

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Andrijana D. Stanisavljević Ilić

**Efekat olanzapina na aktivaciju
neurona, parvalbumin-pozitivne
interneurone i parametre
inflamacije i oksidativnog stresa
u mozgu pacova nakon
dugotrajne izolacije**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Andrijana D. Stanisavljević Ilić

**Effect of Olanzapine on neuronal
activation, parvalbumin-positive
interneurons, and parameters of
inflammation and oxidative stress
in rat brain following chronic
social isolation**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

MENTORI:

dr Dragana Filipović, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Laketa, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Sanja Dacić, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Nela Puškaš, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

dr Nada Tomanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za Nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se **dr Dragani Filipović**, naučni savetnik, Institut za Nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, na znanju, savetima, angažovanju, poverenju i neizmernoj pomoći koju mi je pružila tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Danijeli Laketi**, vanredni profesor, Biološki fakultet Univerzitet u Beogradu, na svojoj podršci i pomoći pri pisanju ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Neli Puškaš**, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, na sugestijama pri pisanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Sanji Dacić**, docent, Biološki fakultet Univerzitet u Beogradu, na sugestijama i komentarima pri pisanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Nadi Tomanović**, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, na sugestijama pri pisanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Snežani Đorđević**, profesor i načelnik Odeljenja za toksikološku hemiju, Medicinski fakultet, Vojnomedicinska akademija Univerzitet odbrane u Beogradu, na određivanju koncentracije olanzapina u serumu životinja.

Zahvaljujem se **prof. dr Peter Gass**, Klinika za psihijatriju i psihoterapiju - Centralni institut za mentalno zdravlje, Medicinski fakultet u Manhajmu, Univerzitet u Hajdelbergu, Nemačka, **prof. dr Dragos Inta**, Translaciona psihijatrija, Odeljenje za javno zdravlje, Univerzitet u Friburu, Fribur, Švajcarska, **prof. dr Stefan J. Borgwardt**, Klinika za psihijatriju i psihoterapiju, Univerzitetski klinički centar Šlezvig-Holštajn, Univerzitet u Libeku, Nemačka na ukazanoj stručnoj i finansijskoj pomoći prilikom publikacije naučnih radova.

Zahvaljujem se **dr Neveni Todorović Vukotić**, naučni saradnik, Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Institut za Nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu na pomoći koju mi je ukazala u početnoj fazi izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **dr Ivani Perić**, naučni saradnik, Institut za Nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, za svu pomoć, znanje, ali pre svega na podršci, pozitivnosti i prijateljstvu koje mi je pružila prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Ujedno se zahvaljujem i svim kolegama Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za Nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu koji su mi pomogli u bilo kom trenutku prilikom izrade doktorske disertacije.

Hvala mojoj majci, ocu, sestri i sestriću, na veri u mene i podršci tokom svih ovih godina.

Hvala mom mužu Savi Iliću na bodrenju koje mi je pružio tokom izrade doktorske disertacije.

Posebno hvala i mojoj ćerki, Katji, bez koje nikad ne bih istrajala i kojoj posvećujem ovaj doktorat

Efekat olanzapina na aktivaciju neurona, parvalbumin-pozitivne interneurone i parametre inflamacije i oksidativnog stresa u mozgu pacova izlaganih dugotrajnoj izolaciji

SAŽETAK

Dugotrajna izolacija (IZ) može doprineti razvoju depresije i anksioznosti, pri čemu se kao terapija koristi antipsihotik olanzapin (Olz). Međutim, molekularni mehanizmi delovanja IZ i ograničena efikasnost Olz nisu dovoljno istraženi. Stoga je ispitan efekat Olz (7,5 mg/kg/dnevno) primenjen tokom poslednje 3 od ukupno 6 nedelja IZ, na ponašanje mužjaka pacova nalik depresivnom i anksioznom. Analizirane su promene u broju c-Fos pozitivnih (c-Fos+) ćelija u moždanim regionima, parvalbumin (PV)+ interneurona i glutamat dekarboksilaze 67 (GAD67)+ ćelija u slojevima (lat. *cornu Ammonis*, CA 1-3; lat. *gyrus dentatus*, DG) dorzalnog hipokampusu (dHIP), kao i antioksidativni i anti-inflamacijski efekti Olz u hipokampusu i njegov uticaj na antioksidativni status jetre.

Olz je smanjio povećan broj c-Fos+ ćelija u dHIP, retrosplenijalnom i medijalnom prefrontalnom korteksu nakon IZ. Tretman Olz nije uticao na smanjeni broj PV+ ćelija u slojevima *stratum oriens* (SO) i *stratum pyramidale* (SP) u dorzalnom CA1 (dCA1) i dDG kod pacova izloženih IZ, ali je povećao broj GAD67+ ćelija u SO i SP slojevima dCA1. U hipokampusu, IZ je povećala proteinsku ekspresiju interleukina-6 (IL-6), supresora signalizacije citokina 3 (SOCS3) i bakar-cink superoksid dismutaze (Cu/Zn-SOD), dok je istu smanjila kod katalaze (KAT). Tretman Olz normalizovao je vrednosti Cu/Zn-SOD i KAT na fiziološki nivo, ali nije uticao na nivo IL-6, dok je smanjio proteinsku ekspresiju SOCS3. U jetri IZ je povećala aktivnost KAT, kao i nivo malondialdehida i proteinskih karbonilnih grupa, dok je tretman Olz povećao aktivnost SOD i proteinsku ekspresiju Cu/Zn-SOD, a smanjio proteinsku ekspresiju i aktivnost KAT. Dobijeni rezultati doprinose razumevanju mehanizama delovanja IZ i tretmana Olz u moždanim regionima i jetri.

Ključne reči: dugotrajna izolacija, ponašanje nalik depresivnom i anksioznom, olanzapin, hipokampus, jetra

Naučna oblast: Biologija.

Uža naučna oblast: Neuronauke.

Effect of Olanzapine on neuronal activation, parvalbumin-positive interneurons, and parameters of inflammation and oxidative stress in rat brain following chronic isolation

Abstract

Chronic isolation (CI) can lead to depression and anxiety with antipsychotic drug Olanzapine (Olz) being used as therapy. However, molecular mechanisms of CI and limited efficacy of Olz remain unclear. Therefore, the effect of Olz (7.5 mg/kg/day) administered during the last 3 out of 6-weeks CI was examined in male rats with depression and anxiety-like behaviors. Changes in the number of c-Fos positive (c-Fos+) cells in brain regions, parvalbumin (PV)+ interneurons and glutamate decarboxylase 67 (GAD67)+ cells in layers (cornu Ammonis, CA 1-3; dentate gyrus, DG) of dorsal hippocampus (dHIPP) were analyzed, along with antioxidant and anti-inflammatory effects of Olz in hippocampus, and its impact on antioxidant status of liver.

Olz reduced the increased number of c-Fos+ cells in the dHIPP, retrosplenial and medial prefrontal cortex following CI. Olz treatment did not affect the reduced number of PV+ cells in the stratum oriens (SO) and stratum pyramidale (SP) layers of dorsal CA1 (dCA1) and dDG in CI rats, but increased the number of GAD67+ cells in the SO and SP of dCA1. In the hippocampus, CI increased protein expression of interleukin-6 (IL-6), suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), and copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), while it decreased catalase (CAT) levels. Olz treatment normalized Cu/Zn-SOD and CAT levels to physiological values but didn't affect IL-6 levels and reduced SOCS3 protein expression. In the liver CI increased CAT activity as well as the levels of malondialdehyde and protein carbonyl groups, while Olz treatment increased SOD activity and Cu/Zn-SOD protein expression, and reduced both CAT protein expression and activity. The obtained results contribute to the understanding of mechanisms of CI and Olz treatment in brain regions and liver.

Key words: Chronic isolation, depression and anxiety-like behaviors, olanzapine, hippocampus, liver

Scientific field: Biology.

Scientific Subfield: Neuroscience.

SPISAK SKRAĆENICA I AKRONIMA:

- 5-HT – 5-hidroksitriptamin, serotonin
ABC – avidin-biotin peroksidaza kompleks (engl. *avidin-biotinylated peroxidase complex*)
AcbC – jezgro nukleus akumbensa (lat. *accumbens nucleus, core*)
AcbSh – omotač nukleus akumbensa (lat. *accumbens nucleus, shell*)
ACTH – adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*)
AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina
ANOVA – analiza varijanse (engl. *analysis of variance*)
APS – amonijum persulfat
ATP – adenzin trifosfat
BCL2 – B-ćelijski limfom 2 (engl. *B cell lymphoma 2*)
BDNF – neurotrofni faktor poreklom iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)
BSA – goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)
CA – Amonov rog (lat. *cornu Ammonis*)
CFH – komplementarni faktor H (engl. *complement factor H*)
Cg1K – cingulatna kora 1
CNS – centralni nervni sistem
CORT – kortikosteron
CPu – repato jedro i ljuska (lat. *caudate putamen*)
CRE – elementi odgovora na ciklični adenzin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate response element*)
CREB – CRE vezujući protein (engl. *cAMP-response element binding protein*)
CRH – kortikotropin-oslobađajući hormon (engl. *corticotropin-releasing factor*)
Cu/Zn-SOD – bakar-cink superoksid dismutaza
DAB – 3,3'-Diaminobenzidin
DAPI – marker jedarnog materijala, 4',6-diamidino-2-fenilindol (engl. *4'-6-diamidino-2-phenylindole*)
DG – zubata vijuga, dentatni girus (lat. *gyrus dentatus*)
dHIP – dorzalni hipokampus
DMF – dimetilformamid
DMHT – dorzomedijalno jedro hipotalamusa
DNPH – dinitrofenilhidrazin (engl. *dinitrophenylhydrazine*)
DPK – dorzalna pedunkularna kora
EDTA – etilendiamin tetra sirćetna kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
EK – entorinalni korteks
Elk1 – Elk1 protein (engl. *ETS like-1 protein*)
EPSE – ekstrapiramidni efekti (engl. *extrapyramidal side effects*)
ERK – kinaza regulisana spoljašnjim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)
FC – Folinov reagens (engl. *Folin & Ciocalteu's reagens*)
GABA – gama amino buterna kiselina
GAD65 – glutamat dekarboksilaza 65
GAD67 – glutamat dekarboksilaza 67
GAT – GABA transporter
GdmCl – gvanidin-hlorid
GFAP – glijski fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

GPx – glutation peroksidaza
GR – glukokortikoidni receptor
GSH – glutation
H – hilus
H₂O₂ – vodonik peroksid
HHA – hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina
(HO•) – hidroksil radikal
HRP – enzim peroksidaza rena
HT – hipotalamus
IEGs – neposredni rani geni (engl. *immediate early genes*)
IL – interleukin
IL-6 – interleukin-6
ILK – infralimbički podregion
INF – interferon
IZ – izolacija
JAK/STAT – Janus kinaza/Signal Transducer i Aktivator Transkripcije (engl. *Janus kinasa/Signal Transducer and activator of transcription*)
KAT – katalaza
Keap1 – engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*
Klz – Klozapin
KMB – krvno-moždana barijera
Kont – kontrola
LA/BL – lateralni/bazolateralni kompleks amigdala
M – muskarin
MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza
MDA – malondialdehid
ML- GCL – molekularno-granularni sloj (lat. *molecular layer-granular-cell layer*)
Mn-SOD – mangan-superoksid dismutaza
mPFC – medijalni prefrontalni korteks
MSK – mitogenom i stresom aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen and stress activated protein kinase*)
NAc – nukleus akumbens (lat. *nucleus accumbens*)
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (redukovani oblik), (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
NBT – nitro plavo tetrazolijum hlorid
NDS – magareći serum (engl. *normal donkey serum*)
NeuN – neuronski jedarni protein (engl. *neuronal nuclear protein*)
NF-κB – jedarni faktor-kappa B (engl. *nuclear factor kappa b*)
NGS – kozji serum (engl. *normal goat serum*)
NMDA – N-metil-D-aspartat
NMDAR – N-metil-D-aspartatni receptor
NO – azot oksid (engl. *nitric oxide*)
Nrf2 – nuklearni faktor 2 povezan sa eritroidom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)
(O₂•-) – superoksid anjon radikal
Olz – olanzapin

PBS – fosfatom puferisan fiziološki rastvor (engl. *phosphate buffered saline*)
PCP4 – proteinski marker 4 za Purkinjeove ćelije (engl. *Purkinje cell protein marker 4*)
PFA – paraformaldehid
PFK – prefrontalni korteks
PKG – proteinske karbonilne grupe
PNN – perineuronalne mreže (engl. *perineuronal nets*)
PrLK – prelimbički podregion medijalnog prefrontalnog korteksa
PV – parvalbumin
PVDF – polivinil difluorid membrane (engl. *polyvinylidene difluoride membrane*)
PVHT – paraventrikularno jedro hipotalamusa
PVP – paraventrikularno posteriorno jedro talamusa
PVT – paraventrikularno jedro talamusa
ROS – reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*)
rpS6 – ribozomna protein kinaza S6 (engl. *ribosomal protein kinase S6*)
RSD – retrosplenijalni agranularni korteks (engl. *retrosplenial dysgranular cortex*)
RSGc – retrosplenijalni granularni korteks (engl. *retrosplenial granular cortex*) c region
RSK – retrosplenijalni korteks
SDS – natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)
SEM – standardna greška merenja (engl. *stanard error of mean*)
SLM – lat. *stratum lacunosum moleculare*
SO – lat. *stratum oriens*
SOCS3 – supresor signalizacije citokina 3 (engl. *suppressor of cytokine signaling*).
SOD – superoksid dismutaza
SSRI – selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*)
SP – piramidni sloj (lat. *stratum pyramidale*)
SR – lat. *stratum radiatum*
SRE – engl. *serum response element*
SRF – engl. *serum response factor*
SZO – Svetska zdravstvena organizacija
TBA – tiobarbiturna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)
TBS – Trisom puferisan fiziološki rastvor (engl. *Tris-buffered saline*)
TBST – Tris pufer sa deterdžentom (engl. *Tris-buffered saline Tween 20*)
TCA – trikarboksilne kiseline
TEMED – tetrametiletildiamin
TH – triptofan hidroksilaza
THD – tirozin hidroksilaza
TNF α – faktor nekroze tumora alfa
TrkB – tirozin kinazni receptor B (engl. *tyrosine receptor kinase B*)
VDCC – voltažno zavisni kalcijumski kanal (engl. *voltage-dependent calcium channel*)
VGLUT – vezikularni transporter za glutamat
vHIP – ventralni hipokampus
VMHT – ventromedijalno jedro hipotalamusa
VTA – ventralna tegmentalna oblast (lat. *ventral tegmental area*)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Etiologija depresije	1
1.1.1. Monoaminska hipoteza depresije.....	2
1.1.2. Neuroendokrina hipoteza depresije.....	3
1.1.3. Glutamatna hipoteza depresije	4
1.1.4. GABA hipoteza depresije.....	5
1.1.5. Inflamacijska hipoteza depresije	7
1.1.6. Neuroplastična i neurogena hipoteza depresije.....	7
1.1.7. Mitohondrijska hipoteza depresije	8
1.2. Moždani regioni uključeni u odgovor na dugotrajni stres	9
1.2.1. Hipokampus	13
1.3. Jetra	16
1.4. Životinjski modeli depresije.....	17
1.4.1 Dugotrajna socijalna IZ.....	18
1.5. C-Fos kao marker aktivnosti neurona	19
1.6. Parvalbumin pozitivni interneuroni i glutamat-dekarboksilaza 67 u hipokampusu	20
1.7. Oksidativni stres i inflamacija.....	22
1.8. Olanzapin	25
2. Ciljevi.....	27
3. Materijal i metode	28
3.1. Životinje.....	28
3.2. Dugotrajna IZ kao model depresije.....	28
3.3. Priprema rastvora leka i aplikacija.....	28
3.4. Testovi ponašanja	30
3.4.1. Test preferencije unosa zaslađenog rastvora	30
3.4.2. Test prinudnog plivanja.....	30
3.4.3. Test zakopavanja klikera	31
3.5. Žrtvovanje i izolacija tkiva	31
3.5.1. Frakcionisanje hipokampusa.....	32
3.5.2. Frakcionisanje jetre	32
3.5.3. Određivanje koncentracije proteina	32
3.6. Spektrofotometrijski eseji	33
3.6.1. Određivanje enzimske aktivnosti SOD	33
3.6.2. Određivanje enzimske aktivnosti KAT	33
3.6.3. Esej lipidne peroksidacije	33

3.6.4. Određivanje sadržaja PKG.....	34
3.7. Western blot	34
3.7.1. SDS-PAGE elektroforeza.....	34
3.7.2. Transfer proteina sa poliakrilamidnog gela na noseću membranu.....	35
3.7.3. Imunoblot analiza.....	35
3.8. Imunohistohemija.....	37
3.8.1. Svetlosna imunohistohemija	37
3.8.1.1. Moždani regioni i podregioni.....	37
3.8.2. Fluorescentna imunohistohemija	39
4. Statistička obrada rezultata.....	40
5. Rezultati	41
5.1. Rezultati testova ponašanja.....	41
5.1.1. Rezultati preferencije saharoze	41
5.1.2. Rezultati testa zakopavanje klikera	41
5.1.3. Rezultati testa prinudnog plivanja.....	42
5.2. Broj c-Fos+ ćelija u podregionima/regionima mozga nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom.....	43
5.2.1. Broj c-Fos+ ćelija u podregionima dorzalnog i ventralnog hipokampusu nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom.....	43
5.2.2. Broj c-Fos+ ćelija u podregionima medijalnog prefrontalnog korteksa nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom.....	47
5.2.3. Broj c-Fos+ ćelija u lateralnom/bazolateralnom kompleksu amigdala nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom.....	49
5.2.4. Broj c-Fos+ ćelija u podregionima retrosplenijalnog korteksa nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom.....	50
5.2.5. Broj c-Fos+ ćelija u paraventrikularnom jedru talamusa i dorzomedijalnom i ventromedijalnom jedru hipotalamusa nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom	51
5.2.6. Broj c-Fos+ ćelija u dorzalnom strijatumu (CPu) i nukleus akumbens-u (AcbC i AcbSh) nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom	53
5.2.7. Procentualne promene u broju c-Fos+ ćelija nakon izolacija i/ili olanzapin tretmana ..	55
5.3. Broj PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima podregiona dHIP	56
5.3.1. dCA1 podregion.....	56
5.3.2. CA2 podregion.....	58
5.3.3. dCA3 podregion.....	60
5.3.4. dDG podregion.....	61
5.3.5. Broj PV+ i GAD67+ ćelija u podregionima dHIP.....	63
5.3.6. Procentualna promena u broju PV+ i GAD67 + ćelija	64

5.4. Proteinska ekspresija Cu/Zn-SOD i KAT u citosolu hipokampusa pacova	65
5.5. Proteinska ekspresija IL-6 i SOCS3 citosolu hipokampusa pacova.....	66
5.6. Određivanje parametara oksidativnog stresa u citosolnoj frakciji jetre	67
5.6.1. Sadržaj MDA i PKG u jetri pacova.....	67
5.6.2. Određivanje enzimske aktivnosti SOD i KAT u jetri pacova	67
5.6.3. Određivanje nivoa proteinske ekspresije Cu/Zn-SOD i KAT u jetri pacova	68
6. Diskusija.....	70
6.1. Antidepresivni i anksiolitički efekat olanzapina	70
6.2. Efekat dugotrajne socijalne izolacije na ekspresiju c-Fos proteina u moždanim regionima	70
6.3. Efekat dugotrajnog tretmana olanzapinom na ekspresiju c-Fos proteina u moždanim regionima	73
6.4. Efekat dugotrajne izolacije na promenu broja PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima dorzalnog hipokampusa	75
6.5. Efekat dugotrajnog tretmana olanzapinom kod IZ pacova na broj PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima dorzalnog hipokampusa.....	77
6.6. Efekat olanzapina i izolacije na markere oksidativnog stresa: MDA i PKG u jetri	79
6.7. Uticaj tretmana olanzapinom i dugotrajne izolacije na antioskidativni sistem jetre.....	80
7. Zaključci.....	83
8. Literatura	85
9. Biografija autora	117

1. Uvod

Depresija je oboljenje iz grupe poremećaja raspoloženja, koja se između ostalog manifestuje gubitkom interesovanja ili osećaja zadovoljstva, kao i osećanjem krivice sa niskim samopoštovanjem. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), od depresije boluje oko 280 miliona ljudi širom sveta, uključujući 5% odraslih (4% muškaraca i 6% žena) i 5,7% starijih od 60 godina (SZO, 2023) (World Health Organization). Prema podacima UNICEF-a, oko 4,1% od ukupnog stanovništva Srbije ima simptome depresije (UNICEF Srbija, Mentalno zdravlje i blagostanje). Podaci o mentalnom zdravlju u Srbiji iz 2022. godine ukazuju da oko 25,7% stanovnika ima blage simptome depresije, umereni simptomi su prisutni kod 10,1% građana, izraženiji simptomi kod 3,2% populacije, dok su kod 2,3% građana zabeleženi ozbiljni simptomi depresije (Živanović i sar., 2022). Depresija je povezana sa visokom stopom samoubilačkog ponašanja i smrtnosti (Lépine i Briley, 2011). Lečenje depresije je povezano sa mnogobrojnim izazovima, u prvom redu sa nedovoljnom efikasnošću antidepresiva i/ili njihovim odloženim delovanjem. Oko 30% depresivnih pacijenata nakon lečenja antidepresivima ne pokazuje poboljšanje, što se u medicini definiše kao terapijski rezistentna depresija (Kverno i Mangano, 2021). To je povod za intenzivna istraživanja molekulskih mehanizama koji leže u osnovi nastanka depresije, kao i adekvatnog tretmana koji bi povećao uspešnost lečenja (Colita i sar., 2024; Lang i Borgwardt, 2013).

1.1. Etiologija depresije

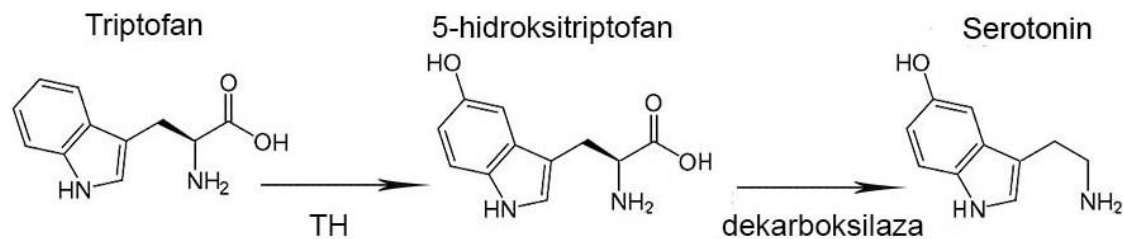
Depresija je heterogeno oboljenje, a najčešći tip depresije jeste klinička depresija koja se karakteriše kao multifaktorijalna. U osnovi ovog poremećaja nalaze se biološki, genetički, psihosocijalni faktori kao i faktori sredine koji mogu dovesti do razvoja depresije. Prema Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje V izdanje (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-5-TR*) (American Psychiatric Association, 2022) dijagnostikovanje kliničke depresije kod ljudi, obuhvata pet ili više simptoma koji su istovremeno prisutni: loše raspoloženje, gubitak interesovanja ili zadovoljstva, osećaj bezvrednosti, smanjena energija, gubitak koncentracije, poremećaj apetita, poremećaj spavanja, agitacija i suicidalne misli.

Današnja istraživanja ukazuju da najveći broj štetnih efekata stresa na organizam potiče od nepovoljnih socijalnih, psiholoških i faktora sredine među kojima je i dugotrajna socijalna izolacija (IZ), kao vrsta psihosocijalnog stresa koja može dovesti do poremećaja raspoloženja kao što su depresija i anksioznost (Abelaira i sar., 2013; Deussing, 2006). Literaturni podaci ukazuju da psihosocijalni stres dovodi do oksidativnog stresa i inflamacije, kako u perifernim tkivima, tako i u određenim moždanim strukturama, što može dovesti do poremećaja raspoloženja. Takođe, narušena funkcija i komunikacija u okviru osovine creva (mikrobiota)-jetre-mozga ima ulogu u patogenezi ponašanja nalik depresiji (Yang i sar., 2024). S obzirom da je mehanizam nastanka depresije heterogen i još uvek etiološki nerazjašnjen, postoji nekoliko hipoteza o uzroku depresije. Biološke teorije nastanka depresije ukazuju na poremećaj u ravnoteži koncentracije monoaminskih neurotransmitera tj. serotonina, noradrenalina i dopamina (monoaminska hipoteza), poremećaj u funkciji hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) osovine (neuroendokrina hipoteza), nesklad između ekscitatorne glutamatne i inhibitorne GABA (gama amino buterna kiselina) neurotransmisije u određenim regionima mozga (glutamatna i GABA hipoteza). Literaturni podaci ukazuju da i povećani nivoi proinflamacijskih citokina kao što su interleukin-1beta (IL-1β) i interleukin-

6 (IL-6) učestvuju u nastanku depresije (inflamacijska hipoteza) (Farooq i sar., 2017; Ting i sar., 2020). U objašnjenju etiologije depresije takođe su zastupljene i neuroplastična, neurogena i mitohondrijska hipoteza depresije.

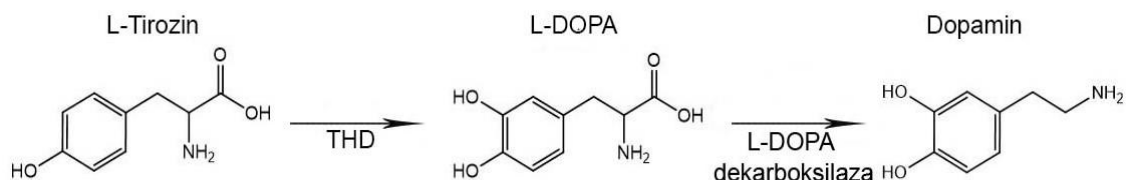
1.1.1. Monoaminska hipoteza depresije

Monoaminska hipoteza depresije ukazuje da depresija nastaje kao posledica smanjene funkcije monoamina (serotonina, norepinefrina, dopamina) u određenim moždanim regionima (Schildkraut, 1965). Pored toga, smanjenje koncentracije monoamina u sinaptičkoj pukotini kao i povećan broj ili osetljivost pre- i postsinaptičkih monoaminskih receptora u neuronskoj ćelijskoj membrani (Belmaker i Agam, 2008) mogu biti uzrok depresije. Ova hipoteza je takođe zasnovana i na osnovu zapažanja da antidepresivi svoje terapijske efekte ispoljavaju povećanjem nivoa monoamina na nivou sinapsi. U razjašnjavanju etiologije depresije, najveći broj istraživanja na području monoamina odnosi se na poremećaj funkcionisanja serotonininskog sistema. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) se sintetiše iz aminokiseline L-triptofana, gde se uz pomoć enzima triptofan hidroksilaze vrši hidroksilacija triptofana do 5-hidroksitriptofana, koji se potom dekarboksiluje pomoću enzima dekarboksilaze i nastaje serotonin (Slika 1). Antidepresivi koji pripadaju grupi selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI), blokiraju ponovni unos serotonina u presinaptičke neurone, povećavajući tako njegovu koncentraciju u sinapsi i time ublažavanja simptoma depresije (Nut i sar., 1999).



Slika 1. Sinteza serotonina iz aminokiseline triptofan. TH - triptofan hidroksilaza. Slika preuzeta i modifikovana sa sajta The Use of Tryptophan to Treat Depression - Institute of Neuro Innovation. <https://inifoundation.org/neuroscience-anthology-1/2018/7/30/the-use-of-tryptophan-to-treat-depression>

Pored serotonina i deficit **dopamina** se vezuje za nastanak depresije. Dopamin se sintetiše iz aminokiseline tirozina (Slika 2) i ima svoj specifični dopaminski transporter. Dopamin ima važnu ulogu u regulaciji sistema nagrađivanja, čiji poremećaj je usko povezan sa razvojem anhedonije (Der-Avakian i Markou, 2012). Anhedonija je emocionalno stanje koje se definiše kao nemogućnost osećaja zadovoljstva i gubitak interesovanja. Anhedonija je vrlo često ključni simptom depresije, ali i drugih mentalnih bolesti (Serretti, 2023). Istraživanja koja koriste neurooslikavanje (engl. *neuroimaging*), farmakološke i elektrofiziološke metode kod ljudi i na životinjskim modelima depresije su potvrdila povezanost poremećaja dopamina i depresije (Yadid i Friedman, 2008).

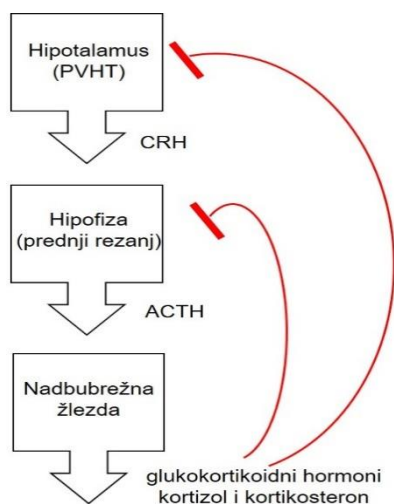


Slika 2. Sinteza dopamina iz aminokiseline L-tirozin. THD - tirozin hidroksilaza; L-DOPA - levodopa ili *l-3,4-dihydroxyphenylalanine*. Slika preuzeta i modifikovana sa sajta Part:BBa_K3633009 - parts.igem.org. https://parts.igem.org/Part:BBa_K3633009

Štaviše, značaj ravnoteže između serotonina i dopamina u regulisanju raspoloženja, a ne apsolutnih nivoa ovih neurotransmitera na receptorima je neophodna za normalno funkcionisanje mozga, stoga poremećaj u ravnoteži ovih neurotransmitera može dovesti do pojave depresije.

Za razliku od serotonina i dopamina, uloga **norepinefrina** u patofiziologiji depresije je manje poznata. Postoje istraživanja koja ukazuju na vezu između sniženog nivoa norepinefrina kao i poremećaja u funkciji norepinefrinskog transportera (Moret i Briley, 2011; Moriguchi i sar., 2017) i patofiziologije depresije.

1.1.2. Neuroendokrina hipoteza depresije



Slika 3. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina; PVHT - paraventricularno jedro hipotalamusa; CRH - kortikotropni hormon; ACTH - adrenokortikotropni hormon

Kao najčešći uzrok poremećaja raspoloženja navodi se faktor stresa. Stres je pojava koja se događa pri pokušaju organizma da se prilagodi nekoj iznenadnoj neprijatnoj životnoj situaciji i odražava se na psihičko i fizičko stanje. Fiziološki odgovor organizma na stres definiše se kao napor da se kontroliše stresna situacija i da se organizam zaštiti od oštećenja (McEwen i Seeman, 1999). Glukokortikoidi koji se oslobađaju iz nadbubrežnih žlezda kao odgovor na stres, u okviru delovanja HHA osovine negativno utiču na mozak, narušavajući neuronske mreže. Kao glavni organ koji učestvuje u odgovoru na stres, mozak je posebno osetljiv na dugotrajnu izloženost ovim hormonima, što može imati štetne posledice po strukturu i funkciju neurona. Pored toga ključna je i komunikacija između nervnog, endokrinog i imunskog sistema. Uspešnost adaptivnog odgovora organizma na stres se ogleda u brzom, efikasnom odgovoru na stresnu situaciju i uspostavljanju homeostaze u organizmu. Proces uspostavljanja stabilnosti organizma tj. homeostaze kroz fiziološke promene i promene u ponašanju se definiše kao „alostaza“ (McEwen i Gianaros, 2010).

Ukoliko se period adaptacije prekomerno produži, može doći do maladaptacije i stanja poznatog kao „alostatsko opterećenje“ (engl. *alostatic load*) (Goldstein i McEwen, 2002), koje prati i razvoj patoloških stanja kao što su depresija i anksioznost.

Stresne životne situacije dovode do psiholoških i fizioloških promena u organizmu uključujući i aktivaciju HHA osovine i simpatičkog nervnog sistema (Pariante, 2003).

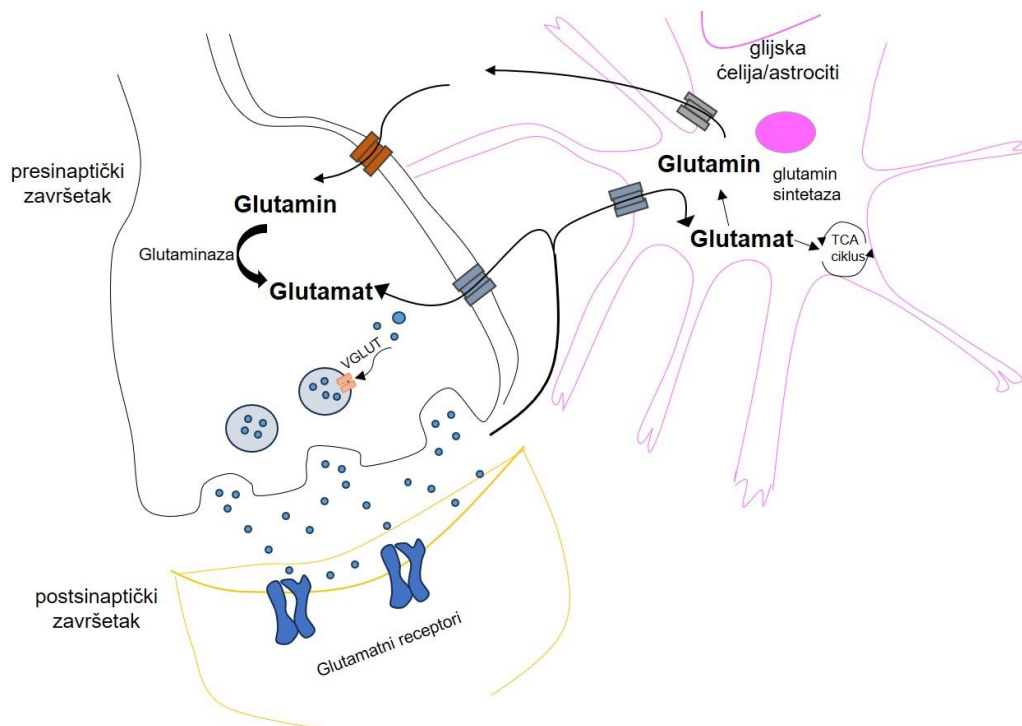
Delovanjem stresa dolazi do oslobađanja neurotransmitera serotonina, norepinefrina i acetilholina, koji utiču na aktivnost paraventrikularnog jedra hipotalamusa (PVHT), a time i na sintezu kortikotropnog - oslobađajućeg hormona (engl. *corticotropin - releasing hormone*, CRH). Pod uticajem ovog hormona dolazi do dalje sinteze adrenokortikotropnog hormona (engl. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) u prednjem režnju hipofize, što stimulise koru nadbubrežne žlezde na lučenje glukokortikoida, kod glodara i čoveka, tj., kortikosterona (CORT) i kortizola, s tim da je CORT zastupljen u manjoj meri kod čoveka (Nestler i sar., 2002) (Slika 3).

Glukokortikoidi su liposolubilni molekuli koji pripadaju klasi steroidnih hormona i koji lako prolaze kroz ćelijsku membranu i krvno-moždanu barijeru (KMB). Putem negativne povratne sprege glukokortikoidi smanjuju sekreciju i oslobađanje CRH i ACTH inhibirajući HHA osovinu, odnosno smanjuju sopstvenu sintezu i sekreciju (Nestler i sar., 2002) (Slika 3). U uslovima dugotrajnog stresa, izloženost organizma visokom nivou glukokortikoida dovodi do dugotrajne aktivacije HHA osovine i poremećaja funkcije negativne povratne sprege (Pariante, 2003). Kliničke studije podržavaju tvrdnju da je poremećaj u funkciji HHA osovine jedan od ključnih faktora za razvoj depresije (Menke, 2024), a veoma često zabeležena je hiperaktivnost HHA osovine kod depresivnih pacijenata (Pariante i Miller, 2001). Nasuprot ovome, ispitivanja su pokazala da koncentracija glukokortikoida u plazmi može biti i snižena ili nepromenjena kod depresivnih pacijenata (Gold i Chrousos, 2002; Krishnan i Nestler, 2008). Normalizacija funkcije HHA osovine i ujedno neuroendokrinog sistema nakon dugotrajnog delovanja antidepresiva može dovesti do ublažavanja kliničke slike depresije (Steckler i sar., 1999). Jedan od mehanizama nastanka ovih promena na molekulskom nivou je smanjenje koncentracije glukokortikoidnog receptora (GR) za koji se vezuju kortikosteroidi (kortizol). Od svih regiona sa smanjenom ekspresijom GR, smatra se da hipokampus, prefrontalni korteks (PFK) i hipotalamus najviše doprinose razvoju depresije (Shishkina i Dygalo, 2017). Hipokampus je jako podložan delovanju glukokortikoida (Brown i sar., 1999), a prekomerna izloženost kortizolu može negativno da utiče na neurone, neurogenezu i volumen hipokampusa (Berton i Nestler, 2006; Moica i sar., 2016).

1.1.3. Glutamatna hipoteza depresije

Kako antidepresivi iz klase SSRI kod nekih depresivnih pacijenata pokazuju manju efikasnost i često recidive (Boku i sar., 2018) pretpostavlja se da pored monoaminskih postoje drugi neurotransmiteri, koji su uključeni u patofiziologiju depresije. Jedan od takvih je i ekscitatorni neurotransmiter glutamat (Paul i Skolnick, 2003). Pored povećanja nivoa ekscitatornog glutamata kod depresije zabeležen je i poremećaj unutarćelijskih signalnih puteva regulisanih glutamatnim jonotropnim NMDA (N-metil-D-aspartat) i AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina) receptorima (Amidfar i sar., 2019; He i sar., 2023). Stoga se NMDA i AMPA receptori sve više potenciraju kao potencijalna mesta delovanja antidepresiva u lečenju depresije (Suzuki i sar., 2023; Wolak i sar., 2013; Zanos i sar., 2023). Neuroni ne mogu da *de novo* sintetisati glutamat iz glukoze, pa ovu funkciju preuzimaju astrociti. Nakon oslobađanja iz presinaptičkih završetaka, glutamat se transportuje u astrocite, gde se aktivnošću enzima glutamin sintetaze konvertuje u glutamin (Linsler i Moscona, 1982). Glutamin se zatim transportuje u neurone pomoću SNAT transportera, podleže deaminaciji u glutamat delovanjem glutaminaze, enzima koji pokazuje visok stepen ekspresije u neuronima, čime se ostvaruje glutamat-glutaminski ciklus (Slika 4). S obzirom da astrociti održavaju balans između preuzimanja i oslobađanja glutamata, mogu da predstavljaju terapeutske targete za bolesti CNS-a koje su povezane sa ekscitotoksičnošću

glutamata (Mahmoud i sar., 2019). Takođe u astrocitima glutamat se konvertuje u α -ketoglutarat, koji uključivanjem u Krebsov ciklus može poslužiti kao alternativni izvor adenozin trifosfata (ATP) u odsustvu glukoze (Mehta i sar., 2013; Schousboe i sar., 2014). Pored toga, reakcijom enzima glutamat dekarboksilaze, glutamat se konvertuje u GABA. Rezultati istraživanja u korteksu depresivnih pacijenata pokazali su nizak nivo glutamata/glutamina/GABA (Yildiz-Yesiloglu i Ankerst, 2006).



Sika 4. Glutamat-glutaminski ciklus. Objašnjenje u tekstu. VGLUT - vezikularni transporter za glutamat; TCA - ciklus trikarboksilnih kiselina (Krebsov ciklus)

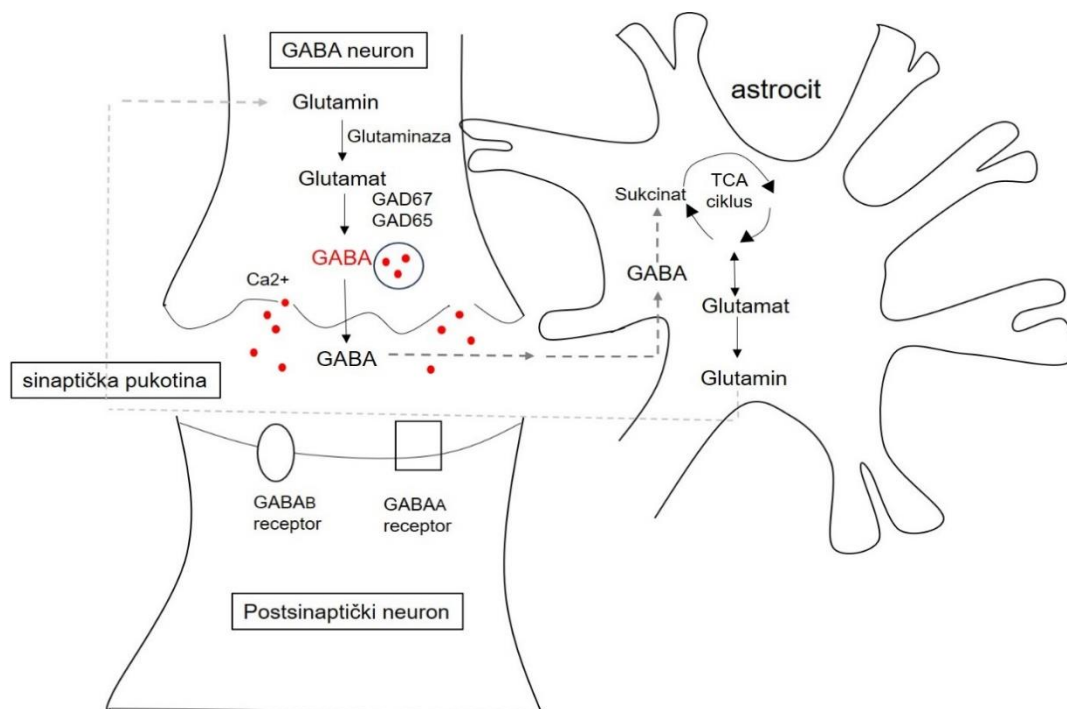
Pored glutamata, poremećaj u ravnoteži između glutamata i GABA može biti ključan u patofiziologiji terapijski rezistentne depresije (Vecera i sar., 2023). Noviji podaci ukazuju da je poremećaj navedene ravnoteže odgovoran za razvoj anksioznosti, naročito kod mladih žena (Johnstone i Cohen Kadosh, 2024), tako da se istraživanja sve više usmeravaju na pronalazak i usavršavanje antidepresiva koji ciljaju ova dva neurotransmitera.

1.1.4. GABA hipoteza depresije

Za održavanje homeostaze organizma važan je balans između inhibicije i ekscitacije u CNS-u, a koji omogućava uravnotežena signalizacija, posredovana inhibitornim i ekscitatornim neurotransmiterima (Petroff, 2002). Sintaza **GABA** se vrši iz L-glutamata delovanjem enzima glutamat dekarboksilaza 65 (GAD65) i glutamat dekarboksilaza 67 (GAD67) (Slika 5), što ukazuje na važnost ovih enzima u održavanju homeostaze organizma (Soghomonian i Martin, 1998). Neuron koji Ca^{2+} zavisnim procesom (Slika 5) oslobađaju GABA u sinaptičke pukotine, široko su rasprostranjeni u mozgu i od vitalne važnosti su za održavanje lokalnih neuronskih mreža, neuroplastičnosti i sveukupno funkcionisanje mozga (Fogaça i Duman, 2019). Štaviše, GABA transporter tip 1 i 3 (GAT-1 i GAT-3, respektivno) su dva glavna podtipa GAT odgovornih za prekid prenosa GABA i u regulaciji vanćelijskih koncentracija GABA tj. nvoa GABA koji se nalaze izvan ćelije, u sinaptičkom prostoru i međućelijskom okruženju CNS. GAT-1 transporter je lociran na presinaptičkim završecima neurona i na

membrani astrocita, dok je GAT-3 isključivo lokalizovan na astrocitima. Dejstvom GAT-1 i GAT-3 GABA se preuzima iz neurona u astrocite gde se metabolizuje do L-glutamata. Ovo kontinuirano recikliranje glutamata i GABA između neurona i astrocita predstavlja glutamat/GABA-glutamin ciklus (Slika 5) (Hampe i sar., 2017).

GABA neuroni ostvaruju guste neuronske veze između moždanih regiona uključenih u regulaciju depresije (Sarawagi i sar., 2021) i povezuju hipotalamus sa okcipitalnim i parietalnim korteksom; hipokampus sa PFK; nukleus akumbens (lat. *nucleus accumbens*, NAc) sa talamusom i ventralnom tegmentalnom oblasti (lat. *ventral tegmental area*, VTA)



Slika 5. Sinteza inhibitornog neurotransmitera gama amino buterne kiseline (GABA) i prikaz glutamat/GABA-glutamin ciklusa. GAD67 - glutamat dekarboksilaza 67; GAD65 - glutamat dekarboksilaza 65; TCA - ciklus trikarboksilnih kiselina (Krebsov ciklus)

Brojne studije su pokazale da stres dovodi do poremećaja u funkcionisanju GABA sistema u hipokampusu i PFK, koji se povezuju sa nizom psihijatrijskih oboljenja kao što su depresija i šizofrenija (Benes i Berretta, 2001; Czéh i sar., 2018, 2015). Metodom magnetne rezonance najizraženije smanjenje nivoa GABA neurotransmitera zabeleženo je kod pacijenata sa terapijski rezistentnom depresijom, u odnosu na kontrolu i pacijente koji pokazuju kliničku depresiju (Price i sar., 2009). Elektrokonvulzivna terapija, kao jedan od načina lečenja kliničke depresije, deluje stimulisanjem GABA signalizacije (Esel i sar., 2008). Literaturni podaci ukazuju i da je poremećaj nivoa GABA u astrocitima, uključen u patologiju kliničke depresije, kao i da su astrociti koji regulišu nivo GABA u CNS-u jedan od potencijalnih budućih terapijskih targeta u kliničkoj depresiji (Ali i sar., 2024). Takođe, snižena proteinska ekspresija enzima GAD67 u PFK, zabeležena je kod pacijenata koji pokazuju kliničku depresiju (Karolewicz i sar., 2010). Pored depresije, poremećaj GABA neurotransmisije koji uključuje i smanjenje i povećanje GABA aktivnosti zabeležen je u amigdali i hipokampusu socijalno izolovanih pacova koji su ispoljili ponašanje nalik anksioznom (Dimonte i sar., 2023; Sajdyk i sar., 2008).

Inhibitorni efekat GABA ostvaruje se vezivanjem za dve vrste receptora: jonotropne (GABA_A) i metabotropne (GABA_B) (Slika 5). Pokazana je uloga GABA_A receptora u antidepresivnom dejstvu ketamina (u sinergiji sa AMPA receptorom) i anksiolitičkom dejstvu benzodiazepina (Rowlett i sar., 2005; Sumner i sar., 2024). Za razliku od GABA_A receptora, poremećaj u ekspresiji ili aktivnosti GABA_B receptora nije konzistentno zabeležen kod depresivnih pacijenata (Pehrson i Sanchez, 2015).

1.1.5. Inflamacijska hipoteza depresije

Savremena istraživanja ukazuju i na vezu između inflamacije i depresije koja je postala tema sve većeg interesovanja u istraživanju mentalnog zdravlja (Dantzer i sar., 2008). Glavne rezidentne imunske ćelije CNS-a su ćelije mikroglije, koje čine oko 10% od svih ćelija mozga (Kim i De Vellis, 2005). One se aktiviraju u brojnim neurodegenerativnim i neuropsihijatrijskim bolestima i dovode do neuroinflamacije lučenjem važnih inflamacijskih medijatora. Citokini predstavljaju proteine koje u nervnom sistemu proizvode ćelije glije i neuroni. Među najčešće proučavanim citokinima jesu: faktor nekroze tumora alfa (TNF α), IL-6, IL-10, IL-1 β i interferon-alfa (INF- α), interferon-beta (INF- β), interferon-gama (INF- γ). Citokini imaju brojne pozitivne efekte, međutim, njihova prekomerna ekspresija može dovesti do brojnih poremećaja među kojima su poremećaj HHA osovine, neurotransmisije i neuroplastičnosti (Hassamal, 2023). Kod depresivnih pacijenata detektovan je povišen nivo proinflamacijskih citokina kao što su IL-6 i TNF α (Dowlati i sar., 2010), a terapija antidepresivima smanjuje nivo inflamacijskih citokina u serumu pacijenata (Hannestad i sar., 2011). Kao uzrok povišenog nivoa proinflamacijskih citokina u plazmi i u mozgu najčešće je psihosocijalni stres (Möller i sar., 2013; Zhou i sar., 1993). Pojava proinflamacijskih citokina najčešće je praćena oksidativnim i nitrozativnim stresom (Maes, 2008).

Inflamacijska teorija depresije zahteva dodatna istraživanja kako bi u potpunosti objasnila komplikovanu vezu između imunskog sistema i psiholoških simptoma, koji se javljaju kako kod depresije, tako i kod drugih mentalnih bolesti.

1.1.6. Neuroplastična i neurogena hipoteza depresije

Neuroplastičnost je proces koji uključuje adaptivno strukturalne promene (promene u fizičkoj strukturi mozga koje se dešavaju kao odgovor na promene u okruženju, iskustvima, učenju ili povredama i koje mu omogućavaju da se prilagođava, optimizuje funkciju i oporavlja) i funkcionalne promene mozga. Neuroplastičnost obuhvata formiranje i povlačenje sinapsi, spinogenezu (razvoj dendritskih trnova) i sinaptogenezu (formiranje sinapsi između neurona), formiranje i regeneraciju aksona, rast i formiranje dendrita (Albert, 2019). Kod depresije uočen je smanjen nivo neurotrofnog faktora poreklom iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*; BDNF) koji vezivanjem za tirozin-kinazni receptor B (engl. *tyrosine receptor kinase B*, TrkB) aktivira različite signalne puteve preko kojih deluje na rast, diferencijaciju, preživljavanje neurona i sinaptičku plastičnost (Licznernski i Jonas, 2018; Park i Poo, 2013). *Post-mortem* istraživanja na humanim uzorcima su pokazala snižen nivo iRNK i proteinsku ekspresiju BDNF u mozgu i serumu depresivnih pacijenata (Banerjee i sar., 2013; Karege i sar., 2002). Rezultati istraživanja na životinjskom modelu depresije i šizofrenije su pokazali da stres socijalne IZ snižava proteinsku ekspresiju BDNF u hipokampusu pacova (Murínová i sar., 2017). SSRI antidepresivi i ketamin su u hipokampusu ostvarili antidepresivni efekat vraćajući BDNF na kontrolni nivo (Björkholm i Monteggia, 2016). Pored BDNF za plastičnost neurona vezuje se i ekspresija neposrednih ranih gena (engl.

immediate early genes, IEGs), među kojima je i *c-fos*. Rani geni se koriste kao molekularni markeri za populacije ćelija (neurona i ćelija glije) koje prolaze kroz plastične promene, naročito pri formiranju dugotrajne memorije (Minatohara i sar., 2016) koja može biti oštećena depresijom. Poremećaj plastičnosti u hipokampusu pacijenata sa depresijom između ostalog obuhvata i smanjenje volumena hipokampusa (Chan i sar., 2016) i često se vezuje za atrofiju neurona (Duman i Aghajanian, 2012). Vraćanje volumena hipokampusa na fiziološki nivo nakon dejstva antidepresiva paroksetina, ukazuje da su ove promene reverzibilnog karaktera (Vermetten i sar., 2003).

Kod depresivnih pacijenata zabeležen je poremećaj neurogeneze, što je osnovna teza neurogene hipoteze depresije (Jacobs i sar., 2000). Adultna neurogeneza, proces u kojem se formiraju novi neuroni ili ćelije koji se odvija u subventrikularnoj zoni lateralnih komora (Buylla i Verdugo, 2002) i subgranularnoj zoni dentatnog girusa, DG (zubata vijuga, lat. *gyrus dentatus*) hipokampusa, koje predstavljaju glavne neurogene niše kod adulta (Kempermann i sar., 2018), prvo je zabeležena kod glodara (Altman i Das, 1965), a zatim i kod čoveka (Eriksson i sar., 1998). Dugotrajni tretmani antidepresivima, podstiču neurogenezu u hipokampusu adultnih životinja (Malberg, 2004) i tako ostvaruju svoj antidepresivni efekat. Pored antidepresiva, pokazano je i da atipični antipsihotici, među kojima je i olanzapin (Olz), utiču na povećanje neurogeneze u hipokampusu kontrolnih, adultnih miševa (Chikama i sar., 2017). Takođe, Olz podstiče i neuroplastičnost i formiranje sinapsi, aktivacijom neurotrofina (Lieberman i sar., 2005).

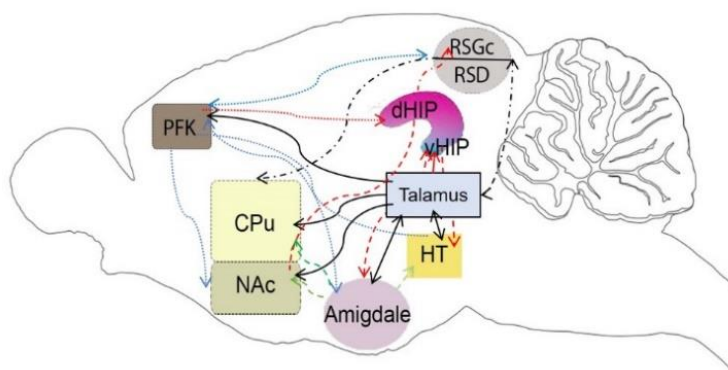
1.1.7. Mitohondrijska hipoteza depresije

Za normalno funkcionisanje mozga neophodna je velika količina energije, koju neuroni najčešće dobijaju procesom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Mitohondrije takođe učestvuju i u ćelijskoj apoptozi, potrošnji kiseonika i proizvodnji slobodnih radikala. Mutacije u mtDNK, takođe mogu biti u vezi sa depresijom, jer dovode do narušavanja kognitivnih funkcija (Suomalainen i sar., 1992). Oksidativna oštećenja mtDNK praćena su često proizvodnjom proinflamacijskih citokina karakterističnih za depresiju. Štaviše, mitohondrije pokazuju promene u metaboličkoj aktivnosti u odgovoru na stresore kao i signalne puteve leka koji se vezuju za određene receptore, pri čemu poremećaj energetskog metabolizma u različitim moždanim regionima predstavlja jedan od uzroka razvoja depresije. Tako, nesinaptičke mitohondrije vezane za post-sinaptičke kompartimente oslikavaju promene na nivou ekspresije proteina, kao jednog od mehanizama prilagođavanja ćelije na dugotrajnu izloženost stresu ili (odložene) terapijske efekte antidepresiva. Sa druge strane, mitohondrije locirane u sinaptičkim završecima na presinaptičkoj membrani značajne su za jonsku homeostazu i neurotransmisiju, što reflektuje dinamičku prirodu sinapsi (Stauch i sar., 2014). U zavisnosti od lokalizacije u ćeliji i stresora, mitohondrije pokazuju promene u broju, veličini, ekspresiji i funkcionalnosti enzima oksidativne fosforilacije i signalne transdukcije (Manoli i sar., 2007). Proteomska istraživanja na životinjskom modelu dugotrajnog nepredvidivog blagog stresa ukazala su na deregulaciju proteina koji učestvuju u oksidativnoj fosforilaciji u PFK pacova (Yang i sar., 2013). Dugotrajni blagi stres inhibira oksidativnu fosforilaciju i oštećuje samu strukturu mitohondrija u korteksu, hipokampusu i hipotalamusu miševa (Gong i sar., 2011; Rezin i sar., 2008). U frakciji obogaćenoj nesinaptičkim mitohondrijama PFK socijalno IZ pacova, zabeležen je efekat antidepresiva fluoksetina na ekspresiju proteina oksidativne fosforilacije, što ukazuje na uticaj fluoksetina na energetski metabolizam mitohondrija (Filipović i sar., 2022).

Zbog heterogenosti i kompleksnosti depresije, nijedna od navedenih hipoteza ne opisuje u potpunosti etiologiju depresije. Stoga su neophodna dodatna istraživanja u cilju pojašnjavanja molekulskih i biohemijskih procesa koji leže u osnovi depresije.

1.2. Moždani regioni uključeni u odgovor na dugotrajni stres

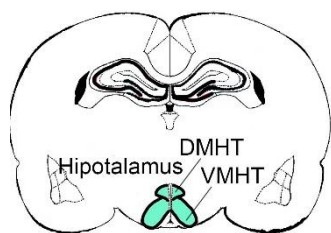
Mozak je najsloženiji organ ljudskog tela koji upravlja svim vitalnim funkcijama i ima ključnu ulogu u odgovoru na stres. Tehnika neurooslikavanja mozga i pozitronska emisijska tomografija pacijenata sa depresijom pokazala je abnormalnosti u funkciji moždanih regiona i to: PFK, cingulatnom korteksu, strijatumu, hipokampusu, talamusu i amigdalama (Drevets, 2001; Mayberg, 2003). Uočena je i disfunkcija HHA osovine kod depresivnih pacijenata. Najčešće zabeležene promene u moždanim regionima ovih pacijenata su smanjenje zapremine sive mase i gustina glijskih ćelija u PFK i hipokampusu (Deutch i sar., 1991). Prema položaju u mozgu korteks, hipokampus, amigdale i strijatum (Mattis i Rabinovitz, 2014) su deo velikog mozga (lat. *telencephalon*), dok su talamus i hipotalamus deo međumozga (lat. *diencephalon*) (Felten i sar., 2016) (Slika 6).



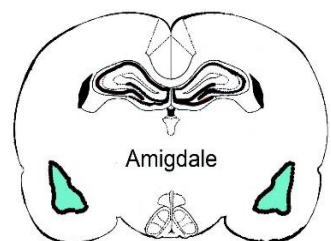
Slika 6. Šematski prikaz aferentnih i eferentnih veza između moždanih regiona pacova najčešće pogođenih dugotrajnim stresom. Objašnjenje u tekstu. PFK - prefrontalni korteks, RSGc - retrosplenijalni granularni korteks, c region, RSD - retrosplenijalni agranularni korteks, CPU - kaudoputamen (lat. *caudate putamen*), NAc - nukleus akumbens (lat. *nucleus accumbens*), dHIP - dorzalni hipokampus, vHIP - ventralni hipokampus, HT - hipotalamus

Socijalna IZ kao faktor stresa utiče na funkcionisanje **hipotalamusa** (Slika 7) a što utiče na aktivnost HHA osovine. Ovaj moždani region je uključen u kontrolu cirkadijalnog ritma, apetita i kognitivnih funkcija, često pogođene depresijom (Bao i Swaab, 2019). Hipotalamus ima kompleksne neuronske veze, koje su u najvećem broju dvosmerne (aferentne i eferentne). Neuronske veze ostvaruje i sa hipokampusom, amigdalama i talamusom (Anschel i sar., 1982; Bear i sar., 2022). Sastoji se iz velikog broja jedara, među kojima su: PVHT, suprahijazmatsko, supraoptičko, dorzomedijalno jedro hipotalamusa (DMHT), ventromedijalno jedro hipotalamusa (VMHT), lučno jedro i mamilarna jedra (Dougherty, 2020). Jedno od najviše izučavanih jedara je PVHT koje ima potencijalnu ulogu

u kontroli stresa i aktivnosti HHA osovine, metabolizma, rasta, reprodukcije, imunskog sistema i drugih funkcija (Ferguson i sar., 2008).



Slika 7. Položaj dorzomedijalnog jedra hipotalamusa (DMHT) i ventromedijalnog jedra hipotalamusa (VMHT) na koronalnom preseku mozga pacova



Slika 8. Položaj amigdala na koronalnom preseku mozga pacova

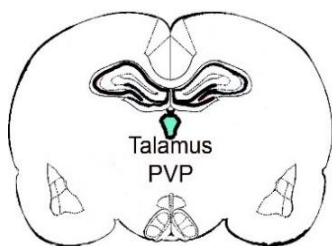
Pored PVHT, u fokusu istraživanja su DMHT i VMHT, zbog njihove uključenosti u odgovoru na stres psihološke prirode (Henderson i Macefield, 2021). VMHT ima važnu funkciju u kontroli anksioznosti što potvrđuju istraživanja na genetski modifikovanim miševima za steroidogeni faktor koji ispoljavaju ponašanje nalik anksioznom (Zhao i sar., 2008). Dugotrajna upotreba antipsihotika, među kojima je i Olz, često je praćena povećanjem telesne mase i inflamacijom, što je pokazano kao potencijalna posledica efekta koji tretman Olz ostvaruje na hipotalamus (He i sar., 2021).

U regulaciju HHA osovine pored hipotalamusa, uključene su i **amigdale** ili bademasta jedra (Weidenfeld i sar, 2017) (Slika 8). U amigdali razlikujemo jedra: bazolateralni kompleks (lateralno, bazalno i bazomedijalno jedro), kortikalni kompleks (kortikalno i jedro lateralnog olfaktornog puta) i centromedijalni kompleks (centralno i medijalno jedro) (Yang i Wang, 2017). Ovaj moždani region ima važnu ulogu u kontroli emocija, posebno straha, a bazolateralni kompleks amigdala se smatra kao veoma važan za razvoj anksioznog stanja (Lowry i Hale, 2010).

Hiperaktivacija amigdala i HHA osovine može dovesti do povećanog nivoa kortizola u plazmi (Gotlib i sar., 2008). Povećana sinteza kortizola dovodi do pojačane ekspresije gena za sintezu serotoninskog transportera na presinaptičkoj membrani, koji posledično povećava preuzimanje serotonina i smanjuje njegovu koncentraciju u sinaptičkoj pukotini (Tafet i sar., 2001), što se povezuje sa nastankom depresije. Povećana ekspresija faktora inflamacije u amigdalama sve se više vezuje za razvoj depresije i anksioznosti (Hu i sar., 2022). Literaturni podaci ukazuju da je kod mentalnih bolesti često detektovan poremećaj neuronskih veza (Slika 6) koje amigdale ostvaruju sa PFK, dorzalnim i ventralnim hipokampusom (dHIP i vHIP) (Ghasemi i sar., 2021; Price i Drevets, 2010; Zhong i sar., 2011), talamusom, hipotalamusom (Bao i Swaab, 2019; Fischer, 2021; Zhao i sar., 2021) i NAc (Fassett-Carman i sar., 2023). Promena aktivnosti amigdala i PFK tokom obrade emocija zapažena je nakon dugotrajnog tretmana Olz kod pacijenata obolelih od šizofrenije (Blasi i sar., 2009).

Talamus (Slika 9) je moždani region sa posebnim anatomskim položajem jer posreduje u vezi između kortikalnih i subkortikalnih regiona. Funkcionalno, talamus je podeljen na pet jedara: retikularno ili intralaminarno jedro koje učestvuje u regulaciji bola i uzbuđenja, senzorno jedro koje je odgovorno za sve senzorne signale osim olfaktornog, efektorno jedro koje upravlja govornom motorikom, asocijativno jedro koje učestvuje u obavljanju kognitivnih funkcija i limbička jedra koja su uključena u kontrolu motivacije i

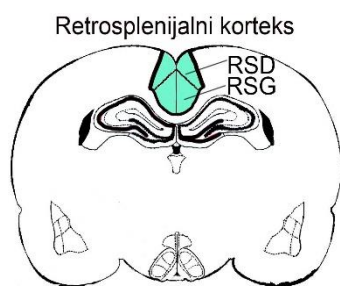
raspoloženja (Torrico i Munakomi, 2023). Kliničke studije povezuju promenu funkcije talamusa sa depresijom (Yang i sar., 2023).



Slika 9. Položaj paraventrikularnog jedra talamusa, posteriorni deo (PVP) na koronalnom preseku mozga pacova

Paraventrikularno jedro talamusa (PVT) igra značajnu ulogu u regulaciji emocionalnih i stresnih odgovora, što ga čini relevantnim za razumevanje depresije. PVT može biti anteriorno i posteriorno (PVP). Povećana neuronska aktivnost ovog jedra talamusa uključena je u patologiju depresije i u odgovoru na tretman antidepresivima (Zhao i sar., 2021). Preciznije, glutamatni neuroni u PVT aktivirani su dugotrajnim, nepredvidim stresom i dovode do razvoja ponašanja nalik depresivnom, dok suzbijanje aktivnosti PVT neurona izaziva antidepresivni efekat kod mužjaka pacova, ali ne i ženki.

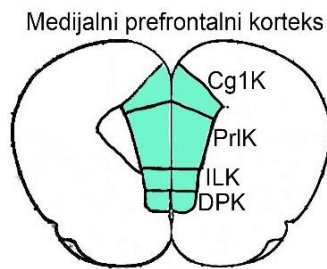
Takođe, PVT pokazuje snažne projekcije ka centralnoj amigdali, a aktivacija neurona koji projektuju između ova dva moždana regiona indukuje ponašanje povezano sa depresijom ili povećava podložnost stresu (Zhao i sar., 2021). Ovi rezultati ukazuju da PVT ima važnu ulogu u kontroli depresije, a sama projekcija PVT-centralna amigdala reguliše ponašanje povezano sa depresijom u zavisnosti od pola korišćenog životnjskog modela, što potencijalno predstavlja jedan od esencijalnih puteva za morbiditet i lečenje depresije (Zhao i sar., 2021). PVT zbog svoje anatomske pozicije ima važnu funkciju u regulaciji anksioznog poremećaja. Uključenost PVT u regulaciji anksioznog poremećaja, potvrđuje i velika gustina oreksinskih vlakana detektovanih u ovom jedru talamusa, za koje je u literaturi pokazano da su uključeni u odgovoru na strah i modulaciju anksioznosti (Kirouac, 2021). Naročito važnu funkciju u anksioznom ponašanju ima upravo PVP (Barson i sar., 2020).



Slika 10. Položaj retrosplenijalnog korteksa (engl. *retrosplenial dysgranular cortex*, RSD; engl. *retrosplenial granular cortex*, RSG) na koronalnom preseku mozga pacova

Pored talamusa i **retrosplenijalni korteks (RSK)** (Slika 10) posreduje u komunikaciji između kortikalnih i subkortikalnih regiona. RSK deo je neokorteksta i smešten je u kaudalnom/posteriornom delu cingulatnog korteksa. Dva dela ovog regiona su granularni (engl. *retrosplenial granular cortex*, RSG) i agranularni (engl. *retrosplenial dysgranular cortex*, RSD) korteks (Aggleton i sar., 2021). RSK prima direktne signale iz dorzalnog područja Amonovog roga 1 (lat. *cornu Ammonis 1*, CA1) i subikuluma (Cenquizca i Swanson, 2007; Wyass i Van Groen, 1992) i ostvaruje komunikaciju sa talamusom, prefrontalnim, cingulatnim, parijetalnim i vizuelnim korteksom (Mitchell i sar., 2018), kao i sa dorzomedijalnim strijatumom (Monko i Heilbronner, 2021).

RSC je ključan za obradu epizodnog pamćenja i emocija, a lezije istog dovode do retrogradne amnezije (Maddock, 1999; Vann i Nelson, 2015). RSK je potencijalno mesto delovanja antipsihotika, s obzirom da Olz i klopazpin (Klz) sprečavaju neuropatološke promene izazvane delovanjem dizocilpina (antagonista NMDA receptora) na NMDA receptore. Sinergijski efekat Olz i Klz može doprineti terapeutskom efektu u lečenju pacijenata obolelih od šizofrenije (Fujimura i sar., 2000). Međutim, ovaj moždani region još uvek zahteva dodatna istraživanja o svojim funkcijama i vezama koje ostvaruje sa drugim regionima mozga (Mitchell i sar., 2018).



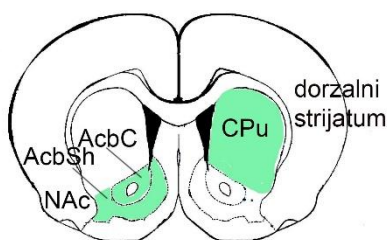
Slika 11. Položaj podregiona medijalnog prefrontalnog korteksa, prednja cingulatna kora 1 (Cg1K), prelimbički podregion medijalnog prefrontalnog korteksa zone cerebruma (PrlK), infralimbički podregion (ILK) i dorzalna pedunkularna kora (DPK) na koronalnom preseku mozga pacova

PFK je moždani region koji takođe učestvuje u integraciji funkcija između kortikalnih i subkortikalnih regiona. Ovaj region ima važnu funkciju u kontroli emotivnih i kognitivnih procesa i njegova struktura kao i funkcija su vrlo često oštećene kod pacijenata obolelih od depresije, anksioznosti, šizofrenije, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Xu i sar., 2019). **Medijalni prefrontalni korteks (mPFK)** (Slika 11) je ključni kortikalni region gde duž dorzalno ventralne ose razlikujemo neuroanatomske podregione: prednja cingulatna kora 1 (Cg1K), prelimbički podregion medijalnog prefrontalnog korteksa zone cerebruma (PrlK), infralimbički podregion (ILK) i dorzalna pedunkularna kora (DPK) (Heidbreder i Groenewegen, 2003). Neuronska mreža u mPFK se najvećim delom sastoji iz ekscitatornih piramidnih neurona a u manjem procentu inhibitornih neurona (Xu i sar., 2019). Među inhibitornim neuronima najzastupljeniji su GABA interneuroni kao što su PV+, somatostatin pozitivni (+) interneuroni, vasoaktivni intestinalni-peptid pozitivni (+) interneuroni i holinski neuroni (Gabbott i sar., 1997; Kawaguchi i Kubota, 1997, 1993). PFK ostvaruje aferentne veze sa bazolateralnim amigdalama, talamusom i vHIP, a eferentne veze sa NAc, dHIP i bazolateralnim amigdalama (Sigurdsson i Duvarci, 2016; Xu i sar., 2019).

Izmenjena ravnoteža ekscitacije/inhibicije u mPFK predstavlja potencijalni uzrok depresije (Fogaça i Duman, 2019). U *post-mortem* studijama depresivnih pacijenata zabeleženo je smanjenje volumena, broja sinapsi i sinaptičkih markera PKF koje je u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti (Kang i sar., 2012). Kod anksioznosti često je zabeležen poremećaj neuronskih veza između mPFK i bazolateralnih amigdala (Adhikari i sar., 2015; Felix-Ortiz i sar., 2016), kao i mPFK i vHIP (Sigurdsson i Duvarci, 2016). Studije neurooslikavanja pokazale su da antipsihotici koji imaju slabiji antagonistički afinitet ka dopaminskom D₂ receptoru i koji su antagonisti 5-HT₂ receptora, među kojima i Olz, imaju funkciju u očuvanju ili povećavanju aktivnosti PFK u poređenju sa antipsihoticima sa jakim antagonističkom aktivnošću na D₂ receptor, što ima potencijalni terapijski efekat u lečenju negativnih simptoma šizofrenije (Liemburg i sar., 2012).

Strijatum (Slika 12) je kompleksna i heterogena struktura koja posreduje u komunikaciji između korteksa, talamusa i limbičkih struktura (Guo i sar., 2015). Strijatum je

podeljen na dorzalni deo koji čine repato jedro (lat. *nucleus caudatus*) koje ima ulogu u kognitivnim funkcijama i ljuska (lat. *putamen*) sa funkcijom u kontroli motorike.



Slika 12. Položaj nukleus akumbens-a: *accumbens nucleus, core* i *accumbens nucleus, shell* (AcbC, AcbSh) i dorzalnog strijatuma, kaudoputamen (CPu) na koronalnom preseku mozga pacova

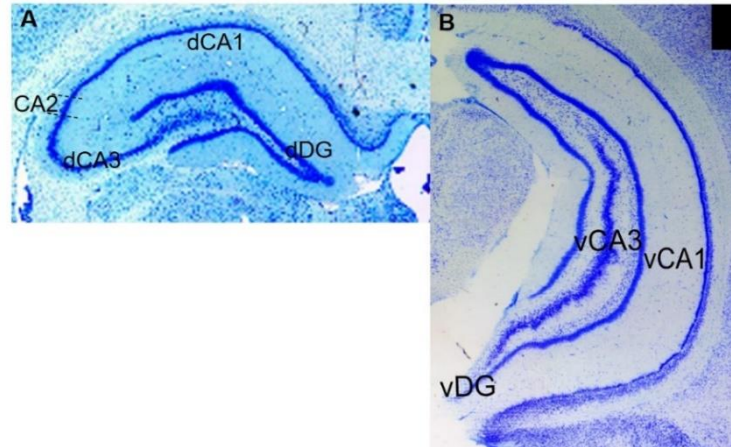
Oba jezdra čine kaudoputamen (CPu), dok su jezgro NAc (lat. *accumbens nucleus core*, AcbC) i omotač NAc (lat. *accumbens nucleus shell*, AcbSh) uključeni u sastav ventralnog strijatuma tj. NAc, čija je funkcija u kontroli emocija. Veći deo ćelija strijatuma jesu GABA neuroni koji protežu svoje nervne završetke izvan strijatuma (Fahn i sar., 2011). U strijatumu su zastupljene tri vrste GABA interneurona: PV+, kalretinin+ i somatostatin+ (Fahn i sar., 2011). Na osnovu zastupljenosti dopaminskih receptora, razlikujemo dva tipa ovih ćelija: one koje sadrže D1 receptor i neurotransmitere supstancu P i dinorfin i one koje sadrže D2 receptor i neurotransmiter enkefalin (Fahn i sar., 2011).

Istraživanja na pacijentima kod kojih je smanjen volumen i u repatom jedru (Krishnan i sar., 1992) i ljuski (Krishnan i sar., 1992; Husain i sar., 1991) potvrđuju promene u CPu kod depresije. Takođe, oštećenja strukture repatog jezdra pokazuju pozitivnu korelaciju sa suicidalnim ponašanjem pacijenata (Dombrovski i sar., 2012). NAc se navodi kao ključni deo mozga koji je pogođen kod pacijenata kod kojih je detektovana depresija sa simptomima anhedonije (Hu i sar., 2023). U osnovi anhedonije nalazi se poremećaj sistema za nagrađivanje koji reguliše našu sposobnost da osetimo zadovoljstvo. Ovaj sistem nagrađivanja čine signalni putevi između VTA, NAc, mPFC, hipokampusa, amigdala, lateralnog hipotalamusa, lateralne habenule i lateralnog dorzalnog tegmentuma (Russo i Nestler, 2013). Kako je strijatum bogat dopaminskim receptorima, često se vezuje za terapeutsko delovanje antipsihotika, koji svoje efekte ostvaruju i preko ovih receptora. U literaturi je pokazano da antipsihotici ostvaruju i svoje terapeutske ali i neželjene - ekstrapiramidne efekte (engl. *extrapyramidal side effects*, EPSE) blokiranjem D₂ receptora (Kapur i sar., 2000; Kasper i sar., 1999). EPSE su karakteristični za prvu generaciju antipsihotika tj. tipičnih antipsihotika ali ne i za noviju generaciju atipičnih antipsihotika među kojima je i Olz.

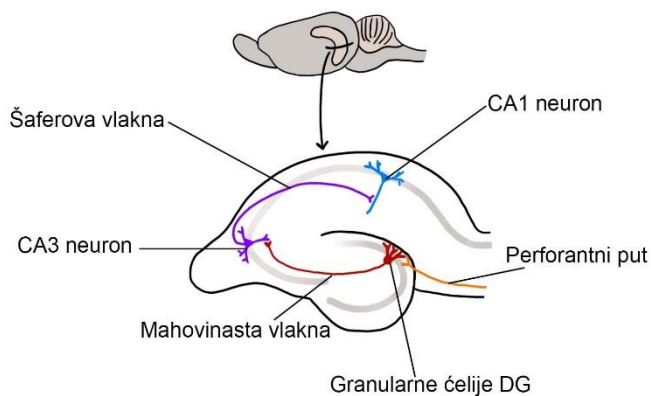
1.2.1. Hipokampus

Kod čoveka hipokampus se nalazi u unutrašnjem delu temporalnog režnja blizu njegove medijalne strane ispod kortikalnih površina i neposredno iznad amigdale. Kod pacova, hipokampus se nalazi između cerebralnog korteksa i talamusa, neposredno iznad amigdale. Ovaj moždani region sastoji se iz subikuluma, Amonovog roga (lat. *cornu Ammonis*, CA) i DG. CA je struktura u obliku latiničnog slova „C“ koje se dele na podregione CA1, CA2, CA3 i CA4. Podregion CA4 se definiše i kao deo polimorfnog sloja DG (Andersen i sar., 2006), stoga se ređe u literaturi izdvaja kao zaseban podregion. Po uzdužnoj osi hipokampusa razlikujemo dHIP i vHIP (Slika 13). CA2 podregion (Lorente de Nò, 1934), je manje istražena struktura hipokampusa zbog male veličine i translacionog položaja između CA1 i CA3. U podregionima CA1, CA2 i CA3 ćelije su slojevito organizovane u *stratum oriens* (SO), piramidni sloj (lat. *stratum pyramidale*, SP), *stratum radiatum* (SR) i *stratum lacunosum moleculare* (SLM), dok kod DG podregiona razlikuju se molekularni sloj (ML),

granularni sloj (GCL) i *hilus* (H). Piramidne ćelije najgušće su raspoređene u podregionu CA1, u odnosu na CA2 i CA3. Oko 90% ćelija hipokampusa jesu granularne i piramidne glutamatne ćelije (Olbrich i Braak, 1985), a preostalih 10% su GABA interneuroni (Olbrich i Braak, 1985). Funkcija hipokampusa je u održavanju homeostaze organizma (regulacija HHA osovine), formiranju memorije (epizodne, prostorne i kontekstualno uslovljavanje straha) karakteristično za dHIP i regulaciji emocija karakteristično za vHIP (Fanselow i Dong, 2010).



Slika 13. Anatomski prikaz podregiona tioninom obojenog, koronalnog preseka dorzalnog hipokampusa (A) i ventralnog hipokampusa (B) pacova, d - dorzalni, v - ventralni, CA - *cornu Ammonis*, DG - dentatni girus (lat. *gyrus dentatus*)



Slika 14. Trisinaptička petlja. Objašnjenje u tekstu. Preuzeto sa sajta <https://uen.pressbooks.pub/introneuro/chapter/the-hippocampal-slice>

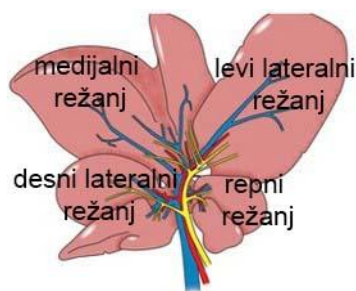
U hipokampusu jedan od glavnih puteva prenosa informacija je put definisan kao trisinaptička petlja. Počinje perforantnim putem direktnim prenosom informacija od entorinalnog korteksa (EK) do CA1, ili indirektnim od EK preko granularnih ćelija DG koje potom šalju informacije do piramidnih ćelija CA3 i CA1 podregiona preko mahovinastih vlakana (engl. *mossy fibers*). Podregion CA3 dalje šalje signale preko šaferovih kolaterala do piramidnih CA1 neurona, koji nadalje šalju signal u subikulum i izvan EK (Andersen, 1975) (Slika 14).

Takođe, podregion CA1 prima i jake ekscitatorne signale iz CA2 (Chevalleyre i Siegelbaum, 2010), a piramidne ćelije CA2 primaju signale iz EK (Cui i sar., 2013), indirektno iz CA3 (Kohara i sar., 2014) i slabiji ekscitatorni input iz DG.

Anatomski i funkcionalno hipokampus ostvaruje najveći broj neuronskih veza sa amigdalama i PFK (McEwen i Gianaros, 2010). Pored toga, ostvaruje veze i sa RSK, hipotalamusom, talamusom i strijatumom. Na osnovu strukture i funkcije, u hipokampusu razlikujemo dHIP i vHIP (Fanselow i Dong, 2010). Dorzalni hipokampus odgovara posteriornom hipokampusu kod primata, dok ventralni odgovara anteriornom hipokampusu kod primata. Za razliku od dHIP, kod ventralnog nemamo podregion CA2 (Fanselow i Dong, 2010), mada postoje literaturna neslaganja oko prisustva ovog podregiona. Takođe, uticaj glukokortikoida na neuralne progenitorske ćelije subgranularne zone DG, koje imaju sposobnost diferenciranja u neurone i glijske ćelije u mozgu odraslih (adultna neurogeneza), zapaženiji je u vHIP u odnosu na dHIP (Levone i sar., 2021). Pored razlike u strukturi i funkciji, između dHIP i vHIP postoje razlike i u neuronskim vezama koje ostvaruju sa drugim moždanim regionima. Među važnijim neuronskim vezama koje dHIP ostvaruje jesu veze CA1 i subikuluma sa RSK (Slika 6) i prednjim cingulatnim korteksom, koja učestvuje u regulaciji prostorne orijentacije, učenja i memorije (Bredewold i sar., 2015; Fanselow i Dong, 2010). U vHIP za kontrolu emocija i anksioznosti najvažnija je prethodno spomenuta veza između ventralnog subikuluma, ventralnog CA1 (vCA1) i amigdala (Pitkänen i sar., 2000), kao i vCA i mPFK (Padilla-Coreano i sar., 2016).

Delovanjem dugotrajnog stresa smanjena je gustina sinapsi u CA1/CA3 podregionima u životinjskim modelima za ponašanje nalik depresivnom (Qiao i sar., 2014). Takođe, u CA3 podregionu pod delovanjem dugotrajnog stresa dolazi do skraćivanja dendrita i smanjenog grananja što čini hipokampus manje efikasnim u regulaciji aktivnosti HHA osovine, ujedno povećava oslobađanje glukokortikoida i doprinosi oštećenju prostorne memorije (Conrad, 2006). U pretkliničkim istraživanjima je pokazano da prekomerna aktivnost dCA3 dovodi do kognitivnog deficita, dok smanjena aktivnost vCA3 dovodi do razvoja anksioznosti (Liu i sar., 2024). U kliničkim istraživanjima depresije, sve se više ističe smanjenje volumena podregiona CA1 kao potencijalnog markera kliničke depresije (Roddy i sar., 2019). Glukokortikoidi pokazuju izuzetno visok afinitet prema CA2 podregionu i utiču na smanjenje gustine „nepiramidnih“ neurona ovog podregiona, što može da doprinese patologiji manične depresije i šizofrenije (Benes i sar., 1998). Najčešće, ovaj podregion ostvaruje funkciju u socijalnoj memoriji za koju je od važnosti veza CA2 i PVHT (Smith i sar., 2016). Pored spomenute veze, za socijalnu memoriju bitne su i inervacije koje CA2 prima iz DG (Diethorn i Gould, 2023) koji kontroliše protok informacija iz kortikalnih regiona i učestvuje u procesima učenja, formiranja memorije (Stone i sar., 2011) i regulaciji raspoloženja. Pored smanjenog procesa neurogeneze, koji se najčešće spominje kao posledica delovanja depresije na DG (Sahay i sar., 2007), zabeležen je i smanjen volumen i atrofija DG neurona (Travis i sar., 2015). Takođe, kod pacijenata sa depresijom nakon elektrokonvulzivne terapije (Nuninga i sar., 2020) ili terapije antidepresivima (Boldrini i sar., 2009) zabeležen je porast volumena DG. Poremećaj ekscitatornih sinapsi u hipokampusu može da uzrokuje ponašanje nalik depresivnom kod laboratorijskih životinja, a sam hipokampalni transkripcijski koaktivator PGC1- α ima važnu ulogu u modulaciji broja ekscitatornih sinapsi. Naročito je veliki uticaj PGC1- α na sinapse u DG i samim tim u regulaciji ponašanja nalik depresivnom, što samo potvrđuje važnost DG u razvoju depresije (Deng i sar., 2024). Takođe, podregioni hipokampusa pored toga što su uključeni u razvoj psihotičnih poremećaja, predstavljaju i ciljna mesta delovanja antipsihotika (Wu Chou i sar., 2014).

1.3. Jetra



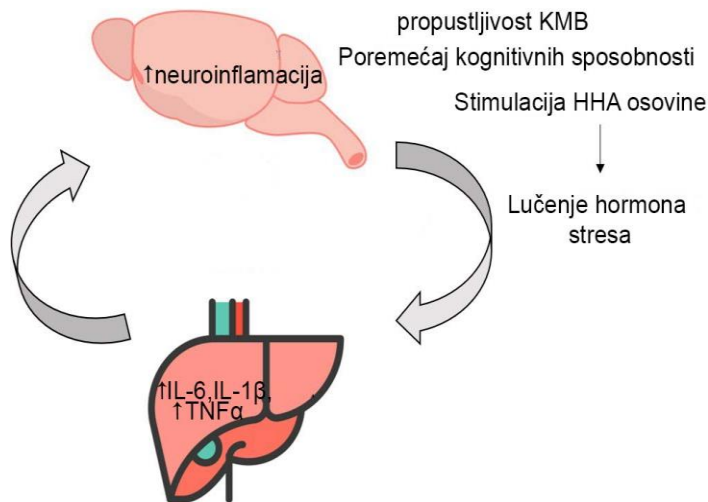
Slika 15. Šematski prikaz jetre. Objašnjenje tekstu. Slika preuzeta i modificirana od Beal i sar., 2017.

Jetra je esencijalni organ u telu čoveka sa velikim brojem funkcija. Sastoji se iz četiri režnja: desni lateralni, levi lateralni, medijalni režanj (kvadratni) i repni režanj (Slika 15). Parenhim unutar režnjeva deli se na veći broj manjih režnjića tj. lobulusa koje čine grupe ćelija. Glavni tipovi ćelija jetre jesu hepatociti koji čine oko 70% jetre, zvezdaste ćelije jetre, Kupferove ćelije i endotelne ćelije sinusoidnih kapilara (Ding i sar., 2016). Ovaj organ učestvuje u metabolizmu lipida, ugljenih hidrata i proteina; proizvodi albumine; učestvuje u detoksikaciji organizma od štetnih materija i neutrališe lekove i alkohol.

Zbog svoje metaboličke aktivnosti izuzetno je podložna oksidativnom stresu. Antioksidativni sistem jetre je pod centralnom kontrolom transkripcionog faktora - nuklearnog faktora 2 povezanog sa nuklearnim eritroidom 2 (engl. *NF-E2-related factor 2*, Nrf2). Nrf2 se u bazalnim uslovima nalazi u citoplazmi vezan za protein Keap1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein1*) i podvrgnut je stalnoj ubikvitinaciji i degradaciji. Nrf2 se ponaša kao senzor za redoks status jetre, koji se pri povišenom nivou reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) oslobađa od proteina Keap1, premešta u jedro i učestvuje u transkripciji ciljnih gena za sintezu antioksidativnih enzima i enzima koji učestvuju u detoksikaciji jetre (Zhang i sar., 2013). Delovanjem oksidativnog stresa dolazi do peroksidacije lipida u membrani što za posledicu ima nastanak malondialdehida (MDA), dok oksidativnim oštećenjem proteina nastaju proteinske karbonilne grupe (PKG). Oksidativni stres aktivira antioksidativne enzime jetre, među kojima su superoksid dismutaza (SOD), koja uklanja superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) prevodeći ga dalje u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (H_2O_2), koji se do vode razlaže uz pomoć glutation-peroksidaze (GPx) i do vode i kiseonika uz pomoć jednog od najzastupljenijih enzima u ćelijama jetre, kalataze (KAT) (Marí i sar., 2010). Delovanjem oksidativnog stresa dolazi do pojačane produkcije citokina $TNF\alpha$, naročito u Kupferovim ćelijama (Li i sar., 2015), koji pojačava inflamaciju i može dovesti do apoptoze. Apoptoza je jedan od glavnih načina ćelijske smrti, koja propratno uz oksidativna oštećenja zauzima veoma važno mesto u patologiji hroničnih bolesti jetre (Wang, 2014). Povećanje produkcije markera oksidativnog oštećenja dovodi se u vezu sa raznim patološkim stanjima. Često je u istraživanjima zabeleženo učešće Nrf2 i poremećaja antioksidativnih enzima u hroničnim bolestima jetre (Allameh i sar., 2023; Xu i sar., 2018). Kod pacijenata sa hroničnim bolestima jetre (hepatitis B, hepatitis C, nealkoholna masna jetra, alkoholni hepatitis) vrlo često je zastupljena i depresija (Huang i sar., 2017). Istraživanje uzroka komorbiditeta hroničnih bolesti jetre i depresije može dati bitne informacije za razumevanje i depresije i bolesti jetre.

U poslednje vreme se istražuje osovina koja povezuje mozak i jetru (Yan i sar., 2023). U komunikaciji ova dva organa je važna KMB koja pod uticajem proinflamacijskih citokina iz jetre kao što su $TNF\alpha$, IL-6 i IL-1 β menja svoju propustljivost i omogućava prolazak toksina poput amonijaka i ksenobiotika koji dovode do proinflamacijskog odgovora u mozgu (Cheon i Song, 2021) (Slika 16). Ujedno dolazi i do oštećenja moždanih funkcija i poremećaja kognitivnih sposobnosti, što je potvrdila studija na miševima (Liu i sar., 2018).

Poremećaj u funkciji jetre (smanjeno razlaganje amiloid- β peptida; virusne infekcije) često dovodi i do povećanog oslobađanja štetnih supstanci, koje u odnosu jetra-mozak mogu dovesti do razvoja bolesti poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti pa i demencije, koje su vrlo često praćene povećanjem proinfalamacijskih citokina u jetri i neuroinflamacijom u mozgu (Vegas-Suárez i sar., 2022).



Slika 16. Jetra - mozak osovina. Objašnjenje u tekstu. KMB - krvno-moždana barijera; HHA - hipotalamo-hipofizna-adrenalna osovina

Bolesti jetre i mozga vrlo često se dovode u vezu sa gastrointestinalnim problemima, tako da u literaturi sve češće nailazimo na podatke o uključenosti osovine koja povezuje creva-jetru-mozak, u razvoj mentalnih bolesti (Zhu i sar., 2022). Takođe, često je zabeležen i štetan efekat antipsihotika na jetru, u formi metaboličkih poremećaja i oštećenja jetre (Tarricone i sar., 2006).

1.4. Životinjski modeli depresije

Životinjski modeli depresije se koriste za ispitivanje neurobiologije depresije, mehanizama delovanja lekova i testiranje novih antidepresiva. Veoma je teško uspostaviti adekvatan model koji na najbolji način prezentuje veći deo simptoma koje depresivni pacijenti ispoljavaju, naročito što nije moguće izazvati nedostatak samopoštovanja i suicidalne misli kod životinjskih modela. Važno je da se kao modeli koriste životinje koje ostvaruju socijalne interakcije, obzirom na to da se kod njih javljaju oblici ponašanja nalik depresivnom. Za istraživanja se smatraju pogodnim određene vrste primata i glodara, s tim da se najviše koriste pacovi i miševi. Ove vrste glodara pokazuju sličnost sa ljudima na genetskom, anatomskom i biohemijskom nivou, a relativno su jednostavni za gajenje i imaju veliki broj potomaka, imaju prilično brz razvoj do odrasle dobi i relativno kratak životni vek.

Osnovu životinjskog modela postavili su McKinney i Bunney (McKinney i Bunney, 1969), a Willner (Willner i sar., 1987) je nešto kasnije dopunio minimum kriterijuma koje model mora da zadovolji kako bi našao primenu u eksperimentalne svrhe. Životinjski model za proučavanje poremećaja raspoloženja potrebno je da zadovolji određene kriterijume sličnosti, odnosno neophodna je sposobnost modela da kod životinja imitiraju simptome koji liče na kliničku sliku depresije kod ljudi (engl. *face validity*). Molekulske, fiziološke i ćelijske promene kod životinja moraju biti uzrokovane događajima koji inače dovode do poremećaja ponašanja kod ljudi (engl. *etiological validity*). Takođe, mora da postoji adekvatni farmakološki odgovor na terapiju koja se koristi u lečenju pacijenata i da je moguće predvideti ishod lečenja (engl. *predictive validity*). Pored toga, neurohemijski procesi koji su

osnova bolesti koja se ispituje u životinjskim modelima trebalo bi da su slični onima kod ljudi (engl. *construct validity*), kao i da je model ponovljiv (Belzung i Lemoine, 2011).

Do danas je ustanovljen veliki broj životinjskih modela depresije, pri čemu se većina bazira na izlaganju različitim vrstama akutnog ili dugotrajnog stresa, a u manjoj meri na genetskim manipulacijama (Deussing, 2006). Generalno, životinjski modeli depresije predstavljaju model-sisteme u kojima korišćene eksperimentalne životinje u određenoj meri ispoljavaju aspekte ljudske patologije. S druge strane, testovi ponašanja predstavljaju procedure koje se koriste za ispitivanje eksperimentalnih uticaja na ponašanje životinja. Za ispitivanje ponašanja nalik anksioznom koriste se: test otvorenog polja (engl. *open field test*), *novelty suppressed feeding*, test izdignutog lavirinta (engl. *elevated plus maze test*), tamno/svetla kutija (engl. *light/dark box*), stresom izazvana hipertermija (engl. *stress induced hyperthermia*), zakopavanje klikera (engl. *marble burying*) (Belovicova i sar., 2017). Testovi koji se koriste za ispitivanje ponašanja nalik depresivnom kod pacova su: test prinudnog plivanja (engl. *forced swim test*), test vešanja o rep (engl. *tail suspension test*) i test preferencije unosa zaslađenog rastvora (engl. *sucrose preference test*) (Willner i sar., 1987).

1.4.1 Dugotrajna socijalna IZ

Dugotrajna socijalna IZ predstavlja blagi, psihosocijalni stres koji je povezan sa osećajem usamljenosti koji karakteriše kliničku depresiju (Matthews i sar., 2016), a može se koristiti i kao model za proučavanje šizofrenije (Kohn i Clausen, 1955). Najčešće se kao modeli za proučavanje dugotrajne IZ u laboratorijskim uslovima koriste glodari (pacovi i miševi) (Blanchard i sar., 2001; Geyer i sar., 1993). Pokazano je da pacovi izloženi ovom tipu dugotrajnog stresa ispoljavaju promene u ponašanju koje su slične depresiji kod čoveka (Carnevali i sar., 2012; Zlatković i sar., 2014a). Tokom dugotrajne IZ, pacovi su pojedinačno raspoređeni u kavezima, pri čemu su lišeni bilo kakvog vizuelnog i taktilnog kontakta, ali ne i auditornog i olfaktornog iskustva (Garzón and Del Río, 1981) (Slika 17).

Dugotrajna socijalna IZ dovodi do poremećaja HHA osovine i ujedno povećava nivo glukokortikoida koji remete antioksidativni sistem organizma (McIntosh i sar., 1998). Sa druge strane, socijalna IZ adultnih mužjaka pacova soja Wistar u periodu od 3 nedelje, iako je pokazala nepromenjen nivo CORT, dovela je do poremećaja u aktivnosti HHA osovine, a što se ogledalo u neadekvatnom odgovoru na dodatni akutni stres kome su socijalno izolovane životinje bile izložene (Filipović i sar., 2005). Pored zapaženog oksidativnog stresa, značajno povećanje nitrozativnog stresa (Zlatković i Filipović, 2012), kao i ekspresija proinflamacijskih citokina (Alshammari i sar., 2020; Todorović i Filipović, 2017) (IL-1 β , IL-6 i TNF α) kroz aktivaciju jedarnog faktora - κ B (engl. *nuclear factor- kappa B*, NF- κ B) je zapaženo kod socijalno izolovanih pacova (Zlatković i Filipović, 2013). Socijalna IZ kompromituje nivo BDNF i smanjuje neurogenezu u DG (Du Preez i sar., 2021; Grigoryan i sar., 2022). Štaviše, tronedeljna kao i šestonedeljna socijalna IZ adultnih mužjaka pacova soja Wistar, dovela je do promena u ponašanju, detektovanih nastankom anhedonije - nedostatak interesovanja za prijatne stimuluse, beznadežnosti (engl. *despair behavior*) i anksioznosti (Stanisavljević i sar., 2019b; Stanisavljević Ilić i sar., 2023). Takođe, socijalna IZ je kompromitovala redoks homeostazu u hipokampusu, istovremeno povećavajući proteinsku ekspresiju IL-6 u citosolu hipokampusu (Perić i sar., 2017) kao i smanjivanjem broja PV+ GABA interneurona u dHIP (Filipović i sar., 2018).

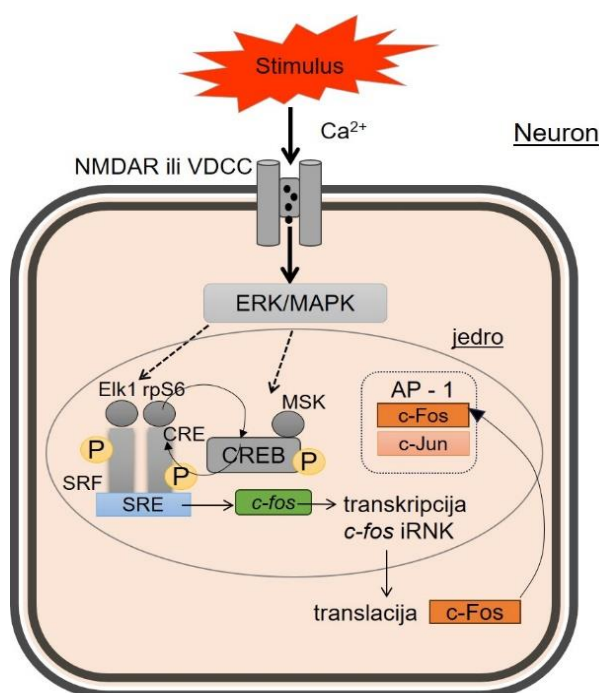


Slika 17. Izazivanje stresa dugotrajne socijalne izolacije kod pacova - eksperimentalna postavka.

1.5. C-Fos kao marker aktivnosti neurona

Različiti stresori kao vanćelijski signalni molekuli indukuju promene u ćelijskim procesima preko mehanizama koji uključuju transmisiju signala od ćelijske membrane do jedra i dovode do promene u ekspresiji gena. Među najbrže aktiviranim genima jesu IEGs koji regulišu ekspresiju brojnih drugih gena tako što se vezuju za specifičnu sekvencu DNK molekula. Među najviše istraživanim IEGs je *c-fos* protoonkogen koji kodira **c-Fos protein**. Sinteza c-Fos proteina odvija se tokom 20 do 90 minuta nakon stimulacije, poluživot proteina je približno 2 sata (Kovács, 2008).

Oksidativni stres, ali i drugi stimuli aktiviraju kinazu regulisanu spoljašnjim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK1/2), koja pripada grupi mitogenom-aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i dovodi do nishodne regulacije ekspresije *c-fos* gena koji kodira c-Fos protein. *C-fos* se među prvima eksprimira kao odgovor na različite stimule i dovodi do ćelijske proliferacije, diferencijacije, transformacije, migracije, apoptoze i onkogeneze. Kako ekspresija c-Fos predstavlja odgovor na depolarizaciju neurona u različitim regionima mozga, c-Fos predstavlja i indirektni marker aktivnosti neurona. Do aktivacije ERK signalnog puta u neuronima dolazi zahvaljujući porastu nivoa unutarćelijskog Ca^{2+} , usled aktivacije N-metil-D-aspartatnog receptora (NMDAR) i voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala (engl. *voltage-dependent calcium channels*, VDCC). Fosforilacijom ERK dolazi do aktiviranja transkripcionih faktora Elk1 (engl. *ETS like-1 protein*), elementa odgovora na ciklični adenozin monofosfat (engl. *cAMP response element*, CRE), *serum response factor* (SRF) i ribozomne protein kinaze S6 (engl. *ribosomal protein kinase S6*, rpS6) koji učestvuju u kontroli c-Fos ekspresije tako što se vežu za promotor *c-fos* gena tj. *serum response element* (SRE). Ključnu ulogu u samoj transkripciji c-Fos zauzima i CRE vezujući protein (engl. *cAMP-response element binding protein*, CREB) za čiju fosforilaciju tj. aktiviranje su neophodne brojne kinaze među kojima je i rpS6 i svakako najznačajnija mitogenom i stresom aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen and stress activated protein kinase*, MSK). Fosforilisan CREB veže se za CRE. Zatim, fosforilisani kompleks transkripcionih faktora veže se za *c-fos* promotor SRE, pokrećući sintezu c-Fos proteina u citoplazmi ćelije (Aparicio i sar., 2022). Potom, sintetisan c-Fos protein u jedru sa c-Jun proteinom formira heterodimer AP-1 kompleks (Slika 18), koji funkcioniše kao transkripcioni faktor u jedru, vezujući se za AP-1 vezujuća mesta na DNK. Takođe, literaturni podaci ukazuju na pozitivnu regulaciju između NF- κ B i c-Fos proteinske ekspresije, tačnije aktiviranje NF- κ B dovodi do indukcije c-Fos proteinske ekspresije. Aktiviranje NF- κ B samo po sebi nije dovoljno da indukuje c-Fos, već je neophodno da indukcija ovog gena bude posredovana ERK-Elk1 i ERK-MSK-CREB signalnim putevima (Tu i sar., 2013).

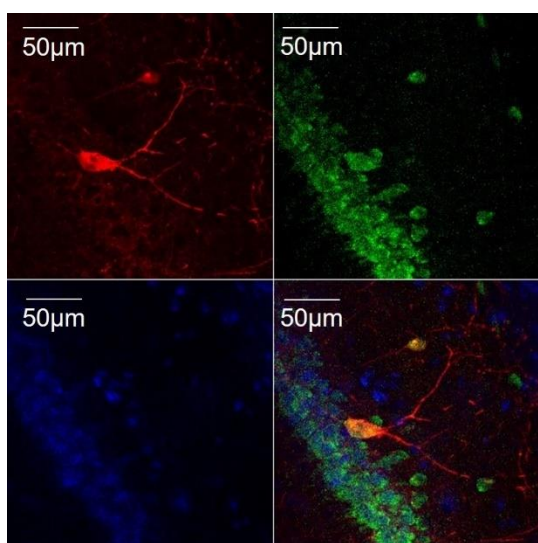


Slika 18. Mehanizam aktivacije proteinske ekspresije c-Fos. Objasnjenje u tekstu. NMDAR - N-metil-D-aspartatni receptor; VDCC - voltažno-zavisni kalcijumski kanali; ERK - kinaza regulisana spoljašnjim signalom; MAPK - mitogen aktivirana protein kinaza; Elk1 - *ETS like- 1 protein*; rpS6 - ribozomna protein kinaza S6; SRF - *serum response factor*; SRE - *serum response element*; CRE - elementa odgovora na ciklični adenozin monofosfat (engl. *cAMP response element*, CRE); CREB - CRE vezujući protein ; MSK - mitogenom i stresom aktivirane protein kinaze; P - fosfat

Ekspresija c-Fos proteina u bazalnim uslovima je niska, dok se pod uticajem različitih tipova stimulusa među kojima je i sam stres (imobilizacija, oksidativni stres, neuroinflamacija) njegova ekspresija znatno povećava. Povećana ekspresija c-Fos proteina omogućava detekciju neuralnih ćelija uključenih u odgovor na primenjeni stimulus, pa samim tim može biti dobar biološki marker za identifikaciju patoloških promena u mozgu (Tae i sar., 2016). Pored toga, sve veći broj radova ukazuje da specifični profil ekspresije c-Fos proteina može biti korišćen kao važan faktor za klasifikaciju psihoaktivnih lekova (Sumner i sar., 2004). Stoga se imunohistohemijsko određivanje broja c-Fos+ ćelija u različitim regionima mozga koristi za proučavanje funkcionalnih puteva u mozgu i identifikaciju aktiviranih neurona.

1.6. Parvalbumin pozitivni interneuroni i glutamat dekarboksilaza 67 u hipokampusu

Brojne studije su pokazale da poremećaj GABA neurotransmisije kao i smanjenje broja ili poremećaj strukture GABA interneurona u hipokampusu i korteksu doprinosi patofiziologiji depresije i šizofrenije (Benes i Berretta, 2001; Czéh i sar., 2015). Kao što je već navedeno, prekursor GABA je glutamat, koji se dekarboksiluje u citosolu u reakciji katalizovanoj enzimima GAD65 i GAD67 (Soghomonian i Martin, 1998). Između ove dve izoforme postoji oko 64% sličnosti u sastavu aminokiselina. Enzim GAD67 je ravnomerno raspoređen u citoplazmi neurona, dok je GAD65 lokalizovan u nervnim završecima (Martin i Rimvall, 1993). Od pomenutih, enzim GAD67 je odgovoran za sintezu čak 90% neurotransmitera GABA (Asada i sar., 1997). GABA pored neurotransmisije ima ulogu i u sinaptogenezi tokom ranog razvoja, zaštiti neurona od povreda i u regulaciji redoks potencijala (Lamigeon i sar., 2001; Pinal i Tobin, 1998; Waagepetersen i sar., 1999). Istraživanja su pokazala da smanjenje nivoa GAD67 enzima dolazi u različitim regionima mozga kod mentalnih bolesti (Torrey i sar., 2005).

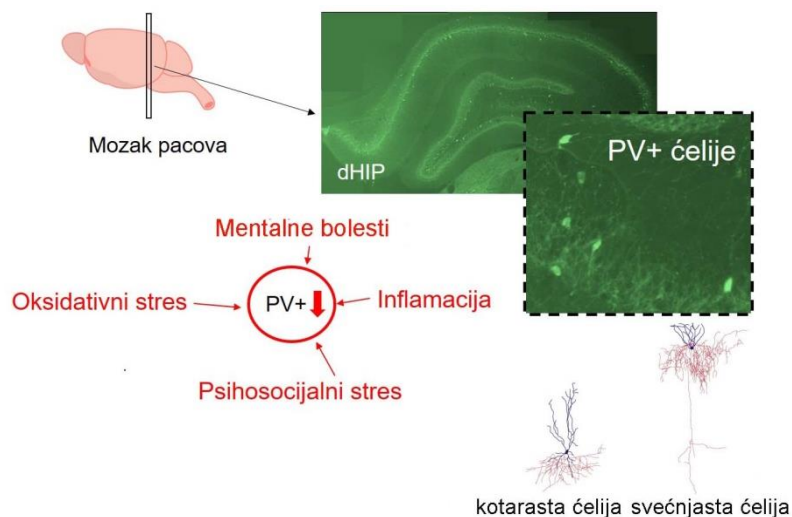


Slika 19. Reprezentativne mikrografije piramidnih neurona dCA1 podregiona hipokampusa nakon fluorescentnog bojenja na parvalbumin (crveni signal), NeuN (zeleni signal) koji je marker neurona i DAPI (4',6-diaminidino-2-fenilindol, plavi signal) koji obeležava jedra ćelije. Skala - 50 µm. Preuzeto i modifikovano od Filipović i sar., 2018.

Važnu grupu GABA interneurona hipokampusa, predstavljaju PV+ interneuroni koji čine posebno osetljivu populaciju u uslovima blagog dugotrajnog stresa (Rossetti i sar., 2018). Reprezentativne mikrografije piramidnih neurona dCA1 podregiona nakon fluorescentnog bojenja na PV (crveni signal) i NeuN (zeleni signal) koji je marker neurona i DAPI (4',6-diaminidino-2-fenilindol, plavi signal) markera koji obeležava jedra ćelija, prikazane su na Slici 19. PV je protein koji pripada grupi Ca^{2+} -vezujućih proteina i specifičan je za kičmenjake (Schwaller i sar., 2002). On reguliše Ca^{2+} -zavisne metaboličke procese unutar GABA neurona. Čelije koje najviše ekspimiraju PV u hipokampusu su: kotaraste ćelije (engl. *basket cells*) i svećnjaste ćelije (engl. *chandelier cells*) (Slika 20). Postoje i drugi Ca^{2+} -vezujući proteini kao što su kalretinin i kalbindin (Rogers i Résibois, 1992). Pretpostavlja se da neuroni koji sadrže visoku koncentraciju ovih Ca^{2+} -vezujućih proteina pokazuju visoku stopu zaštite od oštećenja zahvaljujući sposobnosti da brzo nivelišu nivo Ca^{2+} jona (Heizmann, 1993).

PV+ interneuroni zaštićeni su perineuronalnim mrežama (engl. *perineuronal nets*, PNN) koje predstavljaju fizičku barijeru koja održava lokalnu homeostazu jona i štiti PV+ interneurone od oksidativnog stresa (Wen i sar., 2018). PV+ interneuroni čine oko 24% GABA neurona u CA1, ili oko 2% od ukupne populacije neurona u toj oblasti (Deng i sar., 2019; Xia i sar., 2017). Najviše PV+ interneurona u CA1, CA2 i CA3 ima u slojevima SO i SP, a veoma malo u SR, a nema u SLM sloju (Botcher i sar., 2014). U DG, od svih GABA interneurona najzastupljeniji su oni koji ekspimiraju PV+ i somatostatin+ (Freund i Buzsáki, 1996). Smanjeni broj PV+ GABA neurona zabeleženi su u hipokampusu životinja izlaganih stresu (Czeh i sar., 2005;) kao posledica ćelijske smrti (apoptoza), otežanog sazrevanja neurona ili smanjena ekspresije PV proteina unutar ćelija ispod praga detekcije u svakom GABA interneuronu (Wang i Fawcett, 2012). Studije Filipović i saradnika (Filipović i sar., 2013, 2011) su pokazale da smanjenje broja PV+ interneurona u CA1, CA3 i DG podregionima hipokampusa socijalno izolovanih adultnih mužjaka pacova u periodu od tri nedelje, nije posledica apoptoze, već najverovatnije smanjene ekspresije PV proteina unutar ćelija ispod praga detekcije. Takođe, smanjenje broja PV+ interneurona u hipokampusu pacova nakon izlaganja tronedeljnoj socijalnoj izolaciji i/ili u kombinaciji sa akutnim stresom je nezavisno od nivoa CORT u serumu (Filipović i sar., 2013). Štaviše, ovo smanjenje potencijalno se dovodi u vezu sa zabeleženim deficitom glutationa (GSH) i oksidativnim stresom u hipokampusu (Zaletel i sar., 2016). Ovi rezultati su potvrđeni radom koji pokazuje da nakon dugotrajnog stresa prouzrokovan oksidativni stres dovodi do smanjenja broja PV+ interneurona, kao i oštećenja PNN (Steullet i sar., 2017). PV+ interneuroni su izuzetno bogati

mitochondrijama i neophodna im je velika količina energije za održavanja visoke metaboličke aktivnosti što ih čini još podložnijim stresnim uslovima. *Post-mortem* studije na ljudima pokazale su smanjen broj PV+ interneurona u hipokampusu i PFK kod ljudi obolelih od kliničke depresije i bipolarnog poremećaja (Knable i sar., 2004; Konradi i sar., 2011; Rajkowska i sar., 2006). Takođe, pokazan je smanjen broj PV+ i GAD67+ ćelija, ali i oštećenja PNN kod osoba sa šizofrenijom.. Pored navedenog, od velike važnosti je smanjenje broja PV+ interneurona u amigdalama, obzirom da su amigdala, PFK i hipokampus povezani i da je njihova komunikacija od velike važnosti u regulaciji kognitivnih sposobnosti koje su smanjene kod depresije i šizofrenije (Perlman i sar., 2021).



Slika 20. Parvalbumin pozitivne (PV+) ćelije na koronalnom preseku dorzalnog hipokampusa (dHIP) kontrolnog pacova. Modifikovana slika iz knjige Kirkcaldie M, 2011.

Jedan od primera terapijske efikasnosti antipsihotika na PV+ interneurone je mehanizam delovanja lurasidona koji normalizuje smanjenje proteinske ekspresije PV izazvane dugotrajnim stresom i poboljšanjem antioksidativnog sistema odbrane (Rossetti i sar., 2018). Zbog svega navedenog, PV+ GABA interneuroni su već duži niz godina potencijalni targeti u istraživanjima terapijskih pristupa depresiji i anksioznosti (Möhler, 2012).

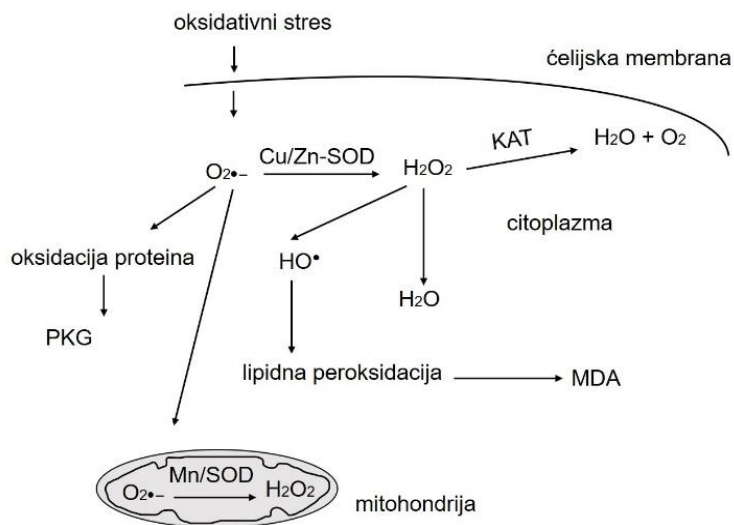
Prethodni radovi su pokazali da tronedeljna (Filipović i sar., 2018) i šestonedeljna IZ (Perić i sar., 2019) dovode do smanjenja broja PV+ GABA - interneurona u pod/regionima dHIP adultnih mužjaka pacova. Literaturni podaci su pokazali da dugotrajni stres više oštećuje dHIP u odnosu na vHIP. Smanjenje broja PV+ interneurona zabeleženo je u svim podregionima dHIP, dok je u vHIP zabeleženo samo u CA1 (Czéh i sar., 2015). Stoga, istraživanja u ovoj disertaciji su usmerena na dHIP.

1.7. Oksidativni stres i inflamacija

Dugotrajna IZ može dovesti do prekomerne produkcije ROS, koje dovode do nastanka oksidativnog i nitrozativnog stresa (Filipović i sar., 2017), a što za posledicu može imati i oštećenje funkcije mozga. Mozak je najosetljiviji na oksidativni stres zbog velike potrošnje

kiseonika i velike količine lipida, i samim tim pojačava uslove za proizvodnju ROS, smanjuje sadržaj antioksidativnog sistema odbrane (SOD, KAT i GPx) i nivo GSH u poređenju sa drugim tkivima (Travica i sar., 2017). Mehanizam oksidativnog oštećenja ćelija uzrokovan delovanjem ROS nije u potpunosti proučen iz razloga što su slobodni radikali kratko živeći pa ih je teško detektovati i kvantifikovati. Zbog toga se učešće ROS u nastajanju patoloških procesa određuje merenjem indirektnih markera oksidativnog stresa, kao što su promene u proteinskoj ekspresiji i aktivnosti antioksidativnih enzima. Kao indikatori oksidativnog stresa koriste se i nivoi MDA i PKG. Povećani nivo ROS dovodi do povećanja lipidne peroksidacije koja je odgovorna za oštećenje tkiva. Kod pacijenata sa depresijom pokazan je visok nivo MDA (Camkurt i sar., 2016). Pored MDA i PKG su potencijalni markeri oksidativnog stresa. Samim tim, ovi potencijalni markeri oksidativnog stresa su u vezi sa brojnim bolestima kojima ovaj tip stresa posreduje.

Održavanje ROS na fiziološkom nivou omogućeno je antioksidativnim enzimima među kojima su SOD, KAT i GPx. SOD katalizuje dismutaciju $O_2^{\bullet-}$ u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (Slika 21), što ovaj enzim stavlja u prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa i funkcioniše kao regulator nivoa ROS u ćeliji. Na osnovu jona metala u aktivnom centru enzima razlikujemo četiri tipa SOD: mangan-SOD (Mn-SOD), bakar-cink-SOD (Cu/Zn-SOD), gvožđe-SOD (Fe-SOD) i nikel-SOD (Ni-SOD) (Perry i sar., 2010). Među najispitivanijim su Cu/ZnSOD i Mn-SOD, koji se razlikuju po svojoj lokaciji. Tako, Cu/Zn-SOD (SOD1 izoforma) se nalazi u citoplazmi, jedru i peroksisomima (Crapo i sar., 1992), a Mn-SOD (SOD2 izoforma) u mitohondrijama. Nastali H_2O_2 se potom razlaže delovanjem enzima KAT ili GPx na vodu i kiseonik (Slika 21).

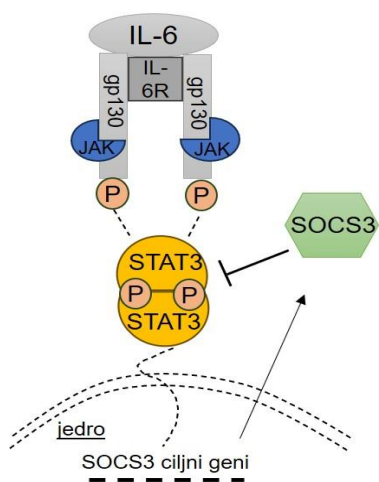


Slika 21. Regulacija oksido-reduktivnog sistema u ćelijama. ($O_2^{\bullet-}$) - superoksid anjon radikal; Cu/Zn-SOD - bakar-cink-superoksid dismutaza; Mn/SOD - mangan-superoksid dismutaza; KAT - katalaza; MDA - malondialdehid; PKG - proteinske-karbonilne grupe. H_2O_2 - vodonik peroksid; ($HO\bullet$) - hidroksil radikal

Kod pacijenata obolelih od depresije zabeležene su promene u funkcionisanju SOD i KAT, s tim da su rezultati istraživanja oprečni i da neki pokazuju porast (Tsai i Huang, 2016), a neki pad nivoa aktivnosti ova dva enzima (Camkurt i sar., 2016; Sabade i sar., 2022).

Takođe, pokazano je da antidepresivi smanjuju nivo oksidativnog stresa tako što pojačavaju antioksidativnu odbranu, što predstavlja jedan od mehanizama koji leže u osnovi neuroprotektivnog efekta antidepresiva (Đorđević i Đorđević, 2022).

Oksidativni stres može biti povezan sa pojavom inflamacije (Hovatta i sar., 2010). Citokini se oslobađaju pod dejstvom spoljašnjeg stimulusa i imaju za cilj očuvanje fiziološke homeostaze. Dele se na proinflamacijske citokine koji imaju funkciju u iniciranju inflamacijskog odgovora neophodnog za borbu protiv infekcije i anti-inflamacije koji imaju funkciju u smanjenju inflamacije. Istraživanja su pokazala da citokini aktiviraju enzim odgovoran za konverziju triptofana u kinurenine i samim tim smanjuju nivo triptofana za sintezu serotonina (Fujigaki i sar., 2006), što indirektno, preko uticaja na sintezu prostaglandina (PGE2) i NO, dovodi do oštećenja hipokampusa (Oxenkrug, 2007). Grupi proinflamacijskih citokina pripada i IL-6 koji može imati ulogu u patofiziologiji depresije (Hodes i sar., 2016). Konzistentno je pronađen povišen nivo IL-6 u stresnim reakcijama i kod pacijenata sa depresijom (Ting i sar., 2020). Prethodna istraživanja pokazala su da šestonedeljna socijalna IZ adultnih mužjaka pacova dovodi do povećane proteinske ekspresije IL-6 (Perić i sar., 2017). Takođe je pokazano da tronedeljna aplikacija fluoksetina kod šestonedeljne IZ pacova mužjaka suprimira proteinsku ekspresiju IL-6 u citosolu hipokampusa (Perić i sar., 2017). Literaturni podaci pokazuju da postoje neslaganja o efektu Olz na nivo proinflamacijskih citokina (Faour-Nmarne i Azab, 2016; Sugino i sar., 2009; Zhang i sar., 2014).



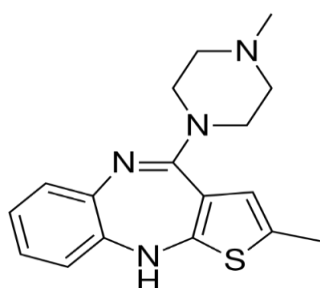
Slika 22. JAK/STAT signalni put. Objašnjenje u tekstu. SOCS3 - supresora signalizacije citokina 3 (engl. *suppressor of cytokine signaling*, SOCS3); IL-6 - Interleukin 6; JAK - Janus kinaza; STAT - signal transducer i aktivator transkripcije; P - Fosfat

Jedan od bitnih regulatora imunološke homeostaze u patološkim stanjima je supresor signalizacije citokina 3 (engl. *suppressor of cytokine signaling*, SOCS3). SOCS3 je negativni regulator aktivnosti citokina koji ostvaruje svoje dejstvo preko janus kinaze i signal transducera i aktivatora transkripcije (engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*, JAK/STAT). Ovaj signalni put se aktivira u brojnim biološkim procesima, u kojima određeni citokini, faktori rasta i hormoni ovim signalnim putem prenose informacije u jedro ćelije (Carow i Rottenberg, 2014). SOCS3 ekspresija indukovana je JAK/STAT kaskadom i deo je negativne povratne sprege, uloga SOCS3 je u gašenju signala. Kada se IL-6 veže za svoj receptor (kompleks koji sadrži dve gp130 subjedinice, IL-6R), aktivira se Janus tirozin kinaza (JAK) koja se autofosforiliše, pa fosforiliše tirozinske ostatke na samom receptoru. Potom se STAT3 preko svog SH2 domena veže za fosforilisan receptor i biva fosforilisan od strane JAK, potom se dimer STAT3 translocira u jedro, veže za ciljne gene i promovira dalje transkripciju (Carow i Rottenberg, 2014) (Slika 22).

SOCS3 reguliše JAK/STAT signalni put vezivanjem za JAK i receptore citokina (gp130 za IL-6), što rezultira inhibicijom STAT3 (Carow i Rottenberg, 2014). Samim tim,

SOCS3 reguliše aktivnost citokina koji su zavisni od receptora gp130, ali i onih koji nisu (interleukin-12R). Kod pacijenata sa blažim oblikom kliničke depresije nije zabeležen porast inflamacijskih citokina (proteina i iRNK) u poređenju sa kontrolnom grupom, međutim, primećeno je smanjenje iRNK za SOCS3 protein koji reguliše inflamacijske citokine. Takođe, kod pacijenata u remisiji zabeleženo je smanjenje iRNK SOCS3, što dovodi do smanjene sposobnosti kontrole inflamacijskih citokina koji su često povezani za depresijom. Ovaj pad SOCS3 tokom remisije sugerise da bi se u stresnim situacijama kod ovih pacijenata lakše mogao desiti ponovni porast inflamacijskih citokina što SOCS3 čini potencijalnim markerom predispozicije za tendenciju porasta nivoa inflamacijskih citokina (Kobayashi i sar., 2022).

1.8. Olanzapin



Slika 23. Hemijska struktura olanzapina. Slika preuzeta sa sajta vikipedija - Olanzapin. <https://en.wikipedia.org/wiki/Olanzapine>

Na osnovu mehanizma delovanja, antipsihotici se dele na tipične (klasične) i atipične antipsihotike. Atipični antipsihotici su nova generacija lekova koji efikasnije smanjuju negativne simptome šizofrenije, deluju na kognitivne nedostatke i depresiju, i ujedno deluju i na serotonin, pokazuju blage EPSE, ali dovode i do povećanja telesne težine. U atipične antipsihotike ubrajaju se Olz, Klz, sulpirid, risperidon, paliperidon, kvetiapin, amisulprid, aripiprazol i ziprasidon. Olz (Zyprexa) je derivat tienobenzodiazepina koji se koristi i u terapiji mentalnih bolesti, među kojim su šizofrenija, bipolarni poremećaj, ali i teški oblici depresije i anksioznost (Jackson i sar., 2004).

Olz (Slika 23) je antagonist dopaminskih (D_1 , D_2 , D_4), serotoninских ($5HT_{-2A}$, $5-HT_{2C}$, $5HT_3$), muskarinskiх (M_{1-5}) i histaminskih (H_1) receptora. Svoj antipsihotički efekat Olz ostvaruje preko antagonističkog delovanja na serotoninске ($5HT_{2A}$) i dopaminske receptore (D_2), dok svoja neželjena dejstva na metabolizam tj. na povećanje telesne mase, hiperglikemiju, dislipidemiju ostvaruje kao antagonist H_1 , $5-HT_{2C}$ i M_3 receptora (Reynolds i Kirk, 2010). Strukturno i funkcionalno sličan je Klz, ali ima manji afinitet za D_2 receptore (Asenjo-Lobos i sar., 2018). Olz se uzima najčešće u dozama od 2,5 mg/dnevno do 20 mg/dnevno i potrebno je najmanje tri nedelje da bi ispoljio svoje pozitivno dejstvo.

U depresiji, Olz se najčešće koristi u lečenju terapijski rezistentne depresije kod pacijenata koji ne odgovaraju adekvatno na antidepresive. Monoterapija antidepresivima kod terapijski rezistentne depresije ne može da postigne adekvatnu efikasnost lečenja čak ni povećanjem terapijske doze antidepresiva, stoga se upotrebljava kombinacija antidepresiva fluoksetina i antipsihotika Olz koja se pokazala efikasnijom u ovakvim slučajevima depresije (Jackson i sar., 2004). Ova kombinovana terapija rezultirala je u većoj serotoninскоj i dopaminskoj aktivnosti, u moždanim regionima (frontalni korteks i NAc) uključenim u patofiziologiju depresije, u odnosu na monoterapiju fluoksetinom (Bobo i Shelton, 2009). Takođe, zapažen je i sinergijski efekat na povećanje BDNF i B-ćelijskih limfoma 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*, BCL2), kao i neurotrofne faktore čija je koncentracija smanjena u depresiji. Olz kao antagonist $5-HT_2$ receptora, povećava oslobađanje serotonina iz presinaptičke

membrane što dovodi do povećanja aktivnosti serotonina na 5-HT₁ receptoru, što potencijalno može objasniti njegova antidepresivna i anksiolitička svojstva (Jackson i sar., 2004).

Neke studije su pokazale da atipični antipsihotici, uključujući i Olz, mogu da pokažu zaštitni efekat u odbrani od oksidativnog stresa (Park i sar., 2011; Todorović i sar., 2016), kao i da pacijenti tretirani Olz imaju blažu kliničku sliku i bolji odgovor na tretman u odnosu na pacijente tretirane tipičnim antipsihoticima (Ciudad i sar., 2005). Postoje studije koje ukazuju da visoke doze Olz mogu izazvati oksidativni stres tako što povećavaju nivo O₂^{•-} i oštećuju mitohondrije (Boz i sar., 2020). U pogledu inflamacije, pojedini rezultati ukazuju da Olz smanjuje nivo proinflamacijskih citokina poput IL-1 β , IL-2, IL-6 i TNF α (Hatziagelaki i sar., 2019). Prema objavljenim podacima, efekat koji Olz ostvaruje na GABA sistem može biti jedan od faktora kojim on postiže svoje anksiolitičke efekte (Locchi i sar., 2008). Takođe, benzodiazepini pojačavaju inhibitorni efekat GABA (Sigel i Ernst, 2018), tako što utiču na pozitivnu alosteričku modulaciju GABA_A receptora (Korpi i Sinkkonen, 2006), što ih ujedno čini jednim od potencijalnih terapijskih kandidata za lečenje poremećaja raspoloženja.

Iako je upotreba Olz odobrena još 1996. godine, dodatna istraživanja su neophodna kako bi se rasvetlili mehanizmi njegovog delovanja.

2. Ciljevi

Višedecenijska istraživanja su pružila značajan doprinos u razumevanju depresije, ali molekularni mehanizmi njenog nastanka i efekti farmakološkog tretmana antipsihotika i dalje nisu potpuno razjašnjeni. Stoga je glavni cilj ove doktorske disertacije bio da se istražuju molekularni mehanizmi kroz koje dugotrajna socijalna IZ kod odraslih mužjaka pacova izaziva ponašanje nalik depresivnom i anksioznom, kao i da se procene antidepresivni i anksiolitički uticaj i molekularni mehanizmi u njihovoj osnovi kod dugotrajne primene atipičnog antipsihotika Olz.

U skladu sa ovim opštim ciljem, formulisani su sledeći pojedinačni ciljevi:

- 1) Utvrditi uticaj dugotrajne socijalne IZ na razvoj ponašanja nalik depresivnom i anksioznom kod odraslih mužjaka pacova kao i efikasnost delovanja Olz u suzbijanju tih poremećaja;
- 2) Okarakterisati efekte dugotrajne socijalne IZ kao i efikasnost tretmana Olz na aktivaciju neurona, kroz promene u broju c-Fos+ ćelija u različitim regionima i podregionima mozga pacova;
- 3) Okarakterisati efekte dugotrajne socijalne IZ kao i efikasnost tretmana Olz na GABA signalizaciju, u pogledu promene broja PV+ GABA interneurona i GAD67+ ćelija u slojevima podregiona dHIP;
- 4) Okarakterisati efekte dugotrajne socijalne IZ kao i efikasnost tretmana Olz na antioksidativni sistem u hipokampusu određujući proteinsku ekspresiju enzima Cu/Zn-SOD i KAT u citosolnoj frakciji hipokampusu pacova;
- 5) Okarakterisati efekte dugotrajne socijalne IZ kao i efikasnost tretmana Olz na proinflamacijski milje na nivou hipokampusu određivanjem proteinske ekspresije citokina IL-6 i njegovog negativnog regulatora u hipokampusu pacova;
- 6) Proceniti hepatotoksične efekte dugotrajne socijalne IZ kao i efikasnost tretmana Olz analizirajući nivo oksidativnog oštećenja primenom markera MDA i PKG, kao i antioksidativni status jetre pacova (ispitivanjem aktivnosti i ekspresije enzima antioksidativne zaštite, SOD, Cu/Zn-SOD i KAT).

3. Materijal i metode

3.1. Životinje

Za potrebe istraživanja korišćeni su adultni mužjaci pacova soja Wistar, starosti 2,5 meseci, na početku eksperimenta težine oko 350 g. Sve životinje odgajane su u vivarijumu Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju u okviru Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od Nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Pacovi su odgajani u standardnim uslovima (konstantna temperatura od 22 ± 2 °C, vlažnost od 55% i svetlosni režim 12 sati svetlost/12 sati mrak) i *ad libitum* režimu vode i hrane. Rad sa eksperimentalnim životinjama sproveden je u skladu sa propisima Etičke komisije za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od Nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, a koji prate smernice registrovanog „Srpskog udruženja za upotrebu životinja u istraživanju i obrazovanju“ (SLASA), pod licencama: 323-07-01893/2015-05 i 323-07-02256/2019-05. Pacovi su na početku eksperimenta nasumično podeljeni u 4 grupe po 6 životinja, dve kontrolne grupe (smeštene do 4 jedinke u kavezu) i dve eksperimentalne grupe čije su jedinke gajene pojedinačno u kavezima u uslovima dugotrajne socijalne izolacije u periodu od 6 nedelja.

3.2. Dugotrajna IZ kao model depresije

U grupama životinja izlaganih dugotrajnoj socijalnoj IZ, pacovi su bili raspoređeni pojedinačno u plastičnim kavezima, u periodu od 6 nedelja, bez mogućnosti međusobnog vizuelnog i taktilnog kontakta, uz istovremeno relativno normalna olfaktorna i auditivna iskustva (Garzón i Del Río, 1981) (Slika 24). Dugotrajno izolovani pacovi pokazali su neurobiološke promene slične onima uočenim kod ljudi sa dijagnozom mentalnih bolesti, uključujući depresiju (Heinrich i Gullone, 2006) i šizofreniju (Möller i sar., 2013).

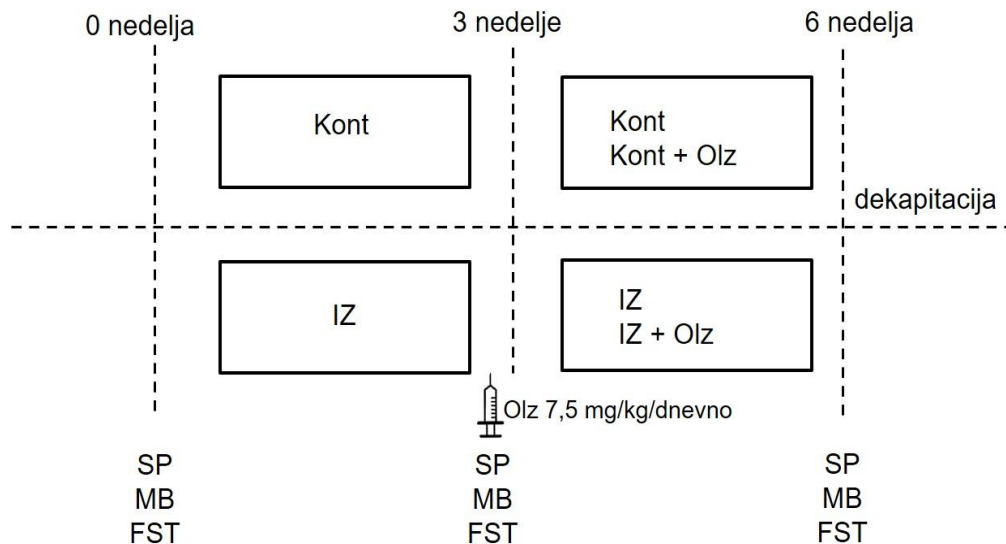


Slika 24. Postavka modela dugotrajne socijalne izolacije (IZ)

3.3. Priprema rastvora leka i aplikacija

U eksperimentima su korišćene tablete Olanzapina (film tableta olanzapin, Actavis, Beograd) i Sizap tablete (Skoplje, Makedonija), koje sadrže 10 mg olanzapina, kao aktivne supstance. Tablete su smrvljene tučkom do praškaste forme u avanu, a potom rastvorene u 0,1 M

hlorovodoničnoj kiselini (HCl), zatim je podešen pH rastvora leka do 5,8 uz mešanje na magnetnoj mešalici (do 1 sat). Rastvor je potom prebačen u ultrazvučno kupatilo (Elma Schmidbauer GmbH) (2 x 10 minuta) i proceden kroz filter papir (Whatman No.42) i membranske filtere (Millex PES), veličina pore 0,45 μm . Nakon tri nedelje od početka eksperimenta, jednoj grupi kontrolnih (Kont + Olz) i grupi pacova u socijalnoj izolaciji (IZ + Olz) intraperitonealno je injektiran rastvor Olz u dozi od 7,5 mg/kg telesne mase (Olz 7,5 mg/kg + 0,1 M HCl, pH = 5,8) svakodnevno tokom sledeće tri nedelje. Preostale dve grupe Kont i IZ pacova tretirane su rastvaračem (0,1 M HCl, pH = 5,8) (Slika 25). Ovaj rastvarač tableta Olz izabran je zbog slabe rastvorljivosti leka u vodi i njegove bolje rastvorljivosti u kiseloj sredini, stoga, upotreba 0,1 M HCl omogućava da se lek lako rastvori, što je važno za radnu dozu leka u laboratorijskim uslovima (*Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Reviews*). Pacovi su mereni svake nedelje kako bi se izračunala potrebna zapremina rastvora Olz za apliciranje. Testovi ponašanja (engl. *sucrose preference*, SP; engl. *marble burying*, MB; engl. *forced swim test*, FST) rađeni su na početku eksperimenta, nakon 3. nedelje i 6. nedelje (Slika 25). Koncentracija rastvora Olz i koncentracija Olz u serumu pacova utvrđena je metodom tačne hromatografije visokih performansi sa fotodiodnom detekcijom (HPLC - PDA) (Kovačević i sar., 2006). Koncentracije Olz u serumu Kont + Olz i grupi IZ + Olz grupa predstavljeni su u Tabeli 1 i u skladu su sa literaturnim podacima (Kapur i sar., 2003). Postignuta koncentracija leka u serumu pacova nakon tretmana Olz (7,5 mg/kg telesne mase/dan) odgovara koncentraciji leka u serumu kod efikasno lečenih pacijenata (Chay i Herman, 1988; Elsworth i sar., 2011; Kapur i sar., 2003; Perry i sar., 1997). U serumu pacijenata terapijski referentne vrednosti za doze Olz između 5-20 mg/kg, kreću se u rangu 20-80 ng/ml (Hiemke i sar., 2018), ili 5-120 ng/ml (Mauri i sar., 2005).



Slika 25. Dizajn studije: Wistar pacovi starosti 2,5 meseci gajeni su 3 nedelje zajedno (kontrole, Kont) ili pojedinačno (izolacija, IZ). Sledeće 3 nedelje svaka grupa dodatno je podeljena na osnovu tretmana koji je primala: Kont, Kont + Olz, IZ, IZ + Olz. Grupe Kont i IZ dobijale su rastvarač (0,1 M HCl, pH = 5,8) tokom 3 nedelje. Testovi ponašanja: SP, MB i FST izvođeni su na početku eksperimenta (0. nedelja), na kraju 3. nedelje i na kraju 6. nedelje

Tabela 1. Koncentracija olanzapina (Olz) u serumu kontrolnih (Kont) i pacova u socijalnoj izolaciji (IZ) tretiranih Olz. SEM - standardna greška merenja (engl. *standard error of mean*).

Doza apliciranog Olz (mg/kg telesne mase/dan)	Eksperimentalna grupa	Koncentracija Olz u serumu pacova	Koncentracija Olz u serumu tretiranih pacijenata
7,5	Kont + Olz	102 - 116 ng/mL ± 1,88 SEM	32-49 ng/mL
7,5	IZ + Olz	110 - 138 ng/mL ± 4,32 SEM	(Weigmann i sar., 2001)

3.4. Testovi ponašanja

3.4.1. Test preferencije unosa zaslađenog rastvora



Slika 26.
Test preferencije unosa zaslađenog rastvora

Test preferencije unosa zaslađenog rastvora (test preferencije saharoze) je korišćen za određivanje anhedonije kod pacova, kao jedne od karakteristika depresije (Willner i sar., 1987). Pacovi su zasebno raspoređeni u plastične kaveze, bez pristupa hrani i dat im je izbor između dve standardne, prethodno izmerene boce. Jedna boca je napunjena vodom sa česme, a druga rastvorom 2% saharoze (Slika 26). Test preferencije unosa zaslađenog rastvora (2% saharoze) u trajanju od jednog sata je najtipičniji način testiranja koji koriste istraživači (Berrio i Kalliokoski, 2023). Nakon jednog sata, merena je količina popijene tečnosti. Kako bi se isključila moguća sporedna preferencija prilikom pijenja u samom testu, položaj dve boce se menjao po danima. Preferencija za saharozu izračunata je iz formule $[\text{konzumiran rastvor saharoze/zapremina celokupne popijene tečnosti (rastvor saharoze + voda)}] \times 100$. Ovaj test izvođen je uzastopno tri dana, na početku studije (0. nedelja), na kraju treće i šeste nedelje.

3.4.2. Test prinudnog plivanja

Test prinudnog plivanja korišćen je za određivanje ponašanja nalik depresivnom i potencijalnog antidepresivnog efekta Olz (Molina-Hernández i sar., 2009). Pacovi su smešteni unutar vertikalnog cilindra od pleksiglasa (visina 45 cm, 28 cm prečnik), koji je ispunjen vodom do 30 cm dubine (Slika 27). Temperatura vode podešena je na 24 ± 1 °C. Test je trajao 5 minuta i zabeležen je uz pomoć Sony HDR-PJ410 kamere. U testu prinudnog plivanja, beleženo je vreme imobilnosti, plivanja i penjanja. Pod imobilnošću smatra se svako odsustvo kretanja u vodi, osim onog neophodnog za održavanja izvan nivoa vode, dok plivanje karakterišu voljni pokreti pacova u vodi, a penjanje podrazumeva penjanje pacova uz sam zid cilindra (Porsolt i sar., 1978).



Slika 27.
Test prinudnog plivanja

Ovaj test izvođen je na početku studije (0. nedelja), na kraju treće i šeste nedelje. Imobilnost je korišćena kao mera za bespomoćnost (engl. *behavioral despair*) (Yankelevitch-Yahav i sar., 2015).

3.4.3. Test zakopavanja klikera



Slika 28.
Test zakopavanja klikera

Test zakopavanja klikera korišćen je za ispitivanje ponašanja nalik anksioznom kod pacova (Ho i sar., 2002). Pacovi su zasebno smešteni u plastične kaveze sa piljevinom, bez pristupa vodi i hrani, sa šest staklenih klikera (prečnika 2,5 cm), raspoređenih na površini piljevine uz ivicu kaveza (Slika 28). Nakon provedenih 30 minuta u kavezu sa klikerima, pacovi su sklonjeni i prebrojen je broj prekrivenih (minimum $\frac{2}{3}$ klikera prekriveno piljevinom) i zakopanih klikera. Ovaj test izvođen je uzastopno tri dana, na početku studije (0. nedelja), na kraju treće i šeste nedelje.

3.5. Žrtvovanje i izolacija tkiva

Dvadeset četiri sata nakon poslednjeg tretmana Olz sve životinje su intraperitonealno anestetizirane kombinacijom anestetika ketamina (Richterpharma, Vels, Austrija) / ksilazina (Provet, Beograd) u dozi 100 mg/kg / 5 mg/kg i potom transkardijalno perfundovane fiziološkim rastvorom (0,9% natrijum-hlorid, NaCl). Životinje su žrtvovane dekapitacijom, uz pomoć giljotine (Harvard Apparatus, South Natick, MA, SAD). Izolovanje mozgov, tkiva hipokampusa i jetre obavljeno je na ledu i odmah po izolovanju tkiva su zamrzavana u tečnom azotu i čuvana na -20 °C, do upotrebe i procesa frakcionisanja. Mozgovi namenjeni imunohistohemijskoj analizi izolovani su u celosti i čuvani u hladnom 4% rastvoru paraformaldehida (PFA, pH = 7,2-7,4), 24 sata u frižideru. Nakon 24 sata, mozgovi su prebačeni u 0,4% rastvor PFA, zatim sečeni na vibratomu (VT 100 S, Leica Bensheim,

Nemačka) i čuvani na -20 °C u krioprotektantu (sastav krioprotektanta videti u Tabeli 6) do upotrebe.

3.5.1. Frakcionisanje hipokampusu

Pre homogenizacije, hipokampusi su ostavljeni 15 minuta u homogenizacionom puferu (0,25 M saharoza; 10 mM Tris/HCl (pH = 7,4)). Homogenizacija je vršena staklenim homogenizerom (Potter-Elvehjem) sa tučkom od teflona na 4 °C sa 12 zaveslaja, na 800 obrtaja (Spindler and Hoyer, Getingen, Nemačka) u homogenizacionom puferu sa proteaznim inhibitorima (Mini, Easy pack, Roche, Minhen, Nemačka, 04 693 132 001). Homogenat je potom centrifugiran na 3300 obrtaja (Beckman, Kalifornija, SAD, rotor JA-20), 10 minuta, na 4 °C, gde je talog predstavljao jedarnu frakciju. Ostaci jedara otklonjeni su iz dobijenog supernatanta S1 centrifugiranjem pod istim uslovima. Za dobijanje taloga mitohondrija, S1 je centrifugiran na 18000 obrtaja (Beckman, Kalifornija, SAD, rotor JA-20) 20 minuta. Za dobijanje čiste citosolne frakcije, supernatant S2 je centrifugiran na 33000 obrtaja (Beckman, Kalifornija, SAD rotor Type Ti 50) 40 minuta na 4 °C (Perić i sar., 2017).

3.5.2. Frakcionisanje jetre

Tkivo jetre homogenizovano je na 4 °C, uz pomoć 20 zaveslaja na 800 obrtaja (Spindler and Hoyer, Getingen, Nemačka) u staklenom (Potter-Elvehjem) homogenizeru sa tučkom od teflona, u 4 zapremine ohlađenog homogenizacionog pufera (20 mM Tris-HCl pH = 7; 0,1 mM etilendiamin tetra sirćetna kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA); 10% glicerol; 50 mM NaCl) sa proteaznim inhibitorima (Mini, Easy pack, Roche, Minhen, Nemačka, 04 693 132 001). Kako bi se otklonio talog jedra, dobijeni homogenat je centrifugiran na 2900 obrtaja (Beckman, Kalifornija, SAD, rotor JA-20), na 4 °C, 10 minuta. Za dobijanje citosolne frakcije jetre, homogenat je dalje centrifugiran na 33000 obrtaja (Beckman, Kalifornija, SAD, rotor Type Ti50), na 4 °C, 60 minuta (Stanisavljević i sar., 2017).

3.5.3. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u citosolnim frakcijama jetre i hipokampusu korišćena je Lorijeva metoda (Lowry i sar., 1951), s tim da je koncentracija citosola jetre određivana makro-metodom, a citosolna frakcija hipokampusu mikro-metodom (mikroploča sa 96 bunarića) zbog dobijene količine uzorka.

Za određivanje koncentracije proteina jetre korišćena je standardna kriva sa goveđim serumskim albuminom (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Sigma - Aldrich, kataloški broj A7638). U epruvetu sa 10 µL uzorka dodavano je 890 µL dH₂O, a zatim reagensa **A** (1 N NaOH), reagensa **B** (4% CuSO₄ × 5H₂O) i rastvora **C** (1% B + 99% A). Na kraju, dodaje se rastvor folinovog reagensu (engl. *Folin & Ciocalteu's reagents*, FC, Sigma - Aldrich, kataloški broj F9252), (odnos FC : dH₂O = 1:1) i nakon 45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku prebacuju se rastvori sukcesivno u kvarcnoj kiveri i očitava apsorbancija na 750 nm talasne dužine na spektrofotometru (BOECO, S-30 Nemačka).

Za određivanje koncentracije citosolnih proteina hipokampusu korišćena je mikro-Lorijeva metoda. Za standardnu krivu korišćen je BSA (Sigma - Aldrich, kataloški broj

A7638), koncentracije od 0 do 1 mg/mL. Za eksperiment su korišćeni sledeći rastvori: **A** (2 % Na₂CO₃ u 0,1 N NaOH (w/v)), **B** (1% CuSO₄ × 5H₂O u milliQ H₂O (w/v)), **C** (Na-K tartarat u milliQ H₂O) i **D** (Rastvor A : Rastvor B : Rastvor C = 1:1:50 (v/v/v)). Uzorci su razblaženi sa 0,1 N NaOH, do 25 µL zapremine, potom je dodavano 250 µL rastvora D. Zatim su uzorci inkubirani 15 minuta na mešalici, nakon čega je dodavano po 25 µL FC (Sigma - Aldrich, kataloški broj F9252) reagensa. Potom su mikroploče mešane na mešalici 30 - 45 minuta, na sobnoj temperaturi i nakon toga je merena apsorbanacija na 650 nm na aparatu VICTOR² WALLAC spektrofotometru.

3.6. Spektrofotometrijski eseji

3.6.1. Određivanje enzimske aktivnosti SOD

Aktivnost enzima SOD određena je na osnovu njegovog kapaciteta da inhibira fotohemijisku redukciju nitro plavo tetrazolijum hlorida (engl. *nitro blue tetrazolium*, NBT), čiji stepen redukcije služi kao indikator produkcije O₂•⁻ (Winterbourn i sar., 1975). Procedura je sprovedena modifikovanom metodom istraživača Beauchamp i Fridovich (Beauchamp i Fridovich, 1971). Tabela 2 prikazuje neophodne supstance za određivanje SOD aktivnosti. Miks eseja čine smeša od 950 µL rastvora (fosfatni pufer, EDTA, NBT, metionina), 50 µL uzorka i 1 µL riboflavina. Jedna jedinica (unit) SOD aktivnosti definisana je kao količina SOD koja inhibira 50% nivo redukcije NBT. Merenje je vršeno u kiveti na 560 nm na spektrofotometru - BOECO (Nemačka, S-30). Rezultati su prikazani kao U/mg proteina.

Tabela 2 - Hemijske supstance za određivanje aktivnosti enzima SOD - superoksid dismutaza

Fosfatni pufer Na ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	50 mM, pH = 7,8
Etilendiamin tetra sirćetna kiselina, EDTA	0,1 mM
Nitro plavi tetrazolijum hlorid, NBT	75 mM
Dimetilformamid, DMF	70%
Metionin	13 mM
Riboflavin	2 mM

3.6.2. Određivanje enzimske aktivnosti KAT

Aktivnost enzima KAT merena je spektrofotometrijskom metodom po Claiborne-u (Greenwald, 2018). Miks eseja čine 1,95 mL fosfatnog pufera (0,5 M, Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ × 2H₂O, pH = 7), 1 mL H₂O₂ (0,019 M, H₂O₂, Sigma - Aldrich) i 0,5 mL citosolne frakcije, do finalnih 3 mL zapremine. Nivo dekompozicije H₂O₂ meren je u kiveti na talasnoj dužini od 240 nm na spektrofotometru - BOECO (Nemačka, S-30). Aktivnost KAT kvantifikovana je uz pomoć 43,6 M⁻¹ cm⁻¹ - milimolarnog ekstincionog koeficijenta H₂O₂ i izražena kao količina KAT koja razlaže 1 µmol H₂O₂ u minutu po miligramu proteina (U/mg).

3.6.3. Esej lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija se određuje kroz sadržaj MDA, koji sa tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid*, TBA) daje MDA - TBA kompleks koji se spektrofotometrijski meri na

535 nm (Albro i sar., 1986). TBA reagens čine: 0,375% TBA; 0,25 M HCl i 15% tri-hlor sirćetna kiselina. Miks esejja čine 100 μ L 0,05 M Tris-HCl pH = 7,4; 100 μ l uzorka i 400 μ L TBA. Epruvete se inkubiraju na 90 °C, 60 minuta. Standardna kriva se priprema uz pomoć komercijalnog MDA (Sigma-Aldrich, kataloški broj 108838-3). Uzorci su centrifugirani na 3000 obrtaja, 10 minuta (Labofug GL, Heraeus). Rezultati su izraženi u nmol MDA po gramu proteina (nmol/g). Merenje je vršeno na spektrofotometru BOECO (Nemačka, S-30).

3.6.4. Određivanje sadržaja PKG

Oksidativno oštećenje proteina se određuje merenjem sadržaja PKG, koji uključuje derivatizaciju karbonilnih grupa sa dinitrofenil-hidrazinom (engl. *dinitrophenylhydrazine*, DNPH) koji vodi do stvaranja stabilnog DNPH produkta (Levine i sar., 1994). Supstance korišćene u eseju date su u Tabeli 3. Smeša esejja sastoji se iz 0,3 mL uzorka i 0,3 mL DNPH (razblažuje se u 2 M HCl) i inkubira se 1 sat na sobnoj temperaturi. Potom, smeši je dodavan 0,3 mL 30% tri-hlor sirćetne kiseline. Smeša je držana 10 minuta na ledu i centrifugirana na 11000 \times g, 15 minuta (Eppendorf centrifuga, 5417R). Supernatant je dekantovan, a talog ispran tri puta sa 0,6 mL rastvora etanola: etilacetat (1:1). Potom je centrifugiran na 11000 \times g, 15 minuta, na 4 °C. U talog je dodato 0,3 mL 6 M gvanidin-hlorida (GdmCl) (u PBS) i ceo sadržaj inkubiran 30 - 60 minuta na 37 °C. Uzorci se potom centrifugiraju na 3000 \times g, 3 minuta. Ukoliko je potrebno, uzorci se razblažuju puferom Tris-HCl. Spektrofotometrijsko merenje PKG obavljeno je na talasnoj dužini od 380 nm na spektrofotometru BOECO (Nemačka, S-30), a rezultati su izraženi u nmol PKG po mg proteina (nmol/mg proteina).

Tabela 3 - Hemijske supstance korišćene za određivanje PKG

Tri-hlor sirćetna kiselina	30%
HCl	2 M
Dinitrofenil-hidrazon, DNPH	10 mM
Gvanidin-hlorid, GdmCl	6 M
Fosfatni pufer	20 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,01 M H ₃ PO ₄
Tris-HCl	0,01 M, pH = 7,4

3.7. Western blot metoda

3.7.1. SDS-PAGE elektroforeza

U citosolnim frakcijama jetre i hipokampusu dodavan je Lemli pufer za pripremu uzoraka (200 mM Tris - HCl, pH = 6,8; 42,5% glicerol; 25% β - merkaptotanol; 10% natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfat*, SDS, Sigma - Aldrich); 0,05% bromfenol plavo (Centrohem)), do jednakih koncentracija proteina (u bunariće gela nanošeno je 25 μ g proteina za jetru i 40 μ g proteina za hipokampus). Uzorci su inkubirani na 90 °C, 5 minuta, a nakon hlađenja nanošeni su na SDS - poliakrilamidni gel. Korišćen je 10% poliakrilamidni - denaturišući gel za razdvajanje proteina i 5% poliakrilamidni gel koji služi za koncentrovanje proteina (Tabela 4). Elektroforeza je rađena na elektroforeznom sistemu Mini-Protean II Electrophoresis Cell sistem (Bio - Rad) sa TRIS puferom (25 mM Tris (SERVA), 192 mM glicin (Fisher), 0,1% SDS (Sigma - Aldrich), pH = 8,3).

Tabela 4 - Hemijski sastav SDS poliakrilamidnih gelova

10% gel za razdvajanje proteina	Zapremina	5% gel za koncentrovanje proteina	Zapremina
dH ₂ O	4,0 mL	dH ₂ O	2,7 mL
1,5 M Tris pH = 8,8	2,5 mL	1 M Tris pH = 6.8	500 uL
30% Akrilamid	3,3 mL	30% Akrilamid	670 uL
10% SDS	100 uL	10% SDS	40 uL
10% Amonijum Persulfat, APS	100 uL	10% Amonijum Persulfat, APS	40 uL
Tetrametiletilendiamin, TEMED	4 uL	Tetrametiletilendiamin, TEMED	4 uL

Pored uzoraka, na gel je nanošen i marker poznate molekulske mase (Thermo Scientific Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, #26619). Proteini su razdvajani na konstantnom naponu od 100 V (u 5% gelu za koncentrovanje) pa do 120 V (u 10% gelu za razdvajanje proteina), u vremenu od 60 do 70 minuta.

3.7.2. Transfer proteina sa poliakrilamidnog gela na noseću membranu

Za proceduru prenosa proteina sa poliakrilamidnog gela na noseću membranu korišćen je aparat za vlažni transfer (Trans-blot Cell[®], Bio-Rad). Poliviniliden-difluoridne membrane (PVDF) su aktivirane u 100% rastvoru metanola, a zatim prebačene u pufer za transfer (25 mM Tris (SERVA); 192 mM glicin (Fisher); 20% metanol). Nakon toga formiran je sendvič koji se sastojao od suđera (Mini Trans-Blot[®], Bio-Rad), filter papira (Mini Trans-Blot[®], Bio-Rad), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane, filter papira i suđera. Sendvič je postavljen u uređaj za vlažni transfer i preliven puferom za transfer. Razdvojeni proteini su na taj način preneti sa gela na PVDF membrane, pri konstantnoj struji od 200 mA za uzorke hipokampusa i 160 mA za uzorke jetre, u trajanju od 2 sata.

3.7.3. Imunoblot analiza

PVDF membrane su nakon prenosa proteina inkubirane u 5% nemasnom mleku (mleko u prahu) za uzorke jetre i u 5% BSA (ROTH) za uzorke hipokampusa u Trisom puferisanom fiziološkom rastvoru (engl. *Tris-buffered saline*, TBS, SERVA) (pH = 7,5). Inkubacija je vršena 1 sat na sobnoj temperaturi. Potom su membrane sečene na odgovarajućoj molekulskoj masi, zahvaljujući markeru poznate molekulske mase (Thermo Scientific Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, #26619), a zatim su inkubirane u odgovarajućem primarnom antitelu, rastvorenom u TBS puferu, na mešalici, preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije u primarnom antitelu, membrane su ispirane, a potom inkubirane 1 do 2 sata u odgovarajućem sekundarnom antitelu, koje je razblaženo u rastvoru TBS sa 0,1% deterdžentom Tween 20 (engl. *Tris-buffered saline Tween 20*, TBST). U Tabeli 5 nalazi se spisak primarnih i sekundarnih antitela korišćenih za inkubaciju membrana sa proteinima citosolne frakcije jetre ili hipokampusa. Nivo β-aktina je upotrebljen kao unutrašnja kontrola, u svrhu normalizacije nivoa proteina različitih koncentracija. Vizualizacija proteina obavljena je uz pomoć hemiluminiscence, primenom luminola i rastvora H₂O₂ (Immobilon western chemiluminiscent HRP substrate, Millipore). Za razvoj signala uzoraka jetre korišćeni su

rendgen filmovi, dok su za razvoj signala uzoraka hipokampusa korišćeni instrumenti iBright CL 1500 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) i Chemidoc - MP System (Bio-Rad), uz korišćenje softvera ImageJ (verzija 2006.02.01). Za svaki dobijeni protein, urađena je normalizacija u odnosu na intenzitet β -aktin traka.

Tabela 5 - Spisak korišćenih primarnih i sekundarnih antitela u Western blot metodi. HRP - peroksidaza rena (engl. *Horseradish Peroxidase*).

Primarna antitela			Sekundarna antitela		
Jetra					
Specifičnost	Poreklo i klonalnost	Proizvođač, razblaženje	Poreklo i klonalnost	Konjugovana antitela	Proizvođač, razblaženje
anti-Cu/Zn-SOD	zečje, poliklonско	Stresgene, SOD-100, 1:4000	anti-zečje iz koze, poliklonско	Konjugovano sa HRP	Sigma Aldrich, Cat# A9169, 1:30000
anti-KAT	zečje, poliklonско	Thermoscientific, PA5-29183, 1:1000	anti-zečje iz koze, poliklonско	Konjugovano sa HRP	Santa Cruz, SC-2004, 1:10000
anti- β -aktin	zečje, poliklonско	Santa Cruz, SC-1616R, 1:1000	anti-zečje iz koze, poliklonско	Konjugovano sa HRP	Santa Cruz, SC-2004, 1:3000
Hipokampus					
anti-KAT	mišje, monoklonско	Santa Cruz, SC- 271803, 1:500	anti-mišje iz koze, poliklonско	Konjugovano sa HRP	Millipore, Cat#12-349, RRID: 390192, 1:10000
anti-SOCS3	zečje, poliklonско	Thermo Fisher Scientific, Cat# PA1-29534, 1:400	anti-zečje iz koze, poliklonско	Konjugovano sa HRP	Sigma Aldrich, Cat# A9169, 1:30000
anti-IL-6	mišje, monoklonско	Santa Cruz, SC-57315; Abcam ab6672, 1:500	anti-mišje iz koze poliklonско	Konjugovano sa HRP	Millipore, Cat#12-349 RRID: 390192, 1:10000
anti-Cu/Zn-SOD	mišje, monoklonско	Santa Cruz, SC-101523 1:1000	anti-mišje iz koze, poliklonско	Konjugovano sa HRP	Millipore, Cat#12-349, RRID: 390192, 1:10000
anti- β -aktin	mišje, monoklonско	Santa Cruz, SC-47778, 1:1000	anti-mišje iz koze, poliklonско	Konjugovano sa HRP	Millipore, Cat#12-349, RRID: 390192 1:10000

3.8. Imunohistohemija

3.8.1. Svetlosna imunohistohemija

Za potrebe svetlosne imunohistohemije, mozgovi pacova su sečeni na vibratomu (VT 100 S, Leica Bensheim, Nemačka) na koronalne preseke debljine 40 μm i sakupljeni u rastvoru krioprotektantu, pH = 7,4, čiji je sastav prikazan u Tabeli 6.

Tabela 6. Sastav rastvora krioprotektanta

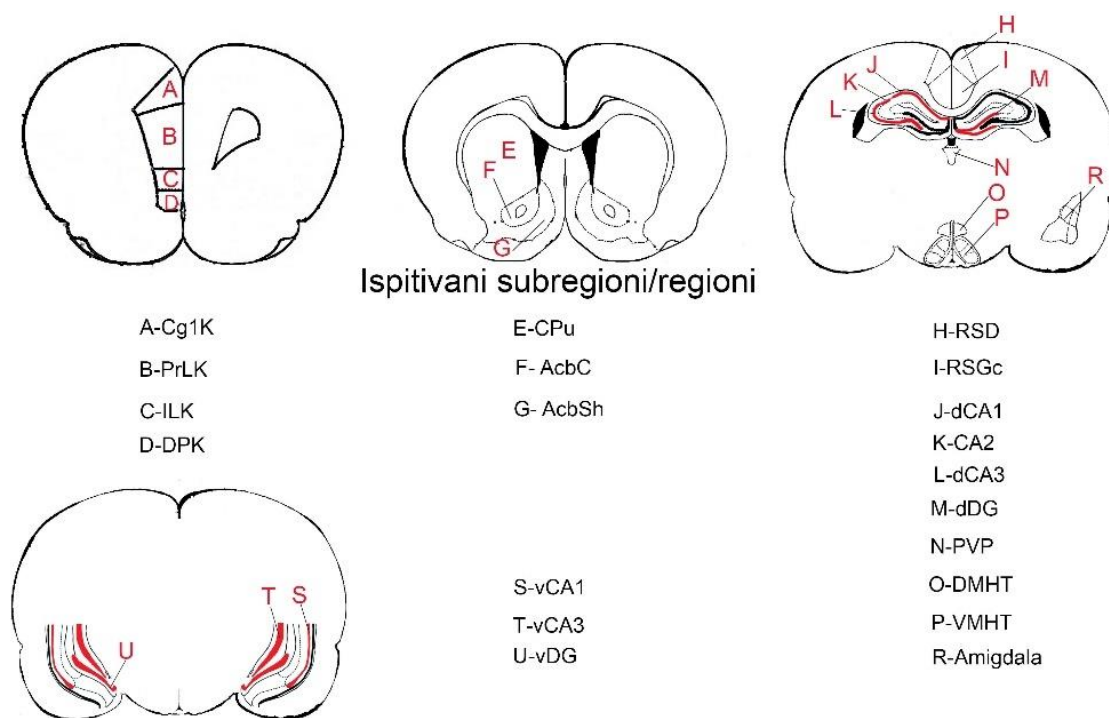
Rastvor	Sastav rastvora
Krioprotektant	15% glukoza; 30% etilen-glikol; 0,04% Na-azid u 0,05 M fosfatom puferisan fiziološki rastvor (engl. <i>phosphate buffer saline</i> , PBS)

Pre imunohistohemijske procedure, odabrani koronalni preseki potopljeni su u rastvor 0,1 M PBS (pH = 7,4) sa 0,05% Tritonom X-100 (Acros, Organics), a potom tretirani 0,6% rastvorom H_2O_2 (30% H_2O_2 , Sigma - Aldrich) na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Nakon inhibicije endogene peroksidaze, preseki su ispirani u istom rastvoru i preinkubirani u 2% kozjem serumu (engl. *normal goat serum*, NGS, Vector Laboratories) sa 0,2% Tritonom X-100 na sobnoj temperaturi tokom 1 sata. Nakon toga, preseki su inkubirani preko noći na 4 $^{\circ}\text{C}$ u primarnom antitelu c-Fos (monoklonsko, mišje, Santa Cruz 8047, razblaženje 1:500). Nakon ispiranja u PBS, preseki su inkubirani anti - mišjim sekundarnim antitelom iz kože (engl. *Biotinylated goat anti-mouse IgG*, 9200, Vector Laboratories, razblaženje 1:300) rastvorenim u PBS (pH = 7,4) i 2% NGS, na sobnoj temperaturi tokom 2 sata. Nakon ispiranja, preseki su inkubirani 20 minuta u rastvoru avidin-biotin peroksidaze (engl. *avidin-biotinylated peroxidase complex*, ABC) (Vector Laboratories). Potom su ispirani u PBS, a peroksidazna reakcija razvijena je korišćenjem 3,3'-diaminobenzidina (DAB, kataloški broj D5637 Sigma - Aldrich) pojačanim niklom (Inta i sar., 2017). Na kraju, preseki mozga su isprani i postavljeni na mikroskopske pločice (superfrostTM plus microscope slides, ThermoScientific), osušeni i pokriveni medijumom za montiranje (Eukitt mounting medium, Fluka) i pokrovnim staklom.

3.8.1.1. Moždani regioni i podregioni

Za razgraničavanje regiona i podregiona mozga korišćen je Atlas mozga pacova autora Paxinos i Watson (Paxinos i Watson, 1998). Za razdvajanje podregiona CA2, u odnosu na dCA1 i dCA3, korišćen je marker za Purkinjeove ćelije (engl. *anti-Purkinje cell protein marker 4*, PCP4, zečje, kataloški broj HPA005792, Sigma - Aldrich, razblaženje 1:200) pripremljen u 6% NGS i 0,2% Triton X-100 u PBS i sekundarno antitelo, anti - zečje iz kože (Vector Laboratories, razblaženje 1:500). Uz koordinate Atlasa mozga pacova (Paxinos i Watson, 1998) i tioninsko bojenje je korišćeno za identifikovanje vHIP, lateralnog/bazolateralnog (LA/BL) kompleksa amigdala, RSK, PVP, DMHT i VMHT, podregione mPFK i strijatuma (CPu, AcbC, AcbSh). Za brojanje c-Fos+ ćelija korišćen je softver ImageJ (verzija 1,5U). Korišćena su 3 koronalna preseka po životinji (5 do 6 životinja po grupi). Preseci su snimani na svetlosnom mikroskopu BTC (opremljen BIM 313T digitalnom kamerom), kao i Leica mikroskopu. Slikano je na uveličanju 4 \times i brojano u softveru ImageJ (verzija 1,5U).

Broj c-Fos+ ćelija izbrojan je u podregionima/regionima prikazanim šematski na Slici 29. i u Tabeli 7.

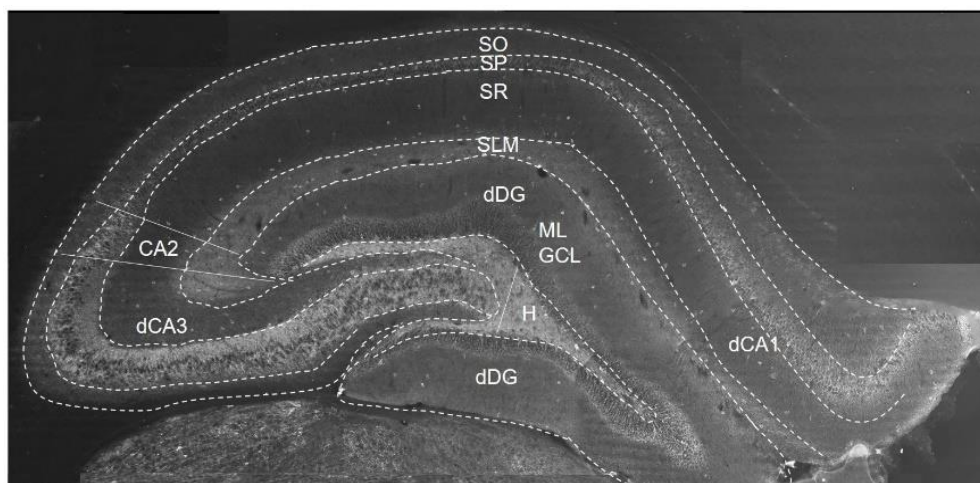


Slika 29. Šematski prikaz moždanih podregiona/regiona u kojima su brojane c-Fos+ ćelije

Tabela 7. Šematski prikaz moždanih regiona i podregiona

Naziv regiona	Naziv podregiona	Pozicija u odnosu na bregmu (mm)
dHIP	dCA1,CA2, dCA3, dDG	-3,12 do -3,60
vHIP	vCA1, vCA3,vDG	-5,16 do -6,12
Amigdale	lateralna/bazolateralna	-3,12 do -3,60
RSK	RSGc, RSD	-3,12 do -3,60
Talamus	PVP	-3,12 do -3,60
Hipotalamus, HT	DMHT, VMHT	-3,00 do -3,36
mPFK	Cg1K, PrLK, ILK, DPK	3,72 do 2,76
Strijatum	CPu, AcbC, AcbSh	1,92 do 1,22

3.8.2. Fluorescentna imunohistohemija



Slika 30. Šematski prikaz podregiona dorzalnog hipokampusa dCA1, CA2, dCA3, dDG i slojeva: *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidale* (SP), *stratum radiatum* (SR) i *stratum lacunosum moleculare* (SLM), u dCA1-CA2-dCA3, dok kod DG podregiona razlikujemo tri sloja ćelija (1. molekularni sloj, 2. sloj granularnih ćelija, 3. polimorfni sloj/hilus), od kojih su za potrebe eksperimenta dva brojana kao jedan, a to su *molecular layer-granular cell layer* (ML-GCL) i *hilus* (H)

Koronalni preseći dHIP (bregma -3,12 do -3,60 mm) (Paxinos i Watson, 1998) korišćeni su za određivanje broja PV+ i GAD67+ ćelija. Brojanje ovih ćelija urađeno je u SO, SP, SR i SLM slojevima dCA1, CA2 i dCA3 podregiona, kao i u ML-GCL i H slojevima podregiona dDG, predstavljenim na Slici 30. Razdvajanje podregiona CA2 je odrađeno uz pomoć PCP4 markera (Botcher i sar., 2014; Filipović i sar., 2018; San Antonio i sar., 2014). Koronalni preseći mozga ispirani su u 0,1 M PBS (pH = 7,4), a potom inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u rastvoru za blokiranje koji sadrži 5% magarećeg seruma (engl. *normal donkey serum*, NDS, Jackson Immuno Research) i 3% Triton X-100 (Acros, Organics) u PBS. Preseći su prvo inkubirani primarnim mišjim antitelom, anti-GAD67 (Millipore, kataloški broj MAB5406b, BRID: AB_2938602, razblaženje 1:100). Nakon nekoliko ispiranja u PBS, preseći su inkubirani u zečjem primarnom antitelu, anti-PV (Swant, PV27, RRID:AB_2631173, razblaženje 1:500), 24 sata, na 4 °C. Nakon toga, preseći su inkubirani u odgovarajućim sekundarnim antitelima iz magarca (Alexa 555, anti-mišje, Thermo Fisher Scientific, A-31570, RRID:AB_2536180, razblaženje 1:500; i Alexa 488 anti-zečje Thermo Fisher Scientific, A-21206, RRID:AB_2535792, razblaženje 1:1000), 2 sata na sobnoj temperaturi u 0,1 M PBS rastvoru koji sadrži 5% NDS. Koronalni preseći su prekriveni sa 100 ng/mL DAPI (Vector Laboratories), stavljeni na pločice i prekriveni fluorescentnim medijumom (Dako, Inc.6392). Slike moždanih preseka uslikane su na Zeiss mikroskopu (Jena, Nemačka) opremljen sa AxioCAM kamerom. Korišćena su tri koronalna preseka po životinji (5 do 6 životinja po grupi). Za brojanje PV+ i GAD67+ ćelija korišćen je softver ImageJ (verzija 1,51U). Brojane su ćelije unutar svakog naznačenog sloja i podregiona dHIP.

4. Statistička obrada rezultata

Pri obradi podataka za testove ponašanja korišćena je analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem za tri vremenske tačke i dva nezavisna parametra, stres (IZ) i Olz, praćene *Duncan's post-hoc* testom za analizu statističke značajnosti između grupa. Svi ispitivani biohemijski parametri (aktivnost enzima i proteinska ekspresija proteina), kao i broj c-Fos+ ćelija, PV+ ćelija i GAD67+ ćelija, analizirani su dvofaktorskom ANOVA praćenom *Duncan's post-hoc* testom. Procenat (%) c-Fos proteinske ekspresije analiziran je jednofaktorskom ANOVA praćenom *Duncan's post-hoc* testom. Nivoi statističke značajnosti su sledeći: $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM standardna greška merenja (engl. *standard error of mean*). Za statističku analizu korišćen je program Statistica 10/12.

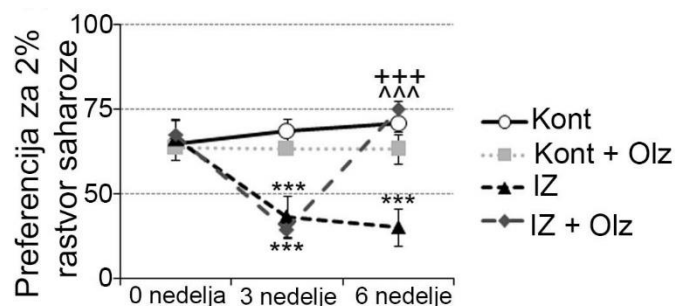
5. Rezultati

5.1. Rezultati testova ponašanja

5.1.1. Rezultati testa preferencije saharoze

Rezultati testa preferencije saharoze pokazuju da je socijalna IZ u trajanju od tri i šest nedelja kod pacova izazvala anhedoniju, dok je tronedeljni tretman Olz neutralisao ovaj efekat i pokazao svoj antidepresivni potencijal (Slika 31).

Od statistički značajnih efekata u testu preferencije saharoze zabeleženi su sledeći: efekat IZ ($F_{1,19} = 21,96$, $p < 0,001$), kombinovano delovanje IZ \times Olz ($F_{1,19} = 10,64$, $p < 0,01$), efekat vremena ($F_{2,38} = 9,73$, $p < 0,001$), kao i kombinovanog delovanja: IZ \times vreme ($F_{2,38} = 12,48$, $p < 0,001$), Olz \times vreme ($F_{2,38} = 6,68$, $p < 0,01$) i IZ \times Olz \times vreme ($F_{2,38} = 7,94$, $p < 0,01$). Statistički značajne promene u smanjenju preferencije prema saharozi, uočene su u IZ na kraju treće i šeste nedelje, u poređenju sa nultom nedeljom (***) $p < 0,001$), što ukazuje na stanje anhedonije i ponašanja nalik depresivnom kod pacova. Značajno povećanje u preferenciji prema saharozi uočeno je kod IZ + Olz grupe na kraju šeste nedelje u poređenju sa svojom tronedeljnom vremenskom tačkom (^^^ $p < 0,001$). Takođe, povećanje je uočeno i u grupi IZ + Olz u poređenju sa IZ grupom na kraju šeste nedelje (+++ $p < 0,001$), što ukazuje na antidepresivni efekat tronedeljnog Olz tretmana.



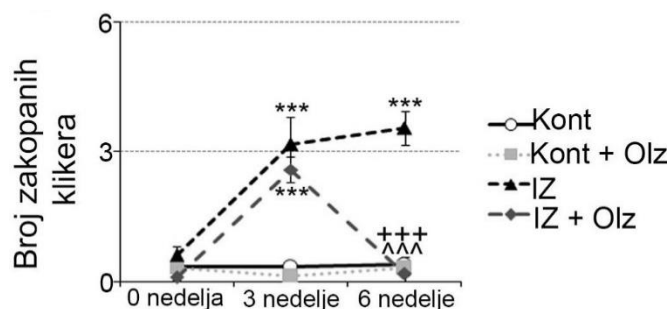
Slika 31. Rezultati testa preferencije saharoze. Prikazane su promene u preferenciji za 2% saharozu kod praćenih grupa u ključnim vremenskim tačkama. *** $p < 0,001$, u odnosu na IZ (0. nedelja); ^^ $p < 0,001$, u odnosu na IZ + Olz (3. nedelje); +++ $p < 0,001$, u odnosu na IZ (6. nedelje). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Broj životinja po grupi $n = 5 - 6$ pacova.

5.1.2. Rezultati testa zakopavanja klikera

Rezultati testa zakopavanja klikera pokazuju da je socijalna IZ u trajanju od tri i šest nedelja kod pacova, u poređenju sa Kont grupom (0. nedelja), izazvala anksioznost; dok je tronedeljni tretman Olz (IZ + Olz grupa) neutralisao ovaj efekat i značajno smanjio broj zakopanih klikera u poređenju sa trećom i šestom nedeljom u grupi IZ, pokazajući svoj anksiolitički potencijal (Slika 32).

Rezultati testa zakopavanja klikera prikazani su na Slici 32. Od statistički značajnih efekata u testu zakopavanja klikera zabeleženi su sledeći: efekat IZ ($F_{1,19} = 121,70$, $p < 0,001$) i Olz tretmana ($F_{1,19} = 39,93$, $p < 0,001$), kombinovano delovanje IZ \times Olz ($F_{1,19} = 29,84$, $p < 0,001$), efekat vremena ($F_{2,38} = 54,05$, $p < 0,001$), kao i kombinovanog delovanja: IZ \times

vremena ($F_{2,38} = 57,89$, $p < 0,001$), Olz \times vremena ($F_{2,38} = 24,60$, $p < 0,001$) i IZ \times Olz \times vreme ($F_{2,38} = 24,65$, $p < 0,001$). Kod IZ grupe došlo je do značajnog povećanja u broju zakopanih klikera na kraju treće (***) i šeste nedelje (***) u poređenju sa nultom nedeljom IZ grupe pacova (0. nedelja), što ukazuje na stanje anksioznosti kod pacova. Značajno smanjenje u broju zakopanih klikera zabeleženo je kod grupe IZ + Olz, u šestoj nedelji, u poređenju sa tronedeljnom vremenskom tačkom (^^^ $p < 0,001$) grupe IZ + Olz i sa šestonedeljnom vremenskom tačkom grupe IZ pacova (+++ $p < 0,001$), što ukazuje na anksiolitičku efikasnost tronedeljnog tretmana Olz.



Slika 32. Rezultati testa zakopavanja klikera. Prikazane su promene u broju zakopanih klikera kod praćenih grupa u ključnim vremenskim tačkama. *** $p < 0,001$, u odnosu na IZ (0. nedelja); ^^ $p < 0,001$, u odnosu na IZ + Olz (3. nedelje); +++ $p < 0,001$, u odnosu na IZ (6. nedelje). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Broj životinja po grupi $n = 5 - 6$.

5.1.3. Rezultati testa prinudnog plivanja

Rezultati testa prinudnog plivanja prikazani su u Tabeli 8.

ANOVA sa ponovljenim merenjem je za rezultate imobilnosti pokazala značajne efekte IZ ($F_{1,20} = 8,99$, $p < 0,01$) i vremena ($F_{2,40} = 10,12$, $p < 0,001$), kao i kombinovanog delovanja IZ \times vreme ($F_{2,40} = 3,86$, $p < 0,05$) i Olz \times vreme ($F_{2,40} = 3,65$, $p < 0,05$). Za rezultate plivanja, ANOVA je pokazala značajan efekat IZ ($F_{1,20} = 15,89$, $p < 0,001$), vremena ($F_{2,40} = 6,81$, $p < 0,01$) kao i efekat kombinovanog delovanja IZ \times vreme ($F_{2,40} = 3,32$, $p < 0,05$) i Olz \times vreme ($F_{2,40} = 10,38$, $p < 0,001$). Kod rezultata vezanih za penjanje uz zid cilindra, ANOVA je pokazala značajan efekat vremena ($F_{2,40} = 50,7$, $p < 0,001$) i efekat kombinovanog delovanja Olz \times vreme ($F_{2,40} = 4,54$, $p < 0,05$).

Vreme imobilnosti statistički značajno je povećano u IZ grupi na kraju treće i šeste nedelje u poređenju sa nultom nedeljom (0. nedelja) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), što ukazuje na bespomoćnost, kao element ponašanja nalik depresivnom. Značajno smanjenje imobilnosti uočeno je u grupi IZ + Olz u odnosu na IZ grupu, ## $p \leq 0,01$, u šestonedeljnoj vremenskoj tački, što ukazuje na antidepresivni potencijal Olz. Značajno povećanje vremena plivanja je detektovano u grupi IZ + Olz u odnosu na IZ grupu, ## $p < 0,01$, u šestonedeljnoj vremenskoj tački. Takođe, značajno smanjenje uočeno je u IZ grupama (3. nedelje i 6. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja), * $p < 0,05$; i IZ (6 nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja), * $p < 0,05$. Za rezultat penjanja uz zid cilindra, značajno smanjenje uočeno je u Kont grupi (6. nedelje) u odnosu na Kont grupu (0. nedelja), ** $p < 0,01$. Takođe, statistička značajnost zabeležena je u IZ grupi (3. nedelje) u odnosu na IZ (0 nedelja), ** $p < 0,01$ i IZ (6. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja), *** $p < 0,001$.

Tabela 8 - Rezultati testa prinudnog plivanja. Statistički značajni rezultati identifikovani su na sledeći način: vreme provedeno u **imobilnosti** - IZ (3. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja), ** p < 0,01; IZ (6. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja), *** p < 0,001; IZ + Olz (6. nedelje) u odnosu na IZ (6. nedelje), ## p < 0,01; vreme provedeno u **plivanju** - IZ (3. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja) * p < 0,05; IZ (6. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja),* p < 0,05; IZ + Olz (6. nedelje) u odnosu na IZ (6. nedelje), ## p < 0,01; vreme provedeno u **penjanju** - Kont (6. nedelje) u odnosu na Kont (0 nedelja), ** p < 0,01; IZ (3. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja), ** p < 0,01; IZ (6. nedelje) u odnosu na IZ (0. nedelja), *** p < 0,001. Rezultati su predstavljeni kao SEM ±, za broj životinja po grupi n = 6 pacova.

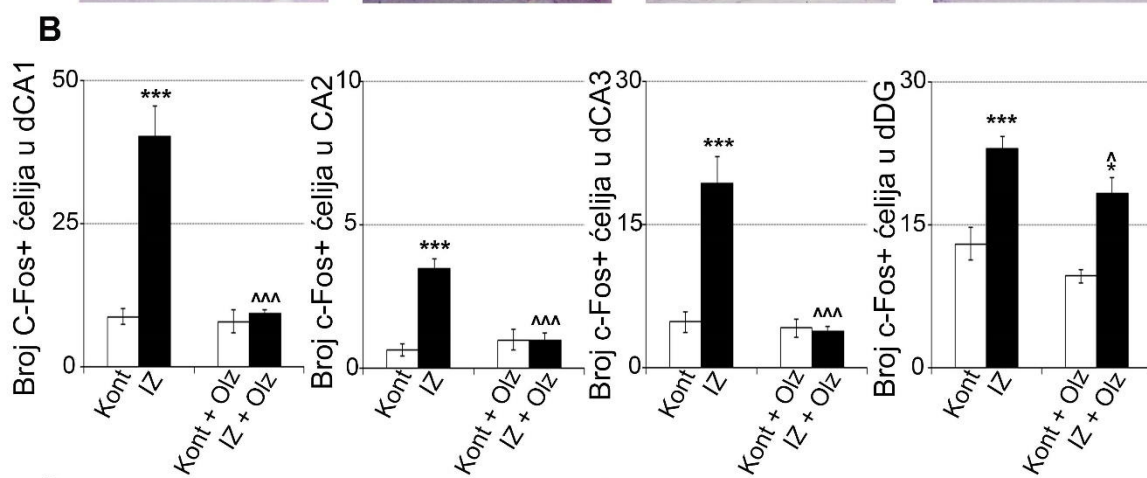
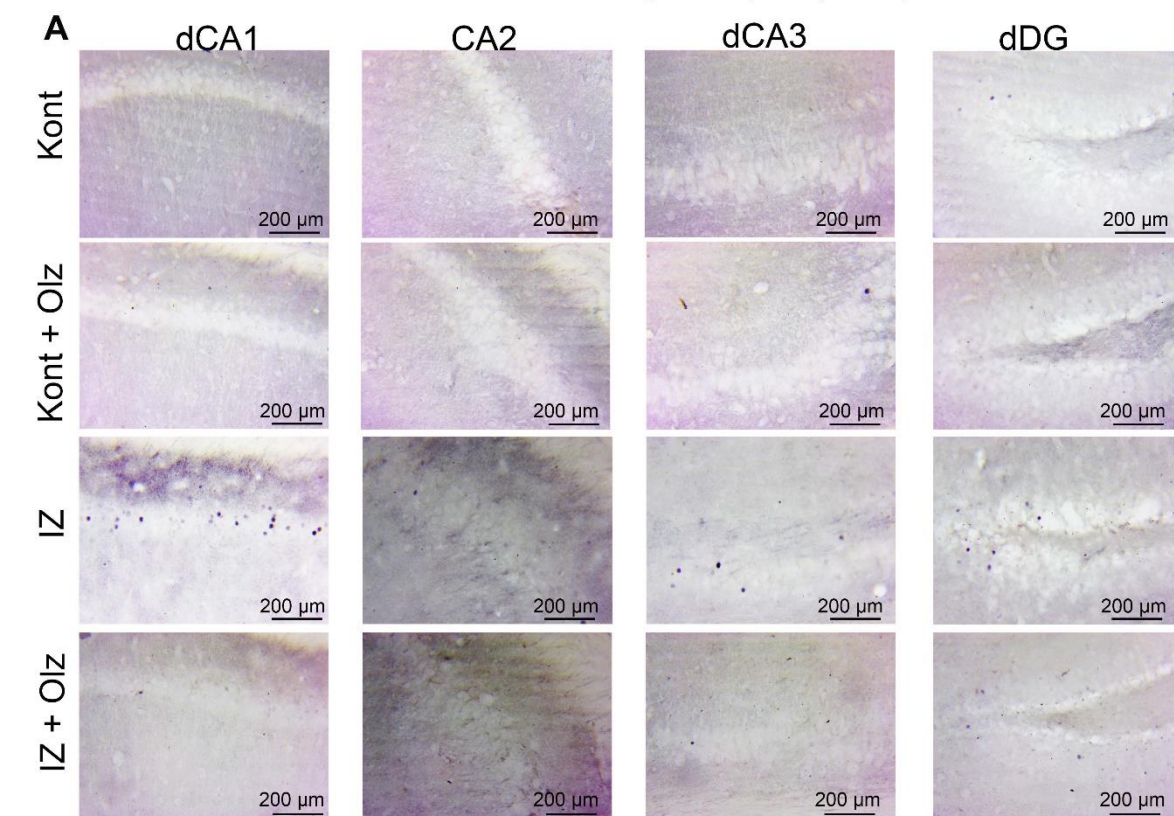
Test prinudnog plivanja									
Grupa	Vreme provedeno u imobilnosti (Sekunde)			Vreme provedeno u plivanju (Sekunde)			Vreme provedeno u penjanju (Sekunde)		
	0. nedelja	3. nedelje	6. nedelje	0. nedelja	3. nedelje	6. nedelje	0. nedelja	3. nedelje	6. nedelje
Kont	40 ± 13	58 ± 24	68 ± 15	166 ± 12	181 ± 19	189 ± 16	78 ± 13	62 ± 12	43 ± 11 **
Kont + Olz	58 ± 14	70 ± 22	71 ± 15	154 ± 12	160 ± 26	218 ± 10	89 ± 8	70 ± 13	11 ± 5
IZ	57 ± 21	137 ± 37 **	169 ± 26 ***	182 ± 7	124 ± 27 *	109 ± 17 *	77 ± 17	39 ± 17 **	22 ± 11 ***
IZ + Olz	70 ± 15	142 ± 20	85 ± 17 ##	138 ± 16	85 ± 15	186 ± 9 ##	92 ± 15	73 ± 14	29 ± 9

5.2. Broj c-Fos+ ćelija u podregionima/regionima mozga nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom

5.2.1. Broj c-Fos+ ćelija u podregionima dorzalnog i ventralnog hipokampusa nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom

Imunohistohemijsko bojenje c-Fos+ ćelija i njihov broj u podregionima dHIP: dCA1, CA2, dCA3 i dDG predstavljen je na Slici 33. Od statistički značajnih efekata ANOVA je pokazala sledeće: efekat IZ ($F_{1,20} = 29,34$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 22,23$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 21,21$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 44,17$, $p < 0,001$), Olz tretmana ($F_{1,20} = 27,57$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 13$; $p < 0,01$; $F_{1,20} = 27,62$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 8,11$; $p < 0,01$) i kombinovanog delovanja IZ × Olz tretmana ($F_{1,20} = 24,74$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 22,23$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 23,26$, $p < 0,001$) na broj c-Fos+ ćelija u podregionima dCA1, CA2, dCA3 i dDG. Povećan broj c-Fos+ ćelija zabeležen je u IZ grupi, u poređenju sa Kont grupom (***) p < 0,001) u dCA1, CA2 i dCA3, dok je tretman Olz u IZ grupi doveo do smanjenja broja c-Fos+ ćelija u poređenju sa IZ pacovima (^^^ p < 0,001), u ova tri ispitivana podregiona. Za podregion dDG, značajno povećanje u broju c-Fos+ ćelija uočeno je kod IZ pacova (***) p < 0,001) i IZ + Olz pacova (* p < 0,05) u poređenju sa Kont grupom. Takođe, značajno smanjenje u broju c-Fos+ ćelija pokazano je u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom (^ p < 0,05) u dDG podregionu.

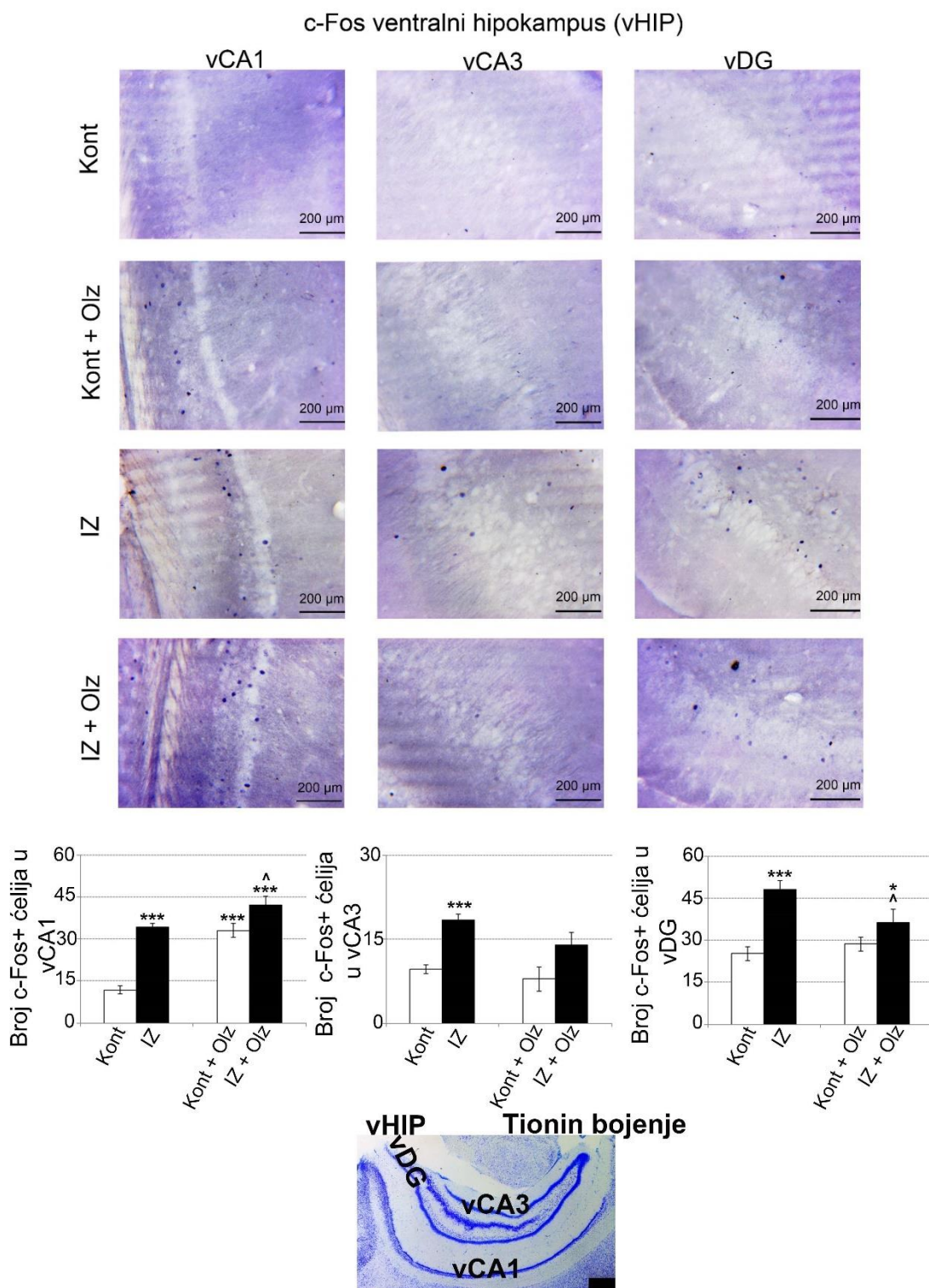
c-Fos dorzalni hipokampus (dHIP)



Slika 33. Imunohistohemijsko bojenje i kvantifikacija c-Fos+ ćelija na presecima podregiona dHIP A) Reprezentativne mikrofotografije dCA1, CA2, dCA3 i dDG podregiona nakon bojenja c-Fos markera. B) Na graficima je predstavljen broj c-Fos+ ćelija unutar odgovarajućih podregiona dHIP. C) Marker PCP4 korišćen je za detekciju podregiona CA2. Data je reprezentativna mikrofotografija dHIP Kont pacova nakon imunohistohemijskog bojenja PCP4 proteina. Statistički značajne razlike u broju c-Fos+ ćelija između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu; ^^ $p < 0,001$, ^ $p < 0,05$ poređenje u odnosu na IZ pacove. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Skala - 200 μ m.

Imunohistohemijsko bojenje c-Fos+ ćelija i broj ovih ćelija u podregionima vHIP: vCA1, CA3 i vDG predstavljen je na Slici 34. Od statistički značajnih efekata zabeleženi su sledeći: efekat IZ ($F_{1,18} = 48,66$, $p < 0,001$; $F_{1,18} = 22,24$, $p < 0,001$; $F_{1,18} = 23,62$, $p < 0,001$) na broj c-Fos+ ćelija u podregionima vCA1, vCA3 i vDG. Takođe, uočen je značajan efekat Olz tretmana ($F_{1,18} = 42,70$, $p < 0,001$) na broj c-Fos+ ćelija u vCA1 i kombinovanog delovanja IZ \times Olz ($F_{1,18} = 8,41$, $p < 0,01$; $F_{1,18} = 5,84$, $p < 0,05$) na broj c-Fos+ ćelija u podregionima vCA1 i vDG.

Povećanje broja c-Fos+ ćelija uočeno je kod IZ pacova u poređenju sa Kont pacovima (*** $p < 0,001$), u podregionima vCA1, vCA3 i vDG. Takođe, značajno povećanje u broju c-Fos+ ćelija uočeno je u Kont grupi tretiranoj Olz u poređenju sa Kont grupom (*** $p < 0,001$) za podregion vCA1. Značajno povećanje u broju c-Fos+ ćelija pokazano je u IZ + Olz grupi (*** $p < 0,001$; * $p < 0,05$) u poređenju sa Kont grupom, za oba podregiona i vCA1 i vDG. Takođe, u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ pacovima (^ $p < 0,05$), u podregionu vCA1 uočeno je značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija, a značajno smanjenje broja c-Fos+ ćelija (^ $p < 0,05$) u podregionu vDG.



Slika 34. Imunohistochemijsko bojenje i kvantifikacija c-Fos+ ćelija na presecima podregiona vHIP. Reprezentativne mikrografije vCA1, vCA3 i vDG podregiona nakon bojenja c-Fos markera. Na graficima je predstavljen broj c-Fos+ ćelija unutar odgovarajućih podregiona vHIP. Tionin bojenje korišćeno je za detekciju podregiona vHIP. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu; ^ $p < 0,05$ poređenje u odnosu na IZ pacove. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Skala - 200 μ m.

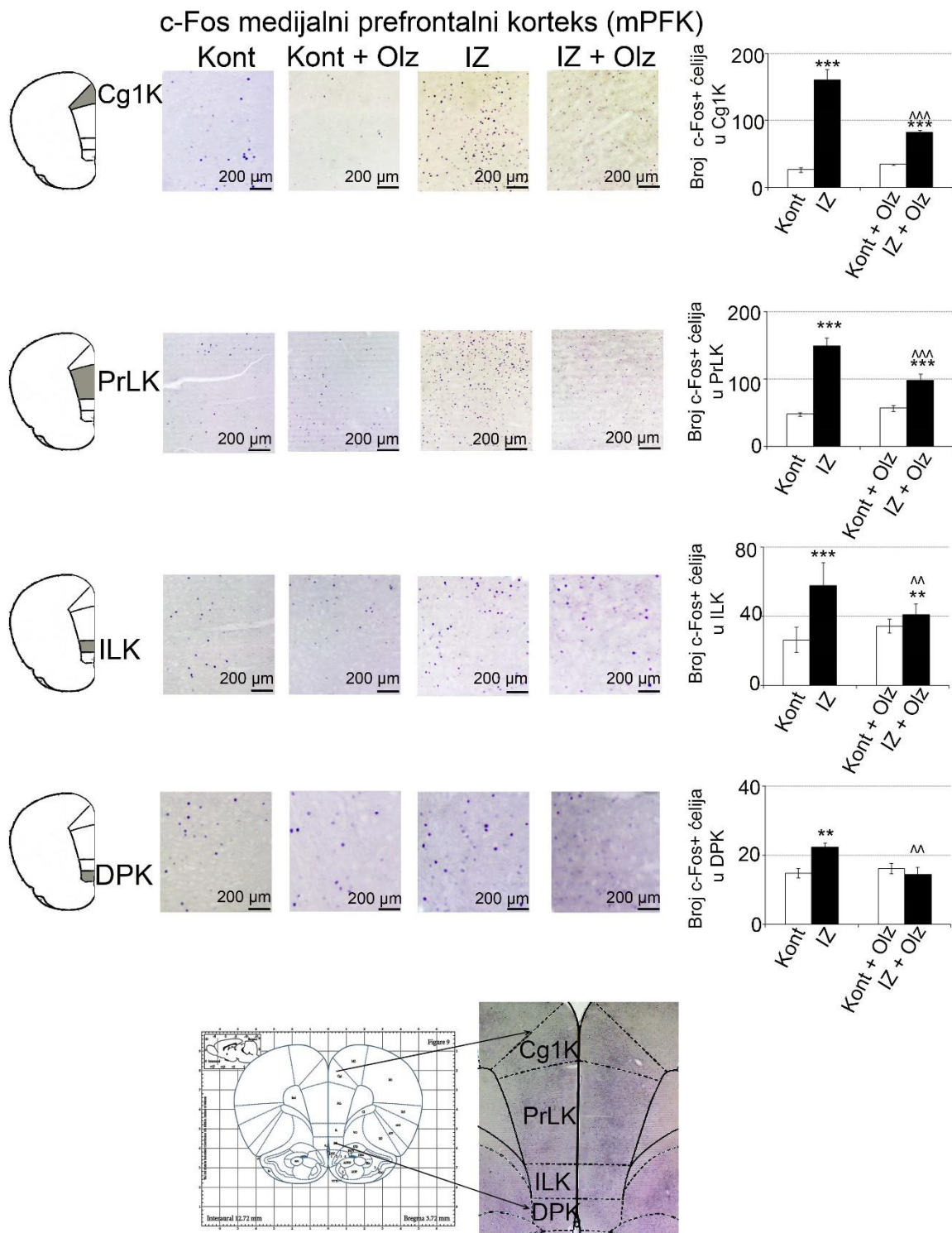
5.2.2. Broj c-Fos+ ćelija u podregionima medijalnog prefrontalnog korteksa nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom

Na Slici 35, predstavljeno je imunohistohemijsko bojenje c-Fos+ ćelija i njihov broj u Cg1K, PrLK, ILK i DPK - podregionima mPFK. Od statistički značajnih efekata zabeleženi su sledeći: značajan efekat IZ ($F_{1,20} = 148,34$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 78,53$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 31,30$, $p < 0,001$) i Olz tretmana ($F_{1,20} = 21,88$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 6,74$, $p < 0,05$), kao i kombinovanog delovanja IZ \times Olz tretmana ($F_{1,20} = 33,31$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 13,63$, $p < 0,05$; $F_{1,20} = 12,97$, $p < 0,01$; $F_{1,20} = 8,62$, $p < 0,01$) u podregionima Cg1K, PrLK, ILK i DPK, redom.

Značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija uočeno je u IZ i IZ + Olz grupi u poređenju sa Kont pacovima (***) $p < 0,001$), podregiona Cg1K i PrLK. Dok je značajno smanjenje zabeleženo u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom (^^^ $p < 0,001$) za oba podregiona, Cg1K i PrLK.

U podregionu ILK uočeno je značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija u IZ grupi (***) $p < 0,001$) i IZ + Olz grupi (** $p < 0,01$) u poređenju sa Kont grupom, dok je značajno smanjenje uočeno u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ pacovima (^^ $p < 0,01$).

U podregionu DPK, uočeno je značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija u IZ grupi pacova u poređenju sa Kont grupom (** $p < 0,01$), dok je smanjenje pronađeno u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom (^^ $p < 0,01$).

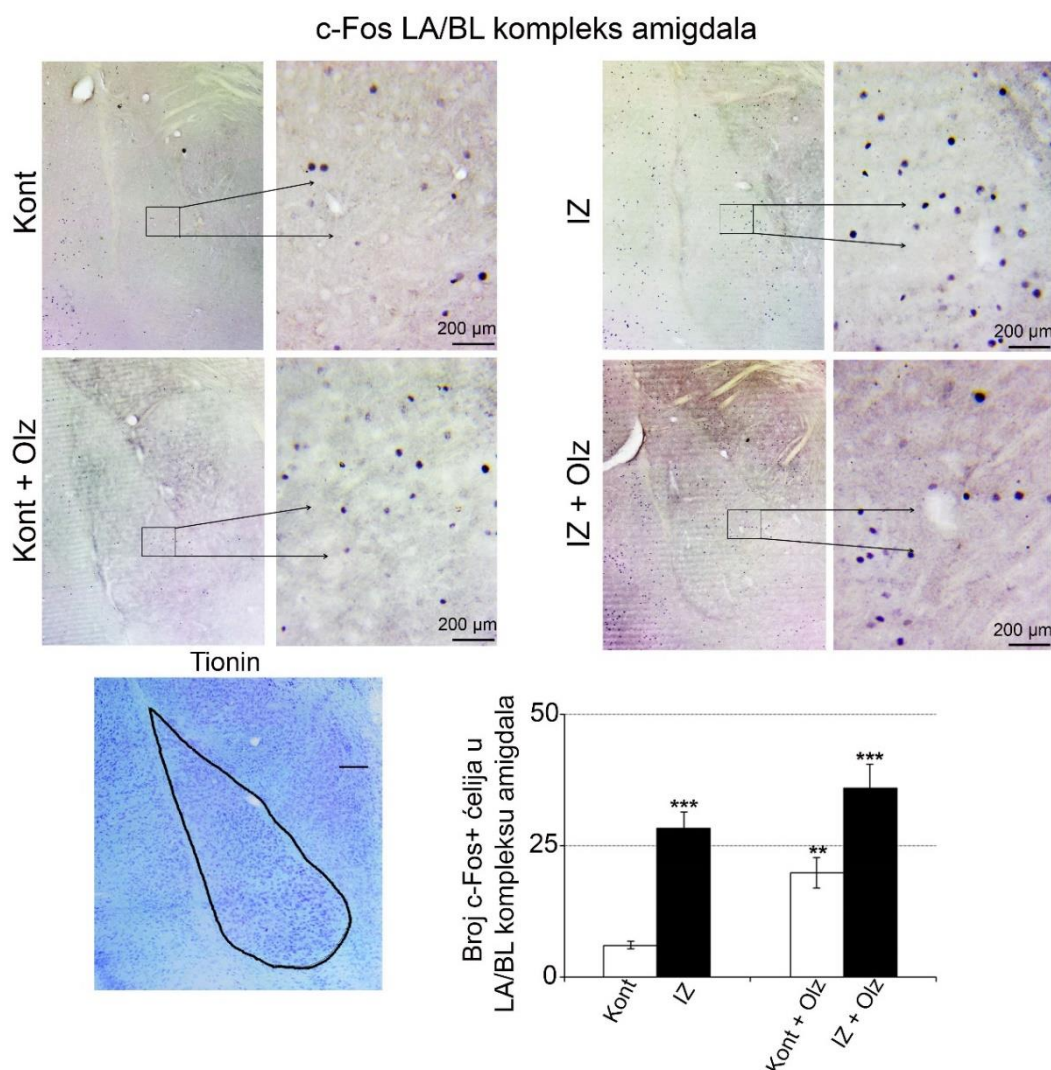


Slika 35. Imunohistohemijsko bojenje i kvantifikacija c-Fos+ ćelija na presecima podregiona medijalnog prefrontalnog korteksa (mPFK). Reprezentativne mikrografije Cg1K, PrLK, ILK, DPK podregiona mPFK nakon bojenja c-Fos markera. Na graficima je predstavljen broj c-Fos+ ćelija unutar odgovarajućih podregiona mPFK. Koordinate atlasa mozga pacova korišćenje su za razgraničavanje podregiona mPFK. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ poređene uvek u odnosu na Kont grupu; ^^ $p < 0,001$, ^ $p < 0,01$ poređenje u odnosu na IZ pacove. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Skala - 200 μ m.

5.2.3. Broj c-Fos+ ćelija u lateralnom/bazolateralnom kompleksu amigdala nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom

Na Slici 36 predstavljeno je imunohistohemijsko bojenje c-Fos+ ćelija kao i njihov broj u LA/BL kompleksu amigdala. Uočeni su sledeći statistički značajni efekti: efekat IZ ($F_{1,19} = 34,56$, $p < 0,001$) i kombinovanog delovanja IZ \times Olz ($F_{1,19} = 10,78$, $p < 0,01$) na broj c-Fos+ ćelija.

Socijalna IZ (***) $p < 0,001$) značajno povećava broj c-Fos+ ćelija u LA/BL kompleksu amigdala, u poređenju sa Kont grupom pacova, dok tronedeljni Olz tretman (** $p < 0,01$) dovodi do povećanja broja c-Fos+ ćelija u Kont grupi pacova u odnosu na Kont grupu. Značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija uočeno je i u grupi IZ + Olz (***) $p < 0,001$) u poređenju sa Kont grupom.

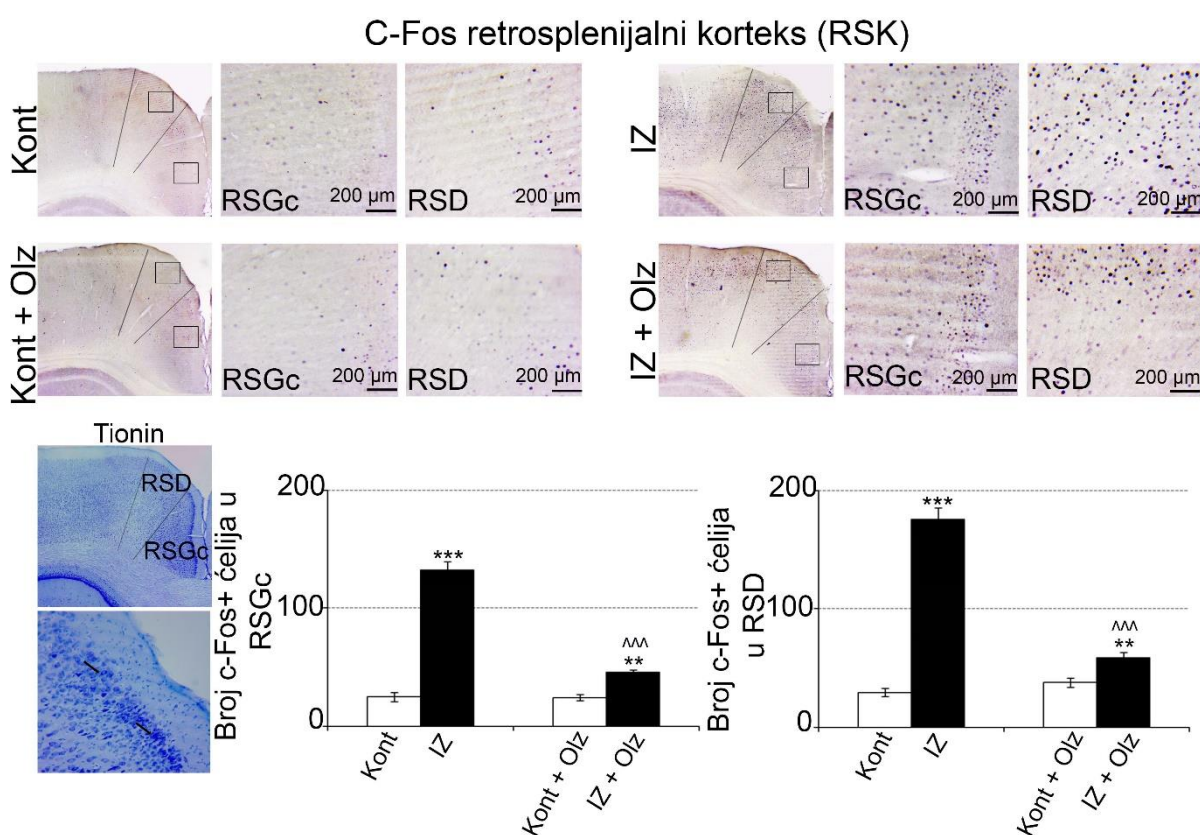


Slika 36. Imunohistohemijsko bojenje i kvantifikacija c-Fos+ ćelija na presecima lateralnog/bazolateralnog (LA/BL) kompleksa amigdala. Reprezentativne mikrografije LA/BL kompleksa amigdala nakon bojenja c-Fos markera. Tioninsko bojenje korišćeno je za razlikovanje granica amigdala. Na grafiku je predstavljen broj c-Fos+ ćelija u amigdalama. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Skala - 200 μ m.

5.2.4. Broj c-Fos⁺ ćelija u podregionima retrosplenijalnog korteksa nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom

Na Slici 37 prikazano je imunohistohemijsko bojenje c-Fos⁺ ćelija i njihov broj u RSD i RSGc. Zabeleženi su sledeći značajni efekti: efekat IZ ($F_{1,20} = 192,59$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 189,45$, $p < 0,001$) i Olz tretmana ($F_{1,20} = 81,28$, $p < 0,001$, $F_{1,20} = 86,46$, $p < 0,001$), kao i kombinovanog delovanja IZ × Olz tretmana ($F_{1,20} = 107,68$, $p < 0,001$, $F_{1,20} = 83,43$, $p < 0,001$) na broj c-Fos⁺ ćelija u RSD i RSGc.

Socijalna IZ značajno povećava broj c-Fos⁺ ćelija (***) u poređenju sa Kont grupom u oba podregiona RSK. Tronedeljni tretman Olz značajno smanjuje IZ povećan broj c-Fos⁺ ćelija (^^^ $p < 0,001$) i to u oba ispitivana podregiona ali se vrednosti ne vraćaju na kontrolni nivo (** $p < 0,01$).

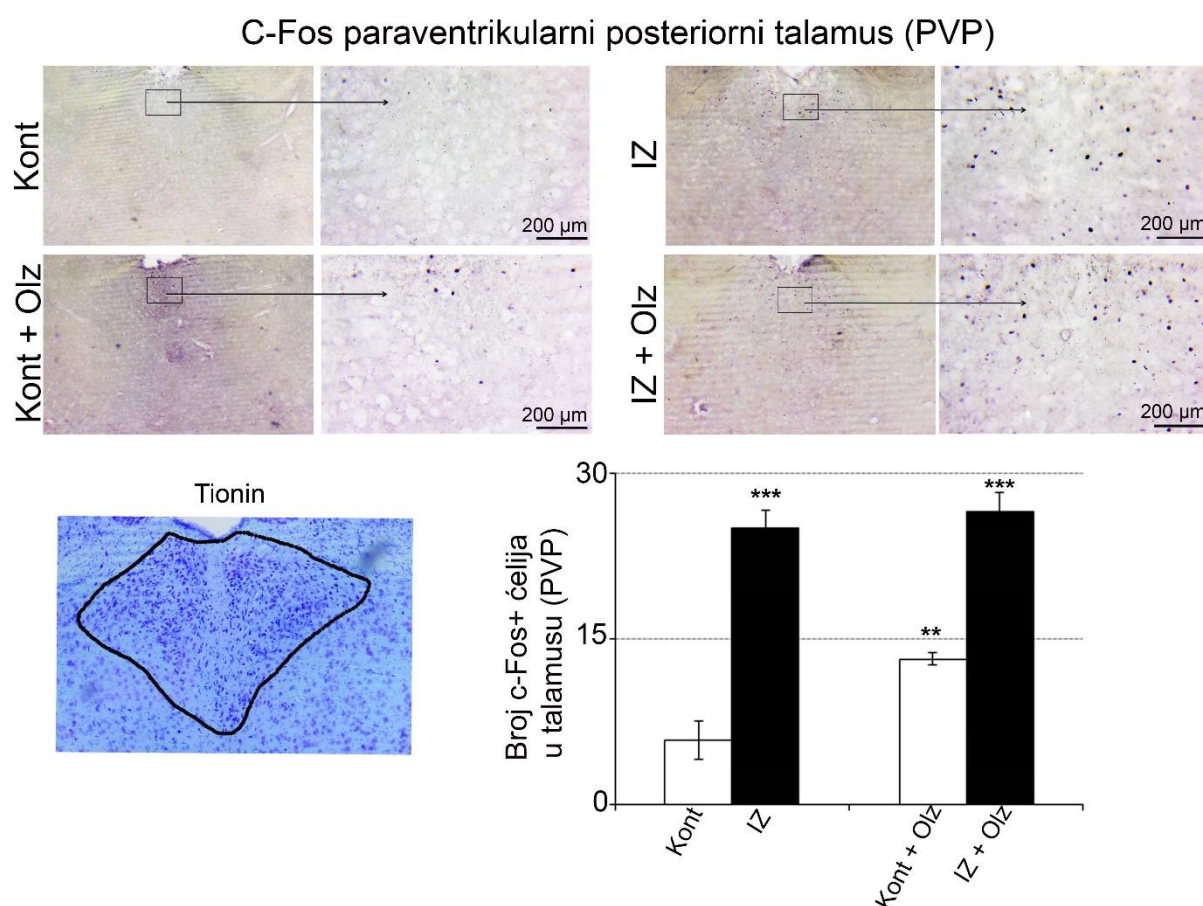


Slika 37. Imunohistohemijsko bojenje i kvantifikacija c-Fos⁺ ćelija na presecima granularnog, c podregiona i agranularnog retrosplenijalnog korteksa (RSGc, RSD). Reprezentativne mikrografije RSGc i RSD podregiona RSK nakon bojenja c-Fos markera. Tioninsko bojenje koronalnih preseka korišćeno je za pravljenje granica između RSGc i RSD. Na graficima je predstavljen broj c-Fos⁺ ćelija u RSGc i RSD. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu. ^^ $p < 0,001$ poređenje u odnosu na IZ. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Skala - 200 μm.

5.2.5. Broj c-Fos+ ćelija u paraventrikularnom jedru talamusa i dorzomedijalnom i ventromedijalnom jedru hipotalamusa nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom

Na Slici 38, predstavljeno je imunohistohemijsko bojenje c-Fos+ ćelija i njihov broj u PVP jedru talamusa. Od značajnijih efekata zabeleženi su sledeći: efekat IZ ($F_{1,20} = 113,5$, $p < 0,001$) i Olz tretmana ($F_{1,20} = 8,39$, $p < 0,01$) na broj c-Fos+ ćelija.

Značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija zabeleženo je u Kont grupi tretiranoj Olz (** $p < 0,001$), IZ grupi (***) $p < 0,001$) i IZ + Olz grupi (***) $p < 0,001$) u poređenju sa Kont grupom.

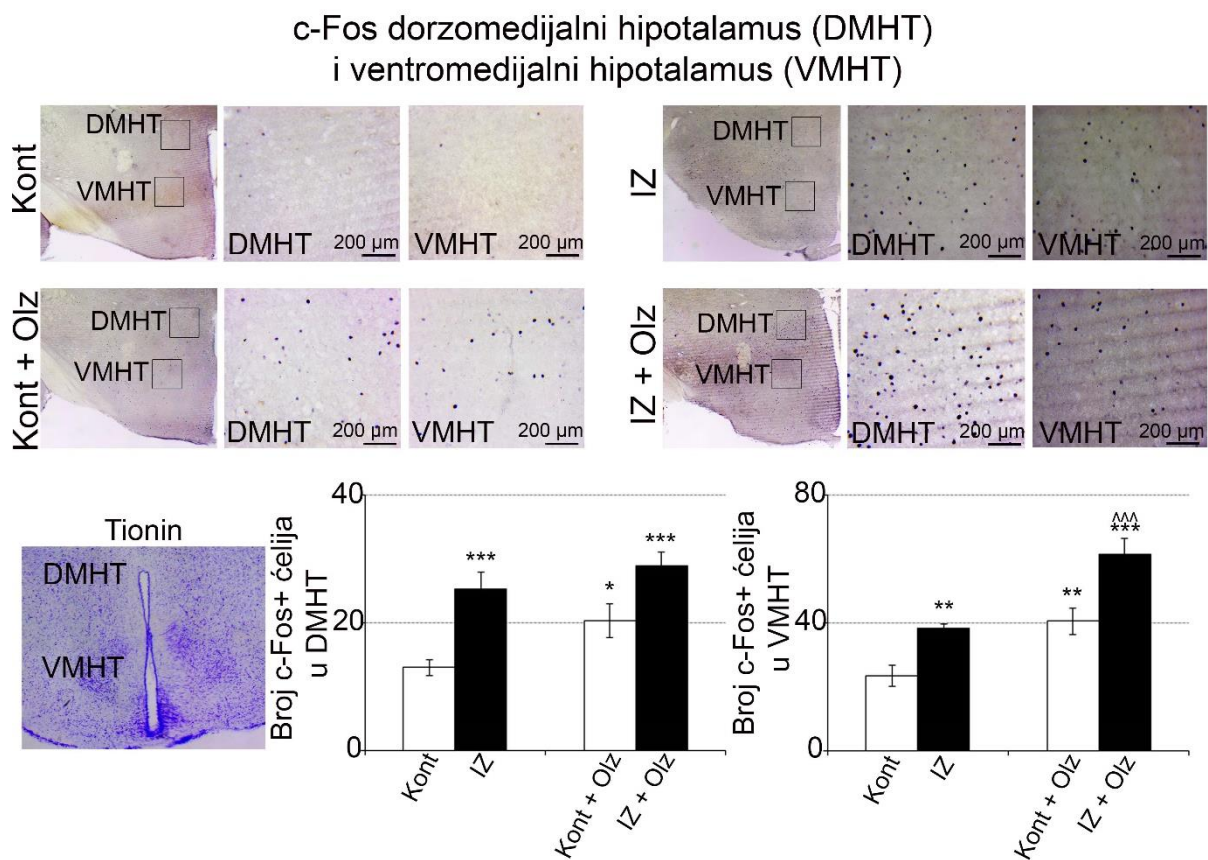


Slika 38. Imunohistohemijsko bojenje i kvantifikacija c-Fos+ ćelija na presecima paraventrikularnog posteriornog jedra talamusa (PVP). Reprezentativne mikrografije PVP jedra svih ispitivanih grupa nakon bojenja c-Fos markera. Tioninsko bojenje korišćeno je za identifikovanje granica PVP. Na grafiku je predstavljen broj c-Fos+ ćelija u PVP ispitivanih grupa. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Skala - 200 μ m.

Na Slici 39 predstavljeno je imunohistohemijsko bojenje c-Fos+ ćelija i njihov broj u DMHT i VMHT. Zabeleženi su sledeći značajni efekti: efekat IZ ($F_{1,20} = 22,7$, $p < 0,001$; $F_{1,20}$

= 23,53, $p < 0,001$) i Olz tretmana ($F_{1,20} = 6,23$, $p < 0,05$; $F_{1,20} = 30,6$, $p < 0,001$) na broj c-Fos+ ćelija u podregionima DMHT i VMHT.

Socijalna IZ dovela je do značajnog povećanja broja c-Fos+ ćelija u oba ispitana podregiona hipotalamusa ($*** p \leq 0,001$; $** p \leq 0,01$) u poređenju sa Kont grupom. Takođe, Olz tretman je u Kont grupi doveo do značajnog povećanja broja c-Fos+ ćelija u oba ispitana podregiona hipotalamusa ($* p < 0,05$; $** p < 0,01$) u poređenju sa Kont grupom. U oba podregiona hipotalamusa zabeleženo je značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija u IZ + Olz grupi ($*** p < 0,001$) u poređenju sa Kont grupom, dok je samo u podregionu VMHT zabeleženo i značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija u poređenju sa IZ grupom ($^^^ p < 0,001$).



Slika 39. Imunohistohemijско bojenje i kvantifikacija c-Fos+ ćelija na presecima dorzomedijalnog jedra hipotalamusa (DMHT) i ventromedijalnog jedra hipotalamusa (VMHT). Reprezentativne mikrografije DMHT i VMHT svih ispitivanih grupa nakon bojenja c-Fos markera. Tioninsko bojenje korišćeno je za identifikovanje granica DMHT i VMHT. Na graficima je predstavljen broj c-Fos+ ćelija u DMHT i VMHT za sve ispitivane grupe. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: $*** p \leq 0,001$; $** p \leq 0,01$, $*** p < 0,001$, $** p < 0,01$, $* p < 0,05$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu. $^^^ p < 0,001$ poređenje u odnosu na IZ pacove. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Skala - 200 μ m.

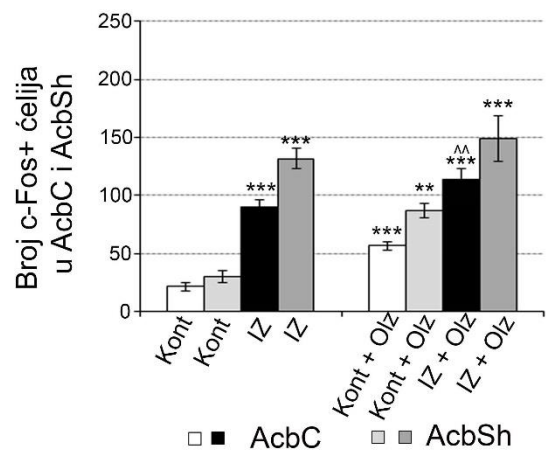
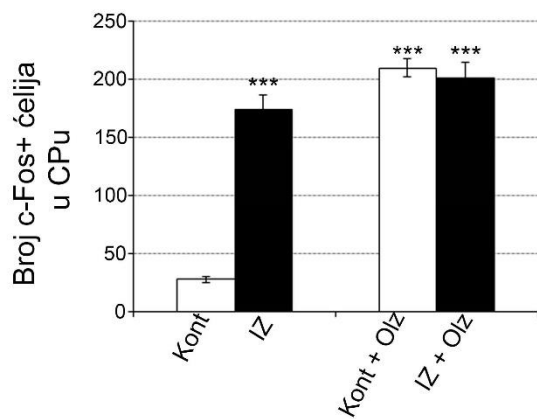
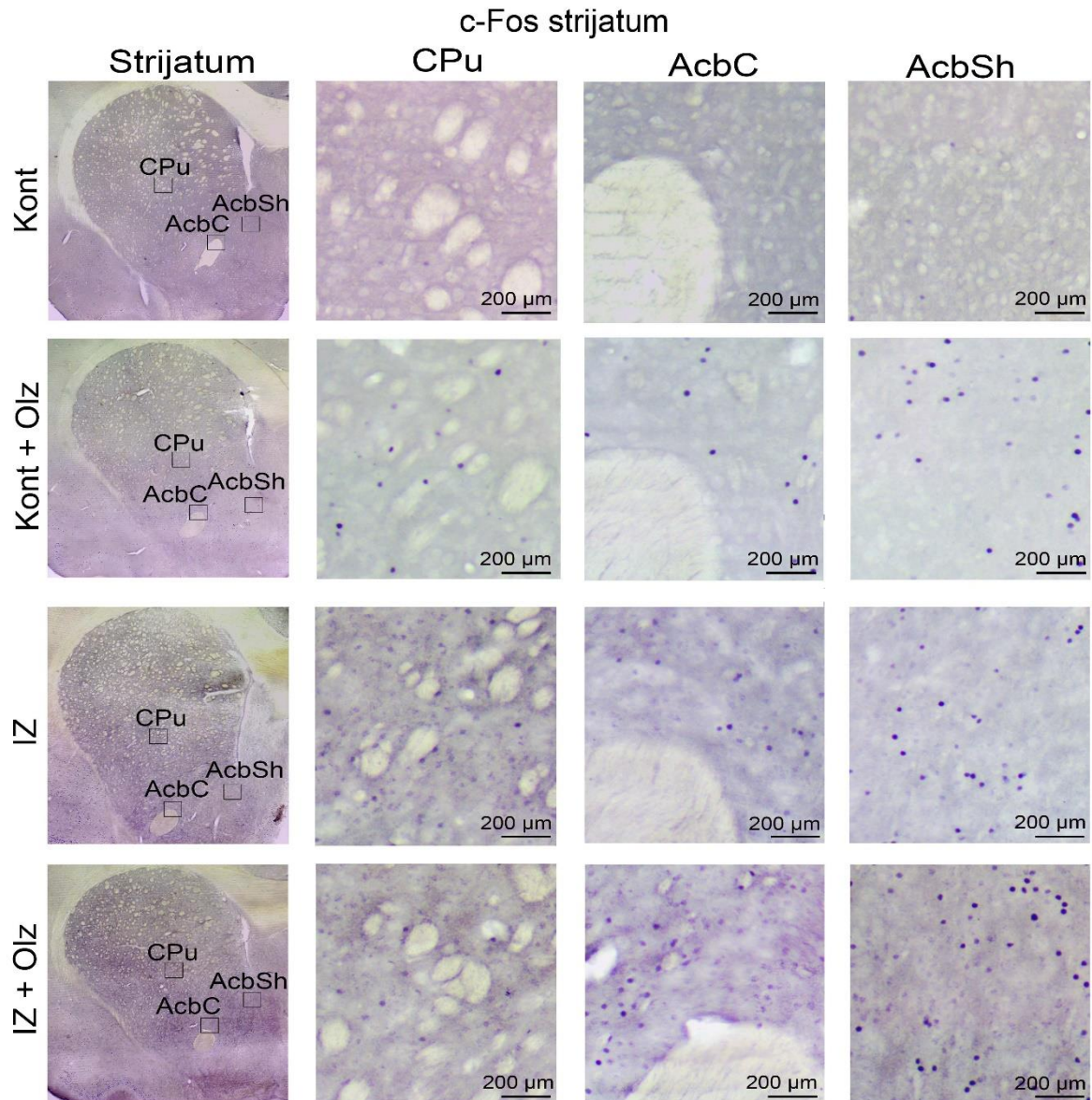
5.2.6. Broj c-Fos+ ćelija u dorzalnemu strijatumu (CPu) i nukleus akumbens-u (AcbC i AcbSh) nakon dugotrajne izolacije i/ili tretmana olanzapinom

Na Slici 40 prikazano imunohistohemijsko bojenje c-Fos+ ćelija i njihov broj u strijatumu: CPu, AcbC i AcbSh. Od statistički značajnih efekata zabeleženi su efekat IZ ($F_{1,20} = 52,68$, $p < 0,001$), Olz tretmana ($F_{1,20} = 119,86$, $p < 0,001$), kao i kombinovanog delovanja IZ \times Olz ($F_{1,20} = 66,14$, $p < 0,001$) na broj c-Fos+ ćelija u CPu.

Značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija u CPu pokazano je i u Kont grupi tretiranoj Olz, IZ grupi i IZ + Olz grupi u poređenju sa Kont grupom (** $p < 0,001$).

U AcbC i AcbSh, zabeležen je značajan efekat IZ ($F_{1,20} = 106,82$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 50,24$, $p < 0,001$) i Olz tretmana ($F_{1,20} = 23,86$, $p < 0,001$; $F_{1,20} = 10,25$, $p < 0,01$) na broj c-Fos+ ćelija.

Značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija pokazano je u Kont grupi tretiranoj Olz (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$), IZ grupi (** $p < 0,001$, ** $p < 0,001$) i IZ + Olz grupi (** $p < 0,001$), u poređenju sa Kont grupom, u AcbC i AcbSh, redom. Značajno povećanje broja c-Fos+ pokazano je u AcbC, između Olz tretirane IZ grupe i IZ pacova ($p \leq 0,01$).



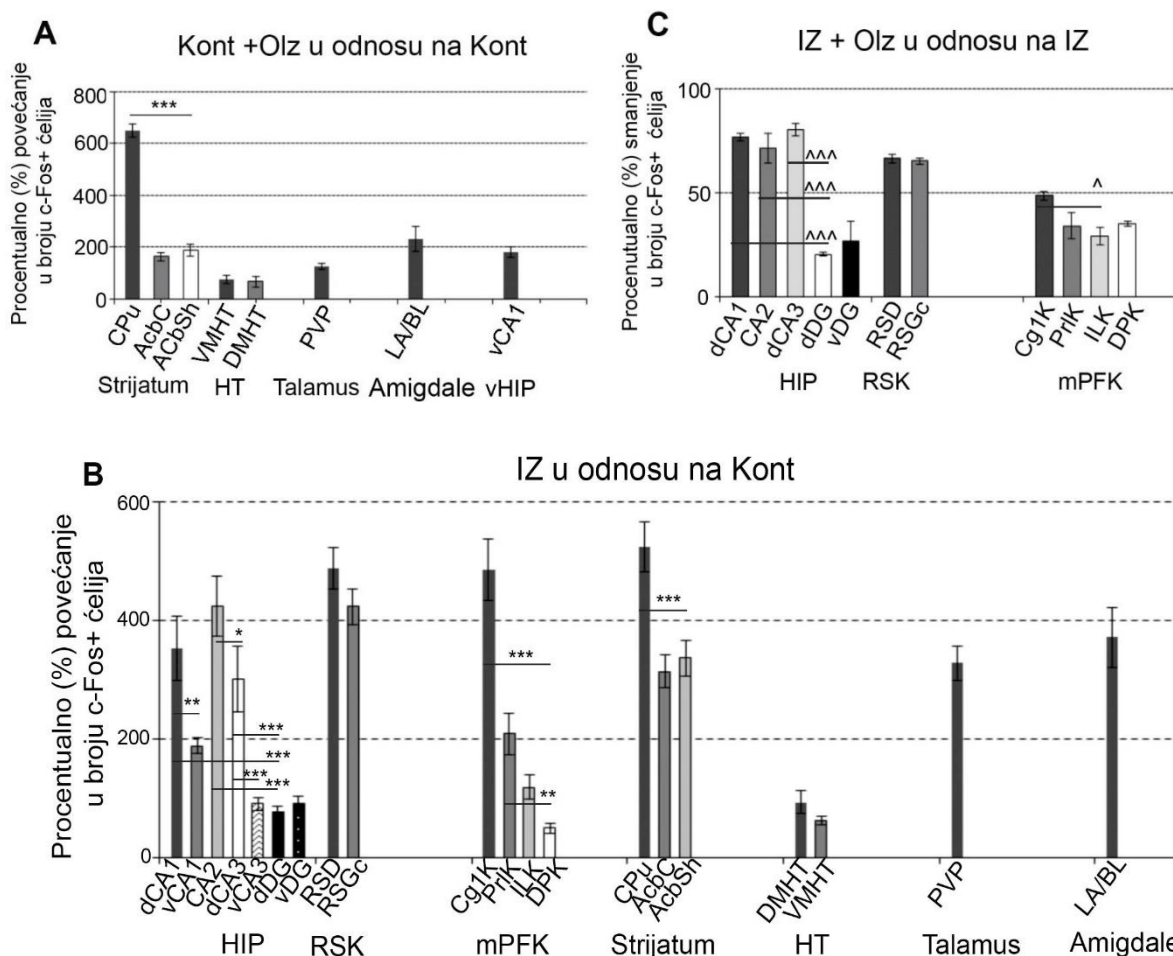
Slika 40. Imunohistohemijsko bojenje i kvantifikacija c-Fos+ ćelija preseccima CPu, AcbC i AcbSh. Reprezentativne mikrografije CPu, AcbC i AcbSh svih ispitivanih grupa nakon bojenja c-Fos markera. Na graficima je predstavljen broj c-Fos+ ćelija u CPu, AcbC i AcbSh ispitivanih grupa. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć ANOVA analize praćene *Duncan's post-hoc* testom su sledeće: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu. ^^ $p \leq 0,01$ poređenje u odnosu na IZ pacove. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Skala - 200 μ m.

5.2.7. Procentualne promene u broju c-Fos+ ćelija nakon izolacije i/ili tretmana olanzapinom

Značajno procentualno povećanje broja c-Fos+ ćelija kod Olz tretmana na kontrolnim životinjama u odnosu na samu Kont grupu ($F_{1,40} = 56,04$, $p < 0,001$) pokazano je u ispitivanim podregionima mozga (Slika 41 A). Najveće procentualno povećanje uočeno je u regionu CPu (648%), a najmanje u DMHT (56%). Takođe, zabeleženo je statistički značajno povećanje u podregionu CPu u poređenju sa podregionima AcbC i AcbSh (*** $p < 0,001$), pojedinačno.

Značajno procentualno povećanje u broju c-Fos+ ćelija kod IZ ($F_{1,100} = 22,32$, $p < 0,001$) u poređenju sa Kont grupom prikazano je na Slici 41 B. Najveće procentualno povećanje zabeleženo je u CPu (524%) i redom u RSD (488%), Cg1K (486%), CA2 (425%), RSGc (424%), a najmanje u dDG (77%), VMHT (64%) i DPK (51%). Statistički značajno povećanje uočeno je i u CA2 podregionu u poređenju sa dCA3 (* $p < 0,05$) i dDG (*** $p < 0,001$), kao i u dCA1 i dCA3 u poređenju sa dDG (*** $p < 0,001$). Poređenjem dHIP sa vHIP, značajno povećanje uočeno je u dCA1 u poređenju sa vCA1 (** $p < 0,01$) i u dCA3 u poređenju sa vCA3 (*** $p < 0,001$), dok između dorzalnog i ventralnog DG nije bilo statistički značajnih razlika. Statistički značajnih razlika nije bilo ni između podregiona vHIP. Značajno procentualno povećanje broja c-Fos+ ćelija uočeno je u podregionu Cg1K u odnosu na svaki podregion PrLK, ILK i DPK (*** $p < 0,001$) pojedinačno, dok je značajno povećanje u PrLK zabeleženo samo u odnosu na DPK (** $p < 0,01$). Takođe, značajno povećanje (*** $p < 0,001$) zabeleženo je u podregionu CPu u poređenju sa AcbC i AcbSh.

Značajan efekat kombinovanog delovanja IZ \times Olz tretmana ($F_{1,54} = 15,85$, $p < 0,001$) na procenat broja c-Fos+ ćelija pokazan je u moždanim podregionima IZ pacova u kojima je tretman Olz smanjio broj c-Fos+ ćelija u poređenju sa IZ grupom (Slika 41 C). U hipokampalnim podregionima najveće smanjenje uočeno je u dCA3 (80%), dCA1 (77%) i CA2 (71,4%) podregionu. Najmanje smanjenje zabeleženo je u ventralnom (26,8%) i dorzalnog DG podregionu (20%). U podregionima mPFC, najveće procentualno povećanje je detektovano u Cg1K (49%), dok je najmanje bilo u ILK podregionu (29%). Procentualna promena c-Fos+ ćelija u podregionima RSK je skoro identična, 66,4% za RSD i 65,15% za RSGc. Statistički značajno povećanje zabeleženo je u dCA3, dCA1 i CA2 podregionima u poređenju sa dorzalnim i ventralnim DG (^^^ $p < 0,001$), dok između ova dva podregiona nije bilo statistički značajnih razlika. Takođe, statistički značajna razlika zabeležena je u Cg1K u odnosu na ILK (^ $p < 0,05$).



Slika 41. Promena broja c-Fos+ ćelija u podregionima mozga pacova, izražena u procentima (%). (A) Porast broja c-Fos+ ćelija u podregionima mozga kontrolnih (Kont) pacova tretiranih olanzapinom (Olz) u odnosu na Kont iskazano u procentima (%). *** $p < 0,001$, predstavlja poređenje između grupa Kont + Olz i Kont, u podregionima u kojima je Olz doveo do povećanja broja c-Fos+ ćelija (B) Porast broja c-Fos+ ćelija u podregionima mozga pacova u izolaciji (IZ) u odnosu na Kont iskazano u procentima (%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ predstavlja poređenje između grupe IZ u odnosu na Kont grupu, u podregionima u kojima je stres IZ doveo do povećanja broja c-Fos+ ćelija (C) Smanjenje broja c-Fos+ ćelija u podregionima mozga IZ + Olz grupe pacova u odnosu na IZ izraženo u procentima (%). ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,001$ predstavlja poređenje između grupe IZ + Olz u odnosu na IZ grupu, u kojima je Olz tretman kod IZ pacova doveo do smanjenja broja c-Fos+ ćelija.

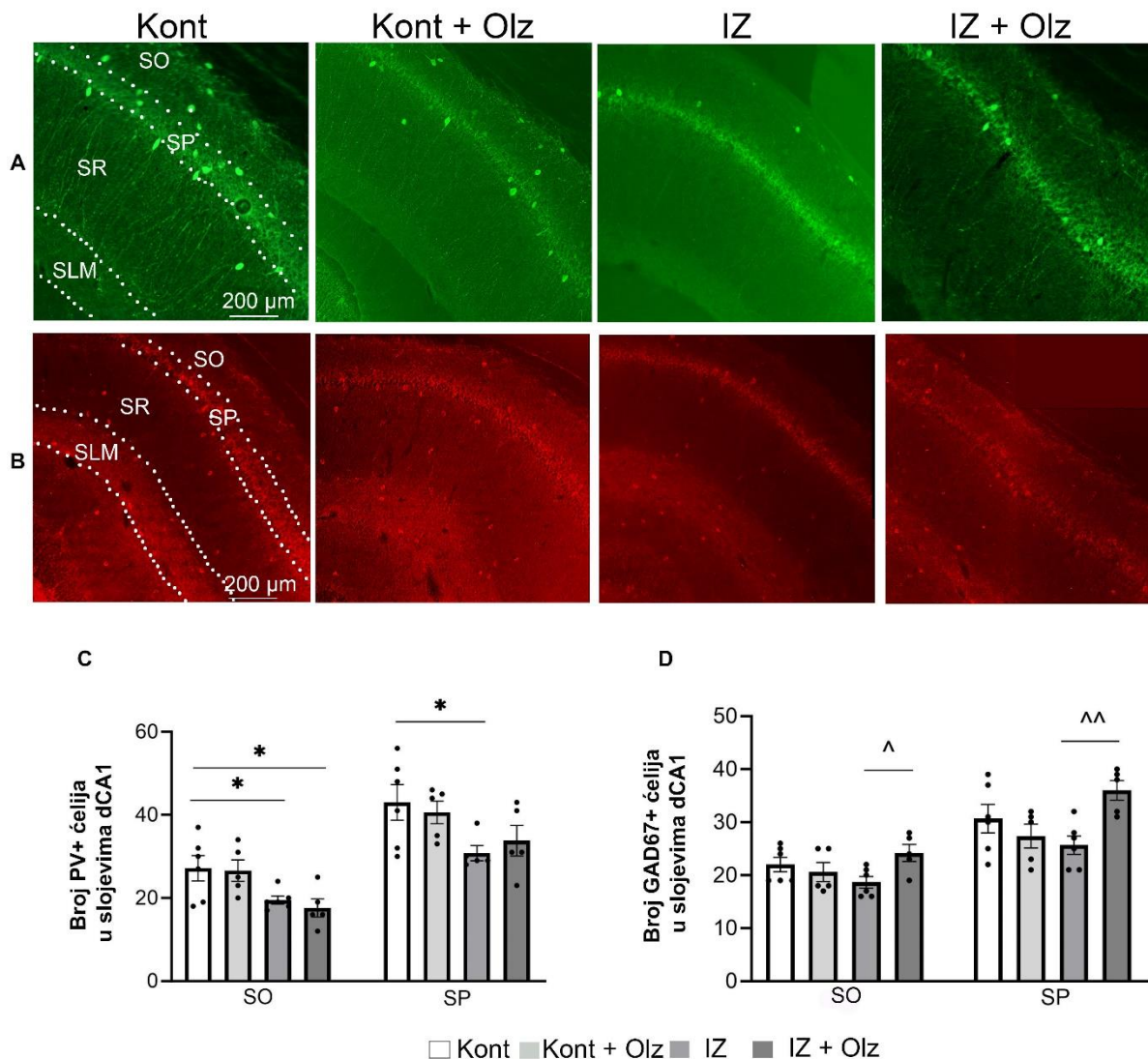
5.3. Broj PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima podregiona dHIP

5.3.1. dCA1 podregion

Reprezentativne mikrografije dCA1 podregiona sve četiri ispitivane grupe, sa označenim slojevima (SO, SP, SR, SLM) na Kont preseccima, prikazane su na Slici 42 A, B. Mikrografije su dobijene imunofluorescentnim bojenjem gde zeleni signal predstavlja PV+ ćelije (Slika 42 A) a crveni signal GAD67+ ćelije (Slika 42 B).

U **dCA1** podregionu pokazan je značajan efekat IZ ($F_{1,18} = 12,61$, $p < 0,01$; $F_{1,17} = 7,63$, $p \leq 0,01$) na broj PV+ ćelija u slojevima SO i SP (Slika 42 C). Značajno smanjenje broja PV+ ćelija zabeleženo je u grupama IZ ili IZ + Olz upoređenju sa Kont grupom (* $p < 0,05$) u SO sloju. U sloju SP, zabeleženo je značajno smanjenje broja ovih ćelija u IZ grupi u poređenju sa Kont (* $p < 0,05$) (Slika 42 C). U sloju SR nisu zabeležene statistički značajne promene u broju PV+ ćelija (rezultati nisu prikazani), dok u sloju SLM nisu ni detektovane PV+ ćelije (Slika 42 A).

Zabeležen je značajan efekat kombinovanog delovanja IZ \times Olz ($F_{1,18} = 5,8$, $p < 0,05$; $F_{1,18} = 8,97$, $p < 0,01$) na promene broja GAD67+ ćelija u slojevima SO i SP (Slika 42 D). Značajno povećanje u broju ovih ćelija zabeleženo je u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom (^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$), u SO i SP slojevima (Slika 42 D). Nije bilo statističke značajnosti između eksperimentalnih grupa u slojevima SR i SLM (rezultati nisu prikazani).



Slika 42. Promene u broju PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima dCA1 podregiona, nakon dugotrajne socijalne IZ i tretmana Olz. Reprezentativne mikrografije SO, SP, SR i SLM podregiona dCA1 dobijene obeležavanjem PV + ćelija (zeleni signal) (A) i GAD67 + ćelija (crveni signal) (B) u slojevima. Statistički značajna promene u broju PV+ ćelija (C) i GAD67+ ćelija (D) zabeležene su u slojevima SO i SP, podregiona dCA1 u grupama Kont, Kont + Olz, IZ, IZ + Olz. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: * $p < 0,05$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu; ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,001$ poređenje u odnosu na IZ grupe pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM sa 5 do 6 pacova po grupi. Skala - 200 μ m.

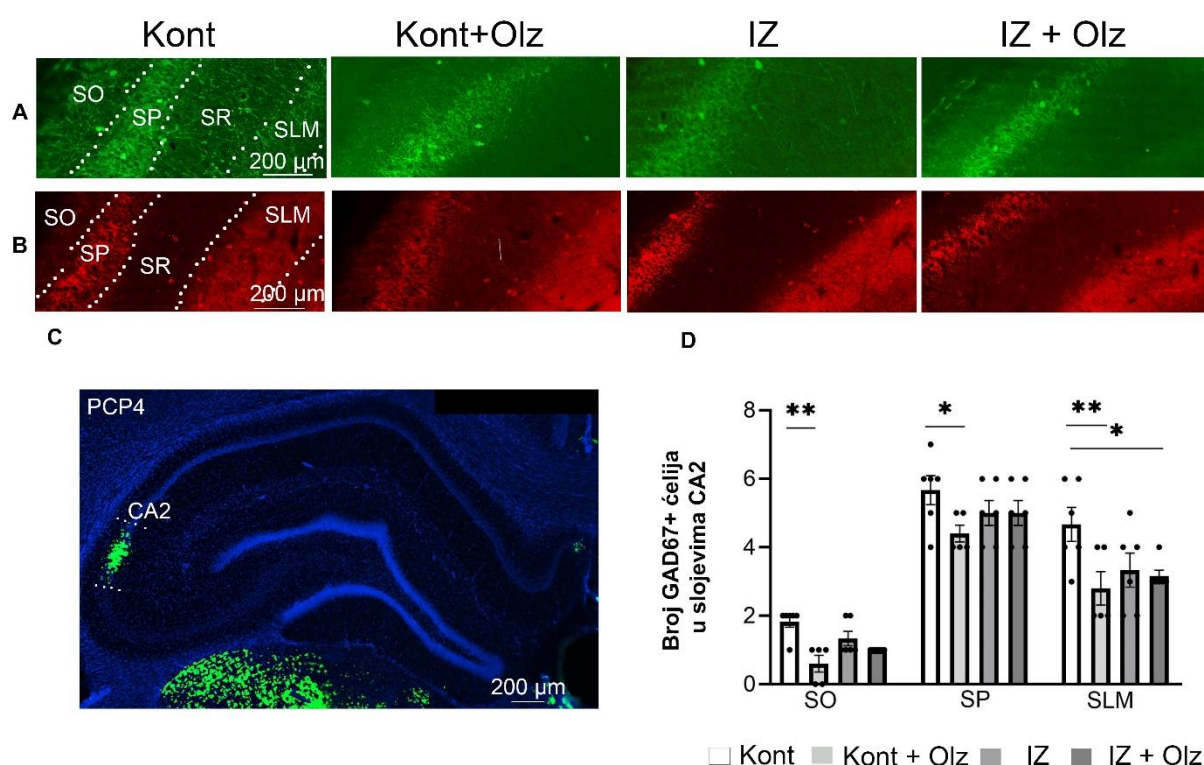
5.3.2. CA2 podregion

Reprezentativne mikrografije CA2 podregiona sve četiri ispitivane grupe, sa označenim slojevima (SO, SP, SR i SLM) na Kont preseccima, prikazane su na Slici 43 A, B. Mikrografije su dobijene imunofluorescentnim bojenjem, zeleni signal predstavlja PV+ ćelije (Slika 43 A) a crveni signal GAD67+ ćelije (Slika 43 B). Slika 43 C je nastala preklapanjem

signala dobijenih imunofluorescentnim bojenjem PCP4 (zeleni signal) koji je marker CA2 regiona i bojenjem jedara neurona DAPI bojom (plavi signal).

U CA2 podregionu nisu pokazane statistički značajne razlike u broju PV+ ćelija u slojevima SO i SP, između eksperimentalnih grupa (rezultati nisu prikazani). Takođe, u slojevima SR i SLM nisu detektovane PV+ ćelije (Slika 43 A).

Od statistički značajanih efekata zabeležen je efekat Olz tretmana ($F_{1,19} = 9,63$, $p < 0,01$; $F_{1,19} = 6,41$, $p < 0,05$) u slojevima SO i SLM, na broj GAD67+ ćelija (Slika 43 D). Značajno povećanje u broju GAD67+ ćelija uočeno je u Kont grupi tretiranoj Olz u odnosu na Kont grupu (** $p \leq 0,01$, * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$) u slojevima SO, SP i SLM (Slika 43 D), kao i u IZ + Olz grupi u poređenju sa Kont grupom (* $p < 0,05$) u SLM sloju (Slika 43 D). U SR sloju nije zabeležena statistički značajna promena u broju GAD67+ ćelija (rezultat nije prikazan).



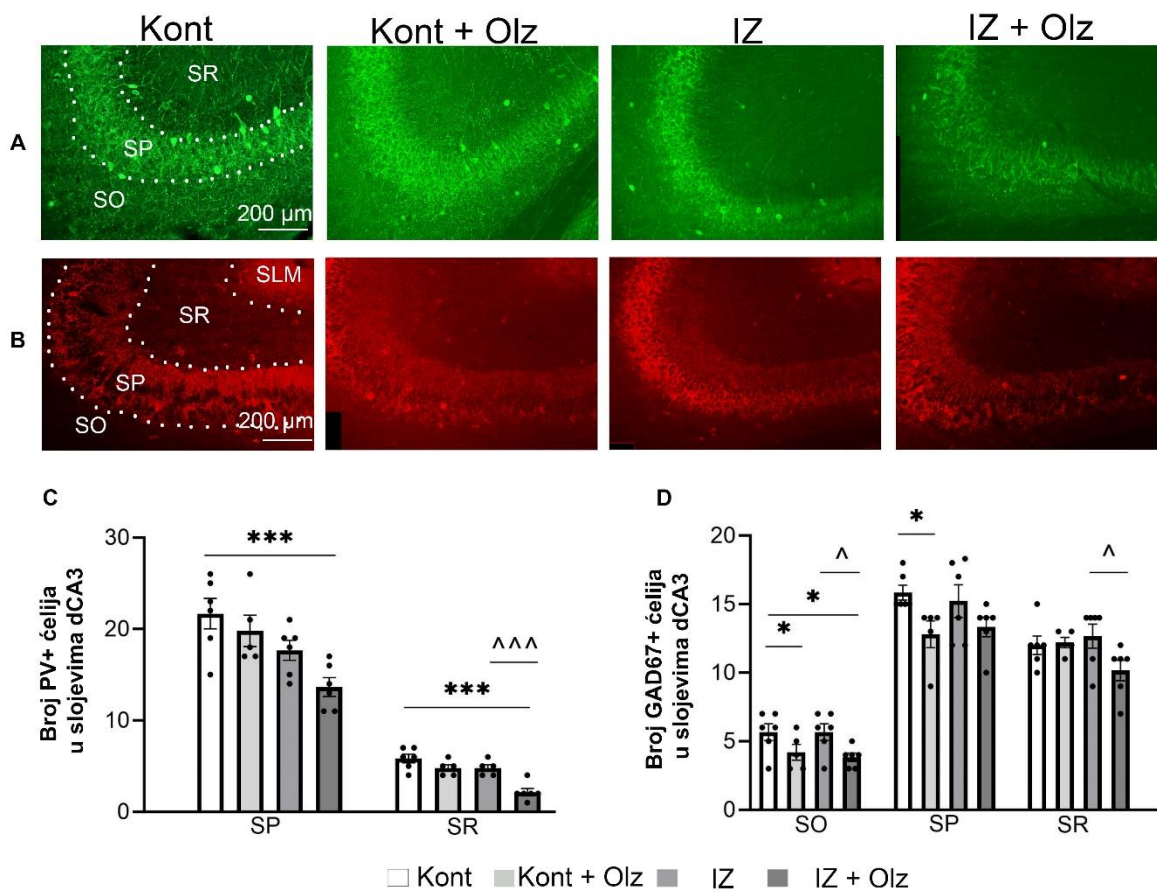
Slika 43. Promene u broju PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima CA2 podregiona, nakon dugotrajne socijalne IZ i tretmana Olz. Reprezentativne mikrofografije SO, SP, SR i SLM podregiona CA2 dobijene obeležavanjem PV+ ćelija (zeleni signal) (A) i GAD67+ ćelija (crveni signal) (B) u slojevima (C) Marker za Purkinjeove ćelije PCP4 korišćen je za obeležavanje CA2 podregiona u DAPI obojenim (plavo) koronalnim presecima dHIP. Statistički značajne promene broja GAD67+ ćelija u SO, SP i SLM slojevima CA2 podregiona (D) u grupama Kont, Kont + Olz, IZ, IZ + Olz. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM sa 5 do 6 pacova po grupi. Skala - 200 μ m.

5.3.3. dCA3 podregion

Reprezentativne mikrografije **dCA3** podregiona sve četiri ispitivane grupe, sa označenim slojevima (SO, SP i SR) na Kont presecima, dobijene imunofluorescentnim bojenjem gde zeleni signal predstavlja PV+ ćelije (Slika 44 A), a crveni signal predstavlja GAD67+ ćelije (Slika 44 B). Statistički značajne promene broja PV+ i GAD67+ ćelija u SO, SP i SR slojevima podregiona dCA3, predstavljena je na Slici 44 (C, D).

Zabeležen je statistički značajan efekat IZ ($F_{1,19} = 13,59$, $p < 0,01$; $F_{1,18} = 15,99$, $p < 0,001$) u slojevima SP i SR, kao i značajan efekat Olz tretmana ($F_{1,18} = 18,53$, $p < 0,001$) u sloju SR za PV+ ćelije (Slika 44 C). Značajno smanjenje uočeno je u IZ + Olz grupi pacova u odnosu na Kont grupu (***) $p \leq 0,001$) u slojevima SP i SR, kao i između IZ + Olz grupe i IZ grupe pacova (^) $p < 0,001$) u sloju SR (Slika 44 C). U sloju SO nije zabeležena statistička značajna promena između eksperimentalnih grupa (rezultati nisu prikazani), dok u sloju SLM nisu detektovane PV+ ćelije (rezultati nisu prikazani).

Značajan efekat Olz ($F_{1,19} = 11,80$, $p < 0,01$; $F_{1,19} = 6,84$, $p < 0,05$) na broj GAD67+ ćelija zabeležen je u slojevima SO i SP (Slika 44 D). Značajno smanjenje broja ovih ćelija zabeleženo je u Kont grupi tretiranoj Olz u poređenju sa Kont grupom (* $p < 0,05$, * $p \leq 0,05$) u slojevima SO i SP (Slika 44 D). Takođe, značajno smanjenje zabeleženo je u IZ + Olz grupi pacova u poređenju sa Kont grupom (* $p < 0,05$) i IZ grupom (^ $p < 0,05$) u sloju SO. Značajno smanjenje zabeleženo je i u IZ + Olz grupi pacova u poređenju sa IZ grupom (^ $p < 0,05$) u SR sloju. Nisu pronađene statistički značajne promene u broju GAD67+ ćelija u sloju SLM (rezultati nisu prikazani).

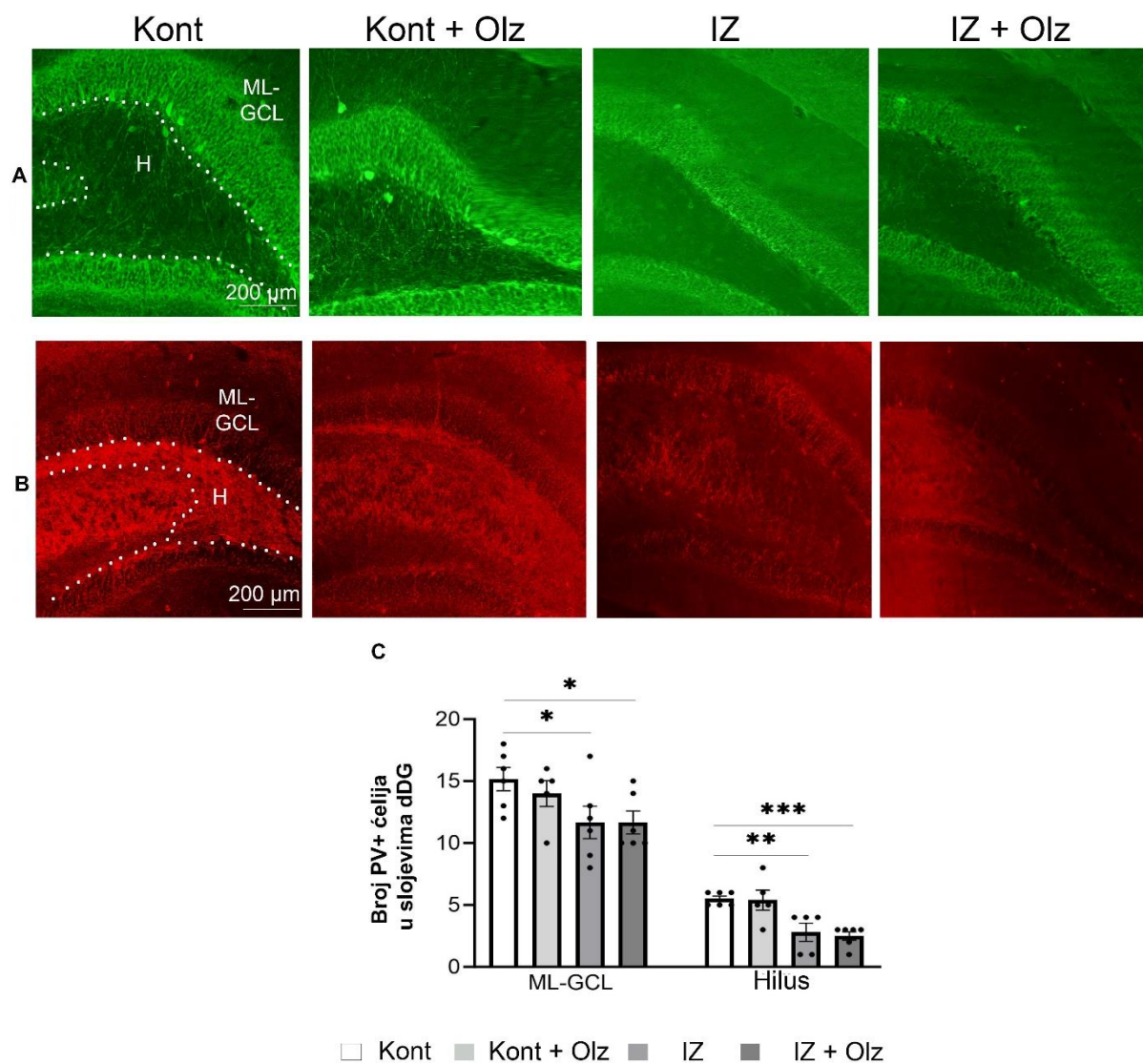


Slika 44. Promene u broju PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima dCA3 podregiona, nakon dugotrajne socijalne IZ i tretmana Olz. Reprezentativne mikrografije SO, SP, SR i SLM podregiona dCA3 dobijene obeležavanjem PV+ ćelija (zeleni signal) (A) i GAD67+ ćelija (crveni signal) (B) u slojevima. Statistički značajne promene u broju PV+ ćelija u SP i SR slojevima (C) i GAD67+ ćelija (D) u SO, SP i SR slojevima dCA3 podregiona u Kont, Kont + Olz, IZ, IZ + Olz grupama. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: * $p \leq 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p \leq 0,001$ poređenje uvek u odnosu na kontrolu; ^ $p < 0,05$, ^^^ $p < 0,001$ poređenje u odnosu na IZ grupe pacova. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM sa 5 do 6 pacova po grupi. Skala - 200 μ m.

5.3.4. dDG podregion

Reprezentativna mikrografija **ddG** podregiona sve četiri ispitivane grupe, sa označenim slojevima (ML-GCL, H) na Kont preseccima, dobijene su imunofluorescentnim bojenjem, zeleni signal predstavlja PV+ ćelije (Slika 45 A) a crveni signal GAD67+ ćelije (Slika 45 B). Statistički značajne promene broja PV+ ćelija u ML-GCL i H slojevima podregiona dDG, predstavljena je na Slici 45 C.

Zabeležen je statistički značajan efekat IZ ($F_{1.19} = 8,81$, $p < 0,01$; $F_{1.18} = 27,42$, $p < 0,001$) na broj PV+ ćelija u slojevima ML-GCL i H. Značajno smanjenje uočeno je u IZ i IZ + Olz grupi pacova u poređenju sa Kont grupom u sloju ML-GCL (* $p < 0,05$) i sloju H (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (Slika 45 C). Nisu zabeležene statistički značajne promene broja GAD67+ ćelija u slojevima dDG podregiona (rezultati nisu prikazani).



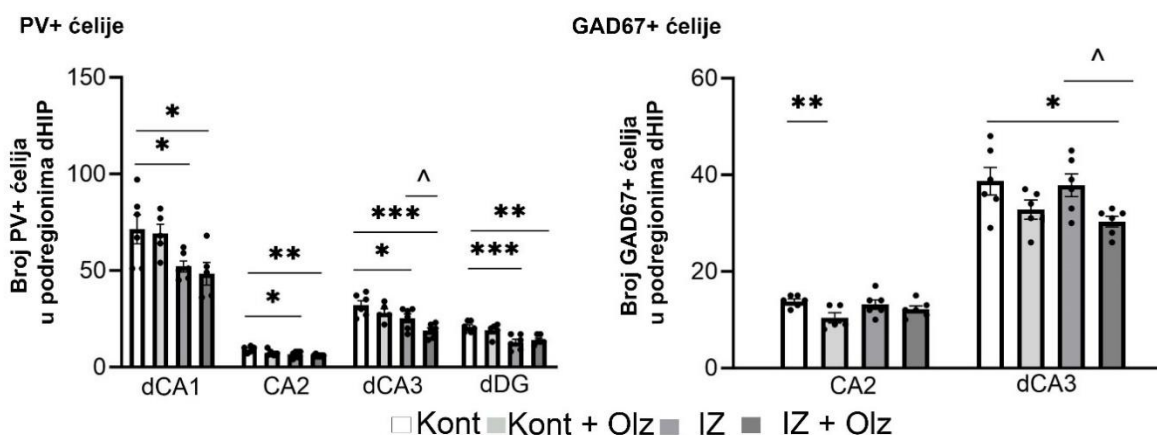
Slika 45. Promene u broju PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima dDG podregiona, nakon dugotrajne socijalne IZ i tretmana Olz. Reprezentativne mikrofografije ML-GCL i H slojeva podregiona dDG, dobijene obeležavanjem PV+ ćelija (zeleni signal) (A) i GAD67+ ćelija (crveni signal) (B) u slojevima. Statistički značajne promene broja PV+ ćelija ML-GCL i H (C) slojeva dDG podregiona u Kont, Kont + Olz, IZ, IZ + Olz grupama. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, poređenje uvek u odnosu na Kont grupu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM sa 5 do 6 pacova po grupi. Skala - 200 μ m.

5.3.5. Broj PV+ i GAD67+ ćelija u podregionima dHIP

Statistički značajne promene u broju PV+ ćelija u podregionima dCA1, CA2, dCA3, dDG prikazane su na Slici 46, kao i promene u broju GAD67+ ćelija u podregionima CA2 i dCA3.

Pokazan je statistički značajan efekat IZ ($F_{1,18} = 12,36$, $p < 0,01$; $F_{1,18} = 7,46$, $p \leq 0,01$; $F_{1,19} = 14,69$, $p \leq 0,001$; $F_{1,19} = 24,04$, $p < 0,001$) u podregionima dCA1, CA2, dCA3 i dDG, kao i efekat Olz tretmana ($F_{1,19} = 6,34$, $p < 0,05$) u podregionu dCA3, na promene broja PV+ ćelija. Značajno smanjenje zabeleženo je kod IZ pacova i IZ + Olz grupi, u poređenju sa kontrolama u dCA1 (* $p < 0,05$), CA2 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), dCA3 (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) i dDG podregionima (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$). Takođe, značajno smanjenje u broju PV+ ćelija zabeleženo je u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom (^ $p < 0,05$) u dCA3 podregionu.

Gledajući promene u broju GAD67+ ćelija u podregionima dCA1, CA2, dCA3 i dDG, zabeležen je značajan efekat kombinovanog delovanja IZ × Olz ($F_{1,19} = 4,85$, $p < 0,05$) u dCA1 podregionu i efekat Olz tretmana ($F_{1,19} = 8,83$, $p < 0,01$, $F_{1,19} = 9,63$, $p < 0,01$) u podregionima CA2 i dCA3. Takođe, značajno smanjenje zabeleženo je u Kont grupi tretiranoj Olz u poređenju sa Kont grupom (** $p < 0,01$) u podregionu CA2, kao i u IZ + Olz grupi pacova, u poređenju sa Kont (* $p < 0,05$) i IZ grupom (^ $p < 0,05$) u podregionu dCA3. Nisu zabeležene statistički značajne promene u broju GAD67+ ćelija u podregionima dCA1 i dDG (rezultati nisu prikazani).



Slika 46. Promene broja PV+ ćelija u podregionima dCA1, CA2, dCA3 i dDG, kao i broja GAD67+ ćelija u CA2 i dCA3, u grupama: Kont, Kont+Olz, IZ i IZ+Olz. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ poređenje uvek u odnosu na Kont grupu; ^ $p < 0,05$ poređenje u odnosu na IZ grupe pacova. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM za 5 do 6 pacova po grupi.**

5.3.6. Procentualna promena u broju PV+ i GAD67 + ćelija

Tabela 9 - Promena broja PV+ i GAD67+ ćelija podregiona dHIP i njihovih slojeva, u dorzalnom hipokampusu.

PV+ ćelije		Kont + Olz u odnosu na Kont		IZ u odnosu na Kont		IZ + Olz u odnosu na IZ	
dCA1	SO	/	/	73% ↓*	72% ↓*	/	/
	SP		/		72% ↓*		/
	SR		/		/		/
CA2	SO	/	/	74% ↓*	/	/	/
	SP		/		/		/
dCA3	SO	/	/	78% ↓*	/	75% ↓^	/
	SP		/		/		/
	SR		/		/		45% ↓ ^{^^^}
dDG	ML-GCL	/	/	62% ↓***	76% ↓*	/	/
	H		/		54% ↓**		/
GAD67+ ćelije		Kont + Olz u odnosu na Kont		IZ u odnosu na Kont		IZ + Olz u odnosu na IZ	
dCA1	SO	/	/	/	/	/	131% ↑^
	SP		/		/		140% ↑ ^{^^}
	SR		/		/		/
	SLM		/		/		/
CA2	SO	75% ↓**	46% ↓**	/	/	/	/
	SP		79% ↓*		/		/
	SR		/		/		/
	SLM		60% ↓**		/		/
dCA3	SO	/	68% ↓*	/	/	80% ↓^	65% ↓^
	SP		82% ↓*		/		/
	SR		/		/		80% ↓^
	SLM		/		/		/
dDG	ML-GCL	/	/	/	/	/	/
	H		/		/		/

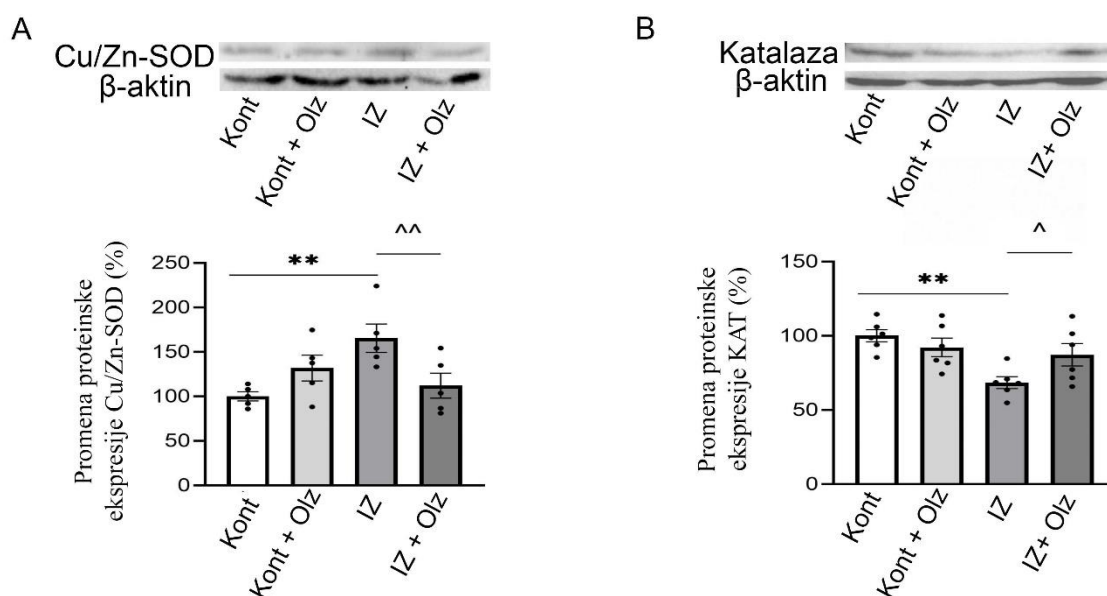
U Tabeli 9 prikazana je procentualna promena u broju PV+ i GAD67+ ćelija u podregionima dHIP (dCA1, CA2, dCA3 i dDG) i u slojevima SO, SP, SR i SLM podregiona dCA1-3, kao i ML-GCL i H slojevima podregiona dDG između sledećih eksperimentalnih grupa pacova: Kont + Olz u odnosu na Kont; IZ u odnosu na Kont grupu; IZ + Olz u odnosu na IZ grupu. Kontrolne vrednosti su postavljene na 100% za podregione dCA1, CA2, dCA3, i dDG, kao i za odgovarajuće slojeve, individualno. Statistički značajne promene u broju PV+ i GAD67+ ćelija su sledeće: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 poređenje uvek u odnosu na kontrolu; ^ p < 0,05, ^^ p < 0,01, ^^^ p < 0,001 poređenje uvek u odnosu na IZ pacove.

5.4. Proteinska ekspresija Cu/Zn-SOD i KAT u citosolu hipokampusa pacova

Promena proteinske ekspresije Cu/Zn-SOD i KAT u citosolnoj frakciji hipokampusa, u različitim grupama, predstavljena je na Slici 47 (A, B).

Statističkom analizom rezultata dobijenih Western blot metodom uočen je značajan efekat kombinovanog delovanja IZ × Olz ($F_{1.16} = 10,54$, $p < 0,01$) na proteinsku ekspresiju Cu/Zn-SOD u citosolnoj frakciji hipokampusa (Slika 47 A). Zabeleženo je značajno povećanje u proteinskoj ekspresiji Cu/Zn-SOD kod IZ pacova u poređenju sa Kont grupom (** $p < 0,01$) kao i značajno smanjenje u IZ + Olz grupi pacova u poređenju sa IZ (^ $p \leq 0,01$) (Slika 47 A).

U citosolnoj frakciji praćenjem proteinske ekspresije nivoa KAT, pokazan je značajan efekat IZ ($F_{1.20} = 10,32$, $p < 0,01$) i efekat kombinovanog delovanja IZ × Olz ($F_{1.20} = 5,5$, $p < 0,05$). Socijalna izolacija značajno smanjuje proteinsku ekspresiju KAT u poređenju sa kontrolom (** $p < 0,01$), dok tronedeljni tretman Olz povećava IZ smanjenu proteinsku ekspresiju ovog enzima (^ $p < 0,05$) ka kontrolnim vrednostima (Slika 47 B).



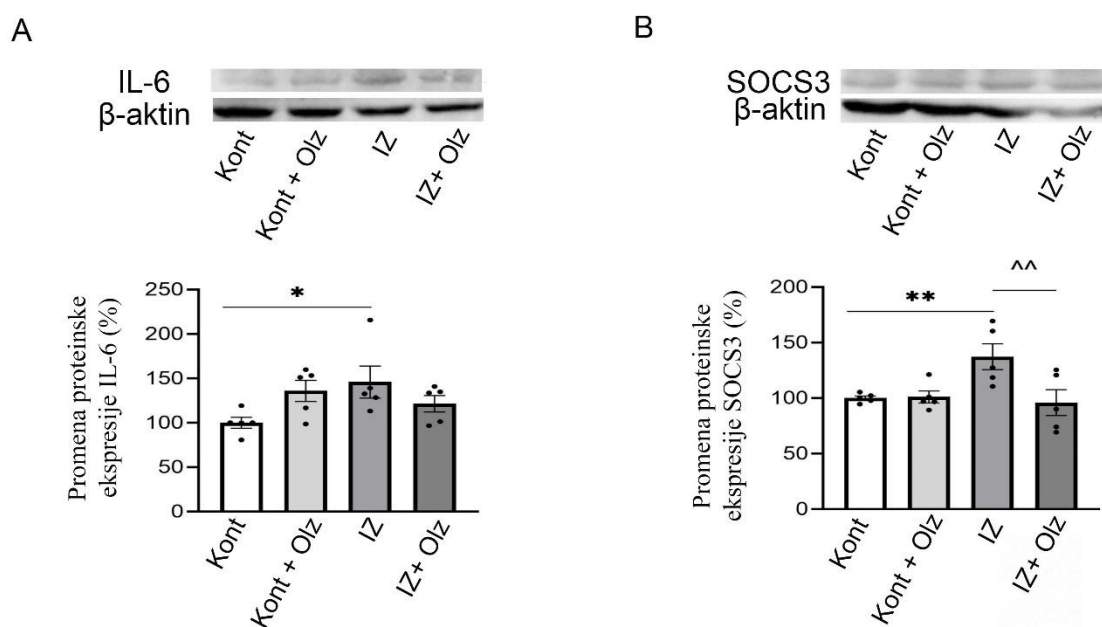
Slika 47. Proteinska ekspresija Cu/Zn-SOD (A) i KAT (B) u citosolnoj frakciji hipokampusa, grupa Kont, Kont + Olz, IZ, IZ + Olz. Na slici iznad grafika prikazani su reprezentativni imunoblotsi, dok sami grafici predstavljaju promene ekspresije dobijene kvantifikacijom imunoblotova i normalizacijom u odnosu na β -aktin. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće (A) Cu/Zn-SOD nivo proteina - ** $p < 0,01$ u poređenju sa Kont; ^ $p \leq 0,01$ u poređenju sa IZ grupom. (B) KAT nivo proteina - ** $p < 0,01$ u poređenju sa Kont grupom; ^ $p < 0,05$ u poređenju sa IZ grupom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM sa 5 do 6 pacova po grupi.

5.5. Proteinska ekspresija IL-6 i SOCS3 u citosolu hipokampusa pacova

Promena proteinske ekspresije IL-6 i SOCS3 u citosolnoj frakciji hipokampusa, u različitim grupama, predstavljena je na Slici 48 (A, B).

U pogledu proteinske ekspresije IL-6, zabeležen je značajan efekat kombinovanog delovanja IZ × Olz tretmana ($F_{1.16} = 6,17$, $p < 0,05$). Značajno povećanje u IL-6 proteinskoj ekspresiji, zabeleženo je kod IZ pacova u poređenju sa Kont grupom (* $p < 0,05$) (Slika 48 A).

U pogledu ekspresije proteina SOCS3 zabeležen je značajan efekat Olz tretmana ($F_{1.16} = 5,35$, $p < 0,05$) i efekat kombinovanog delovanja IZ × Olz tretmana ($F_{1.16} = 5,91$, $p < 0,05$). Statistički značajno povećanje u nivou proteinske ekspresije SOCS3 zabeleženo je u grupi IZ pacova u poređenju sa Kont grupom (** $p \leq 0,01$), a značajno smanjenje u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom pacova (^ ^ $p < 0,01$) (Slika 48 B).



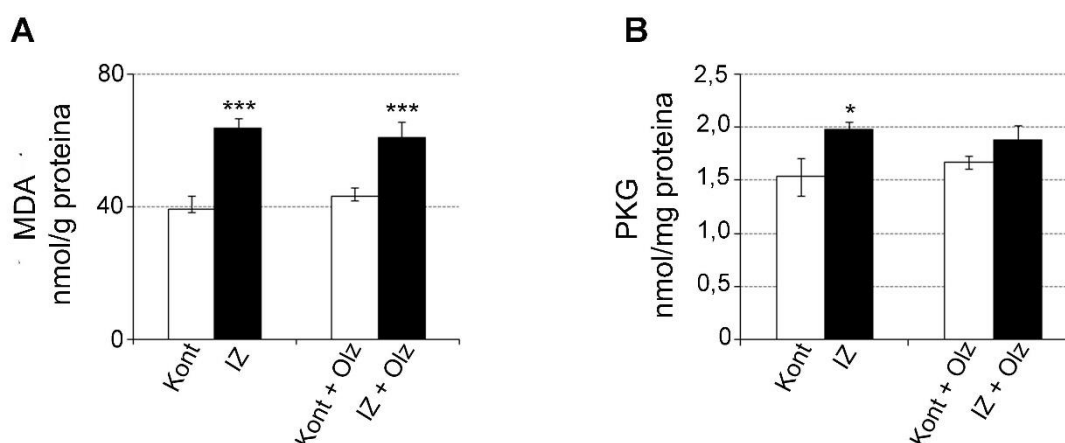
Slika 48. Proteinska ekspresija IL-6 (A) i SOCS3 (B) u citosolnoj frakciji hipokampusa, grupa Kont, Kont + Olz, IZ, IZ + Olz. Na slici iznad grafika prikazani su reprezentativni imunoblotovi, dok sami grafici predstavljaju promene ekspresije dobijene kvantifikacijom imunoblotova i normalizacijom u odnosu na β-aktin. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće. (A) IL-6 nivo proteina - * $p < 0,05$ u odnosu na Kont grupu. (B) SOCS3 nivo proteina - ** $p \leq 0,01$ u poređenju sa Kont grupom; ^^ $p < 0,01$ u poređenju sa IZ grupom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM sa 5 do 6 pacova po grupi.

5.6. Određivanje parametara oksidativnog stresa u citosolnoj frakciji jetre

5.6.1. Sadržaj MDA i PKG u jetri pacova

Lipidna peroksidacija određena je na osnovu sadržaja MDA u citosolnoj frakciji jetre (Slika 49 A). Zabeležen je značajan efekat IZ ($F_{1,20} = 31,14$, $p < 0,001$) na povećanje nivoa MDA. Značajno povećanje u MDA sadržaju zabeleženo je u IZ +Olz grupi i IZ grupi (***) $p < 0,001$) u poređenju sa Kont grupom (Slika 49 A). Takođe, može se primetiti da sam Olz tretman nije imao uticaja na MDA u jetri, s obzirom na to da je sadržaj MDA bio nepromenjen kod Kont tretiranih Olz u poređenju sa običnim kontrolama ($p > 0,05$).

Rezultati nivoa PKG u citosolnoj frakciji jetre prikazani su na Slici 49 B. Zabeležen je značajan efekat IZ ($F_{1,20} = 7,36$, $p < 0,05$) na povećanje sadržaja PKG. (Slika 49 B). Značajno povećanje uočeno je u IZ grupi (* $p < 0,05$) u poređenju sa Kont grupom. Međutim, kod socijalno izolovanih životinja tretiranih Olz nije došlo do povećanja PKG sadržaja ($p > 0,05$).



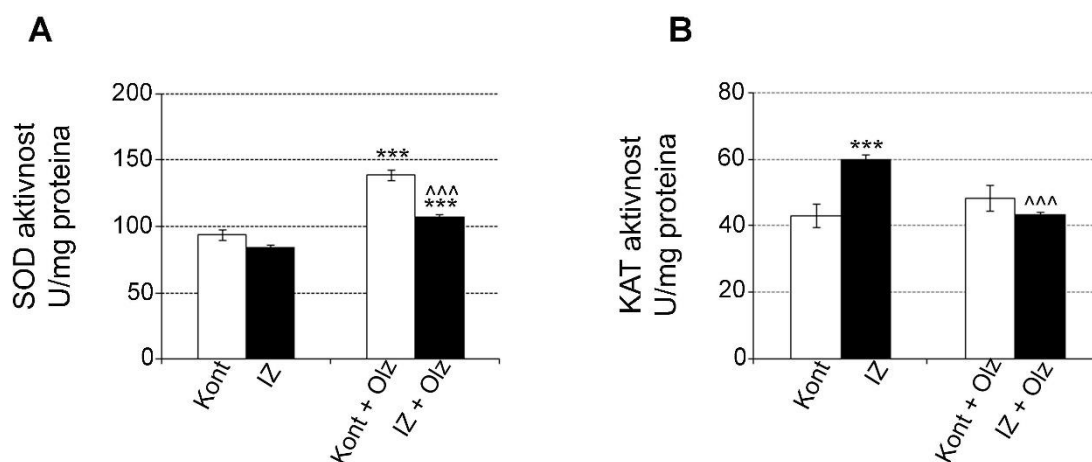
Slika 49. Nivo MDA (A) i sadržaj PKG (B) u citosolnoj frakciji jetre. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: (A) Sadržaj MDA: *** $p < 0,001$ u odnosu na Kont grupu (B) Sadržaj PKG: * $p < 0,05$ u odnosu na Kont grupu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM sa 6 nezavisnih merenja u svakoj grupi.

5.6.2. Određivanje enzimske aktivnosti SOD i KAT u jetri pacova

Od statistički značajnih efekata zabeležen je efekat Olz tretmana ($F_{1,16} = 106,42$, $p < 0,001$) i IZ ($F_{1,16} = 37,84$, $p < 0,001$) kao i značajan efekat kombinovanog delovanja IZ \times Olz tretmana ($F_{1,16} = 11,10$, $p < 0,01$) na SOD aktivnost u citosolu jetre. Značajno povećanje u aktivnosti SOD enzima zabeleženo je u Kont ili IZ grupi tretiranoj Olz u poređenju sa Kont grupom (***) $p < 0,001$) i IZ + Olz u poređenju sa IZ grupom (^^^ $p < 0,001$) (Slika 50 A).

Zabeležen je značajan efekat IZ ($F_{1,20} = 4,46$, $p < 0,05$) i kombinovanog delovanja IZ \times Olz tretmana ($F_{1,20} = 15,50$, $p < 0,001$) na aktivnost enzima KAT u jetri pacova. Značajno povećanje u aktivnosti enzima KAT zabeleženo je u IZ grupi u poređenju sa Kont grupom

(*** $p < 0,001$). Grupa IZ + Olz pokazala je značajno smanjenje u aktivnosti enzima KAT u poređenju sa IZ grupom (^^^ $p < 0,001$) (Slika 50 B).

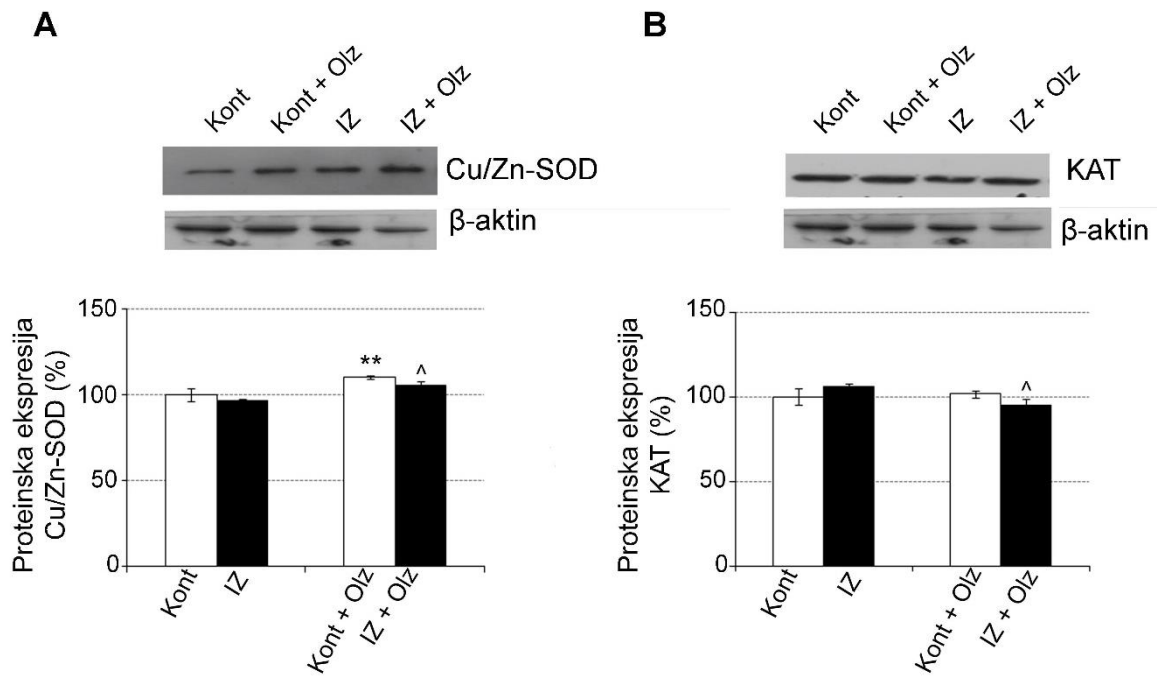


Slika 50. Aktivnost SOD enzima (A) i KAT enzima (B) u citosolnoj frakciji jetre. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: (A) aktivnost enzima SOD, *** $p < 0,001$ u odnosu na Kont grupu, kao i ^^ $p < 0,001$ u odnosu na IZ grupu (B) Aktivnost enzima KAT, *** $p < 0,001$ u odnosu na Kont grupu, kao i ^^ $p < 0,001$ u odnosu na IZ grupu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM sa 5 do 6 nezavisnih merenja u svakoj grupi.

5.6.3. Određivanje nivoa proteinske ekspresije Cu/Zn-SOD i KAT u jetri pacova

Zabeležen je značajan efekat Olz tretmana ($F_{1,21} = 17,87$, $p < 0,001$) na nivo proteinske ekspresije Cu/Zn-SOD enzima. Značajno povećanje proteinske ekspresije Cu/Zn-SOD zabeleženo je u obe grupe, Kont grupi tretiranoj Olz u poređenju sa Kont grupom (** $p < 0,01$) i IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom ($p < 0,05$) (Slika 51 A).

Analizom dobijenih imunoblotova pokazano je značajno smanjenje proteinske ekspresije KAT enzima u IZ + Olz grupi u poređenju sa IZ grupom ($p < 0,05$) (Slika 51 B)



Slika 51. Proteinska ekspresija Cu/Zn-SOD (A) i KAT (B) u citosolnoj frakciji jetre. Statistički značajne razlike između grupa dobijene uz pomoć dvofaktorske ANOVA praćene *Duncan's post-hoc* testom jesu sledeće: (A) Cu/Zn-SOD proteinska ekspresija, ** $p < 0,01$, u odnosu na Kont grupu, ^ $p < 0,05$, u odnosu na IZ grupu (B) KAT proteinska ekspresija, ^ $p < 0,05$, u odnosu na IZ grupu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM sa 6 do 7 nezavisnih merenja u svakoj grupi.

6. Diskusija

6.1. Antidepresivni i anksiolitički efekat olanzapina

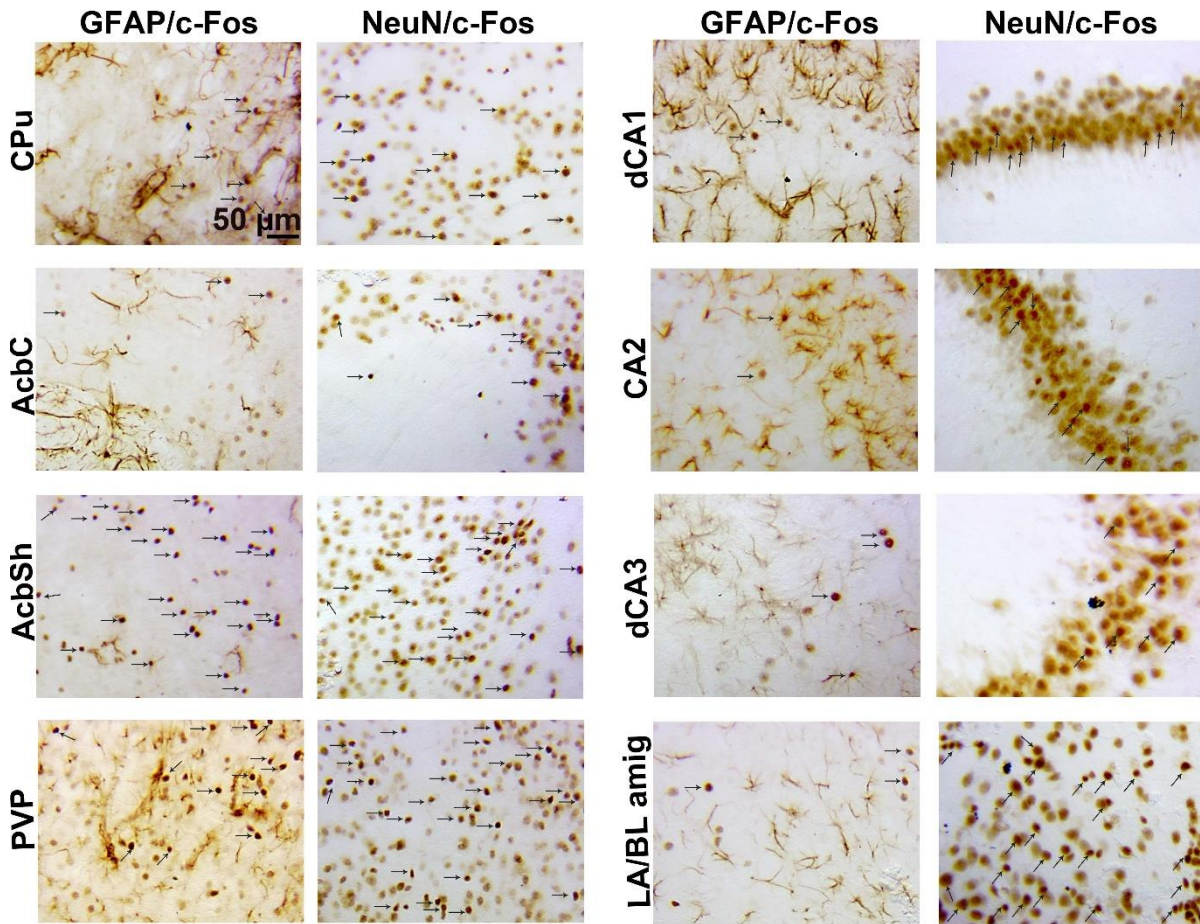
Pacovi izloženi dugotrajnoj socijalnoj IZ pokazali su ponašanje nalik depresivnom što je potvrđeno povećanjem vremena imobilnosti u testu prinudnog plivanja i smanjenom preferencijom saharoze u saharoznom testu. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da pacovi izloženi dugotrajnoj socijalnoj IZ pokazuju ponašanje nalik depresivnom (Filipović i sar., 2022; Zlatković i sar., 2014a). Takođe, dugotrajna socijalna IZ pacova dovela je do ponašanja nalik anksioznom što je potvrđeno testom zakopavanja klikera (Perić i sar., 2017), kao i u testovima otvorenog polja (Đorđević i sar., 2012) i testom uzdignutog lavirinta (Đorđević i sar., 2015).

Tronedeljni tretman Olz (7,5 mg/kg po telesnoj masi/dnevno) ublažio je simptome depresije i anksioznosti kod pacova izloženih šestonedeljnoj socijalnoj IZ što je potkrepljeno rezultatima prethodno navedenih testova ponašanja: test preferencije unosa zaslađenog rastvora, test prinudnog plivanja i test zakopavanje klikera, u kojima je pokazan antidepresivni i anksiolitički efekat tretmana Olz. Antidepresivna efikasnost Olz može biti jedna od glavnih strategija za povećanje efikasnosti terapije antidepresivima (Wang i Si, 2013). Pokazana je veća efikasnost terapije koja koristi kombinaciju Olz i fluoksetina u lečenju terapijski rezistentne depresije adultnih pacijenata, u odnosu na monoterapiju (Croxtall i Scott, 2010). U pretkliničkim studijama na pacovima izloženim dugotrajnom blagom stresu pokazan je pozitivan efekat Olz u pogledu smanjenja anhedonije (Orsetti i sar., 2007). Kliničke studije su pokazale da povećanje nivoa komplementarnog faktora H (engl. *complement factor H*, CFH) može predstavljati potencijalni biomarker anhedonije (Tang i sar., 2021), dok je smanjenje ovog faktora nakon dugotrajne upotrebe Olz zabeleženo u plazmi pacijenata obolelih od šizofrenije (Zhang i sar., 2023). Anksiolitička aktivnost Olz potvrđena je u studijama koje su koristile više testova za utvrđivanje anksioznog ponašanja kod pacova (Rogóz i Skuza, 2011; Sun i sar., 2010). Takođe, Olz se pokazao kao efikasan u otklanjanju anksioznih simptoma kod pacijenata obolelih od šizofrenije (Crapanzano i sar., 2022).

6.2. Efekat dugotrajne socijalne izolacije na ekspresiju c-Fos proteina u moždanim regionima

Određivanje broja c-Fos+ ćelija u moždanim podregionima i regionima omogućava mapiranje moždanih regiona pogođenih stresom. IEGs, među kojima je *c-fos* nisu univerzalni markeri za aktivnost neurona jer se mogu naći i u glijskim ćelijama, kao što su astrociti (Groves i sar., 2018), mikroglija (Eun i sar., 2004) i oligodendrociti (Muir i Compston, 1996). Zbog svega navedenog, urađeno je istraživanje (Stanisavljević i sar., 2020) koje je pokazalo preklapanje signala između markera neurona NeuN (engl. *neuronal nuclei*) i c-Fos+ ćelija; dok između markera astrocita GFAP i c-Fos+ ćelija nije bilo preklapanja signala u ispitivanim moždanim regionima (Slika 52). Na osnovu navedenih kvalitativnih podataka nadalje u tekstu se govori o c-Fos, kao o markeru aktivnosti neurona.

GFAP/c-Fos i NeuN/c-Fos



Slika 52. Imunohistohemijsko bojenje c-Fos, markera astrocita (GFAP) i neurona (NeuN). Reprezentativne mikrografije CPu, AcbC, AcbSh, PVP, dCA1, CA2, dCA3 i LA/BL amig regiona i podregiona mozga pacova nakon bojenja c-Fos, GFAP i NeuN markera. Strelice ukazuju na c-Fos+ ćelije. Skala razmere - 50 μ m. Slika preuzeta iz Stanisavljević i sar., 2020.

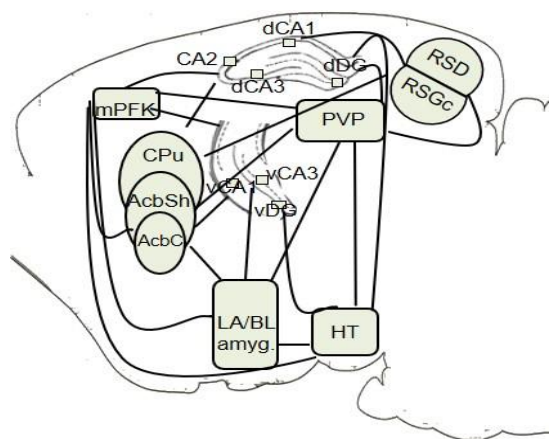
Pokazano je da dHIP i vHIP ostvaruju različite aferentne i eferentne veze, kao i da imaju različite funkcije, tako što je dHIP više zaslužan za kognitivne funkcije dok je vHIP više odgovoran za obradu emotivnih informacija (Strange i sar., 2014). Kod pacova izloženih dugotrajnoj socijalnoj IZ i dHIP i vHIP pokazali su značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija (Slika 53), a na osnovu procentualne promene broja c-Fos+ ćelija pokazano je da je CA2 osetljiviji u odnosu na druge podregione hipokampusa, izuzev dCA1. Podregion CA2 ima važnu ulogu u socijalnoj memoriji (Tzakis i Holahan, 2019) i anksioznosti (Insausti i sar., 2023), stoga se disfunkcija CA2 podregiona može povezati sa mentalnim bolestima. Takođe, pokazano je da 30 minuta stresa imobilizacije povećava ekspresiju *c-fos* iRNK u dHIP (Guimarães i sar., 1993). Između hipokampusa i RSK zabeležene su direktne i indirektno veze, koje doprinose funkciji hipokampusa u formiranju memorije i učenju. Dugotrajna socijalna IZ pokazala je isti efekat u promeni broja c-Fos+ ćelija u oba ispitana podregiona RSK, RSGc i RSD (Slika 53). Takođe, značajno povećanje broja c-Fos+ ćelija je pokazano u RSK i dHIP i vHIP nakon socijalne IZ što može biti rezultat veza između ovih moždanih regiona, naročito između RSK i dCA1 podregiona i subikuluma (Cenquizca i Swanson, 2007)

što ujedno predstavlja i jedan od glavnih puteva za protok izlaznih informacija iz hipokampusa.

Moždani region koji ima važnu ulogu u patofiziologiji šizofrenije i depresije je PFK (Koenigs i Grafman, 2009). Rezultati ove studije pokazuju da je mPFK aktiviran pod uticajem stresa dugotrajne IZ, povećanjem broja c-Fos+ ćelija u svim podregionima mPFK, u odnosu na Kont grupu (Slika 53). Ovaj rezultat potencijalno može da ukazuje na efekat socijalne IZ na radnu memoriju (Karimian i sar., 2015) i druge više moždane funkcije u kojima je PFK uključen. Od svih podregiona mPFK, IZ je pokazala najveći efekat u Cg1K, a najmanji u DPK podregionu, što može biti posledica velike osetljivosti prednje cingulate kore zabeležene kod poremećaja raspoloženja (Drevets i sar., 2008).

Amigdala ima važnu funkciju u regulaciji emotivnog i socijalnog ponašanja (Felix-Ortiz i sar., 2016) i može biti uključena u patofiziologiju depresije (Sibille i sar., 2009). Povećan broj c-Fos+ ćelija u LA/BL kompleksu amigdala nakon dugotrajne IZ (Slika 53), pokazao je sličan obrazac u pogledu promena u broju c-Fos+ ćelija kao i dorzalni/ventralni hipokampus i mPFK, tj. kao moždani regioni sa kojima ostvaruje jake veze. Naročito je važna veza između BL dela amigdala i vCA1 podregiona koji čine neuronsku mrežu u regulaciju anksioznosti i socijalnog ponašanja (Yang i Wang, 2017). Značaj spomenute neuronske mreže podržavaju i rezultati ove doktorske teze koji su pokazali povećan broj c-Fos+ ćelija u LA/BL amigdalama i vHIP kod IZ pacova koji su ispoljili anksiozno ponašanje.

U pogledu broja c-Fos+ ćelija, IZ je ostvarila značajan efekat i u strijatumu. Ovaj rezultat može biti posledica zabeleženog efekta socijalnog stanja i uslova odgajanja na anatomiju i fiziologiju strijatuma kod primata i pacova (Báez-Mendoza i Schultz, 2013). Takođe, kod pacijenata obolelih od depresije zabeleženo je smanjenje zapremine strijatuma (Krishnan i sar., 1992). Najveći efekat IZ u pogledu aktivnosti neurona uočeni su u dorzalnem strijatumu (CPu), u odnosu na NAc (AcbC i AcbSh) (Slika 53), dok u samim delovima NAc nije bilo statistički značajnih razlika u pogledu broja c-Fos+ ćelija. NAc je uključen u procesuiranje motivacionih i emotivnih procesa. Obzirom da NAc ostvaruje glutamatne aferentne veze sa nekoliko moždanih regiona uključujući vHIP, mPFK, bazolateralno jedro amigdala i talamus (Bagot i sar., 2015), povećan broj c-Fos+ ćelija može biti posledica povećanog nivoa glutamata u ovim regionima nakon izloženosti dugotrajnoj socijalnoj IZ.



Slika 53. Moždani podregioni/region (zelena boja) u kojima je dugotrajna socijalna IZ povećala broj c-Fos+ ćelija u poređenju sa Kont grupom

Nakon dugotrajne socijalne IZ zabeležen je i povećan broj c-Fos+ ćelija u PVP jedru talamusa, regionu (Slika 53) koji je poznat po visokoj osetljivosti na različite vrste stresora (Behrendt, 2011), ukazujući na potencijalnu uključenost ovog moždanog dela u ponašanje nalik depresivnom i anksioznom. Povećan broj c-Fos+ ćelija pokazan je u amigdali, AcbC i AcbSh (NAc), bez statistički značajnih razlika između ovih podregiona/regiona, što potencijalno ukazuje na postojanje jake glutamatne veze između ovih moždanih delova (Haight i Flagel, 2014).

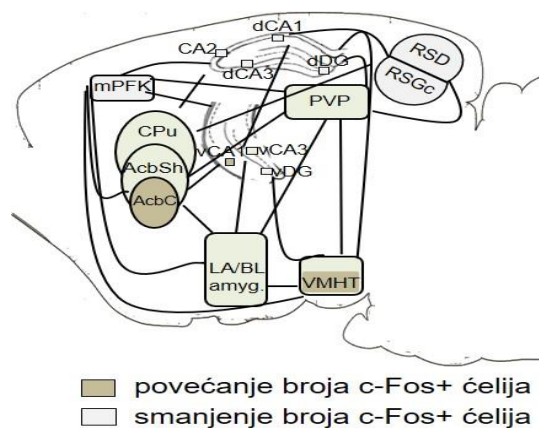
Takođe, povećan broj c-Fos+ ćelija u podregionima hipotalamusa (Slika 53), a to su DMHT i VMHT, može biti posledica snažnog prijemnog signala iz hipokampusa, naročito iz ventralnog (Sahay i Hen, 2007). Međutim, između samih podregiona hipotalamusa nije bilo značajnih procentualnih razlika u broju c-Fos+ ćelija, ali je zabeležena mnogo manja procentualna promena u broju c-Fos+ ćelija u odnosu na hipokampus, što samim tim ukazuje potencijalno na veću podložnost hipokampusa na efekte dugotrajne socijalne IZ, u odnosu na hipotalamus.

U prethodnim radovima ispitivan je efekat i tronedeljne socijalne IZ na broj c-Fos+ ćelija u moždanim podregionima i regionima (Stanisavljević i sar., 2019a; Stanisavljević i sar., 2020). Povećan broj c-Fos+ ćelija nakon tronedeljne socijalne IZ zabeležen je u CPU, AcbSh, RSD, RSGc, dDG, PVP i LA/BL kompleksu amigdala, što se poklapa sa efektom šestonedeljne socijalne IZ i samim tim ukazuje na veliku osetljivost ovih moždanih delova na sam efekat blagog stresa kao što je socijalna IZ. Takođe, ovi rezultati ukazuju da se prethodno navedeni moždani delovi nisu prilagodili na efekat stresa socijalne IZ, već su i nakon šest nedelja pokazivali statistički značajno povećan broj c-Fos+ ćelija.

6.3. Efekat dugotrajnog tretmana olanzapinom na ekspresiju c-Fos proteina u moždanim regionima

Tretman Olz je smanjio broj c-Fos+ ćelija u svim podregionima dHIP, kao i vDG pacova izloženih dugotrajnoj socijalnoj IZ (Slika 54) i samim tim ukazao da je antidepresivni i anksiolitički efekat Olz potencijalno posredovan delovanjem na neurotransmisiju na nivou hipokampusa. Obzirom da je tretman Olz smanjio broj c-Fos+ ćelija samo u vDG (bez efekta smanjenja na ostale podregione vHIP), ovo može biti potencijalno povezano sa ulogom ovog podregiona u anksioznom poremećaju (Strange i sar., 2014), stoga ovaj efekat Olz možda ukazuje na njegov anksiolitički potencijal. Vezano za procentualnu promenu broja c-Fos+ ćelija, tretman Olz ostvario je različite efekte duž hipokampalnih podregiona, sa najvećim efektom smanjenja broja c-Fos+ ćelija na dorzalni CA deo (CA1, CA2, CA3), bez efekta smanjenja na vCA1 i vCA3 i sa vrlo sličnim efektom na ventralni i dorzalni DG. Podregion dCA3 se ističe najvećim procentualnim smanjenjem broja c-Fos+ ćelija, a ujedno se pokazao i kao mesto delovanja Olz na GABA neurotransmisiju, obzirom da je Olz tretman smanjio broj PV+ i GAD67+ ćelija u SR sloju ovog podregiona (Stanisavljević Ilić i sar., 2023). Novije istraživanje (Gao i sar., 2024) je pokazalo da Olz takođe utiče na neuronsku aktivnost i gama - oscilaciju CA3 podregiona. Sama gama - oscilacija važna je za komunikaciju između moždanih regiona što je od velike važnosti za memoriju i emocije i čiji poremećaj se često veže za mentalne bolesti (Guan i sar., 2022). Takođe, pokazano je da Olz poboljšava prostornu orijentaciju koja je usko vezana sa dHIP i smanjuje oštećenja hipokampalne memorije (Orsetti i sar., 2007). S obzirom da su dHIP i mPFK povezani neuronskim vezama smanjenje u broju c-Fos+ ćelija u mPFK (Slika 54) pod dejstvom Olz može biti povezano sa prethodno navedenim promenama u dHIP. Podregion mPFK u kojem je Olz tretman ostvario najveći efekat je Cg1K. Poremećaj u funkcionisanju cingulatnog korteksa, vrlo često je zabeležen kod šizofrenije, ali isto tako je cingulatni korteks ključni deo mozga u kojem antipsihotik risperidon ostvaruje svoj potencijalni efekat u lečenju depresivnih simptoma šizofrenije (Shen i sar., 2023). Stoga, možda, predstavlja i potencijalno mesto delovanja Olz kada su u pitanju njegovi antidepresivni efekti. Takođe, sličan obrazac u pogledu promena u broju c-Fos+ ćelija u dHIP i RSK proističe iz njihovih direktnih i indirektnih veza (Slika 54). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Fujimura i kolega (Fujimura i sar., 2000), koji su

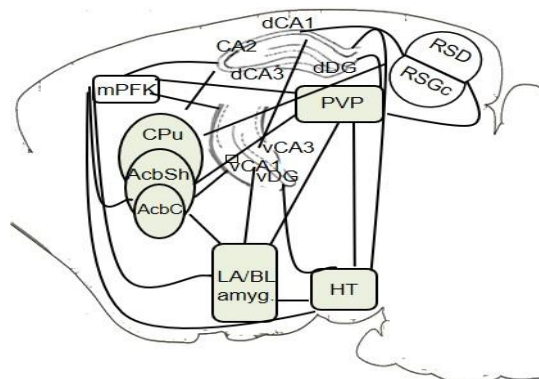
pokazali da farmakološki efikasne doze Olz blokiraju Fos proteinsku ekspresiju i neurološke modifikacije u RSK kod ženki pacova koje su tretirane dizocilpinom, antagonistom NMDA receptora. Procentualne promene u broju c-Fos+ ćelija nisu pokazale statističku značajnu razliku između RSGc i RSD podregiona RSK.



Slika 54. Efekat Olz tretmana na broj c-Fos+ ćelija u moždanim podregionima/regionima IZ grupe pacova, u poređenju sa IZ grupom pacova

Obzirom na to, da je Olz smanjio broj c-Fos+ ćelija u ispitivanim podregionima RSK, u svim podregionima mPFC i dHIP, kao i u vDG pacova koji su bili izloženi dugotrajnoj socijalnoj IZ, ovi rezultati ukazuju na značaj potencijalno terapeutskog efekta Olz u ponašanju nalik depresivnom i anksioznom. Nasuprot spomenutom efektu Olz, u podregionima kao što su vCA3, DMHT, ali i amigdale, CPU, AcbSh i PVP, tretman Olz nije smanjio broj c-Fos+ ćelija kod IZ pacova (Slika 54). Tačnije, u vCA1, VMHT i AcbC, došlo je do zajedničkog delovanja Olz i IZ i povećanja broja c-Fos+ ćelija (Slika 54).

Kod kontrolnih pacova, tretman Olz povećao je broj c-Fos+ ćelija u vCA1, CPU i NAc, PVP, ispitivanim podregionima hipotalamusa i LA/BL kompleksu amigdala (Slika 55), ukazujući na potencijalni značaj ovih moždanih delova u antipsihotičkom efektu Olz. Procentualno najveći efekat Olz je ostvario u CPU i samim tim ukazao da je ovaj moždani deo potencijalno mesto njegovog delovanja. Studija Deutch i kolega (Deutch i sar., 1992) pokazala je da atipični antipsihotici (Klz i remoksiprid) ostvaruju regionalno specifičan efekat na strijatum, tako što je AcbSh mesto delovanja antipsihotika. Suprotno ovoj studiji, rezultati doktorske disertacije nisu pokazali statistički značajne razlike u broju c-Fos+ ćelija između podregiona NAc (AcbC, AcbSh), ukazujući da tretman Olz ne pokazuje regionalno specifičan efekat u NAc. Međutim, prema ranije objavljenim rezultatima, dugotrajni tretman Klz doveo je do povećanog broja c-Fos+ ćelija u podregionima mozga kontrolnih pacova i to dDG, subregionima RSK, PVP, LA/BL kompleksu amigdala, CPU i NAc (Stanisavljević i sar., 2019a).



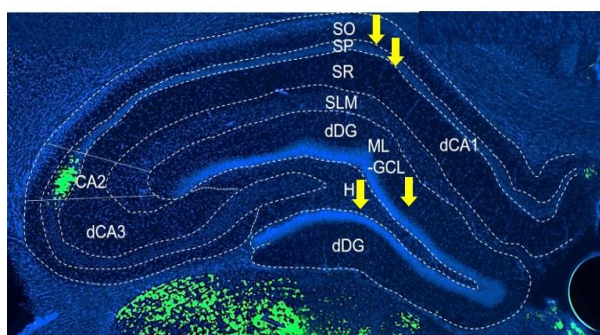
Slika 55. Moždani podregioni/regioni (zeleno boja) u kojima je Olz tretman povećao broj c-Fos+ ćelija u poređenju sa Kont grupom pacova

Stoga se pretpostavlja da su talamus, amigdala i strijatum potencijalno zajednička mesta delovanja atipičnih antipsihotika Olz i Klz i ujedno potencijalna mesta u kojima oni ostvaruju svoje antipsihotične efekte.

Različita distribucija c-Fos proteina u moždanim regionima imala bi značaj u mapiranju ciljnih mesta delovanja akutnog ili dugotrajnog tretmana Olz ili socijalne IZ, što je od važnosti za pojašnjavanje mehanizama i neuronskih mreža koje potencijalno leže u osnovi antidepresivnog i anksiolitičkog efekta Olz, ali i samog efekta socijalne IZ. Tačna uloga c-Fos proteina u nervnom sistemu još uvek nije dovoljno poznata, zbog velikog broja faktora koji utiču na njegovu ekspresiju. Ipak, c-Fos se koristi u životinjskim modelima još od 1990. godine i njegovo korišćenje kao markera aktivnosti ćelija još uvek je pouzdano i korisno (Aparicio i sar., 2022). Razumevanje mehanizma delovanja lekova u mozgu od gena pa do neuronskih mreža od velikog je značaja za razvoj novih agenasa koji bi delovali na CNS; stoga je c-Fos važan kao marker prilikom određivanja regiona mozga i pojedinačnih neurona na koje lek deluje i samim tim za otkrivanje potencijalnog mehanizma delovanja leka u mozgu (Sakurai, 2023).

6.4. Efekat dugotrajne izolacije na promenu broja PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima dorzalnog hipokampusa

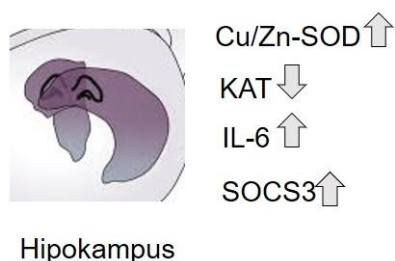
Šestonedeljna socijalna IZ smanjila je broj PV+ ćelija u podregionima dHIP i samim tim potvrdila prethodno objavljene rezultate (Filipović i sar., 2018; Perić i sar., 2019), bez statistički značajnih promena u broju GAD67+ ćelija (Slika 56). Smanjen broj PV+ ćelija u slojevima SO (72%) i SP (72%) podregiona dCA1, kao i u oba sloja dDG podregiona (ML-GCL-76% i H-54%) (Slika 56) u poređenju sa kontrolnim grupama, može smanjiti GABA inhibiciju. Poremećaj u GABA transmisiji može dalje rezultirati u oštećenju kognitivnih funkcija, što potencijalno ukazuje na značaj PV+ ćelija za obavljanje kognitivnih radnji i njihovoj ulozi u patologiji mentalnih bolesti (Chamberlin i sar., 2023). Dobijeni rezultati ukazuju da šestonedeljna socijalna IZ ostvaruje najsnažnije efekte na nivou podregiona dDG. Međutim, efekat IZ ogleda se i u dCA1 podregionu, čiji su inhibitorni interneuroni važni za funkcionisanje radne prostorne memorije (Jeong i Singer, 2022), na koju snažan uticaj u pogledu oštećenja ima dugotrajna socijalna IZ kod odraslih (Zorzo i sar., 2019). Takođe, najveći broj PV+ interneurona upravo se i nalazi u slojevima SO i SP (CA podregiona), koji su u dCA1 podregionu očekivano najpogođeniji izolacijom.



Slika 56. Koronalni presek dHIP nakon bojenja jedara (DAPI, plavo) sa šematskim prikazom statistički značajnog efekta dugotrajne socijalne izolacije (IZ) na broj PV+ ćelija u poređenju sa kontrolom

Smanjen broj PV+ ćelija može prouzrokovati povećano oslobađanje glutamata, koje vodi ka prekomernoj aktivaciji neurona, neurotoksičnosti (Zierhut i sar., 2013) i smanjenju inhibitorne sinaptičke transmisije, procesima koji oštećuju kognitivne radnje (Koh i sar., 2010).

Stoga su pacovi izloženi blagom dugotrajnom stresu pokazali smanjenu PV ekspresiju, što je doprinelo i oštećenju kognitivnih funkcija mozga (Calabrese i sar., 2017). Istraživanje Czéh i saradnika (Czéh i sar., 2015) pokazalo je da devet nedelja blagog stresa smanjuje broj PV interneurona za 20%-30% u CA podregionima dHIP. U rezultatima doktorske disertacije, smanjen broj ovih interneurona može biti povezan sa supresijom adultne neurogeneze pod uticajem stresa (Czéh i sar., 2002, 2001), obzirom da su oko 14% novostvorenih neurona u DG pacova ustvari GABA PV+ ćelije (Liu i sar., 2003), koje učestvuju u regulaciji adultne neurogeneze (Vaden i sar., 2020). Takođe, pokazano je da podregion DG ima važnu ulogu u samom procesu nastanka i razvoja bolesti kliničke depresije (Segi-Nishida i Suzuki, 2022). Dugo se u literaturi samo vDG vezivao za bolesti raspoloženja, međutim, u skorije vreme pokazano je i da sam dDG ima ulogu u regulaciji raspoloženja i da posebno njegova oštećenja doprinose razvoju bolesti depresije i anksioznosti (Sun i sar., 2023). Pored ostalog, razlog smanjenog broja PV+ ćelija može biti poremećaj u sazrevanju PV+ neurona ili smanjena proteinska ekspresija PV (ispod nivoa detekcije), ukoliko nije zabeležen gubitak neurona u hipokampusu. Ovaj rezultat podržan je podacima koji pokazuju da IZ ne dovodi do povećanja nivoa proteina kaspaze-3 (engl. *caspase-3*), koja ima centralnu ulogu u ćelijskoj apoptozi, u dHIP pacova (Filipović i sar., 2011). Inhibitorna aktivnost PV interneurona, zahteva veliku količinu energije i veliki broj molekula citohroma c (Gulyás i sar., 2006), čime se ovi interneuroni izlažu potencijalno toksičnom efektu ROS-a, što može dovesti do poremećaja njihovog redoks potencijala (Kann, 2016).



Slika 57. Šematski prikaz efekta dugotrajne socijalne izolacije (IZ) na parametre antioksidativnog sistema (Cu/Zn-SOD, KAT) i inflamacije (IL-6, SOCS3) u hipokampusu, u poređenju sa kontrolnom grupom pacova

Prethodna studija zabeležila je poremećaj u redoks regulaciji hipokampusa adultnih mužjaka socijalno IZ pacova (Perić i sar., 2017), koja bi mogla strukturalno da ošteti PV interneurone i utiče na smanjeni broj PV+ ćelija. Stoga, određivan je nivo proteinske ekspresije antioksidativnih enzima kao što su citosolni Cu/Zn-SOD i KAT u hipokampusu. Šestonedeljna socijalna IZ povećala je nivo proteinske ekspresije citosolnog enzima Cu/Zn-SOD, a smanjila proteinsku ekspresiju KAT (Slika 57) što može doprineti pojačanom oksidativnom stresu.

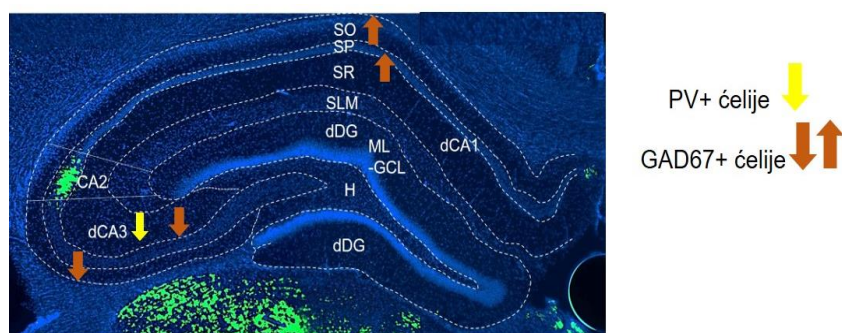
Samim tim, povećana aktivnost Cu/Zn-SOD ukazuje na zaštitu ćelija od oksidativnog stresa u hipokampusu. Povećan proteinski nivo Cu/Zn-SOD enzima može biti rezultat povećane proizvodnje radikala H_2O_2 , kao i povećane produkcije supstrata za KAT. Tačnije, SOD katalizuje pretvaranje superoksidnih radikala u H_2O_2 , koji zatim postaje supstrat za KAT. Na taj način, povećanje nivoa SOD može odražavati adaptivni odgovor organizma na pojačanu produkciju reaktivnih vrsta kiseonika i potrebu za njihovim efikasnijim uklanjanjem. Zabeleženo smanjenje u nivou proteinske ekspresije KAT može biti posledica nemogućnosti otklanjanja nagomilanog H_2O_2 što dovodi do povećanja oksidativnog stresa u hipokampusu. Oksidativni stres i inflamacija često deluju sinergijski u patogenezi različitih

bolesti, tačnije, ROS koje nastaju kao posledica oksidativnog stresa vrlo često oštećuju ćelijske komponente (proteini, lipidi i DNK) što dalje pokreće inflamacijski odgovor, koji zauzvrat može povećati proizvodnju ROS i doprineti patogenezi bolesti. Stoga, oksidativni stres je usko povezan sa inflamacijom i povećanom produkcijom interleukina (IL-6, IL-1) (Mittal i sar., 2014). Zabeleženo je da IL-6 posreduje gubitku PV-ekspimirajućih GABA interneurona (Dugan i sar., 2009). U skladu sa tim rezultatom zabeleženo je povećanje proteinskog nivoa IL-6 i SOCS-3 pod uticajem IZ u hipokampusu (Slika 57), bez bilo kakvog supresivnog efekta na negativnu povratnu spregu preko koje SOCS3 reguliše signalizaciju citokina. Slični rezultati su objavljeni u istraživanju Rossetti i kolega (Rossetti i sar., 2022) koji su objasnili da poremećaj negativne povratne sprege čija inhibicija zavisi od SOCS-3 pod uticajem dugotrajnog blagog stresa, može biti prouzrokovana prekomernom aktivacijom IL-6-posredovane signalizacije koja dalje vodi do stvaranja oštećenog okruženja i odsustva adekvatnih fizioloških i adaptivnih reakcija. Takođe, povećanje proizvodnje IL-6 u mozgu pod patološkim okolnostima može potencijalno smanjiti adultnu neurogenezu u DG hipokampusa (Vallières i sar., 2002) , što ujedno može uticati na smanjenje broja PV+ ćelija u DG (Stanisavljević Ilić i sar., 2023).

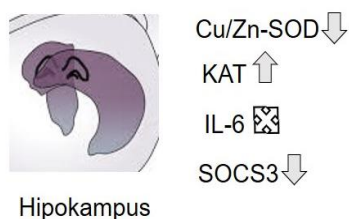
6.5. Efekat dugotrajnog tretmana olanzapinom kod IZ pacova na broj PV+ i GAD67+ ćelija u slojevima dorzalnog hipokampusa

Za razliku od socijalne IZ, tretman Olz kod IZ pacova ostvario je statistički značajan efekat na broj GAD76+ ćelija u podregionima dCA1 (slojevi: SO i SP) i dCA3 (slojevi SO i SR) u poređenju sa IZ pacovima (Slika 58). Smanjenje u broju PV+ i GAD67+ ćelija zabeleženo je u SR sloju podregiona dCA3 (Slika 58). U suprotnosti sa ovim podregionom, povećan broj GAD67+ ćelija pronađen je u slojevima SO i SP podregiona dCA1 kod Olz tretiranih IZ pacova (Slika 58), što ukazuje na efikasnost Olz u pogledu povećanja inhibitorne sinaptičke neurotransmisije. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima koji ukazuju da dugotrajni tretman antipsihotikom lurasidonom normalizuje smanjenu ekspresiju PV u dHIP indukovanu blagim stresom (Rossetti i sar., 2018). Takođe, antipsihotik Klz reguliše funkciju GABA interneurona u dHIP, tako što sprečava smanjenje u broju PV+ ćelija do kojeg je dovela IZ, u podregionima CA2, CA3 i DG (Filipović i sar., 2018). Zabeležen je i povećan broj GAD67+ ćelija u dHIP (podregioni: dCA1 (SO/SP/SR/SLM), CA2 (SLM) i dCA3 (SO, SR, SLM)) socijalno IZ pacova nakon tretmana antidepresivom tianeptinom (Perić i sar., 2019). Iako tretman Olz nije uspeo da vrati na kontrolni nivo smanjen broj PV+ ćelija u podregionima dCA1, CA2 i dDG do kojeg je dovela IZ, ovaj antipsihotik je sprečio dalji gubitak PV+ ćelija, izuzev u podregionu dCA3 i njegovom SR sloju, u poređenju sa samom IZ (Slika 58). Takođe, nije zabeležen statistički značajan efekat Olz na broj PV+ ćelija u podregionima dHIP, kod Kont pacova. Međutim, zabeležen je njegov efekat smanjenja broja GAD67+ ćelija CA2 podregiona (slojevi: SO, SP i SLM) i dCA3 (slojevi: SO i SP) Kont grupe pacova. S obzirom da je GAD67 odgovaran za sintezu GABA i održavanje bazalnog nivoa GABA, ovaj rezultat potvrđuje uključenost GABA transmisije u mehanizam delovanja antipsihotika. Sloj SR se definiše kao suprapiramidni sloj, u kojem se ostvaruju veze unutar samog CA3 podregiona, kao i između podregiona CA3 i CA1 (Cappaert i sar., 2015). Tretman Olz je smanjio GABA inhibiciju u SR sloju, što potencijalno može da predstavlja negativan efekat ovog tretmana. Međutim, postoji mogućnost da je tretman Olz terapijski efekat ostvario kroz druge kalcijum-vezujuće proteine kao što su kalretinin i kalbindin. Takođe, dCA3 podregion ima važnu funkciju u regulaciji radne prostorne memorije (Gilber i Kesner, 2006),

a sam tretman Olz pokazao se kao efikasan u ublažavanju indukovanih oštećenja prostorne memorije i neuropatoloških promena u hipokampusu (He i sar., 2005).



Slika 58. Koronalni presek dHIP nakon bojenja jedara (DAPI, plavo) sa šematskim prikazom statistički značajnog efekta dugotrajnog tretmana olanzapinom na broj PV+ i GAD67+ ćelija kod izolovanih pacova (IZ + Olz) u poređenju sa izolacijom (IZ)



Slika 59. Efekat dugotrajnog tretmana olanzapinom u izolaciji (IZ + Olz) na parametre antioksidativnog sistema (Cu/Zn-SOD, KAT) i inflamacije (IL-6, SOCS3) u hipokampusu, u poređenju sa IZ grupom pacova

Olz je na nivou antioksidativne zaštite delovao suprotno uticaju IZ, odnosno smanjio je nivo proteinske ekspresije Cu/Zn-SOD i povećao nivo proteinske ekspresije KAT (Slika 59), ukazujući na mogućnost Olz da moduliše antioksidativni sistem odbrane, što može doprineti njegovom antioksidativnom potencijalu. Za razliku od lekova litijuma i valproinske kiseline, dugotrajni tretman Olz doveo je do neznatnog povećanja i lipidne peroksidacije i oksidacije proteina, u PFK kontrolnih pacova (Arslan i sar., 2023). Takođe, u životinjskom modelu za proučavanje šizofrenije, Olz je pokazao pozitivan potencijal u regulaciji oksidativnog oštećenja svojstvenog bolesti (Reyna i sar., 2023).

Nivo SOCS3 proteina bio je smanjen nakon tretmana Olz, bez efekta na IL-6 (Slika 59). Nedovoljno smanjenje IL-6 može da onemogući Olz da spreči smanjenje broja PV+ ćelija kod IZ pacova. Takođe, u jetri pacova izloženih dugotrajnoj socijalnoj IZ, tretman Olz nije pokazao anti-inflamacijski potencijal (Todorovi i sar., 2016) što se poklapa sa njegovim efektom i na nivo IL-6 u hipokampusu pacova. Pokazano je da Olz tretman dovodi do smanjenja nivoa proinflamacijskih citokina među kojima je IL-6 (Maes i sar., 1995; Müller i sar., 1997). Zabeleženo je i povećanje proinflamacijskih citokina u plazmi pacijenata obolelih

od šizofrenije, nakon upotrebe Olz, ali sa minimalno štetnim efektom ili bez efekta na sam mozak (Li i sar., 2019). Takođe, anti-inflamacijski potencijal Olz zabeležen je u hipokampusu pacova (Park i sar., 2023).

Iako se atipični antipsihoptici, među kojima i Olz smatraju prvenstveno antagonistima receptora D_2 i $5HT_2$, njihovi mehanizmi delovanja mogu delimično da obuhvate i GABA efekte, što potencijalno može doprineti njihovom kliničkom dejstvu. Istraživanja su pokazala da akutni tretman Olz kod pacova povećava nivo alopregnanolona - moćnog modulatora $GABA_A$ receptora (Marx i sar., 2000) i ima svojstva antagonista $GABA_A$ receptora (Lu i sar., 2023). Takođe, dugotrajni tretman Olz ostvario je efekat u vidu smanjenja gustine $GABA_A$ receptora u hipokampusu (Farnbach-Pralong i sar., 1998) i povećanja ekspresije GAD enzima u talamusu (Sakai i sar., 2001). Stoga je potrebno dodatno ispitati efekat Olz na GABA neurotransmisiju kao potencijalni mehanizam njegovog delovanja i njihovu vezu u mentalnim bolestima.

6.6. Efekat olanzapina i izolacije na markere oksidativnog stresa: MDA i PKG u jetri

Relativno skorašnji rezultati zasnovani na ispitivanju efekata Olz na hepatocite IZ pacova pokazali su da je citotoksični efekat Olz povezan sa mitohondrijskim/peroksidomskim oštećenjima nakon iniciranja oksidativnog stresa od strane leka (Eftekhari i sar., 2016). Međutim, rezultati pokazuju da je Olz tretman smanjio oksidativni stres izazvan IZ tako što je povratio antioksidativnu odbranu uz pomoć enzima SOD i KAT, bez efekta na MDA i PKG. Svakako, neslaganje sa prethodnim rezultatima može da proističe i iz razlika u model sistemima i dozama korišćenog antipsihotika.

Lipidna peroksidacija je vrlo štetna obzirom da prpratno oštećuje i proteine i da je povezana sa mnogim patološkim stanjima među kojima su i bolesti nervnog sistema, pa i sama depresija. Slobodni radikali kiseonika mogu da oštete ćeliju kroz lipidnu peroksidaciju ćelijske membrane tako što produkuju adlehid peroksid - MDA, koji se najčešće koristi kao marker lipidne peroksidacije (Ciobica i sar., 2011). Krajnji produkt lipidne peroksidacije - MDA koristi se kao indikator oksidativnog stresa u kliničkim studijama (Padurariu i sar., 2010). U literaturi je upotreba Olz u životinjskim modelima često povezana sa oštećenjima jetre (Isaacson i sar., 2020) i poremećajem lipidnog metabolizma (Chen i sar., 2018). Međutim, mnogo je ređe zabeležena klinička hepatotoksičnost nakon upotrebe Olz (Larrey i Ripault, 2013). Takođe, prethodna studija zabeležila je povećanu lipidnu peroksidaciju samo kod pacova tretiranih haloperidolom koji spada u tipične antipsihotike, ali ne i kod pacova tretiranih atipičnim antipsihoticima (Padurariu i sar., 2010; Parikh i sar., 2003). Dobijeni rezultati pokazali su povećanje MDA nivoa u citosolu jetre kod IZ (Slika 60 A) i IZ + Olz pacova u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na povećanje oksidativnog stresa od strane IZ. Prethodni rezultati pokazali su da tri nedelje IZ povećavaju nivo azot oksida (engl. *nitrogen-oxid*, NO) u jetri, što delimično doprinosi toksičnom efektu na jetru (Zlatković i sar., 2014b). Formiranje peroksinitrita reakcijom između $O_2\bullet-$ i NO (Pacher i sar., 2007) može dovesti do ćelijske toksičnosti i povećanja lipidne peroksidacije (Squadrito i Pryor, 1995). Takođe, istraživači Zafir i Banu (Zafir i Banu, 2007), koristeći stres imobilizacije kao model sistem, pronašli su povećanu peroksidaciju lipida u jetri stresiranih pacova.

Kao marker oksidativnog stresa vrlo često se koriste i PKG, koji predstavljaju parametre oksidacije proteina. Promene proteina imaju važnu ulogu u mentalnim bolestima (Dalle-Donne i sar., 2003; Dietrich-Muszalska i sar., 2012). Povišen sadržaj PKG u jetri

pacova nakon šest nedelja IZ može rezultirati oštećenjem ćelijskih proteina od strane ROS radikala. Merenje nivoa PKG može imati određene prednosti u odnosu na druge markere oksidativnog stresa, kao što su: rano formiranje, stabilnost i pouzdanost karbonilnih produkata proteina i njihov duži poluživot (Dalle-Donne i sar., 2003; Noeman i sar., 2011). Takođe, sadržaj PKG u jetri pokazao je pozitivnu korelaciju sa sadržajem MDA grupa nakon stresa kod IZ pacova (Slika 60 A). Povećanje lipidne i proteinske oksidacije u jetri IZ pacova može biti povezano sa sličnim oksidativnim promenama u mozgu (Zlatković i sar., 2014a).

Lipidna peroksidacija se dovodi u vezu i sa bolestima metabolizma, a vrlo često se i za samu upotrebu leka Olz kao nuspojava veže metabolički poremećaj. Dugotrajni tretman Olz kod IZ pacova nije pokazao statistički značajan efekat u pogledu smanjenja markera oksidativnog oštećenja ni proteina, a ni lipida (Slika 60 B). Međutim, nije doveo ni do njihovog povećanja u odnosu na samu IZ. MDA povećanje koje je zabeleženo kod Olz tretiranih IZ pacova, u odnosu na kontrolnu grupu najverovatnije potiče od stresa IZ, ne od samog Olz. Studija Martinsa i kolega (Martins i sar., 2008) pokazala je da u mozgu pacova tretman Olz za razliku od drugih antipsihotika nije izazvao ni oksidaciju proteina, ni lipidnu peroksidaciju. Takođe, često je zabeleženo da kod pacijenata obolelih od šizofrenije antipsihotici novije generacije, među kojima i sam Olz smanjuju lipidnu peroksidaciju (Caruso i sar., 2020).



Slika 60. Šematski prikaz efekta izolacije (IZ) u poređenju sa kontrolom (A) i efekta dugotrajnog tretmana olanzapinom (Olz) kod IZ pacova (IZ + Olz) u poređenju sa IZ grupom pacova (B) na markere oksidativnog oštećenja (MDA, PKG) u jetri pacova.

6.7. Uticaj tretmana olanzapinom i dugotrajne izolacije na antioksidativni sistem jetre

Kako bi se odredio oksidativni stres u organizmu, često se meri njegov antioksidativni sistem odbrane i ključni enzimi poput SOD i KAT. Kao što je prethodno već spomenuto, SOD ima ulogu u “hvatanju” $O_2^{\bullet-}$ tako što ga prevodi u molekule O_2 i H_2O_2 . Glavni izvor superoksidnog anjona kiseonika je citohrom P450, enzim koji ima važnu ulogu u metabolizmu Olz (Urlichuk i sar., 2008), kao i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (redukovani oblik) (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) oksidaza lokalizovana u Kupferovim i zvezdastim ćelijama jetre (Mortezaee, 2018). Aktivnost SOD u grupi IZ pacova ne pokazuje statistički značajne promene što se poklapa sa nepromenjenom proteinskom ekspresijom Cu/Zn-SOD pod istim uslovima stresa. Aktivnost totalnog SOD u poređenju je sa proteinskom ekspresijom Cu/Zn-SOD zbog činjenice da ova forma enzima

čini oko 90% od ukupnog SOD enzima (Weydert i Cullen, 2010) sa najvećom zastupljenošću u citosolnoj frakciji ćelija (Okado-Matsumoto i Fridovich, 2001), stoga najviše i doprinosi aktivnosti totalnog SOD enzima.

U citosolnoj frakciji jetre nakon dugotrajnog stresa IZ zabeležena je nepromenjena GPx aktivnost koja ne odgovara njegovoj povećanoj proteinskoj ekspresiji, što ukazuje potencijalno na nedostatak efikasnosti GPx odgovara (Todorović i sar., 2016). Nepromenjena aktivnost enzima SOD (Slika 61 A) i GPx nakon dugotrajnog stresa IZ može dovesti do nakupljanja radikala kiseonika i ujedno oksidativnog stresa. Takođe, stanje oksidativnog stresa može biti pogoršano i gomilanjem NO, jer je pokazano da IZ povećava ekspresiju inducibilne forme NO u jetri (Todorović i sar., 2016), što dalje vodi ka produkciji $O_2^{\bullet-}$ uz pomoć lanca elektronskog transporta mitohondrija (Boveris i Cadenas, 2000). Nagomilavanje $O_2^{\bullet-}$ može doprineti lipidnoj peroksidaciji koja je zabeležena u vidu povećanja MDA. Takođe, kao što je već spomenuto, NO može da reaguje sa $O_2^{\bullet-}$ rezultirajući u formiranju peroksinitrita (Pacher i sar., 2007), koji potencijalno može da inhibira SOD aktivnost (MacMillan-Crow i sar., 1998) i dovede do redukcije nivoa GSH (Kamat, 2006). Smanjenje nivoa GSH i aktivnosti glutation reduktaze, koje je takođe zabeleženo u citosolnoj frakciji jetre IZ pacova (Todorović i sar., 2016) može dovesti do gomilanja H_2O_2 i drugih ROS, koji dalje mogu da suprimiraju aktivnost antioksidativnih enzima (Pigeolet i sar., 1990). Ekspresija SOD je pod kontrolom NF- κ B (Meyer i sar., 1993) čija povećana aktivnost je zabeležena u jetri IZ pacova (Todorović i sar., 2016). Međutim, jedarna translokacija NF- κ B očigledno nije bila praćena povećanjem proteinske ekspresije Cu/Zn-SOD ili aktivnošću SOD enzima. Nepromenjena ekspresija Cu/Zn-SOD može da proističe iz regulacije drugih transkripcionih faktora kao što je GR, obzirom da je zabeleženo da glukokortikoidi preko GR regulišu proteinsku ekspresiju Cu/Zn-SOD (Kim i sar., 1994). Takođe, nepromenjena proteinska ekspresija Cu/Zn-SOD može biti rezultat poremećaja u funkcionisanju HHA osovine, tačnije, poremećaja u jedarno-citoplazmatskom premeštanju GR u jetri pacova izloženih dugotrajnoj izolaciji (3 nedelja) (Filipović i sar., 2008) gde nepotpuno premeštanje citosolnog GR u jedro i njegovo zadržavanje u citolosu može da spreči aktiviranje promotora za Cu/Zn-SOD. Takođe, rezultati su pokazali i povećanu aktivnost enzima KAT nakon stresa IZ (Slika 61 A). Ovaj enzim zajedno sa GPx enzimom sprečava prekomerno nagomilavanje H_2O_2 i ujedno štiti ćelije od štete koju peroksidaze nanose. Povećana aktivnost KAT, nivoa PKG i MDA samo potvrđuje prisustvo visoke produkcije ROS-a, tj. prisustvo oksidativnog stresa u jetri IZ pacova. KAT je najzastupljeniji enzim u jetri i njegova povećana aktivnost nakon IZ može potencijalno biti uslovljena visokom koncentracijom H_2O_2 koja mora da se ukloni.

Olz tretman je kod IZ pacova povećao aktivnost SOD enzima, u poređenju sa IZ pacovima, što je bilo u saglasnosti sa njegovom proteinskom ekspresijom (Cu/Zn-SOD) (Slika 61 B). Povećanje u proteinskoj ekspresiji Cu/Zn-SOD i aktivnosti SOD enzima kod kontrolnih pacova tretiranih Olz ili IZ + Olz pacova, ukazuje samo na potencijalni uticaj antipsihotika na antioksidativni sistem odbrane. Takođe, postoje literaturni podaci koji pokazuju antioksidativni potencijal Olz kroz povećanje aktivnosti SOD enzima (Li i sar., 1999; Wei i sar., 2003). Tronedeljni tretman Olz je smanjio aktivnost KAT enzima u IZ grupi pacova, što je bilo u skladu sa proteinskom ekspresijom KAT enzima (Slika 61 B). Smanjenje KAT aktivnosti kod IZ + Olz pacova u poređenju sa IZ pacovima (kod kojih je povećana aktivnost KAT enzima) možda predstavlja efikasnu odbranu antipsihotika od IZ indukovanog oksidativnog stresa.

Zabeleženi efekti dugotrajnog tretmana Olz u jetri IZ pacova mogu biti važni za proučavanje bolesti jetre koje su povezane sa oksidativnim stresom (Li i sar., 2015) kao i sa mentalnim bolestima koje su povezane sa stresom, obzirom da ovaj antipsihotik aktiviraju enzimi jetre (Urichuk i sar., 2008). Rezultati dobijeni iz tkiva jetre ukazuju da Olz ima potencijala u smanjenju oksidativnog stresa izazvanog IZ.



Slika 61. Šematski prikaz značajnog efekta izolacije (IZ) u poređenju sa kontrolom (A) i efekta dugotrajnog tretmana olanzapinom kod IZ pacova (IZ + Olz) u poređenju sa IZ grupom pacova (B) na parametre antioksidativnog sistema (SOD, KAT, Cu/Zn-SOD) u jetri pacova

7. Zaključci

Na osnovu analize dobijenih rezultata, u skladu sa postavljenim ciljevima izvedeni su sledeći zaključci:

- Dugotrajna IZ pacova u trajanju od 6 nedelja dovela je do:
 1. Razvoja ponašanja nalik depresivnom i anksioznom;
 2. Povećanja broja c-Fos+ ćelija u podregionima dHIP i vHIP, mPFK, RSK, LA/BL kompleksu amigdala, PVP, DMHT i VMHT, strijatumu;
 3. Smanjenja u broju PV+ ćelija u SO i SP slojevima dCA1 i oba sloja dDG (ML-GCL, H), podregiona dHIP;
 4. Promena enzimske antioksidativne zaštite (povećanjem zastupljenosti enzima Cu/Zn-SOD i smanjenjem KAT na proteinskom nivou)
 5. Porasta zastupljenosti proinflamacijskog citokina IL-6 i njegovog regulatora SOCS3 na proteinskom nivou u hipokampusu;
 6. Pojave oksidativnog stresa u jetri, pokazanog kroz porast produkata lipidne peroksidacije (MDA) i karbonilacije proteina (PKG), a koje je praćeno porastom aktivnosti KAT;

- Tronedeljni tretman olanzapinom tokom poslednje 3 nedelje dugotrajne IZ doveo je do:
 1. Izostanka razvoja ponašanja nalik depresivnom i anksioznom;
 2. Smanjenja broja c-Fos+ ćelija u podregionima dHIP, ventralnom DG, RSK i mPFK;
 3. Povećanja u broju GAD67+ ćelijama u slojevima SO i SP podregiona dCA1, ali i do smanjenja broja GAD67+ ćelija u slojevima SO i SR podregiona dCA3, IZ pacova, dok nije uticao na smanjeni broj PV+ ćelija u slojevima SO i SP podregiona dCA1 i oba sloja podregiona dDG u dHIP, izuzev sloja SR u dCA3;
 4. Ponovnog uspostavljanja fizioloških vrednosti na nivou proteinske ekspresije komponenti antioksidativne zaštite Cu/Zn-SOD i KAT u hipokampusu;
 5. Smanjenja nivoa proteinske ekspresije SOCS3 u hipokampusu, ali bez uticaja na promenu proteinske ekspresije IL-6;
 6. Porasta proteinske ekspresije, kao i enzimske aktivnosti Cu/Zn-SOD, a smanjenja kod KAT u jetri, dok nije doveo do smanjenja PKG i MDA, ali je sprečio dalje povećanje u odnosu na samu IZ.

Iz svega prethodno navedenog, izveden je i sledeći opšti zaključak:

Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju validnost životinjskog modela dugotrajne socijalne izolacije adultnih pacova u istraživanju patofizioloških mehanizama koji leže u osnovi depresije. Uočene promene u pogledu povećanja broja c-Fos+ ćelija u moždanim regionima uključenim u odgovor na dugotrajni stres, disregulacije na nivou GABA signalizacije u dHIP pacova, kao i pojave oksidativnog stresa i inflamacije u hipokampusu zajednički doprinose etiopatogenezi simptoma nalik depresivnim i anksioznim. S druge strane, Olz tretman kod IZ pacova doveo je do smanjenja broja c-Fos+ ćelija u navedenim moždanim regionima, delimične normalizacije na nivou GABA signalizacije u dHIP i smanjenja parametara oksidativnog stresa u hipokampusu, čime po svemu sudeći doprinosi antidepresivnom i anksiolitičkom delovanju pokazanom na nivou ponašanja. Iako je u brojnim pretkliničkim i kliničkim studijama Olz pokazao značajan potencijal u lečenju

mentalnih bolesti, tokom njegove primene zabeležen je značajan broj nuspojava. Zbog toga je neophodno nastaviti istraživanja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi terapijskih efekata Olz kod depresije i anksioznosti.

8. Literatura:

- Abelaira, H.M., Reúus, G.Z., Quevedo, J., 2013. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 35, 112-120. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1098>
- Adhikari, A., Lerner, T.N., Finkelstein, J., Pak, S., Jennings, J.H., Davidson, T.J., Ferenczi, E., Gunaydin, L.A., Mirzabekov, J.J., Ye, L., Kim, S.Y., Lei, A., Deisseroth, K., 2015. Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature* 527, 179–185. <https://doi.org/10.1038/NATURE15698>
- Aggleton, J.P., Yanakieva, S., Sengpiel, F., Nelson, A.J., 2021. The separate and combined properties of the granular (area 29) and dysgranular (area 30) retrosplenial cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 185. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2021.107516>
- Albert, P.R., 2019. Adult neuroplasticity: A new “cure” for major depression? *J. Psychiatry Neurosci.* 44, 147-150. <https://doi.org/10.1503/JPN.190072>
- Albro, P.W., Corbett, J.T., Schroeder, J.L., 1986. Application of the thiobarbiturate assay to the measurement of lipid peroxidation products in microsomes. *J. Biochem. Biophys. Methods* 13, 185–194. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(86\)90092-8](https://doi.org/10.1016/0165-022X(86)90092-8)
- Ali, D.N., Ali, H.M., Lopez, M.R., Kang, S., Choi, D.S., 2024. Astrocytic GABAergic Regulation in Alcohol Use and Major Depressive Disorders. *Cells* 2024, 13, 1-20. <https://doi.org/10.3390/CELLS13040318>
- Allameh, A., Niayesh-Mehr, R., Aliarab, A., Sebastiani, G., Pantopoulos, K., 2023. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants* 12, 1-23. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12091653>
- Alshammari, T.K., Alghamdi, H.M., Alduhailan, H.E., Saja, M.F., Alrasheed, N.M., Alshammari, M.A., 2020. Examining the central effects of chronic stressful social isolation on rats. *Biomed. Reports* 13, 1–7. <https://doi.org/10.3892/BR.2020.1363>
- Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335. <https://doi.org/10.1002/CNE.901240303>
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22, 629-634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002>
- American Psychiatric Association. (2022). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed., text rev.). Washington, DC: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425787>
- Amidfar, M., Woelfer, M., Réus, G.Z., Quevedo, J., Walter, M., Kim, Y.K., 2019. The role of NMDA receptor in neurobiology and treatment of major depressive disorder: Evidence from translational research. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 94, 109668. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2019.109668>
- Andersen, P., 1975. Organization of Hippocampal Neurons and Their Interconnections. *Hippocampus* 155–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2976-3_7
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J., 2006. *The Hippocampus Book*. Hippocampus B. 1–852.

<https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780195100273.001.0001>

- Anschel, S., Alexander, M., Perachio, A.A., 1982. Multiple connections of medial hypothalamic neurons in the rat. *Exp. brain Res.* 46, 383–392. <https://doi.org/10.1007/BF00238633>
- Aparicio, L., Fierro, L., Abreu, A., Cárdenas, T., Durán, R., Denes, M., Current, al, Yasbeth Lara Aparicio, S., de Jesús Laureani Fierro, Á., Emiliano Aranda Abreu, G., Toledo Cárdenas, R., Isauro García Hernández, L., Alfonso Coria Ávila, G., Rojas Durán, F., Elena Hernández Aguilar, M., Manzo Denes, J., Donají Chi-Castañeda, L., Antonio Pérez Estudillo, C., 2022. Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci* 2022, 3, 687–702. <https://doi.org/10.3390/NEUROSCI3040050>
- Arslan, M.A., Tunçel, Ö.K., Bilgici, B., Karaustaoğlu, A., Gümrükçüoğlu, T.İ., 2023. Increased levels of lipid and protein oxidation in rat prefrontal cortex after treatment by lithium, valproic acid, and olanzapine. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 396, 2721–2728. <https://doi.org/10.1007/S00210-023-02494-6>
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., Obata, K., 1997. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6496–6499. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.12.6496>
- Asenjo-Lobos, C., Fonseca, C., Leucht, S., Arancibia, M., Cortés-Jofré, M., 2018. Clozapine versus olanzapine for people with schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018.1-15. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013219>
- Báez-Mendoza, R., Schultz, W., 2013. The role of the striatum in social behavior. *Front. Neurosci.* 7, 71890. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2013.00233/BIBTEX>
- Bagot, R.C., Parise, E.M., Peña, C.J., Zhang, H.X., Maze, I., Chaudhury, D., Persaud, B., Cachope, R., Bolaños-Guzmán, C.A., Cheer, J., Deisseroth, K., Han, M.H., Nestler, E.J., 2015. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nat. Commun.* 6, 1-8. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS8062>
- Banerjee, R., Ghosh, A.K., Ghosh, B., Bhattacharyya, S., Mondal, A.C., 2013. Decreased mRNA and Protein Expression of BDNF, NGF, and their Receptors in the Hippocampus from Suicide: An Analysis in Human Postmortem Brain. *Clin. Med. Insights. Pathol.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.4137/CMPATH.S12530>
- Bao, A.M., Swaab, D.F., 2019. The human hypothalamus in mood disorders: The HPA axis in the center. *IBRO Reports* 6, 45-53. <https://doi.org/10.1016/J.IBROR.2018.11.008>
- Barson, J.R., Mack, N.R., Gao, W.J., 2020. The Paraventricular Nucleus of the Thalamus Is an Important Node in the Emotional Processing Network. *Front. Behav. Neurosci.* 14, 1-9. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2020.598469>
- Beal, E.W., Dumond, C.A., Kim, J-L., Mumtaz, K., Jr, D.H., Washburn, K., Whitson, B.A., Black, S.M., 2017. Method of Direct Segmental Intra-hepatic Delivery Using a Rat Liver Hilar Clamp Model. *J. Vis. Exp.* 2017, 122, 54729. <https://doi.org/10.3791/54729>
- Bear, M.H., Reddy, V., Bollu, P.C., 2022. Neuroanatomy, Hypothalamus. *StatPearls*.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

- Behrendt, R.-P., 2011. *Neuroanatomy of social behaviour: an evolutionary and psychoanalytic perspective*. Karnac Books, prvo izdanje. 668.
- Belmaker, R.H., Agam, G., 2008. Major depressive disorder. *N. Engl. J. M.* 358, 55-68. <https://doi.org/10.1056/NEJMra073096>
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatlosova, K., Dubovicky, M., 2017. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip. Toxicol.* 10, 40-43. <https://doi.org/10.1515/INTOX-2017-0006>
- Belzung, C., Lemoine, M., 2011. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 1, 9. <https://doi.org/10.1186/2045-5380-1-9>
- Benes, F.M., Berretta, S., 2001. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25, 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00225-1](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00225-1)
- Benes, F.M., Kwok, E.W., Vincent, S.L., Todtenkopf, M.S., 1998. A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol. Psychiatry* 44, 88–97. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00138-3)
- Berrio, J.P., Kalliokoski, O., 2023. Rethinking data treatment: The sucrose preference threshold for anhedonia in stress-induced rat models of depression. *J. Neurosci. Methods* 395, 109910. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.109910>
- Berton, O., Nestler, E.J., 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 137–151. <https://doi.org/10.1038/NRN1846>
- Björkholm, C., Monteggia, L.M., 2016. BDNF — a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology* 102, 72-79. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.10.034>
- Blanchard, R.J., McKittrick, C.R., Blanchard, D.C., 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol. Behav.* 73, 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00449-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00449-8)
- Blasi, G., Popolizio, T., Taurisano, P., Caforio, G., Romano, R., Di Giorgio, A., Sambataro, F., Rubino, V., Latorre, V., Lo Bianco, L., Fazio, L., Nardini, M., Weinberger, D.R., Bertolino, A., 2009. Changes in prefrontal and amygdala activity during olanzapine treatment in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 173, 31-38. <https://doi.org/10.1016/J.PSCYCHRESNS.2008.09.001>
- Bobo, W. V., Shelton, R.C., 2009. Olanzapine and fluoxetine combination therapy for treatment-resistant depression: Review of efficacy, safety, and study design issues. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 5, 369–383. <https://doi.org/10.2147/NDT.S5819>
- Boku, S., Nakagawa, S., Toda, H., Hishimoto, A., 2018. Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 72, 3-12. <https://doi.org/10.1111/pcn.12604>
- Boldrini, M., Underwood, M.D., Hen, R., Rosoklija, G.B., Dwork, A.J., John Mann, J., Arango, V., 2009. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34, 2376–2389. <https://doi.org/10.1038/NPP.2009.75>

- Botcher, N.A., Falck, J.E., Thomson, A.M., Mercer, A., 2014. Distribution of interneurons in the CA2 region of the rat hippocampus. *Front. Neuroanat.* 8, 104–120. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00104>
- Boveris, A., Cadenas, E., 2000. Mitochondrial Production of Hydrogen Peroxide Regulation by Nitric Oxide and the Role of Ubisemiquinone. *IUBMB Life* 50, 245–250. <https://doi.org/10.1080/713803732>
- Boz, Z., Hu, M., Yu, Y., Huang, X.F., 2020. N-acetylcysteine prevents olanzapine-induced oxidative stress in mHypoA-59 hypothalamic neurons. *Sci. Reports* 2020 101 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75356-3>
- Bredewold, R., Schiavo, J.K., van der Hart, M., Verreij, M., Veenema, A.H., 2015. Dynamic changes in extracellular release of GABA and glutamate in the lateral septum during social play behavior in juvenile rats: Implications for sex-specific regulation of social play behavior. *Neuroscience* 307, 117–127. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.08.052>
- Brown, E.S., Rush, A.J., McEwen, B.S., 1999. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 21, 474–484. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00054-8)
- Calabrese, F., Brivio, P., Gruca, P., Lason-Tyburkiewicz, M., Papp, M., Riva, M.A., 2017. Chronic Mild Stress-Induced Alterations of Local Protein Synthesis: A Role for Cognitive Impairment. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 817–825. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.6B00392>
- Camkurt, M.A., Findikli, E., Izci, F., Kurutaş, E.B., Tuman, T.C., 2016. Evaluation of malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase activity and their diagnostic value in drug naïve, first episode, non-smoker major depression patients and healthy controls. *Psychiatry Res.* 238, 81–85. <https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2016.01.075>
- Cappaert, N.L.M., Van Strien, N.M., Witter, M.P., 2015. Hippocampal Formation. *Rat Nerv. Syst. Četvrto izdanje.* 511–573. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00020-6>
- Carnevali, L., Mastorci, F., Graiani, G., Razzoli, M., Trombini, M., Pico-Alfonso, M., Arban, R., Grippo, A., Quaini, F., Sgoifo, A., 2012. Social defeat and isolation induce clear signs of a depression-like state, but modest cardiac alterations in wild-type rats. *Physiol. Behav.* 106, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.01.022>
- Carow, B., Rottenberg, M.E., 2014. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Front. Immunol.* 5, 58–71. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00058>
- Caruso, G., Grasso, M., Fidilio, A., Tascetta, F., Drago, F., Caraci, F., 2020. Antioxidant Properties of Second-Generation Antipsychotics: Focus on Microglia. *Pharmaceuticals* 13, 1–20. <https://doi.org/10.3390/PH13120457>
- Cenquizca, L.A., Swanson, L.W., 2007. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56, 1–26. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2007.05.002>
- Chamberlin, L.A., Yang, S.S., McEachern, E.P., Lucas, J.T.M., McLeod, O.W., Rolland, C.A., Mack, N.R., Ferguson, B.R., Gao, W.J., 2023. Pharmacogenetic activation of parvalbumin interneurons in the prefrontal cortex rescues cognitive deficits induced by adolescent MK801 administration. *Neuropsychopharmacology* 48, 1267–1276.

<https://doi.org/10.1038/S41386-023-01576-6>

- Chan, S.W.Y., Harmer, C.J., Norbury, R., O'Sullivan, U., Goodwin, G.M., Portella, M.J., 2016. Hippocampal volume in vulnerability and resilience to depression. *J. Affect. Disord.* 189, 199–202. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2015.09.021>
- Chay, S.H., Herman, J.L., 1988. Disposition of the novel anti-schizophrenic drug [14C]olanzapine in male Fischer 344 and female CD rats following single oral dose administration. *Arzneimittelforschung* 48, 446–454.
- Chen, C.H., Shyue, S.K., Hsu, C.P., Lee, T.S., 2018. Atypical Antipsychotic Drug Olanzapine Deregulates Hepatic Lipid Metabolism and Aortic Inflammation and Aggravates Atherosclerosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 50, 1216–1229. <https://doi.org/10.1159/000494573>
- Cheon, S.Y., Song, J., 2021. The Association between Hepatic Encephalopathy and Diabetic Encephalopathy: The Brain-Liver Axis. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–16. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010463>
- Chevaleyre, V., Siegelbaum, S.A., 2010. Strong CA2 Pyramidal Neuron Synapses Define a Powerful Disynaptic Cortico-Hippocampal Loop. *Neuron* 66, 560–572. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.04.013>
- Chikama, K., Yamada, H., Tsukamoto, T., Kajitani, K., Nakabeppu, Y., Uchimura, N., 2017. Chronic atypical antipsychotics, but not haloperidol, increase neurogenesis in the hippocampus of adult mouse. *Brain Res.* 1676, 77–82. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2017.09.006>
- Ciobica, A., Padurariu, M., Irina Dobrin, C., Stefanescu, R.D., 2011. Oxidative stress in schizophrenia - focusing on the main markers. *Psychiatr Danub* 23, 237–45.
- Ciudad, A., Gutiérrez, M., Cañas, F., Gibert, J., Gascón, J., Carrasco, J.L., Bobes, J., Gómez, J.C., Alvarez, E., 2005. Safety and effectiveness of olanzapine in monotherapy: a multivariate analysis of a naturalistic study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 944–951. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2005.04.037>
- Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review (s). Center for drug evaluation and research. 1999. Dostupno na sajt: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/21-086_Zyprexa%20Zydis_biopharmr.pdf
- Colita, D., Burdusel, D., Glavan, D., Hermann, D.M., Colită, C.I., Colita, E., Udristoiu, I., Popa-Wagner, A., 2024. Molecular mechanisms underlying major depressive disorder and post-stroke affective disorders. *J. Affect. Disord.* 344, 149–158. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2023.10.037>
- Conrad, C.D., 2006. What Is the Functional Significance of Chronic Stress-Induced CA3 Dendritic Retraction Within the Hippocampus? *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* 5, 41. <https://doi.org/10.1177/1534582306289043>
- Crapanzano, C., Casolaro, I., Damiani, S., Amendola, C., 2022. Efficacy of Olanzapine in Anxiety Dimension of Schizophrenia: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 20, 592–599. <https://doi.org/10.9758/CPN.2022.20.4.592>
- Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W., Chang, L.Y., 1992. Copper,zinc superoxide

- dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10405-10409. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.21.10405>
- Croxtall, J.D., Scott, L.J., 2010. Olanzapine/fluoxetine: a review of its use in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *CNS Drugs* 24, 245–262. <https://doi.org/10.2165/11203830-000000000-00000>
- Cui, Z., Gerfen, C.R., Young, W.S., 2013. Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 521, 1844–1866. <https://doi.org/10.1002/CNE.23263>
- Czéh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., De Biurrun, G., Van Kampen, M., Bartolomucci, A., Fuchs, E., 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12796–12801. <https://doi.org/10.1073/pnas.211427898>
- Czeh, B., Simon, M., Van Der Hart, M.G.C., Schmelting, B., Hesselink, M.B., Fuchs, E., 2005. Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: Prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist. *Neuropsychopharmacology* 30, 67–79. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300581>
- Czéh, B., Vardya, I., Varga, Z., Febbraro, F., Csabai, D., Martis, L.S., Højgaard, K., Henningsen, K., Bouzinova, E. V., Miseta, A., Jensen, K., Wiborg, O., 2018. Long-term stress disrupts the structural and functional integrity of GABAergic neuronal networks in the medial prefrontal cortex of rats. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 148-169. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00148>
- Czéh, B., Varga, Z.K.K., Henningsen, K., Kovács, G.L., Miseta, A., Wiborg, O., 2015. Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus* 25, 393–405. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22382>
- Czéh, B., Welt, T., Fischer, A.K., Erhardt, A., Schmitt, W., Müller, M.B., Toschi, N., Fuchs, E., Keck, M.E., 2002. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: Effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 52, 1057–1065. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01457-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01457-9)
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23–38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 46–56. <https://doi.org/10.1038/NRN2297>
- Deng, X., Gu, L., Sui, N., Guo, J., Liang, J., 2019. Parvalbumin interneuron in the ventral hippocampus functions as a discriminator in social memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 16583–16592. https://doi.org/10.1073/PNAS.1819133116/SUPPL_FILE/PNAS.1819133116.SAPP.PDF
- Deng, Y., Liang, X., Li, Y., Jiang, L., Wang, J., Tang, J., Li, J., Xie, Y., Xiao, K., Zhu, P.,

- Guo, Y., Luo, Y., Tang, Y., 2024. PGC-1 α in the hippocampus mediates depressive-like and stress-coping behaviours and regulates excitatory synapses in the dentate gyrus in mice. *Neuropharmacology* 250, 109908. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2024.109908>
- Der-Avakian, A., Markou, A., 2012. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci.* 35, 68–77. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.11.005>
- Deussing, J.M., 2006. Animal models of depression. *Drug Discov. Today Dis. Model.* 3, 375–383. <https://doi.org/10.1016/J.DDMOD.2006.11.003>
- Deutch, A.Y., Lee, M.C., Iadarola, M.J., 1992. Regionally specific effects of atypical antipsychotic drugs on striatal Fos expression: The nucleus accumbens shell as a locus of antipsychotic action. *Mol. Cell. Neurosci.* 3, 332–341. [https://doi.org/10.1016/1044-7431\(92\)90030-6](https://doi.org/10.1016/1044-7431(92)90030-6)
- Deutch, A.Y., Moghaddam, B., Innis, R.B., Krystal, J.H., Aghajanian, G.K., Bunney, B.S., Charney, D.S., 1991. Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs: Implications for novel therapeutic strategies for schizophrenia. *Schizophr. Res.* 4, 121–156. [https://doi.org/10.1016/0920-9964\(91\)90030-U](https://doi.org/10.1016/0920-9964(91)90030-U)
- Diethorn, E.J., Gould, E., 2023. Postnatal development of hippocampal CA2 structure and function during the emergence of social recognition of peers. *Hippocampus* 33, 208–222. <https://doi.org/10.1002/HIPO.23476>
- Dietrich-Muszalska, A., Malinowska, J., Olas, B., Głowacki, R., Bald, E., Wachowicz, B., Rabe-Jabłońska, J., 2012. The Oxidative Stress May be Induced by the Elevated Homocysteine in Schizophrenic Patients. *Neurochem. Res.* 37, 1057–1062. <https://doi.org/10.1007/S11064-012-0707-3>
- Dimonte, S., Sikora, V., Bove, M., Morgese, M.G., Tucci, P., Schiavone, S., Trabace, L., 2023. Social isolation from early life induces anxiety-like behaviors in adult rats: Relation to neuroendocrine and neurochemical dysfunctions. *Biomed. Pharmacother.* 158, 114181. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.114181>
- Ding, C., Li, Y., Guo, F., Jiang, Y., Ying, W., Li, D., Yang, D., Xia, X., Liu, W., Zhao, Y., He, Y., Li, X., Sun, W., Liu, Q., Song, L., Zhen, B., Zhang, P., Qian, X., Qin, J., He, F., 2016. A Cell-type-resolved Liver Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 3190–3202. <https://doi.org/10.1074/MCP.M116.060145>
- Dombrowski, A.Y., Siegle, G.J., Szanto, K., Clark, L., Reynolds, C.F., Aizenstein, H., 2012. The temptation of suicide: striatal gray matter, discounting of delayed rewards, and suicide attempts in late-life depression. *Psychol. Med.* 42, 1203–1215. <https://doi.org/10.1017/S0033291711002133>
- Drevets, W.C., 2001. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr. Opin. Neurobiol* 11, 240–249. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00203-8](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00203-8)
- Đorđević, J., Đorđević, A., Adžić, M., Radojčić, M.B., 2012. Effects of Chronic Social Isolation on Wistar Rat Behavior and Brain Plasticity Markers. *Neuropsychobiology* 66, 112–119. <https://doi.org/10.1159/000338605>
- Đorđević, J., Mitić, M., Lukić, I., Adžić, M., 2015. Maternal deprivation of rat pups reduces body weight and alters behavior in adulthood in a gender-specific manner. *Arch. Biol.*

Sci 67, 131–138. <https://doi.org/10.2298/ABS141002015D>

- Dorđević, V., Dorđević, V., 2022. Superoxide Dismutase in Psychiatric Diseases, in: Ractive Oxygen Species. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.99847>
- Dougherty, P., 2020. Hypothalamus: Structural Organization. Neurosci. online. URL <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s4/chapter01.html> (pristupljeno 11.28.23).
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctôt, K.L., 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry* 67, 446–457. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2009.09.033>
- Drevets, W.C., Savitz, J., Trimble, M., 2008. The Subgenual Anterior Cingulate Cortex in Mood Disorders. *CNS Spectr.* 13, 663–681. <https://doi.org/10.1017/S1092852900013754>
- Du Preez, A., Onorato, D., Eiben, I., Musaelyan, K., Egeland, M., Zunszain, P.A., Fernandes, C., Thuret, S., Pariante, C.M., 2021. Chronic stress followed by social isolation promotes depressive-like behaviour, alters microglial and astrocyte biology and reduces hippocampal neurogenesis in male mice. *Brain. Behav. Immun.* 91, 24–47. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2020.07.015>
- Dugan, L.L., Ali, S.S., Shekhtman, G., Roberts, A.J., Lucero, J., Quick, K.L., Behrens, M.M., 2009. IL-6 mediated degeneration of forebrain GABAergic interneurons and cognitive impairment in aged mice through activation of neuronal NADPH oxidase. *PLoS One* 4, 5518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005518>
- Duman, R.S., Aghajanian, G.K., 2012. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338, 68–72. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1222939>
- Eftekhari, A., Azarmi, Y., Parvizpur, A., Eghbal, M.A., 2016. Involvement of oxidative stress and mitochondrial/lysosomal cross-talk in olanzapine cytotoxicity in freshly isolated rat hepatocytes. *Xenobiotica*. 46, 363–378. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1078522>
- Elsworth, J.D., Morrow, B.A., Hajszan, T., Leranth, C., Roth, R.H., 2011. Phencyclidine-induced loss of asymmetric spine synapses in rodent prefrontal cortex is reversed by acute and chronic treatment with olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 36, 2054–2061. <https://doi.org/10.1038/NPP.2011.96>
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Esel, E., Kose, K., Hacimusalar, Y., Ozsoy, S., Kula, M., Candan, Z., Turan, T., 2008. The effects of electroconvulsive therapy on GABAergic function in major depressive patients. *J. ECT* 24, 224–228. <https://doi.org/10.1097/YCT.0B013E31815CBAA1>
- Eun, S.Y., Hong, Y.H., Kim, E.H., Jeon, H., Suh, Y.H., Lee, J.E., Jo, C., Jo, S.A., Kim, J., 2004. Glutamate receptor-mediated regulation of c-fos expression in cultured microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 320–327. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.10.035>
- Fahn, S., Jankovic, J., Hallett, M., 2011. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Princ. Pract. Mov. Disord, drugo izdanje, treće poglavlje*. 55–65. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2369-4.00003-2>

- Fanselow, M.S., Dong, H.W., 2010. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Faour-Nmarne, C., Azab, A.N., 2016. Effects of olanzapine on LPS-induced inflammation in rat primary glia cells. *Innate Immun.* 22, 40–50. <https://doi.org/10.1177/1753425915613425>
- Farooq, R.K., Asghar, K., Kanwal, S., Zulqernain, A., 2017. Role of inflammatory cytokines in depression: Focus on interleukin-1 β . *Biomed Rep.* 6, 15–20. <https://doi.org/10.3892/br.2016.807>
- Farnbach-Pralong, D., Bradbury, R., Copolov, D., Dean, B., 1998. Clozapine and olanzapine treatment decreases rat cortical and limbic GABA(A) receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 349, R7-R8. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00285-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00285-4)
- Fassett-Carman, A.N., Moser, A.D., Ruzic, L., Neilson, C., Jones, J., Barnes-Horowitz, S., Schneck, C.D., Kaiser, R.H., 2023. Amygdala and nucleus accumbens activation during reward anticipation moderates the association between life stressor frequency and depressive symptoms. *J. Affect. Disord.* 330, 309–318. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2023.02.149>
- Felix-Ortiz, A.C., Burgos-Robles, A., Bhagat, N.D., Leppla, C.A., Tye, K.M., 2016. Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 321, 197–209. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.07.041>
- Felten, D.L., O'Banion, M.K., Maida, M.S., 2016. *Developmental Neuroscience. Netter's Atlas Neurosci*, treće izdanje, osmo poglavlje. 125–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-26511-9.00008-4>
- Ferguson, A. V., Latchford, K.J., Sanon, W.K., 2008. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus A Potential Target for Integrative Treatment of Autonomic Dysfunction. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 717-727. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.6.717>
- Filipović, D., Gavrilović, L., Dronjak, S., Demajo, M., Radojčić, M.B., 2008. Liver glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to different stress models. *Physiol. Res.* 57, 204–213. <https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.931152>
- Filipović, D., Gavrilović, L., Dronjak, S., Radojčić, M.B., 2005. Brain glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to acute, chronic or combined stress. *Neuropsychobiology* 51, 107–114. <https://doi.org/10.1159/000084168>
- Filipović, D., Novak, B., Xiao, J., Yan, Y., Yeoh, K., Turck, C.W., 2022. Chronic Fluoxetine Treatment of Socially Isolated Rats Modulates Prefrontal Cortex Proteome. *Neuroscience* 501, 52–71. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2022.08.011>
- Filipović, D., Stanisavljević, A., Jasnić, N., Bernardi, R.E., Inta, D., Perić, I., Gass, P., 2018. Chronic treatment with fluoxetine or clozapine of socially isolated rats prevents subsector-specific reduction of parvalbumin immunoreactive cells in the hippocampus. *Neuroscience*, 371, 384-394. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.12.020>
- Filipović, D., Todorović, N., Bernardi, R.E., Gass, P., 2017. Oxidative and nitrosative stress pathways in the brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like symptoms. *Brain Struct. Funct.* 222, 1-20. <https://doi.org/10.1007/S00429->

- Filipović, D., Zlatković, J., Gass, P., Inta, D., 2013. The differential effects of acute vs. chronic stress and their combination on hippocampal parvalbumin and inducible heat shock protein 70 expression. *Neuroscience* 236, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.033>
- Filipović, D., Zlatković, J., Inta, D., Bjelobaba, I., Stojiljkovic, M., Gass, P., 2011. Chronic isolation stress predisposes the frontal cortex but not the hippocampus to the potentially detrimental release of cytochrome c from mitochondria and the activation of caspase-3. *J. Neurosci. Res.* 89, 1461–1470. <https://doi.org/10.1002/JNR.22687>
- Fischer, S., 2021. The hypothalamus in anxiety disorders. *Handb. Clin. Neurol.* 180, 149–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00009-4>
- Fogaça, M. V., Duman, R.S., 2019. Cortical GABAergic dysfunction in stress and depression: New insights for therapeutic interventions. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 87–108. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00087>
- Freund, T.F., Buzsáki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063)
- Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., Seishima, M., 2006. The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor. *J. Biochem.* 139, 655–662. <https://doi.org/10.1093/JB/MVJ072>
- Fujimura, M., Hashimoto, K., Yamagami, K., 2000. Effects of antipsychotic drugs on neurotoxicity, expression of fos-like protein and c-fos mRNA in the retrosplenial cortex after administration of dizocilpine. *Eur. J. Pharmacol.* 398, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00235-1)
- Gabbott, P., Dickie, G., Vaid, R., Headlam, A., Bacon, S., 1997. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution -. *J Comp Neurol* 377, 465–499. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970127\)377:4<465::aid-cne1>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970127)377:4<465::aid-cne1>3.0.co;2-0).
- Gao, M., Wang, F., Sun, C., Zhang, S., Su, R., 2024. Effects of olanzapine on hippocampal CA3 and the prefrontal cortex local field potentials. *Eur. J. Pharmacol.* 176396. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2024.176396>
- Garzón, J., Del Río, J., 1981. Hyperactivity induced in rats by long-term isolation: further studies on a new animal model for the detection of antidepressants. *Eur. J. Pharmacol.* 74, 287–294. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(81\)90047-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(81)90047-9)
- Geyer, M.A., Wilkinson, L.S., Humby, T., Robbins, T.W., 1993. Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 34, 361–372. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90180-L](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90180-L)
- Ghasemi, M., Navidhamidi, M., Rezaei, F., Azizikia, A., Mehranfard, N., 2021. Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 2021 223 22, 431–449. <https://doi.org/10.3758/S13415-021-00973-Y>
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P., 2006. The role of the dorsal CA3 hippocampal subregion in

- spatial working memory and pattern separation. *Behav. Brain Res.* 169, 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2006.01.002>
- Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2002. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol. Psychiatry* 7, 254–275. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4001032>
- Goldstein, D.S., McEwen, B., 2002. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress* 5, 55–58. <https://doi.org/10.1080/102538902900012345>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2010.11.006>
- Gotlib, I.H., Joormann, J., Minor, K.L., Hallmayer, J., 2008. HPA axis reactivity: a mechanism underlying the associations among 5-HTTLPR, stress, and depression. *Biol. Psychiatry* 63, 847–851. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2007.10.008>
- Greenwald, R.A., 2018. Handbook methods for oxygen radical research. *Handb. Methods Oxyg. Radic. Res.*, prvo izdanje. 1–447. <https://doi.org/10.1201/9781351072922>
- Grigoryan, G.A., Pavlova, I. V., Zaichenko, M.I., 2022. Effects of Social Isolation on the Development of Anxiety and Depression-Like Behavior in Model Experiments in Animals. *Neurosci. Behav. Physiol.* 52, 722–738. <https://doi.org/10.1007/S11055-022-01297-1>
- Groves, A., Kihara, Y., Jonnalagadda, D., Rivera, R., Kennedy, G., Mayford, M., Chun, J., 2018. A Functionally Defined In Vivo Astrocyte Population Identified by c-Fos Activation in a Mouse Model of Multiple Sclerosis Modulated by S1P Signaling: Immediate-Early Astrocytes (*ieAstrocytes*). *eNeuro* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0239-18.2018>
- Guan, A., Wang, S., Huang, A., Qiu, C., Li, Y., Li, X., Wang, J., Wang, Q., Deng, B., 2022. The role of gamma oscillations in central nervous system diseases: Mechanism and treatment. *Front. Cell. Neurosci.* 16, 962–957. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2022.962957>
- Guimarães, F.S., Del Bel, E.A., Padovan, C.M., Netto, S.M., de Almeida, R.T., 1993. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav. Brain Res.* 58, 133–139. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90098-B](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90098-B)
- Gulyás, A.I., Buzsáki, G., Freund, T.F., Hirase, H., 2006. Populations of hippocampal inhibitory neurons express different levels of cytochrome c. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2581–2594. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2006.04814.X>
- Guo, Q., Wang, D., He, X., Feng, Q., Lin, R., Xu, F., Fu, L., Luo, M., 2015. Whole-brain mapping of inputs to projection neurons and cholinergic interneurons in the dorsal striatum. *PLoS One* 10, 0123381. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123381>
- Haight, J.L., Flagel, S.B., 2014. A potential role for the paraventricular nucleus of the thalamus in mediating individual variation in Pavlovian conditioned responses. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2014.00079>
- Hampe, C.S., Mitoma, H., Manto, M., Hampe, C.S., Mitoma, H., Manto, M., 2017. GABA and Glutamate: Their Transmitter Role in the CNS and Pancreatic Islets. *GABA Glutamate - New Dev. Neurotransmission Res.*

<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.70958>

- Hannestad, J., Dellagioia, N., Bloch, M., 2011. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology* 36, 2452–2459. <https://doi.org/10.1038/NPP.2011.132>
- Hassamal, S., 2023. Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. *Front. Psychiatry* 14, 1130989. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2023.1130989>
- Hatzigelaki, E., Tsiavou, A., Gerasimou, C., Vavougiou, G.D., Spathis, A., Laskos, E., Papageorgiou, C., Douzenis, A., Christodoulou, N., Stefanis, N., Spandidos, D.A., Nikolakakis, N., Tsamakias, K., Rizos, E., 2019. Effects of olanzapine on cytokine profile and brain-derived neurotrophic factor in drug-naive subjects with first-episode psychosis. *Exp. Ther. Med.* 17, 3071–3076. <https://doi.org/10.3892/ETM.2019.7285>
- He, J., Yang, Y., Xu, H., Zhang, X., Li, X.M., 2005. Olanzapine Attenuates the Okadaic Acid-Induced Spatial Memory Impairment and Hippocampal Cell Death in Rats. *Neuropsychopharmacol.* 2005 308 30, 1511–1520. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300757>
- He, J.G., Zhou, H.Y., Wang, F., Chen, J.G., 2023. Dysfunction of Glutamatergic Synaptic Transmission in Depression: Focus on AMPA Receptor Trafficking. *Biol. Psychiatry Glob. Open Sci.* 3, 187–196. <https://doi.org/10.1016/J.BPSGOS.2022.02.007>
- He, M., Qian, K., Zhang, Y., Huang, X.F., Deng, C., Zhang, B., Gao, G., Li, J., Xie, H., Sun, T., 2021. Olanzapine-Induced Activation of Hypothalamic Astrocytes and Toll-Like Receptor-4 Signaling via Endoplasmic Reticulum Stress Were Related to Olanzapine-Induced Weight Gain. *Front. Neurosci.* 14, 589–650. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.589650/FULL>
- Health Data Apps & AI - IQVIA , n.d. URL https://www.iqvia.com/solutions/real-world-evidence/health-data-apps-and-ai?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=2023_GADSNewWebpage_sX_RWS_RS&utm_content=157265885674&utm_term=healthcare_market_insights&gad=1&gclid=CjwKCAiAmZGrBhAnEiwAo9qHiS_olOe (pristupljeno 11.27.23).
- Heidbreder, C.A., Groenewegen, H.J., 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 555–579. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
- Heinrich, L.M., Gullone, E., 2006. The clinical significance of loneliness: a literature review. *Clin. Psychol. Rev.* 26, 695–718. <https://doi.org/10.1016/J.CPR.2006.04.002>
- Heizmann, C.W., 1993. Calcium signaling in the brain. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 53, 15–23.
- Henderson, L.A., Macefield, V.G., 2021. The role of the dorsomedial and ventromedial hypothalamus in regulating behaviorally coupled and resting autonomic drive. *Handb. Clin. Neurol.* 180, 187–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00012-4>
- Hiemke, C., Bergemann, N., Clement, H.W., Conca, A., Deckert, J., Domschke, K., Eckermann, G., Egberts, K., Gerlach, M., Greiner, C., Gründer, G., Haen, E., Havemann-Reinecke, U., Hefner, G., Helmer, R., Janssen, G., Jaquenoud, E., Laux, G.,

- Messer, T., Mössner, R., Müller, M.J., Paulzen, M., Pfuhlmann, B., Riederer, P., Saria, A., Schoppek, B., Schoretsanitis, G., Schwarz, M., Gracia, M.S., Stegmann, B., Steimer, W., Stingl, J.C., Uhr, M., Ulrich, S., Unterecker, S., Waschgler, R., Zernig, G., Zurek, G., Baumann, P., 2018. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2018. *Pharmacopsychiatry* 51, 9–62. <https://doi.org/10.1055/S-0043-116492>
- Ho, Y.J., Eichendorff, J., Schwarting, R.K.W., 2002. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behav. Brain Res.* 136, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00089-X)
- Hodes, G.E., Ménard, C., Russo, S.J., 2016. Integrating Interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. *Neurobiol. Stress* 4, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2016.03.003>
- Hovatta, I., Juhila, J., Donner, J., 2010. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci. Res.* 68, 261–275. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2010.08.007>
- Hu, P., Lu, Y., Pan, B.X., Zhang, W.H., 2022. New Insights into the Pivotal Role of the Amygdala in Inflammation-Related Depression and Anxiety Disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1-20. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911076>
- Hu, Y., Zhao, C., Zhao, H., Qiao, J., 2023. Abnormal functional connectivity of the nucleus accumbens subregions mediates the association between anhedonia and major depressive disorder. *BMC Psychiatry* 23, 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12888-023-04693-0/FIGURES/5>
- Huang, X., Liu, X., Yu, Y., 2017. Depression and Chronic Liver Diseases: Are There Shared Underlying Mechanisms? *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1-11. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00134>
- Husain, M.M., McDonald, W.M., Doraiswamy, P.M., Figiel, G.S., Na, C., Escalona, R., Boyko, O.B., Nemeroff, C.B., Krishnan, R.R., 1991. A magnetic resonance imaging study of putamen nuclei in major depression. *Psychiatry Research: Neuroimaging.* 40, 95-99.
- Insausti, R., Muñoz-López, M., Insausti, A.M., 2023. The CA2 hippocampal subfield in humans: A review. *Hippocampus* 33, 712–729. <https://doi.org/10.1002/HIPO.23547>
- Inta, I., Domonkos, E., Pfeiffer, N., Sprengel, R., Bettendorf, M., Lang, U.E., Inta, D., Gass, P., 2017. Puberty marks major changes in the hippocampal and cortical c-Fos activation pattern induced by NMDA receptor antagonists. *Neuropharmacology* 112, 181–187. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.03.023>
- Isaacson, R.H., Beier, J.I., Khoo, N.K., Freeman, B.A., Freyberg, Z., Arteel, G.E., 2020. Olanzapine-induced liver injury in mice: aggravation by high-fat diet and protection with sulforaphane. *J. Nutr. Biochem.* 81, 108399. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2020.108399>
- Jackson, W.C., Manning, J.S., Connor, P.D., Deardorff, O.G., 2004. Retrospective Study of Olanzapine in Depressive and Anxious States in Primary Care. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 6, 199-202. <https://doi.org/10.4088/PCC.V06N0504>
- Jacobs, B.L., Van Praag, H., Gage, F.H., 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* 5, 262–269.

<https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4000712>

- Jeong, N., Singer, A.C., 2022. Learning from inhibition: Functional roles of hippocampal CA1 inhibition in spatial learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 76, 102604. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2022.102604>
- Johnstone, N., Cohen Kadosh, K., 2024. Excitatory and inhibitory neurochemical markers of anxiety in young females. *Dev. Cogn. Neurosci.* 66, 101363. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2024.101363>
- Kamat, J.P., 2006. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J Exp Bio* 44, 436–447.
- Kang, H.J., Voleti, B., Hajszan, T., Rajkowska, G., Stockmeier, C.A., Licznarski, P., Lepack, A., Majik, M.S., Jeong, L.S., Banasr, M., Son, H., Duman, R.S., 2012. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat. Med.* 18, 1413–1417. <https://doi.org/10.1038/NM.2886>
- Kann, O., 2016. The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. *Neurobiol. Dis.* 90, 75–85. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2015.08.005>
- Kapur, S., Vanderspek, S.C., Brownlee, B.A., Nobrega, J.N., 2003. Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 625–631. <https://doi.org/10.1124/JPET.102.046987>
- Kapur, S., Zipursky, R., Jones, C., Shammi, C.S., Remington, G., Seeman, P., 2000. A positron emission tomography study of quetiapine in schizophrenia: a preliminary finding of an antipsychotic effect with only transiently high dopamine D2 receptor occupancy. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 553–559. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.57.6.553>
- Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., Aubry, J.M., 2002. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res.* 109, 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(02\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(02)00005-7)
- Karimian, M., Famitafreshi, H., Fanaei, H., Attari, F., Fatima, S., 2015. Social isolation is associated with reduced neurogenesis, impaired spatial working memory performance, and altered anxiety levels in male rats. *Open Access Anim. Physiol.* 87-95. <https://doi.org/10.2147/OAAP.S84327>
- Karolewicz, B., MacIag, D., O'Dwyer, G., Stockmeier, C.A., Feyissa, A.M., Rajkowska, G., 2010. Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 411–420. <https://doi.org/10.1017/S1461145709990587>
- Kasper, S., Tauscher, J., Küfferle, B., Barnas, C., Pezawas, L., Quiner, S., 1999. Dopamine- and serotonin-receptors in schizophrenia: Results of imaging-studies and implications for pharmacotherapy in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249, 83-89. <https://doi.org/10.1007/PL00014189>
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/7.6.476>
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1993. Correlation of physiological subgroupings of

- nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* 70, 387–396. <https://doi.org/10.1152/JN.1993.70.1.387>
- Kempermann, G., Gage, F.H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M.A., Thuret, S., Kuhn, H.G., Jessberger, S., Frankland, P.W., Cameron, H.A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D.N., Toni, N., Schinder, A.F., Zhao, X., Lucassen, P.J., Frisén, J., 2018. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* 23, 25–30. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.04.004>
- Kim, H.T., Kim, Y.H., Nam, J. wha, Lee, H.J., Rho, H.M., Jung, G.H., 1994. Study of 5'-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 1526–1533. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1877>
- Kim, S.U., De Vellis, J., 2005. Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* 81, 302–313. <https://doi.org/10.1002/JNR.20562>
- Kirouac, G.J., 2021. The Paraventricular Nucleus of the Thalamus as an Integrating and Relay Node in the Brain Anxiety Network. *Front. Behav. Neurosci.* 15, 627–633. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2021.627633/BIBTEX>
- Kirkcaldie, M.T.K., 2011. Neocortex. *The Mouse Nervous System. The mouse nervous system, četvrto poglavlje.* 52–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369497-3.10004-4>
- Knable, M.B., Barci, B.M., Webster, M.J., Meador-Woodruff, J., Torrey, E.F., 2004. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol. Psychiatry* 9, 609–620. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4001471>
- Kobayashi, N., Shinagawa, S., Nagata, T., Shigeta, M., Kondo, K., 2022. Suppressors of Cytokine Signaling Are Decreased in Major Depressive Disorder Patients. *J. Pers. Med.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.3390/JPM12071040>
- Koenigs, M., Grafman, J., 2009. The functional neuroanatomy of depression: Distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 201, 239–243. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2009.03.004>
- Koh, M.T., Haberman, R.P., Foti, S., McCown, T.J., Gallagher, M., 2010. Treatment strategies targeting excess hippocampal activity benefit aged rats with cognitive impairment. *Neuropsychopharmacology* 35, 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.207>
- Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A.J., Jung, H.Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I.R., Tonegawa, S., 2014. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat. Neurosci.* 17, 269–279. <https://doi.org/10.1038/NN.3614>
- Kohn, M.L., Clausen, J.A., 1955. Social Isolation and Schizophrenia. *Am. Sociol. Rev.* 20, 265–273. <https://doi.org/10.2307/2087384>
- Konradi, C., Zimmerman, E.I., Yang, C.K., Lohmann, K.M., Gresch, P., Pantazopoulos, H., Berretta, S., Heckers, S., 2011. Hippocampal interneurons in bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 340–350. <https://doi.org/10.1001/ARCHGENPSYCHIATRY.2010.175>
- Korpi, E.R., Sinkkonen, S.T., 2006. GABA(A) receptor subtypes as targets for

- neuropsychiatric drug development. *Pharmacol. Ther.* 109, 12–32. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2005.05.009>
- Kovačević, I., Pokrajac, M., Miljković, B., Jovanović, D., Prostran, M., 2006. Comparison of liquid chromatography with fluorescence detection to liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 830, 372–376. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2005.11.034>
- Kovács, K.J., 2008. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J. Neuroendocrinol.* 20, 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>
- Krishnan, K.R.R., McDonald, W.M., Escalona, P.R., Doraiswamy, P.M., Na, C., Husain, M.M., Figiel, G.S., Boyko, O.B., Ellinwood, E.H., Nemeroff, C.B., 1992. Magnetic resonance imaging of the caudate nuclei in depression. Preliminary observations. *Arch. Gen. Psychiatry* 49, 553–557. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.1992.01820070047007>
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894–902. <https://doi.org/10.1038/NATURE07455>
- Kverno, K.S., Mangano, E., 2021. Treatment-Resistant Depression: Approaches to Treatment. *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.* 59, 7–11. <https://doi.org/10.3928/02793695-20210816-01>
- Lamigeon, C., Bellier, J.P., Sacchettoni, S., Rujano, M., Jacquemont, B., 2001. Enhanced neuronal protection from oxidative stress by coculture with glutamic acid decarboxylase-expressing astrocytes. *J. Neurochem.* 77, 598–606. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2001.00278.X>
- Lang, U.E., Borgwardt, S., 2013. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cell. Physiol. Biochem.* 31, 761–777. <https://doi.org/10.1159/000350094>
- Larrey, D., Ripault, M.P., 2013. Hepatotoxicity of Psychotropic Drugs and Drugs of Abuse. *Drug-Induced Liver Dis*, treće izdanje, poglavlje 25, 443–462. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387817-5.00025-X>
- Lépine, J.P., Briley, M., 2011. The increasing burden of depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 7, 3–7. <https://doi.org/10.2147/NDT.S19617>
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Levone, B.R., Codagnone, M.G., Moloney, G.M., Nolan, Y.M., Cryan, J.F., O' Leary, O.F., 2021. Adult-born neurons from the dorsal, intermediate, and ventral regions of the longitudinal axis of the hippocampus exhibit differential sensitivity to glucocorticoids. *Mol. Psychiatry* 26, 3240–3252. <https://doi.org/10.1038/S41380-020-0848-8>
- Li, H., Peng, S., Li, S., Liu, S., Lv, Y., Yang, N., Yu, L., Deng, Y.H., Zhang, Z., Fang, M., Huo, Y., Chen, Y., Sun, T., Li, W., 2019. Chronic olanzapine administration causes metabolic syndrome through inflammatory cytokines in rodent models of insulin resistance. *Sci. Rep.* 9, 1-12. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-36930-Y>
- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W., Feng, Y., 2015. The Role of

- Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26087-26124. <https://doi.org/10.3390/IJMS161125942>
- Li, X.M., Chlan-Fourney, J., Juorio, A. V., Bennett, V.L., Shrikhande, S., Keegan, D.L., Qi, J., Boulton, A.A., 1999. Differential effects of olanzapine on the gene expression of superoxide dismutase and the low affinity nerve growth factor receptor. *J. Neurosci. Res.* 56, 72–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990401\)56:1<72::AID-JNR9>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990401)56:1<72::AID-JNR9>3.0.CO;2-0)
- Licznerski, P., Jonas, E.A., 2018. BDNF signaling: Harnessing stress to battle mood disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3742–3744. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1803645115>
- Lieberman, J.A., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Keefe, R.S.E., Davis, S.M., Davis, C.E., Lebowitz, B.D., Severe, J., Hsiao, J.K., 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* 353, 1209–1223. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA051688>
- Liemburg, E.J., Knegtering, H., Klein, H.C., KorteKaas, R., Aleman, A., 2012. Antipsychotic medication and prefrontal cortex activation: A review of neuroimaging findings. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 22, 387–400. <https://doi.org/10.1016/J.EURONEURO.2011.12.008>
- Linser, P., Moscona, A.A., 1982. Cell interactions in embryonic neural retina: role in hormonal induction of glutamine synthetase. *Mol. Approaches to Neurobiol.* 179–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-137020-6.50012-2>
- Liu, L., Miao, M., Chen, Y., Wang, Z., Sun, B., Liu, X., 2018. Altered Function and Expression of ABC Transporters at the Blood–Brain Barrier and Increased Brain Distribution of Phenobarbital in Acute Liver Failure Mice. *Front. Pharmacol.* 9, 1-13. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00190>
- Liu, S.H., Wang, J., Zhu, D.Y., Fu, Y.P., Lukowiak, K., Lu, Y.M., 2003. Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 23, 732–736. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-03-00732.2003>
- Liu, X., Liu, R., Sun, Y.X., Wang, H.L., Wang, H., Wang, T., Ma, Y.N., Li, X.X., Wang, Q., Su, Y.A., Li, J.T., Si, T.M., 2024. Dorsal CA3 overactivation mediates witnessing stress-induced recognition memory deficits in adolescent male mice. *Neuropsychopharmacol.* 2024 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41386-024-01848-9>
- Locchi, F., Dall’Olio, R., Gandolfi, O., Rimondini, R., 2008. Olanzapine counteracts stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Neurosci. Lett.* 438, 146–149. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2008.04.017>
- Lorente de Nò, R., 1934. Studies on the Structure of the Cerebral Cortex II. *J. für Psychol. und Neurol.* 46, 113–177.
- Lowry, C.A., Hale, M.W., 2010. Serotonin and the Neurobiology of Anxious States. *Handb. Behav. Neurosci.* 21, 379–397. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70091-6](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70091-6)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry.* *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, C., Zhu, X., Feng, Y., Ao, W., Li, J., Gao, Z., Luo, H., Chen, M., Cai, F., Zhan, S., Li, H.,

- Sun, W., Hu, J., 2023. Atypical antipsychotics antagonize GABA_A receptors in the ventral tegmental area GABA neurons to relieve psychotic behaviors. *Mol. Psychiatry* 28, 2107–2121. <https://doi.org/10.1038/S41380-023-01982-8>
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Thompson, J.A., 1998. Peroxynitrite-Mediated Inactivation of Manganese Superoxide Dismutase Involves Nitration and Oxidation of Critical Tyrosine Residues†. *Biochemistry* 37, 1613–1622. <https://doi.org/10.1021/BI971894B>
- Maddock, R.J., 1999. The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci.* 22, 310–316. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01374-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01374-5)
- Maes, M., 2008. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *Neuro Endocrinol. Lett.* 29, 287–291.
- Maes, M., Bosmans, E., Calabrese, J., Smith, R., Meltzer, H.Y., 1995. Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. *J. Psychiatr. Res.* 29, 141–152. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(94\)00049-W](https://doi.org/10.1016/0022-3956(94)00049-W)
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., Gris, D., 2019. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells* 8, 1–27. <https://doi.org/10.3390/cells8020184>
- Malberg, J.E., 2004. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 196–205.
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M.R., Su, Y.A., Rennert, O.M., Chrousos, G.P., 2007. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 190–198. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2007.04.004>
- Mari, M., Colell, A., Morales, A., Von Montfort, C., Garcia-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C., 2010. Redox Control of Liver Function in Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1295–1334. <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2634>
- Martin, D.L., Rinvall, K., 1993. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60, 395–407. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1993.TB03165.X>
- Martins, M.R., Petronilho, F.C., Gomes, K.M., Dal-Pizzol, F., Streck, E.L., Quevedo, J., 2008. Antipsychotic-induced oxidative stress in rat brain. *Neurotox. Res.* 13, 63–69. <https://doi.org/10.1007/BF03033368/METRICS>
- Marx, C.E., Duncan, G.E., Gilmore, J.H., Lieberman, J.A., Morrow, A.L., 2000. Olanzapine increases allopregnanolone in the rat cerebral cortex. *Biol. Psychiatry* 47, 1000–1004. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00305-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00305-4)
- Matthews, T., Danese, A., Wertz, J., Odgers, C.L., Ambler, A., Moffitt, T.E., Arseneault, L., 2016. Social isolation, loneliness and depression in young adulthood: a behavioural genetic analysis. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* 51, 339–348. <https://doi.org/10.1007/S00127-016-1178-7>
- Mattis, P.J., Rabinovitz, B.B., 2014. Corpus Striatum. *Encycl. Neurol. Sci.*, drugo izdanje. 869–871. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.01138-6>

- Mauri, M.C., Steinhilber, C.P.C., Marino, R., Invernizzi, E., Fiorentini, A., Cerveri, G., Baldi, M.L., Barale, F., 2005. Clinical outcome and olanzapine plasma levels in acute schizophrenia. *Eur. Psychiatry* 20, 55–60. <https://doi.org/10.1016/J.EURPSY.2004.09.009>
- Mayberg, H.S., 2003. Positron emission tomography imaging in depression: a neural systems perspective. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 13, 805-815. [https://doi.org/10.1016/s1052-5149\(03\)00104-7](https://doi.org/10.1016/s1052-5149(03)00104-7)
- McEwen, B.S., Gianaros, P.J., 2010. Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1186, 190-222. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2009.05331.X>
- McEwen, B.S., Seeman, T., 1999. Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 896, 30–47. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1999.TB08103.X>
- McIntosh, L.J., Hong, K.E., Sapolsky, R.M., 1998. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res.* 791, 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00115-2)
- McKinney, W.T., Bunney, W.E., 1969. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch. Gen. Psychiatry* 21, 240–248. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.1969.01740200112015>
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P.L., 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 6–18. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2012.10.032>
- Menke, A., 2024. The HPA Axis as Target for Depression. *Curr. Neuropharmacol.* 22, 904–915. <https://doi.org/10.2174/1570159X21666230811141557>
- Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P.A., 1993. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12, 2005-2015. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1993.TB05850.X>
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., Okuno, H., 2016. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078>
- Mitchell, A.S., Czajkowski, R., Zhang, N., Jeffery, K., Nelson, A.J.D., 2018. Retrosplenial cortex and its role in spatial cognition. *Brain Neurosci. Adv.* 2, 1-13. <https://doi.org/10.1177/2398212818757098>
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126-1168. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.5149>
- Möhler, H., 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62, 42–53. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2011.08.040>
- Moica, T., Gligor, A., Moica, S., 2016. The Relationship between Cortisol and the Hippocampal Volume in Depressed Patients – A MRI Pilot Study. *Procedia Technol.* 22, 1106–1112. <https://doi.org/10.1016/J.PROTCY.2016.01.156>

- Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, N.P., Olivera-Lopez, J.I., Jaramillo, M.T., 2009. Olanzapine plus 17- β estradiol produce antidepressant-like actions in rats forced to swim. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93, 491–497. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2009.06.015>
- Möller, M., Du Preez, J.L., Viljoen, F.P., Berk, M., Emsley, R., Harvey, B.H., 2013. Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. *Brain. Behav. Immun.* 30, 156–167. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2012.12.011>
- Monko, M.E., Heilbronner, S.R., 2021. Retrosplenial Cortical Connectivity with Frontal Basal Ganglia Networks. *J. Cogn. Neurosci.* 33, 1096–1105. https://doi.org/10.1162/JOCN_A_01699
- Moret, C., Briley, M., 2011. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 7, 9-13. <https://doi.org/10.2147/NDT.S19619>
- Moriguchi, S., Yamada, M., Takano, H., Nagashima, T., Takahata, K., Yokokawa, K., Ito, T., Ishii, T., Kimura, Y., Zhang, M.R., Mimura, M., Suhara, T., 2017. Norepinephrine transporter in major depressive disorder: A PET study. *Am. J. Psychiatry* 174, 36–41. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2016.15101334/ASSET/IMAGES/LARGE/APPI.AJP.2016.15101334F1.JPEG>
- Mortezaee, K., 2018. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) and liver fibrosis: A review. *Cell Biochem. Funct.* 36, 292–302. <https://doi.org/10.1002/CBF.3351>
- Muir, D., CompstonDA, 1996. Growth factor stimulation triggers apoptotic cell death in mature oligodendrocytes - PubMed. *J Neurosci Res* 44, 1–11. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960401\)44:1<1::AID-JNR1>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960401)44:1<1::AID-JNR1>3.0.CO;2-L)
- Müller, N., Empl, M., Riedel, M., Schwarz, M., Ackenheil, M., 1997. Neuroleptic treatment increases soluble IL-2 receptors and decreases soluble IL-6 receptors in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 247, 308–313. <https://doi.org/10.1007/BF02922260>
- Murínová, J., Hlaváčová, N., Chmelová, M., Riečanský, I., 2017. The evidence for altered BDNF expression in the brain of rats reared or housed in social isolation: A systematic review. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00101>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00653-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00653-0)
- Noeman, S.A., Hamooda, H.E., Baalash, A.A., 2011. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* 3. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>
- Nuninga, J.O., Mandl, R.C.W., Boks, M.P., Bakker, S., Somers, M., Heringa, S.M., Nieuwdorp, W., Hoogduin, H., Kahn, R.S., Luijten, P., Sommer, I.E.C., 2020. Volume increase in the dentate gyrus after electroconvulsive therapy in depressed patients as measured with 7T. *Mol. Psychiatry* 25, 1559–1568. <https://doi.org/10.1038/S41380-019-0392-6>
- Nutt, D.J., Forshall, S., Bell, C., Rich, A., Sandford, J., Nash, J., Argyropoulos, S., 1999.

- Mechanisms of action of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of psychiatric disorders. *ENP* 9, 581-586. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(99\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(99)00030-9)
- Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276, 38388–38393. <https://doi.org/10.1074/JBC.M105395200>
- Olanzapin - Vikipedija. Dostupno na sajtu <https://sr.wikipedia.org/sr/Olanzapin>
- Olbrich, H.G., Braak, H., 1985. Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat. Embryol. (Berl)*. 173, 105–110. <https://doi.org/10.1007/BF00707308>
- Orsetti, M., Colella, L., Dellarole, A., Luigi Canonico, P., Ghi, P., 2007. Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 10, 345–357. <https://doi.org/10.1017/S1461145706006705>
- Oxenkrug, G.F., 2007. Genetic and hormonal regulation of tryptophan kynurenine metabolism: implications for vascular cognitive impairment, major depressive disorder, and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1122, 35–49. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1403.003>
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00029.2006>
- Padilla-Coreano, N., Bolkan, S.S., Pierce, G.M., Blackman, D.R., Hardin, W.D., Garcia-Garcia, A.L., Spellman, T.J., Gordon, J.A., 2016. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron* 89, 857–866. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.01.011>
- Padurariu, M., Ciobica, A., Hritcu, L., Stoica, B., Bild, W., Stefanescu, C., 2010. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 469, 6–10. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2009.11.033>
- Pariante, C.M., 2003. Depression, stress and the adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.* 15, 811–812. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2826.2003.01058.X>
- Pariante, C.M., Miller, A.H., 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: Relevance to pathophysiology and treatment. *Biol. Psychiatry* 49, 391–404. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01088-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01088-X)
- Parikh, V., Khan, M.M., Mahadik, S.P., 2003. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 37, 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(02\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(02)00048-1)
- Park, B., Yoo, Y., Kim, R., Jang, Y., Lee, J., TH, K., Lee, Y., JH, H., Kim, I., Hwang, H., Tae, H., Yoon, J., Shin, H., Kim, S., 2023. The Effect of Olanzapine through Antioxidant and Anti-Inflammation on the Hippocampus in the Asphyxial Cardiac Arrest Rat Model. *Eur. PMC*,1-20. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-3145323/V1>
- Park, H., Poo, M.M., 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. <https://doi.org/10.1038/NRN3379>

- Park, S.W., Lee, C.H., Lee, J.G., Kim, L.W., Shin, B.S., Lee, B.J., Kim, Y.H., 2011. Protective effects of atypical antipsychotic drugs against MPP⁺-induced oxidative stress in PC12 cells. *Neurosci. Res.* 69, 283–290. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2011.01.004>
- Part:BBa K3633009 - parts.igem.org. Dostupno na: https://parts.igem.org/Part:BBa_K3633009
- Paul, I.A., Skolnick, P., 2003. Glutamate and Depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003, 250–272. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1300.016>
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sci. Res. Publ.
- Pehrson, A.L., Sanchez, C., 2015. Altered γ -aminobutyric acid neurotransmission in major depressive disorder: a critical review of the supporting evidence and the influence of serotonergic antidepressants. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 603–624. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S62912>
- Perić, I., Stanisavljević, A., Gass, P., Filipović, D., 2017. Fluoxetine reverses behavior changes in socially isolated rats: role of the hippocampal GSH-dependent defense system and proinflammatory cytokines. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 267, 737–749. <https://doi.org/10.1007/S00406-017-0807-9>
- Perić, I., Stanisavljević, A., Inta, D., Gass, P., Undine E., L., Borgwardt, S., Filipović, D., 2019. Tianeptine antagonizes the reduction of PV⁺ and GAD67 cells number in dorsal hippocampus of socially isolated rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 89, 386–399. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2018.10.013>
- Perlman, G., Tanti, A., Mechawar, N., 2021. Parvalbumin interneuron alterations in stress-related mood disorders: A systematic review. *Neurobiol. Stress* 15, 1–42. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2021.100380>
- Perry, J.J.P., Shin, D.S., Getzoff, E.D., Tainer, J.A., 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 245–262. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2009.11.004>
- Perry, P.J., Sanger, T., Beasley, C., 1997. Olanzapine plasma concentrations and clinical response in acutely ill schizophrenic patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* 17, 472–477. <https://doi.org/10.1097/00004714-199712000-00006>
- Petroff, O.A.C., 2002. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist.* 8, 562–573. <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.D., Remacle, J., 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 51, 283–297. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(90\)90078-T](https://doi.org/10.1016/0047-6374(90)90078-T)
- Pinal, C., Tobin, A., 1998. Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol* 5, 109–118.
- Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., Ylinen, A., 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 911, 369–391. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB06738.X>

- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379–391. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8)
- Price, J.L., Drevets, W.C., 2010. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 192–216. <https://doi.org/10.1038/NPP.2009.104>
- Price, R.B., Shungu, D.C., Mao, X., Nestadt, P., Kelly, C., Collins, K.A., Murrrough, J.W., Charney, D.S., Mathew, S.J., 2009. Amino acid neurotransmitters assessed by proton magnetic resonance spectroscopy: relationship to treatment resistance in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry* 65, 792–800. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2008.10.025>
- Qiao, H., An, S.C., Ren, W., Ma, X.M., 2014. Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression. *Behav. Brain Res.* 275, 191–200. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2014.08.040>
- Rajkowska, G., O'Dwyer, G., Teleki, Z., Stockmeier, C.A., Miguel-Hidalgo, J.J., 2006. GABAergic Neurons Immunoreactive for Calcium Binding Proteins are Reduced in the Prefrontal Cortex in Major Depression. *Neuropsychopharmacol.* 2007 322 32, 471–482. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301234>
- Reyna, L.A., Iván, P.N., Camilo, R., Alfonso, M.B., Erick, M., Norman, M., Araceli, D.R., 2023. Evaluation of the antioxidant effect of olanzapine in combination with N Acetyl Cysteine in a mouse model of schizophrenia induced by MK-801. *Arch. Neurociencias* 28, 7–14. <https://doi.org/10.31157/AN.V28I3.399>
- Reynolds, G.P., Kirk, S.L., 2010. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment – pharmacological mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 125, 169–179. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2009.10.010>
- Rezin, G.T., Cardoso, M.R., Gonçalves, 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. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2008.09.012>
- Roddy, D.W., Farrell, C., Doolin, K., Roman, E., Tozzi, L., Frodl, T., O'Keane, V., O'Hanlon, E., 2019. The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. *Biol. Psychiatry* 85, 487–497. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2018.08.021>
- Rogers, J.H., Résibois, A., 1992. Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 51, 843–865. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90525-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90525-7)
- Rogóz, Z., Skuza, G., 2011. Anxiolytic-like effects of olanzapine, risperidone and fluoxetine in the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacol. Reports* 63, 1547–1552. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70719-8/METRICS](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70719-8/METRICS)
- Rossetti, A.C., Paladini, M.S., Brüning, C.A., Spero, V., Cattaneo, M.G., Racagni, G., Papp, M., Riva, M.A., Molteni, R., 2022. Involvement of the IL-6 Signaling Pathway in the Anti-Anhedonic Effect of the Antidepressant Agomelatine in the Chronic Mild Stress Model of Depression. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1-15. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012453>
- Rossetti, A.C., Serena Paladini, M., Colombo, M., Gruca, P., Lason-Tyburkiewicz, M., Tota-

- Glowczyk, K., Papp, M., Riva, M.A., Molteni, R., 2018. Chronic Stress Exposure Reduces Parvalbumin Expression in the Rat Hippocampus through an Imbalance of Redox Mechanisms: Restorative Effect of the Antipsychotic Lurasidone. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 883–893. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYY046>
- Rowlett, J.K., Platt, D.M., Lelas, S., Atack, J.R., Dawson, G.R., 2005. Different GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine-like drugs in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 915–920. https://doi.org/10.1073/PNAS.0405621102/SUPPL_FILE/05621FIG8.JPG
- Russo, S.J., Nestler, E.J., 2013. The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 609–625. <https://doi.org/10.1038/NRN3381>
- Sabade, S.B., Babanrao Gagare, D., Vikhe, B.B., Marotrao Bhalerao, M., 2022. Indian Journal of Clinical Anatomy and Physiology Study of serum catalase in depression at Pravara institute of medical sciences. *Indian J. Clin. Anat. Physiol.* 9, 279–282. <https://doi.org/10.18231/j.ijcap.2022.058>
- Sahay, A., Drew, M.R., Hen, R., 2007. Dentate gyrus neurogenesis and depression. *Prog. Brain Res.* 163, 697–822. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63038-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63038-6)
- Sahay, A., Hen, R., 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.* 2007 109 10, 1110–1115. <https://doi.org/10.1038/nn1969>
- Sajdyk, T.J., Johnson, P.L., Fitz, S.D., Shekhar, A., 2008. Chronic inhibition of GABA synthesis in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis elicits anxiety-like behavior: Chronic GABA inhibition in BNST and anxiety. *J. Psychopharmacol.* 22, 633–641. <https://doi.org/10.1177/0269881107082902>
- Sakai, K., GAO, X.M., Tamminga, C.A., 2001. Traditional and new antipsychotic drugs differentially alter neurotransmission markers in basal ganglia-thalamocortical neural pathways. *Synapse* 39, 152–160. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(200102\)39:2<152::AID-SYN6>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1098-2396(200102)39:2<152::AID-SYN6>3.0.CO;2-F)
- Sakurai, K., 2023. Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain. *J. Biochem.* 175, 377–381. <https://doi.org/10.1093/JB/MVAD110>
- San Antonio, A., Liban, K., Ikrar, T., Tsyganovskiy, E., Xu, X., 2014. Distinct physiological and developmental properties of hippocampal CA2 subfield revealed by using anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4) immunostaining. *J. Comp. Neurol.* 522, 1333–1354. <https://doi.org/10.1002/CNE.23486>
- Sarawagi, A., Soni, N.D., Patel, A.B., 2021. Glutamate and GABA Homeostasis and Neurometabolism in Major Depressive Disorder. *Front. psychiatry* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2021.637863>
- Schildkraut, J.J., 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry* 122, 509–522. <https://doi.org/10.1176/AJP.122.5.509>
- Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., McKenna, M.C., 2014. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv. Neurobiol.* 11, 13–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08894-5_2
- Schwaller, B., Meyer, M., Schiffmann, S., 2002. “New” functions for “old” proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in

- cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* 1, 241–258. <https://doi.org/10.1080/147342202320883551>
- Segi-Nishida, E., Suzuki, K., 2022. Regulation of adult-born and mature neurons in stress response and antidepressant action in the dentate gyrus of the hippocampus. *Neurosci. Res.* 360, 201–205. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2022.08.010>
- Serretti, A., 2023. Anhedonia and Depressive Disorders. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 21, 401–409. <https://doi.org/10.9758/CPN.23.1086>
- Shen, H., Ge, L., Cao, B., Wei, G.X., Zhang, X., 2023. The contribution of the cingulate cortex: treating depressive symptoms in first-episode drug naïve schizophrenia. *Int. J. Clin. Heal. Psychol.* 23, 1-7. <https://doi.org/10.1016/J.IJCHP.2023.100372>
- Shishkina, G.T., Dygalo, N.N., 2017. The glucocorticoid hypothesis of depression: History and prospects. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 7, 128–133. <https://doi.org/10.1134/S2079059717010142/METRICS>
- Sibille, E., Wang, Y., Joeyen-Waldorf, J., Gaiteri, C., Surget, A., Oh, S., Belzung, C., Tseng, G.C., Lewis, D.A., 2009. A Molecular Signature of Depression in the Amygdala. *Am. J. Psychiatry* 166, 1011-1024. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2009.08121760>
- Sigel, E., Ernst, M., 2018. The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 659–671. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2018.03.006>
- Sigurdsson, T., Duvarci, S., 2016. Hippocampal-prefrontal interactions in cognition, behavior and psychiatric disease. *Front. Syst. Neurosci.* 9, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00190>
- Smith, A.S., Williams Avram, S.K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., Young, W.S., 2016. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol. Psychiatry* 21, 1137–1144. <https://doi.org/10.1038/MP.2015.189>
- Soghomonian, J.J., Martin, D.L., 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 500–505. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01270-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01270-X)
- Squadrito, G.L., Pryor, W.A., 1995. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem. Biol. Interact.* 96, 203–206. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)03591-U](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)03591-U)
- Stanisavljević, A., Perić, I., Bernardi, R.E., Gass, P., Filipović, D., 2019a. Clozapine increased c-Fos protein expression in several brain subregions of socially isolated rats. *Brain Res. Bull.* 152, 35–44. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2019.07.005>
- Stanisavljević, A., Perić, I., Gass, P., Inta, D., Lang, U.E., Borgwardt, S., Filipović, D., 2020. Fluoxetine modulates neuronal activity in stress-related limbic areas of adult rats subjected to the chronic social isolation. *Brain Res. Bull.* 163, 95–108. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2020.07.021>
- Stanisavljević, A., Perić, I., Gass, P., Inta, D., Lang, U.E., Borgwardt, S., Filipović, D., 2019b. Brain Sub/Region-Specific Effects of Olanzapine on c-Fos Expression of Chronically Socially Isolated Rats. *Neuroscience* 396, 46–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.015>
- Stanisavljević, A., Perić, I., Pantelić, M., Filipović, D.M., 2017. Olanzapine alleviates oxidative stress in the liver of socially isolated rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95, 634–

640. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0598>

- Stanisavljević Ilić, A., Đorđević, S., Inta, D., Borgwardt, S., Filipović, D., 2023. Olanzapine Effects on Parvalbumin/GAD67 Cell Numbers in Layers/Subregions of Dorsal Hippocampus of Chronically Socially Isolated Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms242417181>
- Stauch, K.L., Purnell, P.R., Fox, H.S., 2014. Quantitative Proteomics of Synaptic and Nonsynaptic Mitochondria: Insights for Synaptic Mitochondrial Vulnerability. *J. Proteome Res.* 13, 2620-2636. <https://doi.org/10.1021/PR500295N>
- Steckler, T., Holsboer, F., Reul, J.M.H.M., 1999. Glucocorticoids and depression. *Baillieres. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 13, 597-614. <https://doi.org/10.1053/BEEM.1999.0046>
- Stellet, P., Cabungcal, J.H., Coyle, J., Didriksen, M., Gill, K., Grace, A.A., Hensch, T.K., Lamantia, A.S., Lindemann, L., Maynard, T.M., Meyer, U., Morishita, H., O'Donnell, P., Puhl, M., Cuenod, M., Do, K.Q., 2017. Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 22, 936-943. <https://doi.org/10.1038/MP.2017.47>
- Stone, S.S.D., Teixeira, C.M., de Vito, L.M., Zaslavsky, K., Josselyn, S.A., Lozano, A.M., Frankland, P.W., 2011. Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *J. Neurosci.* 31, 13469-13484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3100-11.2011>
- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., Moser, E.I., 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014 1510 15, 655-669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Sugino, H., Futamura, T., Mitsumoto, Y., Maeda, K., Marunaka, Y., 2009. Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 33, 303-307. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2008.12.006>
- Sumner, B.E.H., Cruise, L.A., Slattery, D.A., Hill, D.R., Shahid, M., Henry, B., 2004. Testing the validity of c-fos expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs. *Psychopharmacology (Berl.)* 171, 306-321. <https://doi.org/10.1007/S00213-003-1579-7>
- Sumner, R.L., McMillan, R.L., Forsyth, A., Muthukumaraswamy, S.D., Shaw, A.D., 2024. Neurophysiological evidence that frontoparietal connectivity and GABA-A receptor changes underpin the antidepressant response to ketamine. *Transl. Psychiatry* 2024 141 14, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02738-w>
- Sun, D., Mei, L., Xiong, W.C., 2023. Dorsal Dentate Gyrus, a Key Regulator for Mood and Psychiatric Disorders. *Biol. Psychiatry* 93, 1071-1080. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2023.01.005>
- Sun, T., He, W., Hu, G., Li, M., 2010. Anxiolytic-like property of risperidone and olanzapine as examined in multiple measures of fear in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 298-307. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2010.02.005>
- Suomalainen, A., Ciafaloni, E., Koga, Y., Peltonen, L., DiMauro, S., Schon, E.A., 1992. Use of single strand conformation polymorphism analysis to detect point mutations in human

- mitochondrial DNA. *J. Neurol. Sci.* 111, 222–226. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(92\)90074-U](https://doi.org/10.1016/0022-510X(92)90074-U)
- Suzuki, A., Hara, H., Kimura, H., 2023. Role of the AMPA receptor in antidepressant effects of ketamine and potential of AMPA receptor potentiators as a novel antidepressant. *Neuropharmacology* 222, 1-11. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2022.109308>
- Tae, H.J., Park, S.M., Cho, Jeong Hwi, Kim, I.H., Hyeon Ahn, J., Park, J.H., Won, M.H., Chen, B.H., Shin, B.N., Shin, M.C., Lee, C.H., Hong, S., Lee, J.C., Cho, Jun Hwi, 2016. Differential activation of c-Fos in the paraventricular nuclei of the hypothalamus and thalamus following myocardial infarction in rats. *Mol. Med. Rep.* 14, 3503-3508. <https://doi.org/10.3892/MMR.2016.5731>
- Tafet, G.E., Toister-Achituv, M., Shinitzky, M., 2001. Enhancement of serotonin uptake by cortisol: a possible link between stress and depression. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 1, 96–104. <https://doi.org/10.3758/CABN.1.1.96>
- Tang, W., Liu, H., Chen, L., Zhao, K., Zhang, Y., Zheng, K., Zhu, C., Zheng, T., Liu, J., Wang, D., Yu, L., Fang, X., Zhang, C., Su, K.P., 2021. Inflammatory cytokines, complement factor H and anhedonia in drug-naïve major depressive disorder. *Brain. Behav. Immun.* 95, 238–244. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2021.03.022>
- Tarricone, I., Casoria, M., Gozzi, B.F., Grieco, D., Menchetti, M., Serretti, A., Ujkaj, M., Pastorelli, F., Berardi, D., 2006. Metabolic risk factor profile associated with use of second generation antipsychotics: A cross sectional study in a community mental health centre. *BMC Psychiatry* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-6-11/TABLES/4>
- The Hippocampal Slice – Introduction to Neuroscience [WWW Document], n.d. URL Dostupno na: <https://uen.pressbooks.pub/introneuro/chapter/the-hippocampal-slice>
- The Use of Tryptophan to Treat Depression - Institute of Neuro Innovation. Dostupno na: <https://inifoundation.org/neuroscience-anthology-1/2018/7/30/the-use-of-tryptophan-to-treat-depression>
- Ting, E.Y.C., Yang, A.C., Tsai, S.J., 2020. Role of Interleukin-6 in Depressive Disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1-22. <https://doi.org/10.3390/IJMS21062194>
- Todorović, N., Filipović, D., 2017. Prefrontal cortical glutathione-dependent defense and proinflammatory mediators in chronically isolated rats: Modulation by fluoxetine or clozapine. *Neuroscience* 355, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.044>
- Todorović, N., Tomanović, N., Gass, P., Filipović, D., 2016. Olanzapine modulation of hepatic oxidative stress and inflammation in socially isolated rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 81, 94–102. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2015.10.010>
- Torrey, E.F., Barci, B.M., Webster, M.J., Bartko, J.J., Meador-Woodruff, J.H., Knable, M.B., 2005. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol. Psychiatry* 57, 252–260. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2004.10.019>
- Torrico, T.J., Munakomi, S., 2023. *Neuroanatomy, Thalamus*. StatPearls Publishing LLC.
- Travica, N., Ried, K., Sali, A., Scholey, A., Hudson, I., Pipingas, A., 2017. Vitamin C Status and Cognitive Function: A Systematic Review. *Nutrients* 9, 1–21. <https://doi.org/10.3390/NU9090960>

- Travis, S., Coupland, N.J., Silversone, P.H., Huang, Y., Fujiwara, E., Carter, R., Seres, P., Malykhin, N. V., 2015. Dentate gyrus volume and memory performance in major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 172, 159–164. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2014.09.048>
- Tsai, M.C., Huang, T.L., 2016. Increased activities of both superoxide dismutase and catalase were indicators of acute depressive episodes in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 235, 38–42. <https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2015.12.005>
- Tu, Y.C., Huang, D.Y., Shiah, S.G., Wang, J.S., Lin, W.W., 2013. Regulation of c-Fos Gene Expression by NF- κ B: A p65 Homodimer Binding Site in Mouse Embryonic Fibroblasts but Not Human HEK293 Cells. *PLoS One* 8, 1-14. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084062>
- Tzakis, N., Holahan, M.R., 2019. Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 1-15. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2019.00233>
- UNICEF Srbija, Mentalno zdravlje i blagostanje, Dostupno na: <https://www.unicef.org/serbia/mentalno-zdravlje-i-blagostanje>
- Urichuk, L., Prior, T., Dursun, S., Baker, G., 2008. Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Curr. Drug Metab.* 9, 410–418. <https://doi.org/10.2174/138920008784746373>
- Vaden, R.J., Gonzalez, J.C., Tsai, M.C., Niver, A.J., Fusilier, A.R., Griffith, C.M., Kramer, R.H., Wadiche, J.I., Overstreet-Wadiche, L., 2020. Parvalbumin interneurons provide spillover to newborn and mature dentate granule cells. *Elife* 9, 1–23. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.54125>
- Vann, S.D., Nelson, A.J.D., 2015. The mammillary bodies and memory: more than a hippocampal relay. *Prog. Brain Res.* 2015, 219,163-185. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.03.006>
- Vallières, L., Campbell, I.L., Gage, F.H., Sawchenko, P.E., 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of Interleukin-6. *J. Neurosci.* 22, 486-492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-02-00486.2002>
- Vecera, C.M., Courtes, A., Jones, G., Soares, J.C., Machado-Vieira, R., 2023. Pharmacotherapies Targeting GABA-Glutamate Neurotransmission for Treatment-Resistant Depression. *Pharm.* 2023, 16, 1572. <https://doi.org/10.3390/PH16111572>
- Vegas-Suárez, S., Simón, J., Martínez-Chantar, M.L., Moratalla, R., 2022. Metabolic Diffusion in Neuropathologies: The Relevance of Brain-Liver Axis. *Front. Physiol.* 13, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.864263>
- Vermetten, E., Vythilingam, M., Southwick, S.M., Charney, D.S., Bremner, J.D., 2003. Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 54, 693–702. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00634-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00634-6)
- Waagepetersen, H.S., Sonnewald, U., Schousboe, A., 1999. The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J. Neurochem.* 73, 1335–1342. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1999.0731335.X>
- Wang, D., Fawcett, J., 2012. The perineurial net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 349, 147-160. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1375-y>

- Wang, K., 2014. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis.* 5, 1-10. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2013.499>
- Wang, P., Si, T., 2013. Use of antipsychotics in the treatment of depressive disorders. *Shanghai Arch. Psychiatry* 25, 134-140. <https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1002-0829.2013.03.002>
- Wei, Z., Bai, O., Richardson, J.S., Mousseau, D.D., Li, X.M., 2003. Olanzapine protects PC12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J. Neurosci. Res.* 73, 364–368. <https://doi.org/10.1002/JNR.10668>
- Weidenfeld, J., Ovadia, H., Weidenfeld, J., Ovadia, H., 2017. The Role of the Amygdala in Regulating the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Amygdala - Where Emot. Shape Perception, Learn. Memories.* <https://doi.org/10.5772/67828>
- Weigmann, H., Härtter, S., Maehrlein, S., Kiefer, W., Krämer, G., Dannhardt, G., Hiemke, C., 2001. Simultaneous determination of olanzapine, clozapine and demethylated metabolites in serum by on-line column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 759, 63–71. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00215-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00215-8)
- Wen, T.H., Binder, D.K., Ethell, I.M., Razak, K.A., 2018. The Perineuronal ‘Safety’ Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 270. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00270>
- Weydert, C.J., Cullen, J.J., 2010. MEASUREMENT OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE, AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN CULTURED CELLS AND TISSUE. *Nat. Protoc.* 5, 51-66. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2009.197>
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R., 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl.)* 93, 358–364. <https://doi.org/10.1007/BF00187257/METRICS>
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M., Carrell, R.W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Med, J Lab Clin.* 85, 337–341.
- Wolak, M., Siwek, A., Szewczyk, B., Poleszak, E., Pilc, A., Popik, P., Nowak, G., 2013. Involvement of NMDA and AMPA receptors in The antidepressant-like activity of antidepressant drugs in The forced swim test. *Pharmacol. Reports* 65, 991–997. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71080-6/METRICS](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71080-6/METRICS)
- World Health Organization. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Wu Chou, A.I., Lu, M.L., Shen, W.W., 2014. Hepatotoxicity induced by clozapine: a case report and review of literature. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 10, 1585-1587. <https://doi.org/10.2147/NDT.S67654>
- Wyass, J.M., Van Groen, T., 1992. Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: A review. *Hippocampus* 2, 1–11. <https://doi.org/10.1002/hipo.450020102>
- Xia, F., Richards, B.A., Tran, M.M., Josselyn, S.A., Takehara-Nishiuchi, K., Frankland, P.W., 2017. Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *Elife* 6, 1-25.

<https://doi.org/10.7554/ELIFE.27868>

- Xu, D., Xu, M., Jeong, S., Qian, Y., Wu, H., Xia, Q., Kong, X., 2018. The Role of Nrf2 in Liver Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front. Pharmacol.* 9, 1-7. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.01428>
- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., Lu, H., 2019. Translational Physiology: Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiol. Genomics* 51, 432-442. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00006.2019>
- Yadid, G., Friedman, A., 2008. Dynamics of the dopaminergic system as a key component to the understanding of depression. *Prog. Brain Res.* 172, 265–286. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00913-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00913-8)
- Yan, M., Man, S., Sun, B., Ma, L., Guo, L., Huang, L., Gao, W., 2023. Gut liver brain axis in diseases: the implications for therapeutic interventions. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023 81 8, 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01673-4>
- Yang, C., Xiao, K., Ao, Y., Cui, Q., Jing, X., Wang, Y., 2023. The thalamus is the causal hub of intervention in patients with major depressive disorder: Evidence from the Granger causality analysis. *Neuroimage (Amst.)* 37, 1-7. <https://doi.org/10.1016/J.NICL.2022.103295>
- Yang, Y., Eguchi, A., Wan, X., Mori, C., Hashimoto, K., 2024. Depression-like phenotypes in mice with hepatic ischemia/reperfusion injury: A role of gut-microbiota-liver-brain axis via vagus nerve. *J. Affect. Disord.* 345, 157–167. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2023.10.142>
- Yang, Y., Wang, J.Z., 2017. From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. *Front. Neural Circuits* 11, 1-8. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2017.00086>
- Yang, Y., Yang, D., Tang, G., Zhou, C., Cheng, K., Zhou, J., Wu, B., Peng, Y., Liu, C., Zhan, Y., Chen, J., Chen, G., Xie, P., 2013. Proteomics reveals energy and glutathione metabolic dysregulation in the prefrontal cortex of a rat model of depression. *Neuroscience* 247, 191–200. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.05.031>
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., Doron, R., 2015. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *J. Vis. Exp.* 2015, 52587. <https://doi.org/10.3791/52587>
- Yildiz-Yesiloglu, A., Ankerst, D.P., 2006. Review of 1H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder: a meta-analysis. *Psychiatry Res.* 147, 1–25. <https://doi.org/10.1016/J.PSCYCHRESNS.2005.12.004>
- Zafir, A., Banu, N., 2007. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 572, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.05.062>
- Zaletel, I., Filipović, D., Puškaš, N., 2016. Chronic stress, hippocampus and parvalbumin-positive interneurons: what do we know so far? *Rev. Neurosci.* 27, 397–409. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2015-0042>
- Zanos, P., Brown, K.A., Georgiou, P., Yuan, P., Zarate, C.A., Thompson, S.M., Gould, T.D., 2023. NMDA Receptor Activation-Dependent Antidepressant-Relevant Behavioral and Synaptic Actions of Ketamine. *J. Neurosci.* 43, 1038-1050.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1316-22.2022>

- Zhang, Q., He, M., Deng, C., Wang, H., Huang, X.F., 2014. Effects of olanzapine on the elevation of macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in female rats. *J. Psychopharmacol.* 28, 1161–1169. <https://doi.org/10.1177/0269881114555250>
- Zhang, Y., Tang, W., Wang, W., Xu, F., Lu, W., Zhang, C., 2023. Effects of olanzapine on anhedonia in schizophrenia: mediated by complement factor H. *Front. Psychiatry* 14, 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1146714>
- Zhang, Y.K.J., Wu, K.C., Klaassen, C.D., 2013. Genetic Activation of Nrf2 Protects against Fasting-Induced Oxidative Stress in Livers of Mice. *PLoS One* 8, 1-10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0059122>
- Zhao, D., Liu, C., Cui, M., Liu, J., Meng, F., Lian, H., Wang, D., Hu, F., Liu, D., Li, C., 2021. The paraventricular thalamus input to central amygdala controls depression-related behaviors. *Exp. Neurol.* 342, 1-16. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2021.113744>
- Zhao, L., Ki, W.K., Ikeda, Y., Anderson, K.K., Beck, L., Chase, S., Tobet, S.A., Parker, K.L., 2008. Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. *Mol. Endocrinol.* 22, 1403–1415. <https://doi.org/10.1210/ME.2008-0034>
- Zhong, M., Wang, X., Xiao, J., Yi, J., Zhu, X., Liao, J., Wang, W., Yao, S., 2011. Amygdala hyperactivation and prefrontal hypoactivation in subjects with cognitive vulnerability to depression. *Biol. Psychol.* 88, 233–242. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCHO.2011.08.007>
- Zhou, D., Kusnecov, A.W., Shurin, M.R., Depaoli, M., Rabin, B.S., 1993. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 133, 2523–2530. <https://doi.org/10.1210/ENDO.133.6.8243274>
- Zhu, F., Tu, H., Chen, T., 2022. The Microbiota–Gut–Brain Axis in Depression: The Potential Pathophysiological Mechanisms and Microbiota Combined Antidepressant Effect. *Nutrients* 14, 1-15. <https://doi.org/10.3390/NU14102081>
- Zierhut, K.C., Graßmann, R., Kaufmann, J., Steiner, J., Bogerts, B., Schiltz, K., 2013. Hippocampal CA1 deformity is related to symptom severity and antipsychotic dosage in schizophrenia. *Brain* 136, 804–814. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWS335>
- Živanović, M., Vučković, M., Marković, M., Dismoski, J., Gvozden, M., 2022. MENTALNO ZDRAVLJE U SRBIJI. *Mentalno Zdr. u Srb.* URL <https://psychosocialinnovation.net/wp-content/uploads/2022/05/PROCENA-POTREBA-FAKTORA-RIZIKA-I-BARIJERA-U-DOBIJANJU-STRUCNE-PODRSKE>. (pristupljeno 3.27.24).
- Zlatković, J., Filipović, D., 2013. Chronic social isolation induces NF-κB activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex. *Neurochem. Int.* 63, 172–179. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2013.06.002>
- Zlatković, J., Filipović, D., 2012. Bax and B-cell-lymphoma 2 mediate proapoptotic signaling following chronic isolation stress in rat brain. *Neuroscience* 223, 238–245.

<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.08.005>

- Zlatković, J., Todorović, N., Bošković, M., Pajović, S.B., Demajo, M., Filipović, D., 2014a. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol. Cell. Biochem.* 393, 43–57. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2045-z>
- Zlatković, J., Todorović, N., Tomanović, N., Bošković, M., Djordjević, S., Lazarević-Pašti, T., Bernardi, R.E., Djurdjević, A., Filipović, D., 2014b. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: a histopathological study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 59, 20–30. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2014.04.010>
- Zorzo, C., Méndez-López, M., Méndez, M., Arias, J.L., 2019. Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Behav. Brain Res.* 365, 170–177. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2019.03.011>

9. Biografija autora:

Stanisavljević Ilić (Dragan) Andrijana rođena je 20.09.1990. u Vranju. Osnovnu i srednju školu završila je u Vranju. Osnovne i master studije pohađala je u na Biološkom fakultetu, Univerzitetu u Beogradu, na studijskom programu Biologija. Diplomirala je 10.09.2013. sa prosečnom ocenom 9,15. Master studije je završila 25.09.2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00., odbranivši master rad pod nazivom „Efekat predtretmana manitolom na otpornost prema slanom stresu kod mahovine *Atrichum undulatum* (Hedw.) P.Beauv”, čime je stekla stručno zvanje master biolog. Doktorske studije upisala je na Biološkom fakultetu, Univerzitetu u Beogradu 2015. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9.72. Od 01.03.2015. zaposlena je kao istraživač pripravnik u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ - Institutu od nacionalnog značaja za Republikju Srbiju, Univerzitetu u Beogradu, u laboratoriji za Molekularnu Biologiju i Endokrinologiju (090). Angažovana je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom “Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara “, (broj projekta 173044). U zvanje istraživač saradnik izabrana je 25. januara 2018. godine. U zvanje stručni savetnik izabrana je 27.04.2023. godine. Od 01. januara 2020. godine angažovana je u okviru programa „Životna sredina i zdravlje“ Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, na temi „Stres, mentalni poremećaji i efekat farmakoloških supstanci“ evidencioni broj 0902403. Do sada je bila prvi autor 6 radova i koautor 7 radova objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima, 3 (jedno autorsko i dva koautorska) saopštenja štampanih u celini i 5 (tri autorska i dva koautorska) saopštenja štampanih u izvodu.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Андријана Станисављевић Илић

Број индекса Б3005/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекат Оланзапина на активацију неурона, парвалбумин-позитивне интернеуроне и параметре инфламације и оксидативног стреса у мозгу пацова након дуготрајне изолације

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

У Београду, _____

Потпис аутора

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Андријана Станисављевић Илић

Број индекса Б3005/2015

Студијски програм Биологија

Наслов рада Ефекат Оланзапина на активацију неурона, парвалбумин-позитивне интернеуроне и параметре инфламације и оксидативног стреса у мозгу пацова након дуготрајне изолације

Ментор др Драгана Филиповић, НСВ, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Ефекат Оланзапина на активацију неурона, парвалбумин-позитивне интернеуроне и параметре инфламације и оксидативног стреса у мозгу пацова након дуготрајне изолације

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство** – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство** – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство** – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство** – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство** – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода