

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Željka N. Brkić

**POVEZANOST FOSFORILACIONOG STATUSA
GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA I
PONAŠANJA PACOVA OBA POLA U
NEUROINFLAMATORNOM MODELU DEPRESIJE**

Doktorska disertacija
Beograd, 2019.

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Željka N. Brkić

**POVEZANOST FOSFORILACIONOG STATUSA
GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA I
PONAŠANJA PACOVA OBA POLA U
NEUROINFLAMATORNOM MODELU DEPRESIJE**

Doktorska disertacija
Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Željka N. Brkić

**THE ASSOCIATION OF GLUCOCORTICOID
RECEPTOR PHOSPHORYLATION STATUS AND
BEHAVIOR OF RATS OF BOTH SEXES IN
NEUROINFLAMMATORY MODEL OF DEPRESSION**

Doctoral Dissertation
Belgrade, 2019.

MENTORI I ČLAN KOMISIJE

Mentori

dr Miroslav Adžić, viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke Vinča

prof. dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Član komisije

dr Iva Lukić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke Vinča

Datum odbrane

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Definisanje klastera molekularnih biomarkera za poboljšanje i terapiju poremećaja raspoloženja“ (III41209) pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Miroslavu Adžiću, na ukazanom poverenju, uloženom trudu i vremenu, korisnim savetima i sugestijama u svim fazama izrade ove disertacije.

Veliko hvala prof. dr Nadeždi Nedeljković na svojoj pomoći koju mi je pružila tokom doktorskih studija, kao i na korisnim sugestijama, vremenu i trudu koje je uložila tokom čitanja ove doktorske disertacije.

Dragoj kolegini dr Ivi Lukić želim da zahvalim na pruženim savetima i pomoći, koji su mi naročito značili na početku mog naučnog rada, kao i na svim korisnim savetima i sugestijama pruženim tokom izrade i čitanja ove disertacije.

Svojim kolegicama Ester, Zorici, Minji i Emiliji i kolegi Milošu dugujem zahvalnost za pomoć i podršku u svakodnevnom radu.

Zahvaljujem svojoj porodici na podršci i ljubavi koju mi uvek pružaju.

POVEZANOST FOSFORILACIONOG STATUSA GLUKOKORTIKOIDNOG RECEPTORA I PONAŠANJA PACOVA OBA POLA U NEUROINFLAMATORNOM MODELU DEPRESIJE

Sažetak

Medijatori inflamacije imaju značajnu ulogu u patogenezi depresije. Jedan od načina na koje inflamacija utiče na nastanak ovog oboljenja jeste putem uticaja na hipotalamo-hipofizno-nadbubrežnu (HPA) osu i krajnje produkate aktivnosti ove ose, glukokortikoide. Glukokortikoidi se u ćelijama vezuju za glukokortikoidni receptor (GR), ligand-zavisani transkripcioni faktor, koji nakon vezivanja glukokortikoida prelazi iz citoplazme u jedro i mitohondrije, gde reguliše ekspresiju velikog broja gena. Aktivnost GR-a je regulisana i kompleksnim obrascem fosforilacija koje mogu da utiču na transkripcionu aktivnost ovog receptora. Pored toga što modulišu ekspresiju jedarnih gena, GR i njegove fosfoforme utiču i na mitohondrijske procese, i na taj način mogu da budu uključeni u proces apoptoze. Značajnu ulogu u nastanku ovog oboljenja ima i pol – kod žena se depresija javlja duplo češće nego kod muškaraca.

Uzimajući u obzir navedene podatke, u ovoj tezi je ispitan uticaj sedmodnevnog tretmana inflamatornim agensom, lipopolisaharidom (LPS), na nivoe i fosforilacioni status GR-a u citosolu, jedru i mitohondrijama prefrontalnog korteksa (PFC) i hipokampusa mužjaka i ženki pacova *Wistar* soja koji pokazuju depresivno ponašanje. Takođe, u citosolu i jedru su praćeni i nivoi košaperona GR-a i kinaza uključenih u njegovu fosforilaciju, dok su u citosolu i mitohondrijama praćeni nivoi nekoliko kaspaza i članova BCL-2 proteinske porodice uključenih u regulaciju apoptoze. Dalje, kako bi se utvrdili efekti promena u fosforilaciji na gensku ekspresiju, praćeni su i nivoi iRNK nekoliko jedarnih i mitohondrijskih gena koji su regulisani ovim receptorom i koji su uključeni u parofiziologiju depresije.

Rezultati ove studije su pokazali da promene uočene u glukokortikoidnoj signalizaciji izazvane LPS-om utiču na procese uključene u nastanak depresije na tkivno- i polno- specifičan način. Kod mužjaka, poremećaji u glukokortikoidnoj signalizaciji su bili praćeni promenama koje ukazuju na smanjenu neuroplastičnost i neuroinflamaciju i povišenu oksidativnu fosforilaciju u PFC-u. Sa druge strane, promene u glukokortikoidnoj signalizaciji u hipokampusu su bile praćene promenama koje ukazuju na poremećenu serotoninsku neurotransmisiju i narušene neuroendokrine

precise. Kada su u pitanju ženke, rezultati ove studije su pokazali da je LPS poremetio glukokortikoidnu signalizaciju samo u hipokampusu, gde je doveo do smanjene transkripcije gena uključenih u neuroinflamaciju, neuroendokrinu funkciju, serotononsku neurotransmisiju, neuroplastičnost i oksidativnu fosforilaciju.

Ključne reči: lipopolisaharid, depresivno ponašanje, pol, prefrontalni korteks, hipokampus, glukokortikoidni receptor, mitohondrijski signaling

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

THE ASSOCIATION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR PHOSPHORYLATION STATUS AND BEHAVIOR OF RATS OF BOTH SEXES IN NEUROINFLAMMATORY MODEL OF DEPRESSION

Abstract

Inflammatory mediators play a significant role in the pathogenesis of depression. One of the ways in which inflammation can influence the onset of this disease is by affecting the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and the levels of glucocorticoids, the end-products of the activity of this axis. Glucocorticoids bind to the glucocorticoid receptor (GR), a ligand-dependent transcription factor that, upon glucocorticoid binding, translocates from the cytoplasm to the nucleus, where it regulates the expression of a large number of genes. GR activity is also regulated by a complex pattern of phosphorylations that affect the transcriptional activity of the receptor. In addition to modulating the expression of nuclear genes, GR and its phosphoforms also affect mitochondrial processes, and may be involved in the process of apoptosis. Sex also plays a significant role in the onset of the disease - in women, depression occurs twice as often as in men.

Considering these data, in this study we investigated the effect of the seven-day treatment with an inflammatory agent, lipopolysaccharide (LPS), on the levels and phosphorylation status of GR in the cytosol, nucleus and mitochondria of the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus of male and female Wistar rats with depressive-like behavior. We also measured the levels of GR co-chaperones and kinases involved in its phosphorylation in cytosol and nucleus, together with the levels of several caspases and members of the BCL-2 protein family involved in the regulation of apoptosis in the cytosol and mitochondria. In order to determine the effects of changes in phosphorylation on gene expression, the mRNA levels of several nuclear and mitochondrial genes regulated by this receptor and involved in the pathophysiology of depression were also measured.

The results of this study showed that changes observed in glucocorticoid signaling induced by LPS were associated with processes involved in the onset of depression in a tissue- and sex-specific manner. In males, alterations in glucocorticoid signaling were followed by alterations that suggest decreased neuroplasticity and

neuroinflammation, increased oxidative phosphorylation in PFC. On the other hand, alterations in glucocorticoid signalling detected in hippocampus were followed by changes that imply disrupted serotonin neurotransmission and neuroendocrine processes. As for females, the results of this study indicate that LPS disrupted glucocorticoid signaling only in the hippocampus, where it reduced transcription of genes involved in neuroinflammation, neuroendocrine function, serotonin neurotransmission, neuroplasticity and oxidative phosphorylation.

Key words: lipopolysaccharide, depressive-like behavior, sex, prefrontal cortex, hippocampus, glucocorticoid receptor phosphorylation, mitochondrial signaling

Research area: Biology

Research field: Neurobiology

SPISAK SKRAĆENICA

ACTH – adrenokortikotropni hormon

AF-1 – transaktivirajući domen 1

ALL – limfoblasti akutne leukemija

AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

ANOVA – analiza varijanse

AP-1 – proteinski aktivator 1

BAD – eng. *BCL-2 associated agonist of cell death*

Bag1 – eng. *BCL-2 associated athanogene1*

BAK – eng. *BCL-2 homologous antagonist/killer*

BAX – eng. *BCL-2 associated X protein*

BCL-2 – eng. *B-cell lymphoma 2*

BCL-xL – eng. *B-cell lymphoma-extra large*

BDNF – neurotrofni moždani faktor

BID – eng. *BH3 interacting-domain death agonist*

BIM – eng. *BCL-2-like protein 11*

BSA – albumin iz goveđeg seruma

CBG – kortikosteroid-vezujući globulin

CDK – ciklin-zavisna kinaza

CNS – centralni nervni sistem

COX-2 – ciklooksigenaza-2

COX-1/-3 – citohrom C oksidaze-1/-3

CREB – eng. *cAMP response element-binding*

CRH – kortikotropni oslobađajući hormon

CRP – C-reaktivni protein

DBD – domen zadužen za vezivanje za DNK

DEX – deksametazon

DSM – eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

DST – test supresije deksametazonom

DTT – ditiotreititol

EDTA – etilen diamino-tetrasirćetna kiselina

EGTA – etilen glikol-bis(β -aminoetil etar)-N,N,N',N'-tetrasirćetna kiselina

EKT – elektrokonvulzivna terapija
EPMT – test uzdignutog plus lavirinta
ERK – kinaze regulisane vanćelijskim signalima
FasL – Fas ligand
FDA – Agencija *Food and drug administration*
FKBP – FK506-vezujući protein
FST – test prinudnog plivanja
GABA- γ – aminobuterna kiseselina
GILZ – leucinski rajsferšlus indukovan glukokortikoidima
GR – glukokortikoidni receptor
GRE –DNK sekvence regulisane glukokortikoidima
GWAS – studije asocijacije polimorfizama na nivou genoma
HPA osa – hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osa
hsp – protein toplotnog šoka
ICD – eng. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*
IDO – indolamin 2,3-dioksigenaza
I κ B – inhibitor NF- κ B
IKK β – kinaza koja fosforiliše I κ B
IL-1 β – interleukin-1 beta
IL-6 – interleukin-6
INF- α – interferon alpha
IRF – faktor regulacije transkripcije interferona
JNK – c-Jun N-terminalna kinaza
KMB – krvno-moždana barijera
LBD – domen zadužen za vezivanje liganda
LPS – lipopolisaharid
MAPK – proteinske kinaze aktivirane mitogenima
MCL-1– eng. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein-1*
MKK – kinaza MAPK-a
MKP – fosfataza MAPK
mtDNK – mitohondrijska DNK
NO – azot-monooksid
NF κ B – jedarni faktor kappa B

nGRE – DNK sekvence negativno regulisane glukokortikoidima
NMDA – N-metil-D-aspartat
NSAIDs – nesteroidni antiinflamatorni lekovi
NTD – N-terminalni domen
OFT – test otvorenog polja
PARP – poli (ADP-riboza) polimeraza
PBS – natrijum/fosfatni pufer
PP5 – proteinska fosfataza 5
PFC – prefrontalni korteks
PVN – paraventrikularno jedro
qRT-PCR – kvantitativni PCR u realnom vremenu
ROS – reaktivne kiseonične vrste
RPL19 – ribozomski protein L19
SDS – natrijum dodecil-sulfat
SEM – standardna geška
SPT – test sklonosti saharozi
SSRI – selektivni inhibitori preuzimanja serotonina
tBID – skraćena forma BID proteina
TLR – Toll-slični receptor 4
TNF- α – faktor nekroze tumora alfa
TrkB – tropomiozinska receptorska kinaza B
TST – test kačenja o rep
VEGF –faktor rasta vaskularnih endotelnih ćelija
5 HT – serotonin
11 β -HSD1/211 β – hidroksteroid dehidrogenaza 1/2

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Depresivni poremećaj	2
1.1.1. Epidemiologija depresivnog poremećaja	4
1.1.2. Etiologija depresivnog poremećaja	5
1.1.2.1. Uticaj pola na razvoj depresivnog poremećaja	6
1.1.3. Patofiziologija depresije	7
1.1.3.1. Monoaminska hipoteza depresije	9
1.1.3.2. Glutamatna hipoteza	10
1.1.3.3. Hipoteza neuroplastičnosti	11
1.1.3.4. Endokrina hipoteza	12
1.1.3.5. Citokinska hipoteza	13
1.1.3.6. Hipoteza o disfunkciji mitohondrija	14
1.1.4. Terapijske strategije lečenja kliničke depresije	15
1.1.5. Životinjski modeli depresije	16
1.2. Neuroinflamacija i depresija	18
1.2.1. Uloga inflamacije u patofiziologiji kliničke depresije	18
1.2.2. Uticaj imunskih signala sa periferije na nastanak inflamacije u mozgu	19
1.2.3. Komponente neuroinflamatornog procesa	20
1.2.3.1. Uticaj citokina na neurotransmitterske sisteme	20
1.2.3.2. Uticaj citokina na procese neurogeneze i neuroplastičnosti	20
1.2.3.3. Citokini i hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osa	21
1.2.4. Depresija kao inflamatorna bolest – farmakološki dokazi	22
1.2.4.1. Efekti antidepresiva na medijatore inflamacije	22
1.2.4.2. Efekti antiinflamatornih lekova na simptome depresije	23
1.2.5. LPS-om indukovani model depresije	25
1.3. Glukokortikoidni receptor	26
1.3.1. Struktura GR-a	26
1.3.1.1. Mehanizmi regulacije GR-a	27
1.3.1.2. Post-translacione modifikacije GR-a	29
1.3.2. Uloga GR-a u regulaciji genske ekspresije	32
1.3.3. Uticaj inflamacije na GR	34
1.3.4. Izmenjena funkcija GR-a u depresiji	36
1.3.4.1. Uloga izmenjene fosforilacije GR-a u nastanku depresije	38
1.3.5. Uticaj modulacije funkcije GR-a na ponašanje u životinjskim modelima depresije	39

1.4. Disfunkcija mitohondrija posredovana GR-om	40
1.4.1. Proces apoptoze	41
1.4.2. Uloga GR-a u apoptozi	42
1.4.2.1. Uloga jedarnog GR-a	43
1.4.2.2. Uloga mitohondrijskog GR-a u procesu apoptoze	44
1.4.3. Uticaj mitohondrijskog GR-a na energetske metabolizam	45
1.4.4. Veza između inflamacije i funkcije mitohondrija	46
1.4.5. Uticaj mitohondrijske disfunkcije na ponašanje životinja	47
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	48
3. MATERIJAL I METODE	51
3.1. Gajenje i tretman eksperimentalnih životinja	52
3.1.1. Određivanje faza estrusnog ciklusa	52
3.1.2. Eksperimentalni dizajn	53
3.2. Testovi ponašanja	55
3.2.1. Merenje fizioloških parametara	55
3.2.2. Testovi za depresivno ponašanje	55
3.2.2.1. Test prinudnog plivanja	55
3.2.2.2. Test sklonosti ka saharozi	57
3.2.3. Testovi za anksiozno ponašanje	58
3.2.3.1. Test otvorenog polja	58
3.2.3.2. Test uzdignutog plus lavirinta	60
3.3. Određivanje koncentracije kortikosterona u serumu	61
3.4. Analiza proteina	61
3.4.1. Priprema citoplazmatskih, mitohondrijskih i jedarnih frakcija	61
3.4.2. Određivanje koncentracije proteina	63
3.4.3. Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu	64
3.4.4. Analiza proteina <i>Western blot</i> metodom	64
3.4.5. Kvantifikacija signala	66
3.5. Analiza ekspresije gena	66
3.5.1. Izolacija RNK	66
3.5.2. Reverzna transkripcija	67
3.5.3. qRT-PCR	67
3.6. Statistička analiza	68

4. REZULTATI -----	69
4.1. Uticaj doze LPS-a i trajanja tretmana na depresivno ponašanje -----	70
4.2. Rezultati analize vaginalnih briseva -----	71
4.3. Analiza fizioloških parametara i ponašanja -----	71
4.4. Analiza fosforilacije GR-a i unutarćelijske translokacije proteina uključenih u glukokortikoidnu signalizaciju nakon tretmana LPS-om -----	74
4.4.1. Analiza nivoa GR-a i njegovih košaperona-----	74
4.4.2. Analiza nivoa kinaza uključenih u fosforilaciju GR-a -----	76
4.4.3. Analiza fosforilacije GR-a -----	81
4.5. Analiza ekspresije jedarnih gena regulisanih GR-om -----	82
4.6. Analiza fosforilacije GR-a u mitohondrijama i mitohondrijske translokacije proteina uključenih u proces apoptoze -----	84
4.6.1. Analiza uticaja LPS-a na nivo isečenog PARP-1 proteina -----	84
4.6.2. Analiza uticaja LPS-a na unutarćelijsku distribuciju kaspaza -----	85
4.6.3. Analiza unutarćelijske distribucije proteina BCL-2 proteinske porodice-----	88
4.6.4. Analiza nivoa i fosforilacionog statusa GR-a u mitohondrijama-----	92
4.7. Analiza ekspresije mitohondrijskih gena regulisanih GR-om -----	94
5. DISKUSIJA -----	95
5.1. Uticaj LPS-a na ponašanje-----	96
5.1.1. Uticaj LPS-a na unos hrane i telesnu težinu -----	98
5.1.2. Uticaj LPS-a na ponašanje nalik depresivnom -----	99
5.1.2.1. Uticaj LPS-a na beznadežnost-----	99
5.1.2.2. Uticaj LPS-a na anhedoniju -----	99
5.1.3. Uticaj LPS-a na anksiozno ponašanje -----	100
5.1.4. Uticaj LPS-a na nivoe serumskog kortikosterona -----	101
5.2. Uticaj LPS-a na fosforilaciju GR-a i unutarćelijsku translokaciju proteina uključenih u glukokortikoidnu signalizaciju -----	103
5.2.1. Uticaj LPS-a na nivoe GR-a i njegovih košaperona -----	103
5.2.2. Uticaj LPS-a na fosforilaciju GR-a i nivoe kinaza uključenih u njegovu fosforilaciju- 105	
5.2.3. Uticaj LPS-a na ekspresiju jedarnih gena regulisanih GR-om -----	107

5.3. Uticaj LPS-a na fosforilaciju GR-a u mitohondrijama i apoptotske procese -----	110
5.3.1. Uticaj LPS-a na translokaciju i isecanje kaspaza-----	110
5.3.2. Uticaj LPS-a na proteine BCL-2 familije -----	112
5.3.3. Uticaj LPS-a na nivoe GR-a u mitohondrijama -----	113
5.3.4. Uticaj LPS-a na fosforilaciju mitohondrijskog GR-a i ekspresiju gena regulisanih ovim receptorom-----	114
6. ZAKLJUČAK -----	116
7. LITERATURA -----	118
8. PRILOZI -----	157
Biografija autora -----	158
Prilog 1. -----	159
Prilog 2. -----	160
Prilog 3. -----	161

1. UVOD

1.1. DEPRESIVNI POREMEĆAJ

Depresija je jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice. Jedan od glavnih razloga za takav stav prema ovom oboljenju jeste to što se relativno često završava samoubistvom - procenjuje se da 2-8% obolelih od depresije izvrši samoubistvo, a da oko 50% osoba koje izvrše samoubistvo boluje od depresije ili nekog drugog poremećaja raspoloženja (Bachmann, 2018). Ovde treba napomenuti da poremećaji raspoloženja, takođe poznati i kao afektivni poremećaji, predstavljaju grupu stanja okarakterisanih prisustvom patološkog afekta, odnosno depresivnog ili maničnog raspoloženja, ili njihovog smenjivanja. U ove poremećeje spadaju klinička depresija, distimija, ciklotimija, bipolarni poremećaj, hipomanija i manija.

Depresija je bolest koja ima i dosta visoku životnu prevalencu, koja iznosi 10-15% (Richards, 2011). Takođe, depresivne epizode su u najvećem broju slučajeva rekurentne, tj. bolest ima hroničan tok, što značajno narušava kvalitet života obolelih. Pored toga, ova bolest može da bude komorbidna sa drugim mentalnim i fizičkim oboljenima, i u tom slučaju povećava ukupnu smrtnost ovih oboljenja (Bostwick i Pankratz, 2000; Paykel, 2006). Zbog svega prethodno navedenog, depresija je rangirana kao drugi vodeći poremećaj čije su posledice višegodišnji život sa invaliditetom (Ferrari i sar., 2013a), a prema procenama Svetske zdravstvene organizacije, do 2030. godine će zauzeti prvo mesto.

Veliki uticaj koji depresija ima na javno zdravlje je delimično posledica toga što oko 40% pacijenata ne reaguje ni na jedan od dostupnih tretmana (Nestler i sar., 2002). Sa druge strane, kod onih pacijenata koji reaguju na neki od tretmana, terapijski efekti se razvijaju sporo, uglavnom tokom nekoliko nedelja tretmana, i tokom tog perioda kod pacijenata su i dalje prisutni svi simptomi bolesti. Iako su danas dostupni lekovi znatno bezbedniji nego pre, njihovi terapijski efekti i mane (poput sporog dejstva terapije, niske stope remisije i postojanja pacijenata koji ne odgovaraju na tretman) su ostali nepromenjeni. Pored toga, čak i nakon uspešnog tretmana, procenjuje se da 20-80% pacijenata ponovo iskusi depresivnu epizodu u periodu od 5 godina nakon otklanjanja simptoma (Sheline i sar., 2003).

Jedan od uzroka ograničene uspešnosti tretmana depresije jeste nedostatak objektivne dijagnostike, koja se trenutno zasniva na prisustvu određenih simptoma, koji su vrlo varijabilni. Postojeći način postavljanja dijagnoze takođe predstavlja ograničenje u razvoju životinjskih modela i neuropatoloških istraživanja zbog toga što su neki od najistaknutijih simptoma depresije u suštini subjektivni osećaji koji se ne mogu proceniti kod životinja (Krishnan i sar., 2008). Dva najpoznatija i najčešće korišćena kriterijuma za dijagnostikovanje depresije su Dijagnostičko-statistički priručnik za duševne poremećaje V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V, DSM-V*), koji se koristi u Sjedinjenim Američkim Državama i Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema 11 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 11, ICD-11*), koja je rasprostranjena u Evropi.

DSM-V prepoznaje veliku depresivnu epizodu na osnovu istovremenog prisustva određenog broja simptoma (minimum 5 od ukupno 9) u trajanju od bar 2 nedelje. Primarni simptomi uključuju depresivno ili razdražljivo raspoloženje i gubitak interesovanja ili zadovoljstva za sve, ili skoro sve aktivnosti. Ostali simptomi su: značajan dobitak ili gubitak na kilaži, insomnija ili hipersomnija, psihomotorna agitacija ili retardacija, umor ili gubitak energije, osećaj bezvrednosti ili preterane krivice, smanjena sposobnost mišljenja, razmišljanje o smrti ili samoubistvu. Ukoliko se velika depresivna epizoda javi ponovo, nakon određenog vremena normalnog raspoloženja, postavlja se dijagnoza velikog depresivnog poremećaja. DSM-V takođe prepoznaje i distimiju, odnosno hronični depresivni poremećaj, koji ima dosta blaže simptome nego veliki depresivni poremećaj, ali ti simptomi moraju biti prisutni bar dve godine. Simptomi uključuju depresivno raspoloženje tokom većeg dela dana, i bar dva simptoma od sledećih: loš apetit, insomnija, nedostatak energije, loše samopouzdanje, nesposobnost koncentracije i osećaj beznadežnosti.

Prema ICD-11, za postavljanje dijagnoze depresivne epizode najmanje četiri simptoma moraju biti prisutna u trajanju od bar 2 nedelje. U te simptome spadaju: gubitak interesovanja, izostanak emotivnog odgovora, poremećaji sna, gubitak apetita, motorna retardacija, promene u težini, gubitak libida i smanjenje energije. Ukoliko se depresivna epizoda javi ponovo, nakon nekoliko meseci normalnog

raspoloženja, postavlja se dijagnoza rekurentnog depresivnog poremećaja. Kao i DSM-V, ova klasifikacija prepoznaje i distimiju, koja je opisana kao period od najmanje 2 godine konstantno depresivnog raspoloženja. Simptomi nisu toliko ozbiljni kao kod velikog depresivnog poremećaja, ali periodi normalnog raspoloženja između depresivnih epizoda retko traju duže od nekoliko nedelja.

Najveća razlika između ove dve klasifikacije jeste u tome što je prema ICD-11 potreban niži prag simptoma za postavljanje dijagnoze nego prema DSM-V. Pored toga, obe klasifikacije, i DSM-V i ICD-11, razlikuju tri stepena težine depresivne epizode: blagu, srednje tešku i tešku.

1.1.1. Epidemiologija depresivnog poremećaja

Godišnja prevalenca za depresivni poremećaj varira u različitim zemljama i studijama, i u proseku iznosi oko 3,7% na globalnom nivou (Ferrari i sar., 2013b). Sa druge strane, životne prevalencije ove bolesti su više i iznose 10-15% (Richards, 2011). Od sociodemografskih faktora, epidemiološke studije pokazuju da pol, godine i ekonomsko stanje imaju najveći uticaja na razvoj depresije (Kessler, 2003; Kessler i Bromet, 2013). Naime, poznato je da žene oko dva puta češće oboljevaju od depresije nego muškarci (Kessler, 2003), a najveći rizik za dobijanje prve depresivne epizode je od kasne adolescencije do sredine 40-ih godina (Kessler i Bromet, 2013). Pored toga, osobe nižeg obrazovanja i osobe koje žive u siromašnim uslovima imaju veću verovatnoću oboljevanja (Kessler, 2003).

Kada je u pitanju komorbidnost sa ostalim oboljenjima, pokazano je da čak 75% obolelih ima bar još jedan od poremećaja klasifikovanih prema DSM-V ili ICD-11. Komorbidnost je najčešća sa anksioznim poremećajima, i javlja se u 50% slučajeva (Richards, 2011). Treba naglasiti i da se simptomi depresije, onako kako su definisani DSM-V ili ICD-11 kriterijumima, mogu javiti u kontekstu mnogih drugih oboljenja, i u tom slučaju mogu povećati njihovu težinu i smrtnost (Nestler i sar., 2002).

1.1.2. Etiologija depresivnog poremećaja

Poznato je da depresija može da bude porodična - blizanačke studije su pokazale da je pojava depresije sa 30-40% određena genetičkim nasleđem (Hasler, 2010). Smatra se da je ova bolest određena pre uticajem većeg broja gena, nego snažnim uticajem manjeg broja gena. Naime, studije koje su proučavale polimorfizme kroz ceo genom (*genome-wide association studies*, GWAS) su otkrile prvo 44 (Wray i sar., 2018), a potom i 120 (Howard i sar., 2019) genetskih varijanti povezanih sa rizikom od depresije, i pokazale su da su uticaji pojedinačnih polimorfizama veoma mali (Wray i sar., 2010). Stoga, ovi podaci pokazuju da depresija ima poligenisku osnovu, i ukazuju na to da bi važan uticaj na nastanak i tok ove bolesti mogle da imaju interakcije između različitih gena, i interakcije između genskih varijanti i sredinskih faktora. Neki od gena za koje je pokazano da mogu da utiču na nastanak depresije su geni za glukokortikoidni receptor (GR) i kortikotropni oslobađajući hormon (CRH) (Uher, 2008; El Hage i sar., 2009), geni za monoamin oksidazu A i neurotrofni moždani faktor (BDNF) (Frodl i sar., 2007), kao i geni za i FK506-vezujući protein (FKBP) 5 (Menke i sar., 2013).

Pored genetičke osnove, uočena je i uloga epigenetskih promena u nastanku depresije, i pokazano je da bi epigenetički mehanizmi mogli imati ulogu u ostvarivanju terapijskih efekata antidepresiva (Tsankova i sar., 2006). Neki od gena čija bi izmenjena metilacija mogla da doprinese povećanom riziku od nastanka depresije su geni za GR, BDNF i vazopresin (Weaver i sar., 2004; Murgatroyd i sar., 2009; Roth i sar., 2009).

Kada su u pitanju stresni događaji, već dugo je poznato da na nastanak depresije mogu da utiču gubitak posla, finansijska nesigurnost, zdravstveni problemi opasni po život, nasilje, razvod ili ožalošćenost (Kessler, 1997). Novija istraživanja su pokazala da značajnu ulogu u nastanku depresije imaju i događaji poput fizičkog ili seksualnog zlostavljanja, psihološkog zapostavljanja, izloženosti nasilju ili rano odvajanje od roditelja (Li i sar., 2016). Pored toga, depresiji mogu doprineti i drugih sredinski uticaji kao što su virusne infekcije (Bode i sar., 1996), povrede mozga (Jorge i sar., 2004) ili različiti agensi, poput terapije interferonom α (INF α) (Bonaccorso i sar., 2001).

Zajedno, ovi podaci ukazuju na to da depresija proizilazi iz kompleksne interakcije genetičke predispozicije individue i faktora spoljašnje sredine, na prvom mestu stresnih životnih situacija. Iako su dosadašnje studije dosta doprinele razumevanju biološke osnove ovog premećaja, ta saznanja još uvek nisu dovoljna da bi se unapredila dijagnostika i uspešnost lečenja ovog oboljenja.

1.1.2.1. Uticaj pola na razvoj depresivnog poremećaja

Mnoga dosadašnja istraživanja su ukazala na dvostruko veću incidencu javljanja depresivnog poremećaja kod žena nego kod muškaraca (Bekker i van Mens-Verhulst, 2007), kao i veću težinu bolesti i funkcionalnog oštećenja (Riecher-Rossler, 2010). Polna razlika je uočena i u odgovoru na antidepresive - pokazano je da žene bolje odgovaraju na selektivne inhibitore preuzimanja serotonina (*SSRI*) od muškaraca (Kornstein i sar., 2000; Joyce i sar., 2004). Kada je u pitanju uticaj polnih hormona na raspoloženje, pokazano je da testosteron pozitivno deluje na raspoloženje kod muškaraca (McHenry i sar., 2014), dok je kod depresivnih žena uočen niži nivo ovog hormona u poređenju sa kontrolama (Giltay i sar., 2012). Takođe, uočen je i značajan uticaj estrogena na depresivne simptome kod žena; tačnije, pokazano je da pad u nivou estradiola može da dovede do nastanka depresivnih simptoma, i da ti simptomi mogu da budu značajno ublaženi primenom 17- β estradiola (Ahokas i sar., 2001).

Moguće objašnjenje za postojanje polnih razlika u sklonosti ka depresiji moglo bi se ogledati u tome što polni hormoni mogu uticati na procese neurotransmisije, aktivnost hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne (HPA) ose i imunskog sistema. Naime, estrogeni utiču na aktivnost neurotransmitera, neurogenezu i ekspresiju neurotrofnih faktora (Borrow i Cameron, 2014; Karki i sar., 2014; Licznerski i Duman, 2013), dok testosteron utiče na oslobađanje dopamina, serotonina i γ -amino buterne kiseline (GABA) (McHenry i sar., 2014). Dalje, estrogeni stimulišu sekreciju kortikotropnog oslobađajućeg hormona (CRH) i smanjuju ekspresiju GR-a u regionima mozga važnim za funkciju HPA ose - hipokampusu, hipotalamusu i hipofizi (Swaab i sar., 2005). Uočen je i protektivan efekat estradiola na očuvanje funkcije mitohondrija (Rachman i sar., 1998). Uz to, polne razlike su pokazane i u aktivnosti imunskog sistema - žene su manje

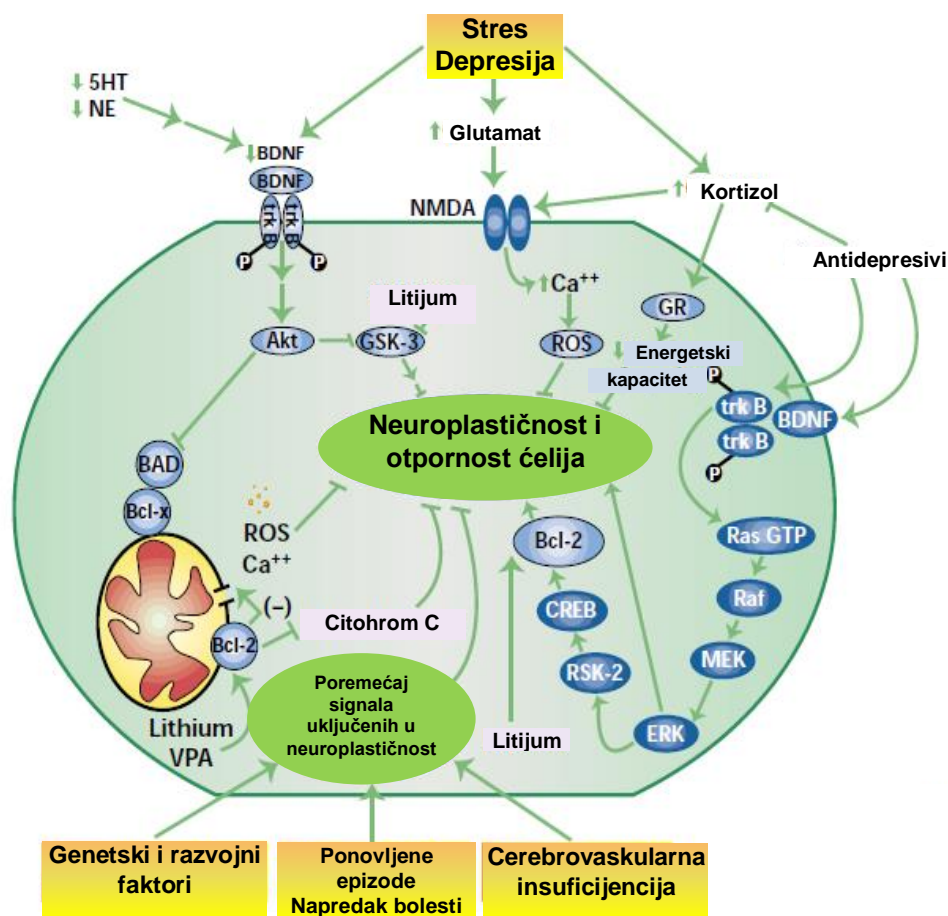
podložne mnogim infekcijama, imaju pojačanu imunoreaktivnost i češće oboljevaju od autoimunskih bolesti u poređenju sa muškarcima (Cannon i St Pierre; 1997, Ahmed i sar., 1999).

Zajedno, ovi nalazi ukazuju na postojanje značajnih polnih razlika u raznim sistemima uključenim u patofiziologiju depresije, i ističu značaj izučavanja mehanizama koji se nalaze u osnovi ovih razlika. Bolje razumevanje ovih razlika bi omogućilo kliničarima da lakše identifikuju žene i muškarce koji imaju povišen rizik od oboljevanja, kao i da identifikuju polno-specifične biomarkere ovog procesa. Sve ovo bi na kraju moglo da omogući razvoj individualizovanog biopsihosocijalnog pristupa, koji bi omogućio efikasniji tretman obolelih.

1.1.3. Patofiziologija depresije

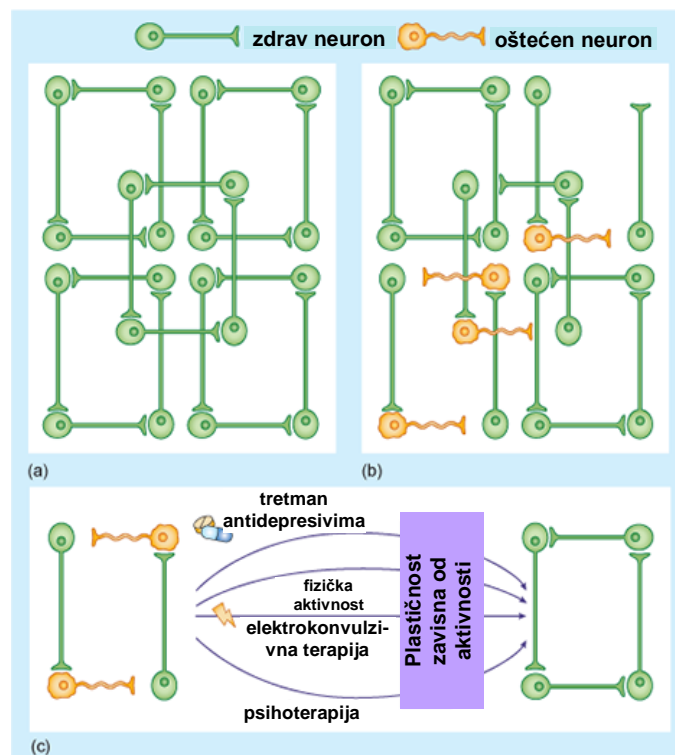
Prva hipoteza depresije, monoaminska hipoteza, formulisana šezdesetih godina XX veka, pretpostavlja da je depresija posledica nedostatka serotonina ili noradrenalina u određenim regionima mozga. Ona se zasnivala na kliničkim i eksperimentalnim nalazima da inhibitori monoamin-oksidge, enzima koji eliminiše kateholamine iz sinaptičkog prostora, poboljšava simptome depresije kod ljudi i eksperimentalnih životinja. Međutim, ubrzo je postalo jasno da monoaminska hipoteza ne može sama po sebi da objasni sve uočene efekte antidepresiva (Nestler i sar., 2002). Stoga je fokus istraživanja pomeren prema receptorima i intracelularnim signalnim putevima regulisanim antidepresivima (Manji i sar., 2001; Coyle i Duman, 2003). Pokazano je da je depresija uzrokovana strukturnim i funkcionalnim promenama različitih molekula u mozgu, a ne samo smanjenjem funkcije monoaminima (Slika 1). Tokom vremena, identifikovane su promene u nekoliko drugih procesa koji su uključeni u nastanak depresije, poput promena u neuroplastičnosti, neurogenezi, inflamaciji i cirkadijalnom ritmu, a uočena je i značajna uloga bolesti poput poremećaja štitne žlezde i mitohondrijskih bolesti. Kasnije u tekstu će detaljnije biti opisane one hipoteze koje su od posebnog značaja za predmet ove disertacije.

Tokom godina, gledište da je depresija posledica hemijske neravnoteže u mozgu je postalo naširoko prihvaćeno među istraživačima, lekarima i opštom populacijom. Međutim, dalja istraživanja su dovela do postavljanja još jednog



Slika 1 - Hemijske promene u depresiji. Intracelularni signalni putevi pogođeni promenama raspoloženja i antidepresivima. Slika preuzeta i adaptirana na osnovu Castren (2005).

modela depresije - hipoteze mreže. Hipoteza mreže pretpostavlja da su poremećaji raspoloženja odraz problema u obradi informacija u okviru određenih neuralnih kola u mozgu, i da antidepresivi, kao i drugi tretmani, mogu da otklone simptome depresije tako što postepeno poboljšavaju obradu informacija u okviru ovih mreže (Slika 2). I zaista, noviji podaci ukazuju na to da je oporavak od depresije pre odraz strukturnih i funkcionalnih promena u kritičnim nervnim mrežama koje omogućavaju bolju adaptaciju na uslove sredine, nego odraz povećanja ili smanjenja koncentracije jednog molekula ili ekspresije jednog gena (Castren, 2005; Duman i Aghajanian, 2012). Ova hipoteza bi takođe mogla da objasni vremensku diskrepancu između dejstva antidepresiva na metabolizam monoamina (koje se meri u minutima ili satima) i njihovih terapijskih efekata (koji su vidljivi tek nakon nekoliko nedelja) (Castren, 2005).



Slika 2 – Hipoteza mreže. a) U zdravom mozgu, informacije obrađuju mreže neurona. b) U depresiji, obrada informacija u pojedinim mrežama ne funkcioniše kako treba jer su neki neuroni oštećeni ili mrtvi. c) Terapija poboljšava povezanost u neuralnim mrežama povećavanjem plastičnosti, što dovodi do oporavka veza u oštećenim neuralnim mrežama. Slika preuzeta i adaptirana iz Castren (2005).

Treba napomenuti da se hemijske hipoteze i hipoteza mreže ne isključuju međusobno, nego su komplementarne. Naime, kako su sinteza i oslobađanje bitnih signalnih molekula regulisani nervnom aktivnošću, promene u aktivnosti neuralnih mreža mogu da dovedu do promene u koncentraciji tih signalnih molekula. Stoga, iako su inicijalni efekti antidepresiva očigledno hemijski i često usmereni ka metabolizmu monoamina, adaptivne promene u koncentraciji tih signalnih molekula koje potom slede su tesno povezane sa strukturom neuralnih mreža, i mogu biti pre posledica izmenjene obrade informacija nego njen uzrok.

1.1.3.1. Monoaminska hipoteza depresije

Osnovna verzija ove hipoteze pretpostavlja da je depresija posledica smanjene količine monoamina u mozgu, na prvom mestu serotonina i noradrenalina, i da antidepresivi ostvaruju svoje efekte povećavajući dostupnost

ovih neurotransmitera prevashodno na nivou sinapsi (Nestler i sar., 2002). U prilog ovoj hipotezi ide nekoliko ključnih nalaza: (1) akutno pražnjenje triptofana, koji je polazni molekul u sintezi serotona, dovodi do nastanka depresije kod osoba koje se nalaze u remisiji ili kod srodnika pacijenata obolelih od depresije (Ruhe i sar., 2007); (2) postoji korelacija između rizika za nastanak depresije i polimorfizama gena za serotonin ske receptore (Caspi i sar., 2003); (3) kod osoba obolelih od depresije je uočena smanjena zapremina *Locus coeruleus*-a u kojem je smeštena glavovina svih noradrenalinskih neurona u mozgu, potom smanjena aktivnost tirozin hidroksilaze uključene u metabolizam noradrenalina i adrenalina i povišena aktivnost α -2 adrenalinskih receptora, što zajedno ukazuje na umanjenu kateholaminsku neurotransmisiju kod ovih pacijenata (Delgado i Moreno, 2000); (4) kod pacijenata sa depresijom utišana je i aktivnost dopaminskog sistema (Dunlop i Nemeroff, 2007); (5) sa depresijom je asociirana povišena aktivnost monoamin oksidaze, koja je odgovorna za degradaciju monoamina (Meyer i sar., 2006); (6) svi antidepresivi koji su trenutno u upotrebi dovode do pojačavanja aktivnosti monoaminskih neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini.

Međutim, iako je danas opšte poznato da su monoaminski sistemi uključeni u patofiziologiju depresije, poremećaji u ovim sistemima čine samo mali deo kompleksnih neuromodulatornih mehanizama koji se nalaze u osnovi ovog poremećaja (Belmaker i Agam, 2008). Ovome u prilog idu i novije studije koje su dale oprečne rezultate kada je u pitanju nivo metabolita noradrenalina i serotonina u plazmi, urinu i cerebro-spinalnoj tečnosti osoba obolelih od depresije (Anisman i sar., 2008). U potonjim decenijama, ova hipoteza je prošla kroz više modifikacija u pokušaju da se objasne određene nedoslednosti, od kojih je glavna vremenska diskrepanca između dejstva antidepresiva na dostupnost monoamina i njihovih terapijskih efekata (Racagni i Popoli, 2008).

1.1.3.2. Glutamatna hipoteza

Devedesetih godina XX veka je uočeno da antagonisti glutamatnog NMDA receptora imaju antidepresivna svojstva (Trullas i Skolnick, 1990), što je dovelo do formulisanja glutamatne hipoteze. U prilog ovoj hipotezi ide veliki broj kliničkih studija koje su pokazale da je patofiziologija depresije povezana sa disfunkcijom

glutamatnog sistema, kao i sa poremećajima u mehanizmima koji regulišu eliminaciju i metabolizam glutamata (Sanacora i sar., 2012). Takođe, pokazano je da tretman antidepresivima može da dovede do smanjenja nivoa glutamata u plazmi pacijenata obolelih od depresije (Sanacora i sar., 2012). Efekti glutamata su uočeni prevashodno na nivou hipokampusa, amigdale i prefrontalnog korteksa (PFC), a to su regioni koji su često pogođeni depresijom (Zhou i Danbolt, 2014). Glutamatna transmisija može da bude modulirana na prvom mestu stresom i glukokortikoidima, koji mogu da utiču na oslobađanje i metabolizam glutamata, ali i na glutamatne receptore (Di i sar., 2009).

Iako je pokazano da neurotransmisija posredovana monoaminima ima primarnu ulogu u modulaciji emocija i kognicije (Pralong i sar., 2002; Robbins i Arnsten, 2009), centralnu ulogu u regulaciji kompleksnih emocionalnih i kognitivnih promena asociраних sa depresijom ima ekscitatorna neurotransmisija, koja možda predstavlja i finalni zajednički signalni put dejstva terapijskih tretmana depresije i ostalih poremećaja raspoloženja. Stoga ne iznenađuje to što se neke od novih strategija lečenja depresije koje bi mogle da budu odobrene u skorijoj budućnosti od strane američke Uprave za hranu i lekove (*Food and drug administration*, FDA) baziraju na jedinjenjima koja modulišu glutamatnu neurotransmisiju, na prvom mestu putem modulacije funkcije NMDA receptora (Sanacora i sar., 2012).

1.1.3.3. Hipoteza neuroplastičnosti

Veliki broj studija je ukazao na ulogu izmenjene neuroplastičnosti u depresiji, kako u životinjskim modelima, tako i u kliničkim studijama. Na postmortem uzorcima hipokampusa pacijenata sa depresijom uočeni su atrofija i povlačenje apikalnih dendrita piramidnih neurona hipokampusa, smanjena neurogeneza u dentatnom girusu hipokampusa (Stockmeier i sar., 2004), kao i regresija dendritske mreže piramidnih neurona u medijalnom PFC (Rajkowska i sar., 1999). Ove promene mogu da imaju značajan uticaj na strukturu pogođenih regiona mozga, utičući na remodelovanje dendrita, redukciju sinapsi i, potencijano, na smanjenje zapremine tih regiona (Pittenger i Duman, 2008).

Tačan molekularni mehanizam koji se nalazi u osnovi izmenjene neuroplastičnosti u depresiji i dalje nije jasan. Neke studije su ukazale na značajnu ulogu NMDA i AMPA receptora u indukovanju morfoloških promena uključenih u neuroplastičnost (Fifkova i Van Harreveld, 1977). Takođe je uočena i smanjena ekspresija neurotrofnih faktora, poput BDNF-a (Frodl i sar., 2007) i vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) (Heine i sar., 2005), a pokazano je i da hroničan stres, kao i hronično visok nivo glukokortikoida, u hipokampusu dovode do narušavanja neuroplastičnosti (Pittenger i Duman, 2008).

U prilog ovoj hipotezi idu i studije koje su pokazale da antidepresivi poboljšavaju neuroplastičnost. Naime, u životinjskim modelima je pokazano da antidepresivi mogu da poprave brojne neurohistološke promene izazvane stresom (Pittenger i Duman, 2008), a kliničke studije su ukazale na značajnu ulogu BDNF-a u ovom procesu; tačnije, pokazale su da je kod pacijenata obolelih od depresije nivo BDNF-a značajno povišen pri tretmanu antidepresivima, i da korelira sa ublažavanjem simptoma bolesti (Brunoni i sar., 2008).

Međutim, ova hipoteza ima nekoliko ograničenja. Naime, na osnovu dosadašnjih saznanja, nemoguće je zaključiti da li je neuroplastičnost uzrok ili posledica neuropatoloških procesa povezanih sa depresijom, a pokazano je i da stres i depresija nisu uvek povezani sa smanjenjem, a terapija antidepresivima sa povećanjem procesa neuroplastičnosti u svim regionima mozga (Pliakas i sar., 2001; Newton i sar., 2002).

1.1.3.4. Endokrini hipoteza

Devedesetih godina prošlog veka je postavljena glukokortikoidna hipoteza depresije, koja pretpostavlja da narušena glukokortikoidna signalizacija i aktivnost HPA ose predstavljaju uzrok nastanka depresije, kao i da terapija antidepresivima dovodi do normalizacije ovog stanja (Holsboer i Barden, 1996).

Veliki broj kliničkih nalaza ide u prilog ovoj hipotezi. Naime, hiperaktivnost HPA ose je jedno od najpostojanijih bioloških nalaza kod ljudi obolelih od kliničke depresije (Pariante i Lightman, 2008). Pojačana aktivnost HPA ose je ujedno i ključna za odgovor organizma na stres (Pariante i Lightman, 2008), a poznato je da stresni životni događaji takođe mogu da dovedu do nastanka kliničke depresije

(Kendler i sar., 2003). Dalje, kod pacijenata obolelih od depresije su uočeni i povećani nivoi adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortizola u krvi, povećan nivo CRH u cerebrospinalnoj tečnosti i povećani nivo kortizola u pljuvački i mokraći (Rubin i sar., 1987; Maes i sar., 1998; Swaab i sar., 2005). Čest nalaz kod ovih pacijenata jeste i narušena negativna povratna sprega posredovana glukokortikoidima, odnosno GR rezistencija (Bao i sar., 2008). Pacijenti oboleli od depresije takođe pokazuju i izmenjen odgovor u neuroendokrinim funkcionalnim testovima, poput testa supresije deksametazonom. U ovom testu, osobama se uveče daje određena doza DEX-a koji, kao moćan supresor HPA ose, dovodi do smanjenja lučenja endogenih glukokortikoida. Budući da DEX ne prolazi krvno-moždanu barijeru, svoj efekat ostvaruje na nivou hipofize supresijom lučenja ACTH. Kod pacijenata sa depresijom supresija lučenja kortizola nakon administracije DEX-a je smanjena.

Iako je nedvosmisleno pokazano da u kliničkoj depresiji dolazi do poremećaja u funkciji HPA ose, ovo saznanje još uvek nije otvorilo nove opcije za terapiju iz nekoliko razloga. Naime, izmenjena aktivnost HPA ose se javlja kod većine, ali ne i kod svih pacijenata sa depresijom (Anacker i sar., 2011). Pored toga, povećana aktivnost HPA ose je povezana sa simptomima melanholične depresije, dok su simptomi atipične depresije povezani sa smanjenom funkcijom HPA ose (Gold i sar., 1996; Oquendo i sar., 2003). Jedna meta-analiza je pokazala da je, nezavisno od popravljene psihopatologije, oko 50% pacijenata imalo sličan nivo kortizola pre i posle tretmana antidepresivima (McKay i Zakzanis, 2010). Treba naglasiti i da poremećna funkcija HPA ose nije karakteristična samo za depresiju, nego se javlja i kod drugih psihijatrijskih oboljenja, poput bipolarnog poremećaja ili šizofrenije (Webster i sar., 2002).

1.1.3.5. Citokinska hipoteza

Kako je uloga neuroinflamacije u patogenezi depresije tema ove disertacije, uloga imunskog sistema u nastanku ovog oboljenja će biti detaljnije opisana u odeljku 1.2. U ovom odeljku će samo u kratkim crtama biti navedeni neki od najvažnijih nalaza koji su ukazali na to da bi sistemska inflamacija mogla da bude značaj činiac patofiziologije ovog oboljenja. Naime, istraživanja su pokazala da kod

pacijenta sa depresijom, koji su inače medicinski zdravi, dolazi do povećane produkcije proinflamatornih citokina, naročito interleukina 6 (IL-6), interleukina 1 beta (IL-1 β) i faktora nekroze tumora alfa (TNF- α), kako u perifernoj krvi, tako i u cerebrospinalnoj tečnosti, kao i do povećane produkcije akutnih faznih proteina, poput C-reaktivnog proteina (CRP), hemokina i adhezivnih molekula (Maes, 1999, Danner i sar., 2003; Alesci i sar., 2005). Pored toga, kod pacijenata koji primaju terapiju interferenom- α (IFN- α) uočeni su simptomi depresije koji se mogu otkloniti uzimanjem antidepresiva (Capuron i sar., 2002a). Pokazano je i da citokini utiču na pojedine procese uključene u nastanak depresije, poput monoaminskih sistema, HPA ose i GR-a (Miller i sar., 2009b). Svi ovi nalazi su doveli do formiranja citokinske hipoteze depresije, prema kojoj je depresija posledica povišene produkcije proinflamatornih citokina izazvane nekom vrstom stresora.

1.1.3.6. Hipoteza o disfunkciji mitohondrija

Veći broj kako prekliničkih, tako i kliničkih studija, ukazao je na značajnu ulogu mitohondrija u nastanku kliničke depresije. Na primer, studije su pokazale da hronični stres kojim su izloženi miševi može da inhibira oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijama, umanja potencijal mitohondrijske membrane i ošteti ultrastrukturu mitohondrija u nekoliko moždanih regiona, uključujući hipokampus, korteks i hipotalamus (Gong i sar., 2011; Rezin i sar., 2008). Studije su takođe pokazale da pacijenti oboleli od kliničke depresije imaju smanjenu potrošnju glukoze u PFC-u, anteriornom cingulatnom girusu i kaudatnom nukleusu (Rezin i sar., 2008; Gardner i sar., 2003; Videbech, 2000). Uočena je i smanjena metabolička aktivnost u većem broju moždanih regiona depresivnih pacijenata (Newton i sar., 2002; Mayberg, 1994; Mayberg i sar., 1994), kao i promene u veličini i distribuciji mitohondrija u neuronima, koje bi mogle da budu povezane sa deficitima u energiji (Cataldo i sar., 2010). Pored toga, nekoliko studija je potvrdilo ulogu mitohondrija u nastanku depresije. Na primer, post-mortem studije pacijenata obolelih od teških oblika depresije su pokazale da je u mitohondrijskoj DNK (mtDNK) moždanog tkiva ovih pacijenata prisutno više delecija nego u mtDNK njihovog mišićnog tkiva (Suomalainen i sar., 1992).

Ovi nalazi su doveli do postavljanja hipoteze o disfunkciji mitohondrija, koja predlaže da poremećaji u funkciji mitohondrija mogu da budu povezani sa nastankom raznih psihijatrijskih oboljenja, poput kliničke depresije (Gardner i Boles, 2011).

1.1.4. Terapijske strategije lečenja kliničke depresije

U terapiji depresije koriste se tri pristupa - farmakoterapija, psihoterapija i somatski tretmani. Po potrebi, ovi pristupi mogu da se primenuju i kombinovano. Psihoterapija se koristi kod blažih i srednje teških oblika depresije, dok se u kombinaciji sa tretmanom antidepresivima koristi za lečenje težih oblika. Kognitivno-bihejvioralna terapija i interpersonalna terapija su psihoterapije za koje je pokazano da su efikasne u lečenju ovog poremećaja (Kupfer i sar., 2012). Što se tiče antidepresiva, dejstvo svih koji su trenutno u upotrebi se zasniva na povećanju aktivnosti monoamina u sinaptičkoj pukotini (Fava i Kendler, 2000). Međutim, iako antidepresivi dovode do trenutnog povećanja monoamina u sinapsi, za postizanje terapijskog učinka potrebno je najmanje dve nedelje, a tek nakon šest nedelja mogu se videti njihovi puni efekti, što predstavlja jedan od najvećih nedostataka terapije antidepresivima. Jedini nefarmakološki, somatski tretman široko dostupan za lečenje kliničke depresije je elektrokonvulzivna terapija (EKT). Ova terapija se primenjuje kod pacijenata sa psihotičnim tipom depresije i kod onih koji ne odgovaraju povoljno na lečenje antidepresivnim lekovima (Fava i Kendler, 2000; Little, 2009). EKT je efikasna u akutnom lečenju, a dugotrajni efekti još uvek nisu potvrđeni (Little, 2009).

Međutim, uprkos postojanju različitih vrsta lečenja, terapija depresivnog poremećaja i dalje ostaje suboptimalna, jer tek oko 50-60% pacijenata biva potpuno izlečeno (Nestler i sar., 2002). Stoga bi bolje razumevanje biološke osnove depresije otvorilo mogućnosti za razvoj novih lekova koji bi poboljšali uspešnost lečenja ovog oboljenja. Postoji nekoliko novih tretmana, od kojih su neki ili tek odobreni, ili se još uvek razmatraju od strane FDA i mogli bi biti odobreni do 2021. godine.

Dejstvo ovih tretmana se zasniva na modulaciji nemonoaminskih sistema, a neki od tih lekova su:

- (1) esketamin, stereoizomer selektivnog antagoniste NMDA receptora, ketamina, koji je odobren ove godine;
- (2) rapastinel, parcijalni agonista NMDA receptora (Ragguett i sar., 2019);
- (3) ALKS 5461, jedinjenje koje kombinuje buprenofrin i samidorfanom, od kojih je prvi parcijalni agonista mi-opioidnih receptora, a drugi antagonista kapa-opioidnih receptora (Thase i sar., 2019). Ovde treba napomenuti da je u skorije vreme uočena značajna uloga opioidnih receptora u modulaciji odgovora na stres, anhedonije i raspoloženja, što je dovelo do toga da se modulatori ovih receptora počnu razmatrati kao potencijalni antidepressivi (Bailey i Husbands, 2018.);
- (4) breksanolon (SAGE-547), modulacija pozitivnog alosternog modulatora GABA receptora, alopregnanolona, koji treba da bude namenjen tretmanu postporođajne depresije (Kanes i sar., 2017);
- (5) transkranijalna magnetna stimulacija, koja bi mogla da bude opcija za ljude koji nisu u mogućnosti da koriste lekove (McNamara i sar., 2001).

1.1.5. Životinjski modeli depresije

Uzimajući u obzir kompleksnu prirodu ovog poremećaja, kreiranje validnih modela depresije je dosta teže nego kreiranje modela nekih drugih bolesti, poput kancera ili autoimunskih oboljenja. Jedna od poteškoća u kreiranju životinjskih modela depresije proizilazi iz toga što se mnoga obeležja depresije, poput depresivnog raspoloženja, niskog samopoštovanja, osećaja krivice ili sklonosti samoubistvu, teško mogu proceniti (ili čak i izazvati) kod životinja. Pored toga, samo jedan deo tih simptoma može biti izmeren kod životinja (Tabela 1). Međutim, čak i u slučajevima kada postoje određene korelacije između simptoma izmerenih u životinjskim modelima sa onima koji su uočeni u kliničkoj populaciji, te korelacije su često samo približne. Dodatnu komplikaciju predstavlja i to što je poznavanje psihopatologije depresije oskudno, a objektivna dijagnostika ne postoji.

Tabela 1 – Simptomi depresije koji se mogu izmeriti u životinjskim modelima. Preuzeto i prilagođeno iz Hasler i sar. (2004).

SIMPTOMI	KARAKTERISTIKE
Anhedonija	Ključan simptom depresije. U eksperimentalnim modelima se procenjuje merenjem afiniteta ka saharozi.
Beznadežnost	Kod životinja se može izmeriti testom prinudnog plivanja i testom kačenja o rep.
Promene u apetitu i težini	Depresija je često asocirana sa promenama u apetitu i telesnoj težini, koje se mogu lako meriti kod životinja.
Promene u neuroanatomiji	Osobe obolele od depresije imaju smanjenu zapreminu hipokampusa. Glodari izloženi hroničnom stresu ili povišenom nivou glukokortikoida pokazuju slične znake smanjenja broja i gustine neurona u hipokampusu.
Neuroendokrine promene	Najkonzistentniji nalaz u depresiji. Funkcionalnost HPA ose se može proceniti merenjem nivoa hormona HPA ose i testom supresije DEX-a.
Promene u strukturi sna	Promene u cirkadijalnom ritmu, a posebno u arhitekturi sna, se često uočavaju kod osoba obolelih od depresije. Kod glodara, ove promene mogu da se procene putem EEG.
Anksiozno ponašanje	Anksioznost je simptom koji je često zastupljen kod osoba obolelih od depresije. Životinjski modeli depresije često pokazuju anksiozno ponašanje.

Naučna zajednica je postavila određene kriterijume validacije koji se koriste za međusobno poređenje životinjskih modela psihijatrijskih oboljenja. Svrha ovih kriterijuma jeste postavljanje validnih animalnih modela psihijatrijskih poremećaja kod ljudi, i ti kriterijumi su sledeći: (1) postojanje određenog stepena sličnosti u uzroku odnosno etiologiji same bolesti između modela i ljudi (konstruktna ili etiološka validnost); (2) verno imitiranje depresivnih simptoma prisutnih kod ljudi (pojavna sličnost); (3) precizno predviđanje ishoda tretmana (prediktivna ili farmakološka validnost) (McKinney, 2001). Pored navedenih kriterijuma, u novije vreme se dodatna pažnja posvećuje i patološkoj validnosti modela, koja podrazumeva poklapanje fizioloških, molekularnih i ćelijskih promene uočeni kod životinja sa promenama koje su uočene kod obolelih ljudi (Krishnan i Nestler, 2008). Kada su u pitanju životinjski modeli depresije, mali broj modela može da zadovolji sve kriterijume validacije, a većina modela koji su

trenutno u upotrebi se oslanja na uspešno dejstvo antidepresiva (farmakološka validnost) ili na primenu nekog vida stresa (etiološka validnost). Međutim, kao što svi pacijenti ne manifestuju sve simptome depresije, tako ni za idealan životinjski model nije neophodno da ima sve promene povezane sa depresivnim ponašanjem.

1.2. NEUROINFLAMACIJA I DEPRESIJA

1.2.1. Uloga inflamacije u patofiziologiji kliničke depresije

Kao što je već pomenuto, trećina pacijenata obolelih od depresije ne odgovara na konvencionalne tretmane, koji na prvom mestu deluju na monoaminske signalne puteve (Rush, 2007). Jedan od uzroka ovoga bi mogao da bude aktivacija imunskog sistema i povišenje proinflamatornih medijatora, što se često uočava kod pacijenata koji ne odgovoraju na dostupne terapije (O'Brien i sar., 2007). Naime, kod mnogih pacijenata sa depresijom su zapažene glavne karakteristike inflamatornog odgovora, kao što supovišena ekspresija proinflamatornih citokina, pre svega IL-6, IL-1 β i TNF- α , kao i njihovih receptora, kako u krvi, tako i u moždano-moždinskoj tečnosti i mozgu (Miller i sar., 2009a). Kod ovih pacijenata je uočen i povišen nivo proteina akutne faze, poput CRP-a, hemokina i adhezivnih molekula (Raison i sar., 2006). Štaviše, jedna meta-analiza je došla do zaključka da su IL-1 β , IL-6, TNF i CRP najpouzdaniji biomarkeri inflamacije kod pacijenata sa depresijom (Miller i sar., 2009a). Takođe, simptomi depresije su uočeni kod oko 50% pacijenta koji boluju od kancera ili hepatitisa C, a koji primaju terapiju INF- α , i ti simptomi se mogu otkloniti uzimanjem antidepresiva (Capuron i sar., 2002b).

Inflamacija je povezana i sa otpornošću pacijenata na tretman antidepresivima. Naime, jedno istraživanje je pokazalo da 45% pacijenata koji ne odgovaraju na tretman antidepresivima ima CRP > 3 mg/l, odnosno da ima visok nivo inflamacije (Pearson i sar., 2003). Veza inflamacije i depresije je potvrđena i u životinjskim modelima, u kojima inflamatorni stimuli poput bakterijskog lipopolisaharida (LPS), poliinozinske:policitidilne kiseline i bacila Kalmet-Gerina (BCG) mogu da izazovu simptome depresije (O'Connor i sar., 2009).

Treba napomenuti da neuroinflamacija može biti izazvana i nekim neimunološkim stimulusima, poput psihosocijalnog stresa, što bi mogao da bude jedan od načina nastanka depresije. Naime, pokazano je da psihosocijalni stres, poput, na primer, nastupa pred publikom, može da aktivira ključne inflamatorne signalne puteve u perifernim mononuklearnim ćelijama krvi, poput puteva koji aktiviraju jedarni faktor kappa B (NF-kB), što može da dovede do povišenja nivoa proinflamatornih citokina, poput IL-6 (Bierhaus i sar., 2003).

Međutim, neka istraživanja nisu uspela da pronađu vezu između inflamacije i depresije (Miller i sar., 2009a). Ova oprečnost rezultata ukazuje na to da inflamatorni procesi mogu imati ulogu u razvoju depresije u nekim, ali ne i u svim slučajevima. U skladu sa ovim su i nalazi koji su pokazali vezu između pojedinih simptoma depresije - smanjenja energije, nesanice i kognitivnih problema, sa jedne strane, i medijatora inflamacije, sa druge, što sugeriše da bi samo određeni simptomi depresije mogli biti povezani sa inflamacijom (Meyers i sar., 2005).

1.2.2. Uticaj imunskih signala sa periferije na nastanak inflamacije u mozgu

Proinflamatorni citokini mogu doprineti razvoju depresije na više načina, kao što je posredstvom uticaja na neurotransmitterske sisteme, neurogenezu i aktivnost HPA ose (Miller i sar., 2009a), o čemu će biti reči u narednim odeljcima. Iako još uvek nije poznato da li aktivacija inflamatornih procesa u depresiji primarno potiče sa periferije ili nastaje u CNS-u, periferni inflamatorni signali mogu dospeti do mozga različitim putevima (Miller i sar., 2009a).

Citokini prolaze kroz KMB posredstvom odgovarajućih transportera, i mogu da budu transportovani u oba smera, iz krvi ka mozgu i obrnuto. Većina citokina se transportuje iz krvi ka mozgu aktivnim transportom, odnosno uz utrošak energije, i u te citokine spadaju IL-1, IL-6 i TNF (Banks, 2005). Do lučenja citokina u CNS-u može doći i stimulacijom perifernih aferentnih nerava, poput aferentne komponente nerva vagusa, za koji je pokazano da reguliše povećanje produkcije citokina u CNS-u (Thayer i Sternberg, 2009). Pored toga, citokini mogu da uđu u mozak preko cirkumventrikularnih organa i horoidnog pleksusa, delova mozga koji nisu zaštićeni KMB. Iako su cirkumventrikularni organi generalno propustljivi

za makromolekule, pokazano je da su odgovorni za manje od 5% ukupnog preuzimanja IL-1 β na nivou mozga (Plotkin i sar., 1996). Takođe, citokini iz cirkulacije mogu da aktiviraju IL-1 receptore endotelnih ćelija KMB, što dovodi do lokalne produkcije sekundarnih ćelijskih glasnika, poput prostaglandina E2 i azotoksida (NO), unutar moždanog parenhima (Konsman i sar., 2004).

1.2.3. Komponente neuroinflamatornog procesa

1.2.3.1. Uticaj citokina na neurotransmitterske sisteme

Uzimajući u obzir značajnu ulogu koju neurotransmiteri imaju u regulaciji raspoloženja, velika pažnja je posvećena proučavanju uticaja citokina na njihov metabolizam. Najveća pažnja je posvećena proučavanju uticaja inflamacije na metabolizam monoamina. Istraživanja su pokazala da proinflamatorni citokini mogu da utiču na različite faze u metabolizmu ovih molekula: (1) mogu da utiču na sintezu monoamina putem smanjenja dostupnosti pojedinih enzimskih kofaktora, poput BH4 (Neurauter i sar., 2008); (2) mogu da smanje dostupnost monoamina povećavanjem ekspresije i funkcije presinaptičkih pumpi za njihovo preuzimanje iz sinaptičke pukotine, što je povezano sa nastankom ponašanja nalik depresivnom kod laboratorijskih životinja (Zhu i sar., 2010); (3) mogu da utiču i na oslobađanje monoamina: na primer, pokazano je da primena IFN α kod pacijenata obolelih od hepatitisa C povećava resorpciju i smanjuje oslobađanje primarnog prekursora dopamina, 3,4-dihidroksifenilalanina (Capuron i sar., 2012); (4) mogu da utiču i na promet serotonina (De La Garza i Asnis, 2003) i noradrenalina (Zalcman i sar., 1994), i ovaj efekat je povezan sa javljanjem zakasnelog i istrajnijeg depresivnog ponašanja kod životinja (Frenois i sar., 2007), kao i kod pacijenata obolelih od depresije (Raison i sar., 2009).

1.2.3.2. Uticaj citokina na procese neurogeneze i neuroplastičnosti

Poremećaj funkcije hipokampusa usled smanjene neurogeneze je jedan od glavnih uzročnika kognitivnih poremećaja koji se javljaju u depresiji. Nekoliko studija je pokazalo da promene u hipokampalnoj neurogenezi izazvane citokinima, imunskim ćelijama i aktiviranjem imunskog sistema, mogu da doprinesu

promenama u ponašanju u životinjskim modelima (Ben Menachem-Zidon i sar., 2008; Ziv i sar., 2006; Crupi i sar., 2010), a sličan efekat inflamacije na neurogenezu je pokazan i u ljudskoj populaciji (Makhija i Karunakaran, 2013). Postoji nekoliko mogućih mehanizama koji se nalaze u osnovi supresije hipokamalne neurogeneze pri sistemske inflamaciji. Jedan od najviše proučavanih mehanizama jeste direktan efekat citokina (IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-11, IFN- α , IFN- γ i TNF- α) na sve procese ključne za hipokampalnu neurogenezu, uključujući i proliferaciju nervnih matičnih ćelija, određivanje sudbine ovih ćelija, migraciju mladih neurona i njihovo sazrevanje (Borsini i sar., 2015). Takođe, pokazano je da neurogeneza može da bude regulisana i indirektnim signalnim putevima asociranim sa inflamacijom, poput neuroendokrinog sistema ili neurotrofnih faktora (Rohleder i sar., 2010).

Kada je u pitanju neuroplastičnost, pokazano je da citokini mogu da poremete signalni put BDNF-a. Na primer, pokazano je IL-1 β može da smanji ekspresiju mRNA-BDNF (Barrientos i sar., 2003), dok efekti inflamacije na BDNF mogu da budu blokirani primenom agonista IL-1 receptora (Ben Menachem-Zidon i sar., 2008; Barrientos i sar., 2003). Inflamatorni citokini takođe utiču i na fosforilaciju receptora za BDNF, tropomiozinske receptorske kinaze B (TrkB), dodatno remeteći ovaj signalni put i na taj način umanjujući neurogenezu u hipokampusu (Cortese i sar., 2011). Uloga BDNF-a u depresiji izazvanoj inflamacijom je takođe uočena i u kliničkim studijama, koje su pokazale da su depresivni simptomi izazvani terapijom IFN α posredovani smanjenim nivoom BDNF-a (Kenis i sar., 2011; Lotrich i sar., 2013).

1.2.3.3. Citokini i hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osa

Kao što je već pomenuto, promene u aktivnosti HPA ose, kao jedna od najpouzdanijih promena uočenih kod pacijenata obolelih od kliničke depresije, su okarakterisane hiperaktivnošću ove ose i povišenim nivoom kortizola u krvi. Ovde je važno dati kratak opis regulacije ove ose. Naime, aktivnost HPA ose je pod kontrolom CRH-a i vazopresina, koji se luče iz paraventricularnog jedra hipotalamusa (PVN) i stimulišu lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) hipofize. ACTH se luči u sistemsku cirkulaciju i podstiče ćelije kore nadbubrežnih

žlezda na sekreciju glukokortikoida, krajnjeg produkta aktivnost HPA ose. Takođe, i drugi regioni mozga mogu uticati na aktivnost HPA ose (De Kloet i sar., 1998).

Pokazano je da do hiperaktivnosti HPA ose može da dođe usled povećanja nivoa proinflammatoryh citokina, a veza HPA ose i imunskog sistema je dvosmerna - HPA osa može negativno da reguliše sintezu i oslobađanje citokina na nivou imunskih ćelija, štiteći na taj način organizam od štetnih posledica hiperaktivnog imunskog sistema (Pariante, 2003). Citokini mogu da utiču na HPA osu na sva tri nivoa - na nivou hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlezde. Naime, citokinski receptori su detektovani na svim nivoima HPA ose, zbog čega svaki nivo može da služi kao tačka integracije imunskih i neuroendokrinih signala. Pored toga, i ćelije mozga, hipofize i nadbubrežne žlezde sintetišu i oslobađaju citokine, i ti citokini mogu parakrino da utiču na amplifikaciju i održavanje povišene aktivnosti HPA ose tokom hronične inflamacije (Turnbull i Rivier, 1995). Dakle, svaki nivo HPA ose sadrži lokalnu citokinsku mrežu, koja može biti stimulisana raznim citokinima, poput IL-1, IL-6 i TNF α (Silverman i sar., 2005).

U stanju povišene inflamacije, proinflammatory citokini mogu da izazovu hiperaktivaciju HPA ose i prekomerno lučenje glukokortikoida, što na kraju dovodi do nastanka glukokortikoidne rezistencije (Irwin i Miller, 2007). Citokini mogu da naruše funkciju GR-a na više nivoa, o čemu će više reči biti u odeljku 1.3.3. Na nivou hipotalamusa, glukokortikoidna rezistencija izazvana citokinima može da bude objašnjenje za narušenu sposobnost glukokortikoida da smanje produkciju CRH-a. Naime, uobičajeni inhibitorni efekti glukokortikoida na produkciju i delovanje citokina od strane ćelija imunskog sistema prestaju, što dovodi do konstantne proizvodnje inflammatoryh citokina. Ovaj pojačani imunski odgovor u mozgu dovodi do smanjenja inhibitornog efekta glukokortikoida na CRH i do pojačane produkcije kortizola (Raison i Miller, 2003).

1.2.4. Depresija kao inflamatorna bolest – farmakološki dokazi

1.2.4.1. Efekti antidepressiva na medijatore inflamacije

Kao što je već pomenuto, svi antidepressivi koji su trenutno u upotrebi funkcionišu tako što utiču na komponente monoaminske neurotransmisije.

Međutim, novije studije su pokazale da ovi antidepresivi mogu posleđično da izazovu promene i u drugim sistemima u mozgu - mogu da povećaju ekspresiju BDNF-a, dovedu do promena u aktivnosti HPA ose i snize pojedine parametre oksidativnog stresa (Molendijk i sar., 2011). Pored toga, nekoliko meta-analiza je pokazalo da antidepresivi mogu da smanje nivo proinflammatoryh citokina; tačnije, pokazano je da SSRI mogu da smanje nivo IL-6 (Molendijk i sar., 2011; Strawbridge i sar., 2015) i IL-1 β (Cattaneo i sar., 2013), kao i da marginalno smanje nivo CRP-a (Hiles i sar., 2012). Takođe je pokazano da ovaj efekat može da zavisi od klase antidepresiva koja se koristi - selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina, triciklični i tetraciklični antidepresivi povećavaju nivoe CRP i IL-6 pre svega kod muškaraca, dok SSRI smanjuju nivo ovih citokina kod muških pacijenata obolelih od depresije (Vogelzangs i sar., 2012).

Studije na životinjama su takođe pokazale da antidepresivi dovode do smanjene proizvodnje brojnih perifernih citokina (IL-1 β , TNF- α i IL-6), kao i CRP i NO (Kubera i sar., 2011; Sacre i sar., 2010), ali da ovaj efekat ne zavisi od klase primenjenih antidepresiva (Hannestad i sar., 2011). Slični efekti su uočeni i na nivou mikroglije. Naime, pokazano je da antidepresivi mogu da spreče sintezu TNF- α , IL-6 i NO indukovanu LPS-om i da blokiraju ekspresiju gena ovih citokina u mikrogliji, što je praćeno nestankom depresivnog ponašanja izazvanog primenom LPS-a (Yirmiya i sar., 2001; Mello i sar., 2013).

1.2.4.2. Efekti antiinflammatoryh lekova na simptome depresije

Među prvim antiinflammatorynim lekovima koji su razmatrani kao kandidati za tretman kliničke depresije (Tabela 2) su nesteroidni antiinflammatoryni lekovi (NSAIDs), čiji je glavni mehanizam delovanja inhibicija ciklooksigenaze (COX), enzima ukljućenog u sintezu prostaglandina. Najviše proućen od svih selektivnih COX-2 inhibitora je celekoksib, za koji je pokazano da ima blagotvorne efekte na simptome depresije, kao i da snižava pojedine proinflammatoryne markere u nekoliko životinjskih studija (Casolini i sar., 2002; Humphreys i sar., 2006; Myint i sar., 2007). I u kliničkim studijama je pokazano da ovaj lek ima antidepresivna svojstva, ali samo kod pacijenata mladih od 70 godina (Iyengar i sar., 2013; Fields i sar., 2012). Što se tiče neselektivnih COX inhibitora, pokazano je da aspirin u

kombinaciji sa antidepresivima može imati pozitivne efekte na simptome depresije (Iyengar i sar., 2013; Fields i sar., 2012).

Kada su u pitanju inhibitori citokina, oni mogu uticati na brojne molekule pogođene u depresiji, poput BDNF-a i serotoninskog transportera (Sahin i sar., 2015; Cavanagh i sar., 2010), zbog čega bi mogli da doprinesu poboljšanoj strategiji lečenja depresije, pogotovo u kombinaciji sa antidepresivima. Naime, pokazano je da ovi agensi mogu da ublaže simptome depresije, poput anksioznosti i umora, ali je njihov efekat do sada posmatran samo kod pacijenata kod kojih je depresivno raspoloženje bilo propratni simptom nekog drugog inflamatornog stanja, poput psorijaze ili Kronove bolesti (Adzic i sar., 2018). Takođe, nekoliko studija je pokazalo da inhibitori citokina u kombinaciji sa antidepresivima mogu da poboljšaju ishod terapije u nekim subpopulacijama pacijenata, pre svega onih sa povišenim medijatorima inflamacije (Adzic i sar., 2018).

Pored NSAID-a i inhibitora citokina, koji imaju primarno antiinflamatorno dejstvo, pokazano je da i drugi agensi čiji su antiinflamatorni efekti nezavisni od njihove primarne funkcije mogu imati antidepresivna svojstva (Tabela 2).

Tabela 2 – Antiinflamatorni lekovi koji imaju antidepresivna svojstva. Preuzeto i prilagođeno iz Adzic i sar (2018).

KLASA	MONOTERAPIJA	KO-TRETMAN
Nesteroidni antiinflamatorni lekovi	ibuprofen, naproksen, celekoksib, aspirin	celekoksib, aspirin
Inhibitori citokina	etanarcept, adalimumab, ustekinumab, infliksimab, tocilizumab	etanarcept, adalimumab, infliksimab, tocilizumab
Tetraciklini	minociklin	minociklin
Statini	atorvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, cerivastatin	lovastatin, simvastatin
Tiazolidindioni	rozigitazon, pioglitazon	rozigitazon, pioglitazon
Modafinil		
Ω-3 masne kiseline		

1.2.5. LPS-om indukovani model depresije

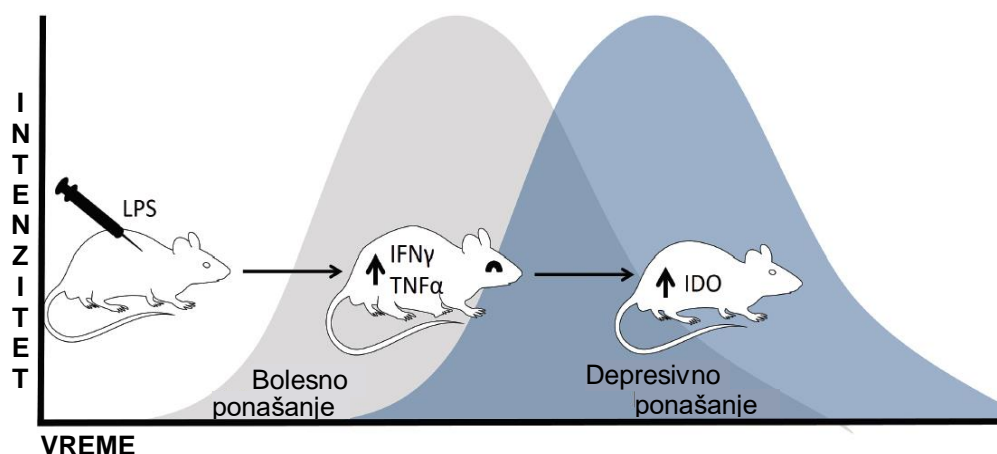
Depresija indukovana inflamacijom može da bude proučavana koristeći veći broj inflamatornih agenasa, poput bakterijskog LPS-a, viralne mimetičke poli I:C i BCG-a. Životinje tretirane bilo kojim od ovih agenasa gube na težini, jedu i piju manje i imaju smanjenu lokomotornu aktivnost nekoliko sati ili dana nakon tretmana, zavisno od prirode inflamatornog agensa i/ili doze. Ovo ponašanje odgovara povišenom nivou proinflamatornih citokina na periferiji i u mozgu (Andre i sar., 2008), a takođe korelira sa promenama u ponašanju kod pacijenata obolelih od depresije.

LPS je molekul koji predstavlja glavnu komponentu spoljašnje membrane gram negativnih bakterija, i u organizmu životinja izaziva jak imunski odgovor tako što se vezuje direktno za TLR4 receptore i aktivira signalne puteve regulisane ovim receptorima. To dovodi do aktivacije NFkB i faktora regulacije transkripcije interferona-3 i -7 (IRF-3 i -7), što za rezultat ima sintezu proinflamatornih citokina, hemokina i drugih proinflamatornih signala. Primarna reakcija životinja na ovaj imunološki agens jeste javljanje „bolesničkog ponašanje” (sickness behavior), koje se kod glodara tipično završava 24 časa nakon ubrizgavanja LPS-a. Tada se motorna aktivnost i apetit vraćaju u normalu, ali životinje i dalje pokazuju smanjenu mobilnost u testu prinudnog plivanja (FST) i testu kačenja o rep (TST) kao i smanjen unos saharoze, što ukazuje na razvoj depresivnog ponašanja (Frenois i sar., 2007). Kada su u pitanju molekularni parametri, pokazano je da se depresivno ponašanje razvija paralelno sa povećanjem proinflamatornih citokina i ekspresije indolamin 2,3-dioksigenaze (IDO) (Slika 3).

Pored toga što se koristi kao model akutne imunske aktivacije, ovaj model je modifikovan na različite načine, tako da može da izazove i hroničnu inflamaciju (Kubera i sar., 2013; Adzic i sar., 2015) ili da se kombinuje sa hroničnim stresom (Elgarf i sar., 2014).

Pored depresivnog ponašanja, LPS takođe izaziva i anksiozno ponašanje (Sulakhiya i sar., 2016). Anksioznost i depresija se u kliničkoj populaciji često dijagnostikuju zajedno (Brown, 2001), a istovremeno modeliranje oba simptoma može da bude i korisno i problematično. Naime, istovremeno prisustvo

anksioznosti i depresije može da doprinese validnosti ovog modela. Međutim, baš kao što se depresija i anksioznost kod ljudi preklapaju klinički (Zbozinek i sar., 2012), tako je i kod životinja nemoguće povući jasnu granicu između depresivnog i anksioznog poremećaja, odnosno nemoguće je razdvojiti mehanizme koji dovode do depresije od onih koji dovode do anksioznosti.



Slika 3 - Šematski prikaz vremenske linije LPS-om indukovanih modela depresije. Preuzeto i prilagođeno iz Remus i Dantzer (2016). Objašnjenje pogledati u tekstu.

1.3. GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR

1.3.1. Struktura GR-a

GR pripada filogenetski konzerviranoj nadporodici jedarnih receptora. Kodiran je *NR3C1* genom, lociranim na kratkom kraku hromozoma 5 (5q31) kod čoveka, i direktno pojačava ili utišava transkripciju hiljada gena uključenih u različite procese u organizmu. Postoji samo jedan gen za GR koji se sastoji od deset egzona, a alternativnom obradom transkripta ovog gena može nastati više izoforme (Encio i Detera-Wadleigh, 1991). Klasična izoforma GR-a je označena kao GR α . Ova izoforma se kod ljudi sastoji od 777 aminokiselina, ima molekulska masu od 95 kDa i eksprimirana je u gotovo svim tkivima organizma. Druge opisane izoforme nastale alternativnom obradom primarnog transkripta GR-a kod ljudi nose oznake GR β , GR γ , GR-A i GR-P. Ove izoforme su eksprimirane u manjoj meri, pokazuju

tkivnu specifičnost i razlike u transkripcionoj aktivnosti (Sousa i sar., 2000; Beger i sar., 2003).

GR α se strukturno može podeliti na tri jasno definisana domena (Slika 5). N-terminalni domen (NTD) sadrži snažan transaktivirajući domen 1 (AF-1) u okviru koga se nalazi nekoliko mesta za fosforilaciju. Centralni, visoko konzervirani domen zadužen za vezivanja za DNK (DBD) interaguje sa DNK sekvencama koje odgovaraju na glukokortikoide preko dva motiva cinkanih prstiju (Umesono i Evans, 1989), ima ulogu u dimerizaciji receptora i njegovoj lokalizaciji u jedro. U okviru ligand-vezujućeg domena (LBD), osim mesta za vezivanje steroida, nalaze se i drugi slabiji transaktivirajući domen, drugi slabiji signal za lokalizaciju u jedro, i aminokiseline važne za dimerizaciju receptora (Picard i Yamamoto, 1987; Duma i sar., 2006) i vezivanje proteina toplotnog stresa 90 (hsp90) (Kanelakis i sar., 2002). Dok su DBD i LBD visoko konzervirani unutar familije jedarnih receptora, N-terminalni AF1 domeni i okolni NTD regioni su različiti u sekvenci i veličini.

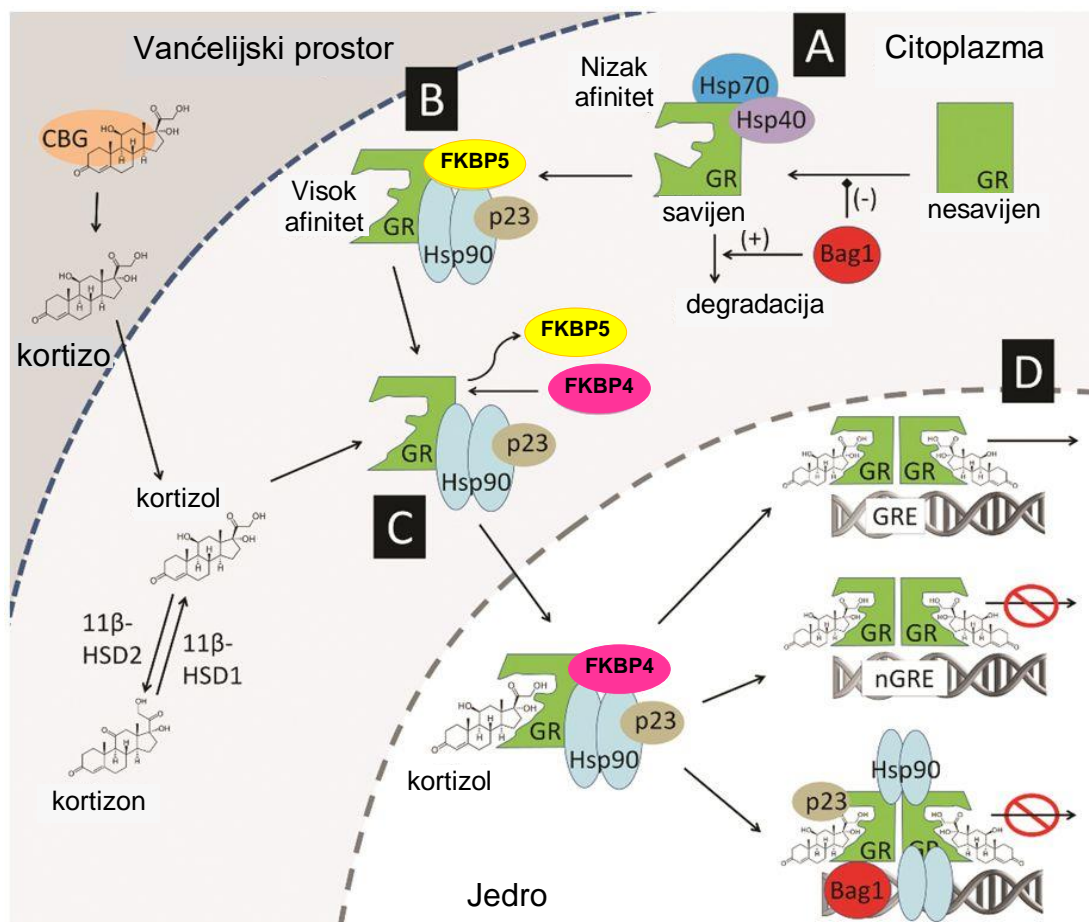
1.3.1.1. Mehanizmi regulacije GR-a

U odsustvu glukokortikoida, GR je lociran u citosolu i pakuje se u multiproteinske komplekse koji se sastoje od proteina toplotnog šoka, hsp90, hsp70 i hsp23, i imunofilina FKBP4 i FKBP5. Ovi proteini se vezuju za receptor i drže ga u neaktivnom stanju u citosolu (Pratt i Toft, 1997). Vezivanje hormona indukuje konformacione promene receptora, koje dovode do njegove disocijacije iz kompleksa, dimerizacije i translokacije u jedro (Bledsoe i sar., 2002). Na Slici 4 je predstavljen šematski prikaz aktivacije GR-a i ključnih kofaktora i šaperona uključenih u njegovu regulaciju.

Ukratko, hsp90 reguliše konačno zauzimanje aktivne konformacije GRa, obezbeđuje dostupnost „džepa“ za vezivanje liganda i omogućava hormonu i koregulatorima da deluju kao alosterni efektori, što čini bazu za specifičan genski i ćelijski odgovor GR-a na ligand. I druge komponente ovog kompleksa imaju važnu ulogu u regulisanju funkcije GR, kao što su FKBP4 i FKBP5. FKBP5 inhibira translokaciju GR-a u jedro, dok je FKBP4 stimuliše. U prvom slučaju radi se o negativnom regulatoru jedarne aktivnosti GR-a, a u drugom o pozitivnom. FKBP4 i FKBP5 su u konkurenciji za isto mesto vezivanja na hsp90, zbog čega promene u

nivoima ovih proteina remete signalizaciju GR-a i dovode se u vezu sa stresom, tj. sa disfunkcijom HPA ose.

Kada se nađe unutar jedra, GR može da kontroliše transkripciju gena na dva načina – zavisno i nezavisno od vezivanja za DNK. Kontrola transkripcije zavisna od vezivanja za DNK takođe može da se odvija na dva načina. Homodimer



Slika 4 - Šematski prikaz aktiviranja GR-a i ključnih kofaktora i šaperona uključenih u njegovu regulaciju. (A) hsp40 i hsp70 stimulišu, dok Bag1 inhibira savijanje GR-a u konformaciju pri kojoj ima nizak afinitet prema steroidima. Bag1 takođe potpomaže degradaciju nestabilnog GR kompleksa. (B) hsp90, p23 i FKBP5 stabilizuju GR kompleks u stanju visokog afiniteta. (C) Nakon vezivanja kortizola i zamene FKBP5 sa FKBP4 dolazi do translokacije GR-heterokompleksa u jedro. (D) U jezdu, GR vrši aktivaciju ili represiju transkripcije ciljanih gena. Preterana ekspresija Bag1, hsp90 ili p23 može da dovede do represije transkripcije gena regulisanih GR-om. Dostupnost slobodnog kortizola (modulisana nivoom CBG-a) i konverzija kortizola u kortizon pomoću 11 β -HSD1/2 takođe utiče na signalni put GR-a. Slika preuzeta i prilagođena iz Sinclair i sar. (2013).

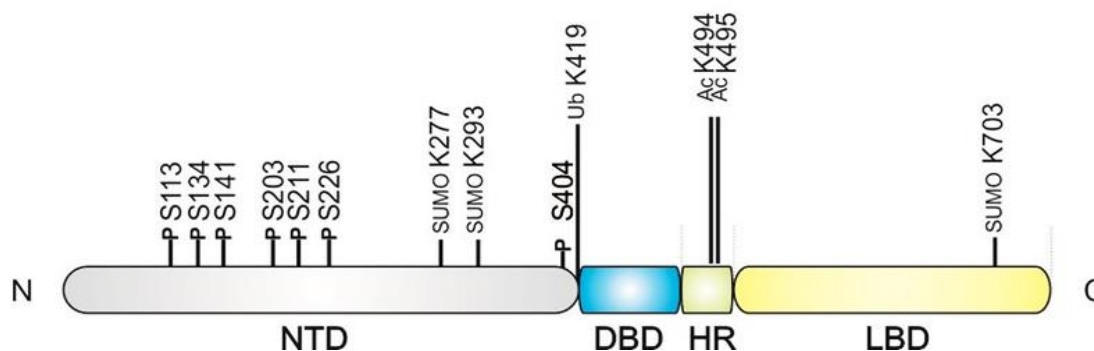
Legenda: Bag1, eng. BCL2 associated athanogene 1; CBG, kortikosteroid-vezujućeg globulin; 11 β -HSD1/2, 11 β -hidroksteroid dehidrogenaza 1/2.

GR-a može da se veže za odgovarajuće hormon-responsivne sekvence DNK koje reaguju na glukokortikoide (GRE), i da aktivira transkripciju gena (Beato, 1989, Freedman, 1992), a može da se veže i za sekvence koje su negativno regulisane glukokortikoidima (nGRE) i da dovede do represije ciljnih gena (Uhlenhaut i sar., 2013). Sa druge strane, regulacija transkripcije gena nezavisna od DNK vezivanja podrazumeva interakciju GR-a sa drugim transkripcionim faktorima koji se vezuju za odgovarajuće DNK sekvence. Naime, pored homodimera, GR može da formira i heterodimere sa drugim transkripcionim faktorima u jedru, poput p65 (subjedinice NF- κ B) i c-Jun/c-Fos (subjedinice proteinskog aktivatora 1, AP-1) (Kassel i Herrlich, 2007). Sposobnost GR-a da se asocira sa različitim kofaktorima u jedru je specifična za ćelijski tip i za promotor, i doprinosi specifičnim transkripcionim promenama u ćeliji i posledičnom odgovoru na glukokortikoide (Necela i Cidlowski, 2004).

1.3.1.2. Post-translacione modifikacije GR-a

Funkcija i aktivnost GR-a su dodatno modulirane post-translacionim modifikacijama koje menjaju njegovu funkciju i indirektno modulišu njegove interakcije sa proteinima, poput šaperonskih kompleksa i kofaktora, povećavajući tako raznovrsnost glukokortikoidnog odgovora. Post-translacione modifikacije GR-a utiču na njegovu stabilnost, unutarćelijsku distribuciju, interakcije sa drugim proteinima, transkripcionu aktivnost, a samim tim i na krajnji odgovor ćelije na glukokortikoide. Najznačajnije post-translacione modifikacije su fosforilacije, sumoilacije, ubikvitinacije i acetilacije (Slika 5).

GR, kao i većina drugih proteina, prolazi kroz naizmenične cikluse fosforilacije posredovane kinazama, i defosforilacije posredovane fosfatazama. Na taj način se omogućava brza regulacija proteinske funkcije u odgovoru na signale koje ćelija prima. Do danas su kod ljudi opisane fosforilacija GR-a na 7 mesta u okviru NTD, i to na Ser113, Ser134, Ser141, Ser203, Ser211, Ser226 i Ser404 (Slika 5) (Ismaili i Garabedian, 2004), i ove rezidue su konzervirane kod ljudi, miševa i pacova (Tabela 3).



Slika 5 - Šematski prikaz najvažnijih post-translacionih modifikacija GR-a i struktura GR-a kod čoveka. Varijacije u strukturi i funkciji proteina su delimično uslovljene post-translacionim fosforilacijama (P), sumoilacijama (SUMO), ubikvitinacijama (Ub) i acetilacijama (Ac). Slika preuzeta i prilagođena iz Vandevyver i sar. (2014).

Najviše su proučavane fosforilacije na Ser203, Ser211 i Ser226 kod ljudi (ortolozi fosforilacija na Ser224, Ser232 i Ser246 kod pacova), koje su posredovane brojnim kinazama, poput proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK) i ciklin-zavisne kinaze 5 (CDK5). Na pojedinim epitopima GR može biti fosforilisan i u odsutvu liganda, dok je vezivanjem liganda njegova fosforilacija još više podstaknuta. Pored toga, fosforilacija jednog epitopa može uticati na fosforilaciju drugog, a obrazac fosforilacije samog receptora može da zavisi i od prethodnih fosforilacija. U Tabeli 3 su prikazana mesta fosforilacija GR-a kod ljudi koje su do danas najviše izučene, njihovi ortolozi kod pacova i miševa, kao i kinaze koje dovode do ovih fosforilacija i efekti koje one imaju na ekspresiju gena regulisanih GR-om.

Fosforilacija GR na Ser246 je stimulisana vezivanjem liganda, mada određeni bazalni nivo fosforilacije na Ser246 može da postoji u pojedinim tipovima ćelija i u odsustvu hormona (Blind i Garabedian, 2008). Ova fosforilacija dovodi do smanjenja transkripcione aktivnosti GR-a, a nakon pada nivoa hormona, stimuliše izbacivanje receptora iz jedra u citosol (Itoh i sar., 2002). Iako većina literaturnih podataka ukazuje na to da fosforilacija na Ser246 smanjuje transkripcionu aktivnost GR-a, postoje podaci koji pokazuju da ova fosforilacija potpomaže regrutaciju receptora na promotore nekih gena sa GRE, ali se njena tačna uloga na ovim promotorima za sada još uvek ne zna (Blind i Garabedian, 2008). Kada je u

Tabela 3 – Mesta fosforilacije glukokortikoidnog receptora. Tabela preuzeta i prilagođena na osnovu Galliher-Beckley i Cidlowski (2009).

MESTO FOSFORILACIJE	KINAZA	EFEKAT
Pacovska Ser224 (ljudska Ser203 mišja Ser212)	Ciklin A/B/E- CDK2 Ciklin A/B- CDC2 ERK	Nalazi se u citosolnoj frakciji ćelija i ne vezuje se za promotore koji sadrže GRE, što ukazuje na to da je ova fosfoforma transkripciono neaktivna.
Pacovska Ser232 (ljudska Ser211 mišja Ser220)	Ciklin A/B/E- CDK2 Ciklin A/B- CDC2 ERK, p38 CDK5	GR je transkripciono aktivniji kada je fosforilisan na ovom mestu zbog konformacione promene i povećane regrutacije na promotore koji sadrže GRE.
Pacovska Ser246 (ljudska Ser226 mišja Ser234)	JNK	Iako može da se asocira sa promotorima koji sadrže GRE, ova fosforilacija vodi do njegovog pojačanog eksporta i utišavanja signalnog puta GR-a.
Pacovska Ser424 (ljudska Ser404 mišja Ser412)	GSK-3	Dovodi do konformacione promene GR-a, izmenjenog regrutovanja kofaktora i preusmeravanja transkripcionog odgovora, i utišavanja signalnog puta ovog receptora.
Pacovska Thr171 (mišja Thr159)	GSK-3	Dovodi do inhibicije transaktivacionog potencijala receptora.

pitanju fosforilacija GR-a na Ser232, ona je zavisna od vezivanja liganda, stimuliše prelazak GR-a u jedro, kao i njegovu transkripcionu aktivnost. Fosforilacija GR-a na Ser232 stimuliše transkripcionu aktivnost receptora tako što dovodi do njegove konformacione promene i regrutovanja osnovne transkripcione mašinerije (Chen i sar., 2008; Wang i sar., 2002; Wang i sar., 2007).

Na ove dve fosforilacije GR-a mogu da utiču i fosforilacije na drugim mestima. Na primer, iako je GR fosforilisan na Ser224 transkripciono neaktivan, ova fosforilacija može da utiče na transkripcionu aktivnost receptora tako što

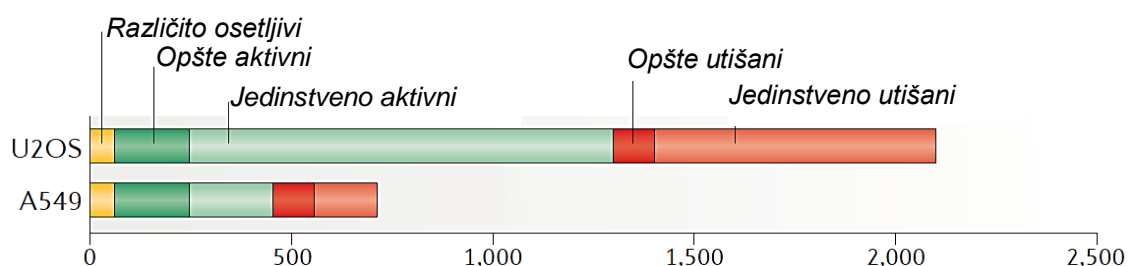
smanjuje fosforilaciju na Ser246, kao i suprotno – fosforilacija na Ser246 sprečava fosforilaciju na Ser224 (Wang i sar., 2007). Moguće objašnjenje za ovakav uzajamni uticaj mesta fosforilacije moglo bi biti postojanje sternih smetnji i nemogućnost pristupa kinaza odgovarajućim mestima fosforilacije i/ili stimulacija regrutovanja fosfataza nakon fosforilacije jednog od epitopa (Ismaili i Garabedian, 2004). Treba napomenuti i da određeni bazalni nivo fosforilacije GR-a na Ser224 postoji i u odsustvu hormona, a nakon vezivanja liganda ova fosforilacija je još više stimulisana (Wang i sar., 2002; Chen i sar., 2008). Izoforma GR-a fosforilisana na Ser224 isključivo je pronađena u citosolu i nema transkripcionu aktivnost (Wang i sar., 2004b; Blind i Garabedian, 2008).

S obzirom na to da aktivnost GR zavisi od mesta i broja fosforilisanih ostataka, na aktivnost GR bitno utiču fosfataze, čija je uloga defosforilacija aminokiselinskih ostataka proteina. Uloga fosfataza u regulaciji fosforilacije GR-a manje je ispitivana u odnosu na ulogu kinaza. Pokazano je da je protein- fosfataza 5 (PP5) preko hsp90 vezana za C-kraj GR-a i ima ulogu u održavanju niske bazalne fosforilacije (Wang i sar., 2007). Nakon vezivanja glukokortikoida, hsp90 i PP5 se oslobađaju, što dovodi do povećanja fosforilacije Ser na N-kraju GR-a (Wang i sar., 2007). Takođe, protein- fosfataze 1 i 2A imaju ulogu i u prelasku receptora iz jedra u citoplazmu nakon stimulacije hormonom (DeFranco i sar., 1991).

1.3.2. Uloga GR-a u regulaciji genske ekspresije

GR deluje na način koji zavisi od konteksta; naime, iako reguliše tačno određene mreže gena u određenom kontekstu, može da ispolji i neverovatnu plastičnost zavisno od tipa ćelije i njenog fiziološkog stanja, što može da dovede do raznovrsnog ishoda (Slika 6).

Jedna od najznačajnijih funkcija GR-a u organizmu jeste uloga u inflamatornom odgovoru. Naime, nakon aktiviranja, GR se translocira u jedro, gde se vezuje za transkripcione faktore NF-kB (McKay i Cidlowski, 1998), AP-1 (Jonat i sar., 1990) ili CREB (Focking i sar., 2003), što dovodi do modulacije ekspresije ciljanih gena. Tipične mete GR-om posredovane transrepresije su inflamatorni citokini, poput IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF α , COX-2 i inducibilne NO sintaze (De Bosscher i Haegeman, 2009), i transrepresija ovih gena je odgovorna za dobro



Slika 6 – Regulacija genske ekspresije zavisna od konteksta. Illumina Human Ref8 beadchip analiza gena regulisanih GR-om. Na slici su prikazani geni regulisani četvoročasovnim tretmanom 100 nM DEX-om u ćelijama karcinoma pluća (A549) i osteosarkoma (U2OS). Ekspresija različito osetljivih gena je stimulisana u jednoj, a inhibirana u drugoj ćelijskoj liniji. Opšti geni su na sličan način regulisani u obe ćelijske linije. Jedinstveni geni su regulisani glukokortikoidima u jednoj, ali ne i u drugoj ćelijskoj liniji. Količina gena koji su jedinstveno aktivirani i različito osetljivi predstavlja regulaciju gena zavisnu od konteksta. Različito osetljivi geni pokazuju različite mehanizme regulacije ciljanih gena u dva ćelijska tipa. Slika preuzeta i prilagođena iz Weikum i sar. (2017).

poznata antiinflamatorna svojstva glukokortikoidnih hormona. Sa druge strane, glukokortikoidi mogu da vrše i transaktivaciju proinflamatornih gena, a vreme, koncentracija i trajanje izlaganja glukokortikoidima su od ključnog značaja u određivanju prirode njihovog efekata (Frank i sar., 2010). Pored citokina, pokazano je da GR utiče i na ekspresiju brojnih receptora uključenih u imunski odgovor, poput TLR4 receptora (Curtale i sar., 2017). GR takođe reguliše i HPA osu, i to na više načina: (1) inhibira ekspresiju, sintezu, sekreciju, regulaciju translacije i stabilnost iRNA CRH u PVN (Zhou i Cidlowski, 2005; Yamamori i sar., 2007; Ma i sar., 2001); (2) dovodi do supresije transkripcije proopiomelanokortina, prekursora ACTH, u kortikotropnim ćelijama hipofize (de Kloet i sar., 2005; McEwen, 2007); (3) utiče na sintezu steroidnih hormona, iako molekularni mehanizam inhibicije steroidogeneze putem GR-a još uvek nije jasan (Gummow i sar., 2006); (4) utiče i na regulaciju sopstvene transkripcije - pokazano je da u okviru promotora gena za GR postoji nekoliko GRE sekvence (Geng i sar., 2008).

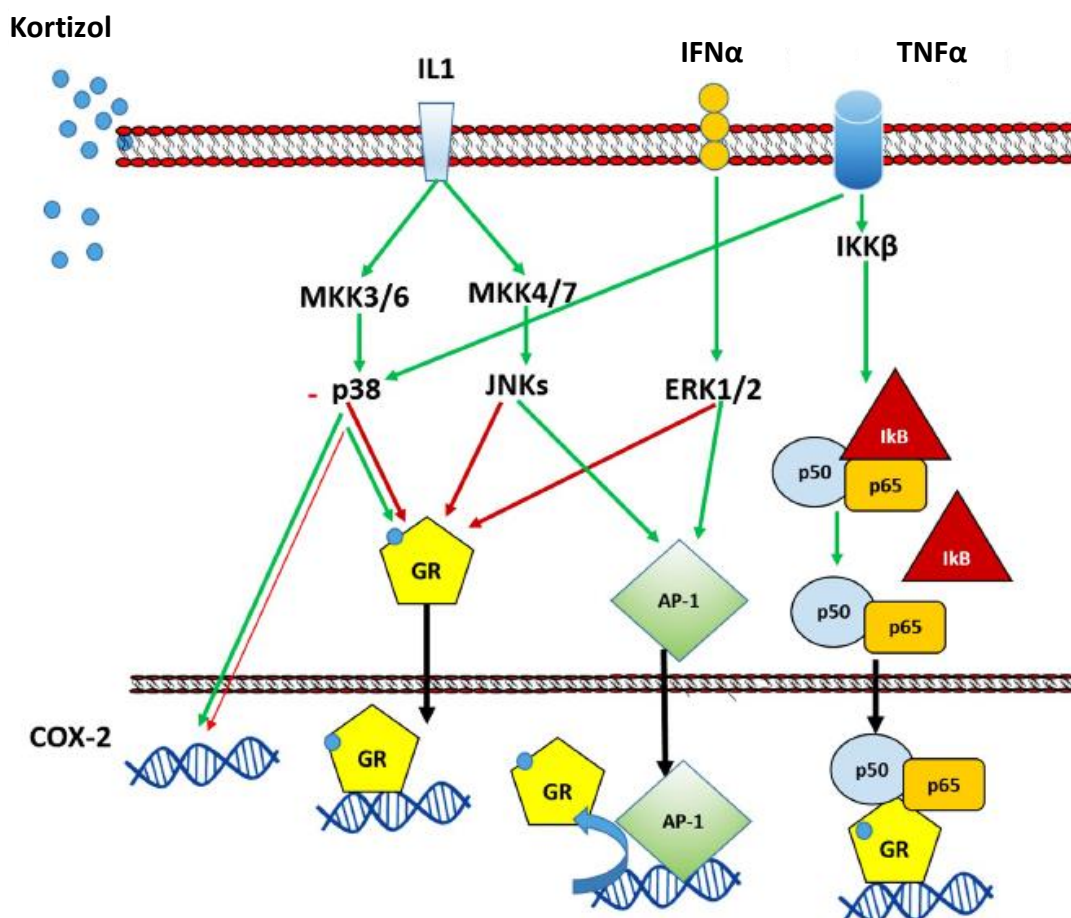
Ovaj receptor reguliše i ekspresiju gena uključenih u neuroplastičnost, poput gena za BDNF, a efekti sistemske administracije glukokortikoida na ekspresiju BDNF-a su izučavani u više moždanih regiona. Te studije su pokazale da, u većini slučajeva, povišen nivo glukokortikoida dovodi do smanjenja nivoa iRNK

ovog proteina u PFC-u i hipokampusu nakon akutnog (2-8h) (Hansson i sar., 2006; Vellucci i sar., 2001; Hansson i sar., 2000) i hroničnog tretmana (Smith i sar., 1995). GR utiče i na ekspresiju komponenti neurotransmisije posredovane serotoninom. Na primer, pokazano je da glukokortikoidi negativno regulišu transkripciju serotoniniskog 5-HT_{1A} receptora (Ou i sar., 2001), kao i transportera receptora za serotonin, p11 (Yao i sar., 1999).

1.3.3. Uticaj inflamacije na GR

Kao što je ranije pomenuto, proinflamatorni citokini, pre svega IL-1, IL-6 i TNF α , mogu da utiču na aktivnost HPA ose i na brojne aspekte funkcije GR-a. Pokazano je da ovi citokini smanjuju ekspresiju GR-a (Pace i sar., 2007), remete njegovu translokaciju iz citosola u jedro (Engler i sar., 2008) i smanjuju njegovu transkripcionu aktivnost (Pariante i sar., 1999). Studije su takođe pokazale da inflamatorni citokini mogu da utiču na ekspresiju određenih izoformi GR-a. Naime, pokazano je da TNF α i IL-1 mogu da povećaju ekspresiju transkripciono neaktivne forme GR-a, GR β , dvostruko, dok na ekspresiju GR α imaju slabiji efekat - povećavaju je 1.5 puta (Webster i sar., 2001). Najznačajniji signalni molekuli putem kojih inflamacija može da utiče na funkciju GR-a su: (a) MAPK, koje utiču na fosforilaciju GR i time modulišu njegovu translokaciju i transkripcionu aktivnost, (b) COX-2, koja se vezuje za GR u jedru i time reguliše njegovu transkripcionu aktivnost, i (c) NF-kB, koji vodi do supresije GR-a. Najznačajniji signalni putevi i mehanizmi kojima bi citokini mogu da utiču na funkciju GR-a su predstavljeni na Slici 7.

MAPK su familija proteinskih kinaza uključenih u signalnu transdukciju i kontrolu mnoštva ćelijskih procesa (Chen i sar., 2001; Johnson i Lapadat, 2002). To su serin/treonin kinaze, uključene u regulaciju aktivnosti mnogih proteinskih supstrata. MAPK obuhvata tri dobro okarakterisane podfamilije: kinaze regulisane ekstracelularnim signalima (ERK), p38 kinaze i kinaze koje fosforilišu N-terminalni kraj c-Jun-a (JNK). Ove kinaze su aktivirane citokinima, i pokazano je da mogu da poremete funkciju GR-a. Naime, inhibitorni efekti velikog broja citokina, poput IL-1, IL-2 i IL-4, na GR su posredovani p38 kinazom. Takođe, pokazano je da JNK može da inhibira funkciju GR-a direktnom fosforilacijom na Ser246 i na taj način



Slika 7 – Putevi kojima citokini utiču na glukokortikoidni receptor. U odsustvu hormona, GR se primarno nalazi u citosolu kao deo velikog multiproteinskog kompleksa. Nakon vezivanja glukokortikoida, dolazi do translokacije GR-a u jedro, njegove dimerizacije i/ili interakcije sa drugim transkripcionim faktorima, i vezivanje za GRE. IL-1 se takođe vezuje za svoje receptore, i na taj način aktivira MKK4/7 koja dalje dovodi do aktiviranja JNK, kao i MKK3/6 koja dovodi do aktiviranja p38 kinaze. Obe kinaze, i JNK i p38, fosforilišu specifične aminokiselinske ostatke GR-a, i na taj način ometaju njegovu translokaciju u jedro. Inflamacijom aktivirana p38 kinaza učestvuje u stabilizaciji iRNK nekoliko proteina uključenih u proces inflamacije, poput COX-2. Vezivanje IFN α za odgovarajuće receptore dovodi do aktivacije ERK1/2, što takođe utiče na fosforilaciju GR-a i njegovu transkripcionu aktivnost. Citokini, putem kaskada koje uključuju JNK i ERK1/2, aktiviraju AP-1, koji deluje kao antagonista GR-a. TNF α se takođe vezuje za odgovarajuće citokinske receptore, što dovodi do aktivacije IKK β , omogućavajući na taj način translokaciju NF-kB (p65 i p50 subjedinice). Aktivirani NF-kB se asocira sa GR-om, interferirajući na taj način sa njegovim vezivanjem za DNK. Zelene strelice označavaju aktivaciju, a crvene inhibiciju. Slika preuzeta i prilagođena iz Adzic i sar.(2018).

Legenda: – MKK, kinaza MAPK-a; I κ B, inhibitor NF-kB; IKK β , kinaza koja fosforiliše I κ B.

stimuliše izbacivanje receptora iz jedra (Rogatsky i sar., 1998). Aktivirane JNK takođe mogu da fosforilišue c-Jun i da na taj način utiču na formiranje AP-1, koji stimuliše ekspresiju velikog broja citokina i može da utiša transkripcionu aktivnost GR-a (Smoak i Cidlowski, 2004).

Još jedan inflamatorni signalni put koji može da utiče na funkciju GR-a jeste signalni put COX-2, koji dovodi do sinteze prostaglandina, i može da bude aktiviran inflamatornim faktorima, poput IL-1, TNF α i LPS-a (Di Battista i sar., 1999). Na primer, pokazano je da nimesulid, inhibitor COX-2, indukuje vezivanje GR-a za DNK i fosforilaciju GR-a u ćelijskoj kulturi (Di Battista i sar., 1999), dok drugi inhibitor ovog enzima, celekoksib, značajno povećava jedarnu lokalizaciju GR-a, njegovo vezivanje za DNK i transkripciju gena posredovanu GR-om (Hu i sar., 2005). Smatra se da bi efekti COX-2 inhibitora mogli da budu posledica njihove sposobnosti da inhibiraju MAPK (Hu i sar., 2005; Paccani i sar., 2005).

Citokini mogu uticati na funkciju GR-a i preko aktivacije transkripcionih faktora NF κ B, AP-1 ili STAT, koji zatim putem protein-protein interakcija mogu smanjiti transkripcionu aktivnost GR-a (Biola i sar., 2001; Raddatz i sar., 2001). Najbolje proučena je interakcija GR-a sa NF κ B, koji se aktivira u odgovoru na stres, inflamaciju ili infekciju, i dovodi do ekspresije velikog broja gena, uključujući i proinflamatorne citokine. NF- κ B interaguje sa GR-om u jedru direktno, usled čega dolazi do uzajamne represije funkcije i GR-a i NF- κ B (McKay i Cidlowski, 1999).

1.3.4. Izmenjena funkcija GR-a u depresiji

Brojne studije na životinjama su pokazale da postoji značajan uticaj stresa i povišenog nivoa glukokortikoida na ekspresiju GR-a u mozgu. Međutim, uočene promene su često kontradiktorne, i zavise od nekoliko faktora: (1) od pola - postoje polno-zavisne razlike u funkciji GR-a nakon izlaganja istom stresoru (Karandrea i sar., 2002); (2) od vremena koje je proteklo od izlaganja stresu - pokazano je da se ekspresija GR-a u dentatnom girusu hipokampusu pacova smanjuje za 41% u periodu od 30 minuta nakon izlaganja stresoru, dok se u periodu od 2h nakon izlaganja ta ekspresija povećava (Fujikawa i sar., 2000); (3) od starosti životinja - životinje koje su bile odvojene od majke u trećoj nedelji života su imale značajno smanjenu imunoreaktivnost GR-a u CA1 regionu

hipokampusa nakon izlaganja novom stresu kasnije u životu, dok je kod kontrolnih životinja efekat bio suprotan (Trujillo i sar., 2016); (4) od dužine izloženosti stresu - pokazano je da je imunoreaktivnost GR-a u dorzalnog hipokampusu pacova izlaganih stresoru smanjena usled petodnevnog izlaganja, dok je nakon 20 dana izlaganja stresu ona povećana (Robertson i sar., 2005); (5) od prirode stresora - hroničan stres obuzdavanja fizičke aktivnosti pacova dovodi do smanjene ekspresije receptora (Mizoguchi i sar., 2003), dok svakodnevno izlaganje životinja jakom zvuku u periodu od 30 dana ima suprotan efekat (Eraslan i sar., 2015).

Kada su u pitanju kliničke studije, proučavanje narušene aktivnosti GR-a kod pacijenata sa depresijom je do sada bilo usmereno ka analizi broja receptora sposobnih da vežu hormon, promenama u ekspresiji gena za GR, šaperonima važnim za funkciju GR-a, ćelijskim funkcijama za koje je poznato da su regulisane glukokortikoidima, i promenama u ekspresiji gena regulisanih GR-om. Novije studije su fokusirane na uticaj antidepresiva na GR, kao i na analize polimorfizama i metilacionog statusa ovog receptora. Funkcija GR-a je u najvećem broju slučajeva proučavana u lako dostupnim perifernim ćelijama limfocita, ukupnim ćelijama krvi i fibroblastima, dok su *postmortem* studije retke. Ispitivanja broja molekula GR-a u lizatima celih ćelija limfocita, kao i u citosolu ovih ćelija, ili nisu detektovala razlike ili su zabeležila smanjen broj GR-a sposobnih da vežu ligand kod pacijenata sa depresijom u odnosu na kontrole (Pariante i Miller, 2001; Calfa i sar., 2003). Slično su pokazale i studije koje su analizirale ekspresiju GR-a (Frodl i sar., 2012; Cattaneo i sar., 2013; Matsubara i sar., 2006). Sa druge strane, studije koje su se zasnivale na sposobnosti glukokortikoida da inhibiraju proliferaciju limfocita nakon stimulacije mitogenima su imale konzistentnije rezultate, i one su pokazale smanjenu proliferaciju limfocita depresivnih pacijenata nakon stimulacije mitogenima (Pariante i Miller, 2001), a smanjena ekspresija GR-a je uočena i na *postmortem* uzorcima tkiva hipokampusa i PFC-a pacijenata sa depresijom (Webster i sar., 2002). Kada su u pitanju neuroendokrini testovi, DST i DEX/CRH testovi, studije su pokazale da narušena funkcija GR-a ne mora uvek biti udružena sa narušenom aktivnošću HPA ose, što ukazuje na to da možda postoje različita stanja narušenosti funkcije GR-a i HPA ose (Jurueña i sar., 2004).

Sumarno, ove studije oslikavaju značajnu ulogu GR-a u adaptivnoj kontroli odgovora na stres i povišen nivo glukokortikoida. Dalja istraživanja uloge ovog receptora bi stoga mogla da doprinesu razvoju novih lekova za tretman ne samo depresije, nego i drugih psihijatrijskih poremećaja izazvanih stresnim uslovima i praćenih povišenim nivoom glukokortikoida.

1.3.4.1. Uloga izmenjene fosforilacije GR-a u nastanku depresije

Uloga izmenjene fosforilacije GR-a u nastanku kliničke depresije je izučavana u svega nekoliko studija, uglavnom sprovedenih u našoj laboratoriji. U životinjskim modelima je pokazano da stres dugotrajne izolacije dovodi do izmenjene fosforilacije GR-a na Ser232 i Ser246 u hipokampusu i PFC-u mužjaka pacova sa depresivnim ponašanjem (Adzic i sar., 2009), što je bilo praćeno promenama u ekspresiji gena regulisanih GR-om i narušenom regulacijom HPA ose (Adzic i sar., 2009). U istom životinjskom modelu je pokazano da su efekti antidepressiva posredovani promenama u fosforilaciji GR, ali i da su polno-specifični. Naime, kod stresiranih ženki antidepressiv fluoksetin je modulisao funkciju GR-a preko fosforilacije na Ser232 i aktivacije ushodnih kinaza u jedru, što za posledicu imalo izmenjenu transkripcionu aktivnost ovog receptora, dok kod mužjaka ovaj efekat nije uočen (Mitic i sar., 2013).

Kada su u pitanju kliničke studije, jedna studija je detektovala povišen nivo GR-a fosforilisanog na Ser211 u jedru limfocita pacijenata obolelih od bipolarnog poremećaja u depresivnoj fazi bolesti (Bei i sar., 2009). Međutim, kasnija studija je pokazala da je u jedru limfocita osoba obolelih od depresije, pored blago povišene fosforilacije na Ser211, uočena i značajno povišena fosforilacija ovog receptora na Ser226, kao i smanjen odnos pGR-211/pGR-226 (Simic i sar., 2013). Ovi rezultati su ukazali na to da bi fosforilacija GR-a na Ser226 i odnos pGR-211/pGR-226 mogli da budu potencijalni biomarkeri za lakše postavljanje dijagnoze depresije, otkrivanje osoba pod rizikom i praćenje oporavka obolelih osoba pod terapijom. U skladu sa ovim nalazima, modulacija fosforilacije GR-a na Ser226, pre svega modulisanjem signalnog puta JNK kinaze, je predložena kao potencijalna strategija za lečenje kliničke depresije (Jovicic i sar., 2015).

1.3.5. Uticaj modulacije funkcije GR-a na ponašanje u životinjskim modelima depresije

Aktiviranje signalnih puteva glukokortikoida, na prvom mestu u limbičkom sistemu, može da dovede do izrazitih promena u ponašanju koje mogu da ostave dugoročne posledice na dobrobit organizma. Funkcionalne promene na nivou sinapsi i nervnih kola mogu da utiču na veliki broj sistema, što na kraju može uticati na ponašanje životinja. Na primer, pokazano je da miševi sa delecijom GR-a u prednjem mozgu (medijalnom PFC-u, hipokampusu i bazolateralnoj amigdali) ispoljavaju povišeno beznadežno ponašanje u FST-u i TST-u, kao i anhedoniju u SPT-u (Boyle i sar., 2005). Studije poput ove ukazuju na bitnu ulogu signalnog puta glukokortikoida u prednjem mozgu u sprečavanju nastanka promena u ponašanju indikativnih za depresiju i anksioznost. Iako su brojni psihijatrijski poremećaji povezani sa poremećajima u sistemima koji regulišu odgovor na stres, tačna uloga GR-a u patologiji tih oboljenja još uvek nije jasno definisana.

Glukokortikoidi imaju jak uticaj na ponašanje regulisano PFC-om, uključujući radnu memoriju, fleksibilnost ponašanja i osećanja. Na primer, pokazano je da signalni putevi glukokortikoida pojačavaju konsolidaciju emotivno relevantnih događaja, u isto vreme minimizirajući konkurentne informacije, što ukazuje na značajan uticaj glukokortikoida na memoriju zavisnu od konteksta (Barsegyan i sar., 2010; Roozendaal i sar., 2004). Pored toga, pokazano je da hronični tretman glukokortikoidima može da naruši izvršavanje zadataka koji zahtevaju radnu memoriju (Mizoguchi i sar., 2004). Kada je u pitanju uloga ovog receptora u regulisanju osećanja, pokazano je da utišavanje GR-a u ovoj moždanoj strukturi povećava vreme imobilnosti u FST-u, što je pokazatelj depresivnog ponašanja (McKlveen i sar., 2013).

Kada je u pitanju hipokampus, izučavana je i uloga GR-a u učenju i pamćenju. Pokazano je da su efekti GR-a na učenje i memoriju zavisni od vremena i konteksta (Diamond i Rose, 1994). Takođe je pokazano da stres može da osnaži formiranje memorije o emotivno bitnim događajima koji imaju adaptivni značaj za organizam (de Kloet, 1999; Smeets i sar., 2009), kao i da je GR posrednik konsolidacije informacija bitnih za kontekst u cilju adaptacije i preživljavanja (Cheni sar., 2012; Fitzsimons i sar., 2013). Ovi podaci ukazuju na to da je povišen

nivo glukokortikoida bitan za prikupljanje i konsolidaciju bitnih informacija i prekidanje memorijskih procesa koji su manje bitni za adaptaciju.

1.4. DISFUNKCIJA MITOHONDRIJA POSREDOVANA GR-OM

Kao što je već pomenuto u poglavlju 1.1.3.6, uočena je veza između depresije i disfunkcije mitohondrija, što je ukazalo na to da bi mitohondrije mogle da igraju ključnu ulogu u narušenoj plastičnosti u depresiji, jer su za funkcionisanje neurona neophodne visoke stope biogeneze. Poremećena funkcija mitohondrija bi mogla da doprinese ovom oboljenju preko smanjenja nivoa ATP-a, pojačanog oksidativnog stresa i stimulisanje apoptoze (Rezin i sar., 2009). Pored toga, pokazano je da bi glukokortikoidi mogli da imaju značajnu ulogu u vezi između mitohondrijske disfunkcije i depresije. Naime, produženo izlaganje mitohondrija povišenom nivou glukokortikoida može da poremeti energetske metabolizam ovih organela, pogotovo pri ponovljenom izlaganju (Karabatsiakos i sar., 2014).

U prilog ovoj hipotezi ide i veliki broj studija koje su pokazale da antidepresivi mogu da utiču na funkciju mitohondrija, kako u životinjskim modelima, tako i u kliničkim studijama (pregledano u Adzic i sar. (2016)). Antidepresivi mogu da utiču na različite procese regulisane mitohondrijama, poput apoptoze i oksidativne fosforilacije (Adzic i sar., 2016). Treba napomenuti i da su psihijatrijski simptomi, poput depresije, psihoza, anksioznosti i promene ličnosti, takođe uočeni kod osoba obolelih od mitohondrijskih poremećaja, što ide u prilog ovoj hipotezi (Fattal i sar., 2006).

Sumarno, veliki broj studija je ukazao na to da bi disfunkcija mitohondrija mogla da ima značajnu ulogu u nastanku velikog broja psihijatrijskih oboljenja, uključujući i depresiju. Stoga bi razvoj lekova koji mogu da poboljšaju mitohondrijsku funkciju mogao da predstavlja jedan od novih pravaca kada je u pitanju terapija ovih oboljenja. U narednim odeljcima biće više reči o ulozi mitohondrijske disfunkcije posredovane glukokortikoidima u neuroinformativnom modelu depresije, sa posebnim naglaskom na proces apoptoze i promene u energetske metabolizmu, kao dva procesa regulisana i mitohondrijama i glukokortikoidima.

1.4.1. Proces apoptoze

Apoptoza je kompleksan i energetski zavisan proces programirane ćelijske smrti, i odvija se preko dva biohemijska puta – unutrašnjeg i spoljašnjeg. Ovi putevi su aktivirani različitim signalima, ali se isto završavaju – aktivacijom kaspaza i ćelijskom smrću.

Spoljašnji signalni put se pokreće aktiviranjem receptora smrti, koji su članovi TNF- α superfamilije receptora (Ashkenazi i Dixit, 1998). Jedan od najbolje proučenih signalnih puteva koji se aktivira ovim receptorima jeste signalni put Fas liganda (FasL), koji indukuje ćelijsku smrt vezivanjem za Fas receptore drugih ćelija i ima značajnu ulogu u regulaciji imunskog sistema (Malhi i sar., 2010). Nakon vezivanja trimernog liganda za odgovarajući receptor, dolazi do auto-katalitičke aktivacije prokaspaze-8, i do pokretanje naredne, efektorne, faze apoptoze (Kischkel i sar., 1995). Takođe, u nekim slučajevima, aktivirana kaspaza-8 može da dovede do katalitičkog isecanja BID (eng. *BH3 interacting-domain death agonist*) proteina, nakon čega nastaje njegova aktivirana, isečena forma (tBID) (Segal i sar., 2007), koja potom može da aktivira unutrašnji apoptotski put (Kaufmann i sar., 2007).

Unutrašnji apoptotski put pokreće veliki broj stimulusa koji nisu posredovani receptorima i koji su inicirani mitohondrijama. Ovi signali dovode do promena u unutrašnjoj membrani mitohondrija, čiji je rezultat otvaranje mitohondrijskih pora, gubitak mitohondrijskog transmembranskog potencijala i oslobađanje dve glavne grupe proapoptotskih proteina iz mitohondrijskog međumembranskog prostora u citosol (Saelens i sar., 2004). Prva grupa proteina dovodi do formiranja „apoptozoma“ i aktiviranja kaspaze-9 (Hill i sar., 2004), dok je oslobađanje druge grupe proteina kasni događaj u procesu apoptoze, i dešava se nakon što je ćelija već počela da umire. Kontrolu i regulaciju ovih događaja obavljaju članovi BCL-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) proteinske familije (Cory i Adams, 2002), koji upravljaju propustljivošću mitohondrijske membrane, i mogu biti pro ili antiapoptotski. Ovi proteini imaju veliki značaj zbog toga što određuju da li će ćelija da nastavi sa započetim procesom apoptoze ili će ga prekinuti.

Oba signalna puta, spoljašnji i unutrašnji, se završavaju pokretanjem efektorskog signalnog puta, koji predstavlja završni put apoptoze. Ovaj signalni put se aktivira nakon aktiviranja efektorskih kaspaza, koje dalje aktiviraju citoplazamatske endonukleaze koje dovode do degradacije jedarnog materijala, kao i proteaze koje dovode do degradacije proteina jedra i citoskeleta. Efektornim kaspazama se smatraju kaspaze-3, -6 i -7, i ove kaspaze mogu da seku različite supstrate poput, poli (ADP-riboza) polimeraze (PARP). PARP predstavlja familiju proteina koji učestvuju u brojnim ćelijskim procesima, poput popravke DNK, genomske stabilnosti i programirane ćelijske smrti. Ovi enzimi se aktiviraju kada se ćelija nađe u stresnim uslovima i/ili kada dođe do oštećenja DNK. U tim uslovima, PARP može da potroši zalihe ćelijskog ATP-a, što na kraju može da dovede do lize i nekroze ćelije. Pored nekroze, PARP može da indukuje i apoptozu u koju nisu uključene kaspaze, dok isecanje PARP-a enzimima, poput kaspaza i katepsina, obično inaktivira ovaj protein.

Dakle, povećano isecanje PARP-1 proteina dovodi do morfoloških i biohemijskih promena koje se primećuju u apoptotskim ćelijama (Slee i sar., 2001). Kaspaza-3 se smatra najvažnijom efektorskom kaspazom, i nju može da aktivira bilo koja inicijatorska kaspaza (poput kaspaze-8 i -9). Pored toga, ova kaspaza indukuje reorganizaciju citoskeleta i dezintegraciju ćelije u apoptotska tela, koja potom bivaju fagocitovana od strane drugih ćelija (Sakahira i sar., 1998).

1.4.2. Uloga GR-a u apoptozi

Veliki broj studija je pokazao da GR ima ulogu u apoptozi, tačnije, da deluje proapoptotski (Schmidt i sar., 2004; Geley i sar., 1996; Tissing i sar., 2003), i da može da dovede do apoptoze aktiviranjem oba puta, spoljašnjeg i unutrašnjeg (Smith i Cidlowski, 2010; Schmidt i sar., 2004). Naime, pokazano je da glukokortikoidi mogu da regulišu spoljašnji signalni put inhibicijom FasL signalnog puta u timocitima (Ashwell i sar., 2000), dok je uloga unutrašnjeg signalnog puta u glukokortikoidima-posredovanoj apoptozi do sada pokazana u hepatocitima, ćelijama mikrocelularnog raka pluća, primarnim limfoblastima akutne leukemije (ALL) i životinjskim sistemima (Almawi i sar., 2004; Bouillet i

sar., 1999). Pored toga, u nekim slučajevima, glukokortikoidi mogu da indukuju apoptozu preko oba puta, unutrašnjeg i spoljašnjeg, a sponu između ova dva signalna puta, kako je već pomenuto, predstavlja protein BID (Roy i Nicholson, 2000).

Međutim, iako je pokazano da GR može da indukuje apoptozu aktiviranjem oba signalna puta apoptoze, konkretni mehanizmi kojima ostvaruje ovaj efekat još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Smatra se da su u apoptozu uključeni kako jedarni, tako i mitohondrijski GR, kao i da je za inicijaciju i tok ovog procesa potrebna njihova kooperacija.

1.4.2.1. Uloga jedarnog GR-a

Pokazano je da glukokortikoidi mogu da regulišu ekspresiju određenog broja proteina uključenih u proces apoptoze, poput pojedinih pro- i antiapoptotskih članova BCL-2 familije proteina. Tačnije, glukokortikoidi mogu da aktiviraju ćelijsku smrt indukcijom ekspresije proapoptotskih proteina kao što su BAX (eng. *BCL2 associated X protein*), BAK (eng. *BCL-2 homologous antagonist/killer*), BIM (eng. *Bcl-2-like protein 11*), BID i BAD (eng. *BCL-2 associated agonist of cell death*), i/ili represijom antiapoptotskih članova, poput BCL-2, MCL-1 (eng. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1*) i BCL-xL (eng. *B-cell lymphoma-extra large*) (Schlossmacher i sar., 2011). Uloga članova BCL-2 familije uključenih u apoptozu indukovanu glukokortikoidima je prikazana u Tabeli 4.

Međutim, iako su genomski efekti GR-a važni u održavanju ravnoteže između pro- i antiapoptotskih signala, smatra se da mnogo važniju ulogu u pokretanju apoptoze imaju njegovi ne-genomski efekti. Neki od tih efekata bi mogli da budu: stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), aktivacija fosfolipaze C i posledična mobilizacija kalcijuma, aktivacija sfingomijelinidaze i porast stvaranja ceramida, kao i oslobađanje katepsina B iz lizozoma (Sionov i sar., 2006b).

Tabela 4 – Pro- i antiapoptotski članovi BCL-2 familije uključeni u apoptozu indukovanu glukokortikoidima.

PROTEIN	ULOGA U APOPTOZI IZAZVANOJ GLUKOKORTIKOIDIMA	FUNKCIJA
BCL-2	Povišena ekspresija u ljudskim ALL ćelijama sprečava apoptozu indukovanu glukokortikoidima.	Antiapoptotski
BCL-xL	Povišena ekspresija u ljudskim ALL ćelijama sprečava apoptozu indukovanu glukokortikoidima.	Antiapoptotski
MCL-1	Utišavanje ovog gena čini ćelije osetljivijim na apoptozu indukovanu glukokortikoidima.	Antiapoptotski
NOXA	Reguliše stabilnost Mcl-1, dok Noxa/Mcl-1 odnos određuje ćelijsku sudbinu.	Proapoptotski
BIM	Utišavanje ovog gena povećava otpornost ALL ćelija, dok povišena ekspresija čini ćelije osetljivijim na apoptozu indukovanu glukokortikoidima.	Proapoptotski
BAX	Reguliše apoptozu indukovanu glukokortikoidima u timocitima, dok istovremeno utišavanje BAX i BAK gena štiti od apoptoze.	Proapoptotski
BAK	Istovremeno utišavanje BAX i BAK gena štiti od apoptoze indukovane glukokortikoidima u timocitima.	Proapoptotski

1.4.2.2. Uloga mitohondrijskog GR-a u procesu apoptoze

Iako jedarni GR ima bitnu ulogu u procesu apoptoze, pokazano je da je translokacija ovog receptora u mitohondrije neophodna i dovoljna da indukuje apoptozu (Sionov i sar., 2006a). Ovome u prilog ide studija koja je pokazala da postoje neke razlike u metabolizmu između ćelija osetljivih i ćelija neosetljivih na GR, poput smanjene aktivnosti heksokinaze u mitohondrijama ćelija tretiranih DEX-om (Tome i sar., 2004).

Jedan od načina na koji bi mitohondrijski GR mogao da indukuje apoptozu jeste direktan genomski efekat. GR se nakon translokacije u mitohondrije vezuje za odgovarajuće regulatorne elemente u mitohondrijskom genomu, utičući na transkripciju mitohondrijskih gena (Demonacos i sar., 1995). Na ovaj način, GR može da reguliše energetske metabolizam ćelije, o čemu će biti više reči u

narednom odeljku. Jedan od mehanizama kojima bi GR mogao da reguliše ekspresiju mitohondrijskih gena jeste fosforilacija. Naime, pokazano je da hronični stres može da izmeni fosforilaciju mitohondrijskog GR u hipokampusu mužjaka i ženki pacova na polno-specifičan način, i da antidepresiv fluoksetin može da utiče na ekspresiju mitohondrijama-kodiranih subjedinića citohrom C oksidaze 1 i 3 (COX-1 i COX-3), putem modulacije fosforilacije GR-a na Ser232, ali samo kod ženki (Adzic i sar., 2013).

GR može da reguliše apoptozu i putem translokacije u mitohondrije i asocijacije sa proteinima BCL-2 familije. Naime, pokazano je da se pri visokim dozama glukokortikoida, u T-limfocitima GR translocira u mitohondrije, gde interaguje sa proteinima BCL-2 familije i na taj način indukuje apoptozu (Prenek i sar., 2017). Takođe, jedna studija je pokazala da bi kritičan korak u blokiranju fomiranja pora u spoljašnjoj membrani mitohondrija, a samim tim i sprečavanju apoptoze, u kortikalnim neuronima moglo biti formiranje GR/BCL-2 kompleksa (Du i sar., 2009). To bi značilo da, pored široko prihvaćenog proapoptoskog, GR može da ima i antiapoptotsko dejstvo u nekim ćelijama. Sposobnost GR-a da ima antiapoptotski efekat u nekim slučajevima dodatno oslikava raznovrsnost i kompleksnost odgovora ovog receptora na raznovrsne stimulse.

1.4.3. Uticaj mitohondrijskog GR-a na energetske metabolizam

Pored apoptoze, GR može da utiče i na komponente energetskog metabolizma mitohondrija. Naime, pokazano je da DEX može da utiče na energetske metabolizam i na ravnotežu između oksidativne fosforilacije i glikolize (Pandya i sar., 2007). Ovaj efekat je dvofazan - niže doze glukokortikoida imaju pozitivan uticaj na oksidativnu fosforilaciju, membranski potencijal i kalcijumski kapacitet, dok više doze deluju štetno, i ti efekti su u direktnoj korelaciji sa neuroprotektivnim efektima kortikosterona (Du i sar., 2009). GR takođe koordiniše transkripciju enzima uključenih u oksidativnu fosforilaciju (Simoes i sar., 2012) i reguliše transkripciju mitohondrijskih gena, poput COX-1 i COX-3 (Adzic i sar., 2013), a pokazano je i da bi geni uključeni u energetske metabolizam takođe mogli da učestvuju u apoptozi indukovanoj glukokortikoidima (Carlet i sar., 2010). Pored toga, značajan uticaj na energetske metabolizam mogle bi da imaju i

promene u nivou GR γ izoforme, za koju je pokazano da može da dovede do povećane proizvodnje ATP-a i potrošnje kiseonika (Morgan i sar., 2016).

Uzimajući u obzir ulogu GR-a u regulaciji transkripcije i jedarnih i mitohondrijskih komponenti signalnog puta oksidativne fosforilacije (Coenen i sar., 2001), smatra se da bi ovaj receptor mogao da bude ključni transkripcioni faktor odgovoran za koordinaciji njihove ekspresije, osiguravajući na taj način odgovarajuću stehiometriju i pravovremenu gensku ekspresiju komponenti respiratornog lanca (Fontanesi i sar., 2006; Lange i sar., 1992).

1.4.4. Veza između inflamacije i funkcije mitohondrija

U slučajevima kada je funkcija mitohondrija narušena, one postaju glavne determinante proinflamatornog statusa. U tim slučajevima, mitohondrije mogu da modulišu urođeni imunski odgovor putem redoks-osetljivih inflamatornih puteva ili putem direktne aktivacije inflamazoma (Escames i sar., 2012). Pored toga, i sama apoptoza može da aktivira imunski odgovor. Naime, iako u većini slučajeva umiruća ćelija formira apoptotska tela koja bivaju fagocitovana od strane makrofaga ili susednih ćelija, u nekim slučajevima se ovo ne dešava, pa u zavisnosti od apoptotskog scenarija apoptoza može da pokrene moćan inflamatorni odgovor. Ovo je pokazano u jednoj studiji, u kojoj je uočena veza između oksidovane mtDNK sa jedne strane, i apoptoze i oslobađanja IL-1 β sa druge, što pokazuje da oksidovana mtDNK može da aktivira kako intracelularne, tako i ekstracelularne sistemske puteve koji uključuju proinflamatorne citokine (Lopez-Armada i sar., 2013).

Jedan od glavnih citokina povezanih sa mitohondrijskom disfunkcijom u nastanku kliničke depresije i drugih psihijatrijskih oboljenja jeste TNF α . Ovaj citokin može da suprimira mitohondrijske komplekse I i IV i aktivnost dehidrogenaze pirogroždane kiseline, i da na taj način dovede do oštećenja mitohondrija (Lopez-Armada i sar., 2013). Ovom procesu doprinosi i IL-6, koji stimuliše produkciju ROS-a u mozgu, od kojih je NO veoma moćan inhibitor citohrom oksidaze i može da izazove oštećenje mitohondrija (Lopez-Armada i sar., 2013). Citokini takođe aktiviraju i proapoptotske članove BCL-2 familije i kaskadu kaspaza, koja može da dovede do apoptoze neurona (Grunnet i sar., 2009). TNF α i

IL-1 β takođe smanjuju aktivnost kompleksa 1 mitohondrijskog respiratornog lanca, proizvodnju ATP-a i potencijal mitohondrijske membrane i indukuju nagomilavanje značajnih količina ROS-a (Guidarelli i sar., 2007; Kim i sar., 2010). Štaviše, u adipocitima je pokazano da TNF α izaziva značajne morfološke promene na mitohondrijama, verovatno zbog promena u nivou nekoliko mitohondrijskih proteina. Pored toga, citokini narušavaju potencijal mitohondrijske membrane, povećavaju njenu permeabilnost i smanjuju produkciju energije (Chen i sar., 2010).

Ovi podaci ukazuju na to da je poremećena funkcija mitohondrija ključna za razvoj inflamatornog fenotipa, kao i da proinflamatorni citokini igraju značajnu ulogu u narušavanju funkcije mitohondrija. Ovi nalazi takođe ističu potencijal mitohondrija kao novih farmakoloških meta u tretmanu pacijenata sa oboljenima koja u osnovi imaju inflamaciju.

1.4.5. Uticaj mitohondrijske disfunkcije na ponašanje životinja

U životinjskim modelima depresije je uočena smanjena produkcija ATP-a kod anhedoničnih ženki koje su bile izložene blagom stresu u trajanju od 40 dana, i ovaj efekat je poništen primenom antidepresiva (Gamaro i sar., 2003a; Gamaro i sar., 2003b). Pored toga, kod miševa sa smanjenom sklonosti ka saharozi i povećanom imobilnošću je uočeno oštećenje mitohondrijske ultrastrukture, narušena stopa respiracije i izmenjen membranski potencijal u hipokampusu, hipotalamusu i korteksu (Gong i sar., 2011). Kod životinja sa depresivnim ponašanjem su uočene i promene u oksidativnoj fosforilaciji; tačnije, pokazano je da hronični nepredvidivi stres smanjuje sklonost ka saharozi i inhibira elektron-transportne komplekse I, II i IV u kori malom mozgu pacova (Rezin i sar., 2008).

2.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Veliki broj studija je ukazao na vezu između depresije i povišene produkcije proinflamatornih citokina, koji mogu da utiču na različite aspekte funkcije HPA ose i da poremete funkciju GR-a. Jedan od načina na koji bi proinflamatorni citokini mogli da naruše funkciju ovog receptora jeste putem njegove izmenjene fosforilacije, i ovaj proces bi mogao da utiče na ekspresiju kako jedarnih, tako i mitohondrijskih gena regulisanih GR-om. U jedru, izmenjena fosforilacija GR-a bi mogla da utiče na ekspresiju velikog broja gena koji su regulisani ovim receptorom, i koji su uključeni u različite procese povezane sa patofiziologijom depresije, poput neuroplastičnosti, serotoninske neurotransmisije, neuroinflamacije i neuroendokrine funkcije. U mitohondrijama, izmenjena fosforilacija GR-a bi mogla da utiče na ekspresiju COX-1 i COX-3 gena, i da na taj način poremeti energetske metabolizam ćelija, što može da se odrazi i na njihovo preživljavanje. Takođe, sama translokacija GR-a u mitohondrije može da dovede do apoptoze ćelija CNS-a, što može da poremeti strukturu neuralnih mreža i značajno naruši neuroplastičnost.

Uzimajući u obzir prethodno navedeno, u ovoj doktorskoj disertaciji je postavljena hipoteza da jak imunološki stresor, kakav je endotoksin bakterija, LPS, menja status fosforilacije i funkciju jedarnog i mitohondrijskog GR-a, što se dovodi u vezu sa iniciranjem ponašanja nalik depresivnom. Istraživanja su obavljena u moždanim strukturama, hipokampusu i PFC-u, pacova *Wistar* soja, sa ciljem da se prošire trenutna znanja o uticaju inflamacije na aktivnosti GR-a u depresiji. Budući da postoje značajne polne razlike u raznim aspektima depresije u humanoj populaciji, u ovoj su studiji korišćene životinje oba pola.

U skladu sa zadatim ciljem, u ovoj disertaciji je/su:

- (1) detaljno okarakterisane promene u ponašanju životinja izazvane LPS-om;
- (2) ispitane promene u nivou kortikosterona u serumu tretiranih životinja;
- (3) ispitan uticaj LPS-a na nivoe GR-a i njegovih fosfoformi pGR-232 i pGR-246, kao i nivoe ukupnih i aktiviranih kinaza (JNK, p38 i CDK5) uključenih u fosforilaciju ovog receptora i njegove košaperone FKBP4 i FKBP5, u citosolu i jedru hipokampusa i PFC-a;

- (4) ispitan uticaj LPS-a na transkripcionu aktivnost jedarnog GR-a u navedenim strukturama, merenjem nivoa iRNK za proteine čija je transkripcija regulisana ovim receptorom (BDNF, COX-2, p11 i GR);
- (5) ispitan uticaj LPS-a na nivoe GR-a i njegovih fosfoformi u mitohondrijama i komponente spoljašnjeg i unutrašnjeg apoptotskog signalnog puta u citosolu i mitohondrijama (prekursorske i isečene forme kaspaza-8, -9 i -3, i članove BCL-2 proteinske porodice - BCL-2, BAX i BID), kao i promene u nivou isečenog PARP-1 proteina u citosolu;
- (6) ispitan uticaj LPS-a na funkciju mitohondrijskog GR-a u ove dve moždane strukture, praćenjem nivoa iRNK mitohondrijskih gena čija je transkripcija regulisana ovim receptorom (COX-1 i COX-3).

3.

MATERIJAL I METODE

3.1. GAJENJE I TRETMAN EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

U eksperimentima opisanim u ovoj tezi korišćene su ženke i mužjaci pacova *Wistar* soja, odgajani u vivarijumu za eksperimentalne životinje Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju instituta „Vinča”. Životinje korišćene u eksperimentima su bile stare 3 meseca. Na početku eksperimenta težina ženki je bila 220-350 g (u proseku 249.09 g), a mužjaka 300-440 g (u proseku 339.78 g). Odgajane su u standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od 20±2°C. Pacovi su držani u kavezima standardne veličine (425×266×185 mm), sa slobodnim pristupom komercijalnoj hrani (Veterinarski zavod Subotica) i vodi. Svetlo je bilo uključeno u periodu 07:00-19:00 h. Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, koji je u skladu sa pravilima i nacrtima Srpskog udruženja za korišćenje životinja u nauci i obrazovanju.

