (GSH), aktivnost glutation peroksidaze (GPx), superoksid dizmutaze (SOD) i katalaze (CAT), i ekspresiju SOD1 i SOD2; (2) moguće generatore slobodnih radikala: mitohondrijalni respiratorni lanac, određivanjem aktivnosti kompleksa I i citohrom c oksidaze (COX) i NADPH oksidazu, određivanjem ekspresije membranskih (gp91phox i p22phox) i citosolnih (p67phox) subjedinića ovog enzima i (3) ukupan broj neurona (NeuN pozitivne ćelije), broj parvalbumin (PV) i kalbindin (CB) pozitivnih GABA-ergičkih neurona i broj supstanca P (SP), enkefalin (ENK) i galanin (GAL)

pozitivnih peptidergičkih neurona u prefrontalnom korteksu (PFK), hipokampusu i amigdali mozga pacova.

Metode: U eksperimentu su korišćeni devet nedelja stari mužjaci Wistar pacova. Trideset šest pacova je nasumično podeljeno na dve grupe (18 životinja po grupi). Jedna grupa je označena kao PPS grupa, a druga kao kontrolna. Pacovi iz PPS grupe su bili izloženi PPS proceduri koja se sastoji iz fizičkog sputavanja, forsiranog plivanja i ekspozicije etru. Mehaničko sputavanje pacova je izvedeno stavljanjem pacova u specijalne plastične tube u toku 2 sata. Posle mehaničkog sputavanja, pacovi su individualno unošeni u providne akrilne bazene (26x42x15cm), koji su do 2/3 napunjeni vodom ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), gde su plivali 20 minuta. Posle 15 minuta oporavka od plivanja, svaki pacov je u desikatoru uz pomoć dietil etra uvođen u opštu anesteziju, definisanu kao gubitak refleksa repa ($<5\text{min}$). Neposredno po uvođenju u opštu anesteziju, pacovi su premešteni iz desikatora u njihove kaveze i tamo ostavljeni bez uznemiravanja sedam dana. Kontrolni pacovi su nastavili da obitavaju u svojim kavezima, uz osnovno održavanje, bez uznemiravanja. Svi pacovi su žrtvovani sedam dana nakon PPS procedure. Za biohemijske i morfometrijske analize korišćeni su prefrontalni korteks, hipokampus i amigdala. Nivoi MDA i GSH, kao i aktivnost SOD, GPx, CAT, Kompleksa I i COX, mereni su spektrofotometrijskom metodom. Ekspresije subjedinica NADPH oksidaze, SOD1 i SOD2 određivane su Western blot tehnikom. Određivanje broja moždanih ćelija imunoreaktivnih na NeuN, PV, CB, SP, GAL i ENK je postignuto imunohistohemijskom metodom.

Rezultati: Ova studija je pokazala da pojedinačni produženi stres dovodi do značajnog porasta nivoa MDA u amigdali i hipokampusu. Takođe, pokazano je da PPS uzrokuje značajan pad koncentracije GSH u amigdali i hipokampusu. Međutim, u prefrontalnom korteksu, nivo MDA i koncentracija GSH nisu bili izmenjeni kod PPS pacova u poređenju sa kontrolnim. Efekti PPS stresora na aktivnost SOD i GPx su bili specifični u odnosu na moždanu strukturu. Aktivnost ukupne SOD je bila značajno smanjena u amigdali, dok je u PFK i hipokampusu bila nepromenjena kod PPS pacova. Aktivnost GPx je bila značajno redukovana u PFK i hipokampusu, dok je u amigdali registrovana nepromenjena vrednost kod PPS pacova u odnosu na kontrolne. Nije evidentirana statistički značajna razlika u aktivnosti katalaze u sva tri ispitivana moždana regiona između PPS i kontrolnih pacova. Aktivnost Kompleksa I i COX je bila nepromenjena u skoro svim ispitivanim moždanim

strukturama kod pacova izloženih PPS proceduri. Našli smo značajan porast aktivnosti kompleksa I u PFK, dok je aktivnost kompleksa I u amigdali i hipokampusu ostala nepromenjena kod PPS pacova u odnosu na kontrolne. Takođe, nismo registrovali značajnu promenu aktivnosti COX enzima respiratornog lanca u PFK, hipokampusu i amigdali. Povećana ekspresija ispitivanih subjedinica NADPH oksidaze je evidentirana samo u amigdali pacova izloženih PPS proceduri. PPS nije izmenio ekspresiju gp91phox u PFK, niti u hipokampusu, dok je u amigdali ekspresija bila značajno povećana u odnosu na kontrole. Ekspresija proteina p22phox je ostala nepromenjena u PFK i hipokampusu. U amigdali PPS pacova je registrovana značajno povećana ekspresija p22phox u poređenju sa kontrolama. Ekspresija p67phox je bila nepromenjena u PFK i hipokampusu, dok je povećana ekspresija evidentirana u amigdali PPS grupe u poređenju sa kontrolnom. Kod PPS pacova, zapazili smo povećanu ekspresiju SOD1 u PFK i povećanu ekspresiju SOD2 u PFK, hipokampusu i amigdali. Ekspresija SOD1 je bila nepromenjena u hipokampusu i amigdali kod PPS pacova u odnosu na kontrolne. Imunohistohemijskom metodom, pokazali smo da PPS uzrokuje značajno smanjenje broja NeuN imunopozitivnih ćelija u PFK, amigdali i hipokampusu. Registrovana je smanjena gustina PV imunopozitivnih interneurona u amigdali i hipokampusu (CA3 subregion i girus dentatus) kod PPS pacova u poređenju sa kontrolnim, dok je broj PV+ interneurona u PFK bio na kontrolnom nivou. Broj CB imunopozitivnih nije bio značajno izmenjen u PFK i amigdali u PPS grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Smanjenje gustine ovih ćelija zapaženo je samo u CA1 subregionu hipokampusa. Takođe, ova studija je pokazala, da PPS stresor dovodi do značajnog porasta SP i smanjenja GAL imunopozitivnih neurona u PFK i amigdali. U sve tri ispitivane moždane strukture (PFK, amigdala i hipokampus) nije registrovana statistički značajna razlika u broju ENK imunopozitivnih neurona između eksperimentalne i kontrolne grupe.

Zaključak: Ova studija je pokazala da pojedinačni produženi stres uzrokuje oksidativni stres u amigdali i hipokampusu pacova, manifestovan kroz povećanu koncentraciju MDA i smanjenu koncentraciju GSH. Takođe, kod PPS pacova je nađena smanjena aktivnost SOD u amigdali, dok je u hipokampusu registrovana smanjena aktivnost GPx. U navedenim strukturama je evidentirana i nepromenjena aktivnost kompleksa mitohondrijalnog respiratornog lanca. U ovakim okolnostima, nalaz povećane ekspresije svih ispitivanih

subjedinica NADPH oksidaze u amigdali PPS pacova, ukazuje da navedeni enzim može biti glavni izvor slobodnih radikala u ovoj moždanoj strukturi, dok nepromenjena ekspresija subjedinica ovog enzima zajedno sa nepromenjenim enzimima respiratornog lanca u hipokampusu, sugeriše prisustvo nekog trećeg izvora slobodnih radikala. Nalaz koncentracije MDA i GSH u okviru vrednosti u kontrolnoj grupi u korteksu, ukazuje na odsustvo oksidativnog stresa uprkos povećanoj aktivnosti Kompleksa I i smanjenoj aktivnosti GPx kod PPS pacova. PPS je uzrokovao značajno smanjenje NeuN+ neurona u sve tri ispitivane ispitivane strukture. Takođe, PPS stresor je prouzrokovao značajno smanjenje gustine PV+ interneurona u amigdali i hipokampusu. Nalaz povećanih koncentracija pokazatelja oksidativnog stresa u amigdali i hipokampusu zajedno sa smanjenjem broja PV+ interneurona u istim strukturama, sugeriše mogućnost oštećenja ovih interneurona oksidativnim stresom u amigdali i hipokampusu na našem PTSP modelu. Takođe, nalazi povećane gustine SP+ ćelija i smanjene gustine GAL+ ćelija u amigdali i PFK kod PPS pacova, ukazuju da ove dve grupe peptidergičkih neurona mogu imati ulogu u patofiziološkim procesima koji se nalaze u osnovi PTSP-a. Rezultati ove doktorske teze mogu doprineti razumevanju patogeneze PTSP-a i razvoju novih terapijskih strategija za lečenje ovog kompleksnog oboljenja.

Ključne reči: pojedinačni produženi stres, posttraumatski stresni poremećaj, amigdala, NADPH oksidaza, supstanca P, galanin, enkefalin.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Neuronauke

Morphological and biochemical changes in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of the rat brain conditioned by single prolonged stress

SUMMARY

Background: Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a highly prevalent and impairing disorder. Despite the availability of pharmacological and evidence-based cognitive behavioral therapy, a considerable number of PTSD patients do not respond to the conventional therapy indicating that pathogenetic mechanisms of PTSD are currently not sufficiently explored. Single prolonged stress (SPS) is useful animal model of PTSD for understanding the pathophysiology of the disorder and the development of new treatments. A prevailing neurocircuitry model of PTSD emphasizes the role of the amygdala, as well as its interactions with the medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus. Increasing evidence indicates that neuropathological and psychological alterations in PTSD sufferers are related to brain oxidative stress. The major sources of reactive oxygen species (ROS) in cells are mitochondrial respiratory chain and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases. Excitatory-inhibitory disbalance through dysfunctional GABA-ergic circuits is implicated in many psychiatric disorders. Parvalbumin inhibitory interneurons are very important for maintaining proper excitatory/inhibitory balance and high-frequency neuronal synchronization and could be implicated in pathological fear learning in PTSD. Also, many studies have shown the participation of different neuropeptides in the processing of stressful stimuli and the stress response.

Aim: The aims of present dissertation were to elucidate the effects of single prolonged stress on: (1) oxidative stress parameters, including malondialdehyde (MDA) level, reduced glutathione (GSH) level, glutathione peroxidase (GPx) activity, superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity and expression of SOD1 and SOD2; (2) possible sources of free radicals: mitochondrial respiratory chain by determining of Complex I and cytochrome c oxidase (COX) activity and NADPH oxidase by determining

of the expression of membrane (gp91phox, p22phox) and cytosolic (p67phox) subunits of this enzyme; (3) total number of neurons (NeuN positive cells), number of parvalbumin (PV) and calbindin (CB) positive GABA-ergic neurons and number of substance P(SP), enkephaline (ENK) and galanine (GAL) positive peptidergic neurons in the rat prefrontal cortex, hippocampus and amygdala.

Methods: Nine weeks-old male Wistar rats were used for the experiments. Thirty-six rats were randomly assigned among the two groups (18 rats each). One group was the SPS group while the other was a control group. Rats from the SPS group were exposed to the SPS procedure that has included physical restraint, forced swimming and ether exposure. Restraint of rats was performed by placing a rat in a special plastic tube for 2 hours. After restraint, the rats were individually placed in a clear acrylic cylinder (26x42x15cm), filled two-thirds with water ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), and allowed to swim for 20 min. Following post-swim recovery for 15 min, each rat was exposed to diethyl ether in a desiccator until general anesthesia, defined as loss of toe and tail pinch responses, was induced (<5 minutes). Immediately after the induction of general anesthesia, rats were removed from the desiccators, placed in their home cages and left undisturbed for 7 days. Control rats remained in their home cages undisturbed except for the usual maintenance. All rats were euthanized seven days after the SPS. The prefrontal cortex, hippocampus and amygdala were used for biochemical and morphometric analysis. MDA and GSH levels, as well as SOD, GPx, CAT, Complex I and COX activities were measured using spectrophotometric methods. The expressions of NADPH oxidase subunits, SOD1 and SOD2 were determined by Western blot. Quantification of density of brain cells immunoreactive to NeuN, PV, CB, SP, GAL and ENK was determined with the immunohistochemistry method.

Results: This study has shown that the single prolonged stress leads to a significant increase of MDA level in the amygdala and hippocampus. Also, we found that SPS causes a significant decrease of GSH concentration in the amygdala and hippocampus. However, MDA level and GSH concentration in PFC were not significantly changed in SPS rats compared to control rats. Effects of SPS stressor on the activities of SOD and GPx, were structure specific. Total SOD activity was significantly decreased in amygdala, while it was unchanged in the PFC, hippocampus of SPS rats. GPx activity was significantly reduced in PFC and hippocampus, while it was unchanged in the amygdala of SPS rats compared to

control rats. There was no significant difference in the activity of catalase in all three examined brain areas between SPS and control rats: PFC, hippocampus, amygdala. Complex I and COX activity were unchanged in most of the investigated brain structures of rats subjected to the SPS procedure. We found significant increase of Complex I activity in the PFC while the activity was unchanged in the hippocampus and amygdala in SPS rats compared to controls. Also, we did not find significant change of COX of the respiratory chain in PFC, hippocampus, amygdala. Increased expression of examined NADPH oxidase subunits was seen only in the amygdala of the rats exposed to SPS. SPS did not change the expression of gp91phox, either in the PFC and hippocampus, while the expression in the amygdala was significantly increased compared to control. Protein expression of p22phox remained unchanged in the PFC and hippocampus. In the amygdala of SPS rats, expression of p22phox was significantly increased compared to control. Expression of p67phox was unchanged in PFC and hippocampus, while in the amygdala expression was significantly increased in the SPS group compared to control. In SPS rats, we found increased SOD1 expression in PFC, and increased SOD2 expression in PFC, hippocampus and amygdala. Expression of SOD1 in the PFC and hippocampus was unchanged in SPS rats compared to controls. Immunohistochemically, we demonstrated that SPS causes a significant decrease in the number of NeuN immunopositive cells in the mPFC, amygdala and hippocampus. The density of PV immunopositive interneurons was reduced in the amygdala and hippocampus (CA3 subregion and gyrus dentatus) in SPS rats compared to controls, while the number of PV+ interneurons in the mPFC maintained control levels.

Number of CB immunopositive interneurons was not significantly changed in the PFC and amygdala in SPS group compared to the control. The decrease in the density of these cells was observed only in the CA1 subregion of the hippocampus. Also, this study demonstrated that SPS stressor leads to a significant increase in the number of SP immunopositive neurons and a decrease of the GAL immunopositive neurons in the PFC and amygdala. In all three examined brain structures (mPFC, amygdala and hippocampus), there was no statistically significant difference in the number of enkephaline immunopositive neurons between experimental and control group.

Conclusion: This study has demonstrated that single prolonged stress causes oxidative stress in amygdala and hippocampus of rats, manifested as increased concentration of MDA and decreased concentration of GSH. Furthermore, decreased SOD activity was seen in amygdala and decreased GPx activity in the hippocampus of SPS rats. Activities of respiratory chain complexes were unchanged in these structures. In these circumstances, the finding of increased expression of all investigated NADPH oxidase subunits in amygdala of SPS rats indicates that this enzyme could be a main source of free radicals in this structure while unaltered expression of subunits of this enzyme, together with unchanged respiratory chain enzymes in the hippocampus is suggestive of the presence of some other source of free radicals. Finding the concentration of MDA and GSH within the values in the control group in the cortex, indicates the absence of oxidative damage despite increased activity of Complex I and decreased activity of GPx in the SPS rats. SPS caused a significant decrease of number of NeuN+ neurons in all three examined structures. Also, SPS stressor caused significant decrease of PV+ interneurons density in the amygdala and hippocampus. The finding of increased oxidative stress markers in the amygdala and hippocampus together with decreased number of PV+ interneurons in the same brain structures, suggests the possibility of oxidative stress-driven parvalbumine interneuron impairment in the amygdala and hippocampus in our PTSD model. Furthermore, the increased density of SP+ cells and the decreased density of GAL+cell in the amygdala and PFC of SPS rats, suggest that these two groups of peptidergic neurons can play a role in the pathophysiological processes underlying PTSD. The results of this doctoral thesis can contribute to understanding the pathogenesis of PTSD and the development of new therapeutic strategies for the treatment of this complex disorder.

Key words: single prolonged stress, post-traumatic stress, amygdala, NADPH oxidase, substance P, galanin, enkephaline.

Research area: Medicine

Research field: Neuroscience

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Posttraumatski stresni poremećaj.....	1
1.1.2. Trauma i PTSP.....	2
1.1.3. Istorijat posttraumatskog stresnog poremećaja.....	3
1.1.4. PTSP u okviru klasifikacionih sistema psihijatrijskih bolesti.....	4
1.1.4.1. Dijagnostički kriterijumi za PTSP u okviru Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaj (DSM5).....	4
1.1.4.2. Definicija PTSP-a prema MKB-10.....	6
1.1.5. PTSP i anksioznost.....	6
1.1.6. Epidemiologija PTSP-a.....	6
1.1.7. Neuroanatomske strukture od značaja za PTSP i neurobiologija straha.....	7
1.1.7.1. Amigdaloidno telo (Corpus amygdaloideum, amigdala).....	10
1.1.7.2. Medijalni prefrontalni korteks.....	15
1.1.7.3. Hipokampalna formacija.....	18
1.2. Animalni modeli PTSP-a.....	21
1.2.1. Stres/trauma animalni modeli PTSP-a.....	21
1.2.2. Animalni modeli PTSP-a prema pretpostavljenom patofiziološkom mehanizmu.....	22
1.2.2.1. Modeli na bazi pojačane uslovljenosti strahom.....	22
1.2.2.2. Modeli na bazi oštećene ekstinkcije straha.....	22
1.2.2.3. Modeli na bazi oštećene kontekstualizacije.....	24
1.2.3. Pojedinačni produženi stres (PPS).....	25
1.3. Neurohemijski i neurohistološki supstrati PTSP-a.....	26
1.3.1. Redoks procesi u centralnom nervnom sistemu i PTSP.....	26
1.3.1.1. Slobodni radikali.....	27
1.3.1.2. Oksidativno oštećenje makromolekula.....	28
1.3.1.3. Antioksidativna zaštita.....	29
1.3.1.4. Fiziološka uloga slobodnih radikala u nervnom sistemu.....	30
1.3.1.5. Faktori povišene osetljivosti nervnog sistema na oksidativni stres.....	31
1.3.2. Mitohondrijalni respiratorni lanac.....	33

1.3.3. NADPH oksidaza.....	34
1.3.3.1. Fiziološke uloge NADPH oksidaze u CNS-u.....	36
1.3.3.1. Patofiziološki značaj NADPH oksidaze u CNS-u.....	36
1.3.4. Neuronu u PTSP-u.....	37
1.3.4.1. Neuronu.....	37
1.3.4.2. Interneuronu.....	38
1.3.5. Neuropeptidi i procesiranje stresora.....	40
1.3.5.1. Supstanca P.....	40
1.3.5.2. Galanin.....	41
1.3.5.3. Enkefalini.....	42
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	44
3. MATERIJAL I METODE.....	45
3.1. Eksperimentalne životinje.....	45
3.2. Tretiranje životinja.....	45
3.3. Grupisanje eksperimentalnih životinja.....	45
3.4. Eksperimentalni protokol.....	46
3.5. Izolovanje struktura za biohemijske analize.....	47
3.6. Biohemijske analize.....	47
3.6.1. Merenje sadržaja proteina.....	48
3.6.2. Merenje sadržaja redukovanođ glutationa (GSH).....	48
3.6.3. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx).....	48
3.6.4. Aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD).....	48
3.6.5. Aktivnost enzima katalaze (CAT).....	49
3.6.6. Koncentracija lipidnih peroksida (MDA).....	49
3.6.7. Aktivnost kompleksa I (NADH-koenzim Q oksidoreduktaza).....	49
3.6.8. Aktivnost enzima citohrom c oksidaze (COX).....	49
3.7. Određivanje ekspresije proteina tehnikom Western blot.....	50
3.8. Imunohistohemijske analize.....	51
3.8.1. Priprema uzoraka za imunohistohemiju (kriopreseci).....	51
3.8.2. Imunohistohemijski protokol.....	52
4. REZULTATI.....	54

4.1. Uticaj PPS stresora na nivo lipidnih peroksida (MDA) u mozgu pacova.....	54
4.2. Uticaj PPS stresora na koncentraciju redukovanog glutationa (GSH) u mozgu pacova.....	55
4.3. Uticaj PPS stresora na aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) u mozgu pacova.....	56
4.4. Uticaj PPS stresora na aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) u mozgu pacova.....	57
4.5. Uticaj PPS stresora na aktivnost enzima katalaze (CAT) u mozgu pacova.....	58
4.6. Uticaj PPS stresora na ekspresiju citosolnog SOD1 enzima u mozgu pacova....	59
4.7. Uticaj PPS stresora na ekspresiju mitohondrijalnog, SOD2 enzima u mozgu pacova.....	60
4.8. Uticaj PPS procedure na aktivnost enzima respiratornog lanca Kompleks I i COX u mozgu pacova.....	61
4.9. Uticaj PPS stresora na ekspresiju gp91phox subjedinice NADPH oksidaze u mozgu pacova.....	62
4.10. Uticaj PPS stresora na ekspresiju subjedinice p22phox NADPH oksidaze u mozgu pacova.....	63
4.11. Uticaj PPS stresora na ekspresiju p67phox subjedinice NADPH oksidaze u mozgu pacova.....	64
4.12. 1. Uticaj PPS stresora na gustinu NeuN-imunopozitivnih neurona (NeuN+) u medijalnom prefrontalnom korteksu (mPFK) mozga pacova.....	65
4.12.2. Uticaj PPS stresora na gustinu NeuN-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova.....	66
4.12.3. Uticaj PPS stresora na gustinu NeuN-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova.....	68
4.13.1. Uticaj PPS stresora na gustinu parvalbumin-imunopozitivnih (PV+) neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova.....	70
4.13.2. Uticaj PPS stresora na gustinu parvalbumin-imunopozitivnih interneurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova.....	71
4.13.3. Uticaj PPS stresora na gustinu PV-imunopozitivnih interneurona u hipokampusu mozga pacova.....	73

4.14.1. Uticaj PPS stresora na gustinu kalbindin-imunopozitivnih (CB+) neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova.....	75
4.14.2. Uticaj PPS stresora na gustinu kalbindin-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova.....	76
4.14.3. Uticaj PPS stresora na gustinu kalbindin-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova.....	77
4.15.1. Uticaj PPS stresora na gustinu supstanca P-imunopozitivnih neurona (SP+) u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova.....	79
4.15.2. Uticaj PPS stresora na gustinu supstanca P-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova.....	80
4.15.3. Uticaj PPS stresora na gustinu supstanca P-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova.....	81
4.16.1. Uticaj PPS stresora na gustinu enkafalin-imunopozitivnih (ENK+) neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova.....	83
4.16.2. Uticaj PPS stresora na gustinu enkefalin-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova.....	84
4.16.3. Uticaj PPS stresora na gustinu enkefalin-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova.....	85
4.17.1. Uticaj PPS stresora na gustinu galanin-imunopozitivnih neurona (GAL+) u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova.....	87
4.17.2. Uticaj PPS stresora na gustinu galanin-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova.....	88
4.17.3. Uticaj PPS stresora na gustinu galanin-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova.....	89
5. DISKUSIJA.....	91
6. ZAKLJUČCI.....	115
7. REFERENCE.....	118

1.UVOD

1.1. POSTTRAUMATSKI STRESNI POREMEĆAJ

Strah je evoluciona tvorevina, prirodni odgovor organizma na pretnje iz okruženja. Strah angažuje autonomne i endokrine promene koje imaju funkciju podržavanja odbrambenih ponašanja kao što su borba, bežanje ili imobilnost. Fiziološko-biohemijsko prilagođavanje u vidu pojačanog protoka krvi i povećanje snabdevenosti energentima u skeletnoj muskulaturi i mozgu, povećava šanse za preživljavanjem organizma. Zbog povećanja preživljavanja, informacije o opasnostima iz prirode, tokom evolucije čvrsto su umrežene u životinjskom mozgu. Filogenetsko pamćenje pretnji, uključuje slike, zvuke i mirise predatora, specifično socijalno ponašanje članova svoje vrste, intenzivne i bolne stimuluse, i drugo (Herman et al., 2003). Navedene pretnje, aktiviraju urođeni, preprogramirani strah. Za razliku od urođenog odgovora strahom, organizam dodatno povećava šanse za preživljavanjem, tako što kroz iskustvo povećava kapacitete za prepoznavanje znakova koji mogu biti povezani sa opasnošću. Jedinka memoriše vezu između znaka i potencijalne opasnosti procesom emocionalnog pamćenja. U ponovljenom kontaktu sa navedenim znacima, podsetnicima na traumatu, aktivira se stečeni odgovor strahom. Dakle, urođeni strah je reakcija na aktuelnu i realnu opasnost i tipično se može izazvati vrlo specifičnim stimulusima, dok stečeni (naučeni) strah predstavlja stanje pripreme organizma za predviđenu, predstojeću opasnost, koja može biti realna ili imaginarna. Pojam naučenog straha se značajno preklapa sa pojmom anksioznost. Maladaptivni strah, odnosno anksioznost predstavlja jednu od najznačajnijih karakteristika posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP). Preciznije rečeno, glavnu odrednicu PTSP-a predstavlja perzistentno procesiranje i elaboracija intruzivne emocionalne memorije povezane sa traumatskim iskustvom (Rosen i Schulkin, 1998).

Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) je jedan od retkih psihijatrijskih entiteta za koji se tačno zna etiologija, odnosno da je izvor tegoba u proživljenom ekstremnom traumatskom iskustvu. PTSP nastaje kao odložena ili produžena reakcija na stresni događaj kraćeg ili dužeg trajanja, izuzetno ugrožavajuće ili katastrofične prirode za koji se može

pretpostaviti da bi gotovo kod svakog mogao da izazove veliku patnju (Kaličanin, Lečić-Toševski, 1994). Prema petoj reviziji Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje (DSM-5) osnovna definicija PTSP-a je razvoj karakterističnih simptoma posle izloženosti nekom životno-ugrožavajućem stresoru. Ti simptomi razvrstani su u četiri osnovne grupe: 1) ponovno proživljavanje traumatskog iskustva; 2) izbegavanje svega što traumatizovanu osobu podseća na traumatski događaj i opšta utrnulost emocionalnog reagovanja; 3) negativne promene kognicije i afekta posle traumatskog iskustva; 4). simptomi povećane uzbuđenosti koji nisu postojali pre traume, 5) profesionala i socijalna disfunkcionalnost. Svi simptomi moraju postojati najmanje mesec dana, te ne smeju biti u vezi sa medikacijom, zloupotrebom supstanci ili sa nekom drugom bolesti (DSM-5).

1.1.2. TRAUMA i PTSP

Pojam “trauma” zauzima značajno mesto u poimanju stresa i načinu suočavanja sa stresom. Trauma je definisana kao događaj koji je van granica uobičajenog ljudskog iskustva i koji je za svakog ekstremno neprijatno iskustvo. Pod traumom se podrazumavaju događaji koji uključuju smrt ili pretnju smrću, teško povređivanje ili pretnju sopstvenom ili tuđem integritetu. Kod takvih događaja ljudi reaguju intenzivnim strahom, užasom, bespomoćnošću. Zbog velikog intenziteta proživljavanja traume koji dovodi do patnje, razlikuje se traumatski događaj od stresnog. Kod traumatskog događaja nije bitno u kakvom je osoba psihofizičkom stanju bila pre takvog događaja niti kakvi su bili njeni koping mehanizmi suočavanja sa traumom. Najznačajniji je intenzitet traumatskog događaja, a ne činoci koji osobu čine osetljivom na stres, te su reakcije na traumatsko iskustvo, neizbežne. Iako psihološke reakcije na traumatski događaj mogu varirati u odnosu na starost, prirodu traume i njeno personalizovano značenje za osobu, opšti oblik posttraumatskih reakcija isti je za sve ljude. Kada intenzitet tih reakcija, obim i trajanje pređu određenu meru, govori se o posttraumatskom stresnom poremećaju, odnosno o patološkom obliku reakcije na traumu (Kaličanin, Lečić-Toševski, 1994).

1.1.3. ISTORIJAT POSTTRAUMATSKOG STRESNOG POREMEĆAJA

Postojanje psihičkih tegoba prouzokovanih iznenadnim i snažnim traumatskim događajima kao što su ratovi i prirodne katastrofe, opisivani su u literaturi mnogo pre zvaničnog uvođenja nozološkog entiteta Posttraumatski stresni poremećaj u klasifikacije psihijatrijskih bolesti. Ovaj poremećaj postoji koliko i čovečanstvo. Trimbl veruje da Šekspirov Henri IV, pokazuje grupe simptoma kao što su ponovno proživljavanje traumatskog događaja, simptome izbegavanja i fiziološku hiperreaktivnost koji jako podsećaju na današnji opis PTSP-a (Trimble, 1985). Ezra opisuje stresne reakcije povezane sa traumom, 2100 godine, pre nove ere, kod stanovnika prastarog grada Ur nakon smrti kralja Urname (Ben-Ezra, 2004). U Prvom i Drugom svetskom ratu poremećaji uzrokovani stresom, odnosno traumom, opisivani su kao »borbeni zamor«, »šok od granatiranja«, »vojničko srce« i »krivica zbog preživljavanja« (Lečić Toševski, 2002). Psihološkim reakcijama na traumu u našoj sredini, bavio se Hugo Klajn, i stresne reakcije nazvao "ratna neuroza Jugoslovena" (Klajn i Trebješanin, 1955).

U prvom izdanju Dijagnostičkog i statističkog priručnika mentalnih poremećaja (DSM-I), 1952. godine PTSP je definisan kao velika stresna reakcija. Paradoksalno, na vrhuncu Vijetnamskog rata, u DSM-II navedena kategorija "veliki stresni poremećaj" je izbačena. Međutim, tokom 1970-tih godina veliki broj socijalnih pokreta u SAD-u i svetu privukao je pažnju na postojanje psiholoških reakcija na interpersonalno nasilje i ratove. Istraživanja iz tog vremena, (Gray et al., 1977; Burges et Holmstrom, 1974; Walker et Lenore, 1980) iznedrila su opise raznih sindroma posle interpersonalne traume („sindrom zlostavljanog deteta“, „sindrom traume nakon silovanja“ i „sindrom pretučene žene“) a bili su gotovo identični psihološkim tegobama koje su opisivali milioni veterana iz Vijetnamskog rata. Podstaknuta navedenim socijalnim pokretima i istraživanjima, Američka psihijatrijska asocijacija, 1980. godine u DSM-III uvodi Posttraumatski stresni poremećaj kao jednu, objedinjenu kategoriju psihološke reakcije na sve traumatske događaje. PTSP kao službena dijagnostička kategorija ostaje nadalje i u DSM-III-R (1987), zatim u DSM-IV(1994.) i DSM-IV-R (2000.), te i u poslednjem izdanju dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje, DSM-5 (2013.)

1.1.4. PTSP U OKVIRU KLASIFIKACIONIH SISTEMA PSIHIJATRIJSKIH BOLESTI

1.1.4.1. Dijagnostički kriterijumi za PTSP u okviru Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje 5 (DSM5).

Dijagnostikovanje se vrši u odnosu na osam kriterijuma: A-stresor, tj. karakteristike stresnog događaja, B-intruzioni simptomi, C-simptomi izbegavanja, D-negativne promene kognicije i emocija, E-izmenjenost u nivou uzbuđenosti i reaktivnosti, F-trajanje simptoma, G-funkcionalnost, H-ekskluzioni kriterijumi.

A). Osoba je bila izložena smrti, pretnji smrću, aktuelnom ili pretećem povređivanju, aktuelnom ili pretećem silovanju.

Potrebno je prisustvo bar jednog od sledeća četiri kriterijuma:

1. direktna izloženost traumatskom događaju,
2. lično prisustvovanje kao svedoka traumatskom događaju,
3. indirektno, saznanjem da je bliski rođak ili bliski prijatelj bio izložen traumatskom događaju,
4. indirektno izlaganje neprijatnim detaljima događaja, obično tokom profesionalnih aktivnosti (tokom sakupljanja delova tela ili ponavljanim izlaganju detaljima o zlostavljanju deteta, tokom obavljanja neke profesionalne aktivnosti).

B) Traumatsko iskustvo se ponovno proživljava na najmanje jedan od sledećih pet načina:

1. ponavljajuća intruzivna sećanja na događaj, koja uključuju slike, misli ili opažanja,
2. ponavljanje uznemirujućih snova o događaju,
3. osećanje kao da se traumatski događaj ponavlja, uključujući iluzije, halucinacije ili "flashback" epizode u budnom stanju ili stanju intoksikacije,
4. intenzivan psihološki distres pri izlaganju spoljašnjem ili unutrašnjem stimulus koji simbolizuje ili podseća na neki aspekt traumatskog događaja,
5. značajan fiziološki odgovor na izlaganje unutrašnjem ili spoljašnjem stimulusu koji simbolizuje neki aspekt traumatskog događaja.

C) Stalno izbegavanje stimulusa povezanih s traumatskim događajem.

Potrebno je prisustvo bar jednog simptoma od sledeća dva:

1. naponi da se izbegnu misli, osećanja povezani s traumatskim događajem,
2. naponi da se izbegnu spoljašnji podsetnici na trauma (naprimer osobe, razgovori, objekti, aktivnosti, mesta i situacije koje mogu podsećati na traumau.

D) Negativne promene u kogniciji i osećanjima koje nastaju ili se pogoršavaju posle traume.

Potrebno je prisustvo bar dva kriterijuma od sledećih sedam:

1. nesposobnost sećanja nekih važnih aspekata trauma (najčešće disocijativna amnezija, nije povezano sa povredom glave, alkoholom i lekovima).
2. preterane i često iskrivljene misli i pretpostavke o sebi i svetu (“ja sam loš”, “svuda u svetu mi preti opasnost”),
3. preterano osećanje stida i srama zbog doživljaja da su prouzrokovali traumatski događaj ili zbog rezultujućih posledica,
4. negativni afekat/ negativne sa traumom povezane emocije (strah, užas, bes, krivica, stid),
5. smanjeno interesovanje za aktivnosti u kojima su bili angažavani pre traume,
6. osećanje izolovanosti (naprimer osećanje odvojenosti, otuđenosti),
7. teškoće u doživljavanju pozitivnih emocija/ uporna nesposobnost da se dožive pozitivne emocije.

E) Stalni simptomi pojačane uzbuđenosti koji nisu postojali pre traume.

Potrebno je prisustvo dva ili više simptoma od šest navedenih simptoma:

1. teškoće uspostavljanja ili održavanja sna,
2. iritabilnost ili osećanje bezrazložne ljutnje,
3. teškoće koncentracije,
4. hipervigilnost,
5. trzanje na mali povod
6. rizično ili destruktivno ponašanje

F) Trajanje simptoma pod B, C, D i E duže je od mesec dana.

G) Znatan poremećaj u socijalnom, radnom ili drugom funkcionisanju.

H) Simptomi nisu povezani sa medikacijom, zloupotrebom supstanci ili drugim bolestima (American Psychiatric Association, 2013).

1.1.4.2. Definicija PTSP-a prema MKB-10 (Međunarodna statistička klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, deseta revizija)

Posttraumatski stresni poremećaj se definiše kao „odloženi ili produženi odgovor na stresni događaj ili situaciju (bilo kratkog ili dugog trajanja) izuzetno ugrožavajuće ili katastrofalne prirode, koji će verovatno kod gotovo svakog uzrokovati pervazivni distres“ (World Health Organization, 2010).

1.1.5. PTSP I ANKSIOZNOST

PTSP je u DSM-V uvršten u poremećaje povezane sa stresom i traumom, dok je u DSM-IV bio klasifikovan u anksiozne poremećaje. Anksioznost je jedna od veoma značajnih kliničkih karakteristika PTSP-a. Anksioznost, najčešća ljudska emocija, može varirati od nelagodnosti, uznemirenosti, strepnje, teskobe, straha pa sve do panike – i čini automatski odgovor čoveka na doživljaj opasnosti. Ona za razliku od straha, gde je objekat poznat, a opasnost i pretnja dolaze iz okoline, predstavlja stanje u kojem je objekat straha nepoznat, a opasnost i pretnja dolaze iz unutrašnjosti. Kao takva, ona može biti normalna (fiziološka) svakodnevna anksioznost ili pak patološka anksioznost. Normalna anksioznost pojavljuje se u svakodnevnim situacijama te prati donošenje odluka, razmišljanja, ispite, putovanja i ima anticipatornu i adaptivnu funkciju, čineći nas opreznijima i omogućavajući nam izbegavanje ili suprotstavljanje opasnosti. Patološka anksioznost, s druge strane, je ona anksioznost koja se pojavljuje van realne opasnosti, koja postoji dugo nakon stresa i prestanka opasnosti, te koja remeti funkcionisanje osobe. Ona dominira kliničkom slikom kod osoba s anksioznim poremećajima, ali se i kod mnogih drugih psihijatrijskih poremećaja javlja kao sekundarni simptom.

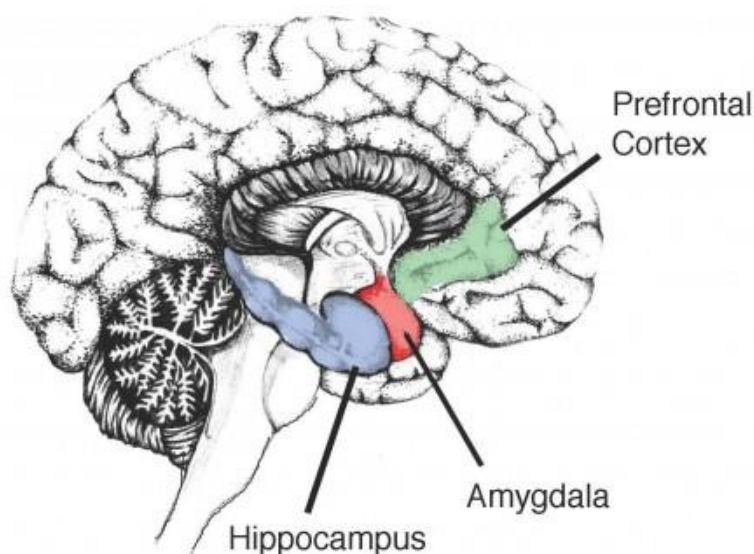
1.1. 6. EPIDEMIOLOGIJA PTSP-a

Incidencija PTSP-a je procenjena na 9-15% a prevalenca na 8% u opštoj populaciji, s tim što još dodatnih 5-15% može bolovati od subkliničke forme ovog oboljenja. Prevalenca kod žena iznosi 10% a kod muškaraca 4%. Kod 30% vojnika posle učestvovanja u ratnim dejstvima, javiće se potpuno razvijena klinička slika PTSP-a, dok će

još 22.5% vojnika oboleti od parcijalnog PTSP, čije je trajanje nedovoljno dugo, da bi se zadovoljili zvanični dijagnostički kriterijumi za PTSP. Iako se PTSP može javiti u bilo kom uzrastu, najviše je raširen među mladim odraslima, jer se očekuje da su oni više eksponirani precipitirajućim situacijama. Muškarci i žene se razlikuju po traumama kojima su izloženi. Tradicionalno, muškarci su izloženi ratnim traumama, a žene fizičkom zlostavljanju i silovanju. Faktori rizika koji dodatno olakšavaju nastanak PTSP-a su samački život, razvedenost, udovištvo, siromašna socijalna mreža, nizak socioekonomski nivo, ali najvažniji faktori su težina, trajanje i neposrednost traumatskog događaja. Takođe su zapaženi i porodični obrasci nastajanja PTSP-a, na primer srodnici prvog stepena sa osobama koje boluju od depresije, imaju povećani rizik od oboljevanja od PTSP-a posle traumatskog događaja (Sadock et al, 2015).

PTSP je visoko prevalentno i onesposobljavajuće oboljenje koje za sobom nosi i ogromne socijalne troškove (Kessler, 2000), te je rasvetljavanje patofiziologije i novih terapijskih modaliteta veoma potrebno našem društvu.

1.1.7. NEUROANATOMSKE STRUKTURE OD ZNAČAJA ZA PTSP I NEUROBIOLOGIJA STRAHA



Slika 1. Neuroanatomske strukture od značaja za PTSP (slika preuzeta sa <https://www.pinterest.com/pin/381961612118044282>)

Da bi neka jedinka preživela u svom okruženju, potrebno je da upamti sva mesta, objekte, i drugo što bi moglo da ugrozi njen opstanak i da se u skladu sa tim informacijama bihevioralno adaptira. Formiranje emocionalne memorije, kao i prisećanje averzivnog iskustva, zahtevaju paralelno procesiranje u tri neuralna sistema, amigdali, hipokampusu i prefrontalnom korteksu. Normalna, fiziološka funkcija u navedenim regionima doprinosi adaptivnom “borba-bekstvo” bihevioralnom odgovoru, te predstavlja evoluciono konzerviran proces, te vrlo značajan za povećanje verovatnoće preživljavanja jedinke.

Klasičan neuroanatomski i patofiziološki model posttraumatskog stresnog poremećaja, postavili su Rauch i saradnici, 1998 godine (Rauch et al., 2008), u formi neuronskog kruga koji uključuje amigdalnu, medijalni prefrontalni korteks (mPFK) i hipokampus. Navedeni autori su pre svega, na osnovu neuroimaging studija PTSP-a, postavili hipotezu da amigdala na preteće stimulse reaguje preteranom aktivacijom i da je to najznačajnija disregulacija u PTSD-u. Pored hiperresponsivne amigdale, autori su pretpostavili da navedenoj hiperresponsivnosti amigdale na preteće stimulse, doprinosi i smanjenje/disfunkcionalnost inhibitorne regulacije amigdale od strane medijalnog prefrontalnog korteksa i hipokampusa. Dakle, PTSP karakterišu, hiperreaktivna amigdala, sama po sebi i pridruženo smanjenje inhibitornih regulatornih kapaciteta medijalnog prefrontalnog korteksa i hipokampusa u stišavanju preterane aktivacije amigdale.

Hiperreaktivna amigdala bi bila u osnovi simptoma povećane uzbuđenosti jedinke obolele od PTSP-a, i takođe razjašnjava skoro neizbrisiv kvalitet emocionalnog pamćenja traumatskog događaja. Neadekvatna supresija amigdale od disfunkcionalnog mPFK, stoji u osnovi smanjenje mogućnosti za nestanak (ekstinkciju) traumatske memorije, kao i u smanjenim kapacitetima prefrontalnog korteksa da suprimira sistem pažnje na stimulse povezane sa traumatskim događajem i odgovor na iste. Smanjena hipokampalna funkcija može biti u osnovi deficita u ispravnom identifikovanju bezbednog konteksta, kao i objašnjenje za deficit eksplicitne memorije (Bremner et al., 1995).

Rauch i saradnici predlažu sledeći patogenetski koncept PTSP-a. U osnovi PTSP-a je klasično uslovljavanje, tj. formiranje patološkog straha procesom učenja posle nekog traumatskog događaja. Doprinosеći patogenetski faktori su povišena reaktivnost amigdale, deficijentna funkcija medijalnog prefrontalnog korteksa i hipokampusa. Hroničan PTSP

pored progresivne deterioracije funkcije neuronskog sistema PTSP-a, uključuje i značajne strukturne promene CNS-a (Rauch et al., 2006).

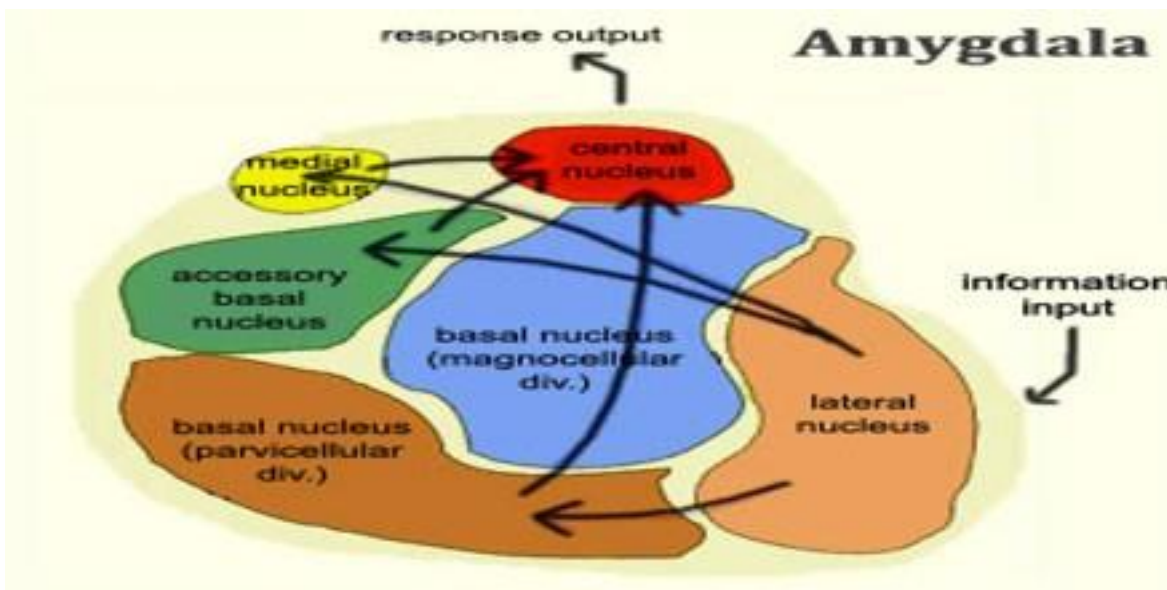
Postoji nekoliko funkcionalnih neuroimidžing studija koje idu u prilog predložene hipoteze PTSP-a. Pozitron emisiona tomografska (PET) studija Rauch i saradnika (Rauch et al., 1996) je pokazala regionalno povećane krvnog protoka u amigdali posle izlaganja audio zapisima skripta povezanog sa traumom u odnosu na izlaganje video zapisima sa neutralnim skriptom kod pacijenata sa PTSP-om. U kasnijim PET studijama, pacijenti oboleli od PTSP-a, izloženi podsetnicima na traumu, pokazivali su veću aktivaciju amigdale u odnosu na zdrave subjekte (Pissiota et al., 2002). Kod pacijenata sa PTSP-om, PET metodom je pokazano smanjenje aktivacije ventromedijalnog prefrontalnog korteksa posle provokacije podsetnicima na traumu u odnosu na zdrave subjekte (Shin et al. 2004). Korišćenjem funkcionalne magnetne rezonance Shin i saradnici (Shin et al., 2005) su pokazali da ekspozicija slikama lica koja imaju intenzivno izraženu mimičku ekspresiju straha, prouzrokuje kod PTSP pacijenata pojačanu aktivaciju amigdale i smanjenu aktivaciju medijalnog prefrontalnog korteksa u odnosu na ekspoziciju istih subjekata slikama lica sa preteranom mimičkom ekspresijom radosti. Takođe, navedena studija pokazuje direktnu funkcionalnu vezu između medijalnog prefrontalnog korteksa i amigdale, jer se hiperaktivacija amigdala registruje simultano sa hipoaktivacijom medijalnog prefrontalnog korteksa kod pacijenata obolelih od PTSP-a za vreme ekspozicije slikama prestrašenih lica. Smatra se da medijalni prefrontalni korteks predstavlja sistem koji je u funkciji negativne povratne sprege za amigdalnu, regulišući na taj način njenu aktivaciju u stanjima kada je aktivirana emocija straha.

Pacijenti sa PTSP-om pokazuju deficite eksplicitne memorije, naročito za emocionalne sadržaje u vezi sa traumom. Mnoge PET studije su pokazale smanjenu aktivaciju hipokampusa kod pacijenta sa PTSP-om, tokom angažovanja eksplicitne memorije zadatih parova reči, koje imaju emocionalno značenje u smislu potencijalne traume (Bremner et al., 2003).

Strukturni neuroimidžing je u više studija pokazao strukturne abnormalnosti kod pacijenata sa PTSP-om. Stein i saradnici (Stein et al., 1997) su demonstrirali smanjenje volumena hipokampusa kod pacijentkinja sa PTSP-om u odnosu na kontrolne subjekte. Geuze i saradnici (Geuze et al., 2007) su pronašli smanjenje debljine prefrontalnog korteksa

kod kod ratnih veterana sa PTSP-om u odnosu na veterane bez PTSP-a. Kada je u pitanju volumen amigdale, neuromidžing studije pokazuju kontraverzne nalaze. Morey i saradnici su strukturnom analizom uz pomoć magnetne rezonance (MRI) kod ratnih veterana sa PTSP-em ustanovili smanjenje volumena amigdale u odnosu na ratne veterane bez PTSP-a (Morey et al., 2012). Pieper i saradnici su pak demonstrirali povećanje volumena amigdale kod ratnih veterana sa PTSP-om i blagom moždanom traumom u odnosu na ratne veterane koji su doživeli samo blagu moždanu traumom. (Pieper et al., 2017).

1.1.7.1. AMIGDALOIDNO TELO (lat. *corpus amygdaloideum*, eng. *amygdala*)



Slika 2. Šematski prikaz jedara amigdale (slika preuzeta sa <http://www.assignmentpoint.com/science/biology/amygdala.html>)

Amigdaloidni kompleks predstavlja subkortikalnu sivu masu, bademastog oblika, koja leži u blizini temporalnog pola hemisfere velikog mozga ispod prednjeg kraja temporalnog roga bočne moždane komore (Ilić et al., 2004). Najvažnija jezdra amigdale od značaja za fiziologiju straha i patofiziologiju PTSP-a su lateralno, bazolateralno, centralno i interkalatna jezdra (LeDoux, 1996).

Lateralno jedro amigdale je glavno ulazno područje koje prima senzorne informacije iz cerebralnog korteksa i talamusa. Lateralno jedro svoje eference šalje u centralno amigdalarno jedro, bed nukleus strije terminalis, strijatum i druga subkortikalna i kortikalna područja, odakle se aktiviraju emocionalni bihevioralni i visceralni odgovori (Pitkänen et al. 1997).

Eferentna vlakna iz lateralne amigdale potiču od piramidalnih ćelija. Od njih neki imaju karakterističnu piramidalnu morfologiju sa karakterističnim apikalnim i bazalnim dendritima, drugi imaju semipiramidalnu pojavu, a treći čak zvezdastu (multipolarnu) strukturu. Aktivacija emocionalnog odgovora iz amigdale je navise određena međuodnosom ekscitatornih i inhibitornih inputa u piramidalnim ćelijama. Korteks i talamus su odgovorni za ekscitatorne signale koji ulaze u piramidalne neurone amigdale, uglavnom kroz spine dendrita piramidalnog neurona (Aleksić, 2017).

Najveća količina inhibitornih inputa dolazi iz lokalnih GABA-ergičkih interneurona. Skoro 50% interneurona u bazolateralnoj amigdali eksprimuju parvalbumin. Neki od njih su košarasti neuroni, koji formiraju korpu oko some odgovarajućeg piramidalnog neurona, dok su drugi svećasti neuroni koji ostvaruju akso-aksonske veze sa inicijalnim segmentom aksona piramidalnog neurona bazolateralne amigdale (Muller et al., 2006).

Amigdaloidni kompleks dobija aferentna vlakna iz korteksa, hipotalamusa, talamusa, moždanog stabla. Kortikalni i talamički inputi daju informacije iz senzornih polja i iz memorijskih sistema. Inputi iz hipotalamusa i moždanog stabla obezbeđuju informacije iz autonomnih i bihevioralnih sistema (Russchen et al., 1985a; Russchen et al., 1985b; Uljarević i Nešić, 2008). Eferentna vlakana iz amigdaloidnog kompleksa odlaze do korteksa velikog mozga, hipotalamusa i moždanog stabla (Sah et al., 2003).

Glavne uloge amigdale u okviru sistema samoprezervacije su 1.detektovanje pretećeg stimulusa (Isenberg et al.,1999; Adolf et al., 1999; Phillips et al., 1998), 2. ekspresija straha u vidu kompleksnog autonomnog i bihevioralnog odgovora organizma na preteći stimulus (Kluver i Bucy, 1939; Halgren et al., 1978), 3. kondicioniranje straha (LeDoux, 2009) i 4.ekstinkcija straha (Falls et al., 1992).

Amigdaloidni kompleks integriše informacije između medijalnog prefrontalnog i parieto-temporo-okcipitalnog asocijativnog korteksa i šalje output u odgovarajuće neuralne strukture koje proizvode odgovor organizma povezan sa strahom. Navedene anatomske

konekcije amigdale, omogućavaju da se integrišu senzorne i kognitivne (memorijske) informacije o pretećem stimulusu, a zatim da se odluči da li će ili neće biti odgovora strahom. Značaj amigdaloidnog kompleksa je u tome da on ima zadatak da signalizira potencijalnu pretnju i na taj način upozori organizam na opasne nagoveštaje umesto da jednostavno prouzrokuje osećanje straha. Odgovor organizma koji amigdala inicira na preteći stimulus uključuje četiri komponente, 1. afekat straha, 2. motorni odgovor (bežanje, borba ili “zaleđenost”), 3. endokrini odgovor HPA (hipotalamus-pituitarna žlezda-adrenalna žlezda) osovine u vidu skoka kortikosteroida i 4. vegetativni odgovor organizma (Ulrich et al., 2009). Afekat straha može se delimično objasniti preko recipročnih konekcija koje amigdala deli sa ključnim areama medijalnog prefrontalnog korteksa koji regulišu emocije, a obuhvataju orbitofrontalnu koru i prednji cingularni korteks. Ipak, strah nije samo osećanje. Odgovor strahom takođe uključuje i motorne odgovore. U zavisnosti od okolnosti i individualnog temperamenta, motorni odgovor može biti borba, bekstvo ili “zaleđenost”. Motorni odgovor povezan sa strahom se može delimično rasvetliti neuronskim vezama koje amigdala ostvaruje sa periakveduktalnom sivom masom moždanog stabla (Fanselow, 1991). Endokrine reakcije povezane sa strahom u vidu brzog skoka kortizola koje značajno povećavaju preživljavanje, se mogu objasniti vezom amigdale sa hipotalamusom, te aktivacijom HPA osovine. Disanje se takođe menja tokom stresnog odgovora i može se objasniti konekcijom amigdale i parabrahijalnog jedra moždanog stabla. Jedan od adaptivnih odgovora u strahu je i ubrzanje respiratorne frekvence da bi se uspešnom borbom ili bekstvom obezbedilo preživljavanje, ali preterano aktiviranje respiratornog centra vodi u neželjene simptome tipa osećaja kratkoće daha, lažnog osećaja gušenja. Povećanje srčane frekvencije i krvnog pritiska za povećanje verovatnoće preživljavanja tokom borbe ili bekstva, ima poreklo u anatomskoj vezi amigdale i locus ceruleusa (Herman et al., 2003; Stahl, 2014).

Uslovljavanje strahom (kondicioniranje straha) je koncept star koliko i eksperimenti sa Pavlovljevim psima i predstavlja oblik emocionalne memorije za čije formiranje je neophodna amigdala. Ukratko, kada je jedan averzivan stimulus kao što je strujni udar, udružen (uparen) sa neutralnim stimulusom kao što je zvuk zvona, životinja uči asocijaciju između stimulusa i razvija strah kad čuje samo zvono (LeDoux, 2000). Kod ljudi, strah se stiče za vreme stresogenog iskustva praćenog emocionalnom traumom i na

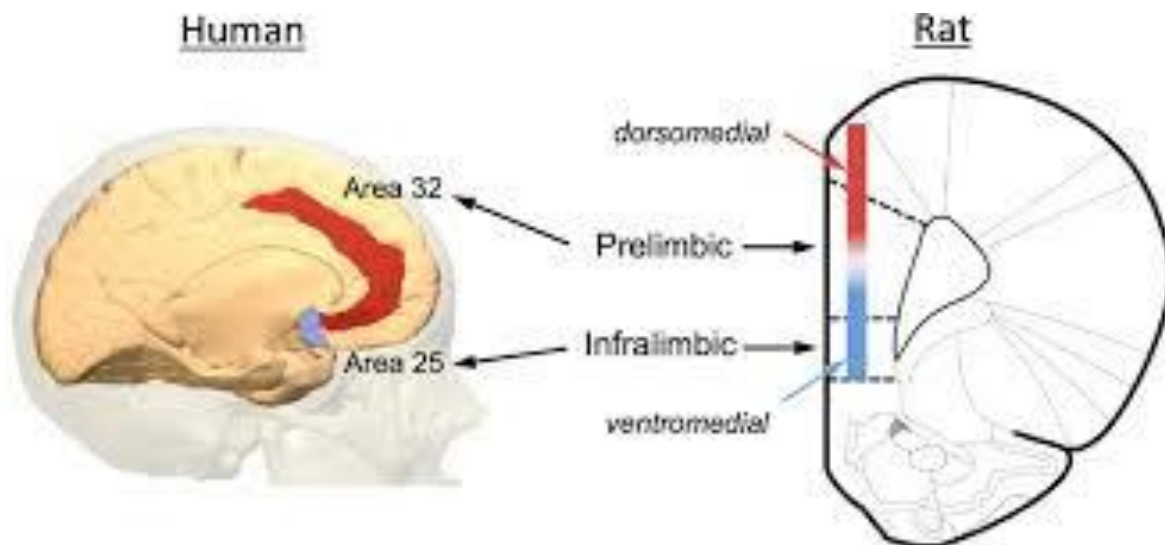
njega utiču individualna genetska predispozicija, kao prethodna ekspozicija okolinskim stresovima koja uzrokuje stres senzitivaciju neuronskih krugova. Najčešće, situacije koje su izazvale strah se uspešno obrade i onda zaborave. Neke reakcije straha su ključne za preživljavanje kod realno opasnih situacija, te je stoga mehanizam naučenog straha (uslovljavanje strahom) strogo konzervisan među svim vrstama uključujući i čoveka. Međutim, drugi strahovi koji su “naučeni” i nisu “zaboravljeni” a nemaju funkciju preživljavanja, hipotetički mogu voditi u anksiozna oboljenja, major depresiju i PTSP (Stahl, 2014). Amigdala je uključena u pamćenje različitih stimulusa asociranih za situacijom koja izaziva strah. To čini na taj način što pojačava glutamatergičke sinapse u lateralnom jedru na mestu gde pristižu informacije iz talamusa ili senzornog korteksa o stimulusima koji su asocirani tokom izazivanja straha. Takođe amigdala pojačava efikasnost neurotransmisije sinapse i na mestu inputa glutamatergičkih neurona lateralnog jedra u centralnom jedru amigdale. Obe sinapse su restrukturisane i permanentno pamćenje je uspostavljeno procesom dugotrajne potencijacije, restrukturacijom NMDA receptora, te procesom sinaptičkog plasticiteta, stoga svaki sledeći ponovljeni input neutralnog stimulusa prvobitno asociranog sa traumatskom situacijom iz korteksa ili talamusa će lako aktivirati emociju straha i odgovarajući motoričko-visceralni odgovor iz centralnog jedra amigdale (Maren i Quirk, 2004; Johansen et al., 2011). Input u lateralnu amigdalnu je modulisan eferencama iz prefrontalnog korteksa, posebno medijalnog prefrontalnog korteksa i hipokampusa. Kada medijalni prefrontalni korteks nije u mogućnosti da suprimuje odgovor straha na nivou amigdale, uslovljenost strahom se nastavlja (Sotres-Bayon et al., 2004). Hipokampus pamti kontekst oko traumatskog događaja kada se procesuiralo uslovljavanje strahom i osigurava da se odgovor straha uvek aktivira kada se traumatski stimulusi i svi drugi asocirani stimulusi pojave (Corcoran et al., 2005). Mnogi današnji lekovi kupiraju anksioznost i strah na nivou outputa straha iz amigdale, te ne postižu izlečenje s obzirom da je suštinsko sinaptičko pamćenje u vezi sa uslovljenim strahom i dalje prisutno na svom mestu (Stahl, 2014).

Ekstinkcija je progresivna redukcija odgovora strahom na stimulus asociran sa traumom, i postiže se onda kada se stimulus asociran sa prvobitnom traumom, ponavljano prezentuje bez bilo kakvih advezivnih posledica. Čak i kada se ekstinkcija straha održava, tj. odgovor strahom je značajno i dugotrajno duboko redukovan, uslovljenost strahom nije

zaboravljen na sinaptičkom nivou. Suštinski u amigdali se tokom procesa ekstinkcije dešava novo učenje, te dodatna restrukturacija na sinaptičkom nivou (Phelps et al., 2004). Te promene mogu da suprimuju simptome anksioznosti i straha pre svega inhibicijom originalnog učenja a ne njegovim uklanjanjem. Uloga hipokampusa u ekstinkciji straha je da pamti kontekst u kome stimulus podsetnik na traumu nije proizveo nikave adverzivne posledice. Ekstinkcija straha se hipotetički objašnjava inputima iz medijalnog prefrontalnog korteksa i hipokampusa koji aktivacijom GABAergičkih interneurona (lokalizovanih u interkalatnim ćelijskim masama amigdale) inhibiraju glutamatergičke sinapse u amigdali. Ovim se postiže postavljanje funkcionalne prepreke u centralnoj amigdali, te se suprimuje output odgovora strahom na stimulse povezane sa traumatskim događajem. Nestanak straha predominira nad uslovljenošću strahom kada su sinaptičko pojačanje i dugotrajna potencijacija u novom neuronskom krugu dovoljni da produkuje takav GABAergički ton koji će nadvladati ekscitatorni glutamatergički ton proizveden u prethodno formiranom neuronskom krugu za produkciju straha na stimulus povezan sa traumom (Maren i Quirk, 2004). Dakle, ekstinkcija straha i uslovljenost strahom perzistiraju istovremeno, memorija oba je prisutna, ali će odgovor na stimulus povezan sa traumom, zavisiti koji od ova dva sistema je jači, odnosno koji ima jaču sinaptičku efikasnost. Ekstinkcija straha je više labilan kontrolni sistem u odnosu na uslovljavanje strahom i ima tendenciju da prestane sa funkcionisanjem kroz vreme. Takođe, odgovor strahom, tj. prvobitni stresni odgovor se može povratiti kada se stimulus povezan sa strahom pokaže u novom kontekstu koji se razlikuje od konteksta koji je hipokampus “zapamtio” za vreme procesa novog učenja tokom supresije stresnog odgovora (Corcoran et al., 2005).

Neuroimidžing studije su pokazale veliki značaj funkcionalnih alteracija amigdaloidnog kompleksa kod pacijenata obolelih od PTSP-a. Tako naprimer pokazana je hiperaktivacija amigdale na podsetnike na traumu kod pacijenata obolelih od PTSP-a (Liberzon i Sripada, 2007). Strukturni neuroimidžing je pokazao kontraverzne nalaze volumena amigdale kod obolelih od PTSP-a. Nedavna studija Pieper i saradnika (2017) je pokazala povećanje volumena amigdale kod pacijenata obolelih od PTSP-a, dok je Morey sa saradnicima (2012) pokazao smanjenje volumena amigdale u PTSP-u.

1.1.7.2. MEDIJALNI PREFRONTALNI KORTEKS



Slika 3. Uporedni prikaz prefrontalnog korteksa kod čoveka i pacova (slika preuzeta iz reference, Gass and Chandler, 2013)

Prefrontalni korteks (PFC) je prednji deo frontalnog korteksa mozga, lociran ispred premotorne kore. PFC je regija frontalnog korteksa koja na električnu stimulaciju ne proizvodi vidljive pokrete (Preuss, 1995). PFC je ujedno i prednja asocijativna area.. Smatra se egzekutivnim centrom za funkcije višeg reda kao što su planiranje aktivnosti, formiranje strategija, donošenje odluka, kompleksno ponašanje i smatra se regionom koji je povezan sa crtama ličnosti i socijalnim ponašanjem (Yang et Raine, 2009). Ostale egzekutivne funkcije PFC-a uključuju procenjivanje dobrog nasuprot lošem, akcije i njihove posledice i aktivnost usmerenu ka cilju (De Young et al., 2010). PFC je i sedište emocionalnih, visceralnih i autonomnih funkcija.

Prefrontalna kora se deli na dorzolateralnu prefrontalnu koru i medijalnu prefrontalnu koru u širem smislu.

Dorzolateralna prefrontalna kora je sastavljena iz prednjih delova donjeg, srednjeg i gornjeg frontalnog girusa. Bidirekciono je povezana sa lateralnim talamusom, hipokampusom i neokorteksom, dok je sa dorzalnim kaudatusom povezana unidirekciono (ima samo eferentne veze). Ima ulogu u pažnji, obrađivanju novih informacija, testiranju

realnosti, fleksibilnosti ponašanja, predstavu prošlosti, sadašnjosti i budućnosti (Pavlović, 2011).

Medijalna prefrontalna kora (mPFK) kod čoveka obuhvata 1. orbito-bazalnu frontalnu koru (aree 11, 13 i 14 po Brodmanu) 2. prednju cingularnu koru (area 32 po Brodmanu) i 3. medijalni prefrontalni korteks u užem smislu, mPFC proper (area 25 po Brodmanu) (Brodman, 1909). Medijalna PFK ima konekcije sa amigdalom i hipokampusom. U citoartitektonskom smislu medijalni prefrontalni korteks sadrži agranularnu (paralimbičku) i granularnu (heteromodalnu) koru. Orbitofrontalna kora u rostralnom delu je u citoarhitektonskom smislu granularna kora, dok kaudalno postaje agranularna. Prednja cingularna kora je po strukturi agranularni korteks sa karakterističnim visokospecijalizovanim, vretenastim neuronima (von Economo neuroni), koji imaju veliko vretenasto telo sa dva nastavka (jedan dendrit koji izrasta iz jednog pola vretenaste some i jednog aksona koji izrasta iz drugog pola some neurona i pruža se u suprotnom smeru od dendrita). Medijalni prefrontalni korteks u užem smislu (infralimbički korteks) je histološki agranularna kora (Murray et al., 2016).

Dugo posle Brodmanovih studija, prefrontalni korteks je bio definisan histološki, postojanjem granularnog četvrtog sloja i topografski rostralnom pozicijom u odnosu na premotornu koru. Navedena definicija prefrontalnog korteksa u potpunosti je mogla biti zadovoljena samo kod primata (Uyling et al., 2003), gde je napravljena distinkcija između frontalnog granularnog korteksa (prefrontalnog) i agranularnog pre(motornog) korteksa. Međutim, kasnijim istraživanjima i primenom drugih kriterijuma, postojanje prefrontalnog korteksa je pokazano i kod pacova. Naime, cerebralni kortikalni areali se mogu definisati i na osnovu recipročnih veza sa glavnim talamičkim jedrima. Mediodorzalno jedro talamusa je jedino talamičko jedro koje šalje projekcije u prefrontalni korteks. Navedene talamokortikalne projekcije su evidentirane i kod primata i kod glodara (Preuss i Goldman-Rakić, 1991). Ekvivalent dorzolateralnog prefrontalnog korteksa kod pacova (frontalna area 2 i dorzalni deo prednje cingularne aree) primaju puno aferenci iz mediodorzalnog talamusa. Takođe, navedeni prefrontalni ekvivalent kod pacova, prima mnogo više multimodalnih kortikokortikalnih projekcija iz somatosenzorne i asocijativne vizuelne kore nego iz primarne motorne kore, što je slično kao u primata. Navedene projekcije su značajne za priliv informacija o stimulusu radi daljeg procesiranja i kodiranja

bihevioralnog i autonomnog odgovora individue (Uyling et al., 2003). Ekvivalent medijalnog prefrontalnog korteksa kod pacova obuhvata prelimbički i infralimbički korteks. Medijalni prefrontalni korteks pacova ima recipročne konekcije sa subikulumom i CA1 poljem hipokampusa, kao i sa jedrima amigdale. Vidal-Gonzales i saradnici su pokazali veoma značajnu ulogu infralimbičkog korteksa u modulaciji ponašanja povezanog sa strahom. Naime, električnom stimulacijom infralimbičkog korteksa postignuta je ekstinkcija patološkog straha i nestanak bihevioralnog odgovora u vidu imobilnosti na uslovni stimulus u vidu tona, za razliku od mikrostimulacije prelimbičkog korteksa pacova gde je dobijeno povećanje bihevioralnog odgovora u vidu imobilnosti pacova na ulovni stimulus. Dakle, studija je pokazala da prelimbički korteks facilitira amigdalarni izlaz, za razliku od infralimbičkog koji ga inhibira. Mikrostimulacijom ekvivalenta dorzolateralnog korteksa (frontalna area 2 i dorzalni deo prednje cingularne kore) nije bilo nikakvog efekta na bihevioralni odgovor povezan sa patološkim strahom (Vidal-Gonzales et al., 2006).

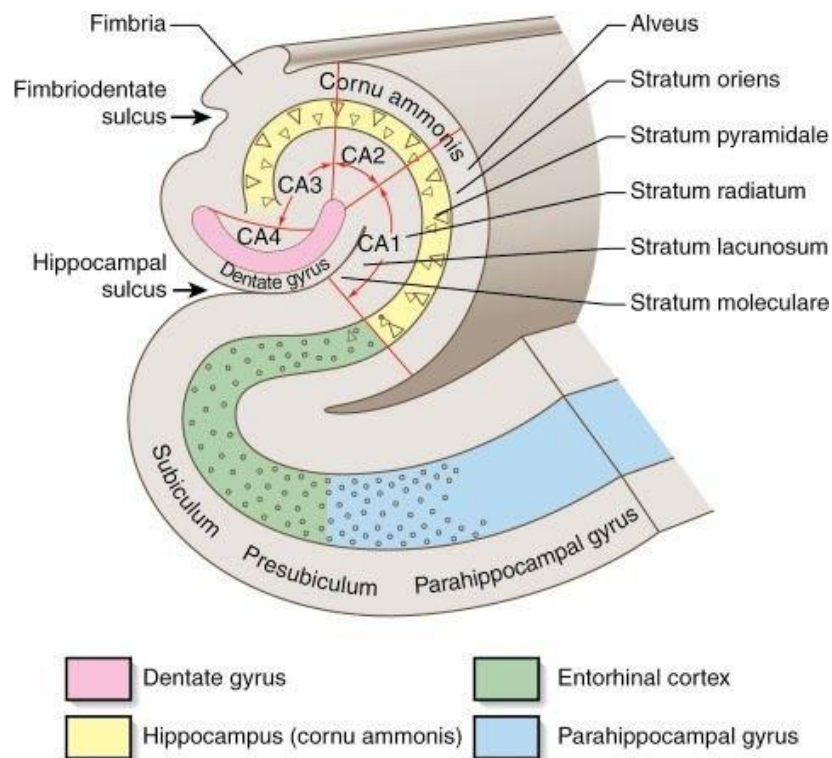
Medijalna prefrontalna kora učestvuje u emocionalnom procesiranju senzornih stimulusa iz spoljašnje i unutrašnje sredine, inhibitornim procesima kao što je inhibicija i odlaganje odgovora, kontroli emocija. Zahvaljujući povezanosti sa subkortikalnim strukturama medijalni prefrontalni korteks ima ulogu „odozgo-naniže“ („top-down“) modulatora emocionalnih reakcija, posebno onih generisanih u amigdali. Neuroimidžing studije pokazuju inverzni odnos između metabolizma glukoze u ventromedijalnom prefrontalnom korteksu i amigdali u afektivnim poremećajima (Abercrombie, 1998). Medijalna PFK upoređuje aktuelnu situaciju reprezentovanu u asocijativnim zonama mozga sa emocionalnim iskustvom, što je osnova za adekvatne bihevioralne reakcije.

Sve tri substrukture medijalne prefrontane kore u širem smislu, učestvuju u modulaciji emocionalnog odgovora. Prednja cingularna kora, a naročito njena ventralna komponenta, ima funkciju u stišavanju emocionalnih i motivacionih informacija. Orbitofrontalni deo mPFK, procenjuje ishode i očekivane kazne i nagrade, te je veoma važan u inhibiciji emocionalnih odgovora, te u socijalnom i emocionalnom ponašanju. Medijalni prefrontalni korteks u užem smislu, mPFK proper (area 25) kod primata i analogno, infralimbički korteks kod glodara, slanjem izuzetno jakih eferenci u GABA-ergičke neurone interkalatnih jedara amigdale, te toničkom inhibicijom centralnog i bazolateralnog jedra amigdale postižu toničku inhibiciju autonomnog i bihevioralnog

odgovora u vidu uslovljenog straha (Pavlović, 2011).

Medijalni prefrontalni korteks ima veliki značaj u posttraumatskom stresnom poremećaju. Za vreme anksioznosti i straha, mPFC je odgovoran za ekstinkciju uslovljenog straha i za održavanje te ekstinkcije (Milad et Quirk, 2002). Ekstinkcija se ne dešava kada je mPFC oštećen (Quirk et al., 2000), te dolazi do održavanja uslovljenog straha (Orr et al., 2000). Navedena istraživanja podržavaju tezu da bi mPFC mogao biti oštećen u PTSP-u. Strukturne neurimidžing studije idu u prilog navedene hipoteze, pokazujući na primer smanjenje volumena prednje cingularne kore kod pacijenata obolelih od PTSP-a (Woodward et al., 2006). Funkcionalni neuroimidžing pokazuje i smanjenu aktivaciju mPFC, kroz smanjenje krvnog protoka u medijalnom prefrontalnom korteksu tokom zamišljanja traumatskog događaja kod pacijenta sa PTSP-om (Shin et al., 2004).

1.1.7.3. HIPOKAMPALNA FORMACIJA



Slika 2. Shematski dijagram hipokampalnog regiona sa prikazom rasporeda ćelijskih polja (Slika preuzeta sa Interneta: <https://medicine.academic.ru/3923/Hippocampus>)

Region hipokampusa je limbička struktura koja ima veoma značajnu ulogu u eksplicitnoj memoriji, emocionalnom i nagonskom ponašanju. Region hipokampusa je neuroanatomska struktura koja se nalazi na medijalnoj strani oba temporalna režnja kod sisara, a sastoji se iz parahipokampusne formacije i formacije hipokampusa. Parahipokampusna formacija obuhvata entorinalnu koru, parasubikulum i presubikulum. Formaciju hipokampusa čine subikulum i hipokampus. Hipokampus obuhvata zupčastu vijugu (*gyrus dentatus*) i hipokampus u užem smislu reči (*hippocampus proper*) ili Amonov rog (Aksić, 2015).

Ostrvca neurona drugog sloja entorinalne kore primaju eksterne i interne senzorne informacije iz senzornih asocijativnih polja neokorteksa. Istovremeno iz ostalih limbičkih struktura, primaju informacije nastale emocionalnim procesiranjem unutrašnjih i spoljašnjih senzornih stimulusa. Najvažniji put procesiranja i integracije informacija o stresnom stimulusu ili podsetnicima na traumu u PTSP-u, u regionu hipokampusa je trisinaptički put hipokampusa, koji obuhvata tri seta glutamatergičkih principalnih neurona. Aksoni principalnih ćelija tog glutamatergičkog kola neurona, obrazuju perforantni, mahovinasti i Šaferov (Schaffer) kolateralni put. Prvi set aksodendritskih sinapsi spaja entorinalnu koru i girus dentatus, drugim su povezani girus dentatus i CA3 polje, dok se trećim setom ostvaruje kontakt između oblasti CA3 i CA1. Među različitim neuronima u ovom sistemu komunikacija može biti sinaptička, jukstasinaptička i nesinaptička, hemijska (Lakočević et al., 2001). Perforantni put čine mijelinizovani aksoni multipolarnih neurona drugog sloja entorinalne kore, koji ostrva napuštaju pod pravim uglom, zatim probijaju subikulum, obilaze obliteratedu fisuru hipokampusa i tako stižu u girus dentatus.

Girus dentatus, inače po strukturi arhikorteks, obuhvata tri sloja: 1. stratum moleculare 2. stratum granulare i 3. stratum polymorphe.

Principalni neuroni zupčaste vijuge su zrnasti neuroni, čija zaobljena, mala i zgusnuta tela grade srednji sloj. Na dendritima u molekularnom sloju koji potiču od zrnastih neurona granularnog sloja, završavaju se aksoni perforantnog puta, i tu se nalazi prvi set aksodendritskih sinapsi trisinaptičkog puta hipokampusa. Od bazalnog pola zrnastih neurona nastaju nemijelinizovani aksoni čije se kolaterale bogato granaju u polimorfnom sloju i obrazuju mahovinasti put. Aksoni mahovinastog puta ulaze u CA3 polje hipokampus propera. Lorente de No (1934) je hipokampus proper podelio na tri polja, CA1, CA2 i

CA3. Hipokampus proper je po strukturi arhikorteks i obuhvata sledeće slojeve: 1. stratum moleculare 2. stratum pyramidale i 3. stratum oriens.

Principalni neuroni Amonovog roga su piramidalni neuroni, koji formiraju srednji, piramidalni sloj. Nemijelizovana vlakna koja nastaju iz bazalnog pola granularnih ćelija girus dentatusa završavaju se na bazalnim dendritima principalnih neurona u piramidnom sloju i sa apikalnim dendritima piramidalnih neurona u stratum lucidumu CA3 polja, formirajući na dva nivoa drugi set sinapsi trisinaptičkog puta hipokampusa. U stratum oriensu se u oblasti CA3 od aksona piramidalnih neurona pre nego što uđu u alveus, odvajaju Šaferove kolaterale koje se završavaju u stratum radiatum CA1 oblasti, na apikalnim dendritima piramidalnih neurona, obrazujući treći set aksodendritskih sinapsi trisinaptičkog puta regiona hipokampusa.

Najznačajnija eferentna vlakna hipokampusa od značaja za procesiranje stresnih stimulusa su aksoni piramidnih neurona subikuluma i hipokampusa propera koji se projektuju u amigdaloidni kompleks (Lakočević et al., 2001).

Kod osoba koje boluju od PTSP-a neurimidžing studije su pokazale smanjenje volumena hipokampusa (Stein et al., 1997) kao i smanjenje aktivnosti hipokampusa (Bremner et al., 2003), što se može objasniti toksičnim efektima ponavljanih skokova kortikosteroida ili hipersenzitivnošću hipokampusa na kortikosteroide. Funkcionalni deficit hipokampusa u PTSP-u, promovise aktivaciju stresnog odgovora, kao i insuficijenciju zaustavljanja stresnog odgovora organizma. Deficit hipokampalne regulacije, takođe doprinosi oštećenju ekstinkcije naučenog straha (Heim i Nemeroff, 2009).

Značaj hipokampusa u PTSP-u je i u kontekstualnoj memoriji traumatskog iskustva, odnosno aktiviranje ponovnog proživljavanja traume posle izlaganja podsetnicima na traum. U kompleksnom sindromu PTSP-a, evidentira se disregulacija u funkcionalnom odnosu između hipokampusa i amigdale, koja uzrokuje generalizaciju tj. prekomernu identifikaciju raznih stimulusa kao opasnih, te dalje facilitira i prolongira maladaptivni strah i stresni odgovor organizma (Charney et al., 1993).

1.2. ANIMALNI MODELI PTSP-a

Animalni modeli PTSP-a imaju nekoliko prednosti u odnosu na ustraživanje na humanoj populaciji. S obzirom na to da glavni dijagnostički kriterijum PTSP-a izloženost životno-ugrožavajućem traumatskom događaju, varijable kao što su vrsta i intenzitet stresora, kao i stepen ekspozicije stresoru, u animalnim modelima mogu biti strogo kontrolisane. Drugo, varijabla kao što su prethodna traumatska iskustva kod ljudi obolelih od PTSD-a se ne može kontrolisati jer validnost anamnestičkih podataka o ranoj traumi pacijenata obolelih od PTSD-a nije zadovoljavajuća. U animalnim modelima se koristi prospektivna studija praćenja, oboljenje se izaziva u tačno određenom vremenu, na tačno određeni način, u kontrolisanim uslovima eksperimenta sa dobrim mogućnostima za procenu bihevioralnih promena i mnogih fizioloških parametara. Pre svega, za razliku od humanih studija, animalne studije omogućavaju analizu biomolekularnih promena u moždanom tkivu, kao i korišćenje farmakoloških agenasa sa potencijanom terapijskom vrednošću (Shiromani, 2009).

Animalni modeli PTSP-a se mogu podeli na 1. modele zasnovane na aplikaciji stresora/traumatskog agensa eksperimentalnoj životinji i na 2. modele zasnovane na pretpostavljenom patofiziološkom mehanizmu PTSP-a.

1.2.1. Stres/trauma animalni modeli PTSP-a

Izlaganje glodara stimulusu koji je u vezi sa predatorom (kao što je mačka, miris mačke, miris lisice ili prirodni sastojci fecesa predatora koji se mogu sintetisati) provocira stresni odgovor kod glodara, kroz odgovarajuće endokrine, fiziološke i bihevioralne reakcije. Najčešće se glodar nalazi u skućenom zatvorenom objektu dok se izlaže stimulusu predatora, da bi se na taj način izbegli borba ili bekstvo glodara, a provocirao odgovor u vidu "zaleđenosti" (imobilnosti). Stres predatorom imitira događaje u prirodi, kratkog je vremena trajanja, životno-ugrožavajućeg karaktera sa dugotrajnim afektivnim posledicama (Adamec et al., 2006).

Drugi animalni modeli PTSP-a uključuju stresore kao što je neizbežni bol ili neizbežni strujni udar, mehaničko obuzdavanje u skućenom zatvorenom prostoru, forsirano plivanje, podvodnu traumom.

Richter-Levin je osmislio model sa podvodnom traumom, u kojem se pacovi mehanički drže ispod površine vode 30-45 s, posle čega se može registrovati dugotrajno i veoma intenzivno anksioznosti slično ponašanje (Richter-Levin, 1998).

1.2.2. Animalni modeli PTSP-a prema pretpostavljenom patofiziološkom modelu

Drugi pristup u razvijanju animalnih modela PTSP-a je bio razmatranje potencijalnih patofizioloških mehanizama mozga koji mogu ležati u osnovi oboljenja, te razvijanje protokola koji imitiraju aktivaciju takvih mehanizama. Pretpostavljeni patogenetski mehanizmi PTSP-a obuhvataju 1. pojačano kondicioniranje straha, 2. deficitarnu ekstinkciju straha, 3. oštećenu kontekstualizaciju.

1.2.2.1. Modeli na bazi pojačane uslovljenosti strahom

Perzistencija fiziološkog i biološkog odgovora u PTSP-u po nekim autorima ne može biti objašnjena samo teorijom o stresnoj reakciji na ozbiljan stresor, već se bolje može sagledati kroz perspektivu uslovljavanja strahom (Yehuda et Le Doux, 2007). U klasičnom Pavlovljevom eksperimentu posle formiranja asocijacije uslovlovnog stimulusa (US) (naprimer tona ili svetlosti) i bezuslovnog stimulusa (BS) (udar šapice pacova strujom), uslovljeni stresni odgovor će se javljati svaki put u istom eksperimentalnom okruženju pacova. Stresni odgovor obuhvata imobilnost životinje, pojačanje mišićnih refleksa, autonomne promene, analgeziju i inhibiciju bihevioralnog odgovora. U PTSP-u trauma (BS) i kasnije podsednici na traumom (US) prouzrokuju strah i povećanu pobuđenost.

1.2.2.2. Modeli na bazi oštećene ekstinkcije straha

Uslovljeni odgovor straha može nestati posle ponavljanog prezentovanja US bez BS. Pavlov je u svojim eksperimentima na psima pokazao da se nestali uslovni refleksni

odgovori spontano oporavljaju sa vremenom. Ovim se pokazuje, ekstinkcija samo suprimira, ali ne otklanja originalnu US-BS asocijaciju. Ekstinkcija je vrlo važan bihevioralni fenomen jer omogućava organizmima da se adaptiraju na promenjeno okruženje. Eksperimentalna ekstinkcija je bihevioralna tehnika koja vodi u supresiju stečenog straha, a manifestuje se kao smanjenje amplitude i frekvencije uslovljenog odgovora na prezentaciju nepotkrepljenog US. Oštećenje ekstinkcije je predloženo kao alternativni patofiziološki mehanizam koji stoji iza simptomatologije PTSP-a (Dunsmoor et al., 2008). Veliki broj farmakoloških, neurofizioloških i studija sa anatomskim lezijama, ukazuju da je amigdala sedište usvajanja i ekstinkcije emocionalne memorije (Walker et Davis, 2002). Hipokampus ima egzekutivnu ulogu u ravnoteži ekscitacije i inhibicije u neuronskim krugovima straha. Kada se uslovni stimulus ponavljano pojavljuje u novom kontekstu (bez bezuslovnog konteksta), hipokampus obezbeđuje preko medijalnog prefrontalnog korteksa (mPFC), supresiju memorije straha u lateralnoj amigdali, te se odgovor strahom umanjuje ili nestaje. Dakle hipokampus u novom kontekstu moduliše mPFC koji onda stimulacijom gabaergičkih interneurona amigdale moduliše pražnjenje principalih neurona lateralne amigdale na pojavu US (Goosens et al., 2003). U slučaju prezentacije US u kontekstu drugačijem u odnosu na onaj u kojem se vršila ekstinkcija, hipokampus inhibira mPFC koji onda dezinhibiše memoriju straha i odgovor straha u amigdali (Goosen et al., 2003). Ovo pokazuju i studije sa lezijom infralimbičkog korteksa (koje su analogne mPFC čoveka), gde se evidentira brzo spontano reuspostavljanje odgovora strahom na US posle prethodno uspostavljene ekstinkcije novim kontekstom (Quirk et al., 2000). Na isto ukazuju i funkcionalne neuroimidžing studije pokazuju hiperresponsivnu amigdalnu i hipoaktivni mPFC kod pacijenata sa PTSPem (Rauch et al., 2006; Shin et al., 2006). Alternativno je predloženo da direktne konekcije hipokampusa sa amigdalom omogućavaju ponovno uspostavljanje odgovora straha onda kad se bezuslovni stimulus pojavi u kontekstu drugačijem u odnosu na onaj u kojem je vršena ekstinkcija (Maren et Quirk, 2004). Međutim, PTSP je mnogo kompleksnije oboljenje i ne može se svesti samo na formiranje uslovnog refleksa.

1.2.2.3. Modeli na bazi oštećene kontekstualizacije

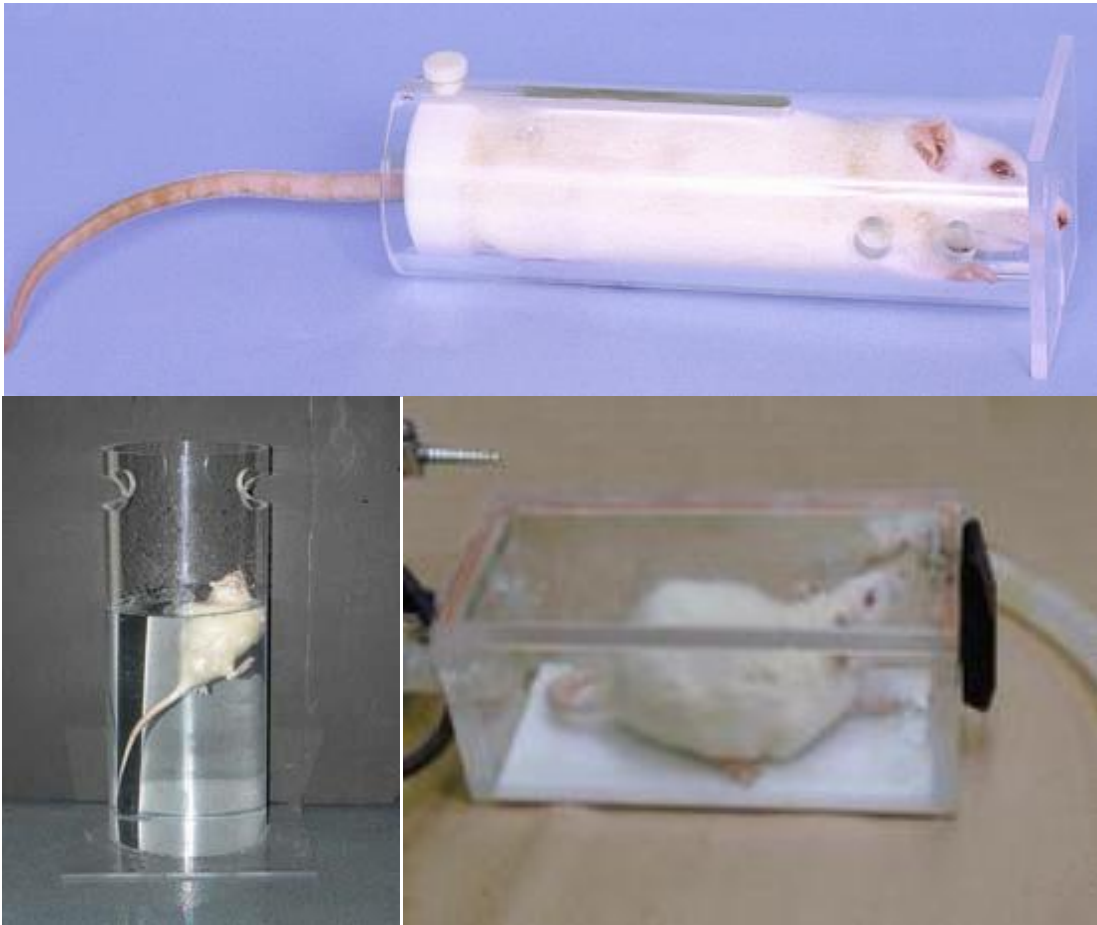
Drugi mehanizam koji može biti objašnjenje razvoja simptoma u PTSP-u je nesposobnost da se traumatski događaj ugradi u svoj pravi kontekst u autobiografskoj memoriji, tj. da se adekvatno i realno kontekstualizuje. Pacijenti oboleli od PTSP-a ponavljano doživljavaju traumatska iskustva, nemaju sposobnost da asimilišu traumatsko iskustvo kao vremenski i kontekstualno ograničen događaj bez negativnih implikacija za njihovu budućnost. Na primer zvuk helikoptera koji leti u objektivno sigurnoj sadašnjosti, ratnom veteranu evocira traumatsko iskustvo iz rata koje se dogodilo nekoliko godina ranije. Smatra se da je deficit ugradnje ili kontekstualizacije traumatskog događaja u autobiografsku memoriju, veoma značajan problem u PTSP-u. (Echlers et Clark, 2000). Kontekstualni memorijski deficiti su evidentirani i u animalnom modelu pojedinačnog produženog stresa (Khan i Liberzon, 2004; Liberzon et al 1999; Liberzon et al 1997).

Pod pretpostavkom da ekspozicija traumatskom iskustvu može oštetiti razlikovanje uslovnog stimulusa u odnosu na kontekst, a to oštećenje je povezano sa PTSP sličnim ponašanjem kod životinja, osmišljen je animalni model uslovljavanja mirisom u različitim kontekstima. Naime, uslovni stimulus je miris cimeta kojem se izlaže životinja u različitim kontekstima, tj. miris cimeta u komori u kojoj životinja doživljava umereno neprijatno iskustvo, zatim komori u kojoj životinja doživljava prijatno iskustvo i komori neutralnoj u odnosu na bilo kakvo kažnjavanje i nagrađivanje (Cohen et al., 2008) Životinja brzo stiče kontekst-specifično emocionalno pamćenje, te lako diskriminiše kontekst koji je povezan sa opasnošću od konteksta povezanog sa sigurnošću. Međutim, dalja ekspozicija ozbiljnom traumatskom stresoru kao što je miris predatora, interferiše sa kasnijom sposobnošću za adekvatnom kontekstualizacijom. Traumatizovane životinje ne mogu da steknu sposobnost pravilne diskriminacije konteksta u kome se javlja miris cimeta, ili ako su takvu sposobnost stekli pre traumatskog događaja (mirisa predatora), istu gube posle traume.

Drugi animalni modeli PTSP-a su fokusirani na modelovanje specifičnih neurobioloških sekvela PTSP-a ili specifičnog ponašanja koje liče na ono u humanom PTSP-u.

Animalni model PTSP-a koji smo koristili u našem istraživanju je model pojedinačnog produženog stresa koji može biti kategorisan kao stres/trauma model.

1.2.3. Pojedinačni produženi stres (PPS)



Slika 4. Model pojedinačnog produženog stresa uključuje tri sukcesivna stresora:

I -Sputavanje (gornja slika, preuzeta sa <http://210.212.254.115:198/arf/p1.php>);

II -Forsirano plivanje (donja levo slika preuzeta sa http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Forced-swimming_test.jpg);

III - Etarska anestezija (donja desno slika preuzeta sa <http://mahmrabeh.weebly.com/heamatology-506-part-iii.html>)

Najviše validiran animalni model PTSP-a je pojedinačni produženi stres koji se sastoji iz tri konsektivna stresora, obuzdavanje 2 sata, forsirano plivanje 15 minuta i etarska anestezija samo do gubitka svesti (Liberzon et al.,1997). Za razliku od drugih animalnih modela PTSP-a koji relativno verno imitiraju bihevioralnu simptomatologiju, tipičnu za PTSP, samo animalni model pojedinačnog produženog stresa (PPS), uspeva da

pored bihevioralnih alteracija, pokaže i neuroendokrinološke karakteristike tipične za PTSP pacijente (Yamamoto et al., 2009). Yehuda i saradnici (1995) su pokazali da pacijenti koji boluju od PTSP-a pokazuju mnogo veće smanjenje koncentracije kortizola u krvi posle aplikacije malih doza egzogenog deksametazona. Pre više od dve decenije Liberzon i saradnici su osmislili PPS animalni model i pokazali povećanu negativnu povratnu spregu hipotalamo-pituitarno-adrenalne osovine (HPA) na male doze egzogenog deksametazona (Liberzon et al., 1997). Kada su u pitanju bihevioralne izmene pacova tretiranih PPS stresorom, koje liče na humani PTSP, literaturni podaci pokazuju da se iste registruju kod pacova, sedmog dana nakon aplikacije PPS stresora (Souza et al., 2017). Sedmog dana se evidentiraju povećanje anksioznosti, pobuđenosti, diskriminacije konteksta straha, kao i pojačano formiranje emocionalne memorije straha, dok su smanjeni ekstinkcija straha, prostorna memorija, socijalne interakcije i rekognicioni aspekti memorije. Prvog dana nakon PPS-a, registruju se samo povećanje REM faze spavanja kao i ubrzani ulazak u REM fazu. U animalnim studijama sa PPS-om, veliki broj biohemijskih promena se može registrovati sedmog dana posle PPS procedure, za razliku od prvog dana posle eksperimentalne procedure kada se može registrovati malo do naznatno biohemijskih alteracija u mozgu pacova, što sve pokazuje da su bihevioralne i molekularne promene u PPS animalnom modelu, vremenski zavisne (Souza et al., 2017), što takođe imitira klinički PTSP.

1.3. NEUROHEMIJSKI I NEUROHISTOLOŠKI SUPSTRATI PTSP-a

1.3.1. REDOKS PROCESI U CENTRALNOM NERVNOM SISTEMU I PTSP

Oksidativni stres predstavlja stanje u kome postoji neravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i njihovog neutralisanja od strane antioksidativne zaštite organizma. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže bar jedan nesparen elektron u spoljašnjem elektronskom omotaču. Slobodni radikali imaju veliki stepen reaktivnosti zbog tendencije sparivanja elektrona. Zbog težnje ka energetske stabilnosti, oni reaguju sa prvim susednim stabilnim molekulom uzimajući njegov elektron i započinjući na taj način lančanu reakciju koja dovodi do strukturnih i funkcionalnih oštećenja tkiva.

Kao evolucijski odgovor na aerobne uslove života i stvaranje slobodnih radikala, u biološkim sistemima se razvio antioksidativni sistem zaštite. Antioksidativna zaštita predstavlja sistem enzimskih i neenzimskih substanci koje imaju zadatak da neutrališu kiseoničke radikale nastale u metaboličkim procesima, te da ih drže u što nižoj koncentraciji (Martinović, 2011).

1.3.1.1. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su vrste koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona a mogu egzistirati nezavisno. Molekulani kiseonik, O_2 se može smatrati reaktivnom kiseoničnom vrstom jer ima dva nesparena elektrona u dve različite orbite, ali s obzirom da ti elektroni imaju isti spin, molekulski kiseonik ima znatnu manju reaktivnost u odnosu na ostale slobodne radikale.

