



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Бојана В. Стефановић

**Дејство мелатонина на регулацију
норадреналинске неуротрансмисије у мозгу,
срцу и надбубрежним жлездама у анималном
моделу депресије**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF BIOLOGY AND ECOLOGY



Bojana V. Stefanović

**The effect of melatonin on the regulation of
noradrenaline neurotransmission in the brain,
heart and adrenal glands in an animal model of
depression**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2023.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: **Проф. др Перица Васиљевић**, редовни професор на Департману за биологију и екологију, Прородно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов: Дејство мелатонина на регулацију норадреналинске неуротрансмисије у мозгу, срцу и надбубрежним жлездама у анималном моделу депресије

Хипокампус је мождана структура веома осетљива на стрес. Мелатонин има улогу у одржавању циркадијалног ритма, а потврђена су његова антиоксидативна својства. Хронични благи непредвидиви стрес (CUMS) је анимални модел који имитира улогу хроничног стреса у настанку депресије код људи. Овај модел је прихваћен као парадигма која реплицира многе поремећаје понашања који прате депресију.

Мужјаци пацова Wistar соја су излагани CUMS у трајању од 4 недеље. Током тог периода животиње су третиране мелатонином у дози од 10 mg/kg телесне масе, i.p. Параметри понашања су праћени тестом отвореног поља, издигнутим плус лавиринтом и тестом принудног пливања.

Резиме: CUMS је довео до продужене имобилности у тесту принудног пливања. Третман пацова мелатонином смањивао је имобилност у поређењу са контролном групом, испољавајући антидепресивни ефекат. Мелатонин нормализује количину норадреналина деловањем на деградационе ензиме и VMAT2 транспортер у хипокампусу. Ова студија је показала да мелатонин показује антидепресивне ефекте у анималном моделу депресије. У тесту отвореног поља, животиње третиране мелатонином проводе више времена у центру арене, указујући на његов анксиолитички ефекат. Наши резултати су показали смањену експресију гена за α_1 -, α_2 - и β_2 -адренорецептор у хипокампусу стресираних пацова, док није било промене у експресији гена за β_1 -адренорецептор.

Третман мелатонином код CUMS пацова спречио је смањење нивоа иРНК и протеина за α_1 - и β_2 -адренорецептор изазвано стресом, док није утицао на ниво иРНК и ниво протеина за β_1 - и α_2 -адренорецептор. Смањење биосинтезе катехоламина и побољшање њиховог поновног преузимања у надбубрежним жлездама пацова излаганих CUMS повезан је са корисним ефектима хроничног третмана мелатонином. Уочени корисни ефекти мелатонина у срцу путем појачаног преузимања и смањене деградације су највероватније компензациони механизми који штите кардиомиоците од штетних ефеката прекомерне стимулације норадреналина.

Добијени резултати доприносе бољем разумевању молекуларних механизма деловања мелатонина праћењем промена у експресији гена одговорних за процес синтезе, преузимања и складиштења катехоламина у мозгу, кардиоваскуларном систему и сржи надбубрежних жлезда као местима примарне синтезе катехоламина.

Научна област:	Биолошке науке
Научна дисциплина:	Неуроендокринологија, Физиологија стреса
Кључне речи:	хронични благи непредвидиви стрес, мелатонин, катехоламини, хипокампус, симпато-адреномедуларни систем, понашање
УДК:	577.17::591.483]:591.51(043.3)
CERIF класификација:	V360; V 470; V 480; V 640
Тип лиценце: Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

PhD Perica Vasiljević, Full professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš

Title:

The effect of melatonin on the regulation of noradrenaline neurotransmission in the brain, heart and adrenal glands in an animal model of depression

Abstract:

The hippocampus is a brain structure highly sensitive to stress. Melatonin plays a role in maintaining the circadian rhythm, and its antioxidant properties have been confirmed. Chronic mild unpredictable stress (CUMS) is an animal model that mimics the role of chronic stress in the development of depression in humans. This model has been accepted as a paradigm that replicates many of the behavioral disorders that accompany depression.

Male Wistar rats were exposed to CUMS for 4 weeks. During that period, the animals were treated with melatonin at a dose of 10 mg/kg body weight, i.p. Behavioral parameters were monitored in the open field test, elevated plus maze and the forced swim test.

CUMS resulted in prolonged immobility in the forced swim test. Treatment of rats with melatonin reduced immobility compared to the control group, exhibiting an antidepressant effect. Melatonin normalized the amount of noradrenaline by acting on degradation enzymes and the VMAT2 transporter in the hippocampus. This study showed that melatonin exhibits antidepressant effects in an animal model of depression. In the open field test, animals treated with melatonin spent more time in the center of the arena, indicating its anxiolytic effect. Our results showed decreased gene expression for α_1 -, α_2 - and β_2 -adrenoreceptor in the hippocampus of stressed rats, while there was no change in gene expression for β_1 -adrenoreceptor. Melatonin treatment in CUMS rats prevented stress-induced decreases in α_1 - and β_2 -adrenoreceptor mRNA and protein levels, while not affecting β_1 - and α_2 -adrenoreceptor mRNA and protein levels. Reduction of catecholamine biosynthesis and enhancement of

their reuptake in the adrenal medulla of rats exposed to CUMS is associated with the beneficial effects of chronic melatonin treatment. The observed beneficial effects of melatonin in the heart via enhanced uptake and reduced degradation are most likely compensatory mechanisms that protect cardiomyocytes from the deleterious effects of excessive noradrenaline stimulation.

The obtained results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of action of melatonin by monitoring changes in the expression of genes responsible for the process of synthesis, uptake and storage of catecholamines in the brain, cardiovascular system and medulla of the adrenal glands as sites of primary synthesis of catecholamines.

Scientific Field:	Biological sciences
Scientific Discipline:	Neuroendocrinology. Physiology of stress
Key Words:	chronic mild unpredictable stress, melatonin, catecholamines, hippocampus, sympatho-adrenomedullary system, behavior
UDC:	577.17::591.483]:591.51(043.3)
CERIF Classification:	B360; B 470; B 480; B 640
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Бојана В. Стефановић
Ментор, МН:	Перица Васиљевић
Наслов рада, НР:	Дејство мелатонина на регулацију норадреналинске неуротрансмисије у мозгу, срцу и надбубрежним жлездама у анималном моделу депресије
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2023.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	9 поглавља, 142 стране, 374 цитата, 2 табеле, 53 слике
Научна област, НО:	Биологија
Научна дисциплина, НД:	Неуроендокринологија, Физиологија стреса
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	хронични благи непредвидиви стрес, мелатонин, катехоламини, хипокампус, симпато-адреномедуларни систем, понашање
УДК	УДК 577.17::591.483]:591.51(043.3)
Чува се, ЧУ:	Библиотека
Важна напомена, ВН:	/

Извод, ИЗ:

Хипокампус је мождана структура веома осетљива на стрес. Мелатонин има улогу у одржавању циркадијалног ритма, а потврђена су његова антиоксидативна својства. Хронични благи непредвидиви стрес (CUMS) је анимални модел који имитира улогу хроничног стреса у настанку депресије код људи. Мужјаци пацова Wistar соја су излагани CUMS у трајању од 4 недеље. Током тог периода животиње су третиране мелатонином у дози од 10 mg/kg телесне масе, i.p. Параметри понашања су праћени тестом отвореног поља, издигнутим плус лавиринтом и тестом принудног пливања. Ова студија је показала да мелатонин показује антидепресивне ефекте у анималном моделу депресије. У тесту отвореног поља, животиње третиране мелатонином проводе више времена у центру арене, указујући на његов анксиолитички ефекат. Наши резултати су показали смањену експресију гена за α_1 -, α_2 - и β_2 -адренорецептор у хипокампусу стресираних пацова, док није било промене у експресији гена за β_1 -адренорецептор. Третман мелатонином код CUMS пацова спречио је смањење нивоа иРНК и протеина за α_1 - и β_2 -адренорецептор изазвано стресом, док није утицао на ниво иРНК и ниво протеина за β_1 - и α_2 -адренорецептор. Смањење биосинтезе катехоламина и побољшање њиховог поновног преузимања у надбубрежним жлездама пацова излаганих CUMS повезан је са корисним ефектима хроничног третмана мелатонином. Уочени корисни ефекти мелатонина у срцу путем појачаног преузимања и смањене деградације су највероватније компензациони механизми који штите кардиомиоците од штетних ефеката прекомерне стимулације норадреналина. Добијени резултати доприносе бољем разумевању молекуларних механизма деловања мелатонина праћењем промена у експресији гена одговорних за процес синтезе, преузимања и складиштења катехоламина у мозгу, кардиоваскуларном систему и сржи надбубрежних жлезда као местима примарне синтезе катехоламина.

Датум прихватања теме, ДП:

15. 3. 2023.

Датум одбране, ДО:

Чланови комисије, КО:

Председник:

Члан:

Члан, ментор:



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Bojana V. Stefanović
Mentor, MN :	Perica Vasiljević
Title, TI :	The effect of melatonin on the regulation of noradrenaline neurotransmission in the brain, heart and adrenal glands in an animal model of depression
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2023.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	9 chapters, 142 pages, 347 references, 2 tables, 53 pictures
Scientific field, SF :	Biology
Scientific discipline, SD :	Neuroendocrinology; Physiology of stress
Subject/Key words, S/KW :	chronic mild unpredictable stress, melatonin, catecholamines, hippocampus, sympatho-adrenomedullary system, behavior
UC	УДК 577.17::591.483]:591.51(043.3)
Holding data, HD :	library
Note, N :	/

Abstract, AB :	<p>The hippocampus is a brain structure highly sensitive to stress. Melatonin plays a role in maintaining the circadian rhythm, and its antioxidant properties have been confirmed. Chronic mild unpredictable stress (CUMS) is an animal model that mimics the role of chronic stress in the development of depression in humans. Male Wistar rats were exposed to CUMS for 4 weeks. During that period, the animals were treated with melatonin at a dose of 10 mg/kg body weight, i.p. Behavioral parameters were monitored in the open field test, elevated plus maze and the forced swim test. This study showed that melatonin exhibits antidepressant effects in an animal model of depression. In the open field test, animals treated with melatonin spent more time in the center of the arena, indicating its anxiolytic effect. Our results showed decreased gene expression for α_1-, α_2- and β_2-adrenoreceptor in the hippocampus of stressed rats, while there was no change in gene expression for β_1-adrenoreceptor. Melatonin treatment in CUMS rats prevented stress-induced decreases in α_1- and β_2-adrenoreceptor mRNA and protein levels, while not affecting β_1- and α_2-adrenoreceptor mRNA and protein levels. Reduction of catecholamine biosynthesis and enhancement of their reuptake in the adrenal medulla of rats exposed to CUMS is associated with the beneficial effects of chronic melatonin treatment. The observed beneficial effects of melatonin in the heart via enhanced uptake and reduced degradation are most likely compensatory mechanisms that protect cardiomyocytes from the deleterious effects of excessive noradrenaline stimulation. The obtained results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of action of melatonin by monitoring changes in the expression of genes responsible for the process of synthesis, uptake and storage of catecholamines in the brain, cardiovascular system and medulla of the adrenal glands as sites of primary synthesis of catecholamines.</p>						
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	15. 3. 2023.						
Defended on, DE :							
Defended Board, DB :	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="422 1384 614 1422">President:</td> <td data-bbox="630 1384 1468 1422"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="422 1429 614 1467">Member:</td> <td data-bbox="630 1429 1468 1467"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="422 1473 614 1512">Member, Mentor:</td> <td data-bbox="630 1473 1468 1512"></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member, Mentor:	
President:							
Member:							
Member, Mentor:							

МЕНТОР:

Проф. др Перица Васиљевић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, Департман за Биологију и Екологију

ПРЕДСЕДНИК КОМИСИЈЕ

Др Слађана Дроњак Чучаковић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србије

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Наташа Спасојевић Поповић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србије

Др Љубиша Ђорђевић, ванредни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет у Нишу, Департман за биологију и екологију

Др Данијела Б. Радојковић, ванредни професор, Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Датум одбране: _____

ЗАХВАЛНИЦА



Ова докторска дисертација урађена је у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке „Винча” - Института од националног значаја за Републику Србију у оквиру Програма 2 „Животна средина и здравље”, на теми „Регулација катехоламинског система у централним и периферним ткивима током стреса 0902301” финансиране од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Срећна сам и захвална што за ментора имам др Слађану Дроњак Чучаковић, која ме је својим саветима и великим стручним искуством на пољу научно-истраживачког рада, водила од почетка рада на овој дисертацији до њене финализације. Због свега сам јој неизмерно захвална.

Захваљујем ментору, др Перици Васиљевић, на указаном поверењу и разумевању, уложеном труду и времену. Хвала за подршку у тешким тренуцима током научног рада када није све ишло како смо планирали, као и за сво пренешено знање и своје дугогодишње искуство.

Велику захвалност дугујем др Наташи Спасојевић Поповић за подршку и стручне савете које ми је пружила у току израде ове студије.

Хвала др Небојши Јаснићу на ангажованости и помоћи око експерименталног рада и обради резултата HPLC анализе ове докторске дисертације.

Хвала драгим колегама др Предрагу Јовановићу, Хариси Феризовић, Милицы Јанковић и Кристини Виријевић за помоћ, разумевање и активно учешће у извођењу експеримената, чиме су значајно допринели квалитету и вредности овог рада и колегиници Мирјани Шућур на пруженој помоћи током рада у лабораторији у сваком тренутку када ми је била потребна.

Хвала свим колегиницама и колегама Лабораторије за молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке „Винча“ - Института од националног значаја за Републику Србију који су ми на било који начин помогли.

Највећу захвалност на безрезервној подршци и разумевању током израде ове докторске дисертације дугујем мојим родитељима, сестри и сестричини. Хвала вам што сте у сваком тренутку били уз мене, бодрили ме и увек ми пружали безграничну љубав.

Садржај:

1 УВОД	1
1.1. Мелатонин	2
1.1.1. Улога мелатонина	2
1.1.2. Синтеза мелатонина	4
1.1.3. Ослобађање мелатонина	6
1.1.4. Мелатонински рецептори	8
1.1.5. Разградња мелатонина	9
1.1.6. Мелатонин и депресија	10
1.2. Стрес	11
1.2.1. Стресори, алостаза и алостатско оптерећење	11
1.3. Стрес и депресија	12
1.3.1. Моноаминска теорија депресије	15
1.3.2. Анимални модел депресије	15
1.3.3. Стрес и хипокампус	16
1.4. Катехоламини	18
1.4.1. Биосинтеза катехоламина	18
1.4.2. Ослобађање катехоламина	20
1.4.3. Механизам деловања катехоламина	21
1.4.4. Инактивација и преузимање катехоламина	23
1.4.5. Деградација катехоламина	25
1.5. Симпато-адреномедуларни систем	27
1.6. Регулација рада срца током одговора на стрес	28
2 ХИПОТЕЗА	31
3 ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	33
4 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35
4.1. Животиње	36
4.2. Експериментални протокол	36
4.3. Хронични благи непредвидиви стрес (CUMS)	37
4.4. Тестови понашања животиња	38
4.4.1. Тест отвореног поља (ТОП)	38
4.4.2. Издигнути плус лавиринт	39
4.4.3. Тест принудног пливања	40
4.5. Метода течне хроматографије високих перформанси - HPLC	41
4.6. Изолација рибонуклеинске киселине и ланчана реакција полимеризације у реалном времену (Real-Time polymerase chain reaction (RT-PCR))	42
4.6.1. Изолација укупне рибонуклеинске киселине	42
4.6.2. Преципитација РНК	43
4.6.3. Изоловање укупне РНК	44
4.6.4. Мерење концентрације укупне РНК	44
4.6.5. Синтеза комплементарне ДНК (cDNK)	45
4.6.6. PCR у реалном времену (Real-Time PCR)	45
4.6.7. Специфична детекција умножавања помоћу TaqMan пробе	45
4.7. Изолација протеина и Western blot анализа	47
4.7.1. Изолација укупних протеина	47
4.7.2. Мерење концентрације укупних протеина	47
4.7.3. Припрема узорка и SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)	48
4.7.4. Трансфер протеина са гела на мембрану	49
4.7.5. Имунодетекција протеина	50
4.8. Статистичка обрада резултата	52
5 РЕЗУЛТАТИ	53

5.1. Ефекат мелатонина на морфометријске карактеристике пацова излаганих CUMS	54
5.1.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на телесну масу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	54
5.1.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на масу леве и десне надбубрежне жлезде нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	55
5.1.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на масу срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	55
5.2. Ефекат мелатонина на понашање пацова излаганих CUMS-----	56
5.2.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на имобилност нестресираних и пацова излаганих CUMS процењивану тестом принудног пливања-----	56
5.2.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на локомоцију у тесту отвореног поља нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	57
5.2.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на параметре анксиозности нестресираних и пацова излаганих CUMS у тесту издигнутог плус лавиринта-----	58
5.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на концентрацију норадrenalина у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	59
5.4. Ефекат мелатонина на експресију гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у хипокампусу пацова излаганих CUMS-----	60
5.4.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за TH нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	60
5.4.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за DBH у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	61
5.5. Утицај мелатонина на експресију гена за транспортере одговорне за преузимање и складиштење катехоламина у хипокампусу пацова излаганих CUMS-----	62
5.5.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	62
5.5.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за VMAT2 у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	63
5.6. Ефекат мелатонина на експресију гена за ензиме одговорне за разградњу катехоламина у хипокампусу пацова излаганих CUMS-----	64
5.6.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за MAO-A у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	64
5.6.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	65
5.7. Експресија гена за адреналинске рецепторе у хипокампусу пацова излаганих CUMS -----	66
5.7.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију α_1 адреналинског рецептора у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	66
5.7.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за α_2 адреналински рецептор у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	67
5.7.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	68
5.7.4. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	69
5.8. Дејство хроничног третмана мелатонином на концентрацију адреналина и норадrenalина у сржи набубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS	70
5.9. Ефекат мелатонина на експресију гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у сржи надбубрежних жлезда пацова излаганих CUMS -----	71
5.9.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за TH у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	71

5.9.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за DBH у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	72
5.9.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	73
5.10. Ефекат мелатонина на експресију гена за транспортере одговорне за преузимање и складиштење катехоламина у сржи надбубрежних жлезда пацова излаганих CUMS---	74
5.10.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	74
4.10.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за VMAT2 транспортер у сржи надубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	75
5.11. Дејство хроничног третмана мелатонином на концентрацију норадреналина у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	76
5.12. Експресија гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у левој преткомори срца пацова излаганих CUMS-----	77
5.12.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за TH у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	77
5.12.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	78
5.13. Експресија гена за транспортере одговорне за преузимање катехоламина у левој преткомори срца пацова излаганих CUMS-----	79
5.13.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	79
5.14. Експресија гена за ензиме одговорне за разградњу катехоламина у левој преткомори срца пацова излаганих CUMS-----	80
5.14.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	80
5.15. Експресија гена за адреналинске рецепторе у левој преткомори пацова излаганих CUMS-----	81
5.15.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	81
5.15.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	82
5.16. Експресија гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у левој комори срца пацова излаганих CUMS-----	83
5.16.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за TH у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	83
5.16.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	84
5.17. Експресија гена за транспортере одговорне за преузимање и складиштење катехоламина у левој комори срца пацова излаганих CUMS -----	85
5.17.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	85
5.18. Експресија гена за ензиме одговорне за разградњу катехоламина у левој комори срца пацова излаганих CUMS-----	86
5.18.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за MAO-A ензим у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	86
5.18.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	87
5.19. Експресија гена за адреналинске рецепторе у левој комори срца пацова хронично излаганих CUMS-----	88

5.19.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	88
5.19.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	89
6 ДИСКУСИЈА-----	90
6.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на телесну масу и масу леве и десне надбубрежне жлезде и срца нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	92
6.2. Ефекти мелатонина на параметре понашања -----	94
6.3. Дејство мелатонина на концентрацију норадrenalина и експресију ензима који учествују у његовој синтези, транспорту, разградњи као и количину рецептора преко којих делује у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS -----	97
6.4. Дејство мелатонина на концентрацију норадrenalина, адреналина и експресију ензима који учествују у његовој синтези и транспорту у надбубрежним жлездама нестресираних и пацова излаганих CUMS-----	101
6.5. Дејство мелатонина на концентрацију норадrenalина и експресију ензима који учествују у његовој синтези, транспорту и разградњи као и рецептора преко којих делује у левој преткомори и комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS -	104
7 ЗАКЉУЧЦИ-----	109
8 ЛИТЕРАТУРА -----	111
9 ПРИЛОЗИ-----	133
ИЗВОД-----	134
SUMMARY -----	135
Биографија -----	136
Библиографија -----	137
Изјаве аутора -----	140