Tokom eksperimenata, životinje su bile podeljene u četiri grupe: (I) ženke tretirane fiziološkim rastvorom, (II) ženke tretirane LPS-om, (III) mužjaci tretirani fiziološkim rastvorom, i (IV) mužjaci tretirani LPS-om. Životinje iz grupa I i III su bile tretirane odgovarajućom zapreminom fiziološkog rastvora, određenom na osnovu njihove težine. Životinje iz grupa II i IV su bile tretirane LPS-om (*Escherichia coli* 005: B5, No. L-2880 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), prethodno rastvorenom u fiziološkom rastvoru, u dozi 500 µg/kg. Sve grupe su tretirane intraperitonealno, a tretman je trajao 7 dana. Životinje su dekapitovane 24 h nakon poslednje injekcije, i iz njih su izvađene odgovarajuće moždane strukture (PFC i hipokampus) i krv.

3.1.1. Određivanje faza estrusnog ciklusa

Vaginalni brisevi su ispitivani u dva navrata. Prvo ispitivanje vaginalnih briseva izvršeno je 12 dana pre početka tretmana, i trajalo je narednih 5 dana. Ovo ispitivanje vaginalnih briseva je vršeno kako bi se utvrdilo da li životinje imaju normalan estrusni ciklus. Kako je prosečno trajanje estrusnog ciklusa kod ženki pacova 4-5 dana (Nequin i sar., 1979), ovaj vremenski period je bio dovoljan da se

utvrđi obrazac cikliranja. Samo ženke sa normalnom distribucijom faza estrusnog ciklusa su bile uključene u dalje studije.

Nakon ovog prvog uzimanja briseva, životinje su ostavljene da se odmaraju 7 dana. Pokazano je da je odmor u trajanju od 7 dana između uzimanja poslednjeg brisa i početka tretmana LPS-om dovoljan kako bi se bazalni parametri HPA ose vratili u normalu, i kako bi se neutralisali stresni efekti procesa uzimanja briseva (Rhodes i sar., 2004).

Vaginalni brisevi su uzimani i analizirani još jednom nakon poslednjeg tretmana, tačnije odmah nakon dekapitacije životinja, kako bi se utvrdio efekat LPS-a na distribuciju faza estrusnog ciklusa. Kako su rezultati ovog poslednjeg uzimanja vaginalnih briseva bitni za praćenje efekta LPS-a na distribuciju faza estrusnog ciklusa, oni će biti predstavljeni kasnije u odeljku 4.2.

3.1.2. Eksperimentalni dizajn

Pre glavnog eksperimenta odrađen je pilot-eksperiment u cilju određivanja odgovarajuće doze LPS-a i dužine tretmana koji bi izazvali ponašanje nalik depresivnom kod jedinki oba pola. Tokom pilot-eksperimenta, ženke i mužjaci su tretirani sa tri različite doze LPS-a (100, 250 i 500 µg/kg). Svaka od ovih doza je davana tokom 4 odnosno 7 dana, kako bi se odredila optimalna dužina trajanja tretmana. Tokom ove faze upotrebljene su 62 životinje, a njihovo ponašanje je izmereno FST-om, koji će biti detaljno opisan kasnije u tekstu.

Za glavnu studiju je upotrebljeno 137 životinja. Životinje su podeljene u tri seta. Prvi set od 64 životinje je upotrebljen za neurobiološke analize, od čega su 32 životinje upotrebljene za *Western blot* analizu (8 po grupi), a 32 za qRT-PCR (8 po grupi). Od ovih životinja je uzet i serum, u kojem je određena koncentracija kortikosterona. Drugi set od 29 životinja je upotrebljen za FST (7-8 životinja po grupi). Ove životinje su upotrebljene i za određivanje promena u telesnoj težini. Treći set od 44 životinje je upotrebljen za merenje unosa hrane, SPT, test otvorenog polja (OFT) i test uzdignutog plus lavirinta (EPMT) (10-12 životinja po grupi). I ove životinje su upotrebljene za merenje promena u telesnoj težini. Grafička predstava eksperimentalnog dizajna je prikazana na Slici 8.

SET I

Poslednja VEH ili
LPS injekcija



0 h

24 h



Uzimanje uzoraka
tkiva i seruma

SET II

Poslednja VEH ili
LPS injekcija



0 h

24 h

48 h



TT

TT

FST

FST
pretest

test

SET III

Poslednja VEH ili
LPS injekcija



0 h

24 h



TT

SPT
Unos hrane

TT

OFT
EPMT

Slika 8 - Eksperimentalni dizajn.

Legenda: VEH, fiziološki rastvor; LPS, lipopolisaharid; TT, telesna težina; FST, test prinudnog plivanja; OFT, test otvorenog pola; EPMT, test uzdignutog plus lavirinta.

3.2. TESTOVI PONAŠANJA

Kako bi se utvrdilo da li je LPS izazvao ponašanje nalik depresivnom, 24 h nakon poslednje injekcije LPS-a dva seta životinja su testirana na prisustvo pojedinih komponenti ponašanja nalik depresivnom. Modifikovani test prinudnog plivanja je sproveden kako bi se ustanovilo prisustvo osećaja beznadežnosti kod životinja tretiranih LPS-om, testovi otvorenog polja i uzdignutog plus lavirinta kako bi se analizirala motorika, istraživačko i anksiozno ponašanje, i test sklonosti prema saharozi kako bi se ustanovilo prisustvo anhedonije. Kako su promene apetita i telesne težine jedan od simptoma depresije, pratili smo i ova dva parametra.

3.2.1. Merenje fizioloških parametara

Telesna težina je merena u dve tačke – neposredno pre početka tretmana i 24 h nakon poslednje injekcije. Razlika u telesnoj težini između ove dve tačke je uzeta kao merilo promene telesne težine. U istom vremenskom periodu (0-24 h nakon poslednje injekcije) merene su i promene u unosu hrane. Naime, svim jedinkama je odmah nakon poslednje injekcije data ista količina hrane. Životinje su puštene slobodno da jedu, a nakon 24 h preostala hrana je uklonjena i izmerena. Razlike u težini hrane u ove dve vremenske tačke su bile merilo promena u unosu hrane.

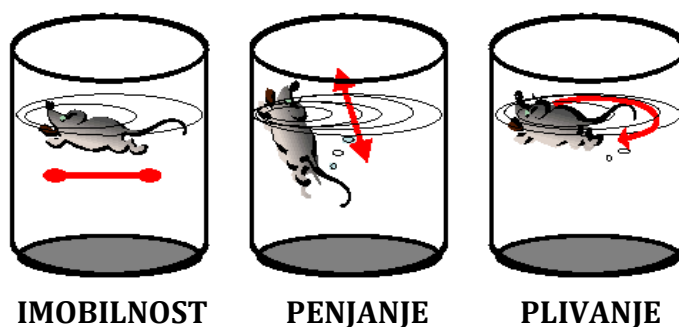
3.2.2. Testovi za depresivno ponašanje

3.2.2.1. Test prinudnog plivanja

Test prinudnog plivanja se najčešće koristi za određivanje efekata antidepressiva na ponašanje laboratorijskih životinja, uglavnom pacova i miševa. U ovom testu bezizlaznu situaciju predstavlja stavljanje životinje u vodu određeni vremenski period. Vreme koje životinja u ovoj situaciji provede nepokretna, odnosno pluta, je bilo merilo beznadežnosti. U ovoj tezi rađen je test prinudnog plivanja po metodi Porsolta (Porsolt i sar., 1977). Tokom testa, životinje su uranjene u vodu koja ispunjava cilindar od pleksiglasa (visine 40 cm i prečnika 20 cm), napunjen vodom do visine od 30 cm. Temperatura vode je bila $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Pacovima je bilo dozvoljeno da plivaju u cilindru u uslovima u kojima ne mogu da dodirnu dno cilindra repom i zadnjim šapama, kao ni da izađu iz njega.

Test prinudnog plivanja se sastojao iz dve faze - faze preliminarnog testiranja (pre-test) i faze testiranja. Faza pre-testa je počela 24 h nakon poslednjeg tretmana. Nakon 15 min boravka u cilindru, životinje su izvađene, osušene i vraćene u kavez. Dvadeset četiri časa nakon pre-testa (ili 48 h nakon poslednje injekcije), životinje su podvrgnute testu koji je trajao 5 min. Testiranje je vršeno u zamračenoj sobi i snimano video kamerom, a ponašanje je naknadno ručno kvantifikovano sa snimka. Sa snimka je određeno koliko dugo su životinje plutale (odnosni bile nepokretne), a koliko su ispoljavale neki od oblika kretanja - plivanje ili penjanje (Slika 9). Analiza je vršena tako što je određivan dominantan oblik ponašanja u periodu od 5 s (Spasojevic i sar., 2009). Plutanje je definisano kao izostanak pokreta celog tela, osim malih pokreta neophodnih da životinja održi glavu iznad vode (Spasojevic i sar., 2009). Takođe, nekontrolisani refleksni pokreti tokom perioda nepokretnosti, poput drhtanja, trzanja ili sklanjanja vode sa očiju, su tretirani kao plutanje. Nakon svakog testiranja, cilindar je očišćen i napunjen svežom vodom za testiranje naredne životinje.



Slika 9 - Karakteristično ponašanje u testu prinudnog plivanja.

Međutim, kako se test prinudnog plivanja zasniva na motornom odgovoru životinje i kako na njega mogu da utiču promene u lokomotornoj aktivnosti, on može da ima lažno pozitivne rezultate. Naime, pokazano je da i neke supstance koje nisu antidepresivi, poput kofeina i amfetamina, mogu da smanje trajanje imobilnosti u ovom testu na sličan način kao i antidepresivi (Lucki, 1997). Zbog

toga se često uz test prinudnog plivanja rade i drugi testovi, poput testa otvorenog polja, kako bi se bolje uočili efekti tretmana na lokomociju (Kaster i sar., 2005).

3.2.2.2. Test sklonosti ka saharozi

Test sklonosti ka saharozi služi za testiranje depresivnog ponašanja životinja i zasniva se na tome da se stresiranim životinjama ponudi da biraju između obične vode i vode koja sadrži određeni procenat rastvorene saharoze. Test traje određeni vremenski period, nakon čega se meri da li su životinje pokazale sklonost za pijenje slatke vode ili su više pile običnu vodu. Izmerena sklonost se potom uzima kao mera anhedonije kod testiranih životinja.

U ovoj studiji test je bio podeljen na dve faze – fazu navikavanja i fazu samog testiranja. Tokom obe faze, životinje su držane grupno, u kavezima u kojima su odrasle, jer bi njihovo izdvajanje u individualne kaveze moglo da ih stresira. Faza navikavanja je trajala 6 dana, i odvijala se paralelno sa tretmanom. Tokom ove faze, pacovi su bili navikavani na prisustvo dve boce od 250 ml, jedne sa 2% rastvorom saharoze i jedne sa čistom vodom. Svakog dana tokom ove faze, između 08:00 i 09:00 h, boce su uklanjane, i njihov sadržaj je menjan svežim. Kako bi se izbeglo da na rezultate testa utiče sklonost ka jednoj strani kaveza, ovom prilikom je menjan i položaj boca. Tokom faze navikavanja svaki dan su merene zapremine popijene vode i saharoze, kako bi se pratio sam efekat tretmana na unos rastvora saharoze i vode.

Neposredno nakon faze navikavanja i nakon poslednjeg tretmana usledila je faza samog testiranja. Tokom ove faze, životinjama su u toku sledeća 24 h bile ponuđene dve boce: jedna sa 2% rastvorom saharoze i druga sa vodom. Po isteku 24 h, boce su uklonjene i izmerena je ukupna zapremina popijene vode i popijenog rastvora saharoze. Iz dobijenih podataka izračunata je sklonost životinja za uzimanje rastvora saharoze po sledećoj formuli:

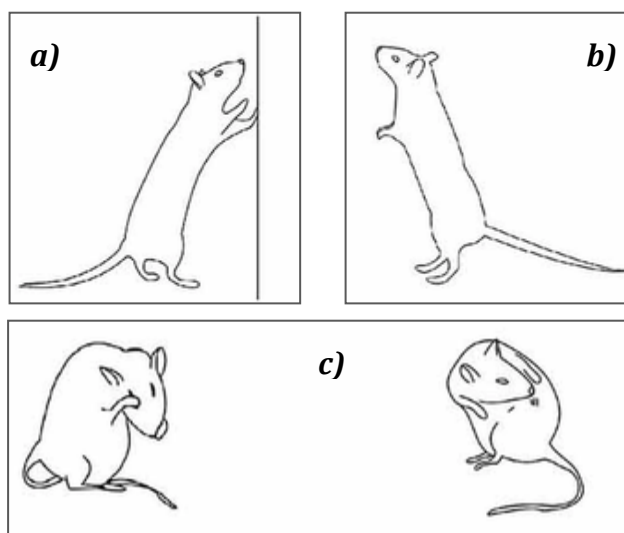
$$\text{Sklonost ka saharozi} = \frac{V(\text{rastvora saharoze})}{V(\text{rastvora saharoze}) + V(\text{vode})} \times 100\%$$

3.2.3. Testovi za anksiozno ponašanje

3.2.3.1. Test otvorenog polja

Test otvorenog polja je namenjen pre svega za testiranje motorike, spontane lokomotorne aktivnosti, istraživačkog ponašanja i anksioznosti. Koncept ovog testa se zasniva na premisi da ravnoteža između straha od nepoznatog prostora i instinktivne radoznalosti životinje određuje njeno ponašanje u ovakvoj situaciji. Naime, kada su anksiozni, glodari pokazuju prirodnu tendenciju da se u testu otvorenog polja kreću pored zidova, izbegavajući centralna polja, što je fenomen poznat kao tigmotaksa. I suprotno, smanjen nivo anksioznosti dovodi do povećane želje životinja za istraživanjem nove sredine, uključujući i stimulse koji im deluju preteći, poput otvorenih i svetlijih centralnih regiona arene. U skladu s tim, broj ulazaka u centralna polja i vreme provedeno u njima odražavaju konflikt između straha i istraživačke aktivnosti, i služe kao dva uobičajena indikatora anksioznosti (Kalueff i sar., 2007; Ramos i sar., 1997).

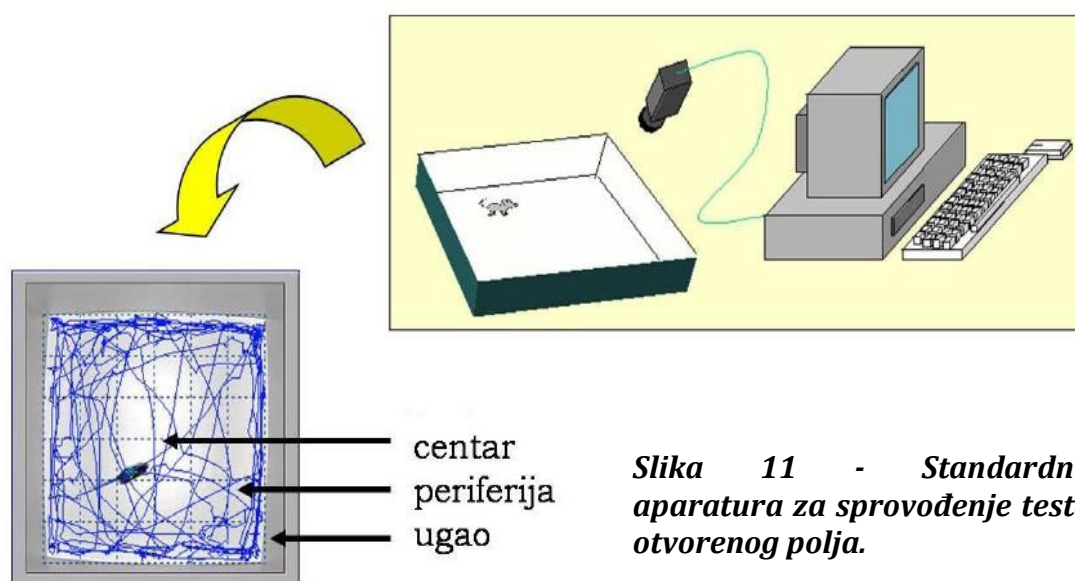
Pored toga, istraživačka, odnosno spontana lokomotorna aktivnost, se može proceniti merenjem ukupnog broja pređenih kvadrata i vertikalnom aktivnošću. Vertikalna aktivnost je klasična eksploratorna aktivnost koja se sastoji od dve komponente – propinjanja uz zidove arene i propinjanja u vazduhu (Slika 10). Iako su se ove dve komponente dugo tretirale kao jedna i smatrale visoko korelisanim sa



Slika 10 – Ponašanje u testu otvorenog polja: propinjanje uz zid (a), propinjanje u vazduhu (b) i čišćenje lica i tela (c).

generalnom aktivnošću životinja, pokazano je da je samo propinjanje uz zidove povezano sa lokomocijom/aktivnošću, dok je propinjanje u vazduhu više povezano sa emocionalnošću (Sturman i sar., 2018). Ovde treba napomenuti da se pod pojmom „emocionalnost“ kod pacova podrazumeva osećaj kako anksioznosti, tako i straha. Još neki od parametara koji se prate u testu otvorenog polja jesu defekacija i čišćenje (Slika 10). Naime, smatra se da stresirane životinje imaju povećanu defekaciju, i da ona može da se koristi kao pokazatelj nivoa anksioznosti glodara (Walsh i Cummins, 1976). Slično tome, čišćenje (lica i tela) bi trebalo da bude povišeno kod životinja koje se nađu u nekoj novoj sredini, što bi takođe moglo da ukaže na prisustvo anksioznosti (Brenes i sar., 2009).

Aparatura za test otvorenog polja se sastojala od arene kvadratnog oblika dimenzija 100 cm (dužina) ×100 cm (širina) ×40 cm (visina zida arene) čiji je pod bio podeljen na 16 jednakih kvadrata dimenzija 25×25 cm radi lakše kvantifikacije lokomotorne aktivnosti (Slika 11). Testiranje se odvijalo u sobi sa kontrolisanom temperaturom, bukom i osvetljenjem. Sve životinje su unete u sobu za testiranje 30 min pre početka testa, kako bi se prilagodile. Tokom testa, svaki pacov je postavljen u centar arene, nakon čega je snimano njegovo ponašanje u areni tokom narednih 5 min. Lokomotorna aktivnost je merena kao zbir broja prelaza iz jednog polja u drugo (sa najmanje 3 šape) i broja izdizanja na zadnje noge, koji je

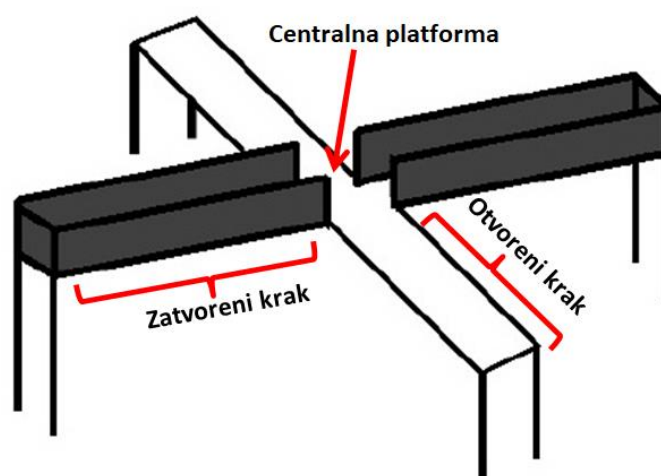


određivan kao zbir broja propinjanja uz zid i propinjanja u vazduhu (Slika 10). Ponašanje nalik anksioznom je prikazano kao procenat ulazaka u centralne kvadrate (četiri centralna kvadrata, dimenzija 50x50), kao i procenat vremena provedenog unutar ovih kvadrata. Takođe su mereni i čišćenje i defekacija. Posle pojedinačnog testiranja svake životinje arena je čišćena 70% rastvorom etanola.

3.2.3.2. Test uzdignutog plus lavirinta

Test uzdignutog plus lavirinta se takođe koristi za merenje anksioznosti kod glodara i zasniva se na sličnim premisama kao i test otvorenog polja. Međutim, za razliku od testa otvorenog polja, koji meri anksioznost izazvanu strahom od otvorenog i osvetljenog prostora, test uzdignutog plus lavirinta detektuje anksioznost izazvanu boravkom na uzdignutom i otvorenom terenu. Pored toga, ovaj test u znatno manjoj meri može da proceni promene u istraživačkoj i spontanoj lokomotornoj aktivnosti i zasniva više na averziji životinja od nepoznatog otvorenog i uzdignutog prostora. U testu uzdignutog plus lavirinta anksioznost je izražena vremenom provedenim u zatvorenim kracima aparature, kao i brojem ulazaka u ove krake. Iako se ovaj test koristi prevashodno za merenje anksioznosti, može da se koristi i kao merilo spontane lokomotorne aktivnosti merenjem ukupnog broja ulazaka u krake (otvorene i zatvorene) (Hogg, 1996).

Aparatura za ovaj test je bila građena od sivog akrila, i sastojala se od dva otvorena (40 cm x 10 cm) i dva zatvorena kraka (40 cm x 10 cm x 40 cm) koja su se



Slika 12 – Šematski prikaz standardne aparature za sprovođenje testa uzdignutog plus lavirinta.

se granala od centralne platforme (10 cm x 10 cm) (Slika 12). Tokom testa, svaki pacov je postavljen na centralnu platformu lavirinta, naspram jednog od otvorenih kraka, i pušten je da se slobodno kreće. Kretanje je snimano u periodu od 5 min. Tokom tog perioda, meren je ukupan broj ulazaka u otvorene i zatvorene krake zajedno (sa najmanje 3 šape), broj ulazaka u otvorene krake i vreme provedeno uotvorenim kracima. Posle pojedinačnog testiranja svake životinje arena je čišćena 70% rastvorom etanola.

3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KORTIKOSTERONA U SERUMU

Nakon dekapitacije, krv je sakupljena u epruvete i ostavljena da koaguliše na sobnoj temperaturi 30 min, nakon čega je centrifugirana 15 min na 3 000 rpm, a dobijeni serumi su čuvani na -20°C do dalje upotrebe. Koncentracija kortikosterona u serumu je određena Eliza esejom visoke osetljivosti specifičnim za pacovski serum (*Immunodiagnostic Systems Ltd*) po uputstvima proizvođača. Apsorbanca je očitavana na 450 nm i 650 nm (650 nm je korekciona OD) na Eliza čitaču (*WALLAC 1420-Victor2 Multilabel Counter, LKB*). Intenzitet razvijene boje je bio obrnuto proporcionalan koncentraciji kortikosterona u uzorku. Vrednosti su očitavane sa semilogaritamske standardne krive i izražene u ng/ml.

3.4. ANALIZA PROTEINA

3.4.1. Priprema citoplazmatskih, mitohondrijskih i jedarnih frakcija

Životinje su ubijene brзом dekapitacijom pomoću giljotine (*Harvard Apparatus*) 24 h nakon poslednje injekcije. Mozgovi su izolovani i brzo prebaćeni na led, i iz njih su izolovani hipokampus i PFC. Tkiva su trenutno zamrzavana u tečnom azotu i čuvana na -70°C do dalje obrade. Priprema citoplazmatskih, mitohondrijskih i jedarnih frakcija je detaljno opisana kod (Moutsatsou i sar., 2001).

Ukratko, tokom pripreme uzoraka, zamrznuta moždana tkiva PFC-a i hipokampusa su izmerena i homogenizovana u hladnom (4°C) homogenizacionom 20 mM Tris-HCl puferu (pH 7.4), u odnosu 1:2 težina/zapremina pufera, sa 30

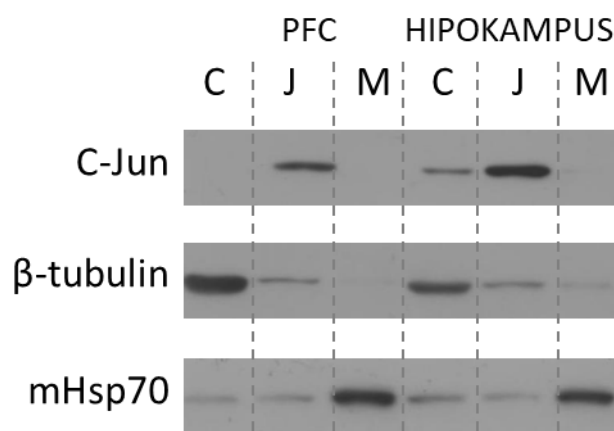
udaraca Potter-Elvehjem teflonsko-staklenog homogenizera. Tris-HCl pufer se sastojao od 10% glicerola, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM DTT i koktela fosfataznih i proteaznih inhibitora. Fosfatazne inhibitore su činili 20 mM β -glicerofosfat, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ i 2 mM Na_3VO_4 , a proteazne 20 mM Na_2MoO_4 , 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 1 mM fenilmetilsulfonyl fluorid, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripsin i 3 mM benzamidin. Nakon homogenizacije, uzorci su inkubirani na ledu uz snažno ljuenje 30 min. Nakon toga, u svaki uzorak je dodato 75 μl 10% rastvora Tween 20, uzorci su vorteksovani 20 s i homogenat je centrifugiran 10 min na 2 000 g (4°C), nakon čega je supernatant korišćen za dobijanje ekstrakta citosola i mitohondrija, a talog za dobijanje jedarnog ekstrakta.

Dobijeni supernatant je dalje centrifugiran 30 min na 20 000 g (4°C) da bi se dobila mitohondrijska frakcija u talogu i supernatant čijim je centrifugiranjem na 105 000 g 60 min (4°C) dobijen finalni supernatant koji je predstavljao citosolnu frakciju. Mitohondrijska frakcija u talogu je oprana tri puta u po 0.5 ml homogenizacionog pufera i centrifugirana na 2 000 g u trajanju od 30 min. Dobijeni talog je potom liziran u puferu koji se sastojao od 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5% glicerola, 1mM Na_2EDTA , 5 mM DTT-a, prethodno pomenutih proteaznih inhibitora i 0.05 % Tritona X-100, i inkubiran na ledu 90 min uz često vorteksovanje. Dobijena frakcija je predstavljala finalni mitohondrijski ekstrakt.

Talog dobijen u prvom centrifugiranju je opran tri puta u po 0.5 ml homogenizacionog pufera centrifugiranjem 10 min na 2 000 g (4°C) i u finalnom talogu su se nalazila prečišćena jedra. Jedra su resuspendovana u jednoj zapremini pufera za liziranje jedara (koji čine homogenizacioni pufer kome je dodat KCl u finalnoj koncentraciji 0.5 M), inkubirana na ledu najmanje 60 min uz intenzivno vorteksovanje, a zatim centrifugirana 10 min na 8 000 g. Dobijeni supernatanti su se koristili kao jedarni ekstrakt (Moutsatsou i sar., 2001).

Western blot analizom je potvrđena čistoća izolovanih odeljaka. Čistoća jedarnih, citoplazmatskih i mitohondrijskih frakcija je potvrđena inkubacijom sa primarnim antitelima specifičnim za c-Jun (dominantan u jedru), β -tubulin (dominantan u citosolu) i mHsp70 (dominantan u mitohondrijama).

Reprezentativni *Western blot*ovi koji pokazuju čistoću ćelijskih odeljaka su prikazani na Slici 13.



Slika 13 – Čistoće odeljaka nakon izolacije proteina.
Legenda: C, citosol; J, jedro; M, mitohondrije.

3.4.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određena Lorijevom metodom (Lowry i sar., 1951). Ova metoda je primenjena zato što je očekivana koncentracija proteina u uzorku bila u opsegu od 5 $\mu\text{g/ml}$ do 50 $\mu\text{g/ml}$. Standard za određivanje koncentracije proteina je bio BSA, od koga je pripremljen osnovni rastvor koncentracije 50 $\mu\text{g/ml}$. Od ovog rastvora su napravljena razblaženja koncentracija 5, 10, 20, 30, 40 i 50 $\mu\text{g/ml}$. Od svakog uzorka i različitih razblaženja standarda su potom urađena triplikatna merenja tako što je uzeto po 1 ml uzorka ili standarda kome je dodato 2.5 ml reagensa A.

Reagens A se sastojao od 1 ml 1% CuSO_4 , 1 ml 2% KNa-tartarata i 98 ml 2% Na_2CO_3 , rastvorenih u 0.1 M NaOH. Ovaj rastvor je promešan na Vortex-u i inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je u tu smešu dodato 160 μl Folin-Ciocalteau reagensa (originalnog, nerazblaženog) i rastvor je inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Nakon ovoga, uzorcima ili standardima je očitana apsorbanca na $\text{OD}_{750\text{nm}}$. Od očitanih vrednosti standarda je konstruisana prava formule $\text{OD}_{750\text{nm}} = A \times C_p$ ($\mu\text{g/ml}$) + B, pri čemu C_p označava koncentraciju proteina, i sa nje je određena

koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane OD_{750nm} za uzorak koji je korigovan za razblaženje i izražen kao mg proteina/ml originalnog uzorka.

3.4.3. Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu

Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorci su pomešani sa denaturišućim puferom prema Lemliju (Laemmli, 1970) i kuvani 5 min na 100°C. Sastav pufera za denaturaciju je bio sledeći: 62.5 mM Tris HCl (pH 6.8), 10% glicerol, 2% SDS, 0.005% Bromfenol Blue i 2% β-merkaptotanol.

Nakon kuvanja, uzorci su ohlađeni i skladišteni na -20°C do dalje upotrebe. Proteini su razdvajani na 10 ili 12% poliakrilamidnim gelovima. Na gel je nanošeno 60 µg proteina. Elektroforeza na denaturišućem SDS poliakrilamidnom gelu je rađena po modifikovanom Lemlijevom protokulu za gel (Tabela 5), u puferu za elektroforezu koji je sadržao 0.25 M Tris, 1.92 M glicin i 0.1% SDS, pH=8.3, pri voltaži od 100 V.

Tabela 5 - Sastav gelova za koncentrovanje i razdvajanje.

GEL ZA RAZDVAJANJE	GEL ZA KONCENTROVANJE
10 ili 12% Akrilamid/bisakrilamid (30:1)	5% Akrilamid/bisakrilamid (30:1)
375 mM Tris pH 8.95	125 mM Tris pH 6.95
2 mM EDTA	2 mM EDTA
0.1% SDS	0.1% SDS
0.06% APS	0.1% APS
0.06% TEMED	0.1% TEMED

3.4.4. Analiza proteina *Western blot* metodom

Posle razdvajanja elektroforezom, proteini su prebačeni na poliviniliden fluorid membranu (*Immobilon-P membrane, Millipore*) korišćenjem blot sistema Transblot (*BioRad*). Membrane su potom inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje, PBS-u koji je sadržao 5% nemasno mleko ili BSA. PBS sa 5% BSA korišćen je za blokiranje membrana kada bi se detektovao fosforilisani GR, a u ostalim slučajevima korišćen je PBS sa 5% nemasnim mlekom. Nakon blokiranja,

membrane su inkubirane u primarnom antitelu preko noći na 4°C. Za detekciju proteina korišćena su primarna antitela prikazana u Tabeli 6.

Tabela 6 – Razblaženja primarnih antitela koja su se koristila za Western blot.

PROTEIN	RAZBLAŽENJE	KOMPANIJA
tGR (M-20)	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
pGR-232	1:500	<i>Cell Signalling</i>
pGR-246	1:1000	<i>Abcam</i>
FKBP4	1:500	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
FKBP5	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
tJNK	1:1000	<i>Biosciences</i>
pJNK	1:500	<i>Cell Signalling</i>
p-38	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
p-p38	1:500	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
CDK5	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
p35/p25	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
BCL-2	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
BAX	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
BID	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Kaspaza-8	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Kaspaza-9	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Kaspaza-3	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Isećeni PARP-1	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
mHSP	1:1000	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
β-actin	1:1000	<i>Abcam</i>

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane 3 puta po 10 min u puferu PBST (PBS sa 0.1% *Tween* 20). Nakon poslednjeg ispiranja membrane su inkubirane 2 h sa odgovarajućim sekundarnim antitelima, anti-zečjim ili anti-mišjim HRP-konjugovanim antitelima (*Santa Cruz*). Posle inkubacije sa sekundarnim antitelima, ponovljeno je ispiranje membrane 3 puta po 10 min u PBST-u. Signali su detektovani korišćenjem Pico ili Femto hemiluminescentnog supstrata (*Terma Scientific Pirce*) i izlaganjem membrane radiografskom filmu.

Nakon detekcije signala za željeni protein, membrane su stripovane u cilju detektovanja drugog željenog proteina sa iste membrane. Stripovanje membrana je vršeno inkubacijom membrana na 50°C 20 ili 30 min, u puferu za stripovanje koji je sadržao 62.5 mM Tris HCl (pH 6.8), 2% SDS i 100 mM β-merkaptotanol.

3.4.5. Kvantifikacija signala

Za denzitometriju proteinskih traka sa radiografskog filma korišćen je ImageJ program. Od svakog *Western blot*-a odabrana su po 2 reprezentativna filma. Jačine traka za svaki protein podeljene su sa intenzitetom trake za β -aktin istog uzorka sa istog gela, a potom su nivoi proteina u svim uzorcima izražavani relativno u odnosu na kontrolni uzorak. Kao kontrolni uzorak uvek je uziman uzorak ženki tretiranih fiziološkim rastvorom. Rađene su 2 serije uzoraka, i svi uzorci su nanošeni na gel bar 3 puta, a zatim su računate srednje vrednosti za nivo proteina za svaki uzorak.

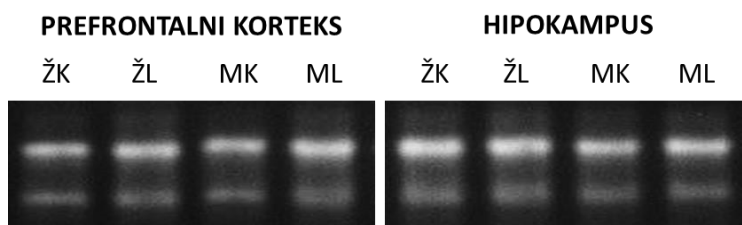
3.5. ANALIZA EKSPRESIJE GENA

3.5.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK izolovana je Trizol® reagensom (*Invitrogen, USA*). Smrznuto tkivo je homogenizovano u Potter-Elvehjem stakleno-teflonskom homogenizeru u odnosu 1 ml Trizol®-a na 100 mg tkiva. Dobijeni homogenati su zatim inkubirani 5 min na 30 °C da bi nukleoproteinski kompleksi potpuno disosovali. Zatim je u svaki homogenat dodavano 0.2 ml hloroforma i ependorfice su snažno mućkane po 15 sekundi, i opet inkubirane na temperaturi od 30°C, 3 min. Uzorci su zatim centrifugirani 15 min na 12 000 g u centrifugi prethodno ohlađenoj na 4 °C. Nakon ovog centrifugiranja u ependorficama su se razdvojile tri faze: donja (organska) faza, interfaza i gornja (vodena) faza. RNK se nalazila u vodenoj fazi i prebačena je u nove ependorfice u koje je dodato 0.5 ml izopropanola. Smeša je inkubirana 10 min na 30 °C i centrifugirana 10 min na 12 000 g. Nakon centrifugiranja talog je resuspendovan u jednoj zapremini 75% etanola i centrifugiran 5 min na 7 500 g na 4 °C. Dobijeni talog je osušen na vazduhu i rastvoren u 100 μ l vode tretirane 0.1% dietilpirokarbonatom.

Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (*Thermo Scientific*) merenjem apsorbance uzorka na 260 nm. Za određivanje čistoće uzorka i eventualne kontaminacije proteinima, upotrebljen je odnos absorpcija na 260 nm vs. 280 nm, dok je odnos 260 nm vs. 230 nm služio kako bi

se odredila kontaminacija organskim rastvaračima. Da bi se proverio integritet dobijene RNK (Slika 14), rađena je elektroforeza ukupne RNK na 1.5% agaroznom gelu, u trajanju od 45 min i pri konstantnoj voltaži od 100 V.



Slika 14 – Integritet RNK nakon izolacije.

Legenda: ŽK, kontrolne ženke (ženke tretirane fiziološkim rastvorom); ŽL, ženke tretirane LPS-om; MK, kontrolni mužjaci (mužjaci tretirani fiziološkim rastvorom); ML, mužjaci tretirani LPS-om.

3.5.2. Reverzna transkripcija

Za sintezu cDNK iz RNK korišćen je High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*). 2 µg ukupne RNK inkubirano je sa reverznom transkriptazom (*MultiScribe™*) (50 U/µl) u prisustvu 2 µl Random prajmera, 0.8 µl 100 mM dNTP-a, 1 µl ribonukleaznog inhibitora i RT pufera u ukupnoj zapremini od 20 µl. Dobijene cDNK su čuvane na -20 °C do upotrebe.

3.5.3. qRT-PCR

Geni su amplifikovani pomoću SYBR green PCR Master Miksa (*Applied Biosystems*) u 7500 Real-time PCR sistemu (*Applied Biosystems*). Tom prilikom je izmeren nivo iRNK nekoliko jedarnih i mitohondrijskih gena čija je ekspresija regulisana GR-om. U te gene spadaju Nr3c1, koji kodira sam GR (Dong i sar., 1988), COX-2 (Goppelt-Struebe, 1997), BDNF (Schaaf i sar., 2000) i p11 (Zhang i sar., 2008) u jedru, i COX-1 i COX-3 (Tsiriyotis i sar., 1997) u mitohondrijama. Kao endogena kontrola je služio konstitutivno eksprimirani gen za ribozomalni protein L19 (RPL-19). Sekvence prajmera za ove gene su prikazane u Tabeli 7.

cDNK je amplifikovana pri sledećim uslovima: hold 95 °C/10 min, 40 ciklusa denaturacije na 95 °C/15 s, vezivanje prajmera na 60 °C/ 1 min i ekstenzija na 60°C/1 min. Na kraju svakog eksperimenta je izvršena analiza krivi topljenja kako

bi se potvrdilo formiranje jedinstvenog proizvoda PCR reakcije. Standardne krive su se koristile za svaki par prajmera kako bi se procenila efikasnost amplifikacije, a dobijene su iz nagiba krive dobijene iz odnosa pražnog ciklusa i log koncentracije (Rutledge i Cote, 2003). Efikasnost reakcije je bila slična za sve prajmere (0.96–0.99), a proračuni relativne količine transkripata su izvršeni pomoću $\Delta\Delta CT$ metode (Livak i Schmittgen, 2001). Apsolutne vrednosti merenja dobijene za sve uzorke su normalizovane na osnovu endogene kontrole uključene u svaki qRT-PCR. Svaki eksperiment je izveden u triplikatu i ponovljen dva puta.

Tabela 7 – Sekvence prajmera koji su se koristili za qRT-PCR.

GEN	SEKVENCA
COX-2	F: 5'-AAAGGAGTCTGGAACATTGTGAAC-3' R: 5'-CAAATGTGATCTGGACGTCAACA-3'
BDNF	F: 5'-GACTGCATGGGACATGTC-3' R: 5'-CAGCCTTCCTTCGTGTAACC-3'
GR	F: 5'-CTTGGGGGCTCTGAACT-3' R: 5'-GACGAGCTGGATGGAGGA3'
p11	F: 5'-TGCTCATGGAAAGGGAGTTC-3' R: 5'-CCCCGCCACTAGTGATAGAA-3'
RPL19	F: 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3' R: 5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'
COX-1	F: 5'-TCACAGTAGGGGGCCTAACA-3' R: 5'-GGCTTTTGCTCATGTGTCATT-3'
COX-3	F: 5'-TCTTCTTTGCCGGATTTTTC-3' R: 5'-ATGGTTTCGGTTCCTTCTA-3'

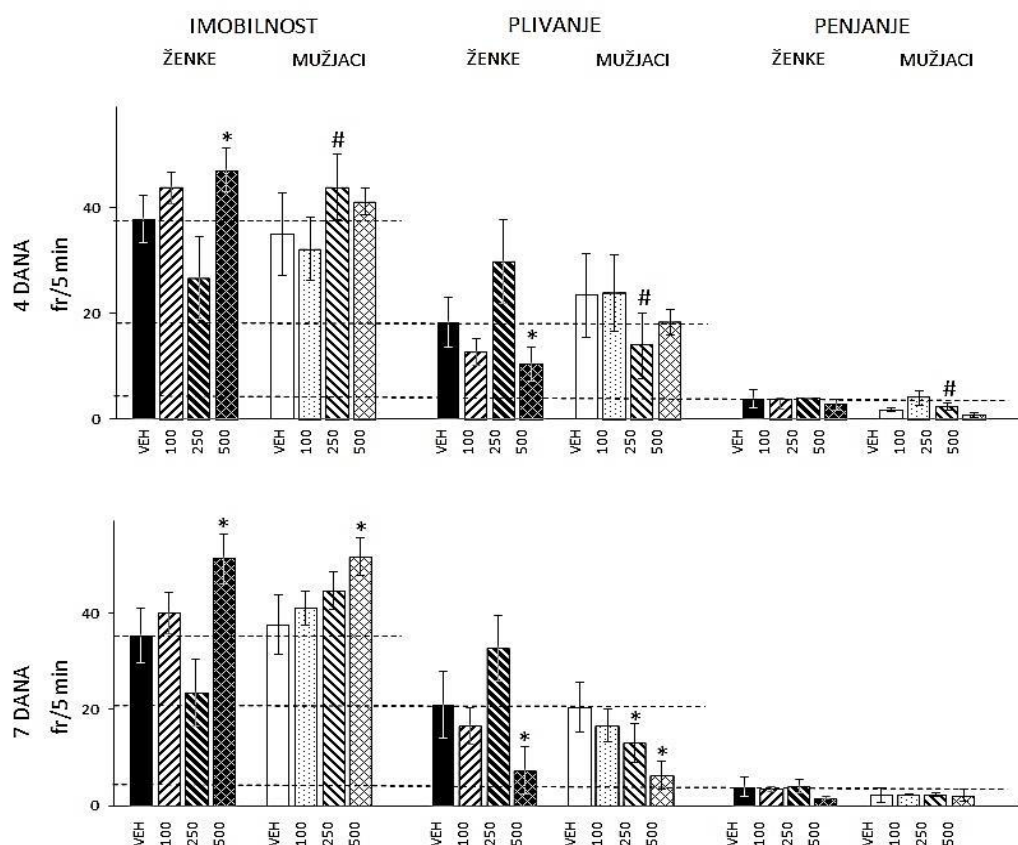
3.6. STATISTIČKA ANALIZA

Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna greška i analizirani su upotrebom dvosmerne analize varijanse (eng. *two-way analyses of variance*, two-way ANOVA) kako bi se odredio uticaj pola, tretmana i interakcije pola i tretmana. *Post hoc* Tukey test je upotrebljen kako bi se odredile razlike između eksperimentalnih grupa. Statistička značajnost je prihvaćena na $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. UTICAJ DOZE LPS-A I TRAJANJA TRETMANA NA DEPRESIVNO PONAŠANJE

Iako su kod ženki uočeni znaci ponašanja nalik depresivnom već nakon četvorodnevnog tretmana dozom od 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kod mužjaka je ovo ponašanje uočeno tek nakon sedmodnevnog tretmana istom dozom (Slika 15). Zbog toga su u daljim eksperimentima primenjeni dužina tretmana i doza LPS-a koji su izazvali ponašanje nalik depresivnom kod oba pola, odnosno sedmodnevni tretman LPS-om u dozi od 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Slika 15 - Efekti različitih doza i dužine tretmana LPS-a na ponašanje životinja. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su Factorial ANOVA i post hoc Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $p < 0.05$ - životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ - mužjaci u odnosu na ženke.

Legenda: VEH, kontrolna grupa; 100, životinje tretirane 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS-om; 250, životinje tretirane 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS-om; 500, životinje tretirane 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS-om; fr, frekvenca.

4.2. REZULTATI ANALIZE VAGINALNIH BRISEVA

Analiza vaginalnih briseva uzetih nakon poslednjeg tretmana i neposredno nakon dekapitacije je pokazala da je procenat faza estrusnih ciklusa u kojima su bile životinje tretirane fiziološkim rastvorom i LPS-om približno sličan (Tabela 8).

Tabela 8 – Broj i procenat ženki u svakoj od faza estrusnog ciklusa.

FAZA	VEH		LPS	
	Broj	%	Broj	%
Estrus	3	18,75	4	25,00
Proestrus	5	31,25	4	25,00
Diesetrus I	4	25,00	3	18,75
Diesetrus II	4	25,00	5	31,25

4.3. ANALIZA FIZIOLOŠKIH PARAMETARA I PONAŠANJA

Kada su u pitanju fiziološki parametri, uočen je značajan efekat LPS-a na telesnu težinu životinja ($F=95.06$, $p<0.05$) i njihov unos hrane ($F=19.52$, $p<0.05$). Tačnije, ova dva parametra su bila značajno snižena kod životinja oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama tretiranim fiziološkim rastvorom (Tabela 10).

U testu prinudnog plivanja, uočen je glavni efekat LPS-a na vreme tokom koga su životinje bile nepomične ($F=60.75$, $p<0.05$) i na vreme tokom koga su plivale ($F=47.17$, $p<0.05$). Dalja post hoc analiza je pokazala da su ženke i mužjaci tretirani LPS-om više vremena proveli nepomični i da su kraće plivali u poređenju sa ženkama, odnosno mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Tabela 10). Sa druge strane, tretman nije uticao na vreme tokom kog su se životinje penjale uz zidove cilindra ni kod mužjaka ni kod ženki (Tabela 10).

Kada je u pitanju test sklonosti ka saharozi, promene u unosu vode izmerene tokom faze navikavanja su pokazale da hroničan tretman LPS-om nije smanjio unos vode kod životinja tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolama u ovoj fazi (Tabela 9). Što se tiče testa, uočen je glavni efekat LPS-a na sklonost ka saharozi ($F=38.39$, $p<0.05$), kao i na unos vode ($F=54.61$, $p<0.05$). Sklonost ka saharozi je bila smanjena, a unos vode povišen kod životinja oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama (Tabela 10).

Tabela 9 - Zapremine vode unete tokom faze navikavanja.

	<i>UNOS VODE (ml)</i>					
	DAN 1	DAN 2	DAN 3	DAN 4	DAN 5	DAN 6
VEH ♀	12.9±2.4	10.6±1.4	10.1±3.1	14.3±6.0	6.3±1.7	14.9±6.5
LPS ♀	13.8±2.6	17.5±1.4	18.6±5.4	14.9±4.1	16.8±5.4	20.7±4.0
VEH ♂	13.6±2.5	14.9±4.1	11.4±2.0	10.2±1.8	8.4±1.1	12.0±1.9
LPS ♂	14.9±1.0	17.1±5.8	19.8±3.8	17.8±2.9	19.8±5.4	23.5±2.7

U testu otvorenog polja, uočen je glavni efekat LPS-a na ukupan broj prelazaka u susedne kvadrate ($F=30.48$, $p<0.05$) i na ukupnu vertikalnu aktivnost ($F=26.57$, $p<0.05$), i ova dva parametra su bila značajno smanjena kod životinja oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama (Tabela 10). Dalje, kako ukupna vertikalna aktivnost može da se podeli na dve komponente, propinjanje uz zidove arene i propinjanje u vazduhu, praćena su oba tipa pokreta ponaosob. ANOVA je pokazala značajan glavni efekat LPS-a na propinjanje uz zidove arene ($F=26.21$, $p<0.05$) i uticaj interakcije pola i LPS-a na propinjanja u vazduhu ($F=3.87$, $p<0.05$). Post hoc test je dalje pokazao statistički značajno smanjenje u broju propinjanja uz zidove arene kod životinja oba pola tretiranih LPS-om, i u broju propinjanja u vazduhu samo kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Tabela 10). Sa druge strane, ANOVA nije pokazala efekte ni pojedinačnih faktora ni njihove interakcije na broj ulazaka u centralne kvadrate i vreme provedeno u njima. kao ni na čišćenje i defekaciju životinja (Tabela 10).

U testu uzdignutog plus lavirinta je uočen značajan glavni efekat LPS-a na ukupnu lokomotornu aktivnost merenu brojem ukupnih ulazaka u otvorene i zatvorene krake ($F=31.81$, $p<0.05$). Ukupna lokomotorna aktivnost je bila smanjena kod ženki i mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama (Tabela 10). Sa druge strane, ANOVA nije pokazala uticaj ni pojedinačnih faktora ni njihove interakcije na broj ulazaka u otvorene krake i vreme provedeno u njima (Tabela 10).

Što se tiče nivoa kortikosterona, ANOVA je pokazala glavni efekat LPS-a na nivo ovog hormona ($F=54.58$, $p<0.05$), koji su bili značajno povišeni kod ženki i mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na njihove kontrole (Tabela 10).