Slobodni radikali nastaju doniranjem ili uzimanjem jednog nesparenog elektrona od nekog drugog stabilnog molekula. Zbog visoke reaktivnosti, slobodni radikali imaju mali poluživot. Najznačajniji slobodni radikali obuhvataju reaktivna kiseonična jedinjenja i reaktivna azotna jedinjenja (Halliwell i Gutteridge, 1999; Blake et al., 1987).

Reaktivna kiseonična jedinjenja obuhvataju slobodne radikale kao što su superoksidni anjon $O_2^{\cdot-}$, hidroksil radikal OH^{\cdot} , alkoksi radikal RO^{\cdot} , peroksi radikal ROO^{\cdot} i hidroperoksil radikal $ROOH^{\cdot}$, i neradikalska jedinjenja kao što su ozon O_3 , singletni kiseonik 1O_2 , hidrogen peroksid H_2O_2 , hipohlorna kiselina $HOCl$. Superoksidni anjon može nastati kao nus produkt aktivnosti respiratornog lanca u mitohondrijama, kao proizvod enzima NADPH oksidaze, ili kao produkt enzima ksantin oksidaze. Tokom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, 95-99% molekularnog kiseonika se redukuje do vode, a 1-5% se parcijalno redukuje u reaktivne kiseonične vrste kao što je superoksidni anjon (Martinović, 2011).

Kao primarna reaktivna kiseonična vrsta, $O_2^{\cdot-}$ je umereno reaktivan, ali lako reaguje sa drugim jedinjenjima kao što je azot monoksidni radikal NO^{\cdot} , formirajući veoma reaktivni molekul peroksinitrit $ONOO^{\cdot}$ (Aruoma, 1998). Superoksidni anjon dizmutira spontano ili uz pomoć enzima superoksid dizmutaze (SOD) u slabije reaktivni neradikalski molekul hidrogen peroksid H_2O_2 koji lako difunduje kroz membrane. H_2O_2 ima sposobnost

da reagovanjem sa delimično redukovanim jonima metala (Fe^{+2} i Cu^{+1}) ili sa azotmonoksidnim radikalom, formira OH^{\bullet} , najreaktivni slobodni radikal koji za kratko vreme oksidiše mnoge biomolekule u neposrednoj okolini i pravi velika oštećenja ćelije (Valko et al., 2007; Halliwell i Gutteridge, 1999).

1.3.1.2. OKSIDATIVNO OŠTEĆENJE MAKROMOLEKULA

U kontaktu sa ćelijskim makromolekulima (fosfolipidima, nukleinskim kiselinama i proteinima), slobodni radikali mogu uzrokovati oksidativno oštećenje strukture i funkcije navedenih molekula, te doprineti ćelijskoj disfunkciji i čak ćelijskoj smrti (Stojković, 2012).

Oksidativnom modifikacijom polinezasićenih masnih kiselina fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane se odvija proces lipidne peroksidacije. Slobodni radikali od nezasićene masne kiseline fosfolipida uzimaju vodonikov atom, pri čemu nastaje fosfolipidni radikal. On u reakciji sa O_2 postaje fosfolipidni peroksil radikal, koji preuzima vodonik sa susednog fosfolipida i postaje fosfolipidni hidroperoksid. Fosfolipidni hidroperoksid u reakciji sa redukovanim metalima (Fe^{+2}) formira fosfolipidni alkoksil radikal koji uzimanjem vodonika sa susednog fosfolipida, gradi fosfolipidni radikal i fosfolipidni aldehid. Najpoznatiji toksički produkti lipidne peroksidacije su 4-hidroksi-2-noneal (HNE) i malonildialdehid (MDA), koji se koriste kao biomarkeri lipidne peroksidacije. Susedni fosfolipid kojem je oduzet vodonik, dalje reaguje sa drugim fosfolipidima, lančano produžavajući oštećenje membrane.

Proces lipidne peroksidaciji dovodi do strukturnih i funkcionalnih oštećenja membrana organela i plazma membrane, preko izmene fluidnosti membrane i promene aktivnosti transmembranskih enzima, transportera i receptora. Promene permeabiliteta membrane mogu dovesti do osmotskog disbalansa i smrti ćelije (Catalá, 2009; Chen i Yu, 1994).

Reaktivne kiseonične vrste mogu da oštete sve komponente DNK (purinske i pirimidinske baze, dezoksiriboza), dovodeći do jednolančanih i dvolančanih prekida DNK, mutacija, delecija, translokacija, unakrsnih povezivanja u okviru jednog ili oba lanca DNK, kao i do unakrsnog povezivanja DNK i proteina. Oksidativnom modifikacijom guanozina

nastaje 8-hidroksiguanozin (8-OHG) koji se koristi kao biomarker oksidativnog oštećenja DNK. Oštećena DNK vodi u poremećaje transkripcije, replikacije i genomske nestabilnosti, degeneraciju i eventualno smrt ćelije (Boiteux i Radicella, 1999)

Aminokiseline u proteinima koje su najosetljivije na oksidaciju su cistein i metionin. Oksidativnom modifikacijom u proteinima nastaju nove funkcionalne grupe kao što su hidroksilna i karbonilna grupa. Proteinski karbonili se koriste kao biomarkeri oksidativnog stresa proteina. Strukturne i funkcionalne promene enzima, transportera i receptora mogu voditi takođe u degeneraciju i smrt ćelije (Dalle-Donne et al., 2003).

1.3.1.3. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

Antioksidansi su biološke supstance koje imaju sposobnost da se takmiče sa oksidabilnim supstratima organizma, da neutrališu oksidanse i sprečavaju oksidativni stres biomolekula (Rivas- Arancibia et al., 2011). Mogu se podeliti na enzimске (SOD, katalaza, glutation peroksidaza) i neenzimske antioksidanse (vitamini, proteini i aminokiseline). Neenzimski antioksidansi su manje reaktivni u odnosu na enzimске, ali antioksidativnu funkciju nadoknađuju većom koncentracijom u odnosu na enzimске antioksidanse.

SOD je enzim koji katalizuje redukciju superoksidnog anjona do hidrogenperoksida koji se potom vrlo brzo neutralizuje uz pomoć glutation peroksidaze i katalaze do vode. U citosolu i plazma membrani je lokalizovana SOD1 koja sadrži Cu i Zn, ima molekularnu masu od 32 kDa i po strukturi je dimer sastavljen od dve identične subjedinice. U mitohondrijalnom matriksu je lokalizovana SOD2, koja sadrži Mn, ima molekularnu težinu 88 kDa i po strukturi je tetramer sastavljen iz četiri identične subjedinice. Superoksid dizmutaza je enzim na prvoj liniji odbrane od toksičnog superoksidnog anjona (Maier i Chan, 2002).

Glutationski oksidaciono-redukcioni sistem obuhvata redukovani glutation (GSH), glutation reduktazu (GR) koja redukuje oksidovani glutation i glutation peroksidazu (GPx) koja zajedno sa GSH doprinosi neutralizaciji peroksida (Reed, 1986). Glutacion je tripepid sastavljen od glutamina, cisteina i glicina. GSH funkcioniše kao redukujući agens u okruženju ispunjenom oksidujućim agensima. Sulfihrilne grupe dva molekula GSH redukuju perokside, formirajući oksidovani oblik glutaciona, glutation disulfid (GSSG).

Glutation reduktaza je enzim koji koristi kofaktor NADPH u cilju redukcije glutacion disulfida u dva molekula glutationa. Pentozofosfatni put je stoga vrlo značajan za snabdevanje glutacion reduktaze njenim kofaktorom NADPH.

Glutation peroksidaza je selen-zavisni enzim koji katalizuje redukciju vodonik peroksida u vodu kao i lipidnih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole, koristeći redukovani glutacion. Postoji nekoliko izoformi GPx: intracelularna, ekstracelularna i plazmatska. Prve dve forme su strukturisane kao homotetradimeri, dok je plazmatska Gpx strukturisana kao monomer. Selen je vezan za cisteinsku reziduu Gpx, kao selenol koji se u reakciji sa vodonik peroksidom, oksiduje u seleničnu kiselinu. Selenična kiselina se ponovo vraća u selenol u reakciji sa GSH oksidujući ga u glutacion disulfid. Glutacion disulfid se redukuje potom u GSH uz pomoć glutacion reduktaze (Reed, 1986).

Katalaza (CAT) ili vodonik peroksid oksidoreduktaza je enzim koji je po zastupljenosti vrlo varijabilno distribuiran u telu. Najviše ga ima u bubrezima i jetri, a u nervnom tkivu se nalazi u veoma malim količinama. Na celularnom nivou, lokalizovan je u mitohondrijama i peroksisomima. CAT je strukturisan kao homotetramerni metaloprotein. Svaka subjedinica sadrži prostetičku grupu protoporfirin IX. Katalaza je uključena u neutralizaciju vodonik peroksida nastalog tokom ćelijskog metabolizma, tako što katalizira transformaciju dva molekula vodonik peroksida u dva molekula vode i molekularni kiseonik (Rivas-Arancibia et al., 2011).

1.3.1.4. FIZIOLOŠKA ULOGA SLOBODNIH RADIKALA U NERVNOM SISTEMU

Slobodni radikali i redoks procesi imaju značajnu ulogu u mnogim ćelijskim procesima, kao što su ćelijska migracija, neuronska plastičnost, sinteza i oslobađanje hormona, povećanje transkripcije citokina za vreme inflamatornog procesa, signalna transdukcija, itd. Slobodni radikali imaju dualnu prirodu, koja zavisi od redoks statusa organizma. U balansiranom redoks statusu, glavna uloga slobodnih radikala je u signalnoj transdukciji, kada se oni vrlo brzo neutrališu preko antioksidativnih sistema. U većem redoks disbalansu, slobodni radikali oštećuju biomolekule, izazivajući oksidativni stres.

Signalna transdukcija ili ćelijska signalizacija je proces koji omogućava prenos informacija iz ćelijskog okruženja do različitih funkcionalnih elemenata u ćeliji. Okidači iz

ćelijske okoline su hormoni, citokini, faktori rasta, neurotransmiteri i neuromodulatori, koji dovode do aktiviranja različitih protein kinaza kao što su naprimer ERK (kinaza regulisana ekstracelularnim signalima) i c-jun NH₂-terminal kinaza (JNK), a potom i aktivacija transkripcionih faktora kao što su nuklearni faktor beta (NF-κB) i aktivator protein jedan (AP-1). Regulacija navedenih transkripcionih faktora je redoks zavisna. Transkripcioni faktori indukuju ekspresiju različitih gena koji onda učestvuju u imunom odgovoru mikroglije, neuronskoj plastičnosti i memoriji, apoptozi, aktivaciji antioksidativne zaštite, itd. Slobodni radikali u fiziološkim uslovima funkcionišu kao signalni molekuli u intracelularnoj transdukcijskoj kaskadi, stoga imaju funkciju sekundarnih mesendžera u ćeliji (Dejanović, 2015).

1.3.1.5. FAKTORI POVIŠENE OSETLJIVOSTI NERVNOG SISTEMA NA OKSIDATIVNI STRES

Nervni sistem je u odnosu na druge organske sisteme naročito vulnerabilan na oksidativni stres (Fridman, 2011). Razlozi su mnogobrojni. Pre svega mozak zbog visokih energetske zahteva, iskorišćava velike količine kiseonika, te produkuje i veće količine slobodnih radikala u respiratornom metabolizmu.

Membrane neurona sadrže puno polinezasićenih masnih kiselina koje su vulnerabilne na oksidativni stres. Površina membrana je velika u odnosu na zapremnu citoplazme. Mozak obiluje ekscitatornim neurotransmiterima koji funkcionišu kao efektorski molekuli u neurotransmisiji. Glutamat i ostale ekscitatorne aminokiseline se nalaze u 40% sinapsi centralnog nervnog sistema sisara. Vezivanje za glutamatergičke receptore rezultuje ekcesivnim i produženim povećanjem nivoa superoksidnog anjona, azotmonoksida i jona kalcijuma intracelularno. Eksces glutamata, te prolongirano aktiviranje receptora, dovodi do edema i smrti neurona, najčešće po tipu nekroze. Intenzivan transmembranski transport jona kalcijuma interferira sa transportom drugih jona, te može facilitirati povećanje nivoa slobodnog jona kalcijuma intracelularno, što vodi u oksidativni stres, na primer aktivacijom azot oksid sintetaze.

Neurotransmiteri kao što su dopamin, noradrenalin i serotonin, mogu lako da autoksiduju, pri čemu vezivanjem za O₂, stvaraju hinone i semihinone, koji kao oksidaciona

sredstva troše zalihe glutationa u mozgu. Autoksidacija neurotransmitera je olakšana u prisustvu prelazni metala kao što su Fe i Mn. Gvožđe koje ima kapacitet da katalizuje reakcije u kojima se sintetišu slobodni radikali, je široko rasprostranjeno u mozgu, i to u citohromu 450, feritinu, akonitazma, mitohondrijalnim nehemskim proteinima sa gvožđem. Gvožđe se nalazi i u tirozin i triptofan hidroksilazi, enzimima koji katalizuju prve reakcije u sintezi dopamina i serotonina. Oštećenja mozga dovode do oslobađanja metala koje vodi u oksidativni stres. Antioksidativna odbrana mozga je skromna, naročito su niske koncentracije katalaze, glutationperoksidaze i vitamina E u odnosu na jetru. Slobodni radikali mogu oštetiti krvno-moždanu barijeru i dovesti do prodiranja neurotoksina i inflamatornih ćelija u ekstracelularni prostor mozga. To čine ili inhibicijom sinteze proteina uključenih u tesne veze ćelija krvno moždane barijere, ili aktivacijom metaloproteinaza koje povećavaju permeabilitet barijere. Aktivirana mikroglia proizvodi superoksidni anjon, hidrogen peroksid, citokine IL-6 (interleukin 6) i TNF- α (faktor tumorske nekroze alfa). Citokini aktiviraju mikrogliju na dodatnu produkciju slobodnih radikala, te nastaje cirkulus viciosus proizvodnje slobodnih radikala i citokina. Mikroglije su odgovorne za inflamacijski proces u mozgu. I poslednje, ali ne manje važno svojstvo mozga, je da sadrži većinom postmitotične neurone, koji se posle nekrotske ili apoptotske smrti prouzrokovane oksidativnim stresom, ne mogu obnoviti. Gubitak većeg broja neurona i njihovih sinapsi, može značajno oštetiti sve funkcije centralnog nervnog sistema (Fridman, 2011).

U literaturi postoji jako malo humanih studija koje su ispitivale oksidativni stres kao potencijalni patogenetski mehanizam u nastanku posttraumatskog stresnog poremećaja. Atli i saradnici (Atli et al., 2016) su pokazali sa visokom statističkom značajnošću, više nivoe malondialdehida i niže nivoe antioksidativnog enzima paraoksonaze u serumu kod pacijenata obolelih od PTSP-a, u odnosu na zdrave kontrole. Attari i saradnici (Attari et al., 2002) su takođe pokazali više nivoe lipidnih peroksida (MDA) u plazmi kod pacijenata obolelih od PTSP-a. Nekoliko studija na animalnom modelu, je pokazalo kauzalni odnos između spoljašnjeg okolinskog stresora i oksidativnog stresa u mozgu (Patki et al., 2013. Vollert et al., 2011). Druge animalne studije su pokazale kauzalni odnos oksidativnog stresa u mozgu (izazvanog hemijskim putem uz pomoć prooksidativnih supstanci kao što su kasantin/kasantin oksidaza ili L-butionin-(S,R)-sulfoksimin) i bihejvioralnih alteracija životinje koje nalikuju na anksioznost i PTSP (Salim et al., 2010; Masood et al., 2008).

Objedinjavanjem navedenih rezultata iz animalnih studija, možemo implikovati oksidativni stres kao potencijalni molekularni put koji povezuje okolinski stresor i bihevioralne izmene koje nalikuju na PTSP.

Dva najznačajnija izvora slobodnih radikala u biološkim sistemima su mitohondrijalni respiratorni lanac i NADPH oksidaza.

1.3.2. MITOHONDRIJALNI RESPIRATORNI LANAC

Mitohondrijalni respiratorni lanac je jedan veoma značajan izvor slobodnih kiseoničnih radikala u biološkim sistemima (Wallace, 1994).

Respiratorni lanac se nalazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija i sastoji se od pet velikih enzimskih kompleksa, nazvanih kompleks I-V. Kompleks I je flavoprotein NADH-koenzim Q reduktaza, sačinjen od flavin mononukleotida i proteina sa nehemiskim gvožđem. Ovaj flavoproteinski kompleks predstavlja mesto na kom se NADH reoksiduje oosloboćajući svoje elektrone, koji se prenose do koenzima Q (ubikvinon). Kompleks II je sukcinat-koenzim Q- reduktaza, sačinjen od sukcinat dehidrogenaze, tri različita proteina sa nehemskim gvožđem i citohroma b560. Ovaj kompleks katalizuje prenos elektrona sa sukcinata na koenzim Q. Koenzim Q je glavni akceptor elektrona sa svih dehidrogenaza koje kao koenzime imaju FAD. Kompleks III je koenzim Q-citohrom c reduktaza, sastavljena od citohroma b562, citohroma b566, citohroma c1 i proteina sa nehemskim gvožđem i učestvuje u translokaciji elektrona sa redukovano koenzima Q na citohrom c, periferni membranski protein slabo vezan za spoljašnju stranu unutrašnje membrane mitohondrija. Citohrom c oksidaza (Kompleks IV, COX), sačinjena od citohroma a, citohroma a3 i redoks aktivnih atoma bakra, funkcioniše kao katalizator finalne reakcije respiratornog lanca, tj. prenos 4 elektrona sa redukovano koenzima c na molekularni kiseonik. Kompleks V je protein na kom se sintetiše adenozin 5''-trifosfat (ATP) i naziva se FoF1-ATP sintaza. Kompleks V se sastoji od dve subjedinice: Fo i F1. Fo subjedinica je locirana u unutrašnjoj membrani mitohondrija i ima ulogu kanala za translokaciju protona. F1 subjedinica je uronjena u matriks mitohondrija i ima funkciju ATP sintaze. Energija dobijena u elektronskom transportnom lancu se koristi za translokaciju protona kroz unutrašnju membranu mitohondrije čime se postiže elektrohemijski gradijent. Ovaj

gradijent funkcionise kao izvor potencijalne energije za sparivanje adenozin difosfata (ADP) i neorganskog fosfora (Pi) i stvaranje ATP-a, koji se dalje koristi za aktivaciju jonskih pumpi koje održavaju mirovni membranski potencijal i za sintezu makromolekula i neurotransmitera (Jevtić-Dožudić, 2017).

Glavna mesta produkcije superoksidnog anjona u mitohondrijalnom ćelijskom lancu su Kompleks I i Kompleks III. Kompleks I oksiduje NADH koristeći koenzim Q kao akceptor elektrona, dok kompleks III oksiduje koenzim Q koristeći citohrom c kao akceptor elektrona. Obe reakcije dovode do translokacije protona i produkcije transmembranskog potencijala neophodnog za sintezu ATP, ali paralelno i do produkcije superoksidnog anjona. Dejstvom kompleksa I stvoreni superoksidni anjon dospeva samo u mitohondrijalni matriks, dok superoksidni anjon stvoren od Kompleksa III dospeva i u matriks i u citosol (Andreyev et al., 2005).

Mitohondrijalna disfunkcija kao i suboptimalni nivo mitohondrijalne funkcije sve se više dovodi u vezu sa patogenezom PTSP-a. Mitohondrija ima centralnu ulogu u nekoliko fizioloških procesa koji mogu biti u pozadini PTSP simptomatologije, kao što su abnormalno kondicioniranje straha, aktivacija neuralnih mreža, sinaptička plastičnost, steroidogeneza, oksidativni stres i inflamacija. Mitohondrijalna disfunkcija ili suboptimalno funkcionisanje mogu biti urođeni i stečeni (Preston et al., 2018).

Studija Liu i saradnika je u PTSP animalnom modelu, pokazala intenzivno smanjenje ekspresije citohrom c oksidaze u mitohondrijalnoj membrani neurona frontalnog korteksa pacova istovremeno sa povećanjem aktivnosti COX u citosolu, oticanje mitohondrija i dezintegraciju citoplazmatske membrane. Dakle, COX je iz mitohondrija ispušten u citosol i enzimska funkcija mitohondrija je izmenjena u toj meri da je izazvala smanjenje metaboličke energije i oštećenje ćelije (Liu et al., 2010).

1.3.3. NADPH OKSIDAZA

NADPH oksidaza (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza, Nox protein) je enzimski kompleks zadužen za produkciju superoksidnog anjona, a sastoji se od šest različitih subjedinica. NOX subjedinice koje se nalaze u membrani su gp91phox (subjedinica b ili NOX2 protein) i p22phox (subjedinica a), formirajući zajedno

heterodimernu strukturu zvanu flavocitohrom b₅₅₈ (citohrom b₅₅₈ ili NOX2 kompleks). U citosolu se nalaze regulatorne subjedinice p40phox, p47phox i p67phox koje su van stimulacije asocirane u kompleks u citosolu. Posle stimulacije, dolazi do fosforilacije subjedinice p47phox, te se onda čitav citosolni kompleks translocira do membrane, gde se asocira sa citohromom b₅₅₈. Spajanjem citosolnih i membranskih subjedinica dolazi do stvaranja aktivne forme NADPH oksidaze. Aktivirani kompleks NADPH oksidaze prenosi elektrone sa supstrata na kiseonik preko drugih nosioca elektrona kao što su prostetična grupa, flavin i hem grupe. Aktivacija navedenog enzimskog kompleksa takođe zahteva prisustvo dva nisko-molekularna proteina, Rac2 i Rac1a. Rac2 je lokalizovan u citosolu kao dimerni kompleks, dok je Rac 1a membranski protein. Tokom aktivacije, Rac 2 vezuje guanozin trifosfat (GTP) i translocira se zajedno sa citosolnim kompleksom (p40phox, p47phox i p67phox) do membrane. Familija NADPH oksidaza se sastoji od najmanje sedam izoformi (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 (Dualna oksidaza 1) i Duox2) koji su strukturno slični, jer svi sadrže FAD i NADPH vezujujuće mesto, šest transmembranskih domena i nose dva hema. Ekspresija NADPH oksidaza je ubikvitarna kod sisara, ali pojedine Nox izoforme imaju različitu tkivnu i ćelijsku distribuciju. Pokazano je da NOX proteini imaju ulogu u regulaciji mnogih fundamentalnih fizioloških procesa, uključujući ćelijski rast, diferencijaciju, apoptozu i remodelovanje citoskeleta. Ekspresija NOX 1-4 izoformi je pokazana u neuronima, mikroglijiji i astrocitima (Sorice i Krause, 2009). NADPH oksidaza je prvobitno otkrivena u aktiviranim makrofagima u kojima funkcioniše kao izvor slobodnih radikala u antibakterijskom imunom odgovoru. Potom je pronađen Nox protein u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova, koji je homolog gp91phox u makrofagima i nazvan je NOX1 (Infanger et al., 2006) a potom su otkrivene i druge izoforme. Suštinski, NOX homolozi u konjunkciji sa p22phox, predstavljaju katalitičku komponentu, te funkcionalni lokus NADPH oksidaze, pošto oni facilitiraju transfer elektrona interagujući sa hemom, NADPH i flavin adenin dinukleotid elementima. Različite Nox izoforme mogu koegistirati u istoj ćeliji i imati različite ćelijske uloge. Imunohistohemijske studije na miševima su pokazale veliku zastupljenost gp91phox (NOX2), p22phox, p40phox, p47phox i p67phox u korteksu, hipokampusu, amigdalama, strijatumu i talamusu mozga (Infanger et al., 2006).

1.3.3.1. Fiziološke uloge NADPH oksidaze u CNS-u:

1. Imunološka odbrana i inflamatorni odgovor obuhvataju ubijanje mikroorganizama slobodnim radikalima, inaktivaciju bakterijskih faktora virulencije, regulaciju pH i koncentraciju jona u fagozomima, regulaciju protonskih kanala i završetak inflamacijskog odgovora.
2. Ćelijska signalizacija obuhvata inhibiciju fosfataza, aktivaciju kinaza, regulaciju jonskih kanala, Ca^{+2} signalizaciju.
3. Regulacija genske ekspresije
4. Regulacija ćelijskog rasta i ćelijskog starenja (Bedard i Krause, 2007).

Studije pokazuju ekspresiju NOX1, NOX2 i NOX4 u neuronima mozga sisara. Njihova uloga u neuronima je ili u modulaciji neuronske aktivnosti ili određivanju ćelijske sudbine, kao što je indukcija apoptoze neurona. Mnoge studije pokazuju da su reaktivne kiseonične vrste nastale od NADPH oksidaze, povezane sa kognitivnim funkcijama, kao što je dugotrajna potencijacija u procesu memorije, te funkcionisanje glutamatergičkih NMDA receptora u procesu učenja. Miševi sa deficitom NOX2 i p47phox pokazuju oštećenja u pamćenju. NADPH oksidaza u neuronima takođe ima i intercelularnu signalnu funkciju. Tako naprimer u hipokampusu, slobodni kiseonični radikali nastali u neuronima uz pomoć NADPH oksidaze tokom faze dugotrajne potencijacije, difunduju van neurona u okolni prostor, u oligodendrocite gde stimulišu kinaze koje onda fosforilišu bazične proteine u mijelinu, te dovode do pojačanja mijelinizacije (Bedard i Krause, 2007).

1.3.3.2. Patofiziološki značaj NADPH oksidaze u CNS-u

Hronični oksidativni stres prouzrokovan hiperaktivacijom NADPH oksidaze se sve više optužuje kao važan patogenetski mehanizam u neurodegenerativnim bolestima, kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest (Infanger et al, 2006). Mikroglijalna NADPH oksidaza učestvuje u neuroinflamatornom procesu u ove dve bolesti. Amiloid prekursor protein (APP) oslobođen iz neurona u Alchajmerovoj bolesti, aktivira NOX2 u okolnim mikroglijama. Slobodni radikali nastali na taj način u mikroglijama ubijaju okolne neurone.

Animalni modeli su pokazali da bi deficit NOX2 mogao biti protektivni faktor od oboljevanja od Parkinsonove bolesti. Takođe se slobodni kiseonični radikali nastali od mikroglijalne NADPH dovode u vezu sa smrću neurona u nigrostrijatnom putu u Parkinsonovoj bolesti. Sličan značaj se pridaje i mikroglijalnoj NOX2 i u HIV demencija kompleksu. Takođe, kod životinja deficitarnih sa NOX proteinima, veličina ishemije posle ishemičko-reperfuzionog udara u mozgu je manja u odnosu na životinje koje nisu deficitarne Nox proteinima. Čini se da NADPH oksidaza ima destruktivnu ulogu u okviru neurodegenerativnih bolesti mozga i ishemičkih cerebrovaskularnih insulta, a protektivnu ulogu kod autoimunih oboljenja mozga (Bedard i Krause, 2007). Kada je u pitanju posttraumatski stresni poremećaj, postoji jako malo studija koje se bave involviranošću familije NADPH oksidaze kao patogenetskog faktora. Liu i saradnici (2016) su pokazali povećanu ekspresiju NOX proteina u hipokampusu pacova u jednom eksperimentalnom modelu PTSP-a. Po našem saznanju nema humanih studija koje su se bavile NADPH oksidazom u PTSP-u.

1.3.4. NEURONI U PTSP-u

1.3.4.1. Neuroni

Neuronalni nuklearni protein (NeuN) je protein koji se ekskluzivno nalazi u skoro svim neuronima kičmenjaka, ne detektuje se u glijalnim ćelijama i nenervnim tkivima, te se smatra specifičnim markerom neuronskih ćelija (Gusel'Nikova et Korzhevskiy, 2015). Sastoji se od 374 aminokiseline. Smatra se, da se NeuN pojavljuje u ranoj embriogenezi u postmitotičkim neuroblastima i da ostaje u neuronima tokom diferencijacije sve do terminalno diferenciranih neurona. NeuN se nalazi u jedrima neurona i u perinuklearnoj citoplazmi. Postoje dve izoforme NeuN (46 kDa i 48kDa). Obe izoforme se nalaze i u jedru i u perinuklearnoj citoplazmi, s tim što u jedru dominira NeuN sa molekularnom masom 46 kDa, a u perinuklearnoj citoplazmi izoforma od 48kDa. U jedru, NeuN je lokalizovan u regionima sa niskom gustinom hromatina. Najveći deo intranuklearnog NeuN je vezan za nuklearni matriks. Hromatografske analize pokazuju sposobnost NeuN da se veže za DNK. Nuklearna lokalizacija NeuN proteina, dokazana njegovom sposobnošću da se

može vezati sa DNK, kao i njegova rastvorljivost, sugerišu da NeuN funkcioniše kao regulatorni molekul u nukleusu neurona. Pored sposobnosti vezivanja za DNK, NeuN ima kapacitet za vezivanje i za RNK. U svakom slučaju, činjenica da je ekspresija NeuN povezana sa neuronalnom diferencijacijom i ekspresija perzistira tokom celog ćelijskog života neurona, pokazuje da je NeuN permanentni regulator ćelijske prezentacije pod neuronalnim fenotipom.

Interpretiranje rezultata kod imunohistohemijskog bojenja na NeuN je jako kompleksno. Naime, smanjenje broja NeuN pozitivnih neurona može se tumačiti neuronskom smrću u oštećenom tkivu. S druge strane smanjeno NeuN bojenje neurona može se interpretirati i privremenim odsustvom sinteze NeuN proteina zbog oštećenja tkiva ali bez smanjenja vitalnosti ćelije. NeuN se može sintetisati i dalje ali je ekspresija NeuN toliko mala da je ispod mogućnosti za detekciju imunohistohemijom. Postoji sedam posttranslacionih modifikacija NeuN proteina, koje se razlikuju po stepenu fosforilacije. Antitela na NeuN prepoznaju isti, samo ako on ima bar jednu fosfatnu grupu. NeuN je produkt Fox-3 gena koji pripada Fox-1 familiji gena. NeuN se koristi pored patohistoloških ispitivanja, i kao specifični neuronski marker kod diferencijacije stem ćelija, te za diferencijaciju neurona od ostalih ćelija, a i za binarizaciju neurona (Gusel'Nikova et Korzhevskiy, 2015).

Kada su u pitanju principalni neuroni mozga, pokazano je u mnogo studija na glodarima i primatima, da ponavljani perinatalni stres ili hronični stres kod odraslih prouzrokuje region-specifične promene dendritske arborizacije i gustine sinaptičkih spina piramidalnih u prefrontalnom korteksu, hipokampusu i amigdali (Seidel et al, 2008). Monoaminergički i peptidergički modulatorni sistemi unutar limbičko-kortikalnih krugova su takođe dramatično reorganizovani posle ranog stresa ili socijalne izolacije odraslih. Glavne mete monoaminergičkih aferenci u prefrontalnom korteksu, amigdali i hipokampusu su GABA-ergički interneuroni.

1.3.4.2. Interneuroni

GABA-ergički neuroni eksprimuju kalcijum vezujuće proteine, parvalbumin, kalbindin ili kalretinin. Postoje multiple populacije interneurona sa različitim neurohemijskim, fiziološkim i morfološkim karakteristikama. Subpopulacije GABA-

egričkih interneurona ostvaraju svoju inhibitornu funkciju ili preko nivoa some i aksonskog brežuljka (parvalbumin-pozitivni interneuroni) ili preko dendrita (Kalbindin pozitivni interneuroni) neokortikalnih, hipokampalnih i amigadalnih piramidnih neurona. Dakle, GABA-ergički neuroni su sposobni da uređuju i kontrolišu stepen inputa kao i outputa ekscitacije piramidnih neurona, te su esencijalni za fino podešavanje i kvalitet obrade informacija u neuronskim krugovima.

Interneuroni imaju donekle raznorodne morfološke karakteristike u različitim regionima i subregionima mozga sisara. To su nepiramidalne, u najvećem broju multipolarne ćelije.

Kalbindin pozitivni neuroni nalaze se u svim slojevima girusa dentatusa i CA1 regiona, s tim što su najzastupljeni u granularnom sloju GD i piramidnom sloju CA1 regiona. Formiraju malo vertikalne dendritske arborizacije. Parvalbumin pozitivni neuroni u odnosu na kalbindin su više zastupljeni u GD i CA1, takođe su najgušći u granularnom sloju GD i piramidnom sloju CA1, sa bogatim vertikalnim grananjem dendrita u molekularni sloj GD i stratum lacunosum-moleculare i stratum radiatum CA1 regiona. Aksoni PV neurona u granuloznom sloju GD i piramidnom sloju CA1 formiraju košaraste formacije oko piramidnih neurona.

U bazolateralnom i centralnom jedru amigdale se nalaze kalbindin i parvalbumin pozitivni neuroni, s tim što su zastupljeniji kalbindin imuno-pozitivni neuroni u odnosu na parvalbumin. U centralnom jedru ima manje obe vrste interneurona, a i neuronska tela su manja u odnosu na bazolateralnu amigdalnu. Dendriti oba tipa neurona se difuzno šire u prostoru, te nemaju preferencijalnu orijentaciju (Seidel et al, 2008).

U izokorteksu parvalbumin pozitivni neuroni obuhvataju košaraste i svećaste ćelije (aksoaksonske ćelije), koje kontrolišu neuronsku mrežu, preko sinapsi sa somom i proksimalnim dendritima ili inicijalnim segmentom aksona principalnog neurona. Kalbindin pozitivni neuroni u medijalnom frontalnom korteksu su najčešće morfološki tipa dupli-buket (eng. double-bouquet). Parvalbumin neuroni su sveukupno zastupljeniji u odnosu na kalbindin pozitivne neurone. Obe vrste neurona se kod majmuna u najvećoj gustani nalaze u drugom i trećem sloju, dok se kod pacova najzastupljeniji u petom sloju. Inače prisutni su u svim slojevima (Gabbott-Paul et al, 1997).

1.3.5. NEUROPEPTIDI I PROCESIRANJE STRESORA

Neuropeptidi su kratki lanci aminokiselina koji funkcionišu kao neurotransmiteri i neuromodulatori, a najčešće su lokalizovani u regionima mozga zaduženim za emocionalno ponašanje i u stresnom odgovoru (Holmes et al., 2003). Za istraživanja o ulozi neuropeptida se koriste glodari sa mutiranim genima za neuropeptide ili njihove receptore. Spisak neuropeptida impliciranih u funkcijama povezanih sa stresom, pokazuje stalni rast. Spisak obuhvata tahikinine (supstanca P i neurokinin A), kortikotropin rilizing faktor (CRF), vazopresin, neuropeptid Y, galanin i mnoge druge.

1.3.5.1. Supstanca P

Supstanca P je peptid koji se sastoji od 11 aminokiselina i pripada porodici tahikinina. Biološke funkcije ostvaruje preko neurokininskog receptora 1 (NK1) koji je povezan sa G proteinom. Supstanci P se pripisuju uloge u inflamaciji, bolu, povraćanju i stresnom odgovoru. Ulogu Supstance P u centralnom nervnom sistemu, kao medijatora stresnog odgovora, pokazuju studije u kojima je mapirana povećana ekspresija supstance P i NK1 receptora u amigdali, hipokampusu, hipotalamusu i periakveduktalnoj sivoj masi posle aplikacije noksicnog ili averzivnog stresora nad eksperimentalnim životinjama. Na primer, materno odvajanje zamorčeta, prouzrokuje povećano oslobađanje supstance P u amigdali, ključnom regionu koji orkestrira endokrini, respiratorni, kardiovaskularni i bihevioralni stresni odgovor. Studije takođe pokazuju povećani efluks supstance P u amigdalnu masu posle emocionalnih stresora (Ebner et Singewald, 2006). Supstanca P je u limbickim regijama mozga često kolokalizovana sa monoaminskim neurotransmiterima. Na primer, polovina neurona koji sadrže serotonin u dorzalnom rafe nuklesu, sadrži istovremeno i supstancu P. Farmakološka blokada ili genetska delecija NK1 receptora uzrokuje povećanje frekvencije akcionih potencijala u neuronima dorzalnog rafe nukleusa, a da pri tome ne dolazi do povećanja ekstracelularnog efluksa serotonina u cerebralnom korteksu. Ovo može biti posredovano blokadom puteva iz habenule koji imaju inhibitornu ulogu na oslabljavanje supstance P. NK1 receptor antagonisti, takođe povećavaju frekvenciju okidanja neurona lokus ceruleus koji sadrže noradrenalin, te pružaju uvid u

novo neuroanatomsko mesto odakle supstanca P ima psihotropnu funkciju. Aplikovanje injekcije sa supstancom P u centralni nervni sistem pacova i zamorčica, prozrokuje čitav spektar bihevioralnih i kardiovaskularnih stresnih odgovora. Stresni odgovori uključuju anksiogeni profil ponašanja u uzdignutom plus lavirintu, potencijaciju trzanja na zvuk, vokalizaciju kao kod prestrašenosti, ponašanje u kojem životinja pokušava da pobjegne. Takođe, centralno aktivni NK1 receptor antagonisti ostvaruju u animalnim modelima, antidepressivne i anksiolitičke efekte u ponašanju, inhibiraju distress vokalizaciju, povećavaju socijalno ponašanje i vreme provedeno u otvorenim krakovima uzdignutog plus lavirinta. Slično se može evidentirati i kod miševa sa delecijom gena za NK1 receptor, što sve ukazuje da supstanca P ima značajnu ulogu u procesiranju stresnog stimulusa i stresnom odgovoru (Ebner i Singewald, 2006).

1.3.5.2. Galanin

Galanin je peptid koji se sastoji od 29-30 aminokiselina. Galanin je kolokalizovan sa serotoninom u neuronima dorzalnog rafe nukleusa, kao i sa noradrenalinom u lokusu ceruleusu. Ima inhibitornu neuromodulatornu ulogu za serotoniniski, noradrenalinski i druge neurotransmitterske sisteme u mozgu glodara (Holmes et al., 2003a). Iako distribucija galanina i njegovog receptora varira među vrstama, galanin i njegovi receptori su u mozgu pacova veoma zastupljeni u limbičkim regionima, kao što su prefrontalni korteks, amigdala, bed nukleus strije terminalis, hipokampus i hipotalamus (Perez et al., 2001). U amigdali je najviše zastupljen u centralnom i medijalnom jedru. Postoje tri podtipa galaninskog receptora (GAL1, GAL2, GAL3), svi su vezani za G protein, ali izgleda imaju različite funkcije. Centralna administracija galanina kod glodara prouzrokuje efekte na kogniciju, hranjenje, seksualno ponašanje, epi napade, regeneraciju nerava i nocicepciju. Galanin takođe posreduje u neuralnom, neuroendokrinom i simpatičkom odgovor na stresor. Ekspresija gena za galanin je povećana u hipotalamusu, amigdali i lokus ceruleusu pacova posle hroničnog izlaganja imobilizaciji, vežbanju, socijalnom stresu. Egzogenom aplikacijom galanina i galanin receptor antagonista prouzrokuje se izmena anksioznosti-sličnog ponašanja, koja zavisi od moždanog regiona i vrste zadatka. Na primer, povećana endogena galaninska aktivnost u amigdali je povezana sa anksiogenim ponašanjem u

uslovima stresa i sa visokom noradrenergičkom aktivnošću. Nasuprot tome, miševi sa genetskim mutacijama sa hiperekspresijom galanina u noradrenergičkim neuronima su neosetljivi na anksiogene efekte povećanog noradrenalina. Miševi sa delecijom gena za GAL1 receptor pokazuju pojačano anksioznosti slično ponašanje pod stresnim okolnostima u odnosu na kontrolne miševе (Holmes et al, 2003b). Prekliničke bihevioralne studije pokazuju da bi farmakološka manipulacija galaninskog sistema u mozgu mogla imati terapijski značaj kod anksioznosti gde je prekomerna noradrenergička aktivnost pretpostavljeni patofiziološki mehanizam, kao što su panični poremećaj i PTSP.

Galanin moduliše neuralni, neuroendokrini i simpatički odgovor na stresore. Studije pokazuju da je izmenjenu ekspresiju gena za galanin u hipotalamusu, amigdali i locus ceruleus-u posle izlaganja ekstremnim stresorima, kao što su imobilizacija i socijalni stres, što takođe implicuje da je galanin veoma važan neuromodulator u procesiranju stresnih stimulusa i u stresnom odgovoru (Holmes et al., 2003a).

1.3.5.3. Enkefalini

Enkefalini su neuropeptidni ligandi endogenog opioidnog sistema koji imaju ulogu u nocicepciji i stresnom odgovoru. Sastoje se od 5 aminokiselina. Endogeni opioidni sistem obuhvata sa G proteinom povezane receptore mi, kapa i delta, kao i njihove ligande beta-endorfin, enkefaline i dinorfine. Kao i drugi endogeni opiodi, enkefalini nastaju iz prekursorskih proteina, iz proenkefalina a koji je prethodno nastao iz preproenkefalina. Postoje dve forme enkefalina, leu-enkefalin i met-enkefalin. Enkefalini se vezuju velikim afinitetom za mi i delta receptore, s tim što imaju veći afinitet za delta. Enkefalini, kao i ostali endogeni opiodi i njihovi receptori, imaju široku distribuciju u moždanim regionima vezanim za stresnu reaktivnost, kao što su paraventrikularno jedro hipotalamusa, amigdala, hipokampus i prefrontalni korteks (de Carvalho, 2015).

Enkefalini imaju antioksidativna svojstva, tako što svojim tirozinskim amino-terminalnim reziduama neutrališu slobodne radikale, transformišući se u dopu i na kraju u opiomelanin, bez učesća enzima. Enkefalini redukuju nivo lipidne peroksidacije (Fontana et al., 2001).

Mnoge studije pokazuju vezu enkefalinskog sistema i stresnog odgovora. Tako je na primer nađena povećana ekspresija mRNK proenkefalina u hipokampusu posle hroničnog imobilizacionog stresa u centralnom jedru amigdale i hipokampusu posle hroničnog nepredvidivog stresa. Nasuprot tome u bazolateralnom nukleusu amigdale je nađena snižena ekspresija mRNK proenkefalina posle hroničnog nepredvidivog stresa, kao i posle hroničnog socijalnog stresa (Berube et al, 2013; 2014). Posle deprivacije spavanja od 72 sata u limbičkom sistemu pacova su smanjeni enkefalinski receptori mi i delta. Farmakološke studije sa egzogenim enkefalinom pokazuju redukciju anksioznog i depresivnog ponašanja kod miševa. Preproenkefalin nokaut životinje pokazuju povišenu bazalnu anksioznost i intenzivno pogoršanje anksioznosti i depresivnosti posle ekspozicije strujnim udarom šape. Oni takođe pokazuju prolongirane alteracije hormona stresa posle ekspozicije pojedinačnom stresoru. Miševi sa specifičnom *daun* regulacijom preproenkefalin gena u centralnom jedru amigdale, pokazuju redukciju bazičnog nivoa anksioznosti. Sa druge strane, *nokdaun* gena za preproenkefalin u bazolateralnom jedru amigdale vodi u povišenu anksioznost kod eksperimentalnih životinja (de Carvalho, 2015). Miševi sa opštim deficitom enkefalina u mozgu, pokazuju mnogo više nivoa anksioznosti i posle 14 dana od akutnog strasnog stimulusa u odnosu na miševe bez deficita enkefalina u jednom PTSD animalnom modelu (Kung et al., 2010).

Hebb i saradnici (2004) su u jednom animalnom modelu PTSP-a, gde je korišćen miris predatora kao stresor i kao podsetnik na traumu, pokazali povećanje broja enkefalin imunopozitivnih neurona u bazolateralnom, centralnom i medijalnom jedru amigdale, kod miševa sa veoma izraženim anksioznim ponašanjem u svetlo-mrak testu. Povećanje ekspresije enkefalina je bilo udruženo sa povećanjem fos-u sličnog antigena. Povišena aktivacija fos sistema bi u procesiranju stresnih stimulusa i stresnom odgovoru, služila regulaciji stresor-resposivnih gena, te bi posredovala u dugotrajnim bihevioralnim promenama. Povećanje enkefalina u mezolimbičkim mestima bi služilo promociji bihevioralnih odgovora kojim se organizam može odvojiti od averzivnog iskustva (Hebb et al., 2004, Kung et al., 2010).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati uticaj PPS-a na pokazatelje oksidativnog stresa u amigdaloidnom telu, hipokampusu i prefrontalnom korteksu mozga pacova određivanjem nivoa lipidnih peroksida i redukovanog glutaciona, aktivnosti glutacion peroksidaze, katalaze i ukupne superoksid dizmutaze, i ekspresiju SOD1 i SOD2.

2. Ispitati uticaj PPS-a na moguće generatore slobodnih radikala: mitohondrijalni respiratorni lanac određivanjem aktivnosti kompleksa I i citohrom C oksidaze i NADPH oksidazu ispitivanjem ekspresije membranskih (gp91phox i p22phox) i citosolnih (p67phox) subjedinica ovog enzima u prefrontalnom korteksu, hipokampusu i amigdaloidnom telu mozga pacova.

3. Ispitati uticaj PPS-a na ukupan broj neurona (NeuN pozitivne ćelije), broj parvalbumin i kalbindin pozitivnih GABA-ergičkih neurona i broj supstanca P, enkefalin i galanin pozitivnih neurona u prefrontalnom korteksu, hipokampusu i amigdali mozga pacova.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTNJE

U eksperimentima su korišćeni pacovi muškog pola, soja Wistar koji su uzeti iz uzgajališta Instituta za biomedicinska istraživanja Galenika u Beogradu (poreklo Charles River laboratorije, Erkrat, Nemačka).

3.2. TRETIRANJE ŽIVOTINJA

Osam nedelja stari mužjaci Wistar pacova prosečne mase od 180-200g su čuvani u standardnim kavezima od pleksiglasa sa piljevinom (26x42x15cm), nedelju dana pre eksperimenta, a radi adaptacije na novo laboratorijsko okruženje. Standardna hrana u vidu peleta i voda im je bila dostupna ad libitum. Pacovi su čuvani u kavezima sa 12-časovnim ciklusom svetlost-mrak (od 07-19h) i sobnoj temperaturi od $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ i sa vlažnošću vazduha $55\pm 5\%$. Nakon nedelju dana čuvanja, u vreme kada su pacovi dostigli masu između 230 i 250g, nad eksperimentalnim pacovima je primenjena PSP eksperimentalna procedura. Svi animalni protokoli su izvršeni u skladu sa NIH Vodičem za brigu i korišćenje Laboratorijskih Životinja. Svi naponi su uloženi da se koristi minimalni broj životinja u eksperimentu i da se minimizira bol i patnja životinja u toku eksperimenta. Korišćenje životinja i eksperimentalni protokol su odobreni od strane etičkog komiteta Univerziteta u Beogradu, pod rešenjem br. 323-07-02608/2015-05/10

3.3. GRUPISANJE EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Posle laboratorijske adaptacije od nedelju dana, 36 pacova je nasumično podeljeno u dve grupe od po 18 pacova, PPS grupa koja će biti podvrgnuta PPS proceduri i kontrolna grupa koja će bez uznemiravanja obitavati u svojim kavezima do žrtvovanja. Za biohemijske analize je korišćeno iz obe grupe po 6 pacova, za Western blot analizu po 6 pacova i za imunohistohemijsku analizu po 6 pacova.