1 Увод

1.1. Мелатонин

1.1.1. Улога мелатонина

Мелатонин (Н-ацетил-5-метокситриптамин) је ендогени индоламин који се синтетише у епифизи (пинеална жлезда, *лат. glandula pinealis*) из неуротрансмитера серотонина. Први пут је изолован из пинеалне жлезде говечета и идентификован од стране Лернера (Lerner и сар., 1958). Недавно је признат као „свестрано дистрибуиран и функционално разноврстан молекул”. Мелатонин се код животиња производи и ослобађа током ноћи, независно од тога да ли су животиње активне током дана или ноћи (Pevet и сар., 1998). Понаша се као хормон, функционишући као циркадијални медијатор. Мелатонин је широко распрострањен не само у телу кичмењака и бескичмењака већ и у више од 20 дикотиледоних и монокотиледоних фамилија цветница (Paredes и сар., 2009). Улога мелатонина у биљкама је заштита од оксидативног оштећења и штетних утицаја спољашње средине (Kolar и Machackova, 2005; Reiter и Тап, 2002). Мелатонин је специфичан хормон епифизе, али га има и у ретини, деловима мозга, гастроинтестиналном тракту (танко црево), срцу и кожи (Асуња-Castroviejo и сар., 2014), што сугерише да мелатонин може имати различите ефекте у различитим органима осим мозга. Ниво мелатонина у епифизи, као и у цереброспиналној течности, пљувачци и крви показује циркадијалну варијацију, са највишим вредностима током ноћи а најнижим током дана (Claustrat и сар., 2005). Код људи је секреција мелатонина највећа од 1 до 3 године, а од пубертета се његова секреција смањује (Hattori и Somei, 2006).

Мелатонин има кључну улогу у различитим физиолошким функцијама, укључујући регулисање циркадијалног ритма (Armstrong, 1989). Клиничке студије су показале да услед поремећаја рада биолошког часовника код радника чији рад подразумева дневне и ноћне смене долази до поремећаја ритма у нивоу хормона раста и мелатонина, смањене осетљивости на инсулин и повећања нивоа кортизола, што све укупно повећава ризик за стварање метаболичког синдрома (Albrecht, 2012). Такође, код 10-30% ових радника развије се поремећај спавања познат као SWD (*енгл.* Shift Work Disorder), (Schnell и сар., 2014).

Једна од најзначајнијих улога мелатонина, која је предмет великог броја истраживања је његов антиоксидативни ефекат (Reiter и сар., 2000). Мелатонин функционише као сакупљач слободних радикала и то хидроксилних радикала (*енгл.* hydroxyl radical - HO) (Тап и сар., 1993), пероксилних радикала (Pieri и сар., 1994) и високо токсичних пероксинитрита (Cuzzocrea и сар., 1997). Бројне студије тврде да мелатонин ефикасно штити мембранске липиде од оксидативног оштећења, индукованог различитим агенсима и процесима који стварају слободне радикале у различитим ткивима (Reiter и сар., 2000). Апликација мелатонина код гравидних женки пацова повећава активност супероксид дисмутазе (*енгл.*

superoxide dismutase - SOD) и/или глутатион пероксидазе у мозгу фетуса (Okatani и сар., 2000). Мелатонин и његови метаболити реагују са различитим реактивним врстама кисеоника (*енгл.* reactive oxygen species - ROS) и азота тако што појачавају експресију антиоксидативних ензима. Антиоксидативни капацитет мелатонина такође укључује неколико индиректних ефеката у регулисању ових ензима, посебно 5 и 12-липо-оксигеназе (Zhang и сар., 1999) и азот-моноксид-синтазе (*енгл.* nitric oxide synthase - NOS) (Storr и сар., 2002). Третман мелатонином инхибира липидну пероксидацију и смањење нивоа глутатиона које настаје као последица администрације липополисахарида из *E. Coli* (Taniguti и сар., 2018). С обзиром да се мелатонин синтетише и излучује током ноћи и пролази крвно-моздану баријеру, може имати превентивну улогу у спречавању оксидативних оштећења нервних ћелија мозга током сна. Hardeland и Pandi-Perumal (2005) су показали да мелатонин смањује ниво хидропероксида у митохондријама. Осим тога, мелатонин спречава стварање проинфламаторних цитокина и хемокина и смањује регрутовање полиморфонуклеарних леукоцита до места запаљења и на тај начин остварује антиинфламаторно дејство.



Слика 1: Физиолошки ефекти мелатонина (преузето са: <http://www.kevinhinkle.com/pineal-gland-melatonin-melanin.html>)

Мелатонин утиче и на рад кардиоваскуларног система. Бројне студије су се фокусирали на испитивање утицаја мелатонина на срчани мишић током различитих болести укључујући старење, сепсу, дистрофију мишића, исхемију/реперфузију, па чак и