Tabela 10 – Fiziološki parametri, testovi ponašanja i nivo kortikosterona. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost±SEM, i analizirane two-way ANOVA testom, praćenim post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu, i # $p<0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

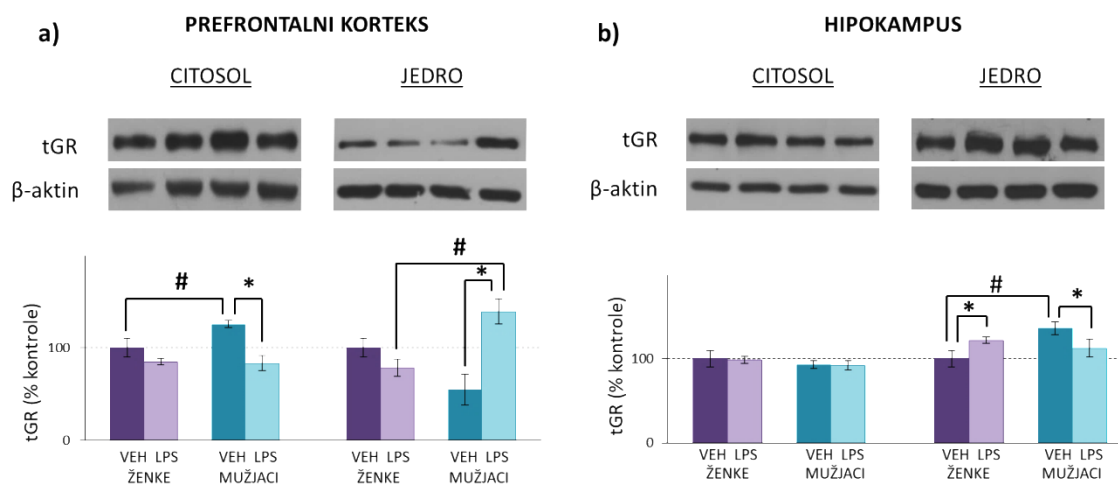
			ŽENKE		MUŽJACI		
			VEH	LPS	VEH	LPS	
FIZIOLOŠKI PARAMETRI	BW	Dobitak/gubitak kilaže (%)	+5.87±1.54	-6.49±1.32*	+9.82±0.73	-4.34±1.73*	
	FCT	Unos hrane (g)	21.03±1.68	15.33±1.45*	25.38±1.21	18.25±1.50*	
TESTOVI PONAŠANJA	Testovi za depresivno ponašanje	FST	Nepomičnost (f/5min)	23.21±4.46	58.05±0.64*	35.21±3.03	51.39±2.58*
			Plivanje (f/5min)	34.04±5.01	1.33±0.51*	21.28±3.37	6.22±1.96*
			Penjanje (f/5min)	2.69±0.81	0.62±0.22	3.42±0.89	2.39±0.84
		SPT	Sklonost ka saharozi (%)	81.76±6.09	49.31±4.17*	83.94±1.71	38.10±11.45*
			Unos vode (ml)	8.94±2.42	17.67±3.03*	9.42±1.78	22.50±5.86*
	Testovi za anksiozno ponašanje	OFT	Broj prelaza	56.07±4.45	33.74±5.03*	60.74±5.54	30.30±3.72*
			Vertikalna aktivnost	18.35±4.45	9.06±5.03*	24.76±5.54	10.91±1.26*
			Propinjanje uz zidove	15.67±1.9	7.71±1.49*	15.58±1.38	8.58±0.99*
			Propinjanje u vazduhu	2.68±0.59	1.35±0.74	9.18±2.49	2.33±0.84*
			Ulaz u centralne kvadrate (%)	3.69±0.60	4.73±0.94	4.46±0.79	2.97±0.94
			Vreme u centralnim kv. (%)	2.38±0.68	2.00±0.42	2.17±0.42	0.83±0.27
			Defekacija	0.60±0.43	1.17±0.42	1.26±0.41	1.09±0.41
			Čišćenje	2.55±0.63	2.76±0.35	3.21±0.54	2.91±0.50
		EPMT	Ukupan broj ulazaka	11.40±1.05	5.79±0.67*	7.45±0.91	4.00±0.56*
			Ulasci u otvorene krake (%)	34.06±2.42	37.60±4.49	33.44±5.01	33.49±8.17
			Vreme u otvorenim kracima (%)	16.58±2.05	17.22 ±2.49	11.93±3.06	10.25±4.16
Nivo serumskog kortikosterona (µg/ml)			189.00±16.37	395.50±40.81*	158.13±15.50	322.50 ±19.11*	

Legenda: BW, telesna težina; FCT, test uzimanja hrane; FST, test prinudnog plivanja; SPT, test sklonosti ka saharozi; OFT, test otvorenog polja; EPMT, test uzdignutog plus lavirinta; f, frekvencija.

4.4. ANALIZA FOSFORILACIJE GR-A I UNUTARĆELIJSKE TRANSLOKACIJE PROTEINA UKLJUČENIH U GLUKOKORTIKOIDNU SIGNALIZACIJU NAKON TRETMANA LPS-OM

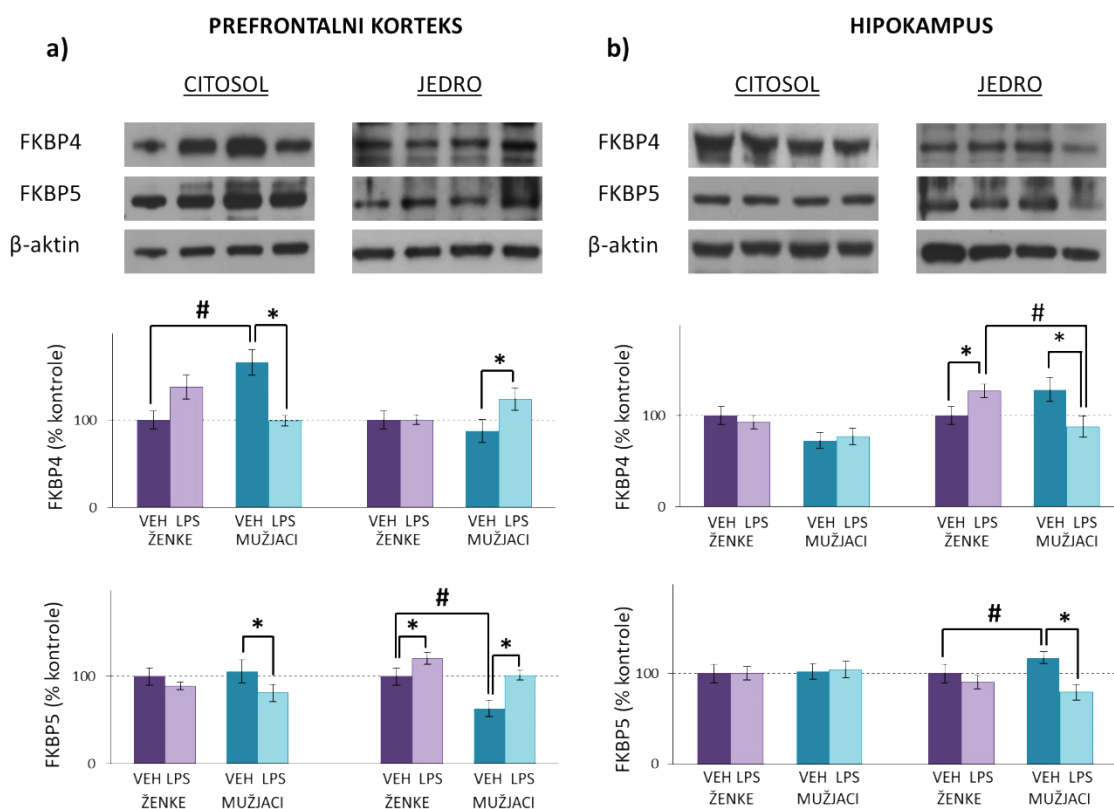
4.4.1. Analiza nivoa GR-a i njegovih košaperona

U PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivo GR-a u citosolu ($F=6.03$, $p<0.05$) i jedru ($F=24.94$, $p<0.05$). Nivo ovog proteina je bio značajno niži u citosolu i značajno viši u jedru mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Slika 16a). Takođe je uočen i značajno viši nivo ovog proteina u citosolu mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama, kao i u jedru mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženkama tretiranim LPS-om. Sa druge strane, u hipokampusu je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivo GR-a samo u jedru ($F=5.63$, $p<0.05$). U ovom ćelijskim odeljku, uočen je povišen nivo GR-a kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na ženke tretirane fiziološkim rastvorom, dok je kod mužjaka uočen suprotan efekat (Slika 16b). Takođe je zabeležen i značajno viši nivo ovog proteina kod kontrolnih mužjaka u odnosu na kontrolne ženke.



Slika 16 - Nivoi glukokortikoidnog receptora u citosolu i jedru ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao $*p<0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i $\#p<0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

Kada su u pitanju košaperoni GR-a, u PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe FKBP4 u citosolu ($F=8.87$, $p<0.05$) i jedru ($F=8.23$, $p<0.05$). Nivoi ovog proteina su bili značajno smanjeni u citosolu i značajno povišeni u jedru mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen i značajno viši nivo ovog proteina u citosolu mužjaka tretiranih fiziološki rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka (Slika 17a). Kada je u pitanju nivo FKBP5 u ovom tkivu, uočen je efekat interakcije pola i LPS-a u citosolu ($F=5.59$, $p<0.05$) i glavni efekat LPS-a u jedru ($F=27.48$, $p<0.05$). Tukey test je dalje pokazao da je nivo ovog proteina u citosolu značajno snižen samo kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima



Slika 17 - Nivoi košaperona FKBP4 i FKBP5 u citosolu i jedru ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

tretiranim fiziološkim rastvorom. Sa druge strane, u jedru je uočen povišen nivo ovog proteina kod životinja oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim odgovarajućim kontrolama. U ovom odeljku je uočen i značajno niži nivo ovog proteina kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke (Slika 17a).

U hipokampusu je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivo FKBP4 samo u jedru ($F=21.73$, $p<0.05$), gde je uočen značajan porast ovog proteina kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na ženke tretirane fiziološkim rastvorom, i pad kod mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na mužjake tretirane fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen i značajno niži nivo ovog proteina kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženkama tretiranim LPS-om (Slika 17b). Što se tiče FKBP5, ANOVA je takođe pokazala efekat interakcije pola i LPS-a u jedru ($F=11.20$, $p<0.05$), dok je post hoc test pokazao značajan pad ovog proteina kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen značajno viši nivo FKBP5 u jedru mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama (Slika 17b).

4.4.2. Analiza nivoa kinaza uključenih u fosforilaciju GR-a

Analiza ukupne i fosforilisane p38 kinaze - Uočen je značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivo p38 kinaze u citosolu ($F=19.73$, $p<0.05$) i jedru ($F=7.19$, $p<0.05$) PFC-a. U ovom tkivu je uočeno značajno smanjenje nivoa ove kinaze u citosolu i njeno povećanje u jedru mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočeno i značajno povećanje nivoa ove kinaze u citosolu mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama, kao i u jedru mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženkama koje su prošle isti tretman (Tabela 11). Kada je u pitanju fosforilisani oblik ove kinaze, p-p38, takođe je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivo ovog proteina u citosolu ($F=11.97$, $p<0.05$), dok je u jedru uočen samo glavni efekat LPS-a ($F=45.62$, $p<0.05$). Post hoc test je dalje pokazao značajno smanjenje nivoa ovog proteina u citosolu mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom, i značajno povećanje nivoa ovog proteina u jedru životinja oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa

njihovim kontrolama tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen i značajno niži nivo fosforilisane forme ove kinaze u jedru mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka (Tabela 11).

U hipokampusu je uočen značajan glavni efekat LPS-a na nivoe fosforilisane forme p38 kinaze u citosolu ($F=32.87$, $p<0.05$) i značajan efekat interakcije pola i LPS-a u jedru ($F=7.47$, $p<0.05$). Tačnije, nivoi p-p38 su bili značajno povišeni u citosolu oba pola i jedru ženki u odnosu na njihove kontrole tretirane fiziološkim rastvorom (Tabela 11). Sa druge strane, nije uočen uticaj ni glavnih faktora ni njihovih interakcija na nivoe ukupne p38 (Tabela 11).

Analiza nivoa CDK5 i njegovih aktivatora - U PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na citosolne nivoe CDK5 ($F=38.79$, $p<0.05$), p35 ($F=24.11$, $p<0.05$) i p25 ($F=8.53$, $p<0.05$), koji su u ovom ćelijskim odeljku bili značajno niži kod mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na mužjake tretirane fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen i značajno viši nivo CDK5 i p35 kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke, kao i značajno niži nivoi CDK5 i p25 kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženka koje su prošle isti tretman (Tabela 11). Kada je u pitanju jedro, takođe je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe ova tri proteina ($F=33.52$ za CDK5; $F=16.31$ za p35; i $F=15.34$ za p25; $p<0.05$), koji su bili značajno povišeni kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen i značajno niži nivo CDK5 u jedru mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka, kao i značajno viši nivoi p35 i p25 kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženka koje su prošle isti tretman (Tabela 11).

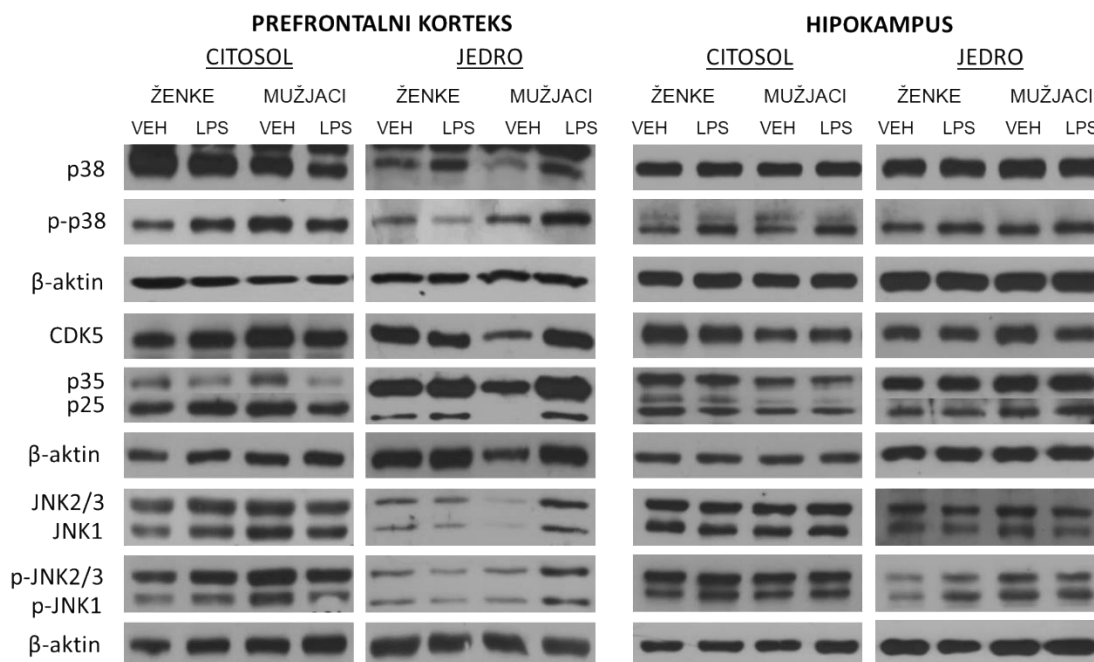
Što se tiče hipokampusu, uočen je značajan efekat pola na nivoe ova tri proteina u citosolu ($F=11.52$ za CDK5; $F=46.11$ za p35; i $F=9.86$ za p25; $p<0.05$), koji su bili značajno sniženi kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na ženke (Tabela 11). Sa druge strane, u jedru je uočena interakcija pola i LPS-a na nivoe CDK5 ($F=13.61$, $p<0.05$), koji su bili značano sniženi samo kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom i sa ženka tretiranim LPS-om. Na aktivatore ove kinaze, p35 i p25,

nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora ni njihove interakcije u ovom ćelijskom odeljku (Tabela 11).

Analiza ukupnih i fosforilisanih izoformi JNK – U PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe ukupne JNK, JNK2/3 ($F=11.39$, $p<0.05$) i JNK1 ($F=34.58$, $p<0.05$) u citosolu. U ovom odeljku je došlo do povišenja nivoa JNK2/3 kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na ženke tretirane fiziološkim rastvorom. Sa druge strane, kod mužjaka tretiranih LPS-om nivoi sve tri izoforme su bili sniženi u odnosu na njihove kontrole tretirane fiziološkim rastvorom. Takođe su uočeni i značajno viši nivoi sve tri izoforme kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama (Tabela 11). U jedru je takođe uočen značajan efekat interakcije između pola i LPS-a na nivoe sve tri izoforme ($F=8.98$ za JNK2/3 i $F=34.55$ za JNK1; $p<0.05$), koje su bile povišene samo kod mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na njihove kontrole tretirane fiziološkim rastvorom i u odnosu na ženke tretirane LPS-om (Tabela 10). Kada su u pitanju fosforilisane forme ovih kinaza (p-JNK), uočen je efekat interakcije pola i LPS-a na njihove nivoe kako u citosolu ($F=46.24$ za p-JNK2/3 i $F=14.65$ za p-JNK1; $p<0.05$), tako i u jedru ($F=11.43$ za p-JNK2/3 i $F=11.52$ za p-JNK1; $p<0.05$). Nivoi sve tri izoforme su bili značajno sniženi u citosolu i povišeni u jedru mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na mužjake tretirane fiziološkim rastvorom. Takođe su uočeni i značajno viši nivoi ovih izoformi u citosolu mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke, i u jedru mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženkama koje su prošle isti tretman (Tabela 11).

Što se tiče hipokampusu, u citosolu nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora ni njihovih interakcija na nivoe ukupnih i fosforilisanih formi ovih kinaza (Tabela 11). Sa druge strane, u jedru je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe kako ukupnih JNK kinaza ($F=27.27$ za JNK2/3 i $F=34.57$ za JNK1; $p<0.05$), tako i njihovih fosforilisanih formi ($F=22.21$ za p-JNK2/3 i $F=39.04$ za p-JNK1; $p<0.05$). U ovom ćelijskim odeljku su uočeni smanjeni nivoi ukupnih formi ovih kinaza kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom, kao i povišeni nivoi kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama. Sa druge strane, nivoi

fosforilisanih formi su bili povišeni kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na ženke tretirane fiziološkim rastvorom i sniženi kod mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na mužjake tretirane fiziološkim rastvorom. Takođe su uočeni i značajno viši nivoi fosforilisanih formi ove kinaze kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama (Tabela 11).



Slika 18 - *Reprezentativni Western blotovi koji prikazuju nivoe ukupne i fosforilisane p-38 kinaze, CDK5 i njenih aktivatora p35 i p25, kao i ukupnih i fosforilisanih JNK2/3 i JNK1 kinaza u citosolu i jedru mužjaka i ženki Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu i hipokampusu.*

REZULTATI

Tabela 11 - Nivoi fosforilisane i ukupne p38 kinaze, CDK5 i njenih aktivatora p35 i p25, i fosforilisanih i ukupnih JNK2/3 i JNK1 kinaza u citosolu i jedru ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu i hipokampusu. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja±SEM i obrađeni su Two way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao *p<0.05 za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i #p<0.05 za mužjake u odnosu na ženke.

PREFRONTALNI KORTEKS

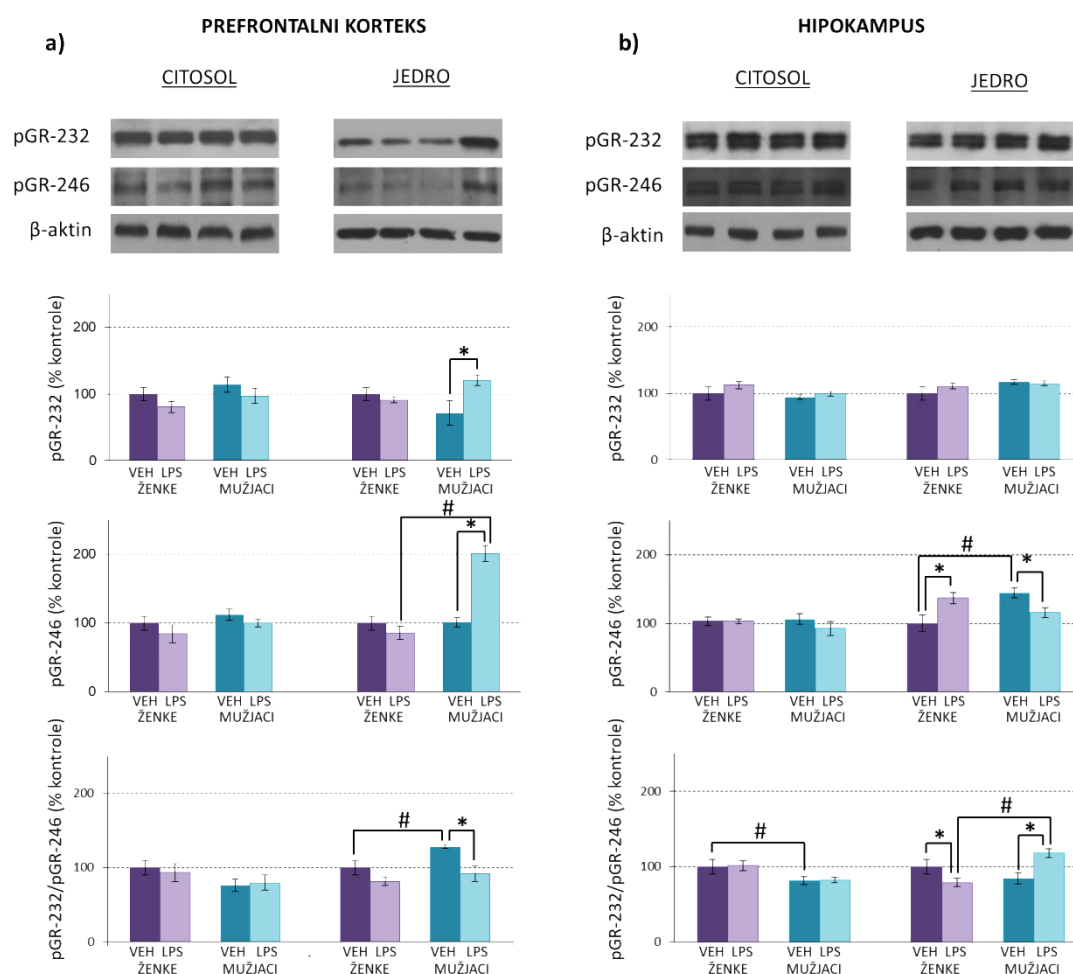
PROTEIN	CITOSOL				JEDRO			
	ŽENKE		MUŽJACI		ŽENKE		MUŽJACI	
	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS
p38	100	97.75±5.67	123.42±7.67	77.14±4.54*	100	98.35±9.59	107.04±8.83	144.01±10.93*
p-p38	100	88.22±6.50	97.62±10.84	66.87±11.32*	100	125.64±8.83*	67.92±2.39	111.67±4.54*
CDK5	100	106.05±6.39	131.60±6.25	82.20±3.91*	100	79.89±5.80	51.70±7.48	97.58±7.92*
p35	100	99.66±7.99	149.82±13.54	72.22±5.73*	100	104.40±10.01	78.21±7.08	141.97±7.35*
p25	100	98.69±5.17	105.25±6.14	77.21±4.59*	100	76.72±19.90	51.64±17.30	168.97±12.89*
JNK2/3	100	137.93±15.15*	201.14±13.38	134.04±13.88*	100	108.76±6.10	94.45±3.29	146.49±12.07*
JNK1	100	104.11±7.71	177.36±11.20	97.46±8.66*	100	82.23±7.33	78.88±16.90	180.44±10.91*
p-JNK2/3	100	115.73±4.97	169.05±15.88	103.76±11.42*	100	110.01±6.50	76.48±7.54	121.03±9.90*
p-JNK1	100	112.75±5.51	156.44±10.52	96.92±7.45*	100	97.87±7.58	79.00±10.76	121.13±8.44*

HIPOKAMPUS

PROTEIN	CITOSOL				JEDRO			
	ŽENKE		MUŽJACI		ŽENKE		MUŽJACI	
	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS
p38	100	99.65±2.75	99.26±6.04	104.38±5.97	100	104.33±4.27	120.88±4.52	117.48±6.68
p-p38	100	145.39±8.93*	105.85±15.07	165.35±9.57*	100	126.30±3.78*	118.05±4.97	118.53±7.16
CDK5	100	85.36±8.69	76.04±4.79	70.13±5.49	100	108.54±6.75	119.46±5.88	78.03±11.49*
p35	100	101.27±5.47	78.70±4.82	64.12±5.39	100	117.79±6.69	115.81±7.44	117.38±8.42
p25	100	82.63±7.34	66.43±10.75	67.56±8.10	100	113.85±8.17	127.89±12.81	130.03±5.33
JNK2/3	100	86.51±4.42	84.72±4.47	87.39±7.46	100	115.38±8.75	149.86±7.64	97.91±8.14*
JNK1	100	96.44±8.20	99.31±11.68	84.70±10.24	100	107.66±9.93	161.15±6.17	86.59±9.38*
p-JNK2/3	100	93.94±4.63	88.55±3.89	97.65±8.87	100	130.26±6.61*	166.26±8.46	131.97±10.69*
p-JNK1	100	120.68±6.57	105.32±7.22	133.68±7.82	100	146.71±5.62*	144.37±9.05	114.13±7.95*

4.4.3. Analiza fosforilacije GR-a

U PFC-u je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe obe fosfoforme samo u jedru (F=15.78 za pGR-232 i F=40.00 za pGR-246; p<0.05). U ovom odeljku, uočeno je značajno povećanje nivoa obe fosfoforme kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Uočen je i značajno viši nivo pGR-246 kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka (Slika 19a). Takođe, uočen je značajan efekat interakcije pola i LPS-a na odnos pGR-232/pGR-246 u jedru (F=13.14, p<0.05). Ovaj odnos je



Slika 19 - Nivoi pGR-232 i pGR-246, kao i odnos pGR-232/pGR-246 u citosolu i jedru ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja±SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao *p<0.05 za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i #p<0.05 za mužjake u odnosu na ženke.

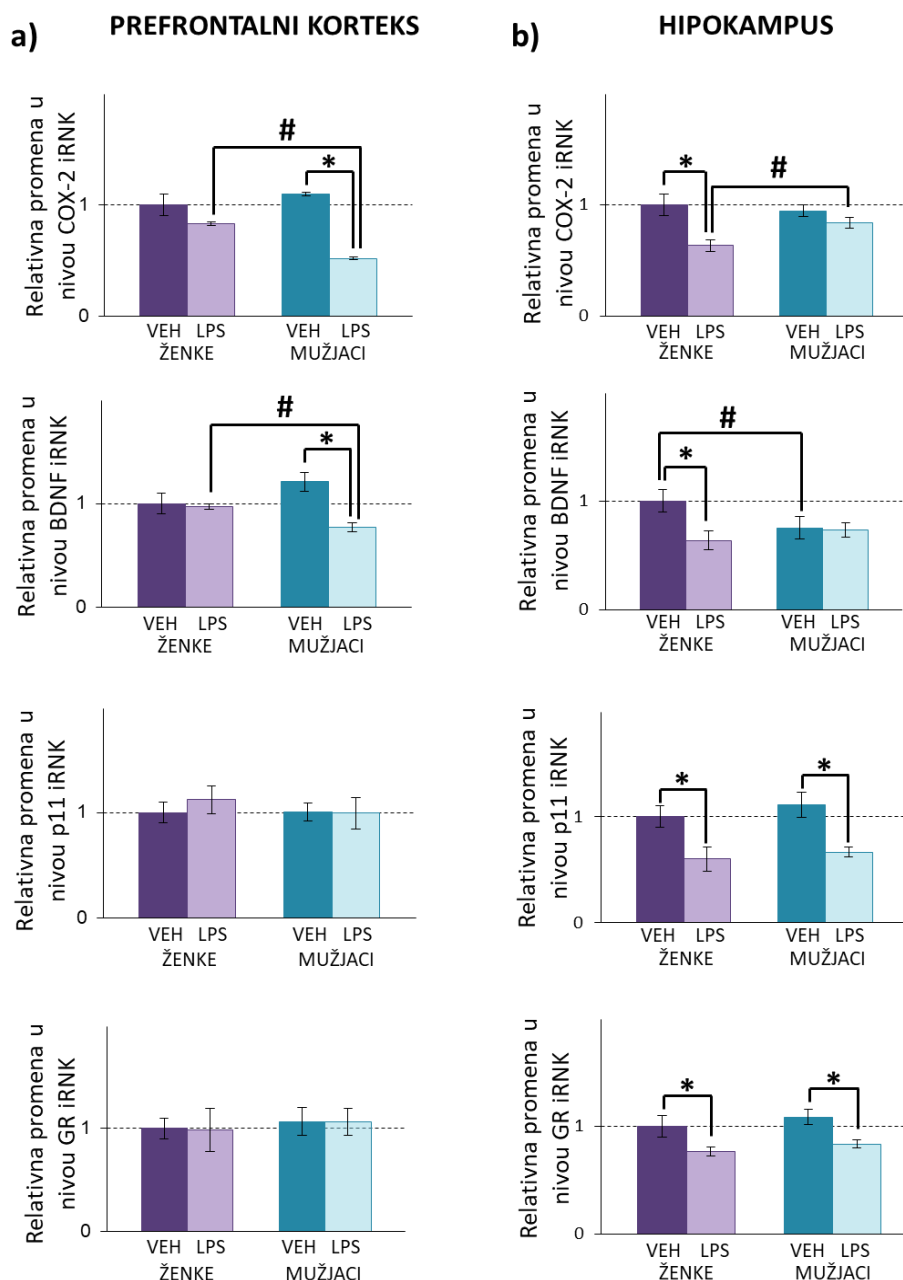
značajno smanjen kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom, i značajno povišen kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke (Slika 19a).

Kada je u pitanju hipokampus, uočen je efekat interakcije pola i LPS-a samo na nivoe pGR-246 u jedru ($F=18.38$, $p<0.05$), gde je došlo do povećanja nivoa ovog proteina kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne jedinke, kao i do njegovog smanjenja kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočeno da je nivo ovog proteina značajno viši kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama (Slika 19b). Što se tiče odnosa ove dve fosfoforme, u citosolu je uočen značajan efekat pola ($F=19.26$, $p<0.05$), a u jedru interakcija pola i LPS-a ($F=31.51$, $p<0.05$). Dalja post hoc analiza je pokazala da je odnos pGR-232/pGR-246 bio značajno snižen u citosolu mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama. Dalje, u jedru je uočen značajan pad ovog odnosa kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama, kao i porast kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom i ženkama tretiranim LPS-om (Slika 19b).

4.5. ANALIZA EKSPRESIJE JEDARNIH GENA REGULISANIH GR-OM

U PFC-u, najznačajniji i polno-specifični efekti tretmana su uočeni na nivoe iRNK COX-2 i BDNF gena. Naime, uočen je efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe iRNK ova dva gena ($F=38.07$ za COX-2 i $F=25.03$ za BDNF; $p<0.05$). Dalje, post hoc analiza je pokazala da su nivoi iRNK ova dva gena bili značajno sniženi kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom i sa ženkama tretiranim LPS-om (Slika 20a). Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora ni njihove interakcije na nivoe p11 i GR iRNK.

I u hipokampusu je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe COX-2 ($F=4.94$, $p<0.05$) i BDNF iRNK ($F=12.13$, $p<0.05$), koji su bili značajno sniženi kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim životinjama. Pored toga, uočen je i značajno viši nivo COX-2 iRNK kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženkama podvrgnutim istom tretmanu, kao i značajno niži nivo BDNF iRNK kod



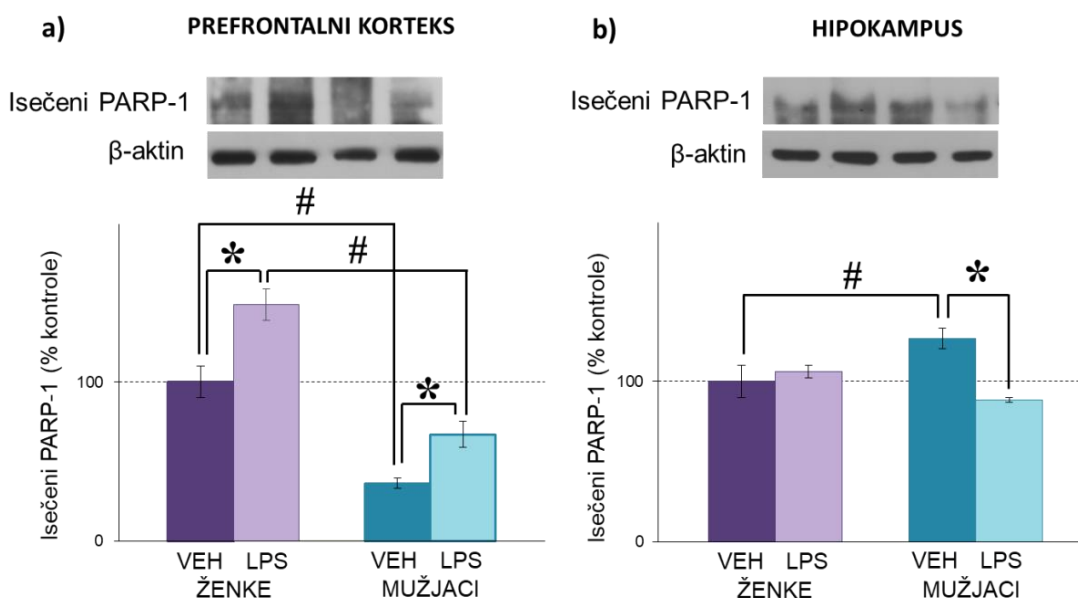
Slika 20 - Ekspresija GR-regulisanih gena ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

kontrolnih mužjaka u odnosu na kontrolne ženke (Slika 20b). Sa druge strane, uočen je značajan efekat LPS-a na nivoe p11 i GR iRNK ($F=1.97$ za p11 i $F=31.12$ za GR; $p<0.05$), koji su bili značajno sniženi i kod mužjaka i kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na njihove kontrole tretirane fiziološkim rastvorom (Slika 20b).

4.6. ANALIZA FOSFORILACIJE GR-A U MITOHONDRIJAMA I MITOHONDRIJSKE TRANSLOKACIJE PROTEINA UKLJUČENIH U PROCES APOPTOZE

4.6.1. Analiza uticaja LPS-a na nivo isečenog PARP-1 proteina

U PFC-u je uočen značajan efekat pola ($F=139.99$, $p<0.05$) i LPS-a ($F=41.90$, $p<0.05$) na nivoe isečenog PARP-1 proteina u citosolu. Značajno viši nivoi isečene forme ovog proteina su uočeni kod jedinki oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen generalno niži nivo isečene forme ovog proteina kod mužjaka nego kod ženki;



Slika 21 - Nivoi isečenog PARP-1 proteina u citosolu ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

tačnije, uočeno je da je taj nivo niži kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka, kao i kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa ženka koje su primile isti tretman (Slika 21a). Sa druge strane, u hipokampusu je uočen efekat interakcije pola i LPS-a ($F=34.94$, $p<0.05$). Nivo isečenog PARP-1 proteina je bio značajno snižen kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom, i značajno povišen kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka (Slika 21b).

4.6.2. Analiza uticaja LPS-a na unutarćelijsku distribuciju kaspaze

Analiza nivoa prekursorske i isečene forme kaspaze-8 - Uočen je značajan glavni efekat LPS-a na nivoe prokaspaze-8 u mitohondrijama PFC-a ($F=5.83$, $p<0.05$). U ovom ćelijskom odeljku, uočeno je značajno smanjenje nivoa prekursorske forme ove kaspaze samo kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim jedinkama. Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni njihove interakcije na nivoe isečene kaspaze-8 u ovom ćelijskom odeljku (Tabela 12). U citosolu je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe obe forme kaspaze-8 ($F=9.88$ za prokaspazu-8 i $F=35.44$ za isečenu kaspazu-8; $p<0.05$). Nivo prokaspaze-8 je bio značajno viši kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženka, dok je nivo njene isečene forme bio viši kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne ženke i na mužjake tretirane LPS-om (Tabela 12).

U hipokampusu je uočen značajan efekat LPS-a na nivoe mitohondrijske prokaspaze-8 ($F=17.97$, $p<0.05$), koji su bili značajno povišeni kod jedinki oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama tretiranim fiziološkim rastvorom. Sa druge strane, nije uočen efekat ni pojedinačnih faktora ni njihovih interakcija na nivoe isečene forme ove kaspaze u ovom ćelijskom odeljku (Tabela 12). U citosolu je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe prekursorske forme kaspaze-8 ($F=10.92$, $p<0.05$), koja je bila značajno povišena kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na ženke tretirane fiziološkim rastvorom. Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni njihove interakcije na nivoe isečene kaspaze-8 u citosolu (Tabela 12).

Analiza nivoa prekursorske i isečene forme kaspaze-9 - U PFC-u su uočeni značajni efekti LPS-a i pola na nivoe prekursorske forme kaspaze-9 u mitohondrijama ($F=7.27$ za uticaj LPS-a i $F=5.87$ za uticaj pola; $p<0.05$), koji su bili značajno sniženi kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama (Tabela 12). Sa druge strane, uočen je značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe isečene forme kaspaze-9 u ovom odeljku ($F=7.14$, $p<0.05$). Nivo isečene forme kaspaze-9 u mitohondrijama je bio značajno niži kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama, a uočen je i značajno niži nivo ove forme kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama (Tabela 12). U citosolu je uočen značajan efekat pola i LPS-a na nivoe prokaspaze-9 ($F=10.99$ za efekat pola i $F=9.28$ za efekat LPS-a; $p<0.05$). Nivo ove prokaspaze je bio značajno viši u citosolu ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama, kao i u citosolu mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama (Tabela 12). Što se tiče isečene forme kaspaze-9 u citosolu, uočen je značajan efekat LPS-a na nivoe ovog proteina ($F=21.57$, $p<0.05$), koji su bili značajno povišeni kod jedinki oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama tretiranim fiziološkim rastvorom (Tabela 12).

Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni njihovih interakcija na nivoe prokaspaze i isečene kaspaze-9 ni u jednom od analiziranih ćelijskih odeljaka (Tabela 12).

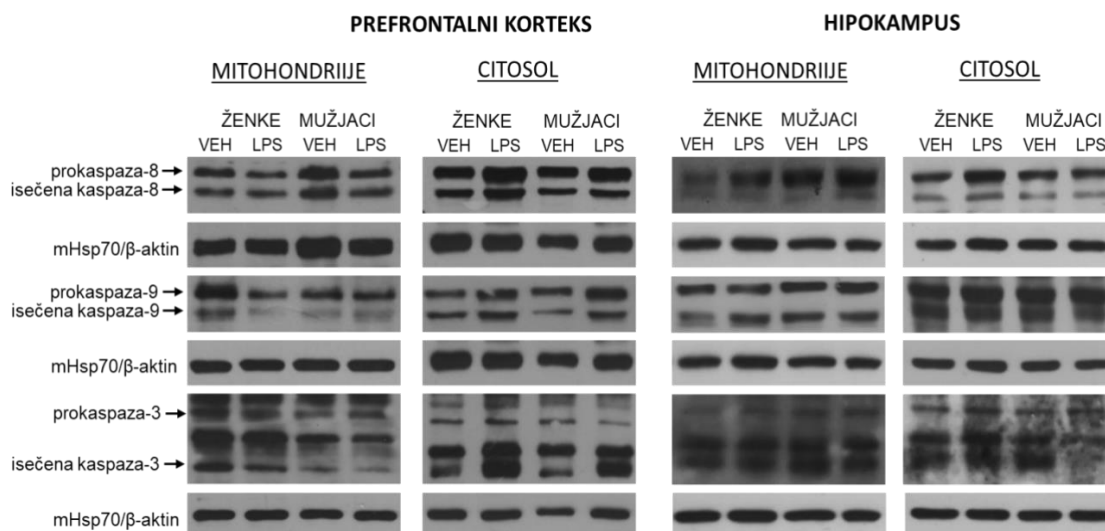
Analiza nivoa prekursorske i isečene forme kaspaze-3 - U PFC-u su uočeni efekti interakcije pola i LPS-a na nivoe obe forme kaspaze-3 u mitohondrijama ($F=20.79$ za prokaspazu-3 i $F=11.67$ za isečenu kaspazu-3; $p<0.05$). Nivoi ove dve forme kaspaze-3 su bili značajno niži u mitohondrijama ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama, kao i u mitohondrijama mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke (Tabela 12). Kada je u pitanju citosol, takođe je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe prokaspaze-3 ($F=40.50$, $p<0.05$), koji su bili značajno viši kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne ženke, kao i u odnosu na mužjake tretirane LPS-om. Sa druge strane, uočen je značajan efekat LPS-a na nivoe isečene forme kaspaze-3 u ovom ćelijskom odeljku ($F=50.71$,

Tabela 12 - Nivoi prekursorskih i isečenih formi kaspaza-8,-9 i-3 u mitohondrijama i citosolu ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu i hipokampusu. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja±SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

PREFRONTALNI KORTEKS								
PROTEIN	MITOHONDRIJE				CITOSOL			
	ŽENKE		MUŽJACI		ŽENKE		MUŽJACI	
	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS
PROKASPAZA 8	100	75.58±7.18*	100.09±3.85	97.60±4.72	100	153.58±2.47*	139.83±11.49	147.65±13.08
ISEČENA KASPAZA-8	100	104.64±5.84	97.65±8.60	101.48±4.37	100	140.22±7.34*	99.46±2.39	91.86±2.21
PROKASPAZA-9	100	74.88±6.87*	76.66±8.11	66.86±9.50	100	152.26±10.61*	149.27±12.51	170.73±14.34
ISEČENA KASPAZA-9	100	55.28±8.74*	69.65±4.12	62.76±12.22	100	146.06±6.11*	105.16±13.63	164.10±26.57*
PROKASPAZA-3	100	66.10±6.08*	46.92±2.73	52.38±5.48	100	133.59±10.86*	121.50±2.49	64.21±7.02
ISEČENA KASPAZA-3	100	59.85±8.88*	40.80±2.32	55.20±13.07	100	236.59±26.07*	126.50±15.76	259.79±23.89*
HIPOKAMPUS								
PROTEIN	MITOHONDRIJE				CITOSOL			
	ŽENKE		MUŽJACI		ŽENKE		MUŽJACI	
	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS	VEH	LPS
PROKASPAZA-8	100	130.39±7.75*	110.70±7.75	158.07±28.75*	100	153.26±9.24*	125.13±8.96	129.44±9.07
ISEČENA KASPAZA-8	100	84.66±10.38	79.11±9.12	71.70±13.03	100	106.31±9.57	76.04±8.59	83.59±10.16
PROKASPAZA-9	100	98.37±4.66	93.14±9.54	95.39±12.62	100	104.73±7.99	90.74±6.57	82.44±12.35
ISEČENA KASPAZA-9	100	81.86±8.86	75.92±8.43	93.92±13.78	100	111.88±7.84	93.81±17.56	77.98±11.52
PROKASPAZA-3	100	70.35±7.23	68.59±8.58	70.71±29.42	100	110.77±8.77	92.46±9.12	87.48±12.80
ISEČENA KASPAZA-3	100	98.26±6.02	100.88±5.13	99.58±7.89	100	85.23±6.85	111.89±13.43	66.13±10.31*

$p < 0.05$), koji su bili značajno povišeni kod jedinki oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolnim jedinkama tretiranim fiziološkim rastvorom (Tabela 12).

Kada je u pitanju hipokampus, uočen je samo efekat LPS-a na nivoe isečene forme ove kaspaze u citosolu ($F = 11.45$, $p < 0.05$), koja je bila značajno snižena kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Tabela 12). Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni njihovih interakcija na nivoe prokaspaze i isečene kaspaze-3 u mitohondrijama, kao ni na nivoe prokaspaze-3 u citosolu (Tabela 12).



Slika 22 - Reprezentativni Western blotovi koji prikazuju nivoe prekursorskih i isečenih formi kaspaza-8,-9 i -3 u mitohondrijama i citosolu ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu i hipokampusu.

4.6.3. Analiza unutarćelijske distribucije proteina BCL-2 proteinske porodice

Analiza nivoa BCL-2 proteina - U PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na mitohondrijske nivoe BCL-2 ($F = 5.82$, $p < 0.05$). U ovom ćelijskom odeljku uočen je značajno viši nivo BCL-2 kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Slika 23a). Sa druge strane, u citosolu je uočen značajan efekat LPS-a na nivoe ovog proteina ($F = 24.82$, $p < 0.05$), koji su bili značajno niži kod jedinki oba pola tretiranih LPS-om u

poređenju sa njihovim kontrolama tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočeno i da je nivo ovog proteina bio značajno viši kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka (Slika 23a).

U hipokampusu je takođe uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe ovog proteina u mitohondrijama ($F=25.62$, $p<0.05$). Nivo BCL-2 je bio povišen u mitohondrijama ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženka. Sa druge strane, nivo ovog proteina je bio značajno snižen u mitohondrijama mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na mužjake tretirane fiziološkim rastvorom, kao i na ženke tretirane LPS-om (Slika 23b). Što se tiče citosola, uočen je značajan efekat LPS-a na nivoe ovog proteina ($F=27.21$, $p<0.05$), koji su bili sniženi kod jedinki oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama (Slika 23b).

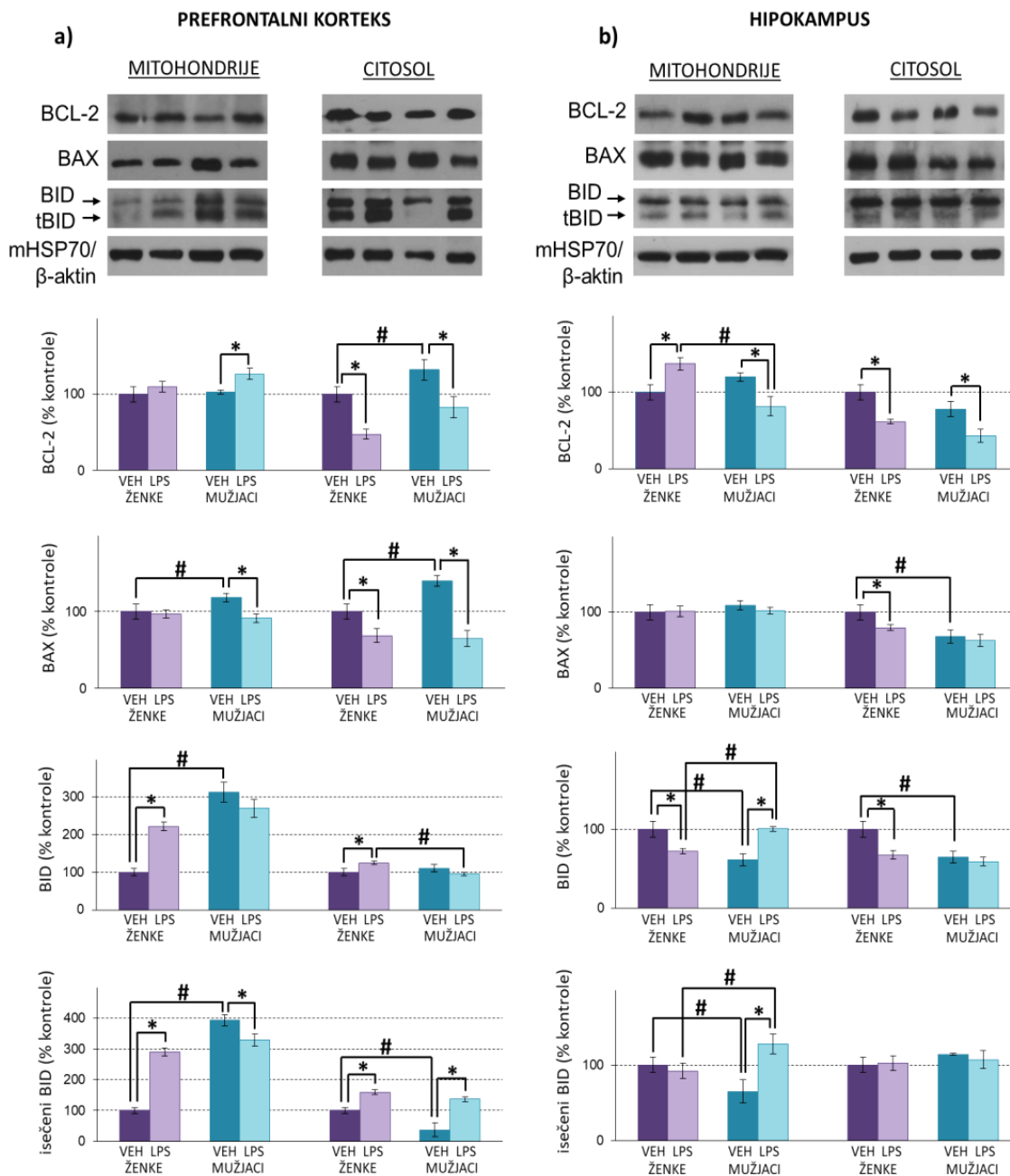
Analiza nivoa BAX proteina – U PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe ovog proteina u oba ćelijska odeljka ($F=7.69$ za mitohondrije i $F=8.63$ za citosol; $p<0.05$). Nivoi ovog proteina su bili značajno sniženi u mitohondrijama mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na mužjake tretirane fiziološkim rastvorom, kao i u citosolu jedinki oba pola tretiranih LPS-om u poređenju sa njihovim kontrolama tretiranim fiziološkim rastvorom. Pored toga, u oba odeljka je uočen i značajno viši nivo ovog proteina kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženka (Slika 23a).

Kada je u pitanju hipokampus, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni njihovih interakcija na nivoe ovog proteina u mitohondrijama. Sa druge strane, uočeni su efekti pola ($F=21.38$, $p<0.05$) i LPS-a ($F=6.03$, $p<0.05$) na nivoe ovog proteina u citosolu. U ovom odeljku je uočen značajno niži nivo BAX-a kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne jedinice, kao i kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke (Slika 23b).