3.4. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Eksperimentalnoj proceduri, Pojedinačnom Produženom Stresu (PPS) je posle laboratorijske adaptacije od nedelju dana bilo izloženo 18 nasumično odabranih pacova. PPS procedura je urađena u vremenu od 9-14h tokom dana, a sastojala se iz aplikacije tri sukcesivna stresora (Liberzon et al., 1997), fizičko sputavanje 2 sata, forsirano plivanje 15 minuta, uvođenje u etarsku anesteziju samo do gubitka svesti. Prvi stresor je dvosatno fizičko sputavanje u specijalnim plastičnim tubama dimenzija 20 cm x 7cm, koje imaju otvor za neometanu ventilaciju pacova. Tube svojim oblikom i veličinom omogućavaju potpunu nepokretnost pacova. Neposredno posle završetka fizičkog sputavanja pacova, svaki pacov je premešten u providni akrilni cilindar, tj. bazenčić (240mm dijametra i visine 500mm) napunjen vodom do 2/3 visine, temperature 24 °C, gde je bio prinuđen da pliva 20 minuta. Posle perioda oporavka od 15 min na suvoj podlozi, pacovi su preneseni u stakleni desikator koji je situiran u hemijskoj kapeli sa zaštitom od požara, gde su uvođeni u inhalacionu etarsku anesteziju. U desikatoru se nalazilo jastuče od gaze 10x10cm natopljeno etrom (40ml), koje nije imalo fizički kontakt sa životinjom. Pacov je u desikatoru ostajao samo do gubitka svesti (oko 3-5 minuta), a završetak ekspozicije etrom je koincidirao sa gubitkom refleksa repa, posle čega je pacov brzo premešten u svoj kavez od pleksiglasa, gde je uz osnovno održavanje, bez uznemiravanja boravio sledećih sedam dana do žrtvovanja. Ostalih 18 kontrolnih životinja je nastavilo da obitava u svojim kavezima uz osnovno održavanje bez uznemiravanja, sledećih sedam dana, istovremeno sa eksperimentalnim životinjama. Sve ekperimentalne i sve kontrolne životinje su u svojim kavezima sve vreme boravile u paru, izuzev tokom ekperimentalne procedure kada su bile van svojih kaveza. Sedam dana posle ekperimentalne procedure, 12 ekperimentalnih pacova i 12 kontrolnih pacova, namenjenih za biohemijske i Western blot analize, su žrtvovani cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom bez anestezije, u intervalu od 9-10 h u odvojenim prostorijama. Ostalih 6 ekperimentalnih i 6 kontrolnih pacova namenjenih za imunohistohmijske analize, je žrtvovano uz intraperitonealnu anesteziju i perfuziju mozga.

3.5. IZOLOVANJE STRUKTURA ZA BIOHEMIJSKE ANALIZE

Za biohemijske analize korišćeno je po šest životinja u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi. Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom bez anestezije, a zatim su glave trenutno zamrzavane u tečnom azotu a zatim čuvane na -80 °C. Moždane strukture, dorzolateralno frontalni korteks (4.2 mm up to -1.32 mm from bregma; Paxinos i Watson, 2005), hipokampus i amigdala preparisane su na hladno i homogenizovane u hladnom puferisanom saharoznom medijumu, ph 7.0 (0,25 M/L saharoze, 50mM K/NaPO₄ pufer i 0.1 mmol/L EDTA). Za određivanje enzimske aktivnosti sinaptozomalna i mitohondrijalna frakcija pojedinih moždanih regiona, su izolovane po metodi Whittaker-a i Barker-a (Whittaker i Barker, 1971) sa izostavljanjem faze prečišćavanja u različitim koncentracijama saharoze po metodi Mičić i Petronijević (2000). Homogenizacijom usitnjeno tkivo je potom centrifugirano dva puta na 1000G, 15 minuta, na 4°C. Supernatanti su dalje centrifugirani 20 minuta na 20000G. Ovako dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule (mikrozome) nastale od glatkog i granulisanog endoplazmatičnog retikuluma, Goldžijevog aparata i plazma membrane kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen 60 minuta na +4°C uz povremeno mešanje. Ovako resuspendovan talog je zatim centrifugiran na 1700G 15 minuta. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome, Goldžijeve membrane i malo granuliranog endoplazmatskog retikuluma.

Neprečišćena sinaptozomalna i neprečišćena mitohondrijalna frakcija su čuvane na -80 °C . Neprečišćena sinaptozomalna frakcija je korišćena za merenje markera oksidativnog stresa, dok je neprečišćena mitohondrijalna frakcija korišćena za merenje aktivnosti enzima respiratornog lanca.

3.6. BIOHEMIJSKE ANALIZE

U uzorcima neprečišćene sinaptozomalne frakcije korteksa, hipokampusa i amigdale, spektrofotometrijski je određivana aktivnost pojedinih enzimskih sistema.

3.6.1. Merenje sadržaja proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana spektrofotometrijski po metodi Lowry i sar. (Lowry et al., 1951). Kao standard je korišćen katalizovan serumski albumin govečeta BSA (Sigma). Količina proteina je određivana u supernatantu za određivanje enzimske aktivnosti neposredno po ekstrakciji. Razblaživanjem sa saharoznim medijumom koncentracija proteina je u svim uzorcima svedena na približno 1mg/ml.

3.6.2. Merenje sadržaja redukovanog glutaciona (GSH)

Sadržaj redukovanog glutaciona (GSH) je određivan spektrofotometrijskom metodom, upotrebom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) (Elman-ov reagens). DTNB reaguje sa alifatičnim tiol jedinjenjima u blago alkalnoj sredini (pH 8.0) stvarajući p-nitrofenol anjon žute boje. Intenzitet boje se koristi za merenje koncentracije GSH očitavanjem ekstinkcije na spektrofotometru pri 412 nm (Ellman, 1959).

.

3.6.3. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx)

Aktivnost enzima glutation peroksidaze je određivana metodom po Günzler (Günzler et al., 1974).

Metoda se zasniva na oksidaciji redukovanog glutaciona sa iskorišćavanjem NADPH u reakciji koju katalizuje enzim glutation reduktaza. Promena apsorbance pri 340 nm kao posledica potrošnje NADPH+H⁺ predstavlja meru aktivnosti glutation peroksidaze u vezanoj reakciji u kojoj učestvuje glutation reduktaza.

3.6.4. Aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD)

Aktivnost SOD određivana je kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini po metodi Sun i Zigman (Sun i Zigman, 1978). Step en inhibicije srazmeran je aktivnosti enzima. Aktivnost ukupne SOD određivana je kinetički, kao promena ekstinkcije u vremenu (10 minuta) na talasnoj dužini od 480nm.

3.6.5. Aktivnost enzima katalaze (CAT)

Aktivnost enzima katalaze je određivana spektrofotometrijski na 405 nm, formiranjem stabilnog kompleksa hidrogen peroksida sa amonijum molibdatom (Goth, 1991).

3.6.6. Koncentracija lipidnih peroksida (MDA)

Stepen lipidne peroksidacije određivan je na osnovu sadržaja malondialdehida (MDA) u sinaptozomalnoj frakciji po metodi Rehnrcrona i sar. (Rehnrcrona et al., 1980). MDA nastao iz polinezasićenih masnih kiselina u procesu lipidne peroksidacije reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) stvarajući obojeni kompleks. Količina stvorenog kompleksa MDA+TBA merena je spektrofotometrijski na 533nm i predstavlja indeks lipidne peroksidacije.

3.6.7. Aktivnost Kompleksa I (NADH-koenzim Q oksidoreduktaza)

Aktivnost Kompleksa I određivana je po metodi Janssen (Janssen et al., 2007). Kompleks I oksiduje NADPH i stvoreni elektroni redukuju decilubihinon koji dalje prenosi elektrone do 2,6-dihlorindofenola (DCIP). Redukcija DCIP-a prati se spektrofotometrijski na 600 nm.

3.6.8. Aktivnost enzima citohrom c oksidaze (COX)

Aktivnost citohrom c oksidaze, poslednje komponente u mitohondrijalnom respiratornom lancu, određivana je na osnovu pada apsorbance tokom oksidacije citohrom c-fero oksida u citohrom c-feri oksid. Kinetika je praćena u kalijumfosfatnom puferu (0.05 M, pH = 7.1) tokom 3-5 minuta spektrofotometrijskom metodom sa maksimalnom apsorbancijom na 550 nm, po metodi Hess i Pope (Hess i Pope, 1960). Aktivnost oba mitohondrijalna parametra je izražena kao U/mg proteina.

3.7. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA TEHNIKOM WESTERN BLOT

Određivanje ekspresije membranskih (gp91phox i p22phox) i citosolne p67phox subjedinice NADPH oksidaze, kao i SOD1 i SOD2, vršeno je Western blot tehnikom. Po šest životinja iz eksperimentalne i kontrolne grupe su žrtvovane cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom. Moždane strukture su preparisane na hladno: korteks (dorzolateralni frontalni korteks; 4.2 mm up to -1.32 mm from bregma), hipokampus i amigdala. Nakon izolovanja pojedine strukture su homogenizovane u puferu za liziranje (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0,25% Na-deoksiholat), koji sadrži proteazne inhibitore (proteaza inhibitor koktel, 100mM PMSF, 200mM Na-ortovanadat i 1M NaF). Nakon centrifugiranja (18000 rpm, 15 minuta na 4°C), odvojeni su supernatanti koji su korišćeni za dalja ispitivanja.

Ukupna koncentracija proteina u homogentu određena je metodom po Bradford-u (Bradford, 1976). Kao standard korišćen je serumski albumin govečeta (BSA). Na osnovu utvrđene koncentracije proteina u uzorcima preračunata je zapremina kojoj se dodaje pufer (Lemli 2x (1m Tris HCl pH6.8, 80% glicerola, 10% SDS, 1% bromfenol plavo) i β -merkaptoetanol)) u odnosu 1:1, kako bi u svakom uzorku bilo 50 μ g proteina. Ovako pripremljeni uzorci su kuvani oko 3 min na 100° C.

Jednake količine proteina iz svakog uzorka (50 μ g) su razdvojene SDS-PAGE elektroforezom na 10 i 15% gelu i izvršen je transfer na nitroceluloznu membranu (Biorad, Hercules, CA). Membrane su blokirane u nemasnom mlekom (5% mleko u TBS-T puferu (TBS 100 mL, dH₂O 900 mL, Tween-20 0,5 mL)) u trajanju od 60 minuta. Nakon blokiranja membrane su inkubirane sa sledećim primarnim antitelima: gp91phox (1:500, zečije poliklonsko, Santa Cruz, CA), p22phox (1:500, zečije poliklonsko, Santa Cruz, CA), p67phox (1:500, zečije poliklonsko, Santa Cruz, CA), SOD1 (1:1000, kozije poliklonsko, Santa Cruz Biotechnology, USA) i SOD2 (1:1000, kozije poliklonsko, Santa Cruz Biotechnology, USA) i β -Aktin (1:10000, mišije monoklonsko, Sigma Aldrich, USA). Potom su membrane inkubirane sa odgovarajućim HRP-obebeženim sekundarnim antitelima: anti-mišijim, anti-zečijim ili anti-kozijim antitelom (Southern Biotech, USA). Membrane se prelivaju aktiviranim luminol radnim rastvorom (aktivira ga 30% H₂O₂) i

tako aktivira vizuelizacija specifičnih proteinskih traka hemiluminiscencijom koja se detektuje primenom ChemiDoc sistema. Sve membrane su stripovane (uklonjena su prethodno vezana antitela) i inkubirane su sa anti-aktin antitelom (1:10000, mišije monoklonsko, Sigma-Aldrich, Germany) kako bi se proverilo da su svi bunarići na gelu bili podjednako napunjeni. U foto-komori, rentgen film je bio izložen membrani tretiranoj sa Enhanced Chemiluminescence System (ECS) i potom razvijen. Blotovi su skenirani i semikvantitativna denzitometrijska analiza je izvršena korišćenjem softvera ImageQuant5.2 a vrednosti izražene u odnosu na β -Actin.

3.8. IMUNOHISTOHEMIJSKE ANALIZE

3.8.1. Priprema uzoraka za imunohistohemiju (kriopreseci)

Za imunohistohemijska ispitivanja žrtvovano je po pet životinja iz eksperimentalne i kontrolne grupe. Životinje smo anestezirali 3.6% hloral hidratom (10ml/kg i.p.) i zatim perfundovali sveže pripremljenim 4% paraformaldehidom (4°C). Izvađene mozgove smo ostavljali 24 h u 4% paraformaldehidu posle čega smo ih prebacili u rastvor saharoze (rastućeg gradijenta koncentracije 10%, 20%, 30%) u 0.1M fosfatnom puferu pH=7.4 (krioprezervacija). Nakon toga, mozgove smo trenutno zamrzavali na -80°C uranjanjem u 2-metilbutan (Fluka Biochemika), koji je prethodno ohlađen na -80°C. Za sečenje tkiva, kaudalni pol svakog mozga je pričvršćen za kriostatski nosač korišćenjem kriostatskog medijuma (Kilik, Italija). Ventralna površina mozga je orijentisana prema sečivu i serijski koronalni preseki debljine 25 μ m za imunohistohemijske analize su sečeni na kriokatu Leica (Leica Instruments, Nemačka). Preseci su sakupljani na SuperFrost Plus pločicama (Menzel Braunschweig, Nemačka). Kako stereološke analize zahtevaju brojne preseke proučavanih struktura i upotrebu serijskih preseka, sakupljanje preseka je uvek vršeno na isti način. Na kraju na svakoj pločici je bilo po 4 preseka koji su međusobno udaljeni 250 μ m. Preseci su do trenutka bojenja čuvani na -20°C.

3.8.2. Imunohistohemijski protokol

Za imunohistohemijsko bojenje, prvo je izvršeno demaskiranje antigena: pločice su inkubirane 30 minuta na 80°C (u kiveti u vodenom kupatilu) u 0,01M citratnom puferu pH=9. Po završetku inkubacije, pločice su ostavljene da se ohlade na sobnoj temperaturi. Zatim je izvršeno nespecifično blokiranje tokom 1h na sobnoj temperaturi koristeći normalan kozji serum (0,2% Triton X-100, 0,02% NaN₃, 5% normalni kozji serum u PBS-u pH=7.3). Nakon toga, rastvor za blokiranje je aspiriran, a pločice su inkubirane sa primarnim antitelima (24 – 48h na +4°C) koja su rastvorena u PBS-u koji sadrži 0.5% λ carrageenan (omogućava bolju penetraciju antitela kroz relativno debeo isečak) i 0.02% NaN₃. Pločice su inkubirane u dobro zatvorenim vlažnim komorama sa odgovarajućim primarnim antitelima, NeuN (1:1000, mišije monoklonsko anti NeuN antitelo, Chemicon, USA), parvalbumin (1:1000, mišije monoklonsko antiparvalbumin antitelo, Sigma-Aldrich, Germany), kalbindin (1:1000, mišije monoklonsko antikalbindin antitelo; Millipore), supstanca P (1:100, mišije monoklonsko anti-supstanca P antitelo; Millipore), enkefalini (1:100, mišije monoklonsko anti-enkefalin antitelo; Millipore) i galanin (1:100, mišije monoklonsko anti-galanin antitelo; Millipore).

Nakon inkubacije, pločice su 3 puta ispirane PBS-om (po 15 min) pre stavljanja odgovarajućeg sekundarnog antitela. Za vizuelizaciju je korišćen En Vision Dual Link System-HRP (DAKO), koji sadrži sekundarna antitela (prema primarnim mišjim i zečjim antitelima) konjugovana sa peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP). Nakon reakcije sa sekundarnim antitelima sledila je inkubacija (10 minuta) sa 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) koji je hromogeni supstrat za peroksidazu, što dovodi do pojave precipitata braon boje na mestu prisustva antigena. Na kraju, preseci su ponovo ispirani PBS-om nakon čega je izvršena dehidratacija i postavljeno pokrovno staklo pomoću DPX-a (Sigma-Aldrich, Nemačka). Obojene pločice su čuvane u mraku na +4°C.

Uz pomoć optičkog mikroskopa (DM4000 Leica) sa 40x objektivom su napravljene mikrofotografije odgovarajućih imunohistohemijskih preparata mozga pacova. Dobijene digitalne fotografije su kvantitativno analizirane u Fotošopu 7.0 softver (Adobe, San Jose,

CA) sa korišćenjem 1cm mreže. Brojani su imunopozitivni neuroni u odgovarajućim stereološkim presecima medijalnog prefrontalnog korteksa, amigdaloidnog tela i hipokampalne formacije mozga eksperimentalnih i kontrolnih pacova. Izbrojani imunopozitivni neuroni su izraženi kao gustina, tj. broj imunopozitivnih neurona po jedinici površine (mm²). U okviru svakog ispitivanog moždanog regiona od navedena tri, upoređivani su stereološki preseki koji se nalaze na istoj udaljenosti od Bregme.

3.7.3. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička obrada dobijenih rezultata između kontrolne i eksperimentalne grupe vršena je pomoću programa Statistica StatSoft, odgovarajućim statističkim testovima, pre svega Studentovim t-testom za dva nezavisna uzorka. Statistička značajnost će biti definisana na nivou verovatnoće nulte hipoteze od $p \leq 0.05$.

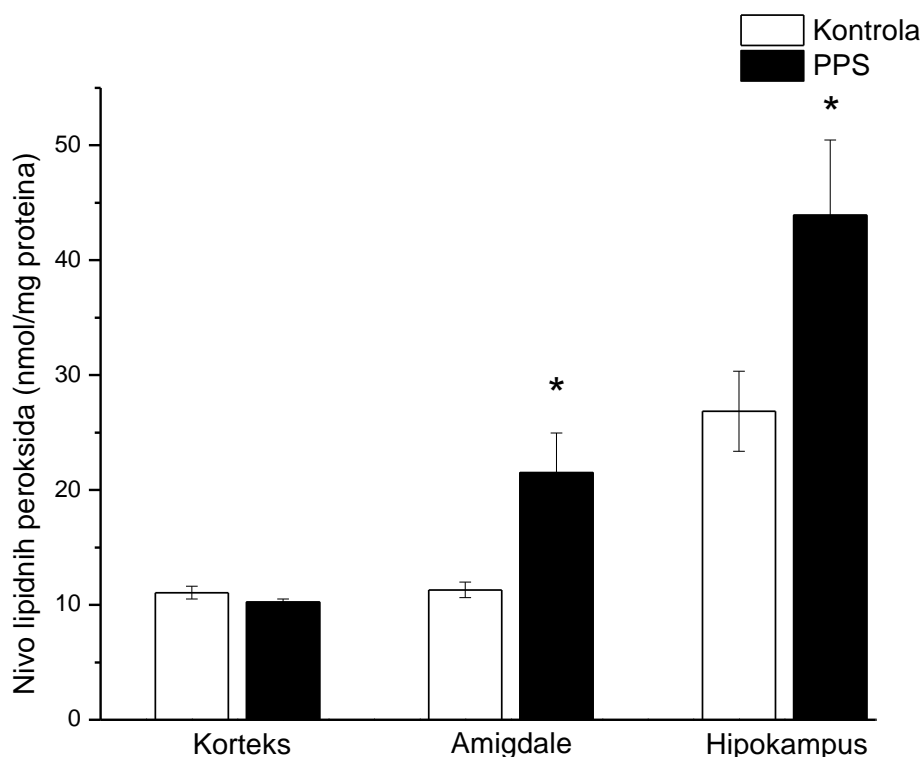
Ukoliko je verovatnoća da je radna hipoteza („postoji razlika između posmatranih grupa“) tačna, bila jednaka ili manja od 5% ($p \leq 0.05$), razlika je smatrana za statistički značajnu. Rezultati su prikazani grafičkim stubičastim dijagramima. Grafički prikaz je urađen u programu OriginPro8.

Statističkim t-testom su upoređivane gustine imunopozitivnih neurona za dati marker između eksperimentalne i kontrolne grupe pacovskih mozgova.

4. REZULTATI

4.1. Uticaj PPS stresora na nivo lipidnih peroksida (MDA) u mozgu pacova

Istraživanje je pokazalo region specifične promene nivoa lipidnih peroksida u mozgu pacova sedmog dana posle aplikacije PPS stresora. Statistički značajan porast MDA je pokazan u amigdali i hipokampusu mozgovog eksperimentalne grupe pacova u odnosu na kontrolnu grupu. U korteksu nije zabeležena statistički značajna razlika u nivou MDA između PPS i kontrolne grupe. Nivoi MDA u ispitivanim moždanim strukturama, eksperimentalnih i kontrolnih životinja, prikazani su na grafikonu 1.

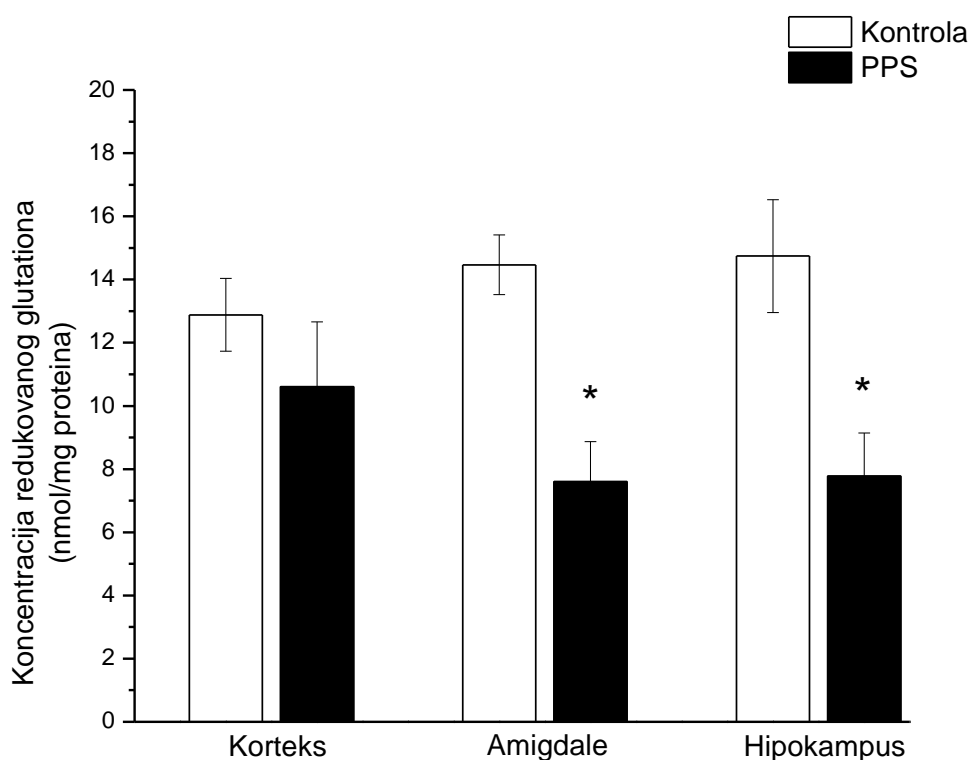


Grafikon 1. Nivo lipidnih peroksida (MDA) u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa, amigdale i hipokampusa u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (n=6) životinja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M .

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe

4.2. Uticaj PPS stresora na koncentraciju redukovanoj glutaciona (GSH) u mozgu pacova

Naša studija je pokazala region specifične promene koncentracije GSH u mozgu pacova tretiranih PPS procedurom u odnosu na kontrolne pacove. U hipokampusu i amigdali PPS pacova, sedmog dana nakon PPS procedure je evidentirano statistički značajno smanjenje koncentracije GSH u odnosu na iste strukture kontrolnih pacova. U korteksu nije identifikovana statistički značajna razlika između eksperimentalnih i kontrolnih pacova. Koncentracije GSH u ispitivanim strukturama mozga u PPS i kontrolnoj grupi, prikazane su na grafikonu 2.

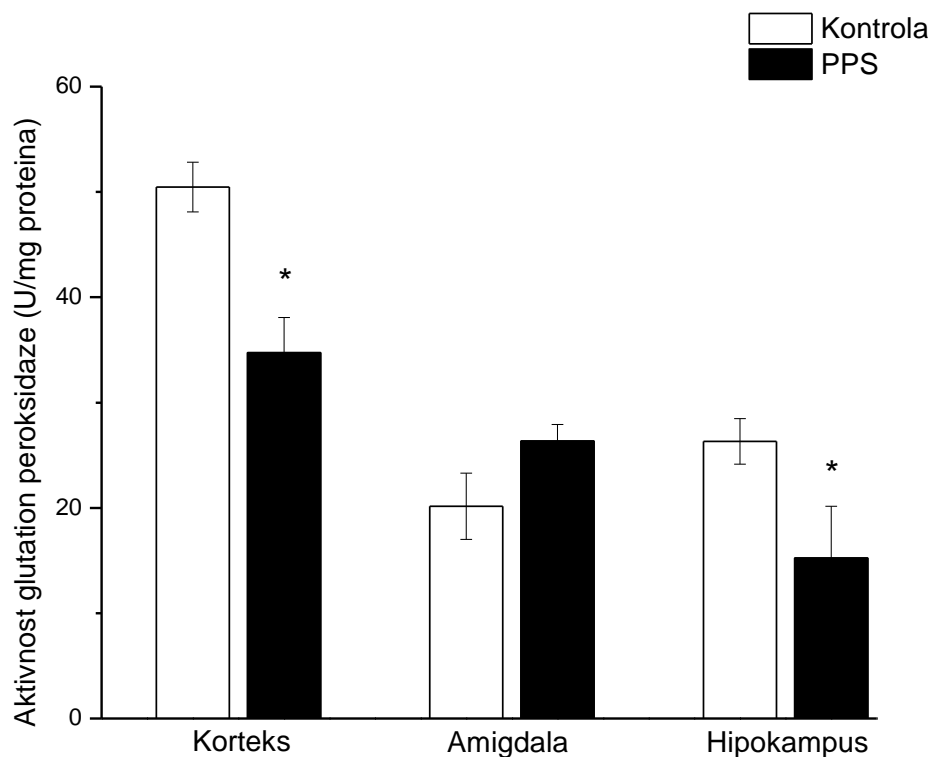


Grafikon 2. Koncentracija redukovanoj glutaciona u neprečišćenju sinaptozomalnoj frakciji korteksa, amigdale i hipokampusu, u kontrolnoj grupi (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

*p<0.05 u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.3. Uticaj PPS stresora na aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) u mozgu pacova

Naše istraživanje je pokazalo region specifičnu promenu aktivnosti GPx pod uticajem PPS stresora. U hipokampusu i korteksu pacova tretiranih PPS stresorom je zabeleženo statistički značajno smanjenje aktivnosti GPx u odnosu na istu strukturu kontrolnih pacova. U amigdali nije pronađena statistički značajna razlika u aktivnost GPx između eksperimentalnih i kontrolnih pacova. Aktivnost GPx u ispitivanim strukturama mozga eksperimentalnih i kontrolnih pacova, sedmog dana posle PPS, prikazana je na grafikonu 3.

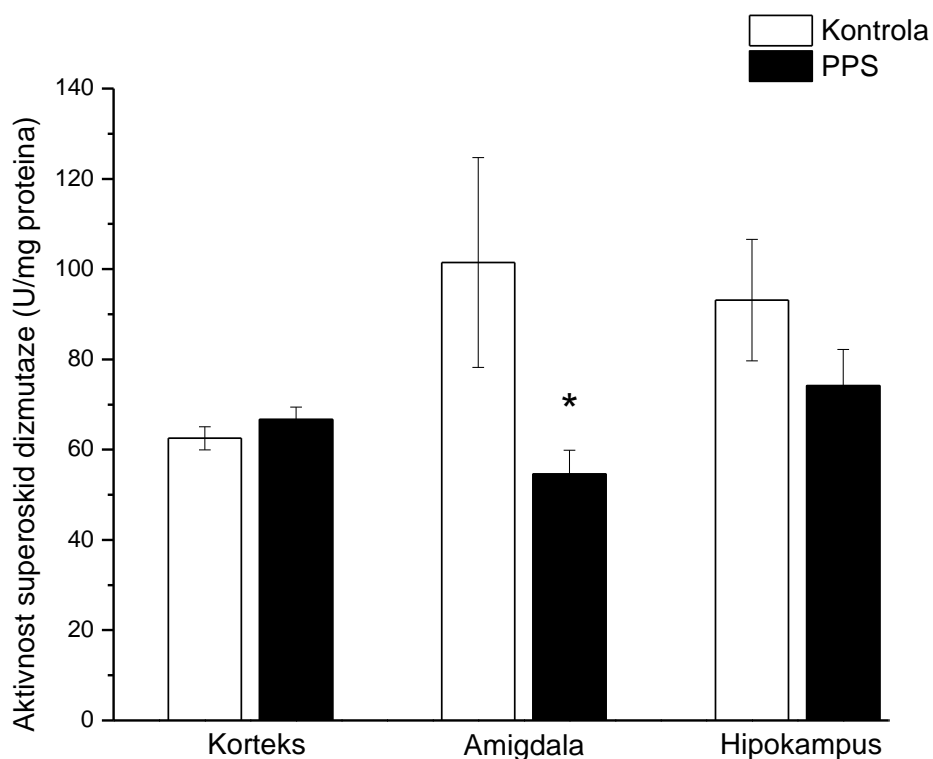


Grafikon 3. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa, amigdale i hipokampusa, u kontrolnoj grupi (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.4. Uticaj PPS stresora na aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) u mozgu pacova

Naše istraživanje je pokazalo statistički značajno smanjenje aktivnosti superoksid dizmutaze u amigdali eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne, sedmog dana nakon aplikacije stresora. U korteksu i hipokampusu nisu evidentirane statistički značajne razlike u nivo aktivnosti ukupne SOD kod PPS pacova u odnosu na kontrole. Aktivnost SOD u ispitivanim moždanim strukturama PPS i kontrolnih pacova, prikazana je na grafikonu 4.

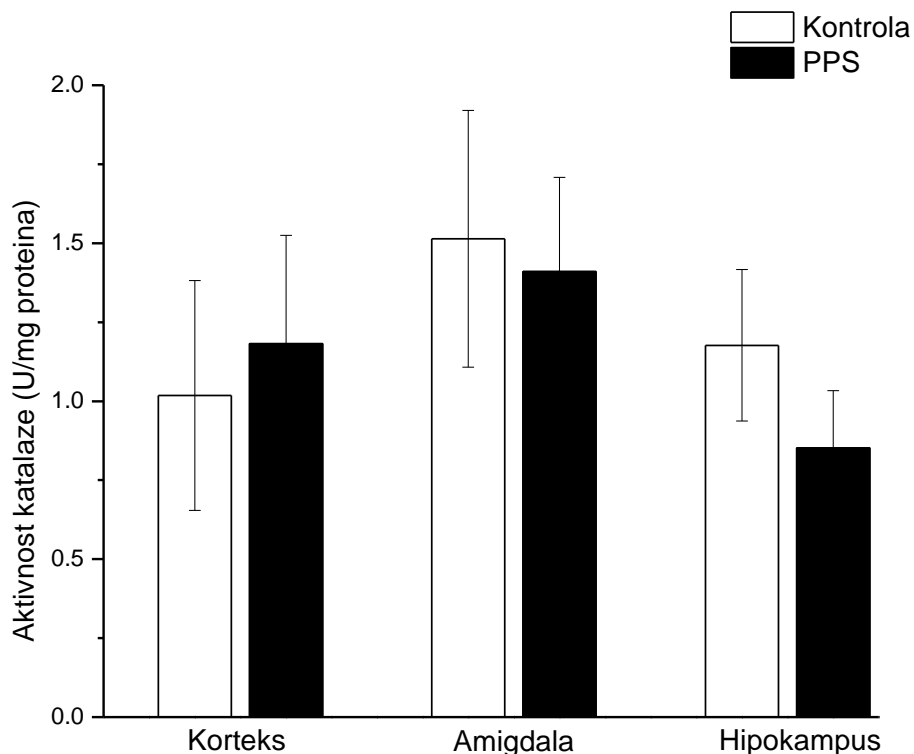


Grafikon 4. Aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) u neprečišćenoj sinaptozomalnoj frakciji korteksa, amigdale i hipokampusa, u kontrolnoj grupi (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.5. Uticaj PPS stresora na aktivnost enzima katalaze (CAT) u mozgu pacova

Naše istraživanje je pokazalo da u amigdali, hipokampusu i korteksu pacova koji su bili izloženi PPS stresoru, nije došlo do statistički značajne izmene aktivnosti enzima katalaze u odnosu na kontrolne pacove u istim moždanim regionima. Grafikon 5 pokazuje aktivnost CAT u korteksu, amigdali i hipokampusu eksperimentalnih i kontrolnih pacova.

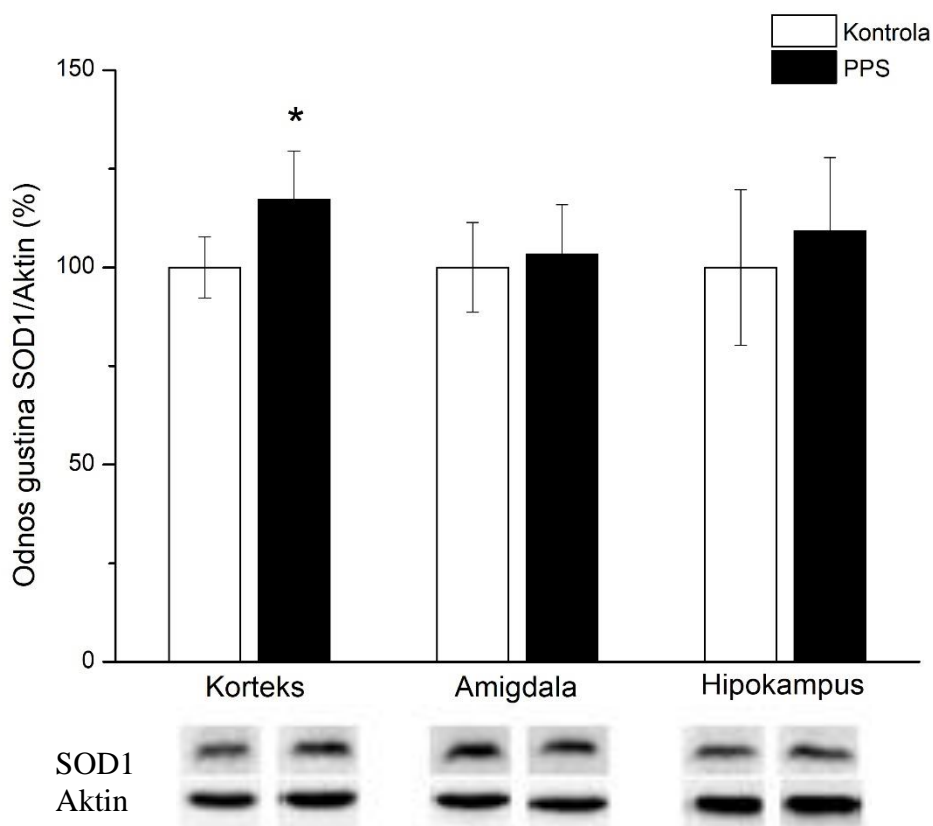


Grafikon 5. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa, amigdale i hipokampusa, u kontrolnoj grupi (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.6. Uticaj PPS stresora na ekspresiju SOD1 enzima (citosolne superoksid dizmutaze) u mozgu pacova

Tehnikom Western blota smo utvrdili statistički značajno povišenu ekspresiju citosolnog izoenzima superoksid dizmutaze (SOD1) samo u korteksu mozga pacova, dok u amigdali i hipokampusu nismo našli statistički značajne promene aktivnosti SOD1 u poređenju sa kontrolnim pacovima. Ekspesija enzima SOD1 u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih i kontrolnih pacova, prikazana je na grafikonu 6.

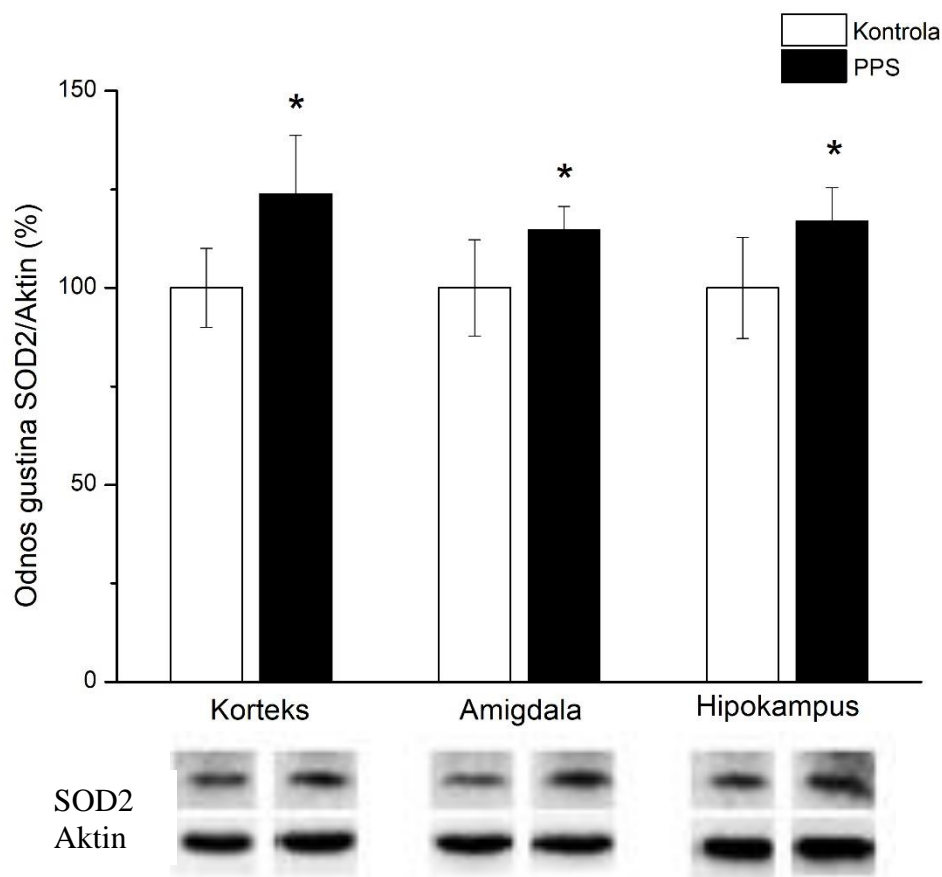


Grafikon 6. Ekspresija enzima SOD1 u korteksu, amigdali i hipokampusu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (SPS) životinja (n=6). Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafikon dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.7. Uticaj PPS stresora na ekspresiju SOD2 enzima (mitohondrijalne superoksid dizmutaze) u mozgu pacova

Western blot tehnikom pokazali smo statistički značajno povišenu ekspresiju mitohondrijalnog izoenzima superoksid dizmutaze (SOD2) u svim ispitivanim moždanim regionima (korteksu, amigdali i hipokampusu) pacova izloženih PPS proceduri u poređenju sa kontrolnim pacovima. Nivoi ekspresije SOD2 u ispitivanim strukturama mozga pacova u PPS i kontrolnoj grupi, prikazani su na grafikonu 7.



Grafikon 7. Ekspresija enzima SOD2 u korteksu, amigdali i hipokampusu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (PPS) životinja (n=6). Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafikon dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.8. Uticaj PPS procedure na aktivnost enzima respiratornog lanca Kompleks I i COX u mozgu pacova

Naša studija je evidentirala statistički značajno povećanu aktivnost Kompleksa I mitohondrijalnog lanca u korteksu mozga eksperimentalnih pacova u poređenju sa kontrolama. U ostalim ispitivanim moždanim regionima (amigdali i hipokampusu) nisu nađene statistički značajne razlike u aktivnosti Kompleksa I između PPS i kontrolne grupe. Takođe, u svim ispitivanim moždanim strukturama nisu nađene statistički značajne razlike u aktivnosti citohrom c oksidaze (COX) između eksperimentalne i kontrolne grupe. Tabela 1. prikazuje aktivnosti Kompleksa I i COX u ispitivanim strukturama u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi pacova.

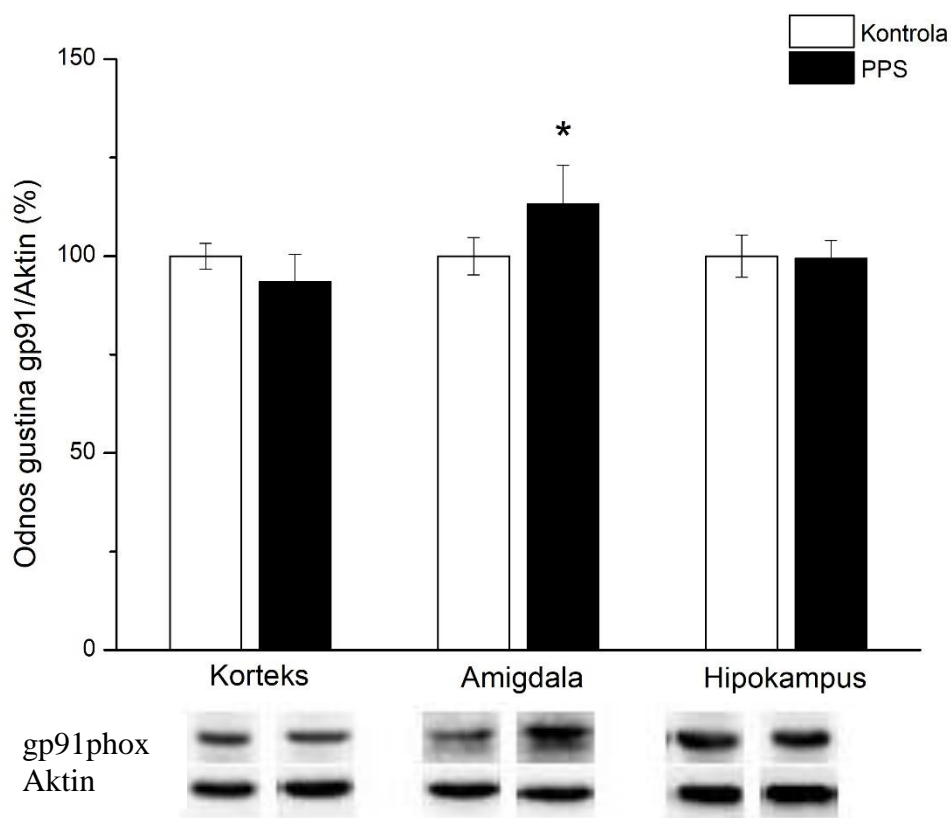
Tabela 1. Aktivnost enzima Kompleksa I i COX u neprečišćenoj mitohondrijalnoj frakciji korteksa, amigdale i hipokampusa u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M

	Kompleks I (U/mg proteina)		COX (U/mg proteina)	
	Kontrola	PPS	Kontrola	PPS
Korteks	17,72 \pm 2,81	30,78 \pm 2,96*	7,03 \pm 0,63	6,44 \pm 1,86
Amigdala	34,30 \pm 2,13	27,48 \pm 4,43	1,40 \pm 0,70	2,37 \pm 0,63
Hipokampus	28,50 \pm 3,07	23,16 \pm 2,57	5,34 \pm 1,72	4,08 \pm 1,01

*p<0.05 u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.9. Uticaj PPS stresora na ekspresiju gp91phox subjedinice NADPH oksidaze u mozgu pacova

Western blot tehnikom smo pokazali statistički značajno povišenu ekspresiju subjedinice gp91phox u amigdali mozga eksperimentalnih pacova u poređenju sa kontrolnim. U hipokampusu i korteksu nisu nađene statistički značajne razlike u ekspresiji gp91phox između PPS i kontrolne grupe. Grafikon 8 prikazuje nivoe ekspresije subjedinice gp91phox u ispitivanim moždanim regionima u PPS i kontrolnoj grupi.

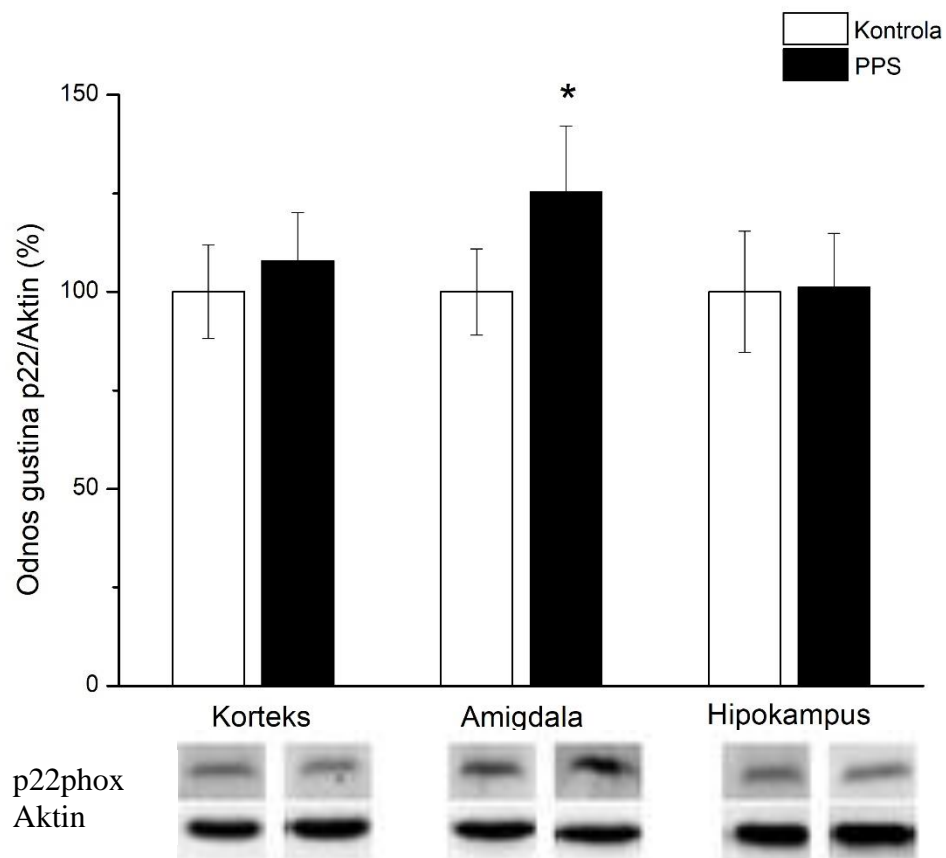


Grafikon 8. Ekspresija gp91phox subjedinice enzima NADPH oksidaze u korteksu, amigdali i hipokampusu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafikon dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.10. Uticaj PPS stresora na ekspresiju subjediniice p22phox NADPH oksidaze u mozgu pacova

Western blot tehnikom smo pokazali statistički značajno povišenu ekspresiju subjediniice p22phox u amigdali mozga eksperimentalnih pacova u poređenju sa kontrolnim. U hipokampusu i korteksu nisu nađene statistički značajne razlike u ekspresiji p22phox između PPS i kontrolne grupe. Grafikon 8 prikazuje nivoe ekspresije subjediniice p22phox u ispitivanim moždanim regionima u PPS i kontrolnoj grupi.

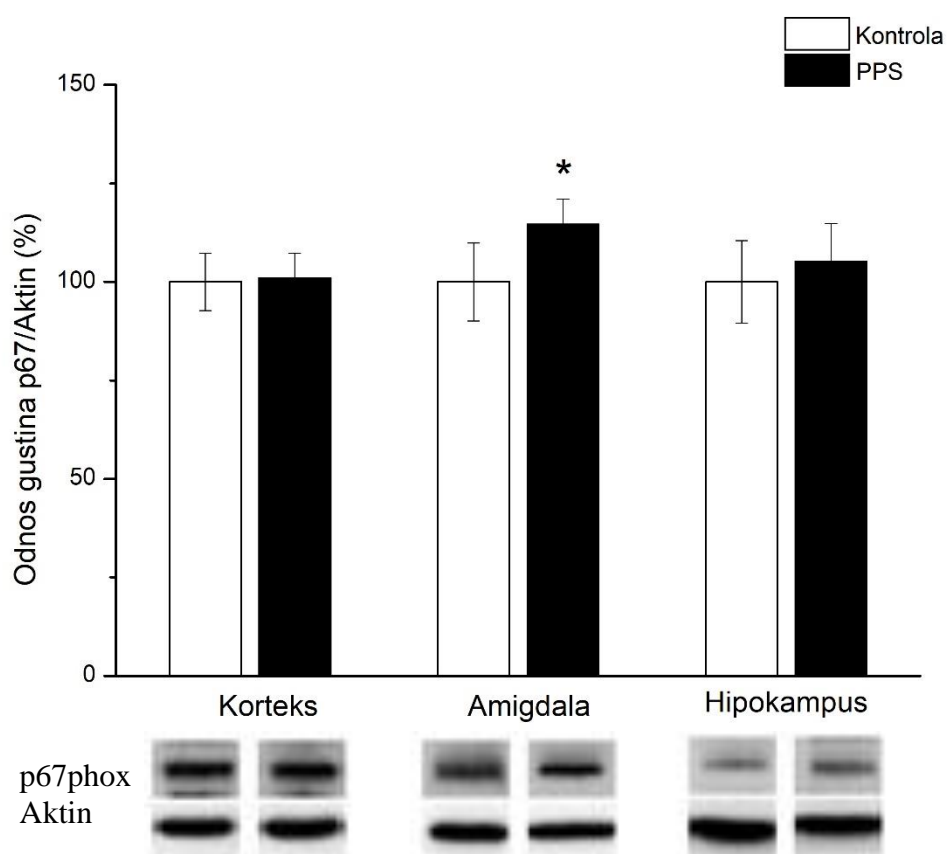


Grafikon 9. Ekspresija p22phox subjediniice enzima NADPH oksidaze u korteksu, amigdali i hipokampusu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafikon dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe.