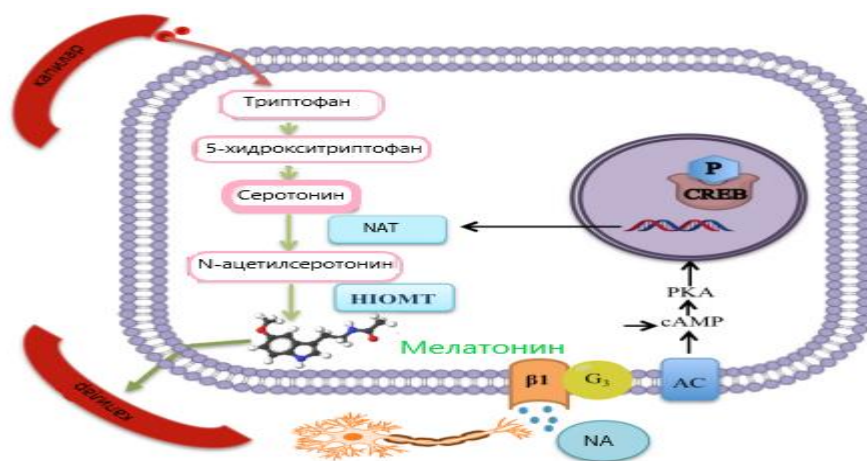
трансплантацију срца; у свим овим случајевима примена мелатонина има позитивне ефекте (Reiter и сар., 2010; Garcia и сар., 2015; Chahbouni и сар., 2010; Ortiz и сар., 2014). Такође, студије на људима указују да мелатонин утиче на регулацију рада кардиоваскуларног система (Nishiyama и сар., 2001). Смањење концентрације мелатонина у серуму и продукта његове разградње (уринарног метаболита аМТ6S) током ноћи примећено је код болесника са коронарном болести срца (Yaprak и сар., 2003) и инфарктом срца (Girotti и сар., 2003). Misaka и сарадници (2019) су показали да пацијенти са акутним инфарктом миокарда имају знатно нижи ниво мелатонина у плазми у поређењу са здравим контролама. Администрација 1 мг мелатонина код хипертензивних пацијената смањује систолни и дијастолни притисак, као и ниво нордреналина (Scheer и сар., 2004). Вазорегулаторно дејство мелатонина је сложено, јер испољава вазодилаторно дејство посредством МТ2 рецептора, а вазоконстрикторно преко МТ1 рецептора. Вазоконстрикција се остварује смањењем сАМФ (*енгл.* cyclic adenosine monophosphate - сАМФ) посредоване фосфорилације Ca^{2+} активирајућих канала за K^+ (ВК_{Ca} – Big Conductance) преко Gi/Go протеин куплованих МТ1 мелатонинских рецептора који су присутни у глатким мишићима (Dubocovich и Markowska, 2005). Доказано је да су МТ2 рецептори широко распрострањени у кардиоваскуларном систему, нарочито у срцу и артеријама (Ектемсиоглу и сар., 2003). Мелатонин испољава вазодилаторно дејство преко МТ2 рецептора повећавањем нивоа азот монооксида (*енгл.* nitric oxide – NO). NO ослобођен из ендотелних ћелија дифундује у суседне ћелије глатких мишића и активира гуанил циклазу, што доводи до повећања производње сGMP (*енгл.* cyclic guanosine monophosphate - сGMP) и активације протеин киназе G, што индукује релаксацију глатких мишића (Anwar и сар., 2001). Мелатонин може смањити крвни притисак помоћу следећих механизма: 1) опуштањем глатких мишића у зиду аорте (Nishiyama и сар., 2001); 2) као антиоксидант који смањује крвни притисак; и 3) смањујући ниво катехоламина. Студија Lau и сарадника (2012) показује да мелатонин може остваривати свој кардиопротективни ефекат и анти-апоптотским дејством преко JAK/STAT (*енгл.* Janus kinase/signal transducer and activator of transcription - JAK/STAT) сигналног пута.

1.1.2. Синтеза мелатонина

Мелатонин се синтетише из триптофана, хидроксилацијом помоћу триптофан-5-хидроксилазе до 5-хидрокситриптофана, кога декарбоксиљује декарбоксилаза до 5-хидрокситриптамина (серотонина). Н-ацетилацијом помоћу Н-ацетил трансферазе настаје Н-ацетилсеротонин (*енгл.* N-Acetylserotonin - NAS), кога метилује хидроксииндол-О-метилтрансфераза (*енгл.* hydroxy-indole-o-methyltransferase - HIOMT) до мелатонина.

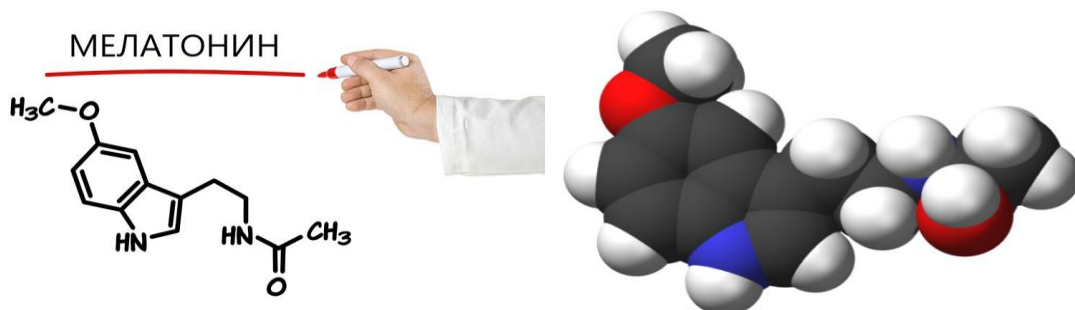
Ензимска машинерија за синтезу мелатонина први пут је идентификована од стране Акселрода и сарадника у пинеалоцитима (Axelrod и сар., 1974). Једном формиран, мелатонин се не складишти у пинеалној жлезди, већ се ослобађа у капиларе и цереброспиналну течност (Tricoire и сар., 2003) и затим се брзо дистрибуира до осталих ткива у телу (Cardinali и Pevet, 1998). Код пацова, ослобађање норадреналина у пинеалну жлезду током ноћи (Drijfhout и сар., 1996) стимулише синтезу мелатонина. Мелатонин се код глодара, производи и ослобађа по бимодалном обрасцу, максимално лучење овог хормона достиже се на почетку, а потом на крају тамне фазе (Nakahara и сар., 2003). Reiter (1991) је показао да активација β_1 адреналинских рецептора повећава генску експресију Н-ацетил трансферазе за 150 пута и његову ензимску активност за 50-70 пута што доводи до десетоструког повећања синтезе и секреције мелатонина (Roseboom и сар., 1996). Синтеза мелатонина у епифизи је такође под утицајем неуропептида, као што су вазоактивни интестинални пептид (*енгл.* vasoactive intestinal peptide - VIP), PACAP (*енгл.* pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - PACAP) и неуропептид Y (*енгл.* neuropeptide Y - NPY) (Karolczak и сар., 2005). Мелатонин доспева до свих ткива у телу веома брзо, пошто испољава велику растворљивост у липидима и води, што му олакшава пролаз кроз ћелијске мембране (Maschi и Bruce, 2004).

Ензими за биосинтезу мелатонина присутни су и у хуманим лимфоцитима и локално синтетисан мелатонин је укључен у регулисање имунског система (Carrillo-Vico и сар., 2004). Друга важна места синтезе мелатонина поред пинеалне жлезде је и гастроинтестинални тракт. Количина мелатонина је у гастроинтестиналном тракту неколико стотина пута већа од његове количине у епифизи. Мелатонин из гастроинтестиналног тракта може да се ослободи у циркулацију, нарочито под утицајем високих нивоа триптофана (Bubenik, 2002).



Слика 2: Шематски приказ синтезе мелатонина (преузето са: [pinealocitimahttps://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00011.2014](https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00011.2014))

NA – норадреналин; NAT - N-ацетил трансфераза; HIOMT - хидроксииндол-O-метил трансфераза; AC - аденилат циклаза (енгл. *adenylyl cyclase*); cAMP - циклични аденозин монофосфат (енгл. *cyclic adenosine monophosphate*); CREB - енгл. *cAMP response element-bindin*; PKA – протеин киназа A (енгл. *protein kinase A*)



Слика 3: Хемијска структура мелатонина (преузето са: <https://www.alamy.com/stock-photo/melatonin-molecular.html>)

У литератури се мелатонин означава и немачким појмом „zeitgeber” (енгл. буквални превод „timegiver”). Одликује се дворитмичном секрецијом. Ритмични образац у лучењу мелатонина је важан јер обезбеђује организму информације о времену које му омогућава да прилагоди своје физиолошке функције на дневне и сезонске варијације у свом окружењу.

1.1.3. Ослобађање мелатонина

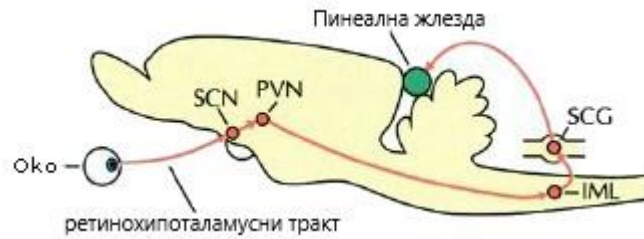
Централни часовник (енгл. *master clock*) се налази у супрасхијазматском једру хипоталамуса (енгл. *suprachiasmatic nucleus - SCN*) и представља део циркадијалног система који прима информације из спољашње и унутрашње средине. SCN је двојно једро кога чини око 10 000 неурона. Налази се у предњем делу хипоталамуса, непосредно испод оптичке хијазме и има улогу у контроли/синхронизацији циркадијалних ритмова. Синхронизација целокупног организма са спољашњим 24h-циклом представља главну улогу SCN. Stephan и Zucker (1972) су показали да лезија оба SCN једра доводи до аритмије, а лезија само једног једра до смањења амплитуде циркадијалног ритма узимања воде.

Сигнали са фоторецепторних ћелија мрежњаче преносе се до вентро-латералне зоне SCN преко ретино-хипоталамусног тракта (енгл. *retinohypothalamic tract - RHT*). RHT представља примарни пут којим светлосни стимулус регулише фазу ритма SCN (Moore и Lenn, 1972). Утицај светлости на циркадијални систем сисара остварује се преко три фоторецепторске ћелије: чепићи, штапићи и ipRGC (енгл. *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells - ipRGC*) (Panda и сар., 2005). Ганглијске ћелије ретине примају сигнал од класичних фоторецептора, чепића и штапића и пројектују своје аксоне у саставу оптичког

нерва до видне коре церебрума где се спознаје виђено. Са друге стране, мала популација ганглијских ћелија (ipRGC) експримира фотопигмент меланопсин, и њихови наставци протежу се до других региона мозга, укључујући и SCN. Ови неурони означени су као ipRGC и осетљиви су на светлост таласне дужине 484 nm. Након што их ексцитира фотон или видљиви део спектра, ћелије RHT отпуштају неуротрансмитере, примарно глутамат и PACAP, који ту информацију преносе на SCN. Везивањем ових неуротрансмитера за своје рецепторе (NMDA глутаматски рецептори (*енгл.* N-methyl-D-aspartate - NMDA), PAC1 (*енгл.* pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor – PAC1) и VPAC2 (*енгл.* Vasoactive Intestinal Polypeptide Receptor - VPAC2) у одређеним неуронима SCN долази до промене у нивоу Ca^{2+} и cAMP што води активацији неколико киназа – Ca^{2+} /калмодулин киназа, ERK/MAP киназа (*енгл.* extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase - MAPK), протеин киназе А (PKA). Све ове киназе могу фосфорилисати CREB (*енгл.* CRE binding protein) протеин који онда преко CRE (*енгл.* cAMP response elements) секвенце активира експримирање брзих раних гена (*енгл.* immediate early genes, *IEGs*) као што је *Per1* (Liu и сар., 2007).

Свака ћелија у организму сисара садржи гене биолошког часовника (*енгл.* clock genes). Ритам експримирања ових гена је ендогено генерисан тј. није покренут спољашњим факторима иако они имају важну улогу у синхронизацији рада појединачних ћелија у органима нашег организма. Молекуларни часовник сисара се састоји из примарне петље коју чине основни гени часовника (*енгл.* core clock genes - CCG) и додатних, регулаторних петљи, што све укупно даје комплексну мрежу негативних повратних спрега (Harms и сар., 2004; Gallego и Virshup, 2007).

Симпатички део аутономног нервног система има важну улогу и у циркадијалној регулацији рада пинеалне жлезде. Показано је да су ГАВАнергички неурони (неурони који производе ГАВА (*енгл.* gamma-aminobutyric acid – GABA) на нивоу паравентрикуларног нуклеуса - PVN (*енгл.* paraventricular nucleus – PVN)) одговорни за инхибиторни ефекат SCN на секрецију мелатонина у току дана, док глутаматергички неурони стимулишу ослобађање мелатонина током ноћи (Kalsbeek и сар., 2006). ГАВА влакна из SCN доспевају до PVN. Еферентна влакна из PVN пролазе кроз ретикуларну формацију и пружају се до интрамедиолатералних рогова вратног дела кичмене мождине (*енгл.* intermediolateral cell column - IML), где преганглијска влакна преносе сигнале до горње цервикалне ганглије (*енгл.* superior cervical ganglion - SCG), потом постганглијска адреналинска влакна од SCG доспевају до пинеалне жлезде и ослобађају норадреналин.



Слика 4: Неурални систем регулације пинеалне N-ацетил-трансферазе (NAT) код пацова

SCN - супрасхијазматско једро (енгл. *suprachiasmatic nucleus* - SCN); PVN – паравентрикуларно једро (енгл. *paraventricular nucleus* – PVN), SCG – горња цервикална ганглија (енгл. *superior cervical ganglion* – SCG); IML – интрамедиолатерални рогови кичмене мождине (енгл. *intermediolateral cell column* – IML)

Стварање мелатонина у пинеалној жлезди је независно од стања будности или сна. Излагање електромагнетном пољу утиче на активност пинеалне жлезде код пацова али нема ефекта на стварање мелатонина код људи. На стварање мелатонина утиче вежбање и промена положаја тела, тако што његова концентрација у плазми и пљувачци опада преласком из лежећег у стојећи став и обрнуто (Macchi и Bruce, 2004). Најзначајнији регулаторни фактор у производњи пинеалног мелатонина је смена дана и ноћи. Временски образац секреције мелатонина служи као сигнал и промене у секрецији мелатонина имају широке ефекте на сезонску физиологију животиња и понашање, пошто су мелатонински рецептор 1 (MT1) и мелатонински рецептор 2 (MT2) широко распрострањени у организму.