Analiza nivoa prekursorske i isečene forme BID-a – U PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe obe forme proteina BID u mitohondrijama ($F=20.46$ za prekursorsku i $F=82.34$ za isečenu formu BID-a;

$p < 0.05$). Obe forme ovog proteina su bile značajno povišene u mitohondrijama ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama, kao i u mitohondrijama mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke. Pored toga, uočeno je i da je nivo isečene forme proteina BID bio značajno niži kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Slika 23a). Kada je u pitanju citosol, takođe je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe prekursorske forme BID-a ($F=13.01$, $p < 0.05$), koji je bio značajno povišen kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama i sa mužjacima tretiranim LPS-om. Sa druge strane, u citosolu su uočeni značajni efekti pola ($F=19.62$, $p < 0.05$) i LPS-a ($F=47.38$, $p < 0.05$). U ovom ćelijskom odeljku, nivoi isečenog BID-a su bili značajno povišeni kod jedinki oba pola tretiranih LPS-om u odnosu na njihove kontrole tretirane fiziološkim rastvorom, a takođe je uočeno i da je nivo ovog proteina bio značajno niži kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama (Slika 23a).

I u hipokampusu je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe obe forme proteina BID u mitohondrijama ($F=58.27$ za prekursorsku i $F=38.32$ za isečenu formu BID-a; $p < 0.05$). Nivoi obe forme BID-a su bili značajno viši kod mužjaka tretiranih LPS-om u odnosu na mužjake tretirane fiziološkim rastvorom i ženke tretirane LPS-om, kao i niži kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke. Pored toga, uočen je i značajno niži nivo prekursorske forme BID proteina kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne ženke (Slika 23b). Kada je u pitanju citosol, takođe je uočen efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe prekursorske forme BID-a ($F=7.62$, $p < 0.05$), koji je bio značajno niži kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne ženke, kao i kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke. Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni interakcija na nivoe isečene forme proteina BID u ovom ćelijskom odeljku (Slika 23b).

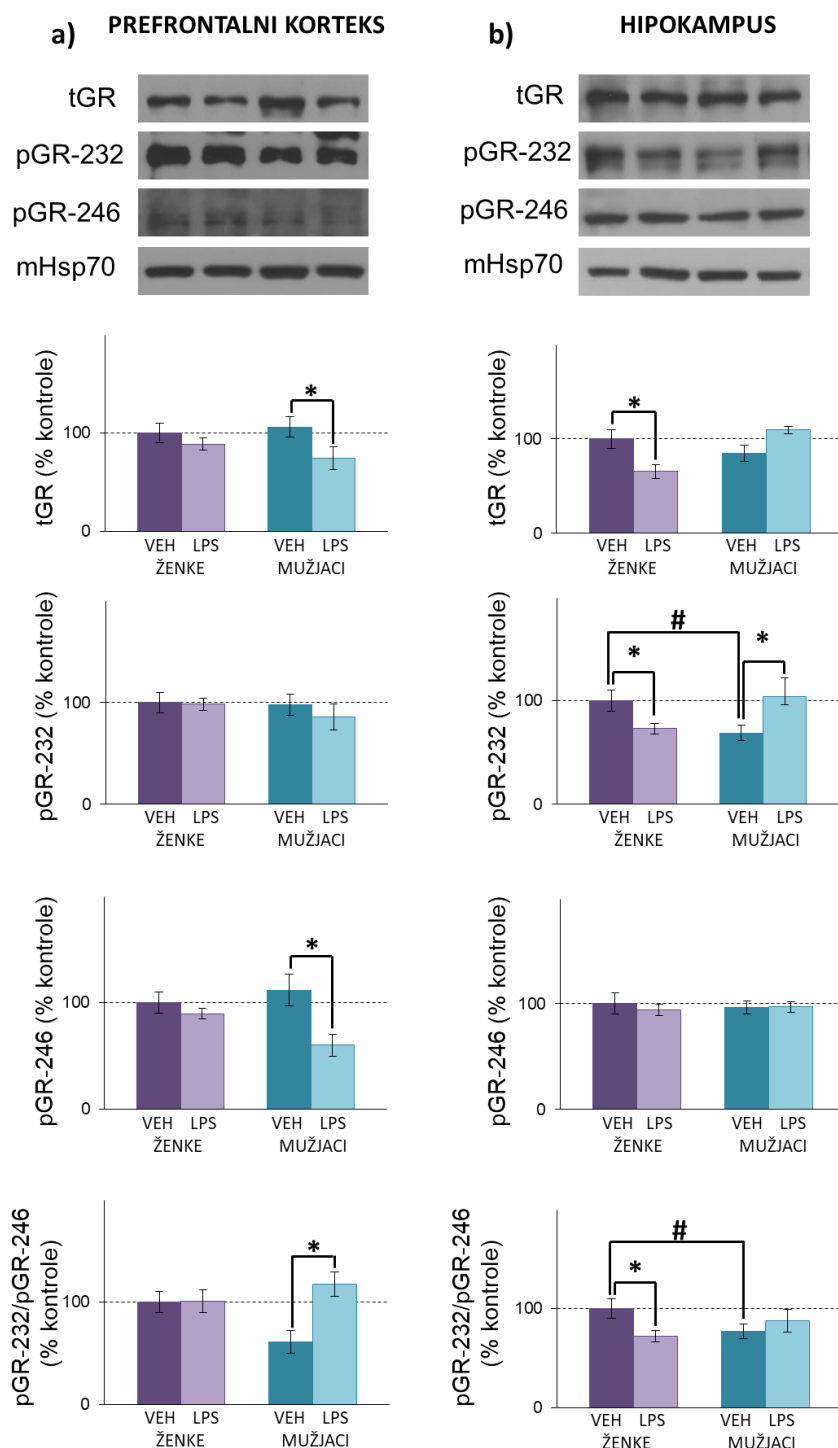


Slika 23 - Nivoi proteina BCL-2 porodice u mitohondrijama i citosolu ženki i mušjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja±SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za mušjake u odnosu na ženke.

4.6.4. Analiza nivoa i fosforilacionog statusa GR-a u mitohondrijama

U PFC-u je uočen značajan efekat LPS-a na nivoe mitohondrijskog GR-a ($F=9.09$, $p<0.05$), koji su bili značajno sniženi kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Slika 24a). Kada su u pitanju fosforilacije ovog receptora, u PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe pGR-246 ($F=4.64$, $p<0.05$), kao i na odnos pGR-232/pGR-246 ($F=7.99$, $p<0.05$). Nivo pGR-246 je bio značajno niži, a odnos pGR-232/pGR-246 značajno viši kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom (Slika 24a). Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni njihovih interakcija na nivoe pGR-232 u ovom ćelijskom odeljku.

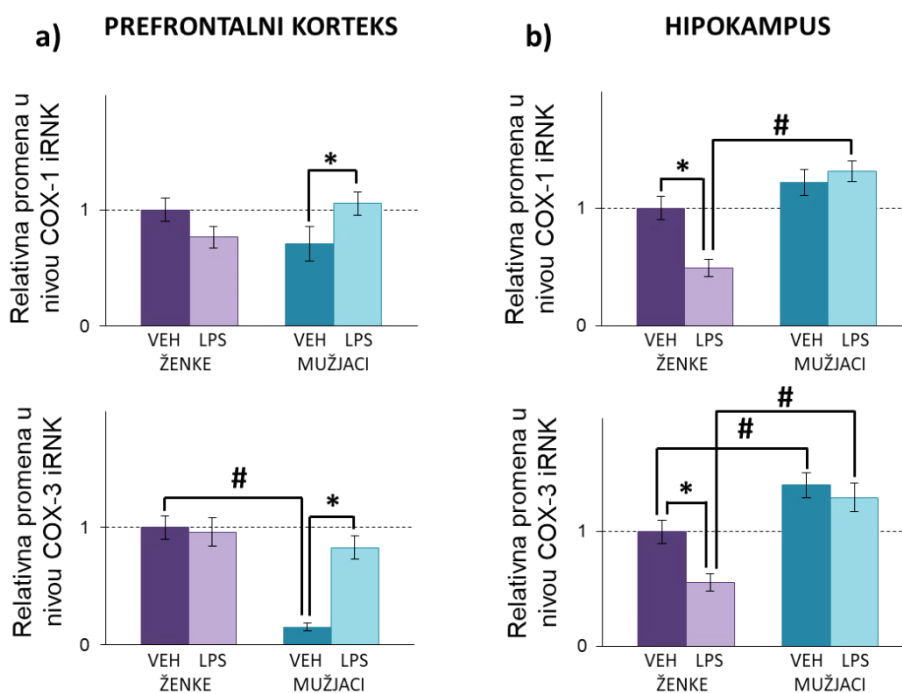
U mitohondrijama hipokampusa je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe GR-a ($F=22.22$, $p<0.05$), koji su bili značajno sniženi kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne ženke (Slika 24b). Što se tiče fosforilacija, uočen je značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe pGR-232 ($F=16.15$, $p<0.05$), kao i na odnos pGR-232/pGR-246 ($F=11.49$, $p<0.05$). Nivoi pGR-232 su bili značajno sniženi kod ženki tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim ženkama, i značajno povišeni kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Takođe je uočen i značajno niži nivo ove fosfoforme kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u poređenju sa kontrolnim ženkama. Što se tiče odnosa pGR-246/pGR-246, on je bio značajno snižen kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne ženke, kao i kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke. Sa druge strane, nisu uočeni efekti ni pojedinačnih faktora, ni njihovih interakcija na nivoe pGR-246 u ovom ćelijskom odeljku (Slika 24b).



Slika 24 - Nivoi ukupnog GR-a i njegovih fosfoformi u mitohondrijama ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p < 0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p < 0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

4.7. ANALIZA EKSPRESIJE MITOHONDRIJSKIH GENA REGULISANIH GR-OM

U PFC-u je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe COX-1 i COX-3 iRNK ($F=13.18$ za COX-1 i $F=13.21$ za COX-3; $p<0.05$). Nivoi iRNK ova dva gena su bili značajno viši kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa mužjacima tretiranim fiziološkim rastvorom. Pored toga, uočen je značajno niži nivo COX-3 iRNK kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke (Slika 25a). Što se tiče hipokampusa, i u ovom tkivu je uočen značajan efekat interakcije pola i LPS-a na nivoe iRNK ova dva gena ($F=16.71$ za COX-1 i $F=13.21$ za COX-3; $p<0.05$). Nivoi iRNK ova dva gena su bili značajno niži kod ženki tretiranih LPS-om u odnosu na kontrolne ženke i na mužjake tretirane LPS-om, a uočen je značajno viši nivo COX-3 iRNK kod mužjaka tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na kontrolne ženke (Slika 25b).



Slika 25 - Ekspresija GR-regulisanih mitohondrijskih gena ženki i mužjaka Wistar pacova tretiranih LPS-om i kontrola u prefrontalnom korteksu (a) i hipokampusu (b). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja \pm SEM i obrađeni su two-way ANOVA-om i post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa pokazane u post hoc testu su naznačene na graficima i predstavljene kao * $p<0.05$ za životinje tretirane LPS-om u odnosu na kontrolnu grupu i # $p<0.05$ za mužjake u odnosu na ženke.

5. DISKUSIJA

Dok uvid u uticaj citokina na glukokortikoidnu rezistenciju raste, efekti interakcije citokina i pola na GR i odgovore na inflamaciju, kao i njihov združen doprinos poremećajima raspoloženja, ostaju da budu razjašnjeni. Stoga bi razumevanje patofizioloških mehanizama koji povezuju inflamaciju i depresiju svakako moglo da dovede do boljeg razumevanja ove bolesti i doprinese efektivnijoj terapiji, a opisivanje neuroimunoloških procesa u odnosu na pol bi moglo da bude korisno oruđe za razumevanje nastanka, toka i ishoda bolesti. Do sada je predloženo nekoliko mehanizama koji bi mogli da budu medijatori veze između inflamacije i depresije, ali njihova uloga u etiologiji ovog oboljenja još uvek nije u potpunosti razjašnjena.

Rezultati ove disertacije su po prvi put pokazali da bi značajnu ulogu u posredovanju polno-specifičnih efekata inflamacije na mehanizme koji dovode do nastanka depresije mogao da ima GR. Sažeti pregled efekata LPS-a na glukokortikoidnu signalizaciju i gene regulisane ovim receptorom koji su uočeni u ovoj studiji je prikazan u Tabelama 13 i 14.

5.1. UTICAJ LPS-A NA PONAŠANJE

Kako bi se okarakterisalo ponašanje nalik depresivnom izazvano LPS-om, i kako bi odgovarajuće promene u glukokortikoidnoj signalizaciji uočene kod tretiranih životinja mogle da se povežu sa izmenjenim ponašanjem, odrađeno je nekoliko testova ponašanja. Testovi ponašanja izvedeni u ovoj studiji su imali za cilj da kod životinja tretiranih LPS-om ukažu na prisustvo nekih od klasičnih simptoma ponašanja nalik depresivnom koji se mogu povezati sa simptomima depresije uočenim u kliničkoj populaciji (i opisani u odeljku 1.1.). Na primer, beznadežnost, kao jedan od simptoma depresivnog ponašanja životinja, bi mogla da bude paralelna ponavljajućim mislima o smrti koje su važan simptom depresije kod ljudi (Cryan i sar., 2005a; Cryan i sar., 2005b). Isto tako, gubitak interesovanja ili zadovoljstva za sve, ili skoro sve aktivnosti, koji je glavni simptom bolesti u kliničkoj populaciji, bi mogao da korelira sa anhedonijom kod životinja, merenom sklonošću ka slatkom rastvoru. Pored toga, kako se depresija u kliničkoj populaciji

često dijagnostikuje zajedno sa anksioznošću (Brown, 2001), u ovoj studiji su praćeni i parametri koji mogu da ukažu na ovo ponašanje.

Tabela 13 – Sažeti prikaz promena u glukokortikoidnoj signalizaciji i markerima apoptoze u prefrontalnom korteksu i hipokampusu životinja oba pola tretiranih LPS-om.

PROTEIN	PREFRONTALNI KORTEKS						HIPOKAMPUS					
	C		J		M		C		J		M	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
UTICAJ LPS-A NA UNUTARĆELIJSKU DISTRIBUCIJU I FOSFORILACIJU GR-A												
tGR	x	↓	x	↑	x	↓	x	x	↑	↓	↓	x
pGR-232	x	x	x	↑	x	x	x	x	x	x	↓	↑
pGR-246	x	x	x	↑	x	↓	x	x	↑	↓	X	x
pGR-232/pGR-246	x	x	x	↓	x	↑	x	x	↓	↑	↓	x
UTICAJ LPS-A NA KINAZE KOJE FOSFORILIŠU GR												
FKBP5	x	↓	↑	↑			x	x	↑	↓		
FKBP4	x	↓	x	↑			x	x	x	↓		
JNK2/3	↑	↓	x	↑			x	x	x	↓		
pJNK2/3	x	↓	x	↑			x	x	↑	↓		
JNK1	x	↓	x	↑			x	x	x	↓		
pJNK1	x	↓	x	↑			x	x	↑	↓		
p-p38	x	↓	x	↑			↑	↑	↑	x		
p38	x	↓	↑	↑			x	x	x	x		
CDK5	x	↓	x	↑			x	x	x	↓		
p25	x	↓	x	↑			x	x	x	x		
p35	x	↓	x	↑			x	x	x	x		
UTICAJ LPS-A NA MARKERE APOPTOZE												
isećeni PARP-1	↑	↑					x	↓				
prokaspaza-8	↑	x			↓	x	↑	x			↑	↑
isećena kaspaza-8	↑	x			x	x	x	x			x	x
prokaspaza-9	↑	x			↓	x	x	x			x	x
isećena kaspaza-9	↑	↑			↓	x	x	x			x	x
prokaspaza-3	↑	↓			↓	x	x	x			x	x
isećena kaspaza-3	↑	↑			↓	x	x	↓			x	x
BAX	↓	↓			x	↓	↓	x			x	x
BCL-2	↓	↓			x	↑	↓	↓			↑	↓
BID	↑	x			↑	x	↓	x			↓	↑
isećeni BID	↑	↑			↑	↓	x	x			x	↑

Tabela 14 - Sažeti prikaz promena u nivoima iRNK jedarnih i mitohondrijskih gena regulisanih GR-om u prefrontalnom korteksu i hipokampusu životinja oba pola tretiranih LPS-om.

	PROTEIN	PREFRONTALNI KORTEKS		HIPOKAMPUS	
		♀	♂	♀	♂
JEDRO	BDNF	x	↓	↓	x
	COX-2	x	↓	↓	x
	p11	x	x	↓	↓
	GR	x	x	↓	↓
MTH	COX-1	x	↑	↓	x
	COX-3	x	↑	↓	x

5.1.1. Uticaj LPS-a na unos hrane i telesnu težinu

U ovoj studiji, životinje oba pola tretirane LPS-om su imale smanjen unos hrane u odnosu na životinje tretirane fiziološkim rastvorom, a smanjeni apetit je bio praćen i smanjenom telesnom težinom. Ovakve promene su jedan od čestih nalaza kod pacijenata obolelih od depresije (Besedovsky i del Rey; 1996, Anisman i sar., 2008) i kod životinja koje ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom (Sachot i sar., 2004). Takođe, uočene promene su u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale smanjenje telesne težine i unosa hrane nakon višestrukih injekcija LPS-a (Bay-Richter i sar., 2011; Kubera i sar., 2013).

Promene u apetitu uočene u ovoj studiji bi mogle da budu direktna posledica narušene funkcije HPA ose. Naime, pokazano je da hormonska neravnoteža na nivou HPA ose izazvana stresom može da dovede do gubitka apetita i smanjenja telesne težine (Shimizu i sar., 1989; Jahng, 2011). Jedan od mehanizama kojima bi poremećena funkcija HPA ose mogla da utiče na apetit jeste putem povišenog lučenja CRH, koji potom može da smanji periferni nivo „hormona gladi“, grelina (Saegusa i sar., 2011). Stoga bi povišeni nivo serumskog kortikosterona uočen u ovoj studiji kod životinja oba pola tretiranih LPS-om mogao da dovede do gubitka apetita i posledičnog smanjenja telesne težine.

5.1.2. Uticaj LPS-a na ponašanje nalik depresivnom

5.1.2.1. Uticaj LPS-a na beznadežnost

U testu prinudnog plivanja, životinje oba pola tretirane LPS-om su ispoljile beznadežno ponašanje. Tačnije, frekvencija imobilnosti kod ovih životinja je bila viša, a frekvencija plivanja niža u poređenju sa životinjama tretiranim fiziološkim rastvorom. Ovi rezultati su u saglasnosti sa studijom koja je pokazala da višednevni tretman LPS-om (4 dana) dovodi do javljanja osećaja beznadežnosti kod mužjaka pacova *Wistar* soja (Bay-Richter i sar., 2011).

Kada je u pitanju treći parametar koji smo merili u testu prinudnog plivanja, penjanje, ono bi u ovom testu moglo da bude indikator lokomotorne aktivnosti (Vieira i sar., 2008; Lino-de-Oliveira i sar., 2005). Iako smo u ovoj studiji zabeležili vidan pad u vrednostima ovog parametra kod životinja oba pola, ova promena nije bila statistički značajna. Međutim, svakako je moguće da bi uočeni pad u frekvenciji plivanja mogao da ukaže na smanjenu lokomotornu aktivnost, što bi bilo u saglasnosti sa rezultatima testova otvorenog polja i uzdignutog plus lavirinta.

5.1.2.2. Uticaj LPS-a na anhedoniju

Test sklonosti ka saharozi je pokazao da su životinje oba pola tretirane LPS-om u ovoj studiji pile manje rastvora saharoze u odnosu na kontrole, što ukazuje na prisustvo anhedonije kod ovih životinja, i ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Bay-Richter i sar., 2011; Kubera i sar., 2013). Iako je špekulisano da smanjenje uzimanja rastvora saharoze može da bude posledica supresivnih efekata LPS-a na apetit, pokazano je da postoji disocijacija između ovih parametara pri tretmanu LPS-om. Na primer, Frenois i sar. su pokazali da miševi tretirani LPS-om pokazuju smanjen unos rastvora saharoze 48 h nakon tretmana, dok su se u toj vremenskoj tački unos hrane i vode vratili na nivo kontrole (Frenois i sar., 2007). Pored toga, iako smanjen unos rastvora saharoze u ovom testu može da bude posledica smanjenog unosa vode usled tretmana LPS-om, rezultati ove studije su pokazali da unos vode kod životinja tretiranih LPS-om nije bio smanjen u odnosu na životinje tretirane fiziološkim rastvorom, i da samim tim promene u unosu vode nisu uticale na rezultate ovog testa.

5.1.3. Uticaj LPS-a na anksiozno ponašanje

Testovi otvorenog polja i uzdignutog plus lavirinta su pokazali da tretman LPS-om nije doveo do nastanka ponašanja nalik anksioznom ni kod ženki ni kod mužjaka. Tačnije, nisu uočene nikakve statistički značajne razlike u parametrima koji klasično mere anksioznost ni u testu otvorenog polja (mereno brojem ulazaka i vremenom provedenim u centru, defekacijom i timarenjem), ni u testu uzdignutog plus lavirinta (mereno brojem ulazaka i vremenom provedenim u otvorenim kracima).

Iako postoje studije koje, poput ove, nisu uspele da detektuju ponašanje nalik anksioznom nakon tretmana LPS-om (Weiss i sar., 1998), neke studije su to ipak pokazale (Lacosta i sar., 1999; Nava i Caputi, 1999; Nava i Carta, 2001). Ovi oprečni rezultati bi mogli da budu posledica trajanja i/ili doze tretmana. Na primer, u ovoj studiji tretman LPS-om je bio sedmodnevan, dok je u studiji Lacosta i saradnika tretman bio akutan, što može da ukaže na to da nakon produženog tretmana LPS-om dolazi do popravljavanja anksioznog ponašanja. Dalje, pokazano je da bi povišenje nivoa IL-1 β iRNK u PFC-u moglo da ublaži anksiozno ponašanje kod pacova kada se primeni intrakranijalno (Montkowski i sar., 1997). U studiji sprovedenoj u našoj laboratoriji je pokazano da je kod životinja oba pola nakon sedmodnevnog tretmana LPS-om u dozi od 500 μ g/kg došlo do porasta nivoa IL-1 β iRNK u PFC-u (Brkic i sar., 2016). Iz ovoga se može zaključiti da bi odsustvo ponašanja nalik anksioznom nakon tretmana LPS-om uočeno u ovoj studiji moglo da bude posledica povišenog nivoa IL-1 β iRNK PFC-u životinja.

Dalje, rezultati testova otvorenog polja i uzdignutog plus lavirinta u ovoj studiji su pokazali da je tretman LPS-om doveo do smanjenja spontane lokomotorne aktivnosti, odnosno smanjenja istraživačkog ponašanja kod životinja oba pola u odnosu na njihove kontrole. Naime, kod ovih životinja je uočeno značajno smanjenje broja prelaza u susedne kvadrate i broja propinjanja uz zidove u testu otvorenog polja, kao i do smanjenja ukupnog broja ulazaka u krake u testu uzdignutog plus lavirinta. Međutim, u naučnoj zajednici postoji neusaglašenost oko toga kako treba tumačiti izmenjenu lokomotornu aktivnost u ovim testovima. Na primer, dok neki istraživači smatraju da nisku lokomotornu aktivnost treba

tumačiti kao indeks visoke emocionalnosti (odnosno anksioznosti i straha), drugi smatraju da su ova dva vida ponašanja nezavisna jedan od drugog (Denenberg, 1969). Ono što bi moglo da pomogne u tumačenju ovih rezultata jesu podaci vezani za defekaciju životinja u testu otvorenog polja. Naime, jedna studija je pokazala da je neophodno imati i podatke o defekaciji životinja kako bi se pravilno mogle interpretirati promene u lokomotornoj aktivnosti (Denenberg, 1969). Prema nekim autorima defekacija životinja je povezana sa njihovom emocionalnošću - visoko emotivne životinje imaju povećanu defekaciju, i ona može da se koristi kao pokazatelj nivoa anksioznosti glodara (Walsh i Cummins, 1976). Međutim, u testu otvorenog polja u ovoj studiji nisu uočene značajne promena u defekaciji životinja tretiranih LPS-om u odnosu na njihove kontrole, odnosno kod ovih životinja nije došlo do promena u emocionalnosti. Kako je kod životinja tretiranih LPS-om u ovoj studiji ujedno i smanjena lokomotorna aktivnost, ovi rezultati bi mogli da ukažu na to da su u ovoj paradigmi lokomotorna aktivnost i emocionalnost dva vida ponašanja nezavisna jedan od drugog.

Treba napomenuti da, iako nismo uočili nikakve statistički značajne razlike u parametrima koji klasično mere anksiozno ponašanje kod mužjaka tretiranih LPS-om u testovima otvorenog polja i uzdignutog plus lavirinta, moguće je da je tretman LPS-om kod ovog pola ipak doveo do izmenjene emocionalnosti, bar u nekoj meri. Naime, neke studije ukazuju na to da bi smanjeno propinjanje u vazduhu, koje je u ovoj studiji uočeno kod mužjaka tretiranih LPS-om u testu otvorenog polja, moglo da ukaže na prisustvo povišene emocionalnosti (Sturman i sar., 2018).

5.1.4. Uticaj LPS-a na nivoe serumskog kortikosterona

Kada je u pitanju nivo kortikosterona u serumu, LPS je doveo do njegovog povećanja kod životinja oba pola u odnosu na njihove kontrole tretirane fiziološkim rastvorom, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Girard-Joyal i sar., 2015). Takođe, ovaj rezultat je u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da životinje koje ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom imaju poremećenu funkciju HPA ose, koju karakteriše povećan nivo serumske koncentracije hormona HPA ose, ACTH i kortikosterona, kao i porast nivoa regulatornog neuropeptida, CRH

(Pariante i Lightman, 2008). Ove promene u aktivnosti HPA ose su u velikoj meri posredovane citokinima, o čemu je bilo reči u poglavlju 1.2.3.3.

Međutim, iako je uticaj LPS-a na nivo kortikosterona bio isti kod oba pola, kod ženki je nivo ovog hormona bio povišen u odnosu na mužjake i u bazalnom stanju i nakon LPS-a, što se često sreće u životinjskim modelima (Kudielka i Kirschbaum, 2005). Ovo se može objasniti činjenicom da estrogeni sa jedne strane stimulišu sekreciju CRH, a sa druge smanjuju ekspresiju GR-a u regionima mozga važnim za funkciju HPA ose (hipokampusu, hipotalamusu i hipofizi) (Swaab i sar., 2005). Takođe, uzimajući u obzir povezanost imunskog sistema i HPA ose, veće povećanje nivoa kortikosterona uočeno kod ženki nakon tretmana LPS-om bi moglo da bude i posledica veće reaktivnosti imunskog sistema kod ženskog pola (Engler i sar., 2016).

Sumirano, ova studija je pokazala da je efekat sedmodnevnog tretmana LPS-om, dozom 500 mg/kg, na ponašanje i na nivo serumskog kortikosterona bio isti kod mužjaka i kod ženki - tačnije, LPS je kod oba pola aktivirao HPA osu i doveo do nastanka depresivnog ponašanja, dok nije uticao na parametre koji mere anksiozno ponašanje. Iako bi istovremeno prisustvo anksioznosti i depresije moglo doprineti validnosti ovog modela, odsustvo anksioznog ponašanja kod životinja tretiranih LPS-om olakšava prepoznavanje i karakterizaciju depresivnog ponašanja kod ovih životinja, budući da je nemoguće povući jasnu granicu između ova dva tipa ponašanja (Zbozinek i sar., 2012).

5.2. UTICAJ LPS-A NA FOSOFILACIJU GR-A I UNUTARĆELIJSKU TRANSLOKACIJU PROTEINA UKLJUČENIH U GLUKOKORTIKOIDNU SIGNALIZACIJU

5.2.1. Uticaj LPS-a na nivoe GR-a i njegovih košaperona

Iako je LPS aktivirao HPA osu i izazvao depresivno ponašanje kod jedinki oba pola, doveo je do tkivno- i polno-specifičnih promena u nivoima GR-a u citosolu i jedru. Naime, u PFC-u je doveo do promena u glukokortikoidnoj signalizaciji samo kod mužjaka, dok je u hipokampusu doveo do povećanja nivoa jedarnog GR-a kod ženki i njegovog smanjenja kod mužjaka.

Ovakva unutarćelijska raspodela GR-a uočena nakon tretmana LPS-om bi mogla da bude posledica promena u nivou njegovih regulatora, FKBP4 i FKBP5. Kao što je već pomenuto u odeljku 1.3.1.1, u citosolu ova dva proteina funkcionišu kao regulatori transporta GR-a – FKBP4 je pozitivni, dok je FKBP5 negativni regulator ovog procesa (Slika 4). Što se tiče jedra, tačna funkcija ovih imunofilina u ovom odeljku još uvek nije jasno definisana. Postoje indikacije da bi jedarni FKBP5 mogao da poveća stabilnost GR-a i potencijalno zaštiti GR koji nije vezan za DNK od proteolize (Tatro i sar., 2009), dok bi jedarni FKBP4 mogao da reguliše transaktivaciju i da funkcioniše kao gen-specifičan modulator transkripcione aktivnosti GR-a (Wolf i sar., 2009). Međutim, dodatna istraživanja su neophodna kako bi se bolje razjasnio efekat ova dva imunofilina na jedarni GR. Važno je napomenuti i da je ekspresija ova dva proteina regulisana polnim hormonima (Kumar i sar., 2001; Hubler i sar., 2003), što bi moglo da objasni polne razlike uočene u nivou ova dva proteina u odgovoru na LPS, a samim tim delimično da objasni i polno-specifične efekte LPS-a na nivoe GR-a u citosolu i jedru.

Uzimajući u obzir ulogu košaperona u translokaciji GR-a, nalaz ove studije da je u PFC-u mužjaka translokacija GR-a nakon tretmana LPS-om bila praćena smanjenim nivoom citosolnog FKBP4 je u saglasnosti sa dobro poznatom ulogom ovog imunofilina u procesu translokacije GR-a. Kada je u pitanju FKBP5, smanjeni nivo ovog imunofilina u citosolu mužjaka bi mogao da potpomogne vezivanje FKBP4 za GR-hsp90 kompleks i translokaciju ovog kompleksa u jedro (Tatro i sar.,

2009). Što se tiče jedra, povišen nivo FKBP5 uočen u ovom odeljku kod mužjaka tretiranih LPS-om bi mogao da doprinese povišenom nivou jedarnog GR-a putem povećanja njegove stabilnosti, ali i da ukaže na njegovo smanjeno vezivanje za DNK i smanjenu transkripcionu aktivnost.

Kada je u pitanju hipokampus, uočene promene u nivou jedarnog GR-a izazvane LPS-om kod oba pola bi takođe mogle da budu posledica promena u FKBP4/FKBP5 sistemu. Naime, pored toga što predstavljaju modulatore translokacije GR-a iz citosola u jedro, ovi košaperoni mogu da utiču i na zadržavanje GR-a u jedru. Tačnije, pokazano je da bi povišen nivo FKBP4 i nepromenjen nivo FKBP5, uočeni u jedru hipokampusa ženki nakon tretmana LPS-om, mogli da doprinesu zadržavanju ovog receptora u jedru (Galigniana i sar., 2010). Zadržavanju GR-a u jedru ženki bi mogli da doprinesu i procesi poput smanjene auto-regulacije GR-a izazvane povišenim nivoom IL-1 (Pariante i sar., 1999), kao i povišeni nivo serumskog kortikosterona koji može da spreči izbacivanje GR-a iz jedra (Madan i DeFranco, 1993). Treba napomenuti i da GR u jedru može da ostane veoma dugo pre nego što se vrati u citosol (Liu i DeFranco, 2000), a sam proces vraćanja GR-a iz jedra u citosol se odvija veoma sporo (Carrigan i sar., 2007).

Kada su u pitanju mužjaci, smanjeni nivo jedarnog FKBP5 u hipokampusu nakon LPS-a bi mogao da doprinese smanjenoj stabilnosti i povišenoj degradaciji receptora, dok bi smanjen nivo FKBP4 mogao da utiče na njegovu transkripcionu aktivnost. Pored FKBP4/FKBP5 sistema, i citokini bi mogli da smanje nivo jedarnog GR-a blokiranjem njegove translokacije ili smanjenjem njegove ekspresije (Miller i sar., 1999), kao i poremećena negativna povratna sprega i povećana aktivnost HPA ose (Dong i sar., 1988).

Sve ukupno, promene u nivoima GR-a uočene u PFC-u i hipokampusu jedinki oba pola bi mogle da imaju polno-specifične efekte na ekspresiju gena regulisanih ovim receptorom. Međutim, smer ovih promena, tačnije to da li će GR da aktivira ili suprimira ekspresiju ciljanih gena, zavisi od većeg broja faktora, poput tipa ćelije ili njenog fiziološkog stanja. Pored toga, sam podatak o promeni nivoa jedarnog GR-a kod jedinki tretiranih LPS-om nam ne govori mnogo o

njegovom efektu na gensku ekspresiju zato što mnogi procesi mogu da utiču na njegovu funkciju, a jedan od tih procesa jesu fosforilacije. Takođe, kinetika regrutovanja ukupnog GR-a i njegovih fosfoformi, pGR-232 i pGR-246, na GRE se razlikuje između gena - geni koji su kontrolisani sa manje GRE više su zavisni od fosforilacija GR-a, dok su geni kontrolisani sa više GRE manje zavisni od fosforilacija GR-a (Blind i Garabedian, 2008), što dodatno povećava raznovrsnost odgovora ovog receptora na stresne stimuluse.

5.2.2. Uticaj LPS-a na fosforilaciju GR-a i nivoa kinaza uključenih u njegovu fosforilaciju

U PFC-u, LPS je doveo do aktivacije i translokacije svih analiziranih kinaza samo kod mužjaka, dok je kod ženki uticao samo na povišenje nivoa jedarne fosfo-p38 kinaze. Promene u translokaciji i aktivaciji kinaza uočene u PFC-u mužjaka nakon tretmana LPS-om su bile praćene povišenom fosforilacijom jedarnog GR-a na oba analizirana mesta, Ser232 i Ser246. Sa druge strane, u jedru hipokampusa ženki, LPS je doveo do fosforilacije svih JNK, dok je kod mužjaka doveo do pada ukupnih i fosforilisanih formi ovih kinaza. Promene u fosforilaciji JNK u hipokampusu su bile praćene sličnim promenama u fosforilaciji GR-a na Ser246, tačnije povećanjem fosforilacije GR-a na ovom aminokiselinskom ostatku kod ženki i smanjenja kod mužjaka.

Polne razlike uočene u aktivnosti MAPK u odgovoru na LPS u ove dve analizirane moždane strukture bi mogle da budu objašnjene time što i testosteron i estradiol imaju negenomske efekte na ćelije, i da u datom trenutku aktiviraju različite signalne puteve u zavisnosti od pola (Swartz i sar., 2005). Pored toga, lokalna koncentracija polnih steroida u određenom regionu mozga takođe može da doprinese polno-specifičnoj regulaciji ovih signalnih puteva. Pad u fosforilaciji jedarne JNK uočena u hipokampusu mužjaka tretiranih LPS-om bi mogao da bude posledica i povišene ekspresije fosfataze MAPK-1 (MKP-1). MKP-1 kinaza je kinaza koja defosforiliše i inaktivira MAPK, a pokazano je da je ova kinaza povišena u hipokampusu mužjaka tretiranih LPS-om (Munhoz i sar., 2010).

Dalje, iako je pokazano da fosforilisana p38 kinaza može da dovede do fosforilacije GR-a na Ser232 (Ismaili i Garabedian, 2004), u ovoj studiji nismo uočili vezu između promena u nivou i fosforilaciji p38 kinaze i promena u nivou pGR-232 u hipokampusu nakon tretmana LPS-om. Ova neusaglašenost bi mogla da bude objašnjena studijama koje su pokazale da Ser232 možda i nije primarna meta ove kinase (Newton i sar., 2002). Pored toga, pokazano je da p38 može da bude medijator inhibitornih efekata citokina na nekoliko nivoa signalnog puta GR-a (Kam i sar., 1993). To bi značilo da povišena fosforilacija p38 kinaze u ovoj moždanoj strukturi više doprinosi inhibiciji nego stimulaciji aktivnosti GR-a, što bi bilo u saglasnosti sa rezultatima genske ekspresije, o čemu će biti više reči u narednim pasusima.

Kada je u pitanju CDK5, uočene polne razlike u nivou ove kinaze i njenih regulatora bi takođe mogle da budu posledica negenomskih efekata polnih hormona. Naime, pokazano je da postoje polno-specifične razlike u epigenetskoj regulaciji ove kinaze u odgovoru na stres (Sase i sar., 2018). Dalje, iako je u jedru hipokampusa mužjaka LPS doveo do smanjenja nivoa CDK5, to smanjenje nije bilo praćeno promenama u fosforilaciji GR-a na Ser232, što bi moglo ukazati na to da je aktivnost ove kinaze očuvana. I zaista, pokazano je da bi očuvanju aktivnosti ove kinaze mogla da doprinese fosforilacija; tačnije, pokazano je da inflamacije može da dovede do fosforilacije CDK5 na S159, i da na taj način poveća njenu aktivnost (Zhang i sar., 2014).

U cilju kvantitativnog poređenja stepena fosforilacije GR-a na Ser232 i Ser246, određen je relativni odnos analiziranih fosfoformi GR-a (pGR-232/pGR-246). Vrednosti ovog odnosa koje su iznad 100% pokazuju dominantnost fosforilacije GR-a na Ser232, dok vrednosti ispod 100%, pokazuju dominantnost fosforilacije GR-a na Ser246. Ovakva analiza je pokazala da, iako su jedarni nivoi obe fosfo-forme bili povišeni u PFC-u mužjaka, GR je bio više fosforilisan na Ser246 nego na Ser232. Uzimajući u obzir studije koje su pokazale da fosforilacija GR-a na Ser246 utišava signaling GR-a, kao i da je transkripciona aktivnost GR-a najveća kada fosforilacija na Ser232 premašuje fosforilaciju na Ser246 (Itoh i sar., 2002), ovi rezultati ukazuju da bi transkripciona aktivnost GR-a u PFC-u mužjaka mogla

da bude utišana pri imunskom odgovoru. Kada je u pitanju hipokampus, odnos pGR-232/pGR-246 je bio smanjen kod ženki i povećan kod mužjaka nakon tretmana LPS-om, što ukazuje na to da bi transkripciona aktivnost GR-a mogla da bude smanjena kod ženki i povišena kod mužjaka u ovom tkivu nakon imunske aktivacije.

5.2.3. Uticaj LPS-a na ekspresiju jedarnih gena regulisanih GR-om

U cilju ispitivanja efekata LPS-a na transkripcionu aktivnost GR-a, tačnije njegovih fosfoformi pGR-232 i pGR-246, merena je ekspresija nekoliko gena koji su regulisani ovim receptorom, i koji se smatraju biomarkerima glavnih signalnih puteva ključnih u regulaciji odgovora na stres. U te gene spadaju gen za GR, koji je autoregulisan i uključen u regulaciju aktivnosti HPA ose, BDNF, koji učestvuje u modulaciji sinaptičke plastičnosti, p11, koji je uključen u serotoninsku neurotransmisiju, i COX-2, koji je ključan za sintezu prostaglandina i učestvuje u inflamatornom odgovoru. Rezultati ove studije su pokazali da je povećanje nivoa ukupnog GR-a u jedru PFC-a mužjaka i hipokampusa ženki nakon tretmana LPS-om bilo praćeno smanjenjem odnosa pGR-232/pGR-246, što bi moglo da bude odgovorno za uočene padove u nivoima iRNK gena za BDNF i COX-2. Sa druge strane, u hipokampusu mužjaka veza između odnosa pGR-232/pGR-246 i nivoa iRNK nije uočena, što bi moglo da bude posledica smanjenog nivoa ukupnog GR-a. Za razliku od efekata LPS-a na nivoe BDNF i COX-2 iRNK, njegovi efekti na nivoe iRNK p11 i GR-a nisu bili polno specifični; tačnije, LPS nije uticao na ekspresiju gena za p11 i GR u PFC-u, dok je smanjio ekspresiju ovih gena u hipokampusu oba pola.

Pad u nivou BDNF iRNK usled sedmodnevnog tretmana LPS-om je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su pokazale da inflamatorni citokini i LPS mogu da poremete signalni put BDNF-a u raznim moždanim strukturama (Cortese i sar., 2011). Kao što je već pomenuto, BDNF igra centralnu ulogu u neurotrofnoj hipotezi depresije, prema kojoj smanjenje u neurotrofnoj podršci izazvano stresom dovodi do degeneracije limbičkih struktura, pre svega hipokampusa, ali i PFC-a. Stoga, smanjenje nivoa BDNF iRNK može da ukaže na

smanjenu neuroplastičnost PFC-a mužjaka i hipokampusa ženki, što na kraju može da doprinese nastanku ponašanja nalik depresivnom. Pored toga, depresivnom ponašanju kod ženki mogu da doprinesu i narušeni neuroplastični procesi u hipotalamusu, koji su takođe uočeni nakon sedmodnevnog tretmana LPS-om (Adzic i sar., 2015). Ovi polno-specifični efekti LPS-a na ekspresiju BDNF-a uočeni u analiziranim moždanim strukturama bi mogli biti posledica modulatornih efekata polnih hormona na ekspresiju BDNF gena (Hill i sar., 2012).

Smanjeni nivoi iRNK COX-2 gena uočeni u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki su u suprotnosti sa studijama koje su pokazale da LPS dovodi do povećanja COX-2 i nastanka depresivnog ponašanja (Arias-Negrete i sar., 1995), kao i da inhibicija ovog enzima poništava depresivno ponašanje (Teeling i sar., 2010). Smanjen nivo COX-2 iRNK uočen u ovoj studiji bi mogao da bude rezultat uzajamnog dejstva citokina i glukokortikoida uključenih i njegovu regulaciju. Naime, pokazano je da povišen nivo DEX-a, u kombinaciji sa povišenim nivoom IL-1 β , može da utiša COX-2, kao i oslobađanje prostaglandina E₂, na transkripcionom i post-transkripcionom nivou (Newton i sar., 1998). Međutim, krajnji efekat smanjene ekspresije gena za COX-2 nije poznat, jer je pokazano je da ovaj pad, pored utišavanja neuroinflamacije, može da dovede i do smanjene hipokampalne neurogeneze (Goncalves i sar., 2010).

Kada je u pitanju p11, dosadašnje studije su pokazale oprečne rezultate kada je u pitanju uticaj citokina na nivoe njegove iRNK – dok su neke studije, poput ove, pokazale da citokini mogu da smanje nivoe iRNK ovog gena (Guo i sar., 2016), druge su pokazale suprotno (Warner-Schmidt i sar., 2011). Kako p11 funkcioniše kao modulator serotoninske signalne transdukcije, i kako interakcija između p11 i GR-a igra značajnu ulogu u patofiziologiji depresivnih stanja (Svenningsson i sar., 2006), smanjeni nivoi iRNK ovog gena uočeni u hipokampusu oba pola bi mogli da doprinesu depresivnom ponašanju uočenom kod oba pola. Takođe, rezultati ove studije ukazuju na to da inflamacija može da doprinese smanjenju p11 iRNK kod oba pola, ali na različite načine – tačnije, kod ženki smanjenjem transkripcione aktivnosti GR-a zavisne od fosforilacije, a kod mužjaka smanjenjam ukupnog nivoa receptora. Sa druge strane, moguće je da u PFC-u ovi procesi nisu narušeni ni kod

mužjaka ni kod ženki nakon tretmana LPS-om, sudeći po nepromenjenim nivoima iRNK ovog gena.

Kada je u pitanju smanjena ekspresije gena za GR u hipokampusu, kod ženki bi ona mogla da bude posledica povišenog nivoa jedarnog GR-a, koji može da utiša sopstvenu ekspresiju na nekoliko nivoa (Duma i sar., 2006; Meyer i sar., 1995). Takođe, određena uloga u ovom procesu bi mogla da se pripíše FKBP4. Naime, kao što je već pomenuto, ovaj protein je gen-specifičan modulator transkripcione aktivnosti GR-a, a u ovoj studiji je uočen povišen nivo ovog imunofilina u jedru hipokampusa ženki. Stoga je moguće da FKBP4 može da pomogne GR-u da prevaziđe inhibitorne efekte fosforilacije na pGR-246 i da smanji nivo iRNK GR-a. Međutim, nije poznato da li je FKBP4 zaista negativni modulator transkripcije gena za GR, kao ni da li je uopšte modulator ekspresije ovog receptora. Sa druge strane, smanjenje iRNK ovog gena uočeno u jedru mužjaka bi moglo da bude posledica porasta pGR-232/pGR-246 odnosa, i posledičnog porasta transkripcione aktivnosti GR-a zavisne od fosforilacije. Kada je u pitanju ekspresija ovog gena u PFC-u, rezultati ove studije dodatno potvrđuju da je glukokortikoidna signalizacija u ovoj moždanoj strukturi kod ženki neosetljiva na tretman LPS-om i povišen nivo serumskog kortikosterona, i da u PFC-u mužjaka LPS utiče na GR samo na negenomskom nivou.

Dakle, promene uočene u glukokortikoidnoj signalizaciji bi mogle da utiču na procese uključene u nastanak depresije na tkivno- i polno- specifičan način. Kod mužjaka, poremećaji u glukokortikoidnoj signalizaciji bi mogli da utiču na smanjenu neuroplastičnost i neuroinflamaciju u PFC-u, dok bi u hipokampusu mogli da poremete serotoninsku neurotransmisiju i utiču na neuroendokrine procese. Kada su u pitanju ženke, rezultati ove studije pokazuju da je LPS poremetio glukokortikoidnu signalizaciju samo u hipokampusu, gde je doveo do smanjene transkripcije gena uključenih u neuroinflamaciju, neuroendokrinu funkciju, neurogenezu i neuroplastičnost. Sa druge strane, glukokortikoidna signalizacija u PFC-u ženki izgleda da nije podložna štetnim efektima inflamacije.

5.3. UTICAJ LPS-A NA FOSFORILACIJU GR-A U MITOHONDRIJAMA I APOPTOTSKE PROCESSE

Kao što je pomenuto u odeljku 1.4, veliki broj studija je pokazao da bi mitohondrije mogle da igraju ključnu ulogu u narušenoj plastičnosti u depresiji, i da bi značajnu ulogu u nastanku mitohondrijske disfunkcije mogao da ima povišeni nivo serumskog kortikosterona. Pokazano je da GR može da utiče na funkcionisanje mitohondrija, kako regulacijom mitohondrijskih gena kodiranih jedarnom DNK, tako i translokacijom GR-a u mitohondrije i regulacijom ekspresije mitohondrijskih gena. Na ovaj način GR može da utiče na procese regulisane ovim organelama, poput apoptoze i oksidativne fosforilacije. Pored toga, GR može da reguliše apoptozu i putem translokacije u mitohondrije i asocijacije sa proteinima BCL-2 familije, koji su ključni u regulaciji ovog procesa.

Kako bi se utvrdio efekat LPS-a na funkciju mitohondrija i uloga mitohondrijskog GR-a u sprovođenju efekata inflamacije na ove organele, u ovoj disertaciji su praćene i promene u nivou i fosforilaciju mitohondrijskog GR-a, kao i efekat ovih promena na apoptozu i oksidativnu fosforilaciju.

5.3.1. Uticaj LPS-a na translokaciju i isecanje kaspaza

Efekat LPS-a na apoptozu je bio polno-nespecifičan i tkivno-specifičan. Naime, u PFC-u, LPS je kod oba pola izazvao apoptozu, sudeći po promenama u nivoima isečenog PARP-1 proteina u citosolu, kao i po promenama u nivou isečenih kaspaza. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nekoliko drugih studija koje su pokazale da LPS može da izazove apoptozu u različitim tipovima moždanih ćelija (Cunningham i sar., 2005; Choi i sar., 2007), i da apoptoza u ovim ćelijama može da bude indukovana oslobađanjem mitohondrijskih medijatora uključenih u proces apoptoze (Yao i sar., 2012; Arsenijevic i sar., 2007). Sa druge strane, promene uočene u nivoima ovih proteina u hipokampusu pokazuju da LPS ni kod mužjaka ni kod ženki nije doveo da apoptoze u ovom moždanom tkivu, i ovi rezultati su u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da se u nekim tipovima ćelija nakon tretmana LPS-om aktiviraju mehanizmi koji štite ove ćelije od apoptoze (Wang i sar., 2009; Sweeney i sar., 1998; Huang i sar., 2019).