4.11. Uticaj PPS stresora na ekspresiju p67phox subjedinice NADPH oksidaze u mozgu pacova

Western blot tehnikom smo pokazali statistički značajno povišenu ekspresiju subjedinice p67phox u amigdali mozga eksperimentalnih pacova u poređenju sa kontrolnim. U hipokampusu i korteksu nisu nađene statistički značajne razlike u ekspresiji p67phox između PPS i kontrolne grupe. Grafikon 8 prikazuje nivoe ekspresije subjedinice p67phox u ispitivanim moždanim regionima u PPS i kontrolnoj grupi.

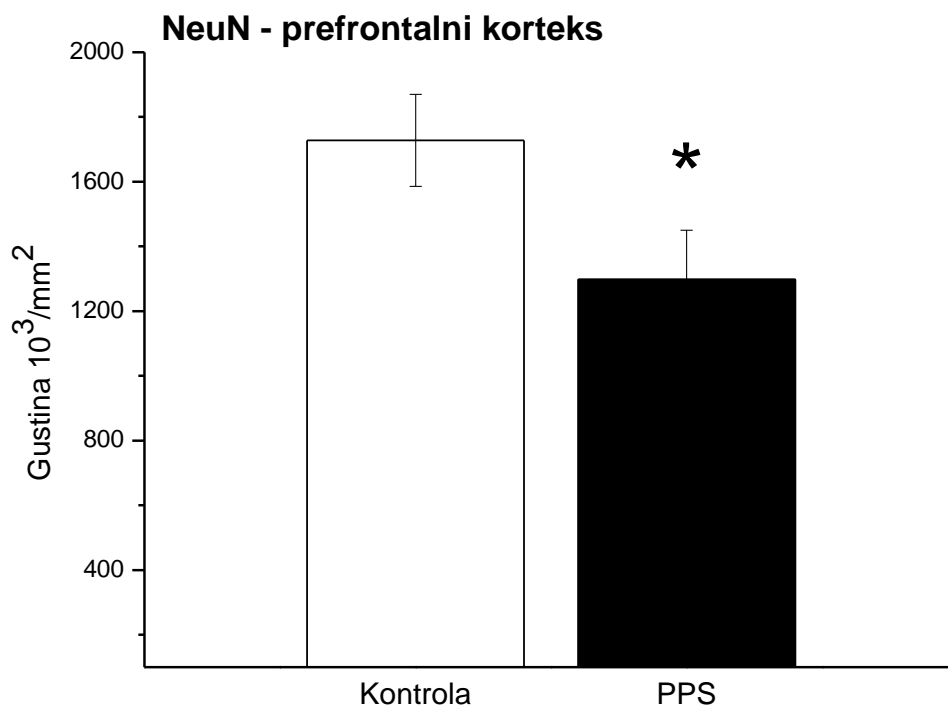


Grafikon 10. Ekspresija p67phox subjedinice enzima NADPH oksidaze u korteksu, amigdali i hipokampusu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi životinja (n=6). Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafikon dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ u odnosu na vrednost u odgovarajućoj strukturi kontrolne grupe

4.12.1. Uticaj PPS stresora na gustinu NeuN-imunopozitivnih neurona (NeuN+) u medijalnom prefrontalnom korteksu (mPFK) mozga pacova

Broj NeuN imunopozitivnih neurona je meren u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova na istoj udaljenosti od bregme. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka pokazano je da je broj NeuN+ neurona bio statistički značajno snižen u medijalnom prefrontalnom korteksu eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 11, slika 1).

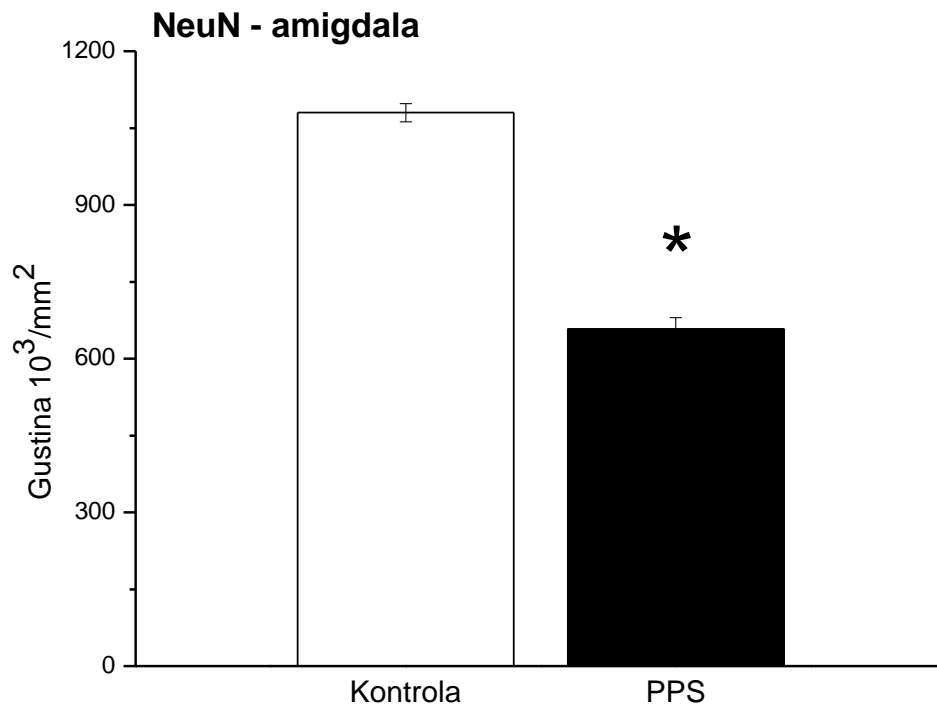


Grafikon 11. Gustina NeuN+ ćelija u medijalnom prefrontalnom korteksu u kontrolnoj ($n=6$) i eksperimentalnoj grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$

4.12.2. Uticaj PPS stresora na gustinu NeuN-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova

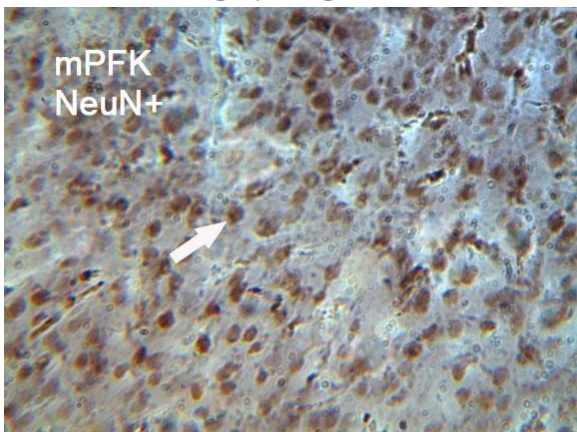
Broj NeuN imunopozitivnih neurona je meren u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka pokazano je da je broj NeuN+ neurona statistički značajno snižen u amigdaloidnom kompleksu eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 12, slika 2).



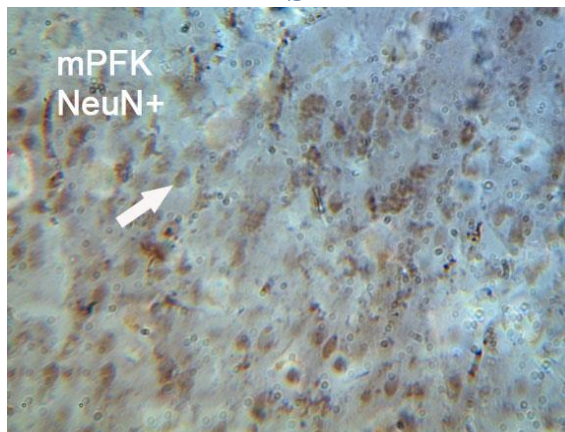
Grafikon 12. Gustina NeuN+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu u kontrolnoj ($n=6$) i eksperimentalnoj grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$

KONTROLA

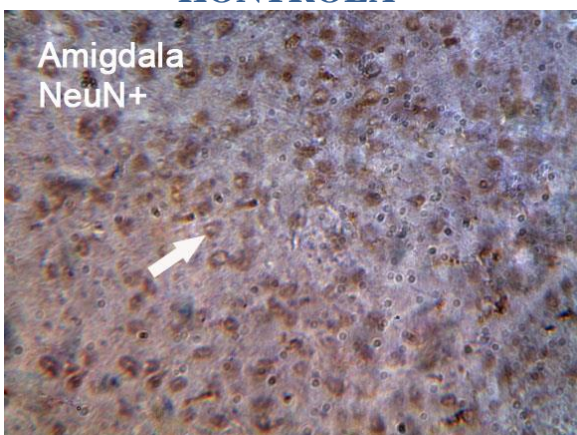


PPS

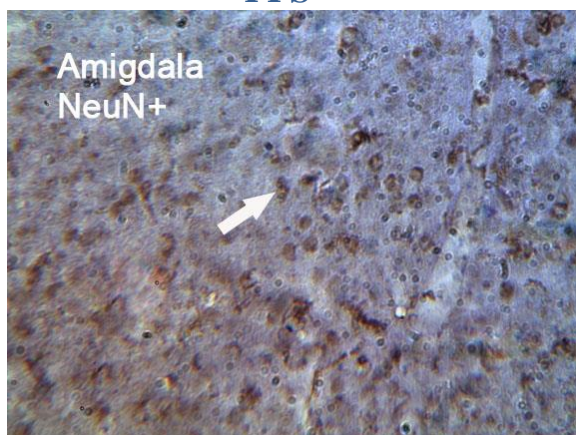


Slika 1. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine NeuN+ ćelija u mPFK kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x

KONTROLA



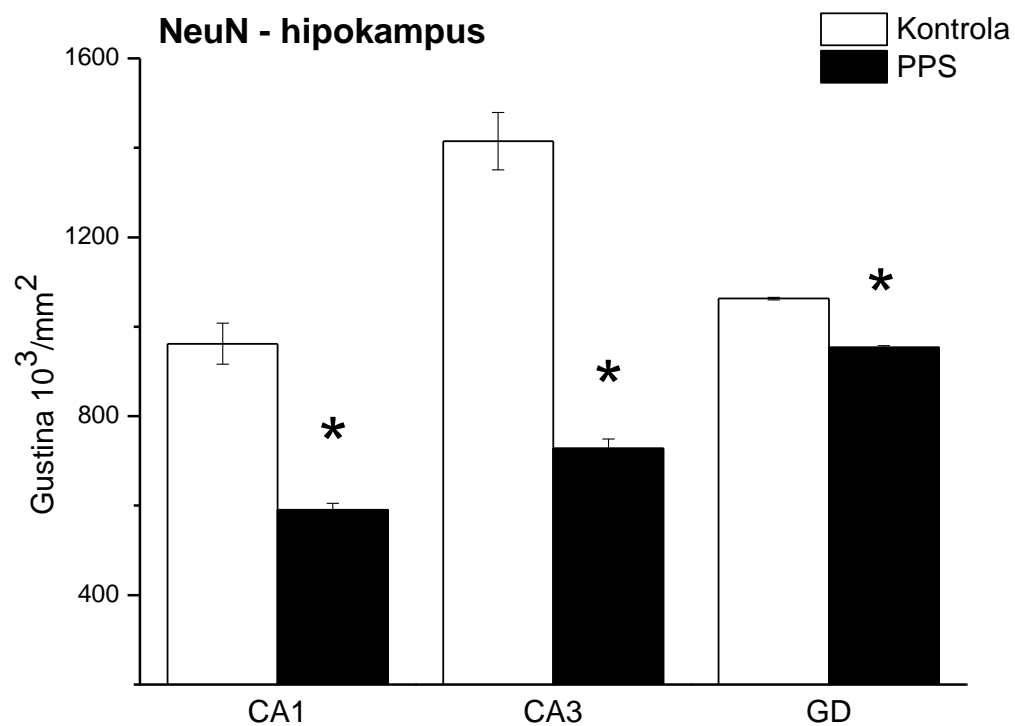
PPS



Slika 2. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine NeuN+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

4.12. 3. Uticaj PPS stresora na gustinu NeuN-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova

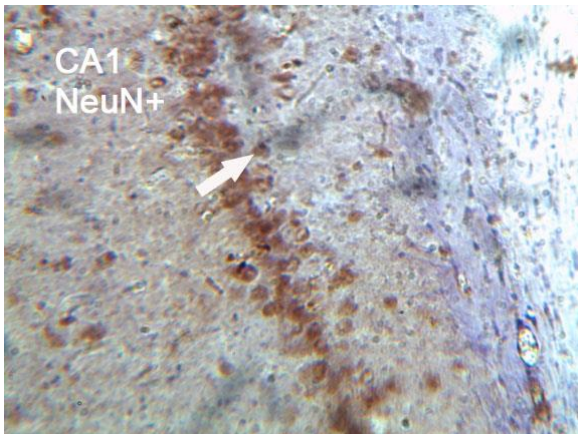
Broj NeuN imunopozitivnih neurona je meren hipokampusu i to u CA1, CA3 i girus dentatus (GD) subregionima. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka pokazano je da je broj NeuN+ neurona statistički značajno snižen u sva tri subregiona hipokampusa kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 13, slike 3a, 3b i 3c).



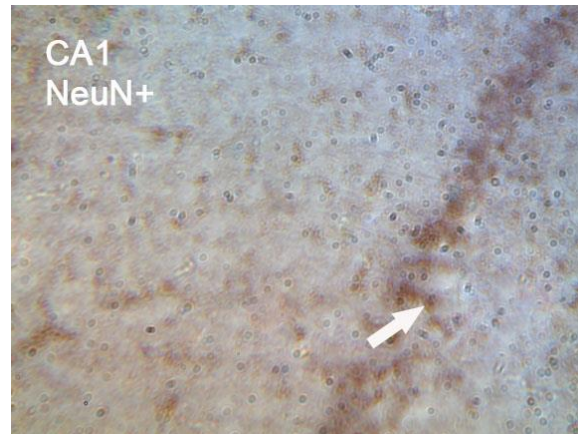
Grafikon 13. Gustina NeuN+ ćelija u CA1, CA3 i GD subregionima hipokampusa u kontrolnoj ($n=6$) i eksperimentalnoj grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$

KONTROLA

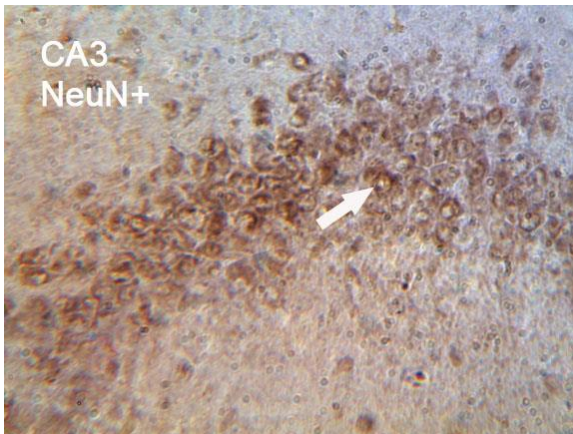


PPS

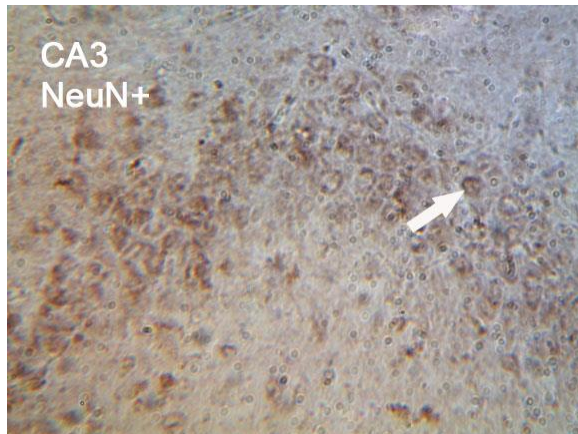


Slika 3a. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine NeuN+ ćelija u CA1 subregionu hipokampusu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA

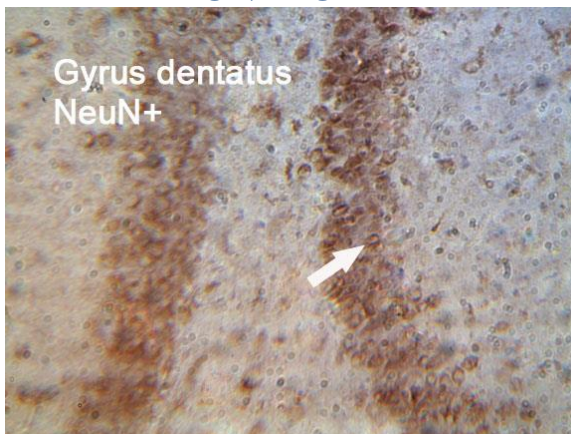


PPS

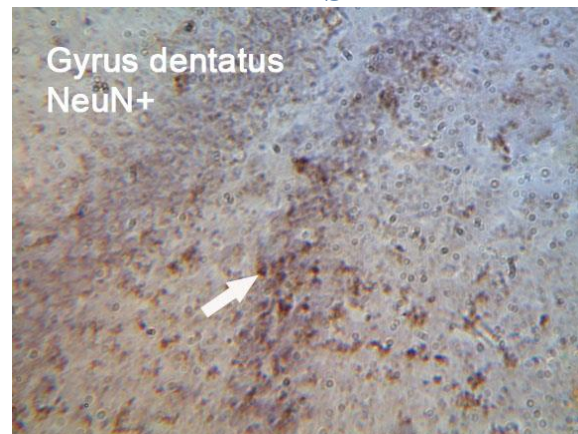


Slika 3b. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine NeuN+ ćelija u CA3 subregionu hipokampusu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA



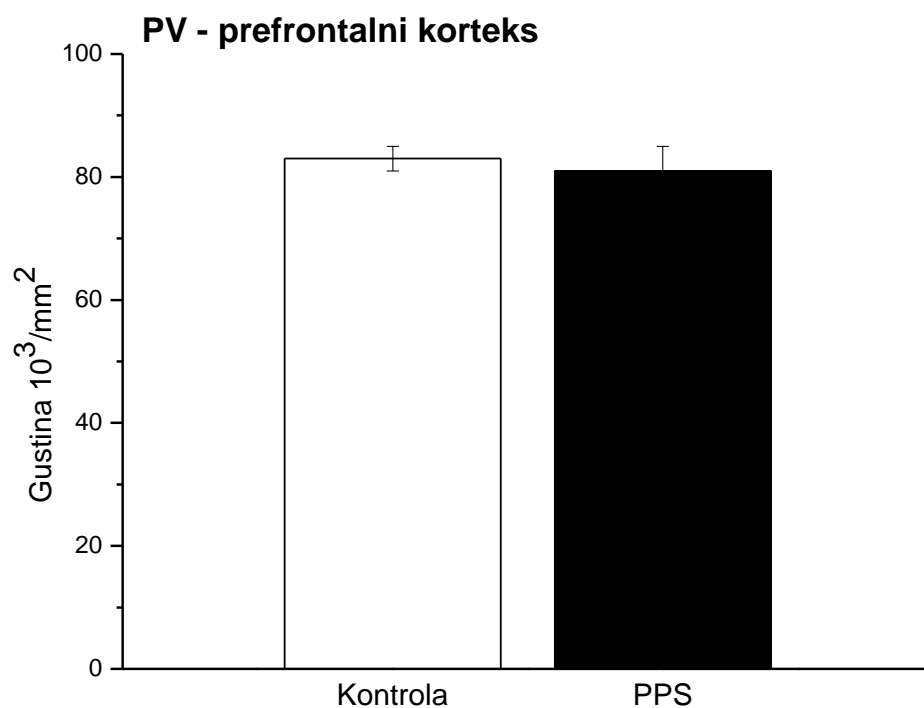
PPS



Slika 3c. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine NeuN+ ćelija u girus dentatusu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

4.13.1. Uticaj PPS stresora na gustinu parvalbumin-imunopozitivnih (PV+) neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova

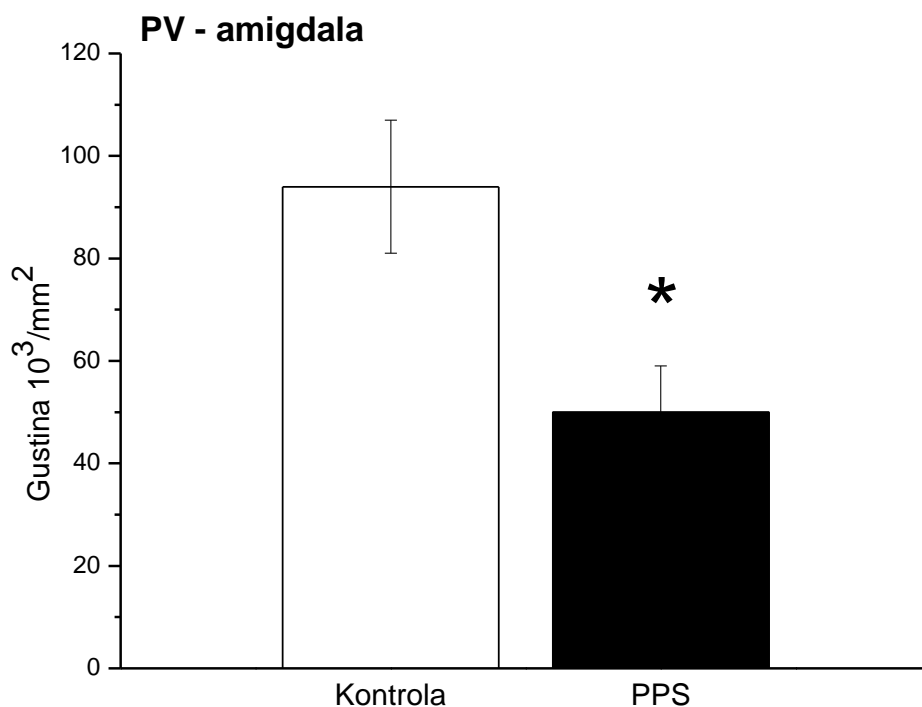
Broj parvalbumin pozitivnih interneurona je meren u medijalnom prefrontalnom korteksu na istoj udaljenosti od bregme. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna zalika između broja PV+ interneurona kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 14, slika 4).



Grafikon 14. Gustina PV+ ćelija u mPFK u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

4.13. 2. Uticaj PPS stresora na gustinu parvalbumin-imunopozitivnih interneurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova

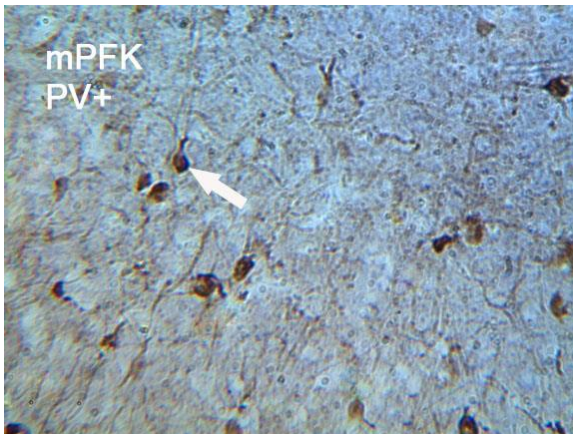
Gustina PV⁺ interneurona je određivana u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka pokazano je da je broj PV⁺ interneurona statistički značajno niži u amigdaloidnom kompleksu PPS pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 15, slika 5).



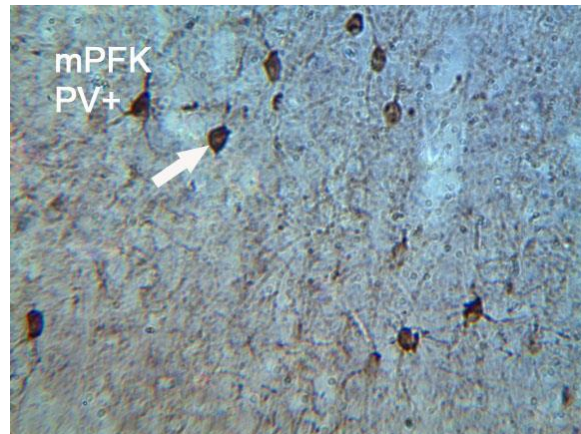
Grafikon 15. Gustina PV⁺ ćelija u amigdaloidnom kompleksu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$

KONTROLA

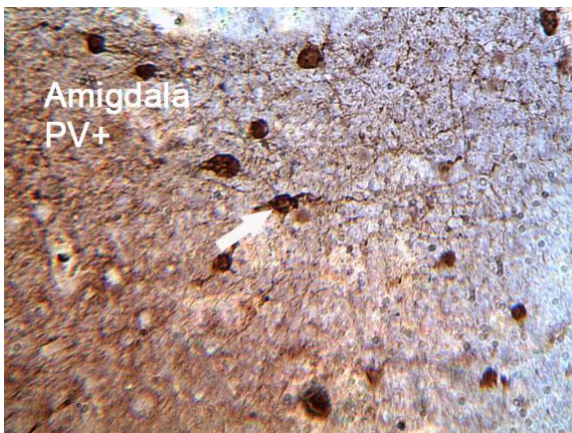


PPS

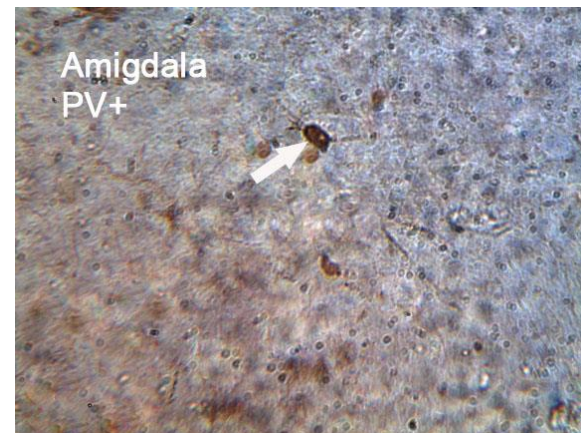


Slika 4. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine PV+ ćelija u mPFK kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA



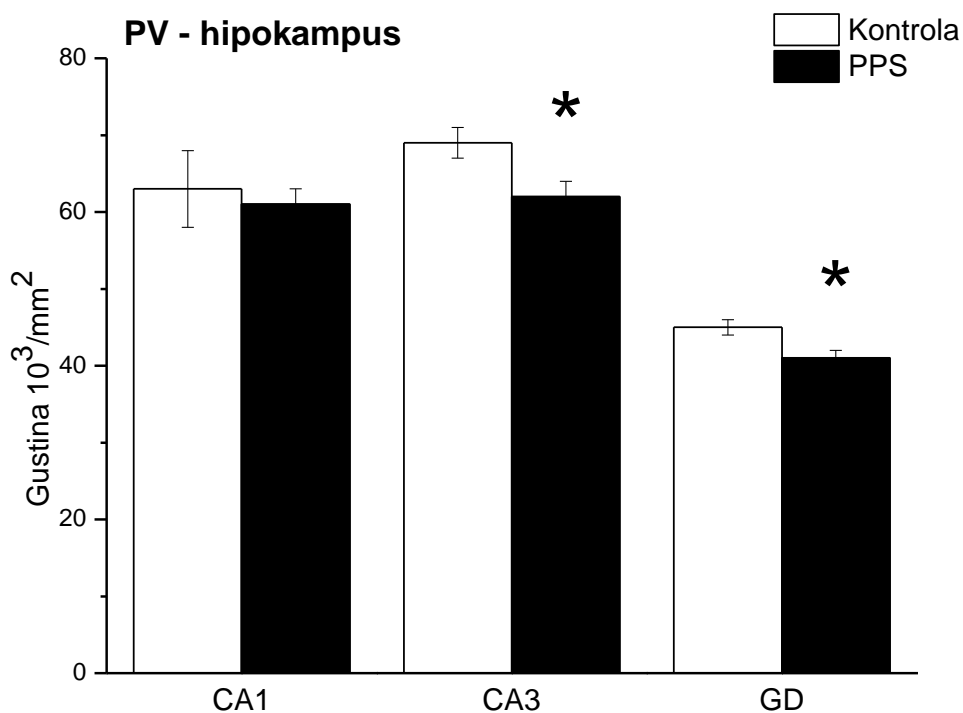
PPS



Slika 5. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine PV+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

4.13. 3. Uticaj PPS stresora na gustinu PV-imunopozitivnih interneurona u hipokampusu mozga pacova

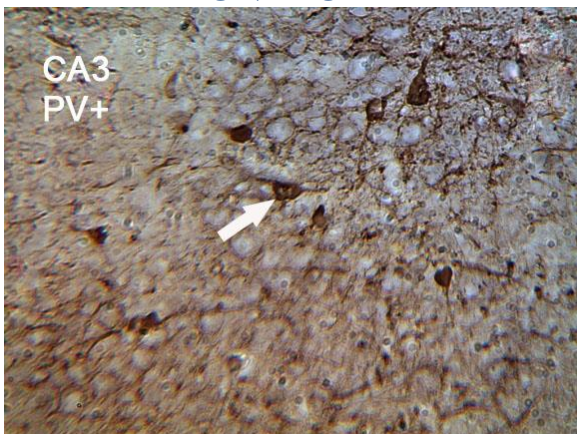
Broj PV+ interneurona je meren u hipokampusu i to u CA1, CA3 i girus dentatus (GD) subregionima. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naše istraživanje je pokazalo je da je broj PV+ interneurona statistički značajno snižen u CA3 i GD subregionu ($p < 0.05$), dok u CA1 regionu nema statistički značajne razlike kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$) (grafikon 16, slike 6a i 6b).



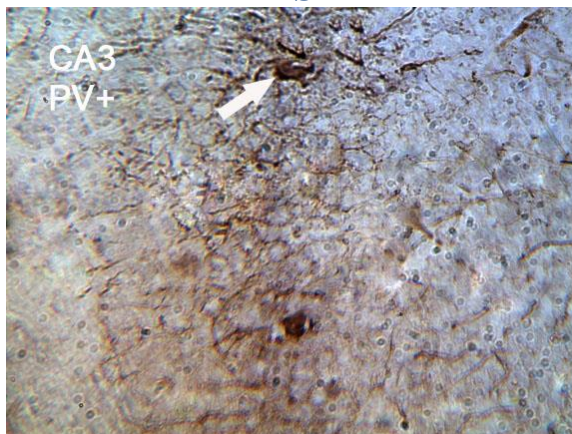
Grafikon 16. Gustina PV+ ćelija u CA1, CA3 i GD subregionima hipokampusu u kontrolnoj ($n=6$) i PPS grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$

KONTROLA

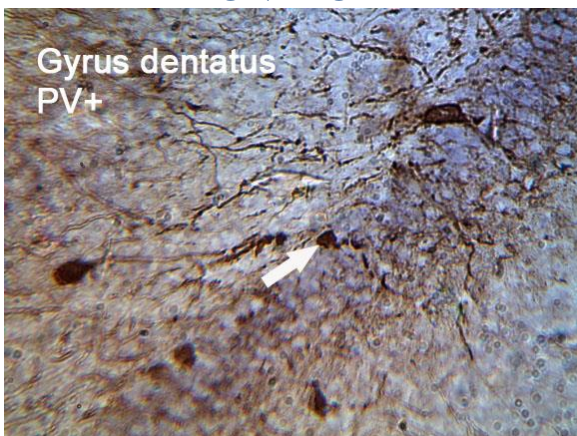


PPS



Slika 6a. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine PV+ ćelija u CA3 subregionu hipokampusu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA



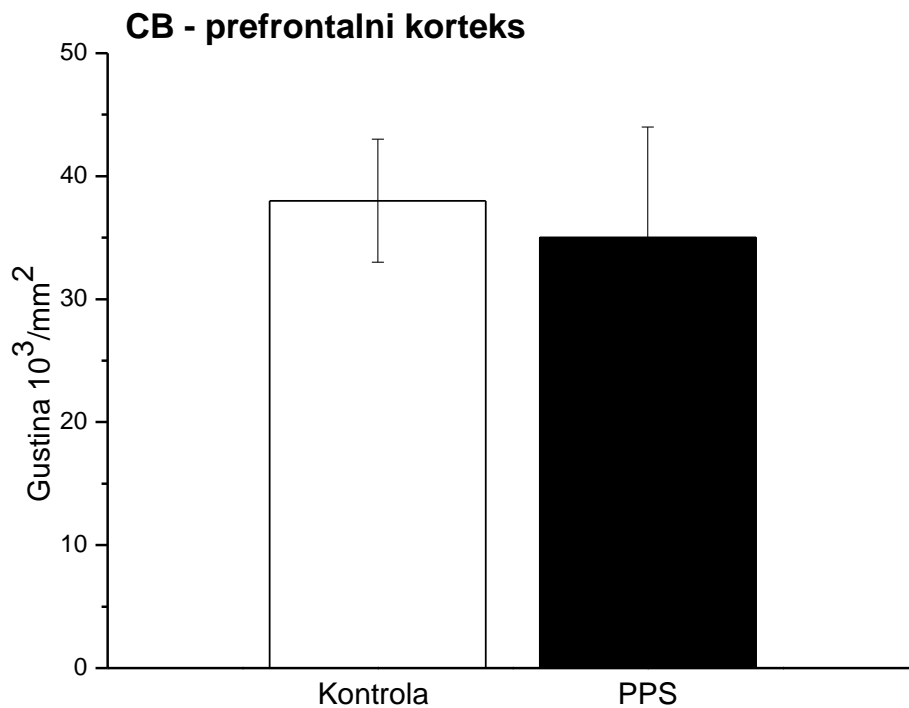
PPS



Slika 6b. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine PV+ ćelija u girus dentatusu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

4.14.1. Uticaj PPS stresora na gustinu kalbindin-imunopozitivnih (CB+) neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova

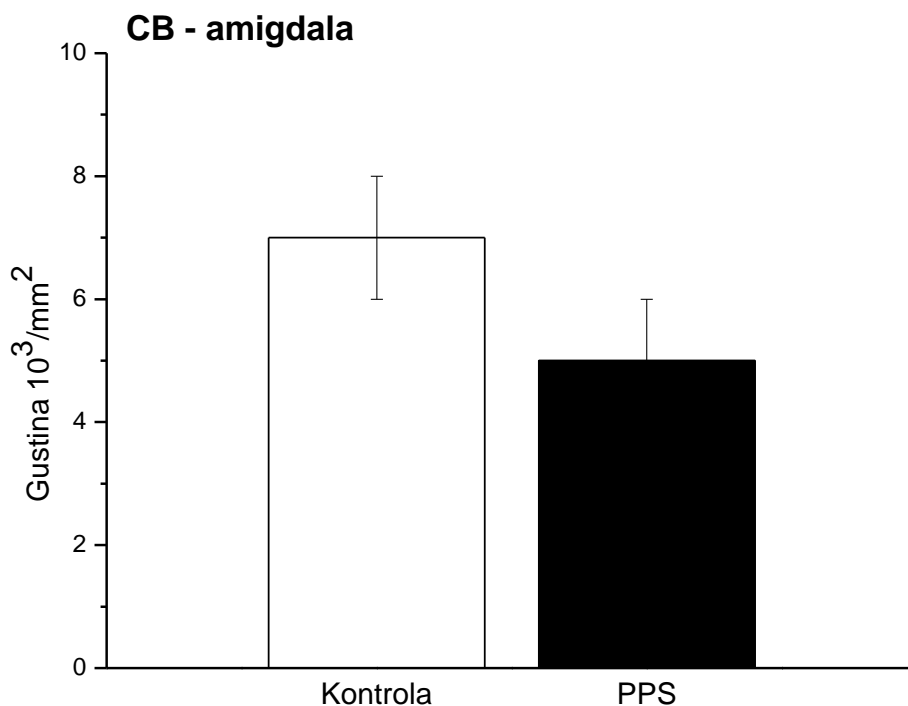
Broj CB+ interneurona je meren u medijalnom prefrontalnom korteksu na istoj udaljenosti od bregme. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika između broja CB+ interneurona kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$) (grafikon 17, slika 7).



Grafikon 17. Gustina CB+ ćelija u mPFK u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

4.14.2. Uticaj PPS stresora na gustinu kalbindin-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova

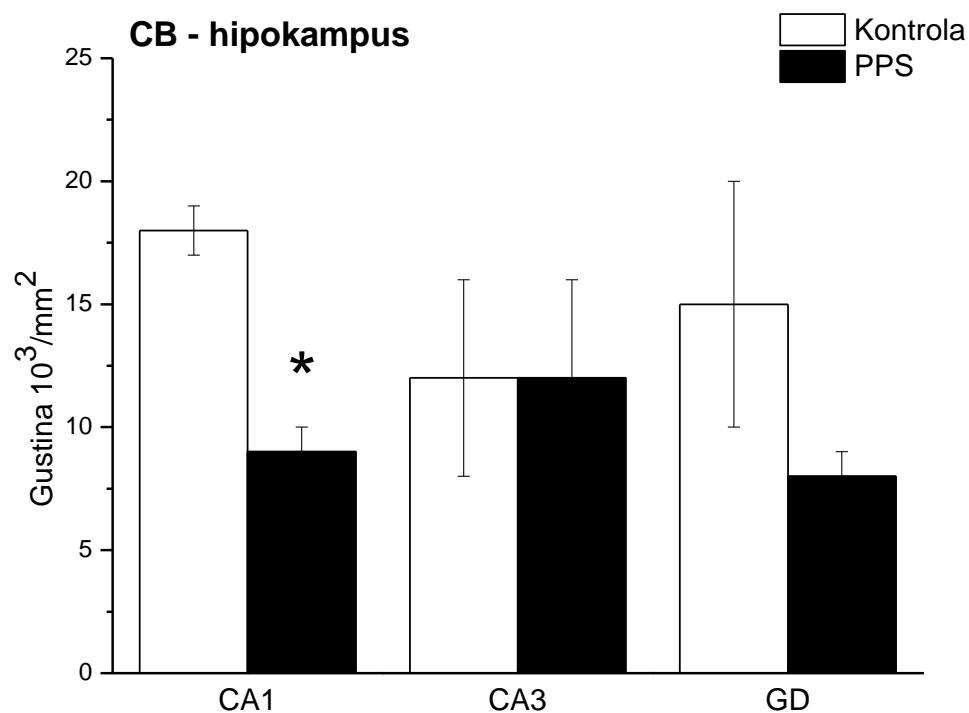
Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razika između broja CB+ interneurona u amigdaloidnom kompleksu kod PPS pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$) (grafikon 18, slika 8).



Grafikon 18. Gustina CB+ ćelija amigdaloidnom kompleksu u kontrolnoj ($n=6$) i eksperimentalnoj grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

4.14.3. Uticaj PPS stresora na gustinu kalbindin-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova

Broj CB+ ćelija je meren u hipokampusu i to u CA1, CA3 i GD subregionima Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da u CA1 subregionu postoji statistički značajna razlika u broju CB+ ćelija ($p < 0.05$), dok u CA3 i GD subregionima ne postoji statistički značajna razlika između broja CB+ ćelija kod PPS pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$), (grafikon 19, slika 9).

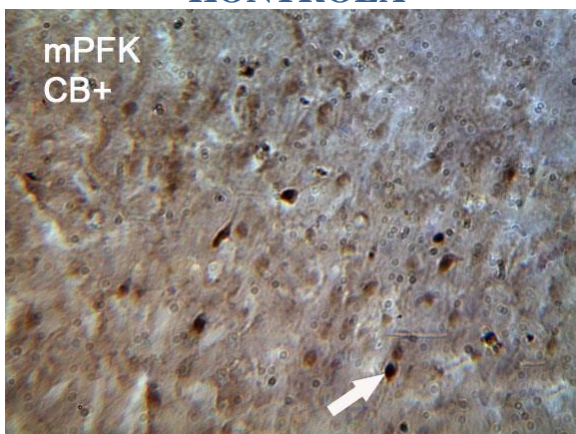


Grafikon 19. Gustina CB+ ćelija u kontrolnoj i (n=6) eksperimentalnoj grupi (n=6).

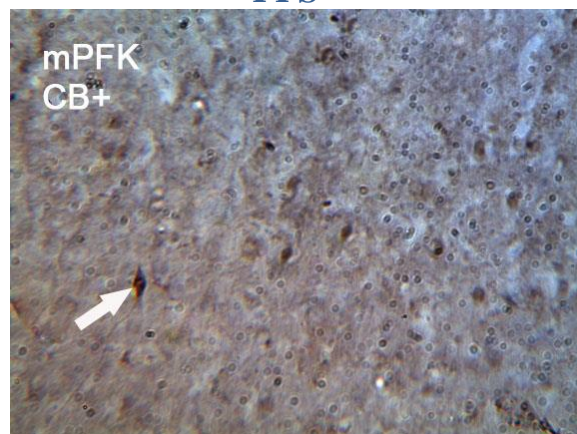
Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$

KONTROLA

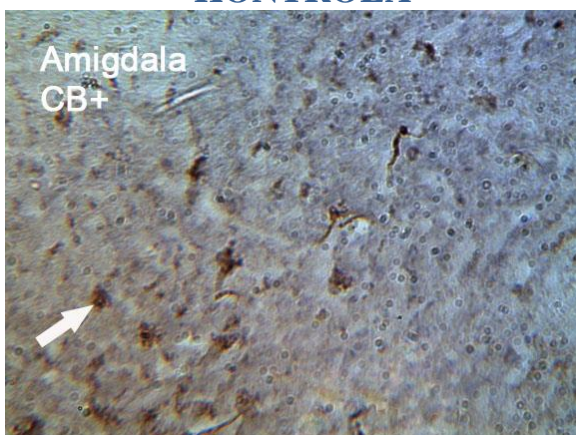


PPS

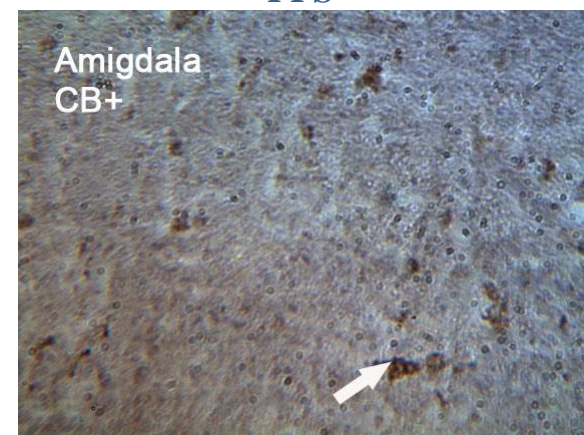


Slika 7. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine CB+ ćelija u mPFC kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA

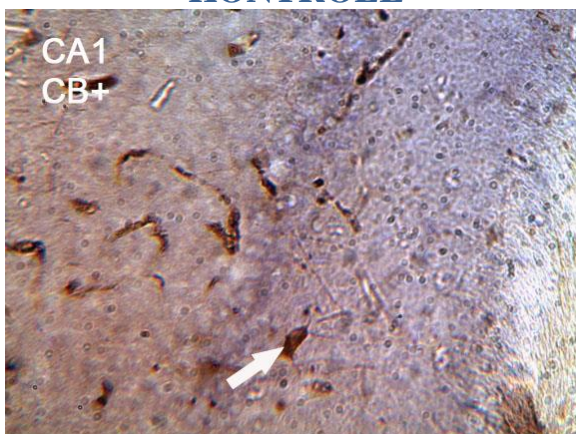


PPS

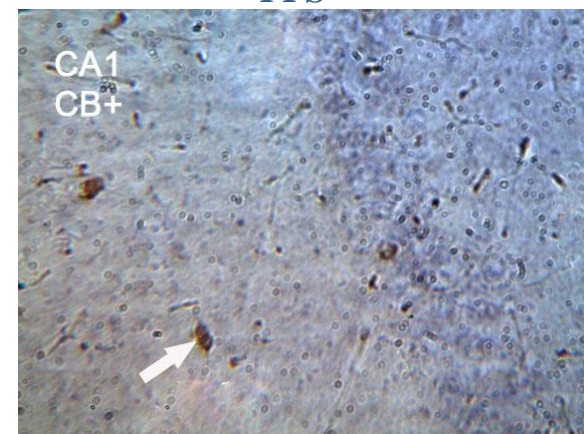


Slika 8. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine CB+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLE



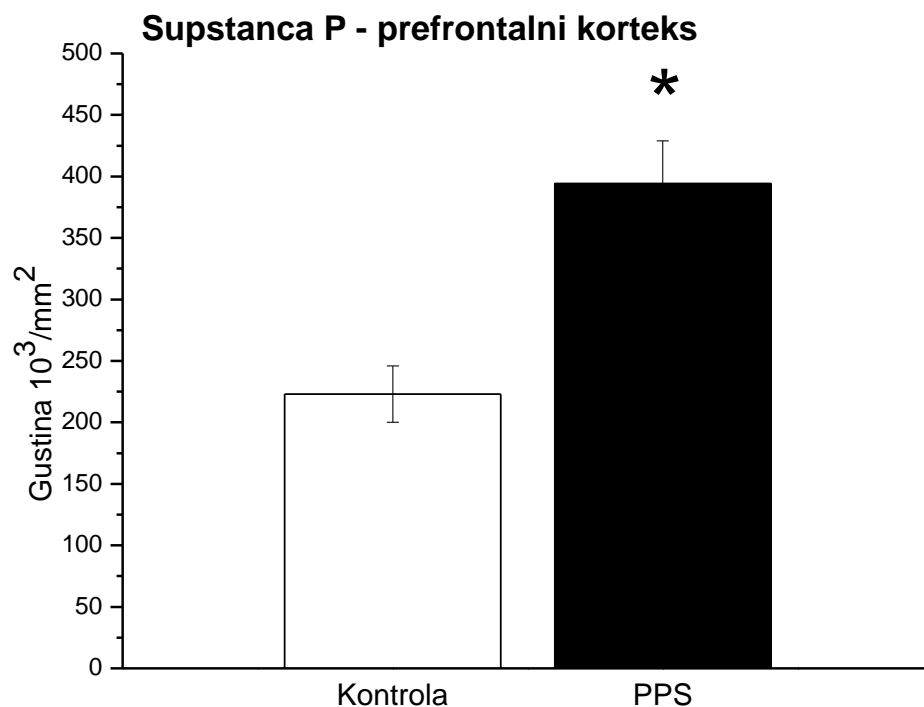
PPS



Slika 9. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine CB+ neurona u CA1 subregionu hipokampusa kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

4.15.1. Uticaj PPS stresora na gustinu supstance P-imunopozitivnih neurona (SP+) u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova

Broj SP+ neurona je meren u medijalnom prefrontalnom korteksu na istoj udaljenosti od bregme. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da postoji statistički značajno povećanje broja SP+ neurona u mPFK kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 20, slika 10).