1.1.4. Мелатонински рецептори

Идентификована су два мембранска мелатонинска рецептора, MT1 и MT2 (Dubocovich и сар., 2010). Оба рецептора припадају фамилији рецептора спрегнутих са протеином G (Witt-Enderby и сар., 2003). MT1 рецептор је клониран из меланофора коже жаба (Ebisawa и сар., 1994) и састоји се од 350 аминокиселина, спрегнутих са Gi, специјално са Gi α ₂, Gi α ₃, и Gq/11 субјединицама. MT1 рецептори се експримирају у кардиоваскуларном систему (укључујући периферне крвне судове, аорту и срце), имунском систему, тестисима, оваријумима, кожи, јетри, бубрезима, кори надбубрежних жлезда, плаценти, дојкама, мрежњачи, панкреасу и слезини (Dubocovich и Markowska, 2005; Fischer и сар., 2008; Pandi-Perumal и сар., 2008; Slominski и сар., 2008). У мозгу, MT1 рецептори су најзаступљенији у хипоталамусу, церебелуму, хипокампусу, *substantia nigra* (Pandi-Perumal и сар., 2008). MT2 рецептори су пронађени у имунском систему, супрасхијазматском једру хипоталамуса, мрежњачи, хипофизи, крвним судовима, тестисима, бубрезима, гастроинтестиналном тракту,

млечним жлездама, адипозном ткиву и кожи (Dubocovich и сар., 2005; Rosa и сар., 1996; Slominski и сар., 2005) и показују 60% хомологије са МТ1 рецептором (Reppert и сар., 1996). Чињеница да МТ1 могу да се повежу са широким спектром G-протеина укључујући $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$ и $G_{\alpha q}$ (Witt-Enderby и сар., 2001), $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha z}$ и $G_{\alpha 16}$ (Chan и сар., 2002) што такође може објаснити његову разноликост одговора у телу. У бројним студијама је показано да МТ1 производи инхибиторне одговоре на каскаду сигналне трансдукције сАМР (Brydon и сар., 1999; Reppert и сар., 1994), што доводи до смањења РКА активности (Witt-Enderby и сар., 1998) и смањења фосфорилације CREB (McNulty и сар., 1994). Ово је генерализованији сигнални механизам предложен за МТ1. Међутим, у COS-7 ћелијама, МТ1 су такође показали да стимулишу сАМР вероватно путем $G_{\alpha s}$ (Chan и сар., 2002). Осим сАМР-зависне каскаде, МТ1 се могу повезати са PLC-зависном сигналном каскадом директно (Ho и сар., 2001) или индиректно преко $G_{\beta\gamma}$ (Roca и сар., 1999) и могу активирати РКС (Witt-Enderby и сар., 1998). МТ1 могу да се повежу са Ca^{2+} активираним каналима за K^+ ($BKCa^{2+}$) (Geary и сар., 1998). Ови рецептори такође могу модулирати формирање арахидонске киселине (Godson и Reppert, 1997), могу стимулисати активност с-Jun N-терминалне киназе (*енгл.* с-Jun N-terminal kinases - JNK) (Chan и сар., 2002) и такође модулирати MAP киназе (Witt-Enderby и сар., 2000).

Слично МТ1, активација МТ2 инхибира формирање сАМР (Brydon и сар., 1999), међутим, за разлику од МТ1, активација МТ2 може довести до смањења сGMP (Petit и сар., 1999).

Можда се суптилне разлике у фармаколошким и сигналним својствима између МТ1 и МТ2 могу показати као суштинска компонента која утиче на ефекте мелатонина на специфичне физиолошке процесе.

1.1.5. Разградња мелатонина

Мелатонин ослобођен у цереброспиналну течност III коморе, достиже концентрацију која је 20-30 пута већа него у крви, али се она са удаљавањем од пинеалне жлезде значајно смањује (Tricoire и сар., 2003), што указује на то да се мелатонин преузима од стране можданог ткива. Производња мелатонина показује знатне индивидуалне разлике. Неке јединке производе више мелатонина током живота од других, али значај ових варијација је непознат. Студије на близанцима сугеришу да ове разлике могу имати генетску основу (Griefahn и сар., 2003).

Циркулишући мелатонин се метаболише углавном у јетри где се прво хидроксилише на C_6 позицији помоћу цитохром P_{450} моно-оксигеназе (изоензими CYP1A2, CYP1A1, и у мањој мери, CYP1B1), затим се коњугује са сулфатом и излучује као 6-сулфатоксимелатонин

(α MT6S). Коњугација са глукуронском киселином је изузетно ретка (Claustrat и сар., 2005). Мелатонин се метаболише и разградњом пироловог прстена у деривате кинурамина. Примарни продукт разградње је N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамин (AFMK), који се деформише, било ариламин формамадазом или хемопероксидазом у N¹-ацетил-5-метоксикинурамин (Tan и сар., 2001). Разградња пиролног прстена чини једну трећину укупног катаболизма мелатонина, али овај проценат може бити већи у одређеним ткивима.

1.1.6. Мелатонин и депресија

Проучавање ефекта мелатонина код пацијената са депресивним поремећајем предмет је бројних истраживања (Srinivasan и сар., 2006). Недостатак мелатонина тако је повезан са предиспозицијом за депресију и удруженим психопатолошким и неуробиолошким поремећајима (укључујући анхедонију, агитацију, поремећај сна, поремећајима расположења, губитак телесне масе, повећање активности моноамино оксидазе и нивоа кортизола у плазми). Мелатонин у комбинацији са антидепресивом буспироном доводи до побољшања клиничког стања код пацијената са дијагнозом депресије (Fava и сар., 2012).

Утврђено је да постоје значајне везе између поремећаја у циркадијалном ритму и неких од најкарактеристичнијих симптома депресије. Већина пацијената са депресијом има тешкоће да заспи, а сан је праћен немиром и честим буђењем током ноћи. Насупрот томе, долази до израженог умора или честог дремања током дана. Управо ово нарушавање правилног ритма сна доводи и до поремећаја расположења, слабе концентрације и когниције (Karlan и сар., 2009). Лекови који су само седативи имају само ограничене ефекте на обнављање нормалног циркадијалног ритма, а дугорочно лечење представља висок ризик за развој толеранције и зависности (Touitou и Bogdan, 2007).

Управо из тих разлога мелатонин и његови аналози су све интересантнији као могућа нова врста терапије за депресију. Код животиња су потврђена антидепресивна својства мелатонина (Rogers и сар., 2003). Осим тога, давање мелатонина уз стандардну антидепресивну терапију код људи додатно поспешује опоравак (Rajaratnam и сар., 2009). Показано је да мелатонински аналог, агомелатин, има клинички значајне антидепресивне ефекте (Goodwin и сар., 2009), а да нема нежељених дејстава који се обично виђају при коришћењу других новијих антидепресива (на пример, гастроинтестиналне промене, главобоље, сексуалне потешкоће, психомоторна агитација или повећање телесне масе) (Llorca, 2010).