U PFC-u ženki, LPS je doveo do translokacije svih analiziranih prokaspaza i isečenih formi kaspaze-9 i -3 iz mitohondrija u citosol, i do povećanja nivoa kaspaze-8 i isečene forme PARP-1 proteina u citosolu. Različite studije su povezale translokaciju prokaspaza i/ili njihovih isečenih formi iz mitohondrija u citosol sa gubitkom funkcije mitohondrijske membrane tokom oštećenja neurona i posledičnom apoptozom (Vaux, 2011; Qin i sar., 2001). Ovi događaji su verovatno direktna posledica inflamacije izazvane LPS-om, jer je pokazano da oslobađanje proinflamatornih citokina može da izazove aktivaciju receptora smrti i kaspaze-8, što dovodi do apoptoze (Haase i sar., 2008). Sa druge strane, u PFC-u mužjaka su uočene promene samo u unutrašnjem apoptotskom putu, i ove promene su bile praćene povišenim nivoom isečene kaspaze-9 i isecanjem PARP-1 proteina u citosolu. Nepromenjeni nivoi prekursorske i isečene kaspaze-8 u oba analizirana ćelijska odeljka ukazuju na to da spoljašnji apoptotski put u PFC-u mužjaka nije aktiviran LPS-om. Ovaj izostanak promena u nivoima prekursorske i isečene forme kaspaze-8 nakon tretmana LPS-om bi mogao da bude posledica povišenog nivoa serumskog kortikosterona koji je takođe uočen kod ovih životinja, i za koji je pokazano da može da inhibira FasL signalni put i inicijaciju spoljašnjeg apoptotskog puta u nekim ćelijama (D'Adamio i sar., 1997).

Kada je u pitanju hipokampus, jedina promena uočena kod ženki nakon tretmana LPS-om jeste povišenje nivoa prokaspaze-8 u oba analizirana odeljka. Međutim, kako je za aktiviranje spoljašnjeg apoptotskog puta potrebno isecanje kaspaze-8, ove promene nisu izazvale apoptozu. Uočena neaktivnost spoljašnjeg apoptotskog puta bi mogla, kao što je već pomenuto, da bude posledica povišenog nivoa serumskog kortikosterona. Sa druge strane, izostanak promena u unutrašnjem apoptotskom putu kod ovog pola bi se mogao objasniti promenama uočenim u nivoima analiziranih proteina BCL-2 familije, o čemu će biti više reči u narednom odeljku. Kada su u pitanju mužjaci, LPS je doveo do nagomilavanja prokaspaze-8 u mitohondrijama, kao i do pada nivoa isečene kaspaze-3 i posledičnog smanjenog isecanja PARP-1 proteina u citosolu. Smanjeni nivo isečene kaspaze-3 je već uočen nakon tretmana LPS-om, i mogao bi da bude mehanizam odbrane ćelija hipokampusa od apoptoze izazvane LPS-om (Newton i sar., 2002).

5.3.2. Uticaj LPS-a na proteine BCL-2 familije

Efekti LPS-a na nivoe i distribuciju analiziranih proteina BCL-2 familije su bili polno- i tkivno-specifični. Naime, u PFC-u ženki, tretman je izazvao znake apoptoze podižući citosolne i mitohondrijske nivoe obe analizirane forme BID-a, dok bi povišenje nivoa BCL-2 proteina uočeno u mitohondrijama mužjaka moglo da ublaži štetne efekte LPS-a na apoptotske signalne puteve u mitohondrijama. Sa druge strane, odsustvo znakova apoptoze u hipokampusu ženki bi moglo da bude posledica translokacije BCL-2 proteina u mitohondrije i pada BAX-a u citosolu i prekursorske forme BID-a u oba odeljka. Međutim, podaci vezani za efekte LPS-a na članove BCL-2 porodice proteina su oskudni. Prema našem saznanju, do sada postoji samo jedna studija, sprovedena na ćelijama karcinoma, koja je pokazala da je apoptoza izazvana LPS-om posredovana povišenom ekspresijom BAX-a, ali bez promena u nivoima BCL-2 proteina (Sharifi i sar., 2010).

Promene u nivoima proteina BCL-2 porodice su bile asocirane sa znacima apoptoze samo u PFC-u ženki, gde je LPS doveo do povišenog nivoa i prekursorske i isečene forme BID-a. Već je pokazano da je ovaj protein neophodan za apoptozu izazvanu receptorima smrti u brojnim tipovima ćelija, kao i da povezuje signale ovih receptora sa mitohondrijskim apoptotskim putem (Luo i sar., 1998). Takođe, ovi rezultati su pokazali da u PFC-u ovih životinja apoptoza može biti indukovana samo BID-om, bez uticaja BAX-a, što je pokazano i ranije (Brunelle i Letai, 2009).

Sa druge strane, promene u nivoima ovih proteina detektovane u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki bi mogle da doprinesu zaštiti mitohondrija od štetnih efekata inflamacije. Naime, u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki je uočena translokacija citoprotektivnog BCL-2 proteina iz citosola u mitohondrije. Već je pokazano da ovaj protein može da zaštiti mitohondrije tako što funkcioniše kao antagonista proapoptotskim proteinima, poput BAX-a, BAK-a i BID-a nakon njihove aktivacije minociklinom (Wang i sar., 2004a). Relokacija BCL-2 proteina u mitohondrije je u PFC-u mužjaka bila praćena smanjenim nivoom BAX-a u oba analizirana ćelijska odeljka i zadržavanjem isečenog BID-a, kao i smanjenim nivoom BAX-a u citosolu i BID-a u oba odeljaka u hipokampusu ženki, što dodatno može da zaštiti mitohondrije od štetnog efekta LPS-a. Sličan antiapoptotski efekat

proteina BCL-2 porodice je već opisan nakon tretmana glukokortikoidima u ćelijama karcinoma i primarnim hepatocitima (Sasson i Amsterdam, 2003; Sasson i sar., 2001).

5.3.3. Uticaj LPS-a na nivoe GR-a u mitohondrijama

Smanjeni nivoi mitohondrijskog GR-a detektovani u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki bi mogli da doprinesu ublažavanju štetnih efekata LPS-a na mitohondrijske signalne puteve. Naime, pokazano je da osetljivost određenog ćelijskog tipa na apoptozu indukovanu glukokortikoidima korelira sa translokacijom GR-a u mitohondrije (Sionov i sar., 2006b). Iako je jedna studija pokazala da GR može da formira kompleks sa proteinom BCL-2 i da se na taj način translocira u mitohondrije (Du i sar., 2009), u ovoj studiji promene u nivoima GR-a nisu bile praćene promenama u nivoima BCL-2 proteina ni u PFC-u mužjaka, ni u hipokampusu ženki. Ova neusaglašenost ukazuje na to da neki dodatni mehanizmi mogu da utiču na formiranje GR/BCL-2 kompleksa. Na primer, pokazano je da je neophodna fosforilacija BCL-2 proteina za formiranje kompleksa sa GR-om, kao i da fosforilaciju ovog proteina mogu da izvrše MAPK (Maundrell i sar., 1997).

Dalje, nivoi GR-a u mitohondrijama oba tkiva nisu bili asocirani sa povišenim nivoom serumskog kortikosterona uočenom u ovoj studiji. Ovi rezultati su u suprotnosti sa studijom koja je pokazala da su povišeni nivoi serumskog kortikosterona povezani sa translokacijom GR-a u mitohondrije, mitohondrijskom disfunkcijom i apoptozom (Sionov i sar., 2006a). Ova neusaglašenost se može objasniti time što ovaj proces u velikoj meri zavisi od trajanja tretmana i/ili nivoa kortikosterona (Du i sar., 2009). Ranija studija sprovedena u našoj laboratoriji je takođe pokazala slično odsustvo asocijacije mitohondrijske akumulacije GR-a u PFC-u ženki pacova i nivoa serumskog kortikosterona nakon izlaganja životinja hroničnom stresu (Adzic i sar., 2013).

Pored toga, smanjeni nivo mitohondrijskog GR-a u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki je u oba slučaja bio praćen njegovim povišenim nivoom u jedru, što ukazuje na to da je u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki LPS doveo do redistribucije GR-a iz mitohondrija u jedro. U jedru, GR bi i dalje mogao da utiče na

mitohondrijski apoptotski put modulacijom ekspresije različitih jedarnih gena uključenih u regulaciju ovog signalnog puta, poput BCL-2 (Rogatsky i sar., 1999).

5.3.4. Uticaj LPS-a na fosforilaciju mitohondrijskog GR-a i ekspresiju gena regulisanih ovim receptorom

Padovi u nivoima mitohondrijskog GR-a u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki su bili praćeni promenama u fosforilaciji ovog receptora, kao i u njegovoj transkripcionoj aktivnosti. U PFC-u, smanjenje nivoa mitohondrijskog GR-a je bilo praćeno smanjenjem nivoa inhibitorne fosfoforme GR-a, pGR-246, i povećanjem odnosa GR-S232/GR-S246, i ove promene u fosforilaciji su bile praćene povišenim nivoima COX-1 i COX-3 iRNK kod mužjaka. Ovi rezultati ukazuju na to da je preostala količina receptora transkripciono više aktivna kod mužjaka tretiranih LPS-om u poređenju sa kontrolnim mužjacima, i sugerišu da bi transkripciona aktivnost GR-a u PFC-u mužjaka mogla da zavisi više od nivoa njegove fosforilacije, nego od nivoa ukupnog GR-a. Ovaj nalaz može da se objasni time što se kinetika regrutovanja ukupnog GR-a i njegovih fosfoformi pGR-232 i pGR-246 na GRE razlikuje između gena. Tačnije, pokazano je da su geni koji su kontrolisani sa manje GRE više zavisni od fosforilacija, dok su geni kontrolisani sa više GRE manje zavisni od fosforilacija (Blind i Garabedian, 2008). Kako su u okviru gena za COX-1 subjedinicu uočena tri putativna GRE, a u okviru gena za COX-3 subjedinicu jedan (Sekeris, 1990), rezultati ove studije pokazuju da, iako je LPS uticao i na ukupan nivo GR-a i na njegovu fosforilaciju u mitohondrijama PFC-a mužjaka, transkripciona regulacija receptora u ovom slučaju izgleda da je više bila zavisna od fosforilacija. Sa druge strane, pad u nivou mitohondrijskog GR-a uočeni u hipokampusu ženki je bio praćen smanjenom fosforilacijom ovog receptora na Ser232, kao i smanjenim nivoom COX-1 i COX-3 iRNK.

Promene u ekspresiji COX-1 i COX-3 subjedinica ukazuju na to da bi LPS mogao da utiče na oksidativni kapacitet mitohondrija u PFC-u mužjaka i hipokampusu ženki na suprotan, ali i potencijalno negativan način (Liang i sar., 2006). Naime, u PFC-u mužjaka, LPS bi mogao da poveća aktivnost citohrom c oksidaze, indukuje hiperpolarizaciju mitohondrijske membrane i oslobađanje ROS-a, dovodeći tako do apoptoze (O'Reilly i sar., 2009). Međutim, uzimajući u obzir

rezultate ove studije vezane za nivoe ukupnog GR-a i proteina BCL-2 porodice, moguće je da efekat povišenog nivoa iRNK ove dve subjedinice i nije toliko drastičan. Naime, povišen nivo COX-1 i COX-3 iRNK može da bude povezan sa povišenom aktivnošću citohrom C oksidaze, koja je asocirana sa većim energetske potrebama ovog tkiva u odgovoru na stress (Liang i sar., 2006). Sa druge strane, smanjeni nivoi iRNK ove dve subjedinice uočeni u hipokampusu ženki bi mogli da dovedu do smanjene aktivnosti citohrom C oksidaze, što bi moglo da naruši potencijal mitohondrijske membrane i da dovede do ćelijske smrti usled smanjene produkcije energije (Huttemann i sar., 2012). Međutim, uzimajući u obzir to što nisu uočene promene u nivoima isečenih formi kaspaza, kao ni promene u nivoima isečenog PARP-1 proteina kod ženki, efekat smanjenog nivoa COX-1 i COX-3 iRNK ni kod ovog pola verovatno nije toliko dramatičan, i takođe oslikava neki vid adaptacije ćelije. U svakom slučaju, promene u oksidativnom metabolizmu i/ili signalizaciji koja vodi u apoptozu bi mogle da poremete neuralnu plastičnost, i na kraju da dovedu do promena u ponašanju koje su uočene u ovoj studiji.

Dakle, LPS je imao polno-nespecifičan i tkivno- specifičan efekat na procese koji dovode do apoptoze u PFC-u i hipokampusu životinja oba pola – tačnije, doveo je do inicijacije apoptoze samo u PFC-u oba pola, pri čemu izgleda da je kod mužjaka taj efekat bio blaži. Snižen nivo GR-a i povišen nivo BCL-2 bi mogli imati značajnu ulogu u ublažavanju, odnosno sprečavanju štetnih efekata inflamacije na mitohondrijske signalne puteve koji su uočeni u mitohondrijama PFC-a mužjaka, odnosno hipokampusa ženki tretiranih LPS-om.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije su po prvi put pokazali da bi značajnu ulogu u posredovanju polno-specifičnih efekata inflamacije na mehanizme koji dovode do nastanka depresije mogao da ima GR, tačnije njegove fosfoforme, kako u jedru, tako i u mitohondrijama. Ovi rezultati bi mogli da doprinesu boljem razumevanju patofizioloških mehanizama koji povezuju inflamaciju i depresiju, što bi na kraju moglo da doprinese razvoju efektivnije terapije. Ukratko, zaključci ove disertacije su sledeći:

- I** Iako je tretman LPS-om doveo do nastanka depresivnog ponašanja i stimulisao aktivnost HPA ose kod životinja oba pola, njegov efekat na procese uključene u nastanak depresivnog ponašanja i regulisane GR-om je bio polno specifičan.
- II** Kod mužjaka, poremećaji u glukokortikoidnoj signalizaciji nastali usled tretmana LPS-om su bili praćeni različitim promenama u analiziranim moždanim strukturama - u PFC-u su bili praćeni promenama koje ukazuju na smanjenu neuroplastičnost i neuroinflamaciju, i povišenu oksidativnu fosforilaciju, dok su u hipokampusu bili praćeni poremećajima u serotoninskoj neurotransmisiji i narušenim neuroendokrinim procesima.
- III** Kod ženki, LPS je poremetio glukokortikoidnu signalizaciju samo u hipokampusu, gde je doveo do smanjene transkripcije gena uključenih u neuroinflamaciju, neuroendokrinu funkciju, neurogenezu i neuroplastičnost, kao i do smanjene transkripcije gena uključenih u oksidativnu fosforilaciju.
- IV** Efekat LPS-a na apoptotske procese je bio polno-nespecifičan i tkivno-specifičan - doveo je do aktiviranja apoptotskih procesa kod oba pola samo u PFC-u, s tim što je taj efekat bio blaži kod mužjaka.
- V** Ublaženi efekat LPS-a na apoptozu u PFC-u mužjaka, odnosno sprečena apoptoza u hipokampusu ženki, su bili praćeni smanjenim nivoima mitohondrijskog GR-a i povišenim nivoima BCL-2 proteina.

7. LITERATURA

- ADZIC, M., BRKIC, Z., BULAJIC, S., MITIC, M. & RADOJCIC, M. B. 2016. Antidepressant Action on Mitochondrial Dysfunction in Psychiatric Disorders. *Drug Dev Res*, 77, 400-406.
- ADZIC, M., BRKIC, Z., MITIC, M., FRANCIJA, E., JOVICIC, M. J., RADULOVIC, J. & MARIC, N. P. 2018. Therapeutic Strategies for Treatment of Inflammation-related Depression. *Curr Neuropharmacol*, 16, 176-209.
- ADZIC, M., DJORDJEVIC, J., DJORDJEVIC, A., NICIFOROVIC, A., DEMONACOS, C., RADOJCIC, M. & KRSTIC-DEMONACOS, M. 2009. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol*, 202, 87-97.
- ADZIC, M., DJORDJEVIC, J., MITIC, M., BRKIC, Z., LUKIC, I. & RADOJCIC, M. 2015. The contribution of hypothalamic neuroendocrine, neuroplastic and neuroinflammatory processes to lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in female and male rats: Involvement of glucocorticoid receptor and C/EBP-beta. *Behav Brain Res*, 291, 130-139.
- ADZIC, M., LUKIC, I., MITIC, M., DJORDJEVIC, J., ELAKOVIC, I., DJORDJEVIC, A., KRSTIC-DEMONACOS, M., MATIC, G. & RADOJCIC, M. 2013. Brain region- and sex-specific modulation of mitochondrial glucocorticoid receptor phosphorylation in fluoxetine treated stressed rats: effects on energy metabolism. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 2914-24.
- AHMED, S. A., HISSONG, B. D., VERTHELYI, D., DONNER, K., BECKER, K. & KARPUZOGLU-SAHIN, E. 1999. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 5, 681-6.
- AHOKAS, A., KAUKORANTA, J., WAHLBECK, K. & AITO, M. 2001. Estrogen deficiency in severe postpartum depression: successful treatment with sublingual physiologic 17beta-estradiol: a preliminary study. *J Clin Psychiatry*, 62, 332-6.
- ALESCI, S., MARTINEZ, P. E., KELKAR, S., ILIAS, I., RONSAVILLE, D. S., LISTWAK, S. J., AYALA, A. R., LICINIO, J., GOLD, H. K., KLING, M. A., CHROUSOS, G. P. & GOLD, P. W. 2005. Major depression is associated with significant diurnal elevations in plasma interleukin-6 levels, a shift of its circadian rhythm, and loss of physiological complexity in its secretion: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2522-30.
- ALMAWI, W. Y., MELEMEDJIAN, O. K. & JAOUDE, M. M. 2004. On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis. *J Leukoc Biol*, 76, 7-14.

- ANACKER, C., ZUNSZAIN, P. A., CARVALHO, L. A. & PARIANTE, C. M. 2011. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36, 415-25.
- ANDRE, C., O'CONNOR, J. C., KELLEY, K. W., LESTAGE, J., DANTZER, R. & CASTANON, N. 2008. Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol*, 200, 90-9.
- ANISMAN, H., MERALI, Z. & HAYLEY, S. 2008. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 85, 1-74.
- ARIAS-NEGRETE, S., KELLER, K. & CHADEE, K. 1995. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 208, 582-9.
- ARSENIJEVIC, D., HERNADFALVI, N., VON MEYENBURG, C., ONTENIENTE, B., RICHARD, D. & LANGHANS, W. 2007. Role for nerve growth factor in the in vivo regulation of glutathione in response to LPS in mice. *Eur Cytokine Netw*, 18, 93-101.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- ASHWELL, J. D., LU, F. W. & VACCHIO, M. S. 2000. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol*, 18, 309-45.
- BACHMANN, S. 2018. Epidemiology of Suicide and the Psychiatric Perspective. *Int J Environ Res Public Health*, 15.
- BANKS, W. A. 2005. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des*, 11, 973-84.
- BAO, A. M., MEYNEN, G. & SWAAB, D. F. 2008. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev*, 57, 531-53.
- BARRIENTOS, R. M., SPRUNGER, D. B., CAMPEAU, S., HIGGINS, E. A., WATKINS, L. R., RUDY, J. W. & MAIER, S. F. 2003. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience*, 121, 847-53.
- BARSEGYAN, A., MACKENZIE, S. M., KUROSE, B. D., MCGAUGH, J. L. & ROOZENDAAL, B. 2010. Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 16655-60.

- BAY-RICHTER, C., JANELIDZE, S., HALLBERG, L. & BRUNDIN, L. 2011. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. *Behav Brain Res*, 222, 193-9.
- BEATO, M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56, 335-44.
- BEGER, C., GERDES, K., LAUTEN, M., TISSING, W. J., FERNANDEZ-MUNOZ, I., SCHRAPPE, M. & WELTE, K. 2003. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol*, 122, 245-52.
- BEI, E., SALPEAS, V., PAPPA, D., ANAGNOSTARA, C., ALEVIZOS, V. & MOUTSATSOU, P. 2009. Phosphorylation status of glucocorticoid receptor, heat shock protein 70, cytochrome c and Bax in lymphocytes of euthymic, depressed and manic bipolar patients. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 1162-75.
- BEKKER, M. H. & VAN MENS-VERHULST, J. 2007. Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. *Gen Med*, 4 Suppl B, S178-93.
- BELMAKER, R. H. & AGAM, G. 2008. Major depressive disorder. *N Engl J Med*, 358, 55-68.
- BEN MENACHEM-ZIDON, O., GOSHEN, I., KREISEL, T., BEN MENAHEM, Y., REINHARTZ, E., BEN HUR, T. & YIRMIYA, R. 2008. Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-induced impairment in memory and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 33, 2251-62.
- BERKENBOSCH, F., VAN OERS, J., DEL REY, A., TILDERS, F. & BESEDOVSKY, H. 1987. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*, 238, 524-6.
- BESEDOVSKY, H. O. & DEL REY, A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17, 64-102.
- BIERHAUS, A., WOLF, J., ANDRASSY, M., ROHLEDER, N., HUMPERT, P. M., PETROV, D., FERSTL, R., VON EYNATTEN, M., WENDT, T., RUDOFISKY, G., JOSWIG, M., MORCOS, M., SCHWANINGER, M., MCEWEN, B., KIRSCHBAUM, C. & NAWROTH, P. P. 2003. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1920-5.
- BIOLA, A., LEFEBVRE, P., PERRIN-WOLFF, M., STURM, M., BERTOGLIO, J. & PALLARDY, M. 2001. Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity

- through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol*, 15, 1062-76.
- BLEDSON, R. K., MONTANA, V. G., STANLEY, T. B., DELVES, C. J., APOLITO, C. J., MCKEE, D. D., CONSLER, T. G., PARKS, D. J., STEWART, E. L., WILLSON, T. M., LAMBERT, M. H., MOORE, J. T., PEARCE, K. H. & XU, H. E. 2002. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*, 110, 93-105.
- BLIND, R. D. & GARABEDIAN, M. J. 2008. Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 109, 150-7.
- BODE, L., DURRWALD, R., RANTAM, F. A., FERSZT, R. & LUDWIG, H. 1996. First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Mol Psychiatry*, 1, 200-12.
- BONACCORSO, S., PUZELLA, A., MARINO, V., PASQUINI, M., BIONDI, M., ARTINI, M., ALMERIGHI, C., LEVRERO, M., EGYED, B., BOSMANS, E., MELTZER, H. Y. & MAES, M. 2001. Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. *Psychiatry Res*, 105, 45-55.
- BORROW, A. P. & CAMERON, N. M. 2014. Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: implications for female mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 54, 13-25.
- BORSINI, A., ZUNSZAIN, P. A., THURET, S. & PARIANTE, C. M. 2015. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci*, 38, 145-57.
- BOSTWICK, J. M. & PANKRATZ, V. S. 2000. Affective disorders and suicide risk: a reexamination. *Am J Psychiatry*, 157, 1925-32.
- BOUILLET, P., METCALF, D., HUANG, D. C., TARLINTON, D. M., KAY, T. W., KONTGEN, F., ADAMS, J. M. & STRASSER, A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286, 1735-8.
- BOYLE, M. P., BREWER, J. A., FUNATSU, M., WOZNIAK, D. F., TSIEN, J. Z., IZUMI, Y. & MUGLIA, L. J. 2005. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 473-8.

- BRKIC, Z., PETROVIC, Z., FRANIC, D., MITIC, M. & ADZIC, M. 2016. Male-specific effects of lipopolysaccharide on glucocorticoid receptor nuclear translocation in the prefrontal cortex of depressive rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 233, 3315-30.
- BROWN, C. S. 2001. Depression and anxiety disorders. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 28, 241-68.
- BRUNELLE, J. K. & LETAI, A. 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*, 122, 437-41.
- BRUNONI, A. R., LOPES, M. & FREGNI, F. 2008. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11, 1169-80.
- CALFA, G., KADEMIAN, S., CESCHIN, D., VEGA, G., RABINOVICH, G. A. & VOLOSIN, M. 2003. Characterization and functional significance of glucocorticoid receptors in patients with major depression: modulation by antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology*, 28, 687-701.
- CANNON, J. G. & ST PIERRE, B. A. 1997. Gender differences in host defense mechanisms. *J Psychiatr Res*, 31, 99-113.
- CAPURON, L., GUMNICK, J. F., MUSSELMAN, D. L., LAWSON, D. H., REEMSNYDER, A., NEMEROFF, C. B. & MILLER, A. H. 2002a. Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology*, 26, 643-52.
- CAPURON, L., HAUSER, P., HINZE-SELCH, D., MILLER, A. H. & NEVEU, P. J. 2002b. Treatment of cytokine-induced depression. *Brain Behav Immun*, 16, 575-80.
- CAPURON, L., PAGNONI, G., DRAKE, D. F., WOOLWINE, B. J., SPIVEY, J. R., CROWE, R. J., VOTAW, J. R., GOODMAN, M. M. & MILLER, A. H. 2012. Dopaminergic mechanisms of reduced basal ganglia responses to hedonic reward during interferon alfa administration. *Arch Gen Psychiatry*, 69, 1044-53.
- CARRIGAN, A., WALTHER, R. F., SALEM, H. A., WU, D., ATLAS, E., LEFEBVRE, Y. A. & HACHE, R. J. 2007. An active nuclear retention signal in the glucocorticoid receptor functions as a strong inducer of transcriptional activation. *J Biol Chem*, 282, 10963-71.
- CARLET, M., JANJETOVIC, K., RAINER, J., SCHMIDT, S., PANZER-GRUMAYER, R., MANN, G., PRELOG, M., MEISTER, B., PLONER, C. & KOFLER, R. 2010. Expression, regulation and function of phosphofructo-kinase/fructose-biphosphatases (PFKFBs) in

- glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *BMC Cancer*, 10, 638.
- CASOLINI, P., CATALANI, A., ZUENA, A. R. & ANGELUCCI, L. 2002. Inhibition of COX-2 reduces the age-dependent increase of hippocampal inflammatory markers, corticosterone secretion, and behavioral impairments in the rat. *J Neurosci Res*, 68, 337-43.
- CASPI, A., SUGDEN, K., MOFFITT, T. E., TAYLOR, A., CRAIG, I. W., HARRINGTON, H., MCCLAY, J., MILL, J., MARTIN, J., BRAITHWAITE, A. & POULTON, R. 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301, 386-9.
- CASTREN, E. 2005. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci*, 6, 241-6.
- CATALDO, A. M., MCPHIE, D. L., LANGE, N. T., PUNZELL, S., ELMILIGY, S., YE, N. Z., FROIMOWITZ, M. P., HASSINGER, L. C., MENESALE, E. B., SARGENT, L. W., LOGAN, D. J., CARPENTER, A. E. & COHEN, B. M. 2010. Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. *Am J Pathol*, 177, 575-85.
- CATTANEO, A., GENNARELLI, M., UHER, R., BREEN, G., FARMER, A., AITCHISON, K. J., CRAIG, I. W., ANACKER, C., ZUNSZTAIN, P. A., MCGUFFIN, P. & PARIANTE, C. M. 2013. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology*, 38, 377-85.
- CAVANAGH, J., PATERSON, C., MCLEAN, J., PIMLOTT, S., MCDONALD, M., PATTERSON, J., WYPER, D. & MCINNES, I. 2010. Tumour necrosis factor blockade mediates altered serotonin transporter availability in rheumatoid arthritis: a clinical, proof-of-concept study. *Ann Rheum Dis*, 69, 1251-2.
- CHEN, B., DOWLATSHAHI, D., MACQUEEN, G. M., WANG, J. F. & YOUNG, L. T. 2001. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, 50, 260-5.
- CHEN, D. Y., BAMBAH-MUKKU, D., POLLONINI, G. & ALBERINI, C. M. 2012. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKIIalpha-BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat Neurosci*, 15, 1707-14.
- CHEN, W., DANG, T., BLIND, R. D., WANG, Z., CAVASOTTO, C. N., HITTELMAN, A. B., ROGATSKY, I., LOGAN, S. K. & GARABEDIAN, M. J. 2008. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol*, 22, 1754-66.

- CHEN, X. H., ZHAO, Y. P., XUE, M., JI, C. B., GAO, C. L., ZHU, J. G., QIN, D. N., KOU, C. Z., QIN, X. H., TONG, M. L. & GUO, X. R. 2010. TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 328, 63-9.
- CHOI, H. B., RYU, J. K., KIM, S. U. & MCLARNON, J. G. 2007. Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J Neurosci*, 27, 4957-68.
- COENEN, M. J., VAN DEN HEUVEL, L. P. & SMEITINK, J. A. 2001. Mitochondrial oxidative phosphorylation system assembly in man: recent achievements. *Curr Opin Neurol*, 14, 777-81.
- CORTESE, G. P., BARRIENTOS, R. M., MAIER, S. F. & PATTERSON, S. L. 2011. Aging and a peripheral immune challenge interact to reduce mature brain-derived neurotrophic factor and activation of TrkB, PLCgamma1, and ERK in hippocampal synaptoneuroosomes. *J Neurosci*, 31, 4274-9.
- CORY, S. & ADAMS, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2, 647-56.
- COYLE, J. T. & DUMAN, R. S. 2003. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron*, 38, 157-60.
- CRUPI, R., CAMBIAGHI, M., SPATZ, L., HEN, R., THORN, M., FRIEDMAN, E., VITA, G. & BATTAGLIA, F. 2010. Reduced adult neurogenesis and altered emotional behaviors in autoimmune-prone B-cell activating factor transgenic mice. *Biol Psychiatry*, 67, 558-66.
- CRYAN, J. F., PAGE, M. E. & LUCKI, I. 2005a. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, 182, 335-44.
- CRYAN, J. F., VALENTINO, R. J. & LUCKI, I. 2005b. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*, 29, 547-69.
- CUNNINGHAM, C., WILCOCKSON, D. C., CAMPION, S., LUNNON, K. & PERRY, V. H. 2005. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*, 25, 9275-84.
- CURTALE, G., RENZI, T. A., DRUFUCA, L., RUBINO, M. & LOCATI, M. 2017. Glucocorticoids downregulate TLR4 signaling activity via its direct targeting by miR-511-5p. *Eur J Immunol*, 47, 2080-2089.

- D'ADAMIO, F., ZOLLO, O., MORACA, R., AYROLDI, E., BRUSCOLI, S., BARTOLI, A., CANNARILE, L., MIGLIORATI, G. & RICCARDI, C. 1997. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*, 7, 803-12.
- DANNER, M., KASL, S. V., ABRAMSON, J. L. & VACCARINO, V. 2003. Association between depression and elevated C-reactive protein. *Psychosom Med*, 65, 347-56.
- DE BOSSCHER, K. & HAEGEMAN, G. 2009. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 23, 281-91.
- DE KLOET, E. R. 1999. Neurobiology of adaptation disorders. *Acta Neuropsychiatr*, 11, 11-4.
- DE KLOET, E. R., VREUGDENHIL, E., OITZL, M. S. & JOELS, M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, 19, 269-301.
- DE LA GARZA, R., 2ND & ASNIS, G. M. 2003. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium attenuates IFN-alpha induced alterations to monoamine turnover in prefrontal cortex and hippocampus. *Brain Res*, 977, 70-9.
- DE KLOET, E. R., JOELS, M. & HOLSBOER, F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6, 463-75.
- DEFRANCO, D. B., QI, M., BORROR, K. C., GARABEDIAN, M. J. & BRAUTIGAN, D. L. 1991. Protein phosphatase types 1 and/or 2A regulate nucleocytoplasmic shuttling of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol*, 5, 1215-28.
- DELGADO, P. L. & MORENO, F. A. 2000. Role of norepinephrine in depression. *J Clin Psychiatry*, 61 Suppl 1, 5-12.
- DEMONACOS, C., DJORDJEVIC-MARKOVIC, R., TSAWDAROGLOU, N. & SEKERIS, C. E. 1995. The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: the interaction of the glucocorticoid receptor with mitochondrial DNA sequences showing partial similarity to the nuclear glucocorticoid responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 55, 43-55.
- DEMONACOS, C. V., KARAYANNI, N., HATZOGLU, E., TSIRIYIOTIS, C., SPANDIDOS, D. A. & SEKERIS, C. E. 1996. Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*, 61, 226-32.
- DENENBERG, V. H. 1969. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci*, 159, 852-9.

- DI, S., MAXSON, M. M., FRANCO, A. & TASKER, J. G. 2009. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. *J Neurosci*, 29, 393-401.
- DI BATTISTA, J. A., ZHANG, M., MARTEL-PELLETIER, J., FERNANDES, J., ALAAEDDINE, N. & PELLETIER, J. P. 1999. Enhancement of phosphorylation and transcriptional activity of the glucocorticoid receptor in human synovial fibroblasts by nimesulide, a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor. *Arthritis Rheum*, 42, 157-66.
- DIAMOND, D. M. & ROSE, G. M. 1994. Stress impairs LTP and hippocampal-dependent memory. *Ann N Y Acad Sci*, 746, 411-4.
- DONG, Y., POELLINGER, L., GUSTAFSSON, J. A. & OKRET, S. 1988. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol*, 2, 1256-64.
- DU, J., WANG, Y., HUNTER, R., WEI, Y., BLUMENTHAL, R., FALKE, C., KHAIROVA, R., ZHOU, R., YUAN, P., MACHADO-VIEIRA, R., MCEWEN, B. S. & MANJI, H. K. 2009. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 3543-8.
- DUMA, D., JEWELL, C. M. & CIDLOWSKI, J. A. 2006. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102, 11-21.
- DUMAN, R. S. & AGHAJANIAN, G. K. 2012. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*, 338, 68-72.
- DUNLOP, B. W. & NEMEROFF, C. B. 2007. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 64, 327-37.
- ELGARF, A. S., ABOUL-FOTOUH, S., ABD-ALKHALEK, H. A., EL TABBAL, M., HASSAN, A. N., KASSIM, S. K., HAMMOUDA, G. A., FARRAG, K. A. & ABDEL-TAWAB, A. M. 2014. Lipopolysaccharide repeated challenge followed by chronic mild stress protocol introduces a combined model of depression in rats: reversibility by imipramine and pentoxifylline. *Pharmacol Biochem Behav*, 126, 152-62.
- EL HAGE, W., POWELL, J. F. & SURGULADZE, S. A. 2009. Vulnerability to depression: what is the role of stress genes in gene x environment interaction? *Psychol Med*, 39, 1407-11.
- ENCIO, I. J. & DETERA-WADLEIGH, S. D. 1991. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 266, 7182-8.

- ENGLER, H., BAILEY, M. T., ENGLER, A., STINER-JONES, L. M., QUAN, N. & SHERIDAN, J. F. 2008. Interleukin-1 receptor type 1-deficient mice fail to develop social stress-associated glucocorticoid resistance in the spleen. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 108-17.
- ENGLER, H., BENSON, S., WEGNER, A., SPREITZER, I., SCHEDLOWSKI, M. & ELSENBURCH, S. 2016. Men and women differ in inflammatory and neuroendocrine responses to endotoxin but not in the severity of sickness symptoms. *Brain Behav Immun*, 52, 18-26.
- ERASLAN, E., AKYAZI, I., ERGUL-EKIZ, E. & MATUR, E. 2015. Noise Stress-Induced Changes in mRNA Levels of Corticotropin-Releasing Hormone Family Molecules and Glucocorticoid Receptors in the Rat Brain. *Folia Biol (Praha)*, 61, 66-73.
- ESCAMES, G., LOPEZ, L. C., GARCIA, J. A., GARCIA-CORZO, L., ORTIZ, F. & ACUNA-CASTROVIEJO, D. 2012. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet*, 131, 161-73.
- FATTAL, O., BUDUR, K., VAUGHAN, A. J. & FRANCO, K. 2006. Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases. *Psychosomatics*, 47, 1-7.
- FAVA, M. & KENDLER, K. S. 2000. Major depressive disorder. *Neuron*, 28, 335-41.
- FERRARI, A. J., CHARLSON, F. J., NORMAN, R. E., PATTEN, S. B., FREEDMAN, G., MURRAY, C. J., VOS, T. & WHITEFORD, H. A. 2013a. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med*, 10, e1001547.
- FERRARI, A. J., SOMERVILLE, A. J., BAXTER, A. J., NORMAN, R., PATTEN, S. B., VOS, T. & WHITEFORD, H. A. 2013b. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. *Psychol Med*, 43, 471-81.
- FIELDS, C., DRYE, L., VAIDYA, V., LYKETSOS, C. & GROUP, A. R. 2012. Celecoxib or naproxen treatment does not benefit depressive symptoms in persons age 70 and older: findings from a randomized controlled trial. *Am J Geriatr Psychiatry*, 20, 505-13.
- FIFKOVA, E. & VAN HARREVELD, A. 1977. Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area. *J Neurocytol*, 6, 211-30.
- FITZSIMONS, C. P., VAN HOOIJDONK, L. W., SCHOUTEN, M., ZALACHORAS, I., BRINKS, V., ZHENG, T., SCHOUTEN, T. G., SAALTINK, D. J., DIJKMANS, T., STEINDLER, D. A.,

- VERHAAGEN, J., VERBEEK, F. J., LUCASSEN, P. J., DE KLOET, E. R., MEIJER, O. C., KARST, H., JOELS, M., OITZL, M. S. & VREUGDENHIL, E. 2013. Knockdown of the glucocorticoid receptor alters functional integration of newborn neurons in the adult hippocampus and impairs fear-motivated behavior. *Mol Psychiatry*, 18, 993-1005.
- FOCKING, M., HOLKER, I. & TRAPP, T. 2003. Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 720-3.
- FONTANESI, F., SOTO, I. C., HORN, D. & BARRIENTOS, A. 2006. Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1129-47.
- FRANK, M. G., MIGUEL, Z. D., WATKINS, L. R. & MAIER, S. F. 2010. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*, 24, 19-30.
- FREEDMAN, L. P. 1992. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev*, 13, 129-45.
- FRENOIS, F., MOREAU, M., O'CONNOR, J., LAWSON, M., MICON, C., LESTAGE, J., KELLEY, K. W., DANTZER, R. & CASTANON, N. 2007. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 516-31.
- FRODL, T., CARBALLEDO, A., HUGHES, M. M., SALEH, K., FAGAN, A., SKOKAUSKAS, N., MCLOUGHLIN, D. M., MEANEY, J., O'KEANE, V. & CONNOR, T. J. 2012. Reduced expression of glucocorticoid-inducible genes GILZ and SGK-1: high IL-6 levels are associated with reduced hippocampal volumes in major depressive disorder. *Transl Psychiatry*, 2, e88.
- FRODL, T., SCHULE, C., SCHMITT, G., BORN, C., BAGHAI, T., ZILL, P., BOTTLENDER, R., RUPPRECHT, R., BONDY, B., REISER, M., MOLLER, H. J. & MEISENZAHL, E. M. 2007. Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Arch Gen Psychiatry*, 64, 410-6.
- FUJIKAWA, T., SOYA, H., FUKUOKA, H., ALAM, K. S., YOSHIZATO, H., MCEWEN, B. S. & NAKASHIMA, K. 2000. A biphasic regulation of receptor mRNA expressions for growth hormone, glucocorticoid and mineralocorticoid in the rat dentate gyrus during acute stress. *Brain Res*, 874, 186-93.

- GALLIHER-BECKLEY, A. J. & CIDLOWSKI, J. A. 2009. Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life*, 61, 979-86.
- GALIGNIANA, M. D., ERLEJMAN, A. G., MONTE, M., GOMEZ-SANCHEZ, C. & PIWIEN-PILIPUK, G. 2010. The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Mol Cell Biol*, 30, 1285-98.
- GAMARO, G. D., MANOLI, L. P., TORRES, I. L., SILVEIRA, R. & DALMAZ, C. 2003a. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int*, 42, 107-14.
- GAMARO, G. D., STRECK, E. L., MATTE, C., PREDIGER, M. E., WYSE, A. T. & DALMAZ, C. 2003b. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res*, 28, 1339-44.
- GARDNER, A. & BOLES, R. G. 2011. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 730-43.
- GARDNER, A., JOHANSSON, A., WIBOM, R., NENNESMO, I., VON DOBELN, U., HAGENFELDT, L. & HALLSTROM, T. 2003. Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J Affect Disord*, 76, 55-68.
- GARRIDO, C., GALLUZZI, L., BRUNET, M., PUIG, P. E., DIDELOT, C. & KROEMER, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13, 1423-33.
- GASSEN, N. C., FRIES, G. R., ZANNAS, A. S., HARTMANN, J., ZSCHOCKE, J., HAFNER, K., CARRILLO-ROA, T., STEINBACHER, J., PREISSINGER, S. N., HOEIJMAKERS, L., KNOP, M., WEBER, F., KLOIBER, S., LUCAE, S., CHROUSOS, G. P., CARELL, T., ISING, M., BINDER, E. B., SCHMIDT, M. V., RUEGG, J. & REIN, T. 2015. Chaperoning epigenetics: FKBP51 decreases the activity of DNMT1 and mediates epigenetic effects of the antidepressant paroxetine. *Sci Signal*, 8, ra119GELEY, S., HARTMANN, B. L., HALA, M., STRASSER-WOZAK, E. M., KAPELARI, K. & KOFLER, R. 1996. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. *Cancer Res*, 56, 5033-8.

- GENG, C. D., SCHWARTZ, J. R. & VEDECKIS, W. V. 2008. A conserved molecular mechanism is responsible for the auto-up-regulation of glucocorticoid receptor gene promoters. *Mol Endocrinol*, 22, 2624-42.
- GILTAY, E. J., ENTER, D., ZITMAN, F. G., PENNINX, B. W., VAN PELT, J., SPINHOVEN, P. & ROELOFS, K. 2012. Salivary testosterone: associations with depression, anxiety disorders, and antidepressant use in a large cohort study. *J Psychosom Res*, 72, 205-13.
- GIRARD-JOYAL, O., FARAGHER, A., BRADLEY, K., KANE, L., HRYCYK, L. & ISMAIL, N. 2015. Age and sex differences in c-Fos expression and serum corticosterone concentration following LPS treatment. *Neuroscience*, 305, 293-301.
- GOLD, P. W., WONG, M. L., CHROUSOS, G. P. & LICINIO, J. 1996. Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry*, 1, 257-64.
- GONCALVES, M. B., WILLIAMS, E. J., YIP, P., YANEZ-MUNOZ, R. J., WILLIAMS, G. & DOHERTY, P. 2010. The COX-2 inhibitors, meloxicam and nimesulide, suppress neurogenesis in the adult mouse brain. *Br J Pharmacol*, 159, 1118-25.
- GONG, Y., CHAI, Y., DING, J. H., SUN, X. L. & HU, G. 2011. Chronic mild stress damages mitochondrial ultrastructure and function in mouse brain. *Neurosci Lett*, 488, 76-80.
- GOODYER, I. M., HERBERT, J., TAMPLIN, A. & ALTHAM, P. M. 2000. Recent life events, cortisol, dehydroepiandrosterone and the onset of major depression in high-risk adolescents. *Br J Psychiatry*, 177, 499-504.
- GRINEVICH, V., HARBUZ, M., MA, X. M., JESSOP, D., TILDERS, F. J., LIGHTMAN, S. L. & AGUILERA, G. 2002. Hypothalamic pituitary adrenal axis and immune responses to endotoxin in rats with chronic adjuvant-induced arthritis. *Exp Neurol*, 178, 112-23.
- GRUNNET, L. G., AIKIN, R., TONNESEN, M. F., PARASKEVAS, S., BLAABJERG, L., STORLING, J., ROSENBERG, L., BILLESTRUP, N., MAYSINGER, D. & MANDRUP-POULSEN, T. 2009. Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes*, 58, 1807-15.
- GUIDARELLI, A., CERIONI, L. & CANTONI, O. 2007. Inhibition of complex III promotes loss of Ca²⁺ dependence for mitochondrial superoxide formation and permeability transition evoked by peroxynitrite. *J Cell Sci*, 120, 1908-14.
- GUMMOW, B. M., SCHEYS, J. O., CANCELLI, V. R. & HAMMER, G. D. 2006. Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription

- complex on the Dax-1 promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex. *Mol Endocrinol*, 20, 2711-23.
- GUO, J., ZHANG, W., ZHANG, L., DING, H., ZHANG, J., SONG, C., ZHANG, Y., XIA, N., LI, M., LIANG, Y., HU, X., LUAN, H. & WANG, H. 2016. Probable involvement of p11 with interferon alpha induced depression. *Sci Rep*, 6, 17029.
- HANNESTAD, J., DELLAGIOIA, N. & BLOCH, M. 2011. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*, 36, 2452-9.
- HAASE, G., PETTMANN, B., RAOUL, C. & HENDERSON, C. E. 2008. Signaling by death receptors in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 284-91.
- HANSSON, A. C., CINTRA, A., BELLUARDO, N., SOMMER, W., BHATNAGAR, M., BADER, M., GANTEN, D. & FUXE, K. 2000. Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neurosci*, 12, 2918-34.
- HANSSON, A. C., SOMMER, W. H., METSIS, M., STROMBERG, I., AGNATI, L. F. & FUXE, K. 2006. Corticosterone actions on the hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression are mediated by exon IV promoter. *J Neuroendocrinol*, 18, 104-14.
- HARDINGHAM, G. E., FUKUNAGA, Y. & BADING, H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, 5, 405-14.
- HARRIS, T. O., BORSANYI, S., MESSARI, S., STANFORD, K., CLEARY, S. E., SHIERS, H. M., BROWN, G. W. & HERBERT, J. 2000. Morning cortisol as a risk factor for subsequent major depressive disorder in adult women. *Br J Psychiatry*, 177, 505-10.
- HASLER, G. 2010. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? *World Psychiatry*, 9, 155-61.
- HASLER, G., DREVETS, W. C., MANJI, H. K. & CHARNEY, D. S. 2004. Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1765-81.
- HEINE, V. M., ZARENO, J., MASLAM, S., JOELS, M. & LUCASSEN, P. J. 2005. Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. *Eur J Neurosci*, 21, 1304-14.

- HILES, S. A., BAKER, A. L., DE MALMANCHE, T. & ATTIA, J. 2012. Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis. *Psychol Med*, 42, 2015-26.
- HILL, R. A., WU, Y. W., KWEK, P. & VAN DEN BUUSE, M. 2012. Modulatory effects of sex steroid hormones on brain-derived neurotrophic factor-tyrosine kinase B expression during adolescent development in C57Bl/6 mice. *J Neuroendocrinol*, 24, 774-88.
- HILL, M. M., ADRAIN, C., DURIEZ, P. J., CREAGH, E. M. & MARTIN, S. J. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*, 23, 2134-45.
- HOLSBOER, F. & BARDEN, N. 1996. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev*, 17, 187-205.
- HOWARD, D. M., ADAMS, M. J., CLARKE, T. K., HAFFERTY, J. D., GIBSON, J., SHIRALI, M., COLEMAN, J. R. I., HAGENAARS, S. P., WARD, J., WIGMORE, E. M., ALLOZA, C., SHEN, X., BARBU, M. C., XU, E. Y., WHALLEY, H. C., MARIONI, R. E., PORTEOUS, D. J., DAVIES, G., DEARY, I. J., HEMANI, G., BERGER, K., TEISMANN, H., RAWAL, R., AROLT, V., BAUNE, B. T., DANNLOWSKI, U., DOMSCHKE, K., TIAN, C., HINDS, D. A., ANDME RESEARCH, T., MAJOR DEPRESSIVE DISORDER WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS, C., TRZASKOWSKI, M., BYRNE, E. M., RIPKE, S., SMITH, D. J., SULLIVAN, P. F., WRAY, N. R., BREEN, G., LEWIS, C. M. & MCINTOSH, A. M. 2019. Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nat Neurosci*, 22, 343-352.
- HU, F., WANG, X., PACE, T. W., WU, H. & MILLER, A. H. 2005. Inhibition of COX-2 by celecoxib enhances glucocorticoid receptor function. *Mol Psychiatry*, 10, 426-8.
- HUANG, J., PENG, W., ZHENG, Y., HAO, H., LI, S., YAO, Y., DING, Y., ZHANG, J., LYU, J. & ZENG, Q. 2019. Upregulation of UCP2 Expression Protects against LPS-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2758262.
- HUBLER, T. R., DENNY, W. B., VALENTINE, D. L., CHEUNG-FLYNN, J., SMITH, D. F. & SCAMMELL, J. G. 2003. The FK506-binding immunophilin FKBP51 is transcriptionally regulated by progestin and attenuates progestin responsiveness. *Endocrinology*, 144, 2380-7.

- HUMPHREYS, D., SCHLESINGER, L., LOPEZ, M. & ARAYA, A. V. 2006. Interleukin-6 production and deregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with major depressive disorders. *Endocrine*, 30, 371-6.
- HUNTER, R. G., SELIGSOHN, M., RUBIN, T. G., GRIFFITHS, B. B., OZDEMIR, Y., PFAFF, D. W., DATSON, N. A. & MCEWEN, B. S. 2016. Stress and corticosteroids regulate rat hippocampal mitochondrial DNA gene expression via the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 9099-104.
- HUTTEMANN, M., HELLING, S., SANDERSON, T. H., SINKLER, C., SAMAVATI, L., MAHAPATRA, G., VARUGHESE, A., LU, G., LIU, J., RAMZAN, R., VOGT, S., GROSSMAN, L. I., DOAN, J. W., MARCUS, K. & LEE, I. 2012. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1817, 598-609.
- IRUSEN, E., MATTHEWS, J. G., TAKAHASHI, A., BARNES, P. J., CHUNG, K. F. & ADCOCK, I. M. 2002. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 109, 649-57.
- IRWIN, M. R. & MILLER, A. H. 2007. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun*, 21, 374-83.
- ISMAILI, N. & GARABEDIAN, M. J. 2004. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci*, 1024, 86-101.
- ITOH, M., ADACHI, M., YASUI, H., TAKEKAWA, M., TANAKA, H. & IMAI, K. 2002. Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol*, 16, 2382-92.
- IYENGAR, R. L., GANDHI, S., ANEJA, A., THORPE, K., RAZZOUK, L., GREENBERG, J., MOSOVICH, S. & FARKOUH, M. E. 2013. NSAIDs are associated with lower depression scores in patients with osteoarthritis. *Am J Med*, 126, 1017 e11-8.
- JAHNG, J. W. 2011. An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Horm Behav*, 59, 213-20.
- JOHNSON, G. L. & LAPADAT, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, 1911-2.
- JONAT, C., RAHMSDORF, H. J., PARK, K. K., CATO, A. C., GEBEL, S., PONTA, H. & HERRLICH, P. 1990. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62, 1189-204.