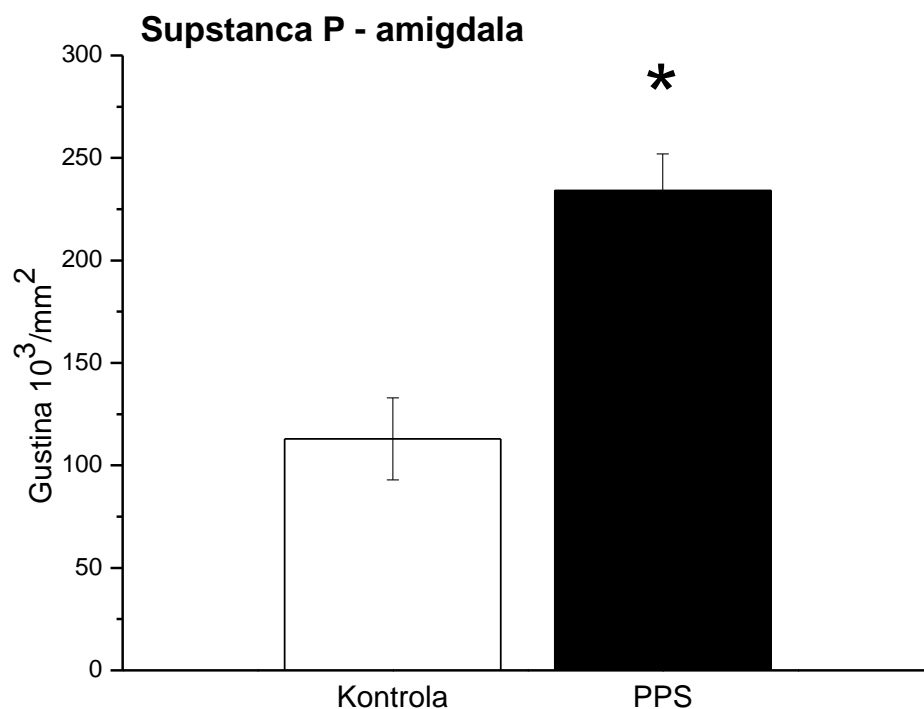


Grafikon 20. Gustina SP+ ćelija u mPFK u kontrolnoj ($n=6$) i eksperimentalnoj grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

* $p < 0.05$

4.15.2. Uticaj PPS stresora na gustinu supstancu P-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova

Broj SP+ neurona je određivan u amigdaloidnom kompleksu. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da postoji statistički značajno povećanje broja SP+ neurona u amigdaloidnom kompleksu kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 21, slika 11).

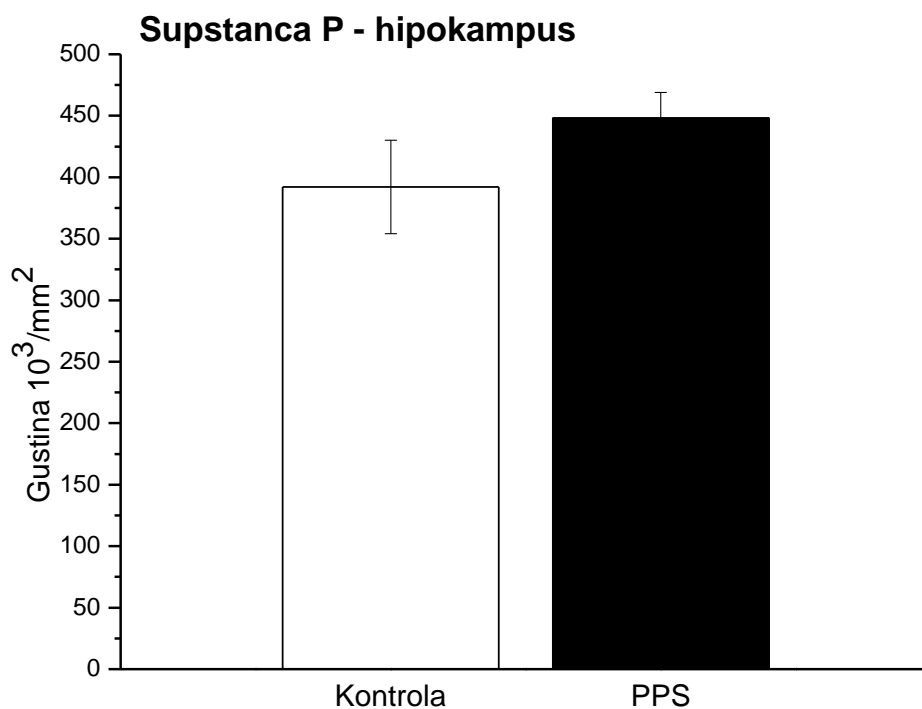


Grafikon 21. Gustina SP+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M

* $p < 0.05$

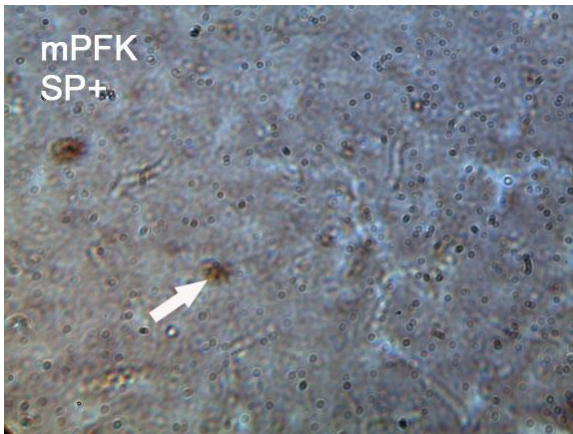
4.15.3. Uticaj PPS stresora na gustinu supstanca P-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova

Broj SP+ neurona je meren u CA1, CA3, GD subregionu. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika broja SP+ neurona u sva tri subregiona hipokampusu kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$). Gustina hipokampalnih SP+ neurona je grafički prikazana objedinjeno (grafikon 22, slika 12).

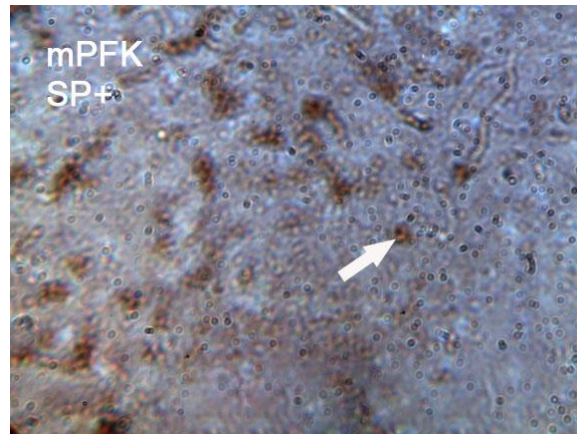


Grafikon 22. Gustina SP+ ćelija u hipokampusu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.

KONTROLA

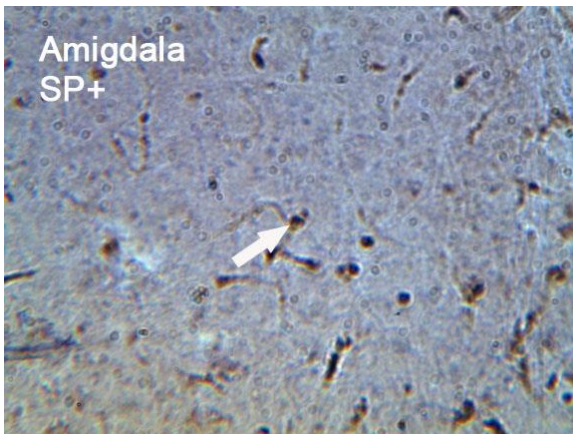


PPS

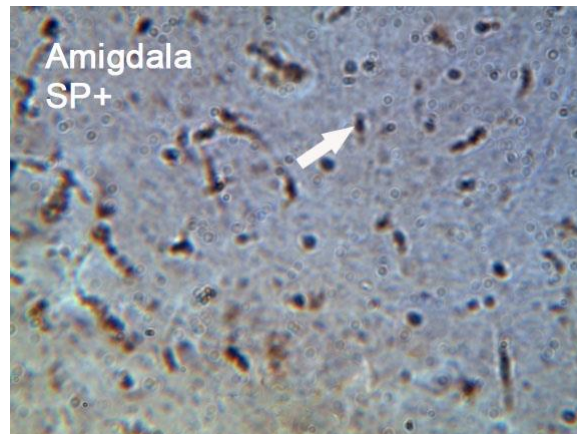


Slika 10. Reprezentativni imunohistochemijski prikaz gustine SP+ ćelija u mPFC kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA

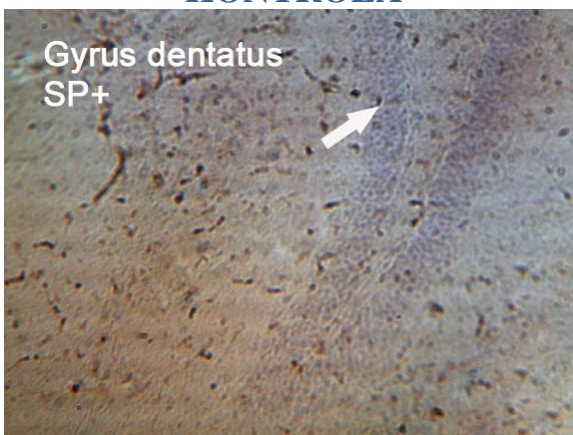


PPS



Slika 11. Reprezentativni imunohistochemijski prikaz gustine SP+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA



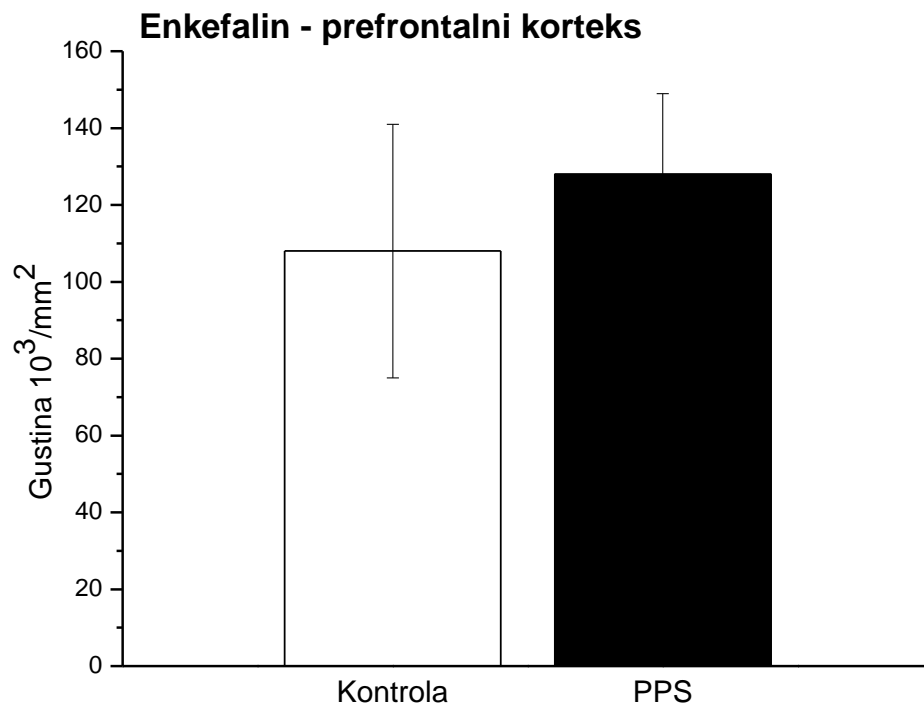
PPS



Slika 12. Reprezentativni imunohistochemijski prikaz gustine SP+ ćelija u girus dentatusu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 100x.

4.16.1. Uticaj PPS stresora na gustinu enkefalin-imunopozitivnih (ENK+) neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova

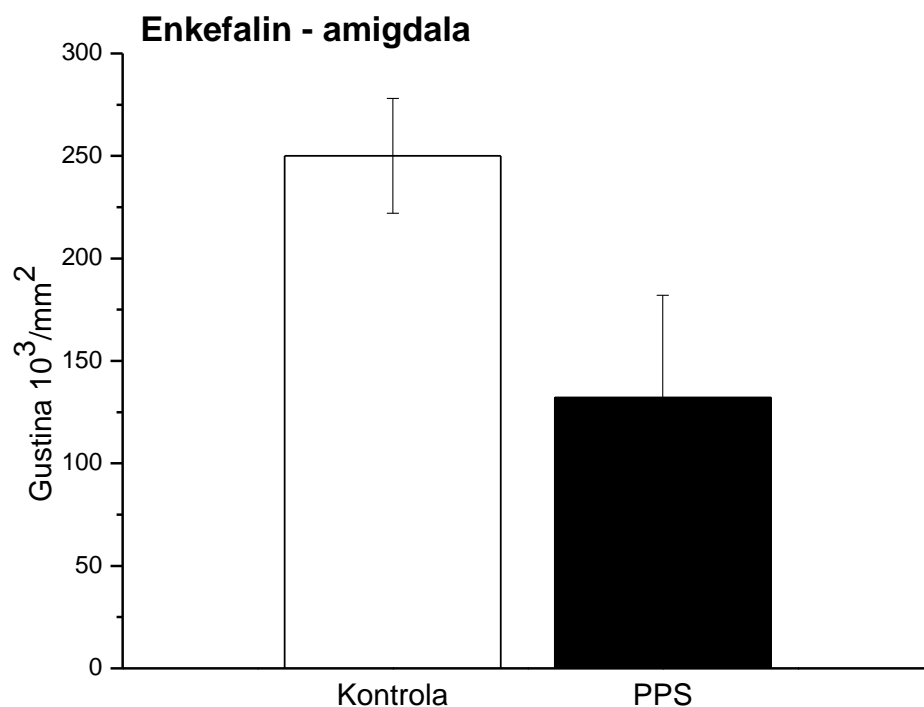
Broj ENK+ neurona je meren u medijalnom prefrontalnom korteksu na istoj udaljenosti od bregme. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u broju ENK+ ćelija u mPFK kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$) (grafikon 23, slika 13).



Grafikon 23. Gustina ENK+ ćelija u medijalnoj prefrontalnoj kori u kontrolnoj ($n=6$) i PPS grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M

4.16.2. Uticaj PPS stresora na gustinu enkefalin-imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu mozga pacova

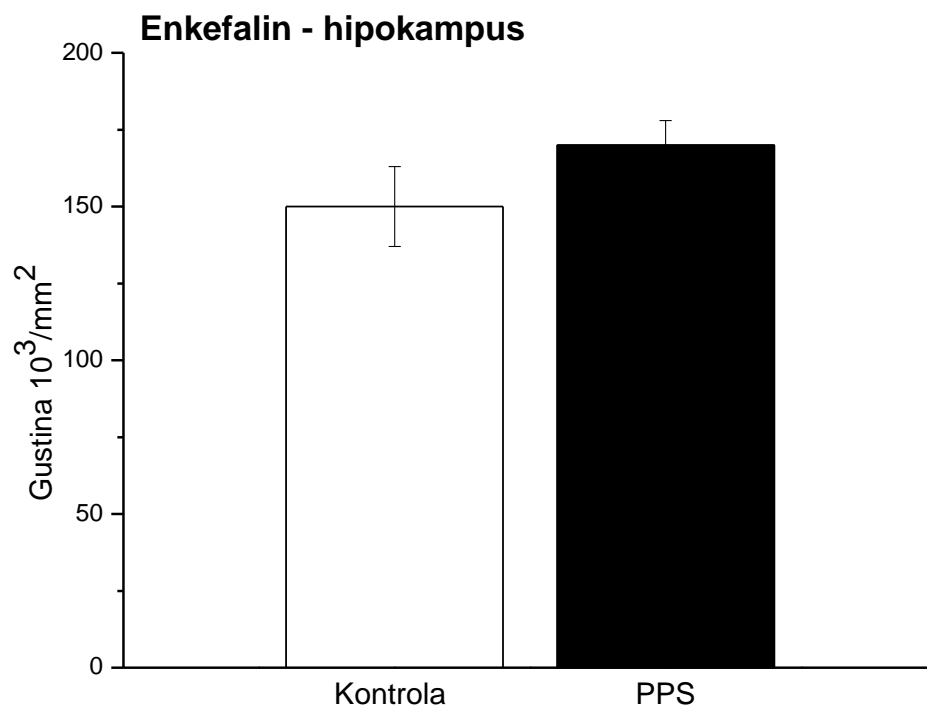
Broj ENK+ neurona je meren u amigdaloidnom kompleksu. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u broju ENK+ neurona u amigdaloidnom kompleksu kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$) (grafikon 24, slika 14).



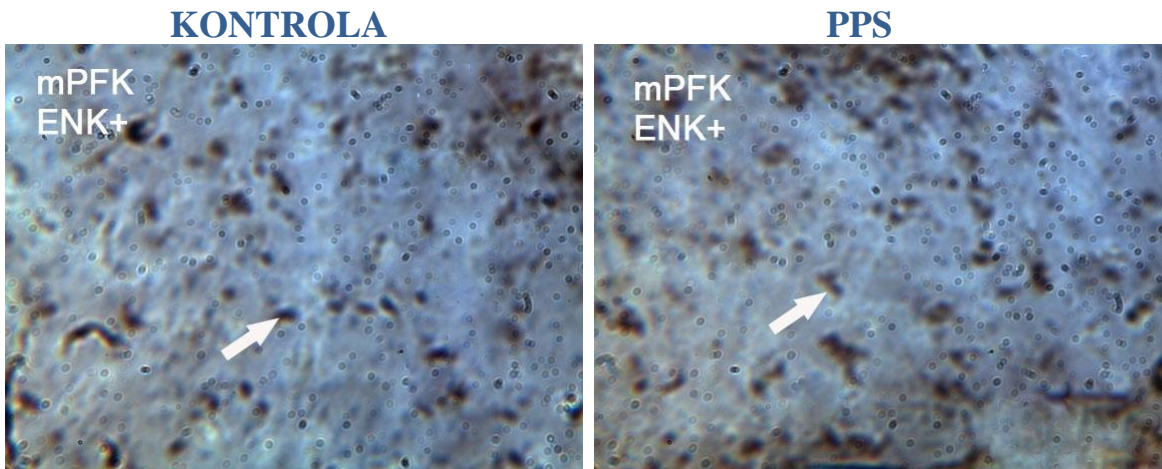
Grafikon 24. Gustina ENK+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu u kontrolnoj ($n=6$) i PPS grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M

4.16.3. Uticaj PPS stresora na gustinu enkefalin-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova

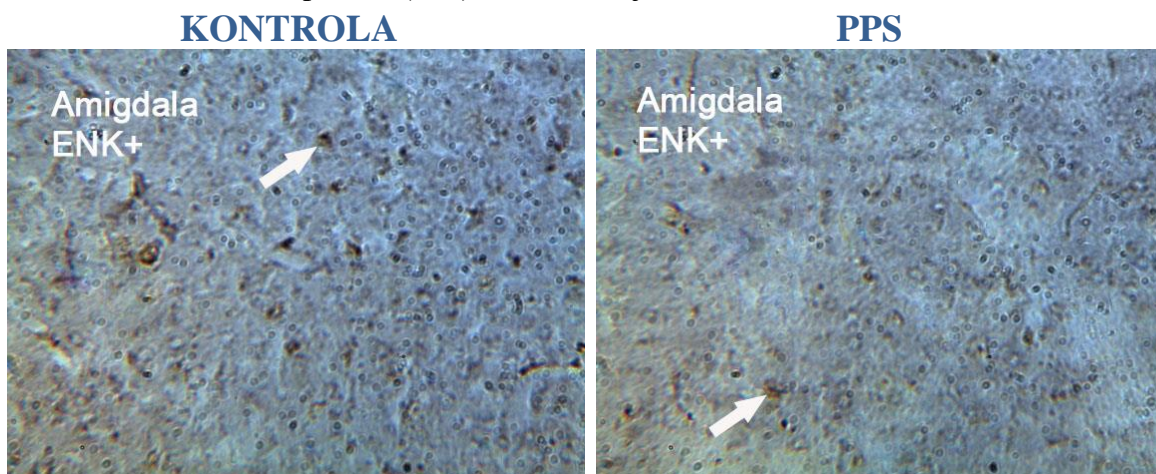
Broj ENK+ neurona je meren u CA1, CA3, GD subregionu. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika broja ENK+ neurona u sva tri subregiona hipokampusu kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$). Gustina hipokampalnih ENK+ neurona je grafički prikazana objedinjeno (grafikon 25, slika 15).



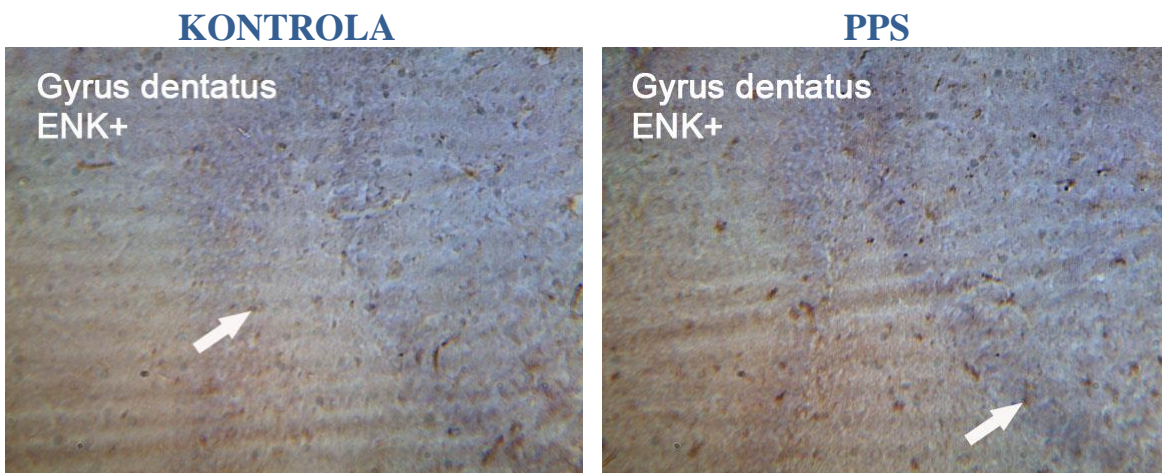
Grafikon 25. Gustina ENK+ u hipokampusu u kontrolnoj (n=6) i PPS grupi (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M.



Slika 13. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine ENK+ ćelija u mPFK kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.



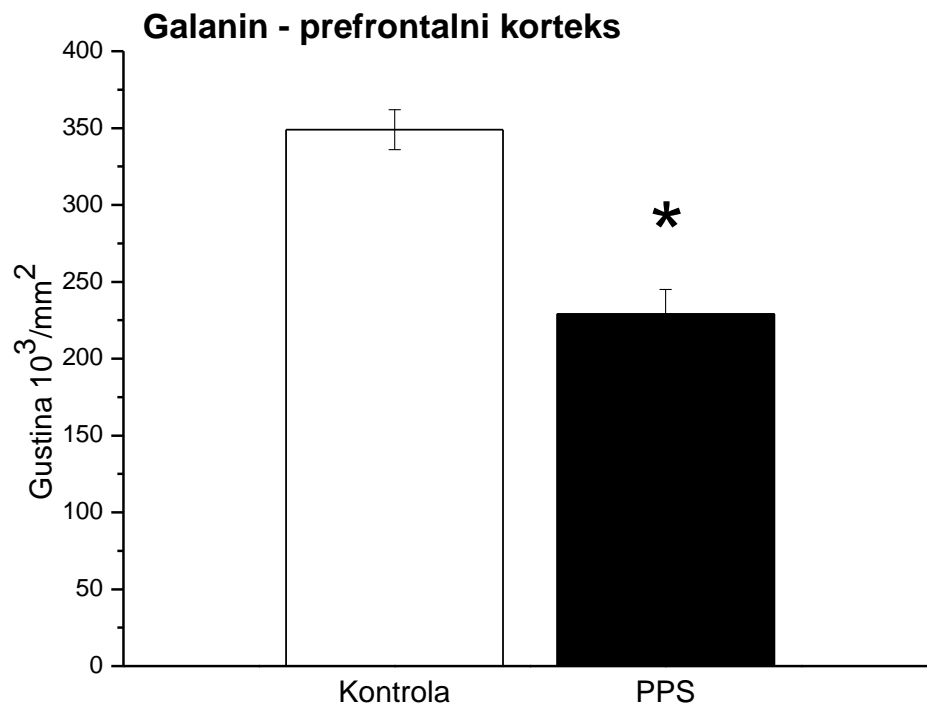
Slika 14. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine ENK+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.



Slika 15. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine ENK+ ćelija u girus dentatusu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 100x.

4.17.1. Uticaj PPS stresora na gustinu galanin-imunopozitivnih neurona (GAL+) u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga pacova

Broj GAL+ neurona je meren u medijalnom prefrontalnom korteksu na istoj udaljenosti od bregme. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da postoji statistički značajno smanjenje broja GAL+ neurona u mPFK kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 26, slika 16).

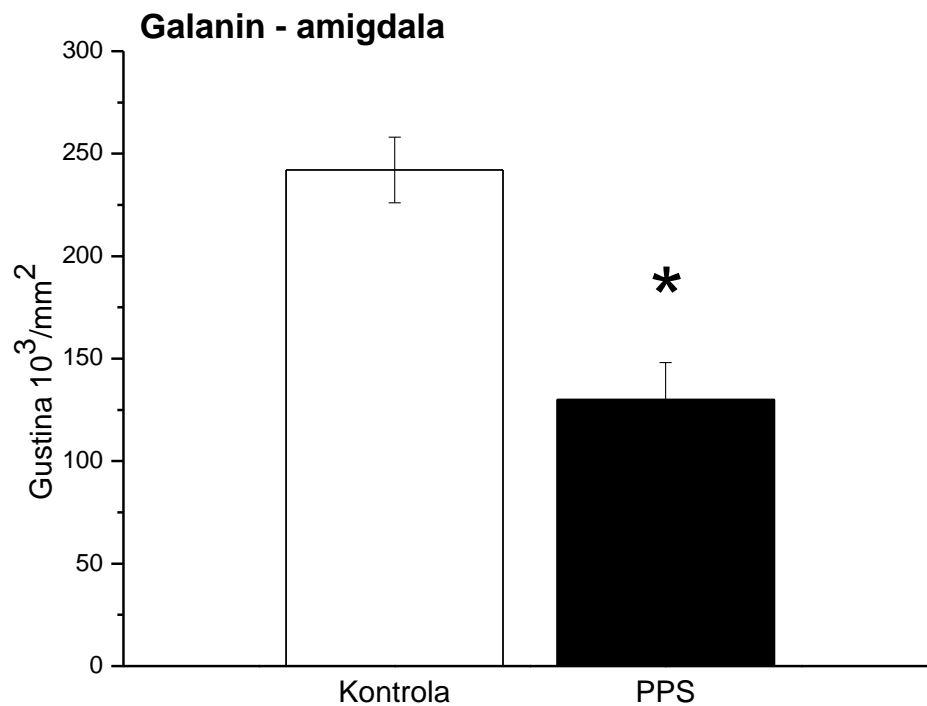


Grafikon 26. Gustina GAL+ ćelija u mPFK u kontrolnoj ($n=6$) i eksperimentalnoj grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M

* $p < 0.05$

4.17.2. Uticaj PPS stresora na gustinu galanin-imunopozitivnih neurona u amigdalooidnom kompleksu mozga pacova

Broj GAL+ neurona je meren u amigdalooidnom kompleksu. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da postoji statistički značajno smanjenje broja GAL+ neurona u amigdalooidnom kompleksu kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p < 0.05$) (grafikon 27, slika 17).

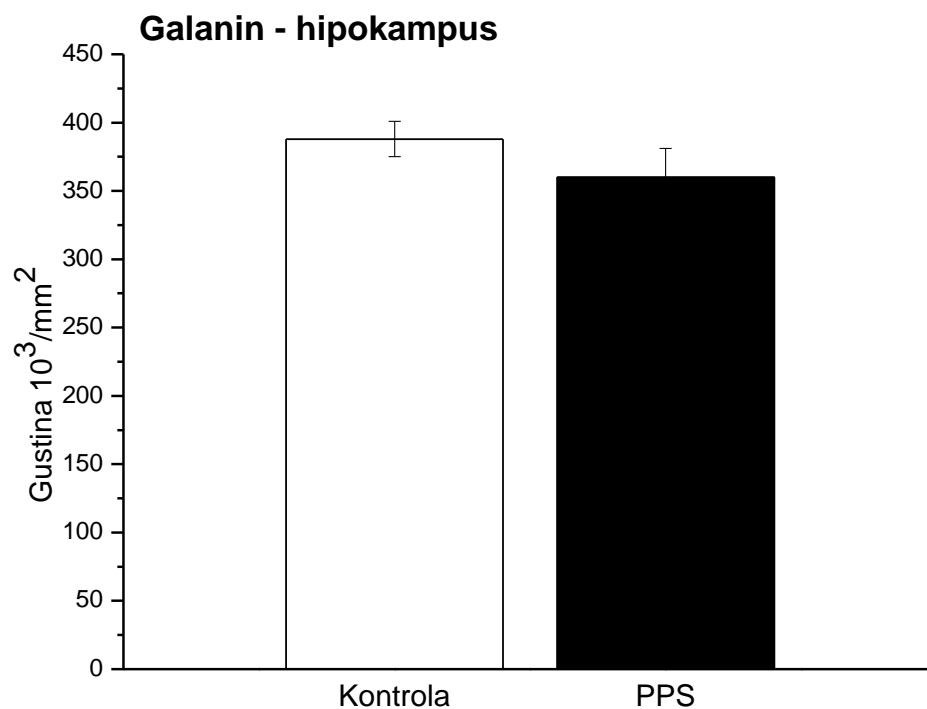


Grafikon 27. Gustina GAL+ ćelija u amigdalooidnom kompleksu u kontrolnoj (n=6) i eksperimentalnoj grupi (n=6). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M

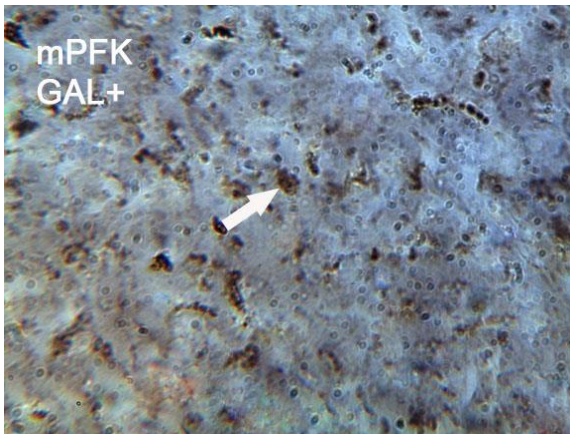
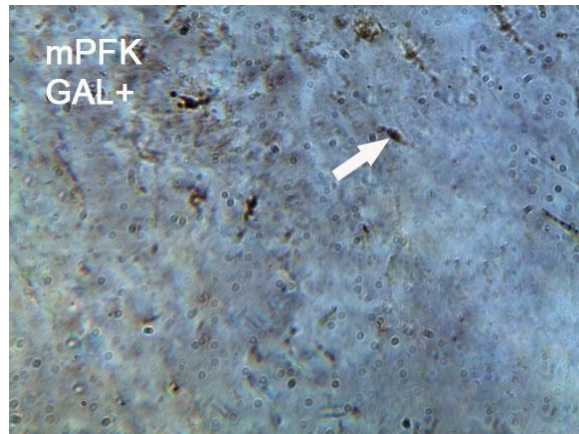
* $p < 0.05$

4.17.3. Uticaj PPS stresora na gustinu galanin-imunopozitivnih neurona u hipokampusu mozga pacova

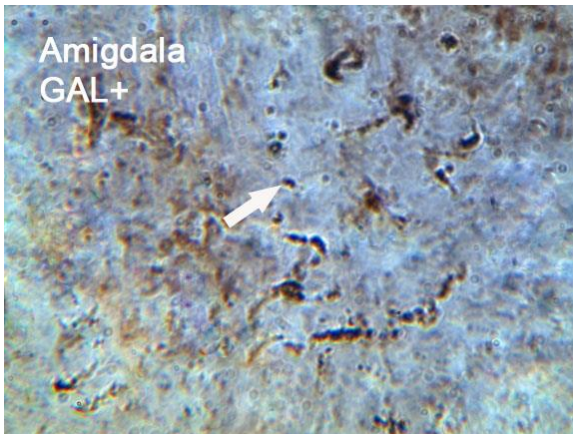
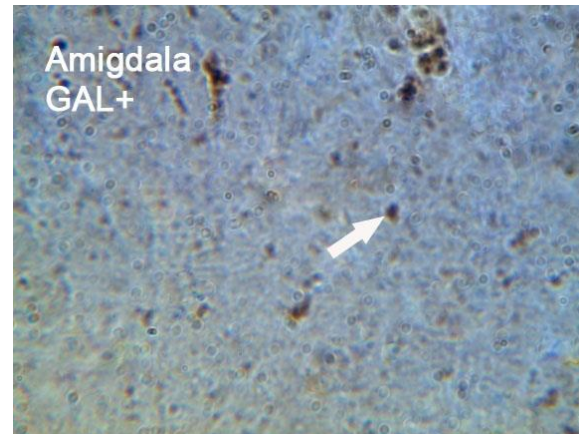
Broj GAL+ neurona je meren u CA1, CA3, GD subregionu. Statističkom analizom korišćenjem T testa za dva nezavisna uzorka, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u broju GAL+ neurona u sva tri subregiona hipokampusu kod eksperimentalnih pacova u odnosu na kontrolne ($p > 0.05$). Gustina hipokampalnih GAL+ neurona je grafički prikazana objedinjeno (grafikon 28, slika 18).



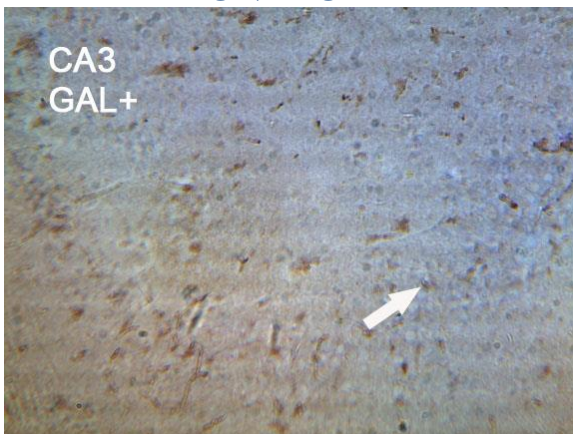
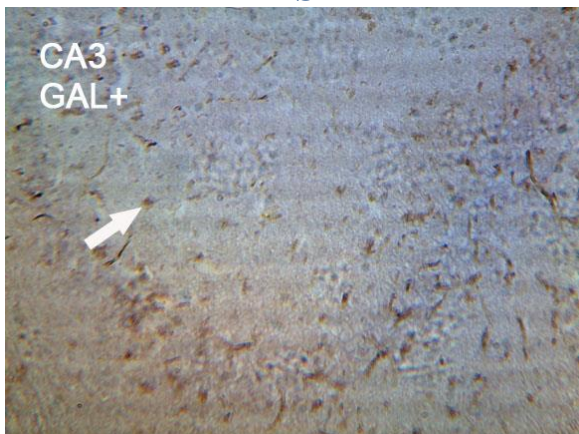
Grafikon 28. Gustina GAL+ ćelija u hipokampusu u kontrolnoj ($n=6$) i eksperimentalnoj grupi ($n=6$). Vrednosti su reprezentovane u formi srednje vrednosti \pm S.E.M

KONTROLA**PPS**

Slika 16. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine GAL+ ćelija u mPFC kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA**PPS**

Slika 17. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine GAL+ ćelija u amigdaloidnom kompleksu kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 200x.

KONTROLA**PPS**

Slika 18. Reprezentativni imunohistohemijski prikaz gustine GAL+ neurona u CA3 subregionu hipokampusa kod kontrolnih (n=6) i PPS pacova (n=6), na uveličanju 100x.

5. DISKUSIJA

Posttraumatski stresni poremećaj je jedno široko raspostranjeno i veoma onesposobljavajuće oboljenje (Kessler, 2000). Literaturni podaci pokazuju da PTSP ugrožava obolelu individuu i društvo, višestrukim mehanizmima. Naime PTSP je faktor rizika za oboljevanje od demencije, depresivnog poremećaja, anksioznih oboljenja i uopšte teške disregulacije emocija i ponašanja koja se manifestuju samopovređivanjem, suicidom, heteroagresivnim ponašanjem i zloupotrebom psihoaktivnih supstanci. PTSP je takođe faktor rizika za nastanak somatske patologije u pravcu kardivaskularne i respiratornih bolesti, dijabetesa, hroničnog bola, gojaznosti i seksualne disfunkcije. Zbog kognitivnih smetnji, emocionalne disregulacije i abuzusa supstanci, oboleli od PTSP-a su u velikom riziku da napuste školovanje i posao, naprave saobraćajni traumatizam, razvedu se i postanu beskućnici. Zbog svega navedenog, kao i zbog finansijskih troškova za lečenje ovakvih bolesnika, PTSP ima veoma značajan negativan uticaj na ekonomiju jednog društva (Kessler, 2000; Tull et al., 2004; Jakupcak i Tull, 2005).

Metaanalitičke studije pokazuju da su aktuelne terapije za PTSP kao što su farmakoterapija i na dokazima zasnovana kognitivno-bihejvioralna psihoterapija, neefikasne u oko 25-50% obolelih od PTSP-a uključenih u klinička ispitivanja (Mithoefer et al., 2011). Navedeni statistički podaci pokazuju da su molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi patogeneze PTSP-a i dalje u velikoj meri nepoznati i neispitani.

Animalni modeli su moćno oruđe za rasvetljavanje molekularnih mehanizama i patofiziologije mentalnih oboljenja. Postoji više animalnih modela za PTSP. Svi oni relativno verno imitiraju bihejvioralnu simptomatologiju, tipičnu za PTSP, ali samo animalni model pojedinačnog produženog stresa (PPS), uspeva da pored bihejvioralnih izmena, pokaže i neuroendokrinološke karakteristike tipične za PTSP pacijente (Yamamoto et al., 2009). Yehuda i saradnici (1995) su pokazali da pacijenti koji boluju od PTSP-a pokazuju mnogo veće smanjenje koncentracije kortizola u krvi posle aplikacije malih doza egzogenog deksametazona. Pre više od dve decenije Liberzon i saradnici su osmislili PPS animalni model i pokazali povećanu negativnu povratnu spregu hipotalamo-pituitarno-adrenalne osovine (HPA) na male doze egzogenog deksametazona (Liberzon et al., 1997).

Literaturni podaci pokazuju da se najviše bihevioralnih izmena koji liče na humani PTSP, registruje kod pacova, sedmog dana nakon aplikacije PPS stresora (Souza et al., 2017). Sedmog dana se evidentiraju povećanje anksioznosti, pobuđenosti, diskriminacije konteksta straha, kao i pojačano formiranje emocionalne memorije straha, dok su smanjeni ekstinkcija straha, prostorna memorija, socijalne interakcije i rekognicioni aspekti memorije. Prvog dana nakon PPS-a, registruju se samo povećanje REM faze spavanja kao i ubrzani ulazak u REM fazu. Takođe mnoge molekularne promene su nađene sedmog dana posle PPS-a, a mnogo manje biohemijskih alteracija je registrovano prvog dana posle eksperimentalne procedure, što sve pokazuje da su bihevioralne i molekularne promene u PPS animalnom modelu, vremenski zavisne (Souza et al., 2017). U našoj studiji smo ispitivanje molekularnih alteracija izvršili upravo sedmog dana posle aplikacije PPS stresora.

Premda PPS u svom nazivu ima pojam pojedinačnog stresora, u suštini se radi o više sukcesivnih multimodalnih stresora. Kombinacija mehaničkog obuzdavanja, forsiranog plivanja i etarske anestezije, predstavlja jednu složenu kombinaciju dve kategorije stresora, a to su fizički (sistemski) i emocionalni (psihološki, procesirajući). Istraživanja pokazuju da za navedene dve kategorije stresora, mozak koristi različite neuronske mreže (Dayas et al., 2001). Fizički stresori kao što je hemoragija, elektrolitni disbalansi, anestezija, predstavljaju realne homeostatske izazove, koji se mogu percipirati somatskim, visceralnim ili cirkumventrikularnim senzornim sistemima. Fizički stresor uzrokuje brzo aktiviranje HPA ose i autonomnih eferencija, preko refleksnih mehanizama. Kičmena moždina, moždano stablo i kontinuum lamine terminalis, primaju informacije o poremećajima homeostaze, te potom šalju direktne projekcije u hipofizeotrofne neurone paraventrikularnog jedra hipotalamusa (PVN) i aktiviraju HPA osovinu, ili svoje direktne eferencije šalju u preganglionske autonomne neurone i aktiviraju autonomni odgovor ("bottom-up", odozdo prema gore regulacija). Nefizički (psihološki, emocionalni) stresori predstavljaju anticipaciju ugroženosti homeostaze i zahtevaju dodatno procesiranje u limbičkim strukturama prednjeg mozga, uključujući prefrontalni korteks, amigdalu i hipokampus. Navedene strukture primaju polimodalne senzorne i nadmodalne informacije o stresoru iz supkortikalnih i kortikalnih regiona mozga zaduženih za senzorno procesiranje višeg reda, kao i za memorijske funkcije. Obradom stresora u navedenim strukturama,

formiraju se anticipatorni odgovori, koji su ili prethodno formirani uslovljeni odgovori iz depoa emocionalne memorije prethodnih stresnih događaja, ili su to aktivirani, urođeni, za vrstu specifični “anksioznost” i “odbrana” programi (naprimer prepoznavanje predatora, prepoznavanje opasnosti povezane sa visinom, svetlošću, mrakom, otvorenim prostorima, itd.). Prednje-moždani limbički regioni (prefrontalni korteks, amigdala i hipokampus) nemaju direktne anatomske veze sa HPA osovinom ili autonomnim nervnim sistemom, već zahtevaju dodatne sinapse u relejnim strukturama (nucleus tractus solitarius, dorzomedijalni hipotalamus, preoptička regija, zona oko periventrikularnog jedra), obezbeđujući dodatno descendentno procesiranje limbičke informacije, pre pristupanja u hipofizeotropne neurone paraventrikularnog jedra hipotalamusa (“top-down” odozgo prema dole regulacija). Međutim, postoji i srednji nivo regulacije, naime navedena relejna mesta za procesiranje limbičkih informacija, takođe su receptivna i za informacije o homeostatskom statusu, omogućavajući na taj način integraciju descendentnih limbičkih signala i signala o aktuelnom fiziološkom stanju organizma (među nivo regulacije, middle management). Ipak, i fizički stresori kao emocionalni se takođe obrađuju u limbičkim prednje-moždanim strukturama, ali izgleda da su različite substrukture responsivne na fizičke i emocionalne stimuluse. Studije pokazuju da centralna amigdala reguliše fizikalne stresore, dok medijalna amigdala moduliše odgovore na emocionalne stresore. Takođe, različite substrukture limbičkog prednjeg mozga, funkcionišu paralelno, ali modulišu HPA osovinu na različit način (na primer, prefrontalni korteks inhibira HPA odgovor na emocionalni stresor, dok obe substrukture amigdale, centralna i medijalna, aktiviraju HPA osu, kao odgovor i na fizičke i na emocionalne stresore respektivno. Takođe, ventralni subikulum hipokampusa inhibira HPA osovinu u sklopu odgovora na emocionalne stresore (Herman et al., 2003).

U svakom slučaju, krajnja integrativna pozicija i glavni CNS efektor stresnog odgovora su neuroendokrini neuroni paraventrikularnog jedra hipotalamusa. Inicijacija ili terminacija HPA aktivacije i oslobađanja glukokortikoida, zavisiće samo od neto integrisanog informacionog izlaza iz prefrontalnog korteksa, hipokampusa, amigdale, moždanog stabla, cirkumventrikularnih organa i drugih hipotalamičkih jedara u PVN (Ulrich-Lai et Herman, 2009; Herman et al., 2003). Aktivacijom neuroendokrinih neurona PVN oslobađa se adrenokortikotropni hormon rilizing faktor koji onda stimuliše adenohipofizu na produkciju adrenokortikotropnog hormona (ACTH). ACTH stimuliše

adrenalnu žlezdu na produkciju glikokortikoida. Glavni glikokortikoidni hormon kod ljudi je kortizol, dok kod glodara je kortikosteron. Kortizol i kortikosteron su glavni hormoni stresnog odgovora koji aktiviraju odgovarajuće centralne i periferne sisteme, uključujući kardiorespiratorni, metabolički i imuni odgovor.

Klasičan model u vezi sa neuronskim krugovima PTSP-a, uključuje tri glavna regiona: amigdalnu, medijalni prefrontalni korteks i hipokampus (Rauch et al. 1998, 2006). Navedeni patofiziološki model PTSP-a uključuje hiperaktivnu amigdalnu i njene interakcije sa hipoaktivnim ventromedijalnim prefrontalnim korteksom i hipokampusom. Naime, neuroimidžing studije pacijenata sa PTSP-om, pokazuju hiperresponsivnu amigdalnu na stimuluse povezane sa traumom i neadekvatnu regulaciju amigdale od strane ventromedijalnog prefrontalnog korteksa i hipokampusa.

Hiperresponsivnost amigdale može objasniti simptome i znake povećane pobuđenosti i ponovnog proživljavanja traumatskog iskustva, te u osnovi vrlo stabilne emocionalne memorije traumatskog događaja u PTSP-u. Deficitarna inhibicija hiperekscitabilne amigdale od strane hipoaktivnog prefrontalnog korteksa, odgovara smanjenom kapacitetu ekstinkcije straha u PTSP-u. Smanjena top-down regulacija amigdale omogućava opstajanje hipervigilne pažnje i pojačane responsivnosti organizma na stimuluse, podsetnike na traumu. Smanjena funkcija hipokampusa u PTSP-u, može biti u osnovi smanjene sposobnosti identifikacije bezbednog konteksta, kao i u osnovi deficita eksplicitne memorije. Deficit funkcije hipokampusa bi bio i patofiziološki mehanizam smanjene ekstinkcije straha (Rauch et al., 2006).

Drugi eksplanatorni modeli neuralnih korelata PTSP-a stavljaju akcenat na deficitarnu funkciju medijalnog prefrontalnog korteksa, dok je klasični model više amigdalocentrični. Naime, disfunkcija medijalnog prefrontalnog korteksa se dovodi u vezu sa izmenjenim procesom kontekstualizacije, tj. procesom kojim se stimulusi u različitim kontekstima interpretiraju, zatim reprezentuju, te određuju bihevioralne akcije. S obzirom da su sa kontekstualizacijom povezani ekstinkcija, emocionalna regulacija, socijalna kognicija i samosvest, disfunkcionalni medijalni prefrontalni korteks bi mogao biti u osnovi mnogih fenomena ponovnog proživljavanja traumatskog iskustva, kao i u osnovi emocionalne umrtvljenosti (Liberzon and Garfinkel, 2009). Individue sa PTSP-om, tokom analize nivoa sopstvene ugroženosti imaju pojačanje signala između opserviranog i

očekivanog telesnog stanja organizma. Kognitivni simptomi kao što je briga i bihevioralni kao što je izbegavanje, se potom uključuju da bi smanjili diskrepancu između poređenih stanja organizma (Paulus and Stain, 2006).

Dok Rauch i saradnici, pokazuju hipoktivaciju hipokampusa u PTSP-u, Patel i saradnici pokazuju hiperaktivaciju hipokampusa u metaanalitičkoj neuroimidžing studiji (Patel et al., 2012). Hiperaktivacija amigdale i hipoaktivacija medijalnog prefrontalnog korteksa su zajednički imenitelj obe studije. S obzirom da amigdala i hipokampus imaju kritične uloge u procesu konsolidacije emocionalne memorije kod zdravih subjekata, interakcija između hiperresponzivne amigdale i hiperresponzivnog hipokampusa bi mogla biti u pozadini intruzivne prirode simptoma ponovnog proživljavanja traumatskog iskustva u PTSP-u.

Kada su u pitanju PTSP i anksiozni poremećaji, glavne mete psihofarmakoterapije su GABA-ergički i serotoninergički neurotransmiterski sistemi. Aktuelna psihofarmakoterapija pored pozitivnih efekata ima i dosta ozbiljnih ograničenja. Kako smo već naveli, značajan deo obolele populacije pokazuje refrakternost na aktuelne farmakološke agense. Drugo, terapija benzodiazepinima prouzrokuje značajne neželjene efekte, kao što su sedacija, tolerancija i zavisnost. Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina, početak farmakološkog dejstva pokazuju posle latence od nekoliko nedelja a takođe mogu biti uzročnici raznih neželjenih efekata. S obzirom dakle da molekularni mehanizmi odgovorni za patogenezu PTSP-a i anksioznih poremećaja očigledno još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni, istraživanja su krenula i u drugim pravcima, kao što je oksidativni stres.

Premda PTSP više ne pripada grupi anksioznih poremećaja po DSM5, anksioznost je i dalje vrlo značajna klinička karakteristika obolelih od PTSP-a. Mnoge animalne studije su pokazale kauzalnu vezu između oksidativnog stresa mozga i ponašanja koje nalikuje anksioznosti. Oksidativni stres u mozgu može biti indukovano ili farmakološki uz pomoć prooksidantnih supstanci ili aplikovanjem nekog nefarmakološkog (okolinskog) stresora.

U studiji Salim i saradnika, oksidativni stres mozga kod pacova je indukovano uz pomoć prooksidativnih supstanci, ksantina i ksantin oksidaze, pri čemu su evidentirani povišeni nivoi oksidativnog markera malondialdehida u hipokampusu i amigdali,

istovremeno sa pojačanjem anksioznosti sličnog ponašanja (merenog bihevioralnim testom otvorenog polja i testom svetlo-mrak) u odnosu na kontrolne pacove (Salim et al., 2010).

Masood i saradnici su kod miševa kao prooksidantnu supstancu koristili L-butionin-(S,R)-sulfoksimin (BSO). Oksidativni stres u mozgu, evidentiran kao povećanje lipidnih peroksida u amigdali i hipotalamusu je prouzrokovao veći nivo anksioznosti kod tretiranih miševa u uzdignutom plus lavirinitu i testu otvorenog polja u odnosu na kontrolne miševe (Masood et al., 2008).

U istraživanjima sa okolinskim stresorom kao što je model socijalnog poraza, pacovi izloženi ponavljanom podređivanju od strane agresivnog pacova uljeza, pokazuju viši nivo proteinske karbonilacije (markera oksidativnog stresa) u hipokampusu, te povišeni nivo anksioznog ponašanja u uzdignutom plus lavirintu, testovima otvorenog polja i svetlo-mrak, u odnosu na kontrolne pacove (Patki et al., 2013). Druga studija sa akutnom deprivacijom spavanja kod pacova pokazuje povišenje markera oksidativnog stresa (glioksalaze 1 i glutation reduktaze) u korteksu, hipokampusu i amigdali, istovremeno sa povećanjem anksioznog ponašanja kod depriviranih pacova u odnosu na kontrole (Vollert et al., 2011).

U humanim studijama obolelih od anksioznih poremećaja takođe je nađena asocijacija između oksidativnog stresa mozga i anksioznosti. Kod obolelih od generalizovanog anksioznog poremećaja, nađena je veća koncentracija lipidnih peroksida u plazmi u odnosu na zdrave kontrole (Bulut et al., 2013). Kod obolelih od paničnog poremećaja viša aktivnost glutation peroksidaze i superoksid dizmutaze, kao i povišen nivo malondialdehida u plazmi su bili asociirani sa većim skorovima na skali panike i agorafobije (Kuloglu et al., 2002).

U literaturi postoji malo kliničkih studija koje su ispitivale asocijaciju oksidativnog stresa i posttraumatskog stresnog poremećaja. Atli i saradnici (Atli et al., 2016) su pokazali sa visokom statističkom značajnošću, više nivoe malondialdehida i niže nivoe antioksidativnog enzima paraoksonaze u serumu kod pacijenata obolelih od PTSP-a, a koji su preživeli zemljotres u odnosu na zdrave kontrole. Attari i saradnici (Attari et al., 2002) su takođe pokazali više nivoe lipidnih peroksida (MDA) u plazmi kod pacijenata obolelih od PTSP-a. Glatt i Tylee sa saradnicima su pokazali smanjenu gensku ekspresiju enzima glutation-S-transferaze mi(μ) 1(GSTM1) u ćelijama periferne krvi, kod mornara koji su

potom razvili PTSP posle suočavanja sa ratnim razaranjima u Iranu i Avganistanu. Enzim GSTM1 ima funkciju detoksikacije prooksidativnih supstanci u organizmu, a nivo njegove genske ekspresije u perifernoj krvi značajno korespondira sa nivoom ekspresije istog enzima u moždanom tkivu. Dakle, navedeni autori su pokazali smanjen nivo ekspresije gena za GSTM1 kao prediktivni faktor oboljevanja od PTSP-a posle doživljavanja traumatičnog iskustva (Glatt et al., 2013; Tylee et al., 2015). Druge genetske studije pokazuju nishodnu regulaciju gena za antioksidativne enzime kod obolelih od PTSP-a. Nishodna regulacija gena za tioredoksin reduktazu (TXR), superoksid dizmutazu (SOD) i cisten/glutamat transporter kod obolelih od PTSP-a, te njihova smanjena dostupnost, se mogu povezati sa oksidativnim stresom u PTSP-u (Zieker et al., 2007).

Neuroimidžing studija sa korišćenjem spektroskopske magnetne rezonantne je pokazala statistički značajno veće nivoe glutaciona (GSH, markera neuronalnog oksidativnog stresa) u dorzolateralnom i prednjem cingularnom korteksu kod obolelih od PTSP-a u poređenju sa zdravim kontrolama. Navedena studija je u istim regionima pokazala i povišene nivoe gama-aminobuterne kiseline (Michels et al., 2014).

Određeni broj studija sa animalnim modelima PTSP-a je takođe ispitivao oksidativni stres mozga, kao potencijalni molekularni mehanizam patogeneze PTSP-a. U istraživanju Wilsona i saradnika, pacovi su u više navrata izlagani svom predatoru, posle čega su pokazivali znake koji liče na kliničku sliku PTSP-a (povećana anksioznost, povećana kardiovaskularna reaktivnost, kognitivne smetnje, pojačan odgovor trzanja na stimulse). U prefrontalnom korteksu i hipokampusu, pokazani su viši nivoi superoksidnog anjona i nivoi ukupnih slobodnih radikala kod pacova izlaganih navedenim psihosocijalnim stresorom u odnosu na kontrolne pacove (Wilson et al., 2013). U drugoj studiji sa animalnim modelom PTSP-a, pacovi su izlagani maternalnoj deprivaciji po nekoliko sati na dan, deset postnatalnih dana. U adultnoj fazi su tretirani neizbežnim električnim udarom šape. Pacovi tretirani maternalnom deprivacijom i električnim udarom, mesec dana posle električnog šoka pokazivali su alteracije spacijalne memorije u bihevioralnim testovima, dok su u hipokampusu pronađeni povećani markeri oksidativnog stresa u vidu povećanog broja prekida DNK lanca (Diehl et al., 2012).

Vrlo mali broj istraživanja je koristio animalni model produženog pojedinačnog stresa u evaluaciji oksidativnog stresa mozga kao patogenetskog činioca PTSP-a. Liu i

saradnici (Liu et al., 2016) su pokazali povećanje markera oksidativnog stresa u hipokampusu pacova tretiranih PPS procedurom u poređenju sa kontrolnim pacovima. Naime, prvog i trećeg dana posle PPS procedure u hipokampusu su pronađene povišene vrednosti lipidnih peroksida (MDA), dok su prvog, trećeg i sedmog dana posle PPS stresora, u hipokampusu demonstrirane povišene vrednosti 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE), takođe markera povećane lipidne peroksidacije u ćelijama.

Naše istraživanje je pokazalo povišene markere oksidativnog stresa u hipokampusu i amigdali kod pacova tretiranih PPS procedurom u poređenju sa kontrolnim pacovima. U amigdali i hipokampusu smo evidentirali povišene koncentracije markera lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA) kod PPS pacova, dok u korteksu nije bilo statistički značajnog povećanja MDA. U svim ispitivanim strukturama PPS pacova smo registrovali izmene antioksidativnog sistema zaštite. Naime, u amigdali i hipokampusu smo registrovali snižene koncentracije GSH, u amigdali sniženu aktivnost ukupne SOD, u hipokampusu i korteksu snižen GPx, dok je paradoksalno pokazana povišena ekspresija SOD1 u korteksu i povišena ekspresija SOD2 u sve tri ispitivane moždane strukture.

Kako je već navedeno, postoji skroman broj istraživanja oksidativnog stresa mozga na PPS modelu. Ostala istraživanja na animalnim modelima koja istražuju odnos nekog okolinskog stresora i oksidativnog stresa mozga u najvećem broju koriste protokole sa hroničnom, repetitivnom aplikacijom stresora. Manji broj animalnih modela koriste akutne stresne protokole i morfo-biohemijske analize vrlo brzo po završetku aplikacije akutnog stresora. S obzirom da je za dijagnozu PTSP-a potrebno da prođe najmanje mesec dana od traumatskog iskustva, PPS procedura koju smo koristili u našem istraživanju najviše imitira vremenski tok u humanom PTSP-u, tj. odložene ili prolongirane mentalne teškoće izazvane jednim, ali intenzivnim, životno-ugrožavajućim događajem.

Sahin i saradnici (Sahin et al., 2004) su istraživali uticaj hroničnih repetitivnih stresnih procedura pacova kao što su ponavljana imobilizacija, izlaganje hladnoći ili kombinacija oba stresora svakog dana, tokom petnaest dana, na oksidativni status mozga. Aktivnost SOD1 je povećana u svim grupama, aktivnost GPx smanjena kod imobilisanih, GSH nivoi smanjeni u svim grupama. TBARS povećani u svim grupama.

Hronični nepredvidivi stres koji se sastoji iz ponavljane aplikacije različitih stresora kao što su obuzdavanje, plivanje u hladnoj vodi, uštinuće repa, električni udar šape,

inverzija ciklusa svetlost-tama, deprivacija vode i hrane, je doveo do povećanja lipidne peroksidacije i smanjenja aktivnosti katalaze u cerebralnom korteksu i hipokampusu tretiranih miševa, kao i smanjenje nivoa glutaciona u korteksu (Moretti et al., 2012). Liu i saradnici (Liu et al., 1996) su koristili akutni stresor, imobilizaciju od 8 sati, i neposredno nakon završetka imobilizacije, pacovi su dekapitovani. Biohemijske analize su pokazale povećanje nivoa MDA u korteksu i u hipokampusu tretiranih pacova. Madrigal i saradnici (Madrigal et al., 2003) su evidentirali povećanje MDA i oksidovanog glutaciona u korteksu mozga pacova koji su bili tretirani akutno, samo jednim mehaničkim sputavanjem u trajanju od 8 sati. Uysal i saradnici (Uysal et al., 2005) su u modelu maternalne deprivacije pokazali povećanje lipidne peroksidacije i SOD aktivnost samo u mozgu depriviranih mužjaka mladunaca pacova, s obzirom da estrogen kod ženki ima ulogu skevendžera slobodnih radikala. Đorđević i saradnici (Djordjevic et al., 2010) su pokazali smanjenje GPx u hipokampusu pacova tretiranih dugotrajnom socijalnom izolacijom. Möller i saradnici (Möller et al., 2011) su pokazali da je osmonedeljna socijalna izolacija pacova prouzrokovala povećanje markera lipidne peroksidacije (MDA), povećanje aktivnosti SOD, smanjenje odnosa redukovani/oksidovani glutacion u cerebralnom korteksu pacova. D'Almeida i saradnici (D'Almeida et al., 1998) su našli smanjenje redukovano glutaciona u hipotalamusu i talamusu pacova tretiranih deprivacijom spavanja u trajanju od 96 sati. Ramanathan i saradnici (Ramanathan et al., 2002) su pokazali smanjenje aktivnosti SOD u hipokampusu i moždanom stablu pacova tretiranih višednevnom deprivacijom spavanja. Alzoubi i saradnici (Alzoubi et al., 2012) su pokazali smanjenje aktivnosti GPx, katalaze i SOD u hipokampusu i oštećenje specijalne memorije u animalnom modelu sa hroničnom deprivacijom spavanja na platformi okruženoj vodom. Mejia-Carmona i saradnici (Mejia-Carmona et al., 2015) su koristili model sa petodnevnom izlaganjem pacova mirisu predatora, tj. tkanini koja je bila u kontaktu sa krznom mačke. Ispitali su oksidativni status i nivo antioksidativne zaštute u amigdali, prefrontalnom korteksu i hipotalamusu. U amigdali tretiranih pacova je evidentirano povećanje markera lipidne peroksidacije (TBARS) i blago smanjenje ekvivalenata reaktivnih kiseoničnih vrsta (oksidovani DCFH, 2',7'-dihlorfluorescein), povećanje aktivnosti mitohondrijalne SOD kao i glutacion S transferaze (GST), dok je u prefrontalnom korteksu pokazano smanjenje TBARS, blago povećanje ekvivalenata slobodnih radikala, oksidovanog DCFH, povećanje aktivnosti

mitohondrijalne SOD i nepromenjenost GST. Isti autor je pokazao smanjenje aktivnosti katalaze u prefrontalnom korteksu i amigdali, kao i povećanje mitohondrijalne SOD i GST u prefrontalnom korteksu, posle akutnog stresora, tj. pojedinačnog izlaganja mirisu predatora (Mejia-Carmona et al., 2014).

Dakle, u našoj studiji smo našli povećanje nivoa markera lipidne peroksidacije (MDA) u hipokampusu kod PPS pacova sedmog dana nakon aplikacije stresora. Slične rezultate, koristeći isti animalni model su dobili Liu i saradnici (2016), s tom razlikom što su oni evidentirali povišenje MDA prvog i trećeg dana ali ne i sedmog dana. U hipokampusu smo registrovali i smanjenje koncentracije redukovano glutaciona, kao i smanjenje aktivnosti GPx što se poklapa sa rezultatima drugih studija (Ramanathan et al., 2002; Djordjević et al., 2010), s tom razlikom što su navedeni istraživači koristili modele sa hroničnim stresorom. GPx zahteva adekvatne rezerve redukovano glutaciona za svoju funkciju elektron donora. GSH se regeneriše uz pomoć NADPH iz oksidovanog glutaciona (GSSG), i zato je GPx izuzetno senzitivan na smanjenje energetskeg statusa neurona jer zahteva funkcionalan pentozo fosfatni put (Dringen, 2000). Dakle, smanjenje aktivnosti GPx možemo povezati i sa smanjenim rezervama redukovano glutaciona u hipokampusu, ili sa smanjenjem energetskeg statusa hipokampusa. Povećanje indikatora lipidne peroksidacije, kao i smanjenje antioksidativne zaštite, nedvosmisleno ukazuju na hipokampalni oksidativni stres koji je prouzrokovan PPS stresorom.

Za razliku od drugih studija (Liu et al., 1996; Madrigal et al., 2003), koji su pokazali povećanje markera lipidne peroksidacije u korteksu i alteraciju drugih parametara oksidativnog stresa, neposredno posle aplikacije akutnog stresora, u našem istraživanju nije evidentirano statistički značajno povećanje markera oksidativnog stresa u ovoj strukturi mozga, i pored evidentiranog smanjenja aktivnosti glutacion peroksidaze, izmene ekspresije SOD1,2 i povećanja aktivnosti kompleksa I mitohondrijalnog respiratornog lanca. Potencijalno objašnjenje navedenog može biti u tome da je antioksidativna zaštita u korteksu ipak suficijentna za održavanje redoks balansa. Drugo objašnjenje je da je površina korteksa u standardnoj proceduri koja je korišćena za biohemijske analize suviše velika da bi bila specifična za određivanje markera oksidativnog stresa, u odnosu na male zone infralimbičkog i paralimbičkog korteksa pacovskog mozga, relevantne za PTSP.

Naše istraživanje je pokazalo povećanje markera lipidne peroksidacije (MDA) u amigdali, slično rezultatima studije Mejia-Carmona i saradnika (2015) koji su pokazali povećanje TBARS u amigdali. Međutim, navedeni istraživač registruje povećanje aktivnosti mitohondrijalne SOD u amigdali posle hroničnog repetitivnog izlaganja pacova mirisu predatora, kao i posle akutnog izlaganja istom (Mejia-Carmona et al., 2014), dok smo mi u našem istraživanju evidentirali smanjenje aktivnosti ukupne SOD, sedmog dana posle aplikacije PPS stresora, što se može interpretirati metodološkim razlikama.

Western blot analiza je pokazala povećanje ekspresije SOD1 u prefrontalnom korteksu pacova, kao i povećanje ekspresije SOD2 u svim ispitivanim moždanim strukturama. S obzirom da su aktivnosti ukupne SOD u ispitivanim strukturama ili nepromenjene ili smanjene u odnosu na kontrole, pretpostavljamo da su SOD1 i SOD2 samo povećano ekspimirane, ali bez značajnog povećanja enzimske aktivnosti.

Možemo pretpostaviti nekoliko mehanizama nastanka oksidativnog stresa u mozgu izazvanog nekim stresorom. Slobodni radikali su veoma značajni za neuralnu funkciju u širokom dijapazonu od ćelijske signalizacije i neuromodulacije do degradacije mitohondrijalne funkcije i apoptoze. S obzirom da mozak ima visok nivo metaboličke aktivnosti te posledično visok nivo produkcije slobodnih radikala, efikasno i pravovremeno neutralisanje slobodnih radikala je veoma značajan, kritičan i ograničavajući proces.

Tokom stresnog odgovora, u mozgu dolazi do hiperprodukcije dopamina i noradrenalina. Autooksidacijom navedenih kateholamina, nastaju slobodni elektroni koji onda formiraju reaktivne kiseonične vrste (Carpagnano et al., 2003; Venarucci et al., 1999). Ćelije potom angažuju svoje enzimske (SOD i GPx) i neenzimske (GSH) antioksidativne molekule.

Sato i saradnici su pokazali da subkutana administracija visokih doza kortikosterona pacovima svakodnevno tokom 14 dana, prouzrokuje povećanje koncentracije lipidnih peroksida, smanjenje aktivnosti GPx, katalaze i SOD u hipokampusu i povećanje superoksidanog anjona u serumu pacova. Povećanje lipidnih peroksida u hipokampusu se objašnjava povećanom produkcijom slobodnih radikala u hipokampusu izazvanom povišenim kortikosteronom, kao i dodatnim oksidativnim oštećenjem superoksidnim anjonima nastalim u plazmi zbog hiperglikemije i glikozilacije serumskih proteina izazvane povećanom glukoneogenezom. Oksidativni stres oštećuje piramidalne neurone

hipokampusa te zato nastaje indukcija povećane aktivnosti HPA osovine, te circulus viciosus oksidativni stres - hiperprodukcija glikokortikoida. Oštećenje piramidnih neurona je uzrokovalo i memorijske deficite u bihevioralnim testovima (Sato et al., 2010).

Patel i saradnici (Patel et al., 2002), su pokazali da kortikosteron u hipokampalnim kulturama neurona pacova prouzrokuje povećanje lipidne peroksidacije, smanjenje aktivnosti GPx i smanjenje koncentracije glutaciona. Smanjenje aktivnosti GPx ili smanjenje koncentracije enzima se može objasniti akcijom glikokortikoida na nivou transkripcije, translacije ili degradacije enzima. Pored smanjenja GSH od strane glikokortikoida, još veće smanjenje depoa GSH je dobijeno zajedničkom akcijom kortikosterona i ekscitotoksina kainata.

Mikrodijalizne cerebralne studije pokazuju akutno ekstracelularno povećanje ekscitatornih aminokiselina u mozgu neposredno posle primene akutnog stresora. Moghaddam (1993) je pokazao akutno povećanje glutamata i aspartata u prefrontalnom korteksu, hipokampusu, nukleusu akumbensu neposredno posle akutnog stresiranja obuzdavanjem od 20 min. Sa druge strane, povećanje ekscitatornih aminokselina dovodi do pojačane aktivacije NMDA receptora, te pojačanog influksa jona Ca u citosol i aktivaciju kalcijum zavisne fosfolipaze A2 koja aktivira biohemijske puteve u kojima se sintetišu slobodnih radikali i menja oksidativni status ćelije. Takođe povišeni slobodni kiseonični radikali stimulišu povećano oslobađanje ekscitatornih aminokiselina i nastaje circulus viciosus međusobne stimulacije ekscitatornih amino kiselina i slobodnih radikala (Oh i Betz, 1991).

Amigdala i prefrontalni korteks su najvažniji regioni za emocionalno procesiranje stimulusa. Prefrontalni korteks služi kao konvergentna zona za interne i eksterne stimulse. PFK može da inhibira druge zone mozga, ako nema potkrepljivanja stimulusa. Amigdala ima dvosmerene veze sa prefrontalnim korteksom i hipotalamusom i ima zadatak da reguliše HPA odgovor na eksterne stimulse. Eksterni stresor izaziva povećano oslobađanje dopamina u prefrontalnom korteksu (Sullivan et al., 1998). Amigdala funkcioniše kao konvergentna zona u odgovoru na emocionalne stresore, te jako važna očuvanost njenog kapaciteta da održava adekvatan transfer informacija. S druge strane istraživanja pokazuju da dugodelujući stresor može prouzrokovati promene u sinaptičkoj plastičnosti, dendritskoj morfologiji i neurogenezi (Kim et al., 1998).

U našem istraživanju ispitivali smo dva najvažnija izvora oksidativnog stresa, enzimske komplekse mitohondrijalnog respiratornog lanca i sistem NADPH oksidaze u sva tri moždana regiona relevantna za PTSP.

Mitohondrijalni transportni lanac elektrona povezuje elektronski transfer između donora elektrona i akceptora elektrona sa transferom H^+ jona kroz membranu, stoga mitohondrijalna disfunkcija može predstavljati vodeći generator slobodnih radikala u nastanku oksidativnog disbalansa. Respiratorni lanac je sastavljen od pet enzimskih kompleksa (Kompleks I-V). Kompleks I oduzima elektrone sa NADH i prenosi ih koenzimu Q. Kompleks IV, takođe nazvan i citohrom c oksidaza (COX) funkcioniše kao katalizator transfera elektrona na molekularni kiseonik (Wallace, 1994). Mitohondrijalni respiratorni lanac generiše slobodne radikale kao nusprodukt, istovremeno respiratorni lanac je veoma osetljiv na reaktivne kiseonične vrste (Bowling i Beal 1995). Stoga, oksidativni stres indukovani stresorom, može biti i uzrok i posledica mitohondrijalne disfunkcije. S obzirom da u amigdali i hipokampusu nismo evidentirali alteraciju aktivnosti Kompleksa I, niti citohrom c oksidaze, zaključili smo da oksidativni stres u navedenim neuralnim strukturama nije posledica disfunkcije respiratornog lanca. Madrigal i saradnici (2001) su u modelu hroničnog repetitivnog stresa mehaničkim sputavanjem (6 sati na dan, 21 dan), pokazali povećanje markera oksidativnog stresa, smanjenje aktivnosti Kompleksa I i neizmenjenost aktivnosti COX u korteksu tretiranih pacova. Međutim, pošto je aktivnost citrat sintetaze nepromenjena, intaktnost mitohondrijalne strukture nije narušena. U našem istraživanju pokazali smo povećanje aktivnosti Kompleksa I u korteksu pacova izloženih PPS stresoru uz nepromenjenost aktivnosti Kompleksa IV. Povećana aktivnost Kompleksa I bez istovremenog povećanja aktivnosti COX mogla bi da dovede do povećanog direktnog prenošenja elektrona sa koenzima Q na kiseonik i do formiranja slobodnih radikala. Enzim citohrom C oksidaza, odnosno Kompleks IV, je značajan transmembranski proteinski kompleks koji je poslednji enzimijski sistem u respiratornom lancu inkorporiran u mitohondrijalnoj membrani. Njegova uloga je transport elektrona sa sva četiri citohrom c molekula i njihov prenos na molekul kiseonika pretvarajući ih u dva molekula vode. Međutim, s obzirom da u korteksu PPS grupe, nismo našli povećanje markera lipidne peroksidacije, niti smanjenje rezervi GSH, možemo zaključiti da antioksidativni sistemi u

korteksu imaju dovoljan kapacitet da održavaju redoks balans u navedenoj strukturi u datoj vremenskoj koordinati posle aplikacije PPS stresora.

Drugi potencijalni izvor slobodnih radikala u mozgu koji smo ispitivali u PPS modelu je sistem NADPH (NOX) oksidaze. Produkcija slobodnih radikala je primarna funkcija porodice NADPH oksidaza, za razliku od mitohondrijalnog respiratornog lanca kojima su slobodni radikali nusproizvod. NOX2 kompleks koji je zadužen za “respiratornu eksploziju” u neutrofilima, takođe je široko eksprimovan u mozgu, gde ima funkciju da kontroliše mnoge ključne neuralne i neuroinflamacijske procese (Bedard & Krause, 2007). NOX2 enzimski kompleks je sastavljen iz šest subjedinica: membranska katalitička subjedinica, gp91phox (NOX2), NOX membranska, stabilizatorna subjedinica gp22phox, citosolna aktivatorna subjedinica p67phox, citosolna organizatorna subjedinica p47phox, citosolna p40phox i Rho GTPaza (Bedard i Krause, 2007). NADPH oksidaza je enzim tako kompleksno regulisan da može funkcionisati u mnogo različitih, pa čak i u suprotnim ulogama. Sa fiziološke tačke gledišta, slobodni radikali generisani od NOX2 u mozgu, učestvuju u intracelularnom i intercelularnom signaliziranju, regulaciji genske ekspresije, modulaciji neuronske aktivnosti, dugotrajnoj potencijaciji, učenju i pamćenju (Bedard & Krause, 2007; Infanger et al., 2006). Sa patološke tačke gledišta, ROS generisani od NOX2 u mozgu su okrivljeni za oksidativni stres, povećanje propustljivosti krvno-moždane barijere, histomorfološke promene mozga, neuroinflamaciju, neuronsku smrt i neurodegenerativne promene (Bedard & Krause, 2007). Literaturni podaci sve više pokazuju pojačanu aktivaciju NOX2 enzimskog kompleksa u mnogim oboljenjima centralnog nervnog sistema, gde se generišu velike količine reaktivnih kiseoničnih vrsta (Sorce & Krause, 2009).

Naša studija je pokazala statistički značajno povećanje ekspresije gp91phox, p22phox i p67phox subjedinice NADPH oksidaze u amigdali koje je udruženo sa povećanjem markera oksidativnog oštećenja u amigdali pacova PPS grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. S obzirom da u amigdali nismo pronašli statistički značajnu promenu enzima mitohondrijalnog respiratornog lanca, možemo zaključiti da je glavni izvor slobodnih radikala, te oksidativnog stresa NADPH oksidaza, NOX2 enzimski kompleks. Koliko nam je poznato u literaturi nema studija koje se bave NADPH oksidazom u amigdali u animalnim modelima sa okolinskim stresorom

U hipokampusu eksperimentalnih pacova nismo pronašli statistički značajne izmene subjedinica NOX2 enzimskog kompleksa, sedmog dana posle PPS stresora u poređenju sa kontrolnim. S obzirom da smo u hipokampusu pokazali povećanje markera oksidativnog stresa, istovremeno sa nepromenjenim enzimskim kompleksima mitohondrijalnog respiratornog lanca, možemo zaključiti da u hipokampusu postoji nekakav dodatni izvor reaktivnih kiseoničnih vrsta koji je prouzrokovao oksidativno oštećenje hipokampusa. Studija Liu i saradnika (2016) u istom modelu pojedinačnog produženog stresa je u hipokampusu pokazala povećanje markera lipidne peroksidacije (MDA) udruženo sa povećanjem ekspresije NOX2 prvog i trećeg dana posle aplikacije PPS stresora, ali ne i sedmog dana. Takođe upotrebom apocinina, inhibitora NADPH oksidaze, postignuta je prevencija oksidativnog stresa u hipokampusu i bihevioralne alteracije prouzrokovane pojedinačnim produženim stresom. Za razliku od navedene studije, naše istraživanje je pokazalo povećanje nivoa MDA sedmog dana, ali bez izmenjene ekspresije NOX2.

U korteksu PPS grupe nije nađeno statički značajno povećanje nijedne ispitivane subjedinice NOX2 enzimskog kompleksa. Premda smo pokazali povećanje aktivnosti kompleksa I mitohondrijalnog respiratornog lanca, oksidativni stres nije evidentiran u navedenoj strukturi. U literaturi postoji jako malo istraživanja koja se bave NADPH oksidazom kao potencijalnim izvorom oksidativnog stresa mozga u modelima sa psihosocijalnim (okolinskim) stresorom. Shrivastava i sar. (2009) su koristili animalni model socijalne izolacije i pokazali su povećanu ekspresiju NOX2 u prefrontalnom korteksu i nukleusu akumbensu socijalno depriviranih pacova, udruženu sa povećanim parametrima oksidativnog stresa. Upotrebom NOX inhibitora apocinina, prevenirali su oksidativni stres u ispitivanim neuralnim strukturama kod socijalno izolovanih pacova.

Imunohistohemijском analizom pokazali smo statistički značajno smanjenje gustine NeuN pozitivnih ćelija u medijalnom prefrontalnom korteksu, amigdali i svim subregionima hipokampusa, smanjenje gustine parvalbumin pozitivnih ćelija u amigdaloidnom kompleksu, CA3 i GD subregionu hipokampusa, kao i smanjenje gustine kalbindin pozitivnih ćelija u CA1 subregionu hipokampusa mozga pacova tretiranih PPS procedurom u odnosu na kontrolne pacove.

Li i saradnici (2013) su u istovetnom animalnom modelu PTSP-a, pojedinačnom produženom stresu, pokazali povećanje broja apoptotičnih ćelija u medijalnom

prefrontalnom korteksu pacova, sa pikom sedmog dana nakon PPS procedure. Takođe su demonstrirali i smanjenu ekspresiju antiapoptotskog regulatornog proteina Bcl-2 (B ćelijski limfom 2) kao i povećanje ekspresije proapoptotskog regulatornog proteina Bax (sa Bcl-2 asociran X), prvog i četvrtog dana posle PPS stresora. Ding i saradnici (2010) su takođe pokazali povećanje BAX/Bcl2 odnosa, udruženo sa povećanjem apoptotskog procesa u amigdali pacova tretiranih PPS stresorom. Navedeni autori su pojačanje apoptoze amigdale, te posledično smanjenje volumena amigdale razmotrili kao jedan od mogućih patogenetskih mehanizama nastanka PTSP-a. Han i saradnici (2013) su pokazali povećanje broja apoptotskih ćelija u hipokampusu mozga pacova tretiranih PPS stresorom, te povećanje ekspresije proteina regulatora glukoze 78 (GRP), kaspaze 12 kao i slobodnog Ca^{++} , kalmodulina i smanjenje ekspresije kalmodulin kinaze $II\alpha$. Dakle, povećanje indikatora apoptotskog puta poreklom iz endoplasmatskog retikuluma, može biti patobiohemijski put kojim spoljašnji stresor doprinosi smanjenju volumena hipokampusa i nastanku PTSP-a.

Nedavna studija na modelu rane postnatalne maternalne deprivacije, jednom animalnom modelu stresa, demonstrirala je smanjenje ekspresije NeuN u neokorteksu i hipokampusu depriviranih pacova (Aksić, 2015)

Naše istraživanje je pokazalo da pojedinačni produženi stres uzrokuje smanjenje broja NeuN pozitivnih neurona u sve tri ispitivane strukture. Interpretacija smanjenja ekspresije neuronalnog nuklearnog antigena se može dovesti u vezu sa gubitkom neurona apoptozom, ali takođe literaturni podaci pokazuju da smanjena sinteza NeuN antigena, kao i smanjena sposobnost NeuN antigena da se veže sa NeuN antitelom, može pokazati smanjenje NeuN⁺ ćelija, a da su pri tome neuroni u lediranom tkivu i dalje vijabilni (Gusel'Nikova et al., 2015). Kada bi naše rezultate tumačili u svetlu apoptoze, mogli bi da zaključimo, da je u mPFK-u došlo do smanjenja broja piramidnih neurona, a u amigdali i hipokampusu je došlo do redukcije i principnih i interneurona.

Literaturni podaci takođe pokazuju da intenzivni spoljašnji stresor u mozgu prouzrokuje povećanje glutamatergičke neurotransmisije (Moghaddam, 1993) te posledičnu ekscitotoksičnost mozga, te se smanjenje broja neurona u PPS modelu i PTSP-u, može objasniti ekscitotoksičnošću glutamata (Chambers et al., 1999).

Harmoničnu funkciju kortikolimbickog sistema, obezbeđuje recipročna interakcija između principnih (piramidnih) neurona i GABA-ergičkih nepiramidalnih interneurona

(Isaacson i Scanziani, 2011). Glavna funkcija GABA-ergičkih neurona je u kontroli ekscitabilnosti piramidalnih neurona. Većina inhibitornih neurona eksprimira najmanje jedan od kalcijum-vezujućih proteina kao što su parvalbumin-PV, kalbindin-CB i kalretinin. Navedeni kalcijum vezujući proteini predstavljaju značajne markere različitih subpopulacija GABA-ergičkih neurona (DeFelipe, 1997). Različite GABA-ergičke subpopulacije interneurona (parvalbumin, kalbindin) ispoljavaju svoju inhibitornu funkciju na nivou tela, aksona ili dendrita neurona u korteksu, hipokampusu i amigdali. GABA-ergički interneuroni mogu inhibirati izlazne signale piramidalnih neurona na nivou inicijalnog segmenta aksona, aksoaksonskim sinapsama, ili regulisati ulazne signale, sinaptičku aktivnost i integraciju na nivou dendrita principalnih neurona, aksodendritskim sinapsama (Szabadits et al., 2007). Intenzivni stresori prouzrokuju funkcionalne i strukturne promene najviše u kortikalnim i limbičkim strukturama zaduženim za emocionalno procesiranje, memoriju i regulaciju emocionalnog odgovora, sa krajnjom svrhom neuroadaptacije biološkog sistema na izmenjeno okruženje (Radley et al., 2006).

Literaturni podaci ukazuju da je disfunkcija kalbindin interneurona, potencijalni patofiziološki mehanizam u mnogim psihijatrijskim oboljenjima, kao što su SCH, depresija, autizam, Alchajmerova bolest i druge (Liu et al., 2016). Heizmann i saradnici (1993) su postavili hipotezu da stresom indukovana redukcija interneurona imunoreaktivnih na kalcijum-vezujuće proteine, ne odgovara gubitku interneurona već smanjenju nivoa ekspresije tih proteina, što je u korelaciji sa smanjenjem nivoa neuronske funkcionalnosti. Schiavone i saradnici (2009) su pokazali statistički značajno smanjenje parvalbumin pozitivnih neurona u prefrontalnom korteksu i nukleus accumbens-u kod pacova izloženim stresoru u vidu socijalne izolacije u odnosu na kontrolne pacove. Smanjenje PV+ neurona je bilo udruženo sa povećanom ekspresijom NADPH oksidaze, povećanim markerima oksidativnog stresa u mozgu, kao i sa bihevioralnim izmenama. Bihevioralne alteracije i oksidativnim stresom izazvano smanjenje PV+ interneurona je prevenirano apocininom, inhibitorom NADPH oksidaze.

Liu i saradnici (2016) su pokazali povećanu ekspresiju NADPH oksidaze i oksidativni stres, udruženi sa progresivnim smanjenjem parvalbumin pozitivnih interneurona u hipokampusu pacova, drugog, četvrtog i sedmog dana nakon izlaganja PPS stresoru. Pacovi izloženi PPS proceduri pokazivali su ponašanje slično anksioznosti u testu

otvorenog polja. Ranom upotrebom apocinina, vrlo brzo nakon PPS procedure, prevenirane su sve navedene stresorom uzrokovane alteracije. Dakle, navedena studija je pokazala koegzistenciju smanjenja ekspresije parvalbumina i manifestacije PTSP simptoma.

Naše istraživanje je takođe pokazalo oksidativni stres i smanjenje PV+ neurona u hipokampusu, uzrokovano PPS stresorom. Mnoge studije pokazuju da disfunkcija ili gubitak PV interneurona prouzrokuje desinhronizaciju neuronskih mreža, te kognitivni deficit i propisihotične efekte u mnogim velikim psihijatrijskim oboljenjima (Liu et al., 2016). PV interneuroni mogu biti preosetljivi na oksidativni stres, i zbog toga što imaju velike energetske potrebe u sklopu visokofrekventnog pražnjenja. Dakle, udeo smanjenja PV ekspresije u hipokampusu u PTSP-u bio bi u alteraciji eksplicitne memorije traumatskog događaja, kao i u naučenim odgovorima na kontekstualne podsetnike na traumu. Smanjenje gustine NeuN+ i PV+ ćelija u girus dentatusu iz našeg istraživanja, bi ukazivalo i na disfunkcionalnost adultne neurogeneze u PTSP-u.

U amigdaloidnom kompleksu smo pokazali povećano eksprimiranu NADPH oksidazu, oksidativni stres i smanjenje gustine PV+ pozitivnih interneurona. Smanjenje inhibitorne sinaptičke transmisije dovodi do redukcije u frekvenci i amplitudi minimalnog inhibitornog presinaptičkog potencijala (mIPSC). Stresorom redukovana GABA-ergička inhibicija u amigdali indukovana glikokortikoidima i noradrenalinom, prouzrokuje pojačanje homosinaptičke i heterosinaptičke dugotrajne potencijacije, te posledično pojačanje formiranja emocionalne memorije (Rainnie et al., 2009). Mnoge farmakološke studije su demonstrirale da inhibitori GABA-ergičke neurotransmisije u amigdali uzrokuju anksigeno ponašanje, kao i pojačanje uslovljavanja strahom i pojačanu aktivaciju traumatskih sećanja (Cole et al., 1995).

Dakle, na osnovu rezultata našeg istraživanja, možemo da pretpostavimo da smanjenje broja ili funkcionalnosti PV+ interneurona u amigdali može biti prouzrokovano oksidativnim stresom porekla NADPH oksidaze a imati veoma važan značaj u patoplastici kliničke slike PTSP-a.

Alteraciju gustine kalbindin imunopozitivnih interneurona, pokazali smo samo u CA1 subregionu hipokampusa, u smislu smanjena ekspresije kod eksperimentalnih pacova, što takođe može ukazivati na preosetljivost navedenih interneurona na oksidativni stres.

Pascual i saradnici (2007) su pokazali smanjenje kalbindin imunopozitivnih interneurona u medijalnom prefrontalnom korteksu pacova tretiranih ranom socijalnom izolacijom.

Naše istraživanje je uključilo i imunohistohemijsku analizu neuropeptida u medijalnom prefrontalnom korteksu, amigdali i hipokampusu mozga pacova, struktura od značaja za PTSP. U amigdali i medijalnom prefrontalnom korteksu pokazali smo povećanu gustinu supstance P (SP) imunopozitivnih neurona, smanjenje galanin (GAL) imunopozitivnih neurona kod pacova tretiranih PPS stresorom u odnosu na kontrolne. U sve tri strukture od značaja za PTSP, nismo našli statistički značajnu razliku u broju enkefalin (ENK) pozitivnih ćelija između eksperimentalne i kontrolne grupe pacova.

Supstanca P je neuropeptid koji pripada porodici tahikinina (neurokinina), a može funkcionisati kao neurotransmiter i/ili neuromodulator. Neurokinini ostvaruju svoje efekte vezivanjem za receptore koji su povezani sa G-proteinom. Supstanca P je široko distribuirana u mozgu sisara, uključujući i regione od značaja za emocionalno procesiranje stresnog stimulusa, anksioznost i afektivitet uopšte, kao što su medijalni prefrontalni korteks, nukleus akumbens, septum, hipokampus, amigdala, hipotalamus, periakveduktalna siva masa, i drugi (Hökfelt et al., 2004). U ovim regionima, supstanca P često koegistira sa ostalim neurokininima i sa "klasičnim" neurotransmiterima, noradrenalinom, serotoninom, GABA, acetiholinom i glutamatom, te ima ulogu u funkcionalnim interakcijama sa navedenim neurotransmiterskim sistemima (Merighi, 2002). Spacijalno preklapanje supstance P sa neurotransmiterima koji su uključeni u regulaciju anksioznosti i raspoloženja, kao što su noradrenalin i serotonin je bilo inspiracija za hipotezu da bi antagonisti receptora supstance P kao što su na primer neurokinin 1 receptor (NK1R) antagonisti mogli imati terapijski efekat u oboljenjima povezanim sa stresom, anksioznim poremećajima i depresivnom poremećaju. Prekliničke studije su potvrdile navedenu hipotezu, tako što je upotrebom NK1 antagonista ili genetskom delecijom NK1R, pokazana alteracija nivoa serotonina i noradrenalina, te anksiolitički i antidepresivni terapijski efekti, ali koji se ipak parcijalno razlikuju od bihevioralnih efekata na animalnim modelima pri primeni klasičnih anksiolitika i antidepresiva (Herpfer et Lieb, 2005), što bi ukazivalo da SP ima i druge autonomne regulacione uloge koje su različite od modulacije serotoninergičke i noradrenergičke neurotransmisije.

Literaturni podaci pokazuju da SP pored navedene involviranosti u anksiozna oboljenja i depresivni poremećaj, takođe moduliše fiziološke i bihevioralne odgovore na stresor. Kada se u animalnim modelima, supstanca P administrira direktno u CNS, dolazi do kardiovaskularnih (Unger et al., 1988) i bihevioralnih odgovora kao što su izmene ponašanja u uzdignutom plus lavirintu, potenciranje refleksa trzanja na zvučne stimulse, vokalizacija indukovana stresom, bežanje (Culman et Unger, 1995), čiji obrasci veoma nalikuju na prirodne odgovore organizma na stresne stimulse. Centralna aplikacija SP kod životinja, proizvodi čitav spektar ponašajnih obrasaca povezanih sa strahom. Sa druge strane, studije pokazuju da fizički i psihološki stresori, indukuju promene sadržaja SP u moždanim regionima koji su uključeni u procesiranje emocija i stresni odgovor, kao što su amigdala, hipokampus, frontalni korteks i hipotalamus (Herpfer et Lieb, 2005).

Ebner i Singewald (2007) su pokazali da stresor u vidu prinudnog plivanja kod budnih i slobodno pokretnih životinja, prouzrokuje porast nivoa supstance P u lokus ceruleus, kao i porast noradrenalina, što takođe potvrđuje modulatornu ulogu SP u noradrenergiji i stresnom odgovoru (Ebner i Singewald, 2007). Boyce i saradnici (2001) su kod mladunaca zamorčeta pokazali inhibiciju vokalizacije prouzrokovane separacijom od majki, intraamigdalarnom aplikacijom inhibitora NK1R. Ebner i saradnici (2004) su na pacovima, mikro-superfuzionim i mikrodijalnim analizama pokazali povećanje ekstracelularne koncentracije supstance P u medijalnom jedru amigdale posle emocionalnog stresora. Pri aplikaciji blagog stresora u vidu uzdignute platforme došlo je do manjeg, tranzijentnog porasta supstance P u amigdali, dok je pri korišćenju imobilizacionog stresora, registrovano produženo i izraženo povećanje supstance P u amigdali. Isti autori su pokazali sa stresom povezane bihevioralne alteracije, tj. anksiozne korelate, koji se manifestuju smanjenjem ukupno provedenog vremena i smanjenjem frekvence ulazaka pacova u otvorene krakove uzdignutog plus lavirinta, kod pacova tretiranih imobilizacionim stresorom. Iste bihevioralne alteracije, pokazane su i intraamigdalarnom aplikacijom supstance P u nestresirane pacove. Intraamigdalarnom aplikacijom NK1R antagonista, prevenirano je imobilizacionim stresorom uzrokovano anksiozno ponašanje. U kliničkim studijama na pacijentima sa velikim depresivnim poremećajem, aplikacija antagonista SP receptora, pokazala je veoma izražene antidepresivne, ali i veoma značajne anksiolitičke efekte (Kramer et al., 1998).

Naše istraživanje je takođe pokazalo povećanu ekspresiju SP imunopozitivnih neurona u amigdaloidnom kompleksu, takođe, povećanu gustinu SP+ neurona pokazali smo i u medijalnom prefrontalnom korteksu kod pacova koji su tretirani PPS stresorom, što sve ukazuje da je supstanca P veoma značajan neurotransmiter/neuromodulator stresa. Registrovano povećanje ekspresije SP u navedenim kortikolimbickim strukturama, pokazuje vrlo značajnu ulogu supstance P u procesiranju emocionalnog stresora i stresnom odgovoru. Takođe, ovakvi rezultati, mogu biti inspiracija farmakološkim studijama sa antagonistima NK receptora kao potencijalnim terapijskim agensima za zbrinjavanje psihijatrijskih oboljenja povezanih sa stresom, uključujući i PTSD.

Naše istraživanje je uključilo i uticaj PPS stresora na gustinu enkefalin imunopozitivnih neurona u tri moždana regiona od značaja za PTSD, tj. mPFK, amigdali i hipokampusu.

Literaturni podaci pokazuju značajnu involviranost endogenog opioidnog sistema u procesiranju stresnog stimulusa i stresnom odgovoru, s obzirom da su opiodi i njihovi receptori značajno distribuirani u regionima mozga od značaja za emocionalno procesiranje i stresni odgovor, kao što su hipokampus, amigdala, hipotalamus i drugi (de Carvalho, 2015).

Mnoge animalne studije demonstriraju promenu ekspresije mRNK prekursora proteina za enkefaline, proenkefalina. Tako naprimer, hronični imobilizacioni stres povećava ekspresiju mRNK za proenkefalin u hipokampusu pacova (Chen et al., 2004). Hronični nepredvidivi stresor kod pacova uzrokuje povećanje ekspresije mRNK za proenkefalin u centralnom jedru amigdale, a smanjuje u bazolateralnom jedru amigdale (Berube et al., 2014). Berube i saradnici (2013) su pokazali smanjenje mRNK proenkefalina u bazolateralnom jedru amigdale kod pacova izloženih hroničnom socijalnom stresu.

Animalni stres modeli takođe pokazuju alteracije nivoa enkefalin peptida u mozgu stresiranih životinja. Naprimer u nukleus akumbens-u u modelu akutnog socijalnog stresa, pokazana je povećana ekstracelularna koncentracija enkefalina (Bertrand et al., 1997). Životinje sa delecijom gena za preproenkefalin pokazuju visoke nivoe anksioznosti u bazalnim uslovima (Bilkei-Gorzo et al., 2004), kao i egzacerbaciju anksioznosti i depresiji sličnog fenotipa posle akutnog stresora (Kung et al., 2010). Postavljena je hipoteza da

enkefalinski deficit može biti značajan patogenetski mehanizam koji doprinosi hipersenzitivnosti osoba koje oboljevaju od PTSP-a.

Jedna klinička studija je pokazala, da pacijenti oboleli od PTSP-a doživljavaju za 30% smanjenje osećaja bola posle izloženosti nekom podsetniku na traumu (Greenberg et al., 1989), što bi ukazivalo da pojačana aktivacija endogenog opioidnog sistema u mozgu na traumatske stimulse ili podsednike na traumu, predstavlja značajan biohemijski put u PTSP-u. Wolf i saradnici (1991) su pokazali da nema značajne razlike u koncentraciji metionin (met)-enkefalina u plazmi obolelih od PTSP-a u odnosu na kontrole, dok je in vitro poluživot degradacije met-enkefalina obolelih od PTSP-a bio duži u odnosu na poluživot met-enkefalina zdravih subjekata, što upućuje na disregulaciju endogenog opioidnog sistema u PTSP-u.

Naše istraživanje nije pokazalo statistički značajnu alteraciju broja ENK+ pozitivnih ćelija ni u jednoj ispitivanoj strukturi od značaja za PTSP, amigdali, mPFC i hipokampusu. Ali s obzirom na literaturne podatke, kod obolelih od PTSP-a nivoi enkefalina i drugih opioidnih neuropeptida mogu biti ekvivalentni sa zdravim subjektima, ali to i dalje ne isključuje hipotezu o disregulaciju opioidnog sistema u PTSP-u.

Naše studija je pokazala da PPS stresor uzrokuje smanjenje broja galanin imunopozitivnih neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu i amigdali, dok u hipokampusu nismo pronašli značajnu alteraciju gustine GAL+ ćelija. Galanin je neuropeptid sa značajnom zastupljenošću u limbičkim regionima kao što su amigdala i hipokampus mozga pacova (Perez et al., 2001). Galanin u mozgu spacijalno koegzistira sa serotoninom i noradrenalinom, dakle sa neurotransmiterima uključenim u emocionalno procesiranje i emocionalne odgovore. Galanin funkcioniše kao inhibitorni neuromodulator navedenih, ali i drugih neurotransmitera (Pieribone et al., 1998). Coumis i Davies (2002) su pokazali da intraperitonealna upotreba agoniste galaninskih receptora kod pacova, prevenira bihevioralne alteracije koje nastaju posle aplikacije stresora u vidu forsiranog plivanja. Galanin inhibira dugotrajnu potencijaciju (LTP) u neuronima indukovanu tetaničkom i teta stimulacijom apikalnih i bazalnih dendrita, ali ne utiče na dugotrajnu depresiju neurona. Smatra se da mehanizam menjanja ekscitabilnosti neurona, galanin ne postiže inhibicijom N-metil-D-aspartatnih (NMDA) ili metabotropnih glutamatnih receptora, već navedene efekte postiže postreceptorskom modifikacijom, na nivou kinaza

koje prevode kratkotrajnu potencijaciju u dugotrajnu. Kinney i saradnici (2009) su u hipokampusu pacova takođe pokazali da galanin funkcioniše kao hiperpolarizujući neurotransmitter/neuromodulator, tako što inhibira LTP u neuronima. Pored inhibicije LTP, galanin takođe inhibira i fosforilaciju ćelijskih transkripcionih faktora (CREB), te alteriše transkripciju određenih gena i modifikuje neuroplastičnost.

Galanin moduliše neuralni, neuroendokrini i simpatički odgovor na stresore. Ekspresija gena za galanin je izmenjena u hipotalamusu, amigdali i locus ceruleus-u posle izlaganja ekstremnim stresorima, kao što su imobilizacija i socijalni stres, ali ne i posle blagih stresnih manipulacija u animalnim modelima (Holmes et al., 2003a). Miševi sa delecijom gena za galanin receptor 1, pokazuju značajno pojačanje anksioznosti sličnog ponašanja u uzdignutom plus lavirintu posle stresne stimulacije (Holmes et al., 2003b). Bing i saradnici (1993) su u jednom animalnom modelu za anksioznost, pokazali da se centralnom administracijom galanina, postižu anksiolitički i sedativni efekti kod pacova.

Kozlovsky i saradnici (2009) su u animalnom modelu sa aplikacijom mirisa predatora, ispitivali nivoe mRNK za galanin u frontalnom korteksu i hipokampusu mozga pacova. Pacovi koji su uključeni u navedeni PTSP animalni model, pokazivali su različite intenzitete bihevioralnih alteracija koje nalikuju na humani PTSP bihevioralni obrazac. Kod pacova sa slabije izraženim PTSP-u sličnim bihevioralnim izmenama, registrovana je povećana ekspresija mRNK za galanin u hipokampalnom CA1 subregionu, dok je kod pacova sa veoma uzraženim PTSP-u sličnim bihevioralnim izmenama, registrovano dugotrajno (i posle sedam dana od izlaganja stresoru) sniženje ekspresije RNK za galanin u CA1 i frontalnom korteksu. Intraperitonealnom aplikacijom galaninskog agoniste Galnona redukovano je stresom indukovano PTSP-u slično ponašanje, regulisan je glikokortikoidni odgovor na stresor i povećani su nivoi serotoninskih, 5HT1 receptora i nivo neuralnog moždanog faktora rasta (BDNF) u hipokampusu pacova izloženih mirisu predatora.

Naša studija je pokazala da ekstreman stresor kao što je PPS procedura indukuje nishodnu regulaciju galaninergičke ekspresije u amigdali i medijalnom prefrontalnom korteksu, strukturama od značaja za procesiranje stresnog stimulusa i za regulaciju stresnog odgovora. Pod pretpostavkom da je smanjena ekspresija galanin imunopozitivnih neurona, posledica smanjene produkcije galanina, možemo zaključiti da smanjenje inhibitorne modulacije galaninom u amigdali i prefrontalnom korteksu, može biti jedan od

patogenetskih mehanizama koji se nalaze u osnovi PTSP-a. Takođe, s obzirom da galanin može biti značajan faktor rezilijentnosti na stresore ili faktor oporavka od stresora, naši rezultati mogu biti inspiracija novim farmakološkim studijama koji bi ispitivale potencijalne korisne efekte galaninskih agonista u lečenju i prevenciji PTSP-a, posle doživljenog traumatskog životnog iskustva.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ovog istraživanja, na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Pojedinačni produženi stres (PPS) uzrokuje oksidativni stres u amigdali i hipokampusu mozga pacova. U obe strukture PPS dovodi do povišenja nivoa malonil-dialdehida i smanjenja nivoa redukovano glutaciona.
2. PPS uzrokuje smanjenje aktivnosti glutacion peroksidaze u hipokampusu i korteksu i smanjenje aktivnosti ukupne superoksid-dizmutaze u amigdali. PPS dovodi do povećanja ekspresije superoksid dizmutaze 1 u korteksu mozga pacova i do povećanja ekspresije superoksid dizmutaze 2 u sve tri ispitivane strukture. PPS stresor nema uticaja na aktivnost katalaze u korteksu, hipokampusu i amigdali mozga pacova.
3. Kod pacova izloženih PPS-u nisu zapažene promene aktivnosti Kompleksa I i citohrom c oksidaze u amigdali i hipokampusu što ukazuje da promene na nivou mitohondrijalnog respiratornog lanca nisu uzrok oksidativnog stresa u ovim strukturama.
4. U amigdalama pacova izloženih PPS-u verovatni uzrok oksidativnog stresa je NADPH oksidaza s obzirom da je u njima zapaženo povećanje ekspresije sve tri subjedinice NADPH oksidaze (gp91phox, p22phox i p67phox).
5. U hipokampusu je pored nepromenjene aktivnosti enzima respiratornog lanca prisutna i neizmenjena ekspresija pojedinih subjedinica NADPH oksidaze u odnosu na kontrolu što upućuje na prisustvo nekog dodatnog izvora slobodnih radikala.
6. Pojedinačni produženi stres dovodi do smanjenja broja NeuN imunopozitivnih neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu, amigdali, CA3 subregionu i girus dentatusu hipokampusa pacova.

7. PPS stresor dovodi do alteracije GABA-ergičkog sistema u mozgu pacova i uzrokuje smanjenje gustine parvalbumin imunopozitivnih interneurona u amigdali i hipokampusu (CA3 i GD subregioni) i smanjenje broja kalbindin imunopozitivnih neurona u CA1 subregionu hipokampalne formacije mozga pacova.

8. PPS stresor prouzrokuje povećanje gustine supstanca P imunopozitivnih neurona i smanjenja galanin imunopozitivnih neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu i amigdali mozga pacova.

9. Pojedinačni produženi stres nema uticaja na enkefalinergički neuromodulatorni sistem u medijalnom prefrontalnom korteksu, amigdali i hipokampusu mozga pacova.

10. Sagledavanje uticaja PPS procedure na NADPH oksidazu i pojedine klase neurona i interneurona u CNS-u može doprineti rasvetljavanju patogeneze ovog poremećaja i sagledavanju novih potencijalnih meta u lečenju ovog kompleksnog oboljenja.

7. LITERATURA

Abercrombie, H.C., Schaefer, S.M., Larson, C.L., Oakes, T.R., Lindgren, K.A., Holden, J.E., Perlman, S.B., Turski, P.A., Krahn, D.D., Benca, R.M., Davidson, R. J., 1998. Metabolic rate in the right amygdala predicts negative affect in depressed patients. *Neuroreport* 9(14), 3301-3307.

Adamec, R., Strasser, K., Blundell, J., Burton P., McKay, D.W., 2006. Protein synthesis and the mechanisms of lasting change in anxiety induced by severe stress. *Behav Brain Res.* 167 (2), 270 –286.

Adolphs, R., Tranel, D., Hamann, S., Young, A.W., Calder, A.J., Phelps, E.A., Anderson, A., Lee, G.P., Damasio, A.R., 1999. Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage. *Neuropsychologia* 37(10), 1111-1117.

Aksić, M., 2015. Morfološke i biohemijske promene u alokorteksu i neokorteksu mozga pacova uslovljene maternalnom deprivacijom. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Beograd.

Aleksić, D., 2017. Morfološke promene u limbičkim strukturama pacova uslovljene maternalnom deprivacijom. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Beograd.

Alzoubi, K.H., Khabour, O.F., Rashid, B.A., Damaj, I.M., Salah, H.A., 2012. The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: the role of oxidative stress. *Behav Brain Res.* 226, 205–210.

American Psychiatric Association, 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). American Psychiatric Pub.

Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Starkov, A. A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.

Aruoma, O. I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 75(2), 199-212.

- Atli, A., Bulut, M., Bez, Y., Kaplan, I., Özdemir, P. G., Uysal, C., Selçuk, H., Sir, A., 2016. Altered lipid peroxidation markers are related to post-traumatic stress disorder (PTSD) and not trauma itself in earthquake survivors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 266(4), 329–36.
- Attari, A., Asgary, S., Naderi, G., Rezayat, A., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant capacity in posttraumatic stress disorder. *J Res Med Sci.* 20(65), 4–6.
- Bedard, K., Krause, K. H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87(1), 245-313.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87, 245–313.
- Ben–Ezra, M., 2004. Trauma in antiquity: 4000 year old post-traumatic reactions?. *Stress Health,* 20(3), 121-125.
- Bertrand, E., Smadja, C., Mauborgne, A., Roques, B. P., Dauge, V., 1997. Social interaction increases the extracellular levels of [Met] enkephalin in the nucleus accumbens of control but not of chronic mild stressed rats. *Neuroscience* 80(1), 17-20.
- Bérubé, P., Laforest, S., Bhatnagar, S., Drolet, G., 2013. Enkephalin and dynorphin mRNA expression are associated with resilience or vulnerability to chronic social defeat stress. *Physiol Behav.* 122, 237-245.
- Bérubé, P., Poulin, J. F., Laforest, S., & Drolet, G., 2014. Enkephalin knockdown in the basolateral amygdala reproduces vulnerable anxiety-like responses to chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology,* 39(5), 1159.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Michel, K., Zimmer, A., Klingmüller, D., Zimmer, A., 2004. Behavioral phenotype of pre-proenkephalin-deficient mice on diverse congenic backgrounds. *Psychopharmacology* 176(3-4), 343-352.
- Bing, O., Möller, C., Engel, J. A., Söderpalm, B., Heilig, M., 1993. Anxiolytic-like action of centrally administered galanin. *Neurosci Lett.*164(1-2), 17-20.

Blake, D. R., Allen, R. E., Lunec, J., 1987. Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. *British medical bulletin*, 43(2), 371-385.

Boiteux, S., Radicella, J. P., 1999. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*, 81(1), 59-67.

Bowling, A.C., Beal, M.F., 1995. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci J*. 56(14), 1151-1171.

Boyce, S., Smith, D., Carlson, E., Hewson, L., Rigby, M., O'donnell, R., Harrison, T., Rupniak, N. M., 2001. Intra-amygdala injection of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs. *Neuropharmacology* 41(1), 130-137.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72(1-2), 248-254.

Bremner, J.D., Randall, P., Scott, T.M., Bronen, R.A., Seibyl, J.P., Southwick, S.M., Innis, I.B., 1995. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 152(7), 973-981.

Bremner, J. D., Vythilingam, M., Vermetten, E., Southwick, S. M., McGlashan, T., Staib, L. H.,... Charney, D. S., 2003. Neural correlates of declarative memory for emotionally valenced words in women with posttraumatic stress disorder related to early childhood sexual abuse. *Biol Psychiatry*, 53(10), 879-889.

Brodmann, K., 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Barth, Leipzig.

Bulut, M., Selek, S., Bez, Y., Karababa, I. F., Kaya, M. C., Gunes, M, Emhan, A., Askoy, N., Sir, A., 2013. Reduced PON1 enzymatic activity and increased lipid hydroperoxide levels that point out oxidative stress in generalized anxiety disorder. *J Affect Disord*. 150(3), 829-833.

Burgess, A.W., Holmstrom, L.L., 1974. Rape trauma syndrome. *Am J Psychiatry* 131(9), 981-986.

Carpagnano, G. E., Kharitonov, S. A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M. P., Gramiccioni, E., Barnes, P. J., 2003. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 124(4), 1386-1392.

Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 157(1), 1-11.

Chambers, R. A., Bremner, J. D., Moghaddam, B., Southwick, S. M., Charney, D. S., Krystal, J. H. 1999. Glutamate and post-traumatic stress disorder: toward a psychobiology of dissociation. *Semin Clin Neuropsychiatry* 4(4), 274-281.

Chandler, L. J., Gass, J. T., 2013. The plasticity of extinction: contribution of the prefrontal cortex in treating addiction through inhibitory learning. *Front Psychiatry* 4, 46.

Charney, D.S., Deutch, A.Y., Krystal, J.H., Southwick, S.M., Davis, M., 1993. Psychobiologic mechanisms of posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 50(4), 295–305.

Chen, J. J., Yu, B. P., 1994. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med.* 17(5), 411-418.

Chen, J. X., Li, W., Zhao, X., Yang, J. X., Xu, H. Y., Wang, Z. F., Yue, G. X., 2004. Changes of mRNA expression of enkephalin and prodynorphin in hippocampus of rats with chronic immobilization stress. *World J Gastroenterol.*10(17), 2547-2549.

Cohen, H., Liberzon, I., Richter-Levin, G., 2009. Exposure to extreme stress impairs contextual odour discrimination in an animal model of PTSD. *J Neuropsychopharmacol.* 12(3), 291-303.

- Cole, B.J., Hillmann, M., Seidelmann, D., Klewer, M., Jones, G.H., 1995. Effects of benzodiazepine receptor partial inverse agonists in the elevated plus maze test of anxiety in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 121, 118–126.
- Corcoran, K. A., Desmond, T. J., Frey, K. A., Maren, S., 2005. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J Neurosci.* 25(39), 8978-8987.
- Coumis, U., Davies, C. H., 2002. The effects of galanin on long-term synaptic plasticity in the CA1 area of rodent hippocampus. *Neuroscience*, 112(1), 173-182.
- Culman, J., Unger, T., 1995. Central tachykinins: mediators of defence reaction and stress reactions. *Can J Physiol Pharmacol.* 73(7), 885-891.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trend Mol Med.* 9(4), 169-176.
- D'almeida, V., Lobo, L. L., Hipólido, D. C., de Oliveira, A. C., Nobrega, J. N., Tufilk, S., 1998. Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport* 9(12), 2853-2856.
- Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., Day, T. A., 2001. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci.* 14(7), 1143-1152.
- de Carvalho, I. M., 2015. Neuropeptides in stress reactivity-Role of enkephalin in response to chronic stress. Doctoral thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Rheinische Friedrich Wilhelms University, Bonn
- DeFelipe, J., 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat.* 14(1), 1-19.

Dejanović, B., 2015. Protektivno dejstvo agmantina od toksičnih efekata izazvanih hlompromazinom kod pacova. Doktorska disertacija, Vojnomedicinska akademija-Medicinski fakultet, Beograd.

DeYoung, C.G., Hirsh, J.B., Shane, M.S., Papademetris, X., Rajeevan, N., Gray, J.R., 2010. Testing predictions from personality neuroscience. Brain structure and the big five. *Psychol Sci.* 21(6), 820-828.

Diehl, L. A., Alvares, L. O., Noschang, C., Engelke, D., Andreazza, A. C., Gonçalves, C.A.S., J 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. *Neuroch Res.* 37(4), 700-707.

Ding, J., Han, F., Shi, Y, 2010. Single-prolonged stress induces apoptosis in the amygdala in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res.* 44(1), 48-55.

Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Radojicic, M. B., 2010. Chronic social isolation compromises the activity of both glutathione peroxidase and catalase in hippocampus of male wistar rats. *Cell Mol Neurobiol* 30(5), 693–700.

Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62, 649–671.

Dunsmoor, J.E., Bandettini, P.A., Knight, D.C., 20. Neural correlates of unconditioned response diminution during Pavlovian conditioning. *Neuroimage* 40, 811 –817.

Ebner, K., Singewald, N. (2007). Stress-induced release of substance P in the locus coeruleus modulates cortical noradrenaline release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 376(1-2), 73-82.

Ebner, K., Rupniak, N. M., Saria, A., Singewald, N., 2004. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proc Natl Acad Sci.* 101(12), 4280-4285.

Ebner, K., Singewald, N., 2006. "The role of substance P in stress and anxiety responses. *J Amino Acids,* 31(3), 251-272.

Ehlers, A., Clark, D.M., 2000. A cognitive model of posttraumatic stress disorder . *Behav Res Ther.* 38(4), 319 – 345 .

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82,70–77.

Falls, W. A., Miserendino, M. J., Davis, M., 1992. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci.* 12(3), 854-863.

Fanselow, M. S.,1991. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In *The midbrain periaqueductal gray matter* (pp. 151-173). Springer, Boston, MA.

Fanselow, M. S., LeDoux , J. E., 1999. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23, 229-232.

Fontana, M., Mosca, L., Rosei, M. A., 2001. Interaction of enkephalins with oxyradicals. *Biochem Pharmacol.* 61(10), 1253-1257.

Friedman, J., 2011. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress?. In *Oxidative stress and free radical damage in neurology* (pp. 19-27). Humana Press.

Szabadits, E., Cserep, C., Ludanyi, A., Katona, I., Gracia-Llanes, J., Freund, T.F., Nyiri, G., 2007. Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *J Neurosci.* 27(30), 8101-11.

Gabbott-Paul, L.A., Dickie- Brian, G.M., Vaid, R.R., Headlam-Anthony, J.N., Bacon, S.J., 1997. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: Morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol.* 377(4), 465-499.

Geuze, E., Westenberg, H. G., Heinecke, A., de Kloet, C. S., Goebel, R., Vermetten, E., 2008. Thinner prefrontal cortex in veterans with posttraumatic stress disorder. *Neuroimage* 41(3), 675-681.

Glatt, S. J., Tylee, D. S., Chandler, S. D., Pazol, J., Nievergelt, C. M., Woelk, C. H., Baker, D.G., Lohr, J.B., Kremen, W.S., Litz, B.T., Tsuang, M. T., 2013. Blood-based

gene-expression predictors of PTSD risk and resilience among deployed marines: A pilot study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 162B(4), 313–26.

Goosens, K.A., Hobin, J.A., Maren, S., 2003. Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? *Neuron* 40, 1013 – 1022.

Góth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.* 196,143-151.

Gray, J.D., Cutler, C.A., Dean, J.G., Kempe, C.H., 1977. Prediction and prevention of child abuse and neglect. *Child Abuse Negl.* 1(1), 45-58.

Greenberg, M. S., Orr, S. P., Pitman, R. K., 1989. Endogenous opioids, stress induced analgesia, and posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacol Bull.* 25(3), 417-421.

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, 444–448.

Gusel'Nikova, V. V., Korzhevskiy, D. E., 2015. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae* 7(2), 42–47.

Halgren, E., Walter, R.D., Cherlow, D.G., Crandall, P.H., 1978. Mental phenomena evoked by electrical stimulation of the human hippocampal formation and amygdala. *Brain* 101, 83-117.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 1999. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press.

Han, F., Yan, S., Shi, Y, 2013. Single-prolonged stress induces endoplasmic reticulum-dependent apoptosis in the hippocampus in a rat model of post-traumatic stress disorder. *PLoS One*, 8(7), e69340.

- Hebb, A. L., Zacharko, R. M., Gauthier, M., Trudel, F., Laforest, S., Drolet, G., 2004. Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice. *Eur J Neurosci.* 20(9), 2415-2429.
- Heim, C., Nemeroff, C.B., 2009. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS Spectr.* 14(1 Suppl 1), 13-24.
- Heizmann, C.W., 1993. Calcium signaling in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 53(1), 15-23.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Cullinan, W. E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24(3), 151-180.
- Herpfer, I., Lieb, K., 2005. Substance P receptor antagonists in psychiatry. *CNS Drugs,* 19(4), 275-293.
- Hess, H.H., Pope, A., 1953. Ultramicrospectrophotometric determination of cytochrome oxidase for quantitative histochemistry. *J Biol Chem.* 204, 295-306.
- Hökfelt, T., Kuteeva, E., Stanic, D., & Ljungdahl, Å., 2004. The histochemistry of tachykinin systems in the brain. In *Tachykinins* (pp. 63-120). Springer Berlin Heidelberg.
- Holmes, A., Heilig, M., Rupniak, N. M., Steckler, T., Griebel, G., 2003a. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 24(11), 580-588.
- Holmes, A., Kinney, J. W., Wrenn, C. C., Li, Q., Yang, R. J., Ma, L., Shine, J., 2003b. Galanin GAL-R1 receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. *Neuropsychopharmacology,* 28(6), 1031.
- Hugues, S., Garci, R., 2007. Reorganization of learning-associated prefrontal synaptic plasticity between the recall of recent and remote fear extinction memory. *Learn Mem.* 14, 520-524.

Ilić, A., Blagotić, M., Malobabić, S., Radonjić, V., Prostran, M., Toševski, J., 2004. Anatomija centralnog nervnog sistema. Savremena administracija, Beograd.

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), 1583-1596.

Isaacson, J.S., Scanziani, M., 2011. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, 72(2), 231-243.

Isenberg, N., Silbersweig, D., Engelien, A., Emmerich, S., Malavade, K., Beattie, B. A., Leon, A.C., Stern, E., 1999. Linguistic threat activates the human amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(18), 10456-10459.

Jakupcak, M., Tull, M. T., 2005. Effects of trauma exposure on anger, aggression, and violence in a nonclinical sample of men. *Violence Vict*. 20(5), 589.

Janssen, A., Trijbels, F., Sengers, R., Randall, R.J., 2007. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem*. 53, 729-734.

Jevtić-Dožudić, G., 2017. Mitohondrijalna disfunkcija u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom-efekat antipsihotika. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Beograd.

Ji, J., Maren, S., 2007. Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus* 17, 749 – 758.

Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., LeDoux, J.E., 2011. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147, 509–524.

Kaličanin, P., Lečić-Toševski, D., 1994. Knjiga o stresu. Medicinska knjiga, Beograd.

Kessler, R. C. (2000). Posttraumatic stress disorder: the burden to the individual and to society. *J Clin Psychiatry* 61(5), 4-14.

Khan, S., Liberzon, I., 2004. Topiramate attenuates exaggerated acoustic startle in an animal model of PTSD. *Psychopharmacology* 172(2), 225-229.

Kim, J. J., Fanselow, M. S., 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675 – 77 .

Kim, J. J., Song, E. Y., Kim, J. J., Song, E. Y., Kosten, T. A., 2006. Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. *Stress* 9(1), 1-11.

Kinney, J. W., Sanchez-Alavez, M., Barr, A. M., Criado, J. R., Crawley, J. N., Behrens, M. M., Bartfai, T., 2009. Impairment of memory consolidation by galanin correlates with in vivo inhibition of both LTP and CREB phosphorylation. *Neurobiol Learn Mem.* 92(3), 429-438.

Klajn, H., Trebješanin, Ž., 1995. *Ratna neuroza Jugoslovena*. Tersit.

Kluver, H., Bucy, P.C., 1939. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry* 42, 979-1000.

Kozlovsky, N., Matar, M. A., Kaplan, Z., Zohar, J., Cohen, H., 2009. The role of the galaninergic system in modulating stress-related responses in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 65(5), 383-391.

Kramer, M. S., Cutler, N., Feighner, J., Shrivastava, R., Carman, J., Sramek, J. J., Reines, S. A., Liu, G., Snavely, D., Wyatt-Knowles, Hale, J. J., 1998. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*, 281(5383), 1640-1645.

Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Ustundag, B., Bulut, S., 2002. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology*, 46(4), 186-189.

Kung, J. C., Chen, T. C., Shyu, B. C., Hsiao, S., Huang, A. C. W., 2010. Anxiety-and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. *J Biomed Sci.* 17(1), 29.

Kung, J.C., Chen, T.C., Shyu, B.C., Hsiao, S., Huang, A.C.W., 2010. Anxiety-and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice:

oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. *J Biomed Sci.* 17(1), 29.

Lakočević, M., Malobabić, S., Očić, G., 2001. Funkcionalna morfoloģija regiona hipokampusa kod viših primata. *Srp Arh Celok Lek.* 129(11-12), 313-318.

Lečić-Toševski, D., (2002). Reakcija na težak stress-posttraumatski stress i akutna stresna reakcija. U: *Urgentna medicina* (ur., Vučović, D.), str. 505-511. Obeležja, Beograd.

LeDoux, J.E., 1996. *The emotional brain: the mysterious underpinnings of emotional life.* Simon and Schuster, New York.

LeDoux, J.E., 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155-184.

Li, Y., Han, F., Shi, Y., 2013. Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Mol Neurosci.* 51(1), 127-137.

Liberzon, I., Garfinkel, S.N., 2009. Functional neuroimaging in post-traumatic stress disorder. In: Shiromani, P.J., et al. (Eds.), *Post-Traumatic Stress Disorder: Basic Science and Clinical Practice.* Humana Press, New York, pp. 297–317.

Liberzon, I., Krstov, M., Young, E. A., 1997. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* 22(6), 443-453.

Liberzon, I., Lopez, J. F., Flagel, S. B., Vazquez, D. M., Young, E. A., 1999. Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance to post-traumatic stress disorder. *J Neuroendocrinol.* 11(1), 11-17.

Liberzon, I., Sripada, C. S., 2007. The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. *Prog Brain Res.* 167, 151-169.

Liu, D. J., Xiao, B., Liu, T. T., Shi, Y. X., Han, F., 2010. Study on COX expression in cerebral prefrontal cortex neuron in PTSD rats under light and electron microscope. *Prog Anat Sci.* 1,1-4.

Liu, F.F., Yang, L. D., Sun, X. R., Zhang, H., Pan, W., Wang, X. M., Yang, J.J., Ji, M.H., Yuan, H.M., 2016. NOX2 mediated-parvalbumin interneuron loss might contribute to anxiety-like and enhanced fear learning behavior in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Mol Neurobiol.* 53(10), 6680-6689.

Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M. K., Yeo, H. C., Mori, A., Ames, B. N., 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *The FASEB J.* 10(13), 1532-1538.

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, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265–275.

Madrigal, J. L., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernández, A. P., Rodrigo, J., Leza, J. C., 2003. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 28(9), 1579-1588.

Maier, C. M., Chan, P. H., 2002. Book review: role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8(4), 323-334.

Maren, S., Quirk, G.J., 2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci.*5, 844 – 852.

Martinović J., 2011. Oksidativni stres i efikasnost antioksidativne zaštite kod kategorisanih sportista. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet, Beograd.

Masood, A., Nadeem, A., Mustafa, S. J., O'Donnell, J. M., 2008. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 326(2), 369-379.

Mejia-Carmona, G. E., Gosselink, K. L., de la Rosa, L. A., Pérez-Ishiwara, G., Martínez-Martínez, A., 2014. Evaluation of antioxidant enzymes in response to predator odor stress in prefrontal cortex and amygdala. *Neurochem J*, 8(2), 125-128.

Mejia-Carmona, G. E., Gosselink, K. L., Pérez-Ishiwara, G., Martínez-Martínez, A., 2015. Oxidant/antioxidant effects of chronic exposure to predator odor in prefrontal cortex, amygdala, and hypothalamus. *Mol Cell Biochem.* 406(1-2), 121-129.

Merighi, A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol.* 66(3), 161-190.

Michels, L., Schulte-Vels, T., Schick, M., O’Gorman, R. L., Zeffiro, T., Hasler, G., Mueller-Pfeiffer, C., 2014. Prefrontal GABA and glutathione imbalance in posttraumatic stress disorder: preliminary findings. *Psychiatry Res.* 224(3), 288-295.

Mićić, D.V., Petronijevic, N.D., 2000. Acetylcholinesterase activity in the mongolian gerbil brain after acute poisoning with aluminum. *J Alzheimers Dis.* 2, 1–6.

Milad, M. R., Quirk, G. J., 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction . *Nature* 420 , 70 – 74 .

Milad, M.R., Quirk, G.J., 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420(6911), 70-74.

Mithoefer, M. C., Wagner, M. T., Mithoefer, A. T., Jerome, L., Doblin, R., 2011. The safety and efficacy of±3, 4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study. *J Psychopharmacol.* 25(4), 439-452.

Moghaddam, B., 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* 60(5), 1650-1657.

Möller, M., Du Preez, J. L., Emsley, R., Harvey, B. H., 2011. Isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating and social interaction in rats are related to cortico-striatal oxidative stress, and reversed by sub-chronic clozapine administration. *Eur Neuropsychopharmacol.* 21(6), 471-483

Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D. B., Budni, J., de Freitas, A. E., Farina, M., Rodrigues, A. L. S., 2012. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine,

reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res.* 46(3), 331-340.

Morey, R. A., Gold, A. L., LaBar, K. S., Beall, S. K., Brown, V. M., Haswell, C. C., McCarthy, G., 2012. Amygdala volume changes in posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veterans group. *Arch Gen Psychiatry* 69(11), 1169-1178.

Muller, J.F., Mascagni, F., McDonald, A.J., 2006. Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J Comp Neurol.* 494(4), 635-650.

Murray, E. A., Wise, S. P., Graham, K. S., 2016. The evolution of memory systems: ancestors, anatomy, and adaptations. Oxford University Press.

Oh, S. M., Betz, A. L., 1991. Interaction between free radicals and excitatory amino acids in the formation of ischemic brain edema in rats. *Stroke* 22(7), 915-921.

Orr, S.P., Metzger, L.J., Lasko, N.B., Macklin, M.L., Peri, T., Pitman, R.K. (2000). De novo conditioning in trauma-exposed individuals with and without posttraumatic stress disorder. *J Abnorm Psychol.* 109(2), 290-298.

Pascual, R., Zamora-Leon, P., Catalan-Ahumada, M., Valero-Cabre, A., 2007. Early social isolation decreases the expression of calbindin D-28k and dendritic branching in the medial prefrontal cortex of the rat. *Int J Neurosci.* 117(4), 465-476.

Patel, R., McIntosh, L., McLaughlin, J., Brooke, S., Nimon, V., Sapolsky, R., 2002. Disruptive effects of glucocorticoids on glutathione peroxidase biochemistry in hippocampal cultures. *J Neurochem.* 82, 118–25.

Patel, R., Spreng, R. N., Shin, L. M., Girard, T. A., 2012. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and beyond: a meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(9), 2130-2142.

Patki, G., Solanki, N., Atrooz, F., Allam, F., Salim, S., 2013. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res.* 1539, 73-86.

- Paulus, M.P., Stein, M.B., 2006. An insular view of anxiety. *Biol Psychiatry* 60, 383–387.
- Pavlović, D., 2011. *Neuropsihologija sa osnovama bihevioralne neurologije*. Beograd: Kaligraf.
- Paxinos, G., Watson, C., 2014. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (7th ed). San Diego: Academic Press.
- Pérez, S. E., Wynick, D., Steiner, R. A., Mufson, E. J.. 2001. Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. *J Comp Neurol*. 434(2), 158-185.
- Phelps, E. A., Delgado, M. R., Nearing, K. I., LeDoux, J. E., 2004. Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. *Neuron* 43(6), 897-905.
- Phillips, M.L., Young, A. W., Scott, S., Calder, A.J., Andrew, C., Giampietro, V., Williams, S.C., Bullmore, E.T., Brammer M., Gray, J.A., 1998. Neural responses to facial and vocal expressions of fear and disgust. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 265, 1809-1817.
- Pieper, J., Baker, D.G., Mahasin, S., Huang, M.X., 2017. Co-morbid PTSD with mTBI is associated with increased amygdala volume compared to mTBI alone in military-trained individuals. Conference paper: Sports Concussion Conference, American Academy of Neurology, At Jacksonville, FL.
- Pieribone, V. A., XU, Z. Q. D., Zhang, X. U., Hökfelt, T., 1998. Electrophysiologic effects of galanin on neurons of the central nervous system. *Ann NY Acad Sci*. 863(1), 264-273.
- Pissiota, A., Frans, Ö., Fernandez, M., von Knorring, L., Fischer, H., Fredrikson, M., 2002. Neurofunctional correlates of posttraumatic stress disorder: a PET symptom provocation study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 252(2), 68-75.
- Pitkänen, A., Savander, V., LeDoux, J. E., 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci*. 20(11), 517-523.
- Preston, G., Kirdar, F., Kozicz, T., 2018. The role of suboptimal mitochondrial function in vulnerability to post-traumatic stress disorder. *J Inherit Metab Dis*. 1-12.

Preuss, T.M., Goldman-Rakic, P.S., 1991. Myelo- and cytoarchitecture of the granular frontal cortex and surrounding regions in the strepsirhine primate Galago and the anthropoid primate Macaca. *J Comp Neurol.* 310(4), 429-474.

Preuss, T.M., 1995. Do rats have prefrontal cortex? The rose-woolsey-akert program reconsidered. *J Cogn Neurosci.* 7(1), 1-24.

Quirk, G.J., Russo, G.K., Barron, J.L., Lebron, K., 2000. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *J Neurosci.* 20(16), 6225-6231.

Radley, J.J., Arias, C.M., Sawchenko, P.E., 2006. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci.* 26(50), 12967-76.

Rainnie, D. G., Ressler, K. J., 2009. Physiology of the Amygdala: Implications for PTSD. In *Post-Traumatic Stress Disorder* (pp. 39-78). Humana Press.

Ramanathan, L., Gulyani, S., Nienhuis, R., Siegel, J.M., 2002. Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *NeuroReport* 13, 1387–1390.

Rauch, S. L., Shin, L. M., Phelps, E. A., 2006. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research—past, present, and future. *Biol psychiatry* 60(4), 376-382.

Rauch, S. L., van der Kolk, B. A., Fisler, R. E., Alpert, N. M., Orr, S. P., Savage, C. R., ... & Pitman, R. K., 1996. A symptom provocation study of posttraumatic stress disorder using positron emission tomography and script-driven imagery. *Arc Gen Psychiatry* 53(5), 380-387.

Rauch, S.L., Shin, L.M., Whalen, P.J., Pitman, R.K., 1998. Neuroimaging and the neuroanatomy of PTSD. *CNS Spectr* 3 (Suppl. 2), 30–41.

Reed, D. J., 1986. Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol.* 35(1), 7-13.

Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjö BK., 1980. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem.* 34,1630–1638.

Richter-Levin, G., 1998. Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Res.* 79 (1), 73 – 83.

Rivas-Arancibia, S., Gallegos-Ríos, C., Gomez-Crisostomo, N., Ferreira-Garcidueñas, E., Briseño, D. F., Navarro, L., Rodríguez-Martínez, E., 2011. Oxidative stress and neurodegenerative disease. In *Neurodegenerative Diseases-Processes, Prevention, Protection and Monitoring*. InTech.

Rosen, J.B., Schulkin, J., 1998. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev.* 105, 325 – 50.

Russchen, F.T., Amaral, D.G., Price, J.L., 1985a. The afferent connections of the substantia innominata in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol.* 242, 1-27.

Russchen, F.T., Bakst, I., Amaral, D.G., Price J.L., 1985b. The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Res.* 329(1-2), 241-257.

Sadock, B.J., Sadock, V.A., Luiz, P., 2015. *Kaplan and Sadock's synopsis of psychiatry: Behavioral sciences/clinical psychiatry*. Lippincot/ Williams & Wilkins.

Sah, P., Faber, E.S., Lopez De Armentia, D., Power, J., 2003. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol Rev.* 83, 803-834.

Şahin, E., Gümüşlü, S., 2004. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res.* 155(2), 241-248.

Salim, S., Asghar, M., Chugh, G., Taneja, M., Xia, Z., Saha, K., 2010. Oxidative stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. *Brain Res.* 1359, 178-185.

Sanders, M. J., Wiltgen, B. J., Fanselow, M.S., 2003. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol.* 463, 217 – 23 .

Sato, H., Takahashi, T., Sumitani, K., Takatsu, H., Urano, S., 2010. Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. *J Clin Biochem Nutr.* 47(3), 224-232.

Schiavone, S., Sorce, S., Dubois-Dauphin, M., Jaquet, V., Colaianna, M., Zotti, M., Cuomo, V., Trabace, L., Krause, K.H., 2009. Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats. *Biol Psychiatry* 66(4), 384-392.

Schiavone, S., Sorce, S., Dubois-Dauphin, M., Jaquet, V., Colaianna, M., Zotti, M., Cuomo, V., Trabace, L., Krause, K.H., 2009. Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats. *Biol Psychiatry*, 66(4), 384-392.

Seidel, K., Helmeke, C., Poeggel, G., Braun, K., 2008. Repeated neonatal separation stress alters the composition of neurochemically characterized interneuron subpopulations in the rodent dentate gyrus and basolateral amygdala. *Dev Neurobiol.* 68(9),1137-1152.

Shin, L.M., Orr, S.P., Carson, M.A., Rauch, S.L., Macklin, M.L., Lasko, N.B., 2004. Regional cerebral blood flow in amygdala and medial prefrontal cortex during traumatic imagery in male and female Vietnam veterans with PTSD. *Arch Gen Psychiatry* 61, 168 – 176.

Shin, L.M., Wright, C.I., Cannistraro, P., Wedig, M., McMullin, K., Martis, B.,... Rauch, M.D., 2005. An fMRI study of amygdala and medial prefrontal cortex responses to overtly presented fearful faces in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62 (83), 273– 281.

Shiromani, P. J., 2009. Post-traumatic stress disorder: basic science and clinical practice. New York: Humana Press.

Sorce, S., Krause, K. H., 2009. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal.* 11(10), 2481-2504.

Sotres-Bayon, F., Bush, D. E., LeDoux, J. E., 2004. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. *Learn Mem.* 11(5), 525-535.

Souza, R. R., Noble, L. J., McIntyre, C. K., 2017. Using the single prolonged stress model to examine the pathophysiology of PTSD. *Front Pharmacol.* 8, 615.

Stahl, S. M., 2013. *Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications.* Cambridge university press.

Stein, M. B., Koverola, C., Hanna, C., Torchia, M. G., McClarty, B., 1997. Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol Med.* 27(4), 951-959.

Stojković, T., Radonjić, N.V., Velimirović, M., Jevtić, G., Popović, V., Doknić, M., Petronijević, N.D., 2012. Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39(1), 192-199.

Sullivan, R. M., Gratton, A., 1998. Relationships between stress-induced increases in medial prefrontal cortical dopamine and plasma corticosterone levels in rats: role of cerebral laterality. *Neuroscience* 83(1), 81-91.

Sun, M., Zigman, S., 1978. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 90, 81-89.

Trimble, M. R., 1981. *Post-traumatic neurosis: From railway spine to the whiplash.* John Wiley & Sons.

Tull, M. T., Gratz, K. L., Salters, K., Roemer, L., 2004. The role of experiential avoidance in posttraumatic stress symptoms and symptoms of depression, anxiety, and somatization. *J Nerv Ment Dis.* 192(11), 754-761.

Tylee, D. S., Chandler, S. D., Nievergelt, C. M., Liu, X., Pazol, J., Woelk, C. H., Lohr, J.B., Kremen, W.S., Baker, D.G., Glatt, S.J., Tsuang, M. T., 2015. Blood-based gene-expression biomarkers of post-traumatic stress disorder among deployed marines: a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 51, 472-494.

Uljarević, M., Nešić, M., 2008. Uloga pojedinih struktura mozga u percepciji i ekspresiji emocija. *Godišnjak za psihologiju* 5, 41-62.

Ulrich-Lai, Y. M., Herman, J. P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10(6), 397-409.

Unger, T., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R. E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H., Veelken, R., 1988. Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ Res.* 63(4), 812-820.

Uylings, H.B., Groenewegen, H.J., Kolb, B., 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res.* 146(1-2), 3-17.

Uysal, N., Gonenc, S., Acikgoz, O., Pekçetin, Ç., Kayatekin, B. M., Sonmez, A., Semin, I., 2005. Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. *Neurosci Lett.* 384(1-2), 98-101.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1), 44-84.

Venarucci, D., Venarucci, V., Vallese, A., Battila, L., Casado, A., la Torre De, R., Lopez, M. F., 1999. Free radicals: important cause of pathologies refer to ageing. *Panminerva Med* 41(4), 335–339.

Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S. L., Quirk, G. J., 2006. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem.* 13(6), 728-733.

Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., Levine, A., Alkadhi, K., Salim, S., 2011. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav Brain Res.* 224(2), 233-240.

Walker, D.L., Davis, M., 2002. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fearpotentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav.* 71, 379 – 392.

Walker, L.E., 1980. *The battered woman.* New York: Harper & Row.

Wallace, D.C., 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad Sci U S A* 91 (19), 8739–8746.

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. *Methods Neuroch.* 2, 1-52.

Wilson, A., Brooks, D.C., Bouton, M. E., 1995. The role of the rat hippocampal system in several effects of context in extinction . *Behav Neurosci* 109, 255 – 260 .

Wilson, C.B., Mclaughlin, L.D., Nair, A., Ebenezer, P.J., Dange, R., & Francis, J., 2013. Inflammation and oxidative stress are elevated in the brain, blood, and adrenal glands during the progression of post-traumatic stress disorder in a predator exposure animal model. *PLoS One* 8 (10), e76146.

Wolf, M. E., Mosnaim, A. D., Puente, J., Ignacio, R., 1991. Plasma methionine-enkephalin in PTSD. *Biol Psychiatry*, 29(3), 305-307.

Woodward, S. H., Kaloupek, D. G., Streeter, C. C., Martinez, C., Schaer, M., Eliez, S., 2006. Decreased anterior cingulate volume in combat-related PTSD. *Biol Psychiatry* 59(7), 582-587.

World Health Organization, 2010. International statistical classification of diseases and related health problems: tenth revision. World Health Organization.

Yamamoto, S., Morinobu, S., Takei, S., Fuchikami, M., Matsuki, A., Yamawaki, S., Liberzon, I., 2009. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 26(12), 1110-1117.

Yang, Y., Raine, A., 2009. Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. *Psychiatry Res.* 174(2), 81-88.

Yehuda, R., Boisoneau, D., Lowy, M.T., Giller, E.L., 1995. Dose-response changes in plasma cortisol and lymphocyte glucocorticoid receptors following dexamethasone

administration in combat veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 583–593.

Yehuda, R., LeDoux, J., 2007. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron* 56 (1), 19 – 32.

Zieker, J., Zieker, D., Jatzko, A., Dietzsch, J., Nieselt, K., Schmitt, A., Bertsch, T., Fassbender, K., Spanagel, R., Northoff, H., Gebicke-Haerter, P. J., 2007. Differential gene expression in peripheral blood of patients suffering from post-traumatic stress disorder. *Mol Psychiatry* 12(2), 116–8.

SPISAK SKRAĆENICA

ACTH	adrenokortikotropni hormon
AP-1	aktivator protein 1
ATP	adenozin trifosfat
BAX	Bcl-2 asociran protein X
Bcl-2	B-ćelijski limfom 2
BS	bezuslovni stimulus
BSA	serumski albumin govečeta
BSO	L-butionin-(S,R)-sulfoksimin
CAT	katalaza
CB	kalbindin
COX	citohrom c oksidaza
CREB	celularni transkripcioni faktori
CRF	kortikotropin oslobađajući faktor
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DCFH	2'7'-dihlorfluorescin
DCIP	2,6-dihlorindofenol
DSM	dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje
DTBN	5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina
ENK	enkefalin
ERK	kinaza regulisana ekstracelularnim signalima
GABA	gama amino buterna kiselina
GAL	galanin
GD	girus dentatus
GPx	glutation peroksidaza
GRP	protein regulator glukoze
GSH	redukovani glutation
GSSH	glutation disulfid

GST	glutation S transferaza
GSTM 1	glutation S transferaza $\mu(mi)1$
GTP	guanozin trifosfat
H ₂ O ₂	hidrogen peroksid
HNE	4-hidroksi-2-noneal
HOCl	hipohlorna kiselina
HPA	hipotalamus-pituitarna žlezda-adrenala žlezda
IL-6	interleukin 6
JNK	c-jun NH ₂ -terminal kinaza
LTP	dugotrajna potencijacija
MDA	malondialdehid
mIPSP	minimalni inhibitorni postsinaptički potencijal
MKB	međunarodna klasifikacija bolesi
mPFK	medijalni prefrontalni korteks
MRI	magnetna rezonanca imidžing
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NeuN	specifični neuronski nuklearni protein
NF- $\kappa\beta$	nuklearni faktor kapa beta
NK1	neurokinin 1
NK1R	neurokinin 1 receptor
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO [•]	azot monoksidni radikal
NOS	nitrit oksid sintaza
NOX	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
O ₂ ^{-•}	superoksidni anjon
O ₃	ozon
OH [•]	hidroksil radikal
ONOO ^{-•}	peroksinitrit
PBS	fosfatom puferisani fiziološki rastvor
PET	pozitron emisiona tomografija

PFK	prefrontalna kora
PPS	pojedinačni produženi stres
PV	parvalbumin
PVN	paraventrikularno jedro
RAC 2	sa RAS-om povezan C3 supstrat botulin toksina 2
RAC1a	sa RAS-om povezan C3 supstrat botulin toksina 1a
RO [•]	alkoksi radikal
ROO [•]	peroksi radikal
ROOH [•]	hidroperoksi radikal
ROS	reaktivne kiseonične vrste
SOD	superoksid dizmutaza
SP	supstanca P
TBA	tiobarbiturna kiselina
TBARS	reaktivna jedinjenja 2-tiobarbiturne kiseline
TNF- α	faktor tumorske nekroze- α
TXR	tioedoksin reduktaza
US	uslovni stimulus
¹ O ₂ ,	singletni kiseonik
4-HNE	4-hidroksi-2-noneal
8-OHG	8-hidroksiguanozin

BIOGRAFIJA AUTORA

Romana Lj. Petrović je rođena 24.03.1974. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu je završila sa titulom najboljeg učenika u generaciji. Medicinski fakultet u Beogradu je upisala 1993. godine i završila sa prosečnom ocenom 9.03.

Zvanje magistra medicinskih nauka na Medicinskom fakultetu u Beogradu, u oblasti neuropsihologije, stekla je 2010 godine, na temu "Prevalencija demencija starih osoba u Gerontološkom centru Beograda".

Specijalistički ispit iz psihijatrije položila 2017. godine sa odličnom ocenom.

Prethodno zaposlena u Službi hitne medicinske pomoći, a od 2010. zaposlena na Klinici za psihijatrijske bolesti "Dr Laza Lazarević" u jedinici Intenzivne psihijatrijske nege II, na poslovima lekara specijaliste psihijatra.

Autor i koautor više radova i učesnik u mnogobrojnim radionicama, međunarodnim i domaćim kongresima iz urgentne medicine i psihijatrije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Romana Lj. Petrović

Број индекса

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Morfološke i biohemijske promene u prefrontalnom koraksu, amigdaloidnom te u hipokampalnoj formaciji mozga pacova uslovljene pojedinačnim produženim stresom

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

Потпис аутора

У Београду, 19.06.2018.

Petrović Romana

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Romana Lj. Petrović

Број индекса

Студијски програм

Наслов рада: Морфолошке и биохемијске промене у префронталном кортексу, амигдалоидном телу и хипокампусној формацији мозга pacова условљене појединачним продуженим стресом

Ментор: Prof. dr Nataša Petronijević

Коментар: Prof. dr Laslo Puškaš

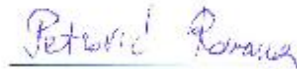
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 19.06.2018.



Изјава о коришћењу

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

Morfološke i biohemijske promene u prefrontalnom korteksu, amigdaloidnom telu i hipokampalnoj formaciji mozga pacova uslovljene pojedinačnim produženim stresom

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 19.06.2018.

Petrović Roman