1.2. Стрес

Приступ изучавања стреса је интердисциплинаран и разумевање последица стреса по здравље захтева интегративни приступ. Стрес обухвата комплекс промена које нарушавају физиолошку хомеостазу организма (Chrousos, 1998). Канадски научник Ханс Селије (Hans Selye) увео је термин стрес и популаризовао теорију стреса у медицинском и научном смислу. Према његовој теорији „Стрес је неспецифични одговор тела на било који захтев“. „Дистрес“ је дефинисао као стрес који је непријатан и штетан за тело. Дистрес је термин за стрес који има штетан или непријатан учинак: клонулост, изнуреност, исцрпљеност, опасност, бол. Прекомерни, понављани, и неодговарајући одговори на стресор су посматрани као маладаптивни и Селије их је описао фразом „болести адаптације“. Први је установио улогу коре надбубрежних жлезда и њених хормона, а Канон (W. Cannon) је установио улогу хормона сржи у одговору на стрес, које је назвао „бори се или бежи реакцијом“. Селије је увео термин генерални адаптациони синдром са његове три сукцесивне фазе: реакција аларма, стадијум резистентности и стадијум исцрпљености. Стање узбуне је тренутни одговор на акутно излагање стресору који се одликује брзим покретањем процеса прилагођавања на дате услове, од којих је најзначајније ослобађање хормона надбубрежних жлезда. У следећој фази, фази прилагођавања, долази до прилагођавања на нове услове, па организам постаје отпорнији на деловање стресора. Међутим, уколико стресор делује у дужем временском периоду на организам, долази до треће фазе - исцрпљења, где се организам више не може прилагодити условима средине и долази до појаве болести везане за стрес (Selye, 1976).

Данас је Селијево виђење неспецифичног, генерализованог одговора на стрес превазиђено, јер се зна да је одговор који се покреће у организму зависан од типа стресора, претходног искуства са тим стресором као и способности јединке да се носи са стресором (*engl. coping*), (Goldstein, 2003; McEwen и Wingfield, 2003).

1.2.1. Стресори, алостаза и алостатско оптерећење

Под термином стресор, подразумева се стимулус који нарушава хомеостазу. Стресори се могу поделити у четири главне категорије (Pacak и Palkovits, 2001): 1) физички стресори, као што су топлота, хладноћа, зрачење, бука, вибрација, хемијски стресори, бол, имобилизација; 2) психолошки стресори који подстичу емотивне реакције и могу изазвати промене у понашању као што су анксиозност, страх, фрустрације. Такви стресори код животиња су узимање у руке (*engl. handling*) или обуздавање покрета (*engl. restraint*); 3) социјални стресори, који нарушавају интеракције међу индивидуама, код људи су незапосленост, развод, код животиња социјална изолација; 4) стресори који ремете

кардиоваскуларну и метаболичку хомеостазу (крварење, гладовање, физички напори). У зависности од трајања стресори се деле на акутне (једнократно, краће излагање) хроничне (дуготрајно, непрекидно излагање) и понављане стресоре (свакодневно излагање током краћег временског интервала).

Примарни хормонски медијатори одговора на стрес, глукокортикоиди и катехоламини, имају протективне, али и штетне ефекте на организам. Они су есенцијални за одржавање хомеостазе, прилагођавање и преживљавање. Физиолошки одговори SNS (*енгл.* sympathetic nervous system - SNS), SAM (*енгл.* sympathetic–adrenal–medullary system - SAM), HPA (*енгл.* hypothalamic–pituitary–adrenal axis - HPA) система, кардиоваскуларног и имунског система доприносе заштити и адаптацији организма на стресне изазове, што представља есенцијалну компоненту за одржавање хомеостазе.

Алостаза је проширени концепт хомеостазе. Алостаза се дефинише као постизање стабилности кроз промене (McEwen и Wingfield, 2003). Хомеостаза и алостаза су блиско повезани појмови. Хомеостаза је процес који нас одржава живим, а алостаза је процес који нам омогућава да се прилагодимо. Током процеса алостазе тело је у стању да ствара хормоне (адреналин, кортизол) и друге медијаторе (нпр. цитокине) који помажу људима да се прилагоде новим изазовима или ситуацијама.

Алостатско оптерећење доводи до дисрегулације физиолошких система и настанка болести. Овај модел описује болести везане за стрес када стресор делује дуго и често.

У литератури је описано да алостатско оптерећење, путем биолошких медијатора, може допринети развоју болести укључујући: кардиоваскуларне, метаболичке и аутоимунске поремећаје које су такође повезане са психолошким поремећајима (депресијом и анксиозношћу).

Важан аспект алостазе и алостатског оптерећења је појам антиципације. Одговор на стрес може модулисати антиципација (луче се медијатори док стресор није наступио).

1.3. Стрес и депресија

Хронично излагање стресорима доводи до бројних физиолошких одговора као што су промене у моноаминима мозга који могу допринети развоју депресије (Porterfield и сар., 2012). Депресија се сматра једним од највећих здравствених проблема од јавног значаја због више разлога: 1) високе превалентности, јер је најчешћи ментални поремећај у општој популацији; 2) тежине последица, јер се у највећем броју случајева (67%) враћа или прелази у хроничну депресију (Kennedy и сар., 2004); 3) значајног нарушавања квалитета живота; 4) код 10-15% пацијената се завршава суицидом (Andreasen, 2001); 5) неретко се јавља

удружена са другим менталним поремећајима и болестима и повећава укупни морбидитет и морталитет.

Депресију погађа приближно 322 милиона људи у свету (Friedrich, 2017). Сматра се да генетска предиспозиција повећава ризик за развој депресивног поремећаја и да допринос наследне основе износи приближно 37% (Belmaker и Agam, 2008). Животна преваленца депресивног поремећаја је код мушкараца 5-12%, а код жена 12-20%. Разлози двоструко веће преваленце код жена још увек нису јасни. Депресивни поремећаји могу да се јаве у било ком животном добу (са извесним специфичностима које носе нпр. адолесценција, порођај, менопауза), али су чешћи после 40. године живота. Новија истраживања показују растућу инциденцу депресије у млађем животном добу. Повећана учесталост депресивних поремећаја у наредним декадама очекује се због следећих чинилаца: 1) продужава се животни век а самим тим и учесталост болести удружених са депресијом; 2) депресија значајно утиче на исход других болести, као што су кардиоваскуларне, дијабетес, гојазност, канцер и неуродегенеративне болести; 3) континуирано се повећава ниво стреса и у развијеним а нарочито у земљама у развоју, а убрзане промене савременог доба донеле су промене у породицама и заједницама, што истовремено слаби социјалну подршку (Sartorius, 2001).

Симптоматологија депресије врло је сложена, а етиологија и неуробиолошка подлога депресије нису довољно јасне. Претпоставља се да је депресија сложени психички поремећај који настаје као последица утицаја чинилаца околине и промене ендогених неуробиолошких чинилаца. Неуробиолошке теорије повезују појаву депресије с неурохемијским, неуроендокринолошким и генетским променама у организму оболелих особа. Савремена истраживања етиологије и лечења депресије укључују методе молекуларне генетике у потрази за генима који би могли помоћи