- JORGE, R. E., ROBINSON, R. G., MOSER, D., TATENO, A., CRESPO-FACORRO, B. & ARNDT, S. 2004. Major depression following traumatic brain injury. *Arch Gen Psychiatry*, 61, 42-50.
- JOVICIC, M. J., LUKIC, I., RADOJCIC, M., ADZIC, M. & MARIC, N. P. 2015. Modulation of c-Jun N-terminal kinase signaling and specific glucocorticoid receptor phosphorylation in the treatment of major depression. *Med Hypotheses*, 85, 291-4.
- JOYCE, P. R., MULDER, R. T., MCKENZIE, J. M., LUTY, S. E. & CLONINGER, C. R. 2004. Atypical depression, atypical temperament and a differential antidepressant response to fluoxetine and nortriptyline. *Depress Anxiety*, 19, 180-6.
- JURUENA, M. F., CLEARE, A. J. & PARIANTE, C. M. 2004. [The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression]. *Braz J Psychiatry*, 26, 189-201.
- KAM, J. C., SZEFLER, S. J., SURS, W., SHER, E. R. & LEUNG, D. Y. 1993. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol*, 151, 3460-6.
- KANELAKIS, K. C., SHEWACH, D. S. & PRATT, W. B. 2002. Nucleotide binding states of hsp70 and hsp90 during sequential steps in the process of glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly. *J Biol Chem*, 277, 33698-703.
- KANES, S., COLQUHOUN, H., GUNDUZ-BRUCE, H., RAINES, S., ARNOLD, R., SCHACTERLE, A., DOHERTY, J., EPPERSON, C. N., DELIGIANNIDIS, K. M., RIESENBERG, R., HOFFMANN, E., RUBINOW, D., JONAS, J., PAUL, S. & MELTZER-BRODY, S. 2017. Brexanolone (SAGE-547 injection) in post-partum depression: a randomised controlled trial. *Lancet*, 390, 480-489.
- KARABATSIAKIS, A., BOCK, C., SALINAS-MANRIQUE, J., KOLASSA, S., CALZIA, E., DIETRICH, D. E. & KOLASSA, I. T. 2014. Mitochondrial respiration in peripheral blood mononuclear cells correlates with depressive subsymptoms and severity of major depression. *Transl Psychiatry*, 4, e397.
- KARANDREA, D., KITTAS, C. & KITRAKI, E. 2002. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology*, 75, 217-26.
- KARKI, P., SMITH, K., JOHNSON, J., JR. & LEE, E. 2014. Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: role of transforming growth factor-alpha in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 389, 58-64.

- KASSEL, O. & HERRLICH, P. 2007. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol*, 275, 13-29.
- KASTER, M. P., FERREIRA, P. K., SANTOS, A. R. & RODRIGUES, A. L. 2005. Effects of potassium channel inhibitors in the forced swimming test: possible involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway. *Behav Brain Res*, 165, 204-9.
- KAUFMANN, T., TAI, L., EKERT, P. G., HUANG, D. C., NORRIS, F., LINDEMANN, R. K., JOHNSTONE, R. W., DIXIT, V. M. & STRASSER, A. 2007. The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell*, 129, 423-33.
- KENDLER, K. S., HETTEMA, J. M., BUTERA, F., GARDNER, C. O. & PRESCOTT, C. A. 2003. Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety. *Arch Gen Psychiatry*, 60, 789-96.
- KENIS, G., PRICKAERTS, J., VAN OS, J., KOEK, G. H., ROBAEYS, G., STEINBUSCH, H. W. & WICHERS, M. 2011. Depressive symptoms following interferon-alpha therapy: mediated by immune-induced reductions in brain-derived neurotrophic factor? *Int J Neuropsychopharmacol*, 14, 247-53.
- KESSLER, R. 2003. Depression screening. *J Fam Pract*, 52, 466; author reply 467.
- KESSLER, R. C. 1997. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol*, 48, 191-214.
- KESSLER, R. C. & BROMET, E. J. 2013. The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health*, 34, 119-38.
- KIM, J., XU, M., XO, R., MATES, A., WILSON, G. L., PEARSALL, A. W. T. & GRISHKO, V. 2010. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 424-32.
- KINO, T., ICHIJO, T., AMIN, N. D., KESAVAPANY, S., WANG, Y., KIM, N., RAO, S., PLAYER, A., ZHENG, Y. L., GARABEDIAN, M. J., KAWASAKI, E., PANT, H. C. & CHROUSOS, G. P. 2007. Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *Mol Endocrinol*, 21, 1552-68.
- KISCHKEL, F. C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated

- proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 14, 5579-88.
- KLENGEL, T. & BINDER, E. B. 2015. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene x Environment Interactions. *Neuron*, 86, 1343-57.
- KONSMAN, J. P., VIGUES, S., MACKERLOVA, L., BRISTOW, A. & BLOMQVIST, A. 2004. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol*, 472, 113-29.
- KORNSTEIN, S. G., SCHATZBERG, A. F., THASE, M. E., YONKERS, K. A., MCCULLOUGH, J. P., KEITNER, G. I., GELENBERG, A. J., DAVIS, S. M., HARRISON, W. M. & KELLER, M. B. 2000. Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry*, 157, 1445-52.
- KRISHNAN, V. & NESTLER, E. J. 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455, 894-902.
- KRISHNAN, V., BERTON, O. & NESTLER, E. 2008. The use of animal models in psychiatric research and treatment. *Am J Psychiatry*, 165, 1109.
- KUBERA, M., CURZYTEK, K., DUDA, W., LESKIEWICZ, M., BASTA-KAIM, A., BUDZISZEWSKA, B., ROMAN, A., ZAJICOVA, A., HOLAN, V., SZCZESNY, E., LASON, W. & MAES, M. 2013. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months. *Brain Behav Immun*, 31, 96-104.
- KUBERA, M., OBUCHOWICZ, E., GOEHLER, L., BRZESZCZ, J. & MAES, M. 2011. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 744-59.
- KUDIELKA, B. M. & KIRSCHBAUM, C. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol*, 69, 113-32.
- KUMAR, P., MARK, P. J., WARD, B. K., MINCHIN, R. F. & RATAJCZAK, T. 2001. Estradiol-regulated expression of the immunophilins cyclophilin 40 and FKBP52 in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284, 219-25.
- KUPFER, D. J., FRANK, E. & PHILLIPS, M. L. 2012. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet*, 379, 1045-55.
- LABAKA, A., GONI-BALENTZIAGA, O., LEBENA, A. & PEREZ-TEJADA, J. 2018. Biological Sex Differences in Depression: A Systematic Review. *Biol Res Nurs*, 20, 383-392.

- LACOSTA, S., MERALI, Z. & ANISMAN, H. 1999. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res*, 818, 291-303.
- LANGE, A. J., ESPINET, C., HALL, R., EL-MAGHRABI, M. R., VARGAS, A. M., MIKSICEK, R. J., GRANNER, D. K. & PILKIS, S. J. 1992. Regulation of gene expression of rat skeletal muscle/liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Isolation and characterization of a glucocorticoid response element in the first intron of the gene. *J Biol Chem*, 267, 15673-80.
- LI, M., D'ARCY, C. & MENG, X. 2016. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. *Psychol Med*, 46, 717-30.
- LIANG, H. L., ONGWIJITWAT, S. & WONG-RILEY, M. T. 2006. Bigenomic functional regulation of all 13 cytochrome c oxidase subunit transcripts in rat neurons in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 140, 177-90.
- LICZNERSKI, P. & DUMAN, R. S. 2013. Remodeling of axo-spinous synapses in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience*, 251, 33-50.
- LINO-DE-OLIVEIRA, C., DE LIMA, T. C. & DE PADUA CAROBREZ, A. 2005. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. *Behav Brain Res*, 158, 243-50.
- LITTLE, A. 2009. Treatment-resistant depression. *Am Fam Physician*, 80, 167-72.
- LIU, J. & DEFRANCO, D. B. 2000. Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol Endocrinol*, 14, 40-51.
- LOPEZ-ARMADA, M. J., RIVEIRO-NAVEIRA, R. R., VAAMONDE-GARCIA, C. & VALCARCEL-ARES, M. N. 2013. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion*, 13, 106-18.
- LOTRICH, F. E., ALBUSAYSI, S. & FERRELL, R. E. 2013. Brain-derived neurotrophic factor serum levels and genotype: association with depression during interferon-alpha treatment. *Neuropsychopharmacology*, 38, 985-95.
- LUCKI, I. 1997. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*, 8, 523-32.
- LUO, X., BUDIARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C. & WANG, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-90.

- MA, X. M., CAMACHO, C. & AGUILERA, G. 2001. Regulation of corticotropin-releasing hormone (CRH) transcription and CRH mRNA stability by glucocorticoids. *Cell Mol Neurobiol*, 21, 465-75.
- MADAN, A. P. & DEFRANCO, D. B. 1993. Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 3588-92.
- MAES, M. 1999. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol*, 461, 25-46.
- MAES, M., LIN, A., BONACCORSO, S., VAN HUNSEL, F., VAN GASTEL, A., DELMEIRE, L., BIONDI, M., BOSMANS, E., KENIS, G. & SCHARPE, S. 1998. Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatr Scand*, 98, 328-35.
- MAJOR DEPRESSIVE DISORDER WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC, G. C., RIPKE, S., WRAY, N. R., LEWIS, C. M., HAMILTON, S. P., WEISSMAN, M. M., BREEN, G., BYRNE, E. M., BLACKWOOD, D. H., BOOMSMA, D. I., CICHON, S., HEATH, A. C., HOLSBOER, F., LUCAE, S., MADDEN, P. A., MARTIN, N. G., MCGUFFIN, P., MUGLIA, P., NOETHEN, M. M., PENNINX, B. P., PERGADIA, M. L., POTASH, J. B., RIETSCHER, M., LIN, D., MULLER-MYHSOK, B., SHI, J., STEINBERG, S., GRABE, H. J., LICHTENSTEIN, P., MAGNUSSON, P., PERLIS, R. H., PREISIG, M., SMOLLER, J. W., STEFANSSON, K., UHER, R., KUTALIK, Z., TANSEY, K. E., TEUMER, A., VIKTORIN, A., BARNES, M. R., BETTECKEN, T., BINDER, E. B., BREUER, R., CASTRO, V. M., CHURCHILL, S. E., CORYELL, W. H., CRADDOCK, N., CRAIG, I. W., CZAMARA, D., DE GEUS, E. J., DEGENHARDT, F., FARMER, A. E., FAVA, M., FRANK, J., GAINER, V. S., GALLAGHER, P. J., GORDON, S. D., GORYACHEV, S., GROSS, M., GUIPPONI, M., HENDERS, A. K., HERMS, S., HICKIE, I. B., HOEFELS, S., HOOGENDIJK, W., HOTTENGA, J. J., IOSIFESCU, D. V., ISING, M., JONES, I., JONES, L., JUNG-YING, T., KNOWLES, J. A., KOHANE, I. S., KOHLI, M. A., KORSZUN, A., LANDEN, M., LAWSON, W. B., LEWIS, G., MACINTYRE, D., MAIER, W., MATTHEISEN, M., MCGRATH, P. J., MCINTOSH, A., MCLEAN, A., MIDDELDORP, C. M., MIDDLETON, L., MONTGOMERY, G. M., MURPHY, S. N., NAUCK, M., NOLEN, W. A., NYHOLT, D. R., O'DONOVAN, M., OSKARSSON, H., PEDERSEN, N., SCHEFTNER, W. A., SCHULZ, A., SCHULZE, T. G., SHYN, S. I., SIGURDSSON, E., SLAGER, S. L., i sar. 2013. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry*, 18, 497-511.

- MAKHIJA, K. & KARUNAKARAN, S. 2013. The role of inflammatory cytokines on the aetiopathogenesis of depression. *Aust N Z J Psychiatry*, 47, 828-39.
- MALHI, H., GUICCIARDI, M. E. & GORES, G. J. 2010. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev*, 90, 1165-94.
- MANJI, H. K., DREVETS, W. C. & CHARNEY, D. S. 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*, 7, 541-7.
- MATSUBARA, T., FUNATO, H., KOBAYASHI, A., NOBUMOTO, M. & WATANABE, Y. 2006. Reduced Glucocorticoid Receptor alpha Expression in Mood Disorder Patients and First-Degree Relatives. *Biol Psychiatry*, 59, 689-95.
- MAUNDRELL, K., ANTONSSON, B., MAGNENAT, E., CAMPS, M., MUDA, M., CHABERT, C., GILLIERON, C., BOSCHERT, U., VIAL-KNECHT, E., MARTINOU, J. C. & ARKINSTALL, S. 1997. Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem*, 272, 25238-42.
- MAYBERG, H. S. 1994. Frontal lobe dysfunction in secondary depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 6, 428-42.
- MAYBERG, H. S., LEWIS, P. J., REGENOLD, W. & WAGNER, H. N., JR. 1994. Paralimbic hypoperfusion in unipolar depression. *J Nucl Med*, 35, 929-34.
- MCEWEN, B. S. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, 87, 873-904.
- MCHENRY, J., CARRIER, N., HULL, E. & KABBAJ, M. 2014. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. *Front Neuroendocrinol*, 35, 42-57.
- MCKAY, L. I. & CIDLOWSKI, J. A. 1998. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol*, 12, 45-56.
- MCKAY, L. I. & CIDLOWSKI, J. A. 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*, 20, 435-59.
- MCKAY, M. S. & ZAKZANIS, K. K. 2010. The impact of treatment on HPA axis activity in unipolar major depression. *J Psychiatr Res*, 44, 183-92.
- MCKINNEY, W. T. 2001. Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 6, 68-78.

- MCKLVEEN, J. M., MYERS, B., FLAK, J. N., BUNDZIKOVA, J., SOLOMON, M. B., SEROOGY, K. B. & HERMAN, J. P. 2013. Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. *Biol Psychiatry*, 74, 672-9.
- MCNAMARA, B., RAY, J. L., ARTHURS, O. J. & BONIFACE, S. 2001. Transcranial magnetic stimulation for depression and other psychiatric disorders. *Psychol Med*, 31, 1141-6.
- MELLO, B. S., MONTE, A. S., MCINTYRE, R. S., SOCZYNSKA, J. K., CUSTODIO, C. S., CORDEIRO, R. C., CHAVES, J. H., VASCONCELOS, S. M., NOBRE, H. V., JR., FLORENCO DE SOUSA, F. C., HYPHANTIS, T. N., CARVALHO, A. F. & MACEDO, D. S. 2013. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. *J Psychiatr Res*, 47, 1521-9.
- MENKE, A., KLENGEL, T., RUBEL, J., BRUCKL, T., PFISTER, H., LUCAE, S., UHR, M., HOLSBOER, F. & BINDER, E. B. 2013. Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression. *Genes Brain Behav*, 12, 289-96.
- MEYER, J. H., GINOVART, N., BOOVARIWALA, A., SAGRATI, S., HUSSEY, D., GARCIA, A., YOUNG, T., PRASCHAK-RIEDER, N., WILSON, A. A. & HOULE, S. 2006. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch Gen Psychiatry*, 63, 1209-16.
- MEYER, L. J., SCHMIDT, L. A., GOLDFAR, D. E. & PIEPKORN, M. W. 1995. Survival and histopathologic characteristics of human melanocytic nevi transplanted to athymic (nude) mice. *Am J Dermatopathol*, 17, 368-73.
- MEYERS, C. A., ALBITAR, M. & ESTEY, E. 2005. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*, 104, 788-93.
- MILLER, A. H., MALETIC, V. & RAISON, C. L. 2009a. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 65, 732-41.
- MILLER, M. A., KANDALA, N. B., KIVIMAKI, M., KUMARI, M., BRUNNER, E. J., LOWE, G. D., MARMOT, M. G. & CAPPuccio, F. P. 2009b. Gender differences in the cross-sectional relationships between sleep duration and markers of inflammation: Whitehall II study. *Sleep*, 32, 857-64.

- MILLER, A. H., PARIANTE, C. M. & PEARCE, B. D. 1999. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. *Adv Exp Med Biol*, 461, 107-16.
- MITIC, M., SIMIC, I., DJORDJEVIC, J., RADOJCIC, M. B. & ADZIC, M. 2013. Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. *Neuropharmacology*, 70, 100-11.
- MIYAOKA, T., WAKE, R., FURUYA, M., LIAURY, K., IEDA, M., KAWAKAMI, K., TSUCHIE, K., TAKI, M., ISHIHARA, K., ARAKI, T. & HORIGUCHI, J. 2012. Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: an open-label study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 37, 222-6.
- MIZOGUCHI, K., ISHIGE, A., ABURADA, M. & TABIRA, T. 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119, 887-97.
- MIZOGUCHI, K., ISHIGE, A., TAKEDA, S., ABURADA, M. & TABIRA, T. 2004. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J Neurosci*, 24, 5492-9.
- MOLENDIJK, M. L., BUS, B. A., SPINHOVEN, P., PENNINX, B. W., KENIS, G., PRICKAERTS, J., VOSHAAR, R. C. & ELZINGA, B. M. 2011. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Mol Psychiatry*, 16, 1088-95.
- MOLINA-HERNANDEZ, M., TELLEZ-ALCANTARA, N. P., PEREZ-GARCIA, J., OLIVERA-LOPEZ, J. I. & JARAMILLO-JAIMES, M. T. 2008. Antidepressant-like actions of minocycline combined with several glutamate antagonists. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 380-6.
- MONTKOWSKI, A., LANDGRAF, R., YASSOURIDIS, A., HOLSBOER, F. & SCHOBITZ, B. 1997. Central administration of IL-1 reduces anxiety and induces sickness behaviour in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 58, 329-36.
- MORGAN, D. J., POOLMAN, T. M., WILLIAMSON, A. J., WANG, Z., CLARK, N. R., MA'AYAN, A., WHETTON, A. D., BRASS, A., MATTHEWS, L. C. & RAY, D. W. 2016. Glucocorticoid receptor isoforms direct distinct mitochondrial programs to regulate ATP production. *Sci Rep*, 6, 26419.
- MOUTSATSOU, P., PSARRA, A. M., TSIAPARA, A., PARASKEVAKOU, H., DAVARIS, P. & SEKERIS, C. E. 2001. Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 386, 69-78.

- MUNHOZ, C. D., SORRELLS, S. F., CASO, J. R., SCAVONE, C. & SAPOLSKY, R. M. 2010. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci*, 30, 13690-8.
- MURGATROYD, C., PATCHEV, A. V., WU, Y., MICALE, V., BOCKMUHL, Y., FISCHER, D., HOLSBOER, F., WOTJAK, C. T., ALMEIDA, O. F. & SPENGLER, D. 2009. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci*, 12, 1559-66.
- MYINT, A. M., STEINBUSCH, H. W., GOEGHEGAN, L., LUCHTMAN, D., KIM, Y. K. & LEONARD, B. E. 2007. Effect of the COX-2 inhibitor celecoxib on behavioural and immune changes in an olfactory bulbectomised rat model of depression. *Neuroimmunomodulation*, 14, 65-71.
- NAVA, F. & CAPUTI, A. P. 1999. Central effects of cromoglycate sodium salt in rats treated with lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol*, 367, 351-9.
- NAVA, F. & CARTA, G. 2001. Melatonin reduces anxiety induced by lipopolysaccharide in the rat. *Neurosci Lett*, 307, 57-60.
- NECELA, B. M. & CIDLOWSKI, J. A. 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc*, 1, 239-46.
- NESTLER, E. J., BARROT, M., DILEONE, R. J., EISCH, A. J., GOLD, S. J. & MONTEGGIA, L. M. 2002. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34, 13-25.
- NESTLER, E. J. & HYMAN, S. E. 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 13, 1161-9.
- NEURAUTER, G., SCHROCKSNADDEL, K., SCHOLL-BURGI, S., SPERNER-UNTERWEGER, B., SCHUBERT, C., LEDOCHOWSKI, M. & FUCHS, D. 2008. Chronic immune stimulation correlates with reduced phenylalanine turnover. *Curr Drug Metab*, 9, 622-7.
- NEWTON, R., SEYBOLD, J., KUITERT, L. M., BERGMANN, M. & BARNES, P. J. 1998. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem*, 273, 32312-21.
- NEWTON, S. S., THOME, J., WALLACE, T. L., SHIRAYAMA, Y., SCHLESINGER, L., SAKAI, N., CHEN, J., NEVE, R., NESTLER, E. J. & DUMAN, R. S. 2002. Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. *J Neurosci*, 22, 10883-90.

- NGUN, T. C., GHAHRAMANI, N., SANCHEZ, F. J., BOCKLANDT, S. & VILAIN, E. 2011. The genetics of sex differences in brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*, 32, 227-46.
- O'BRIEN, S. M., SCULLY, P., FITZGERALD, P., SCOTT, L. V. & DINAN, T. G. 2007. Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy. *J Psychiatr Res*, 41, 326-31.
- O'REILLY, K. C., SHUMAKE, J., BAILEY, S. J., GONZALEZ-LIMA, F. & LANE, M. A. 2009. Chronic 13-cis-retinoic acid administration disrupts network interactions between the raphe nuclei and the hippocampal system in young adult mice. *Eur J Pharmacol*, 605, 68-77.
- O'CONNOR, J. C., LAWSON, M. A., ANDRE, C., MOREAU, M., LESTAGE, J., CASTANON, N., KELLEY, K. W. & DANTZER, R. 2009. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*, 14, 511-22.
- OQUENDO, M. A., ECHAVARRIA, G., GALFALVY, H. C., GRUNEBAUM, M. F., BURKE, A., BARRERA, A., COOPER, T. B., MALONE, K. M. & JOHN MANN, J. 2003. Lower cortisol levels in depressed patients with comorbid post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, 28, 591-8.
- OU, X. M., STORRING, J. M., KUSHWAHA, N. & ALBERT, P. R. 2001. Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT_{1A} receptor gene. *J Biol Chem*, 276, 14299-307.
- PACCANI, S. R., PATRUSSI, L., ULIVIERI, C., MASFERRER, J. L., D'ELIOS, M. M. & BALDARI, C. T. 2005. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit a Fyn-dependent pathway coupled to Rac and stress kinase activation in TCR signaling. *Blood*, 105, 2042-8.
- PACE, T. W., HU, F. & MILLER, A. H. 2007. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun*, 21, 9-19.
- PANDYA, J. D., AGARWAL, N. A. & KATYARE, S. S. 2007. Dexamethasone treatment differentially affects the oxidative energy metabolism of rat brain mitochondria in developing and adult animals. *Int J Dev Neurosci*, 25, 309-16.
- PARIANTE, C. M. 2003. Depression, stress and the adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 15, 811-2.
- PARIANTE, C. M. & LIGHTMAN, S. L. 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, 31, 464-8.

- PARIANTE, C. M. & MILLER, A. H. 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, 49, 391-404.
- PARIANTE, C. M., PEARCE, B. D., PISELL, T. L., SANCHEZ, C. I., PO, C., SU, C. & MILLER, A. H. 1999. The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology*, 140, 4359-66.
- PATCHEV, V. K., KALOGERAS, K. T., ZELAZOWSKI, P., WILDER, R. L. & CHROUSOS, G. P. 1992. Increased plasma concentrations, hypothalamic content, and in vitro release of arginine vasopressin in inflammatory disease-prone, hypothalamic corticotropin-releasing hormone-deficient Lewis rats. *Endocrinology*, 131, 1453-7.
- PAYKEL, E. S. 2006. Depression: major problem for public health. *Epidemiol Psychiatr Soc*, 15, 4-10.
- PEARSON, T. A., MENSAH, G. A., ALEXANDER, R. W., ANDERSON, J. L., CANNON, R. O., 3RD, CRIQUI, M., FADL, Y. Y., FORTMANN, S. P., HONG, Y., MYERS, G. L., RIFAI, N., SMITH, S. C., JR., TAUBERT, K., TRACY, R. P., VINICOR, F., CENTERS FOR DISEASE, C., PREVENTION & AMERICAN HEART, A. 2003. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107, 499-511.
- PICARD, D. & YAMAMOTO, K. R. 1987. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, 6, 3333-40.
- PITTENGER, C. & DUMAN, R. S. 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33, 88-109.
- PLIAKAS, A. M., CARLSON, R. R., NEVE, R. L., KONRADI, C., NESTLER, E. J. & CARLEZON, W. A., JR. 2001. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci*, 21, 7397-403.
- PLOTKIN, S. R., BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. 1996. Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol*, 67, 41-7.
- PRATT, W. B. & TOFT, D. O. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, 18, 306-60.
- PRENEK, L., BOLDIZSAR, F., KUGYELKA, R., UGOR, E., BERTA, G., NEMETH, P. & BERKI, T. 2017. The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid

- receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. *Apoptosis*, 22, 239-253.
- PSARRA, A. M. & SEKERIS, C. E. 2009. Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 431-6.
- QIN, Z. H., WANG, Y., KIKLY, K. K., SAPP, E., KEGEL, K. B., ARONIN, N. & DIFIGLIA, M. 2001. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem*, 276, 8079-86.
- RACAGNI, G. & POPOLI, M. 2008. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci*, 10, 385-400.
- RACHMAN, I. M., UNNERSTALL, J. R., PFAFF, D. W. & COHEN, R. S. 1998. Estrogen alters behavior and forebrain c-fos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13941-6.
- RADDATZ, D., TOTH, S., SCHWORER, H. & RAMADORI, G. 2001. Glucocorticoid receptor signaling in the intestinal epithelial cell lines IEC-6 and Caco-2: evidence of inhibition by interleukin-1beta. *Int J Colorectal Dis*, 16, 377-83.
- RAGGUETT, R. M., RONG, C., KRATIUK, K. & MCINTYRE, R. S. 2019. Rapastinel - an investigational NMDA-R modulator for major depressive disorder: evidence to date. *Expert Opin Investig Drugs*, 28, 113-119.
- RAI, N. K., TRIPATHI, K., SHARMA, D. & SHUKLA, V. K. 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 4, 138-44.
- RAISON, C. L. & MILLER, A. H. 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry*, 160, 1554-65.
- RAISON, C. L., BORISOV, A. S., MAJER, M., DRAKE, D. F., PAGNONI, G., WOOLWINE, B. J., VOGT, G. J., MASSUNG, B. & MILLER, A. H. 2009. Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. *Biol Psychiatry*, 65, 296-303.
- RAISON, C. L., CAPURON, L. & MILLER, A. H. 2006. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 27, 24-31.
- RAJKOWSKA, G., MIGUEL-HIDALGO, J. J., WEI, J., DILLEY, G., PITTMAN, S. D., MELTZER, H. Y., OVERHOLSER, J. C., ROTH, B. L. & STOCKMEIER, C. A. 1999. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*, 45, 1085-98.

- REMUS, J. L. & DANTZER, R. 2016. Inflammation Models of Depression in Rodents: Relevance to Psychotropic Drug Discovery. *Int J Neuropsychopharmacol*, 19.
- REZIN, G. T., AMBONI, G., ZUGNO, A. I., QUEVEDO, J. & STRECK, E. L. 2009. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res*, 34, 1021-9.
- REZIN, G. T., CARDOSO, M. R., GONCALVES, C. L., SCAINI, G., FRAGA, D. B., RIEGEL, R. E., COMIM, C. M., QUEVEDO, J. & STRECK, E. L. 2008. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int*, 53, 395-400.
- RICHARDS, D. 2011. Prevalence and clinical course of depression: a review. *Clin Psychol Rev*, 31, 1117-25.
- RIECHER-ROSSLER, A. 2010. Prospects for the classification of mental disorders in women. *Eur Psychiatry*, 25, 189-96.
- ROBERTSON, D. A., BEATTIE, J. E., REID, I. C. & BALFOUR, D. J. 2005. Regulation of corticosteroid receptors in the rat brain: the role of serotonin and stress. *Eur J Neurosci*, 21, 1511-20.
- ROGATSKY, I., HITTELMAN, A. B., PEARCE, D. & GARABEDIAN, M. J. 1999. Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol Cell Biol*, 19, 5036-49.
- ROHLER, N., WOLF, J. M. & WOLF, O. T. 2010. Glucocorticoid sensitivity of cognitive and inflammatory processes in depression and posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev*, 35, 104-14.
- ROOZENDAAL, B., MCREYNOLDS, J. R. & MCGAUGH, J. L. 2004. The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairment. *J Neurosci*, 24, 1385-92.
- ROTH, T. L., LUBIN, F. D., FUNK, A. J. & SWEATT, J. D. 2009. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry*, 65, 760-9.
- ROY, S. & NICHOLSON, D. W. 2000. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med*, 192, 21-6.
- RUBIN, R. T., POLAND, R. E., LESSER, I. M., WINSTON, R. A. & BLODGETT, A. L. 1987. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry*, 44, 328-36.
- RUHE, H. G., MASON, N. S. & SCHENE, A. H. 2007. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry*, 12, 331-59.
- RUSH, A. J. 2007. STAR*D: what have we learned? *Am J Psychiatry*, 164, 201-4.

- SACRE, S., MEDGHALCHI, M., GREGORY, B., BRENNAN, F. & WILLIAMS, R. 2010. Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. *Arthritis Rheum*, 62, 683-93.
- SACHOT, C., POOLE, S. & LUHESHI, G. N. 2004. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. *J Physiol*, 561, 263-72.
- SAEGUSA, Y., TAKEDA, H., MUTO, S., NAKAGAWA, K., OHNISHI, S., SADAKANE, C., NAHATA, M., HATTORI, T. & ASAKA, M. 2011. Decreased plasma ghrelin contributes to anorexia following novelty stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, E685-96.
- SAELENS, X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G. & VANDENABEELE, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-74.
- SAHIN, T. D., KARSON, A., BALCI, F., YAZIR, Y., BAYRAMGURLER, D. & UTKAN, T. 2015. TNF-alpha inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression. *Behav Brain Res*, 292, 233-40.
- SAKAHIRA, H., ENARI, M. & NAGATA, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96-9.
- SAKIC, B., LAFLAMME, N., CRNIC, L. S., SZECHTMAN, H., DENBURG, J. A. & RIVEST, S. 1999. Reduced corticotropin-releasing factor and enhanced vasopressin gene expression in brains of mice with autoimmunity-induced behavioral dysfunction. *J Neuroimmunol*, 96, 80-91.
- SANACORA, G., TRECCANI, G. & POPOLI, M. 2012. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*, 62, 63-77.
- SASSON, R. & AMSTERDAM, A. 2003. Pleiotropic antiapoptotic activity of glucocorticoids in ovarian follicular cells. *Biochem Pharmacol*, 66, 1393-401.
- SASSON, R., TAJIMA, K. & AMSTERDAM, A. 2001. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology*, 142, 802-11.
- SCHLOSSMACHER, G., STEVENS, A. & WHITE, A. 2011. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol*, 211, 17-25.

- SCHMIDT, S., RAINER, J., PLONER, C., PRESUL, E., RIML, S. & KOFLER, R. 2004. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ*, 11 Suppl 1, S45-55.
- SEGAL, M., NIAZI, S., SIMONS, M. P., GALATI, S. A. & ZANGRILLI, J. G. 2007. Bid activation during induction of extrinsic and intrinsic apoptosis in eosinophils. *Immunol Cell Biol*, 85, 518-24.
- SEKERIS, C. E. 1990. The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo*, 4, 317-20.
- SHARIFI, A. M., HODA, F. E. & NOOR, A. M. 2010. Studying the effect of LPS on cytotoxicity and apoptosis in PC12 neuronal cells: role of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein expression. *Toxicol Mech Methods*, 20, 316-20.
- SHELINE, Y. I., GADO, M. H. & KRAEMER, H. C. 2003. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*, 160, 1516-8.
- SHIMIZU, N., OOMURA, Y. & KAI, Y. 1989. Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiol Behav*, 46, 835-41.
- SILVERMAN, M. N., PEARCE, B. D., BIRON, C. A. & MILLER, A. H. 2005. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol*, 18, 41-78.
- SIMIC, I., MARIC, N. P., MITIC, M., SOLDATOVIC, I., PAVLOVIC, Z., MIHALJEVIC, M., ANDRIC, S., RADOJCIC, M. B. & ADZIC, M. 2013. Phosphorylation of leukocyte glucocorticoid receptor in patients with current episode of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 40, 281-5.
- SIMÕES, D. C., PSARRA, A. M., MAUAD, T., PANTOU, I., ROUSSOS, C., SEKERIS, C. E. & GRATZIOU, C. 2012. Glucocorticoid and estrogen receptors are reduced in mitochondria of lung epithelial cells in asthma. *PLoS One*, 7, e39183.
- SINCLAIR, D., FILLMAN, S. G., WEBSTER, M. J. & WEICKERT, C. S. 2013. Dysregulation of glucocorticoid receptor co-factors FKBP5, BAG1 and PTGES3 in prefrontal cortex in psychotic illness. *Sci Rep*, 3, 3539.
- SIONOV, R. V., COHEN, O., KFIR, S., ZILBERMAN, Y. & YEFENOF, E. 2006a. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med*, 203, 189-201.
- SIONOV, R. V., KFIR, S., ZAFRIR, E., COHEN, O., ZILBERMAN, Y. & YEFENOF, E. 2006b. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle*, 5, 1017-26.

- SLEE, E. A., ADRAIN, C. & MARTIN, S. J. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320-6.
- SMEETS, T., WOLF, O. T., GIESBRECHT, T., SIJSTERMANS, K., TELGEN, S. & JOELS, M. 2009. Stress selectively and lastingly promotes learning of context-related high arousing information. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 1152-61.
- SMITH, L. K. & CIDLOWSKI, J. A. 2010. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res*, 182, 1-30.
- SMITH, M. A., MAKINO, S., KVETNANSKY, R. & POST, R. M. 1995. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, 15, 1768-77.
- SOUSA, A. R., LANE, S. J., CIDLOWSKI, J. A., STAYNOV, D. Z. & LEE, T. H. 2000. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol*, 105, 943-50.
- STOCKMEIER, C. A., MAHAJAN, G. J., KONICK, L. C., OVERHOLSER, J. C., JURJUS, G. J., MELTZER, H. Y., UYLINGS, H. B., FRIEDMAN, L. & RAJKOWSKA, G. 2004. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*, 56, 640-50.
- STRAWBRIDGE, R., ARNONE, D., DANESE, A., PAPADOPOULOS, A., HERANE VIVES, A. & CLEARE, A. J. 2015. Inflammation and clinical response to treatment in depression: A meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol*, 25, 1532-43.
- STURMAN, O., GERMAIN, P. L. & BOHACEK, J. 2018. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, 21, 443-452.
- SULAKHIYA, K., KESHAVLAL, G. P., BEZBARUAH, B. B., DWIVEDI, S., GURJAR, S. S., MUNDE, N., JANGRA, A., LAHKAR, M. & GOGOI, R. 2016. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. *Neurosci Lett*, 611, 106-11.
- SUOMALAINEN, A., MAJANDER, A., HALTIA, M., SOMER, H., LONNQVIST, J., SAVONTAUS, M. L. & PELTONEN, L. 1992. Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest*, 90, 61-6.
- SVENNINGSSON, P., CHERGUI, K., RACHLEFF, I., FLAJOLET, M., ZHANG, X., EL YACOUBI, M., VAUGEOIS, J. M., NOMIKOS, G. G. & GREENGARD, P. 2006. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science*, 311, 77-80.

- SWAAB, D. F., BAO, A. M. & LUCASSEN, P. J. 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*, 4, 141-94.
- SWARTZ, C. D., AFSHARI, C. A., YU, L., HALL, K. E. & DIXON, D. 2005. Estrogen-induced changes in IGF-I, Myb family and MAP kinase pathway genes in human uterine leiomyoma and normal uterine smooth muscle cell lines. *Mol Hum Reprod*, 11, 441-50.
- SWEENEY, J. F., NGUYEN, P. K., OMANN, G. M. & HINSHAW, D. B. 1998. Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *J Surg Res*, 74, 64-70.
- SZATMARY, Z., GARABEDIAN, M. J. & VILCEK, J. 2004. Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Biol Chem*, 279, 43708-15.
- TAVARES, R. G., TASCA, C. I., SANTOS, C. E., ALVES, L. B., PORCIUNCULA, L. O., EMANUELLI, T. & SOUZA, D. O. 2002. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int*, 40, 621-7.
- TATRO, E. T., EVERALL, I. P., KAUL, M. & ACHIM, C. L. 2009. Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. *Brain Res*, 1286, 1-12.
- THAYER, J. F. & STERNBERG, E. M. 2009. Neural concomitants of immunity--focus on the vagus nerve. *Neuroimage*, 47, 908-10.
- TISSING, W. J., MEIJERINK, J. P., DEN BOER, M. L. & PIETERS, R. 2003. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 17, 17-25.
- TEELING, J. L., CUNNINGHAM, C., NEWMAN, T. A. & PERRY, V. H. 2010. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. *Brain Behav Immun*, 24, 409-19.
- THASE, M. E., STANFORD, A. D., MEMISOGLU, A., MARTIN, W., CLAXTON, A., BODKIN, J. A., TRIVEDI, M. H., FAVA, M., YU, M. & PATHAK, S. 2019. Results from a long-term open-label extension study of adjunctive buprenorphine/samidorphan combination in patients with major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*.

- TOME, M. E., LUTZ, N. W. & BRIEHL, M. M. 2004. Overexpression of catalase or Bcl-2 alters glucose and energy metabolism concomitant with dexamethasone resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1693, 57-72.
- TRUJILLO, V., DURANDO, P. E. & SUAREZ, M. M. 2016. Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: effects of tianeptine. *Stress*, 19, 91-103.
- TRULLAS, R. & SKOLNICK, P. 1990. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol*, 185, 1-10.
- TSANKOVA, N. M., BERTON, O., RENTHAL, W., KUMAR, A., NEVE, R. L. & NESTLER, E. J. 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*, 9, 519-25.
- TURNBULL, A. V. & RIVIER, C. 1995. Regulation of the HPA axis by cytokines. *Brain Behav Immun*, 9, 253-75.
- UHER, R. 2008. The implications of gene-environment interactions in depression: will cause inform cure? *Mol Psychiatry*, 13, 1070-8.
- UHLENHAUT, N. H., BARISH, G. D., YU, R. T., DOWNES, M., KARUNASIRI, M., LIDDLE, C., SCHWALIE, P., HUBNER, N. & EVANS, R. M. 2013. Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cisomes. *Mol Cell*, 49, 158-71.
- UMESONO, K. & EVANS, R. M. 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 57, 1139-46.
- VANDEVYVER, S., DEJAGER, L. & LIBERT, C. 2014. Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev*, 35, 671-93.
- VAUX, D. L. 2011. Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 546-50.
- VIEIRA, C., DE LIMA, T. C., CAROBREZ ADE, P. & LINO-DE-OLIVEIRA, C. 2008. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. *Neurosci Lett*, 445, 170-3.
- VELLUCCI, S. V., PARROTT, R. F. & MIMMACK, M. L. 2001. Down-regulation of BDNF mRNA, with no effect on trkB or glucocorticoid receptor m RNAs, in the porcine hippocampus after acute dexamethasone treatment. *Res Vet Sci*, 70, 157-62.
- VIDEBECH, P. 2000. PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review. *Acta Psychiatr Scand*, 101, 11-20.

- VOGELZANGS, N., DUIVIS, H. E., BEEKMAN, A. T., KLUFT, C., NEUTEBOOM, J., HOOGENDIJK, W., SMIT, J. H., DE JONGE, P. & PENNINX, B. W. 2012. Association of depressive disorders, depression characteristics and antidepressant medication with inflammation. *Transl Psychiatry*, 2, e79.
- WANG, J., WEI, Q., WANG, C. Y., HILL, W. D., HESS, D. C. & DONG, Z. 2004a. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 19948-54.
- WALSH, R. N. & CUMMINS, R. A. 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, 83, 482-504.
- WANG, X., WU, H. & MILLER, A. H. 2004. Interleukin 1alpha (IL-1alpha) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function. *Mol Psychiatry*, 9, 65-75.
- WANG, Z., CHEN, W., KONO, E., DANG, T. & GARABEDIAN, M. J. 2007. Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol*, 21, 625-34.
- WANG, Z., FREDERICK, J. & GARABEDIAN, M. J. 2002. Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem*, 277, 26573-80.
- WANG, Z. J., ZHANG, F. M., WANG, L. S., YAO, Y. W., ZHAO, Q. & GAO, X. 2009. Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biol Int*, 33, 665-74.
- WARNER-SCHMIDT, J. L., VANOVER, K. E., CHEN, E. Y., MARSHALL, J. J. & GREENGARD, P. 2011. Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9262-7.
- WEAVER, I. C., CERVONI, N., CHAMPAGNE, F. A., D'ALESSIO, A. C., SHARMA, S., SECKL, J. R., DYMOV, S., SZYF, M. & MEANEY, M. J. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7, 847-54.
- WEBSTER, J. C., OAKLEY, R. H., JEWELL, C. M. & CIDLOWSKI, J. A. 2001. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6865-70.

- WEBSTER, M. J., KNABLE, M. B., O'GRADY, J., ORTHMANN, J. & WEICKERT, C. S. 2002. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry*, 7, 985-94, 924.
- WEIKUM, E. R., KNUESEL, M. T., ORTLUND, E. A. & YAMAMOTO, K. R. 2017. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 159-174.
- WEISS, S. M., WADSWORTH, G., FLETCHER, A. & DOURISH, C. T. 1998. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23, 265-71.
- WOLF, I. M., PERIYASAMY, S., HINDS, T., JR., YONG, W., SHOU, W. & SANCHEZ, E. R. 2009. Targeted ablation reveals a novel role of FKBP52 in gene-specific regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 113, 36-45.
- WRAY, N. R., RIPKE, S., MATTHEISEN, M., TRZASKOWSKI, M., BYRNE, E. M., ABDELLAOUI, A., ADAMS, M. J., AGERBO, E., AIR, T. M., ANDLAUER, T. M. F., BACANU, S. A., BAEKVAD-HANSEN, M., BEEKMAN, A. F. T., BIGDELI, T. B., BINDER, E. B., BLACKWOOD, D. R. H., BRYOIS, J., BUTTENSCHON, H. N., BYBJERG-GRAUHOLM, J., CAI, N., CASTELAO, E., CHRISTENSEN, J. H., CLARKE, T. K., COLEMAN, J. I. R., COLODRO-CONDE, L., COUVY-DUCHESNE, B., CRADDOCK, N., CRAWFORD, G. E., CROWLEY, C. A., DASHTI, H. S., DAVIES, G., DEARY, I. J., DEGENHARDT, F., DERKS, E. M., DIREK, N., DOLAN, C. V., DUNN, E. C., ELEY, T. C., ERIKSSON, N., ESCOTT-PRICE, V., KIADEH, F. H. F., FINUCANE, H. K., FORSTNER, A. J., FRANK, J., GASPAR, H. A., GILL, M., GIUSTI-RODRIGUEZ, P., GOES, F. S., GORDON, S. D., GROVE, J., HALL, L. S., HANNON, E., HANSEN, C. S., HANSEN, T. F., HERMS, S., HICKIE, I. B., HOFFMANN, P., HOMUTH, G., HORN, C., HOTTENGA, J. J., HOUGAARD, D. M., HU, M., HYDE, C. L., ISING, M., JANSEN, R., JIN, F., JORGENSEN, E., KNOWLES, J. A., KOHANE, I. S., KRAFT, J., KRETZSCHMAR, W. W., KROGH, J., KUTALIK, Z., LANE, J. M., LI, Y., LI, Y., LIND, P. A., LIU, X., LU, L., MACINTYRE, D. J., MACKINNON, D. F., MAIER, R. M., MAIER, W., MARCHINI, J., MBAREK, H., MCGRATH, P., MCGUFFIN, P., MEDLAND, S. E., MEHTA, D., MIDDELDORP, C. M., MIHAILOV, E., MILANESCHI, Y., MILANI, L., MILL, J., MONDIMORE, F. M., MONTGOMERY, G. W., MOSTAFAVI, S., MULLINS, N., NAUCK, M., NG, B., i sar. 2018. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat Genet*, 50, 668-681.

- YAMAMORI, E., IWASAKI, Y., TAGUCHI, T., NISHIYAMA, M., YOSHIDA, M., ASAI, M., OISO, Y., ITOI, K., KAMBAYASHI, M. & HASHIMOTO, K. 2007. Molecular mechanisms for corticotropin-releasing hormone gene repression by glucocorticoid in BE(2)C neuronal cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 264, 142-8.
- YAO, S. Y., NATARAJAN, C. & SRIRAM, S. 2012. nNOS mediated mitochondrial injury in LPS stimulated oligodendrocytes. *Mitochondrion*, 12, 336-44.
- YAO, X. L., COWAN, M. J., GLADWIN, M. T., LAWRENCE, M. M., ANGUS, C. W. & SHELHAMER, J. H. 1999. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity. *J Biol Chem*, 274, 17202-8.
- YIRMIYA, R., POLLAK, Y., BARAK, O., AVITSUR, R., OVADIA, H., BETTE, M., WEIHE, E. & WEIDENFELD, J. 2001. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology*, 24, 531-44.
- ZALCMAN, S., GREEN-JOHNSON, J. M., MURRAY, L., NANCE, D. M., DYCK, D., ANISMAN, H. & GREENBERG, A. H. 1994. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res*, 643, 40-9.
- ZBOZINEK, T. D., ROSE, R. D., WOLITZKY-TAYLOR, K. B., SHERBOURNE, C., SULLIVAN, G., STEIN, M. B., ROY-BYRNE, P. P. & CRASKE, M. G. 2012. Diagnostic overlap of generalized anxiety disorder and major depressive disorder in a primary care sample. *Depress Anxiety*, 29, 1065-71.
- ZHANG, X., ZHANG, H., SHAO, H., XUE, Q. & YU, B. 2014. ERK MAP kinase activation in spinal cord regulates phosphorylation of Cdk5 at serine 159 and contributes to peripheral inflammation induced pain/hypersensitivity. *PLoS One*, 9, e87788.
- ZHENG, L. S., KANEKO, N. & SAWAMOTO, K. 2015. Minocycline treatment ameliorates interferon-alpha- induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice. *Front Cell Neurosci*, 9, 5.
- ZHOU, J. & CIDLOWSKI, J. A. 2005. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, 70, 407-17.
- ZHOU, Y. & DANBOLT, N. C. 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*, 121, 799-817.
- ZHU, C. B., LINDLER, K. M., OWENS, A. W., DAWS, L. C., BLAKELY, R. D. & HEWLETT, W. A. 2010. Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces

behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, 35, 2510-20.

ZIV, Y., RON, N., BUTOVSKY, O., LANDA, G., SUDAI, E., GREENBERG, N., COHEN, H., KIPNIS, J. & SCHWARTZ, M. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*, 9, 268-75.

8. PRILOZI

Biografija autora

Željka Brkić je rođena 24. oktobra 1989. godine u Beogradu. Završila je društveno-jezički smer gimnazije u Indiji 2008. godine. Po završetku srednje škole je upisala osnovne akademske studije biologije na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, koje je završila 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,56. Po završetku osnovnih studija je upisala master studije molekularne biologije, koje je završila 2013. godine. Sve ispite na master studijama predviđene studijskim programom je položila sa prosečnom ocenom 9,80. Godine 2013. je odbranila master tezu pod nazivom „Promene u sadržaju vode u različitim tkivima tokom dijapauze kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis Hbn*“, pod mentorstvom prof. dr Jelene Purać. Školske 2014/2015. godine je upisala doktorske studije biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Eksperimentalna neurobiologija, na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku.

Od 15. februara 2014. je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na projektu III41209 „Definisanje klastera molekularnih biomarkera za poboljšanje i terapiju poremećaja raspoloženja“, finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića, višeg naučnog saradnika INN „Vinča“.

Istraživačka aktivnost Željke Brkić je fokusirana na izučavanje uticaja neuroinflamacije u patofiziologiji depresivnih poremećaja, sa posebnim interesovanjem za modulaciju funkcije glukokortikoidnog receptora, kao i proučavanje uticaja pola na patogenezu ovog poremećaja. Autor je 3 i koautor 6 radova u vodećim međunarodnim časopisima, kao i brojnih međunarodnih i domaćih kongresnih saopštenja štampanih u celini i izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Жељка Бркић
Број индекса: Б3043/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом „**Повезаност фосфорилационог статуса глукокортикоидног рецептора и понашања пацова оба пола у неуроинфламаторном моделу депресије**“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора: Жељка Бркић
Број индекса: Б3043/2014
Студијски програм: Експериментална неуробиологија

Наслов рада „**Повезаност фосфорилационог статуса глукокортикоидног рецептора и понашања пацова оба пола у неуроинфламаторном моделу депресије**“

Ментори: др Мирослав Аџић и проф. др Надежда Недељковић
Потписана: Жељка Бркић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: **„Повезаност фосфорилационог статуса глукокортикоидног рецептора и понашања пацова оба пола у неуроинфламаторном моделу депресије“** која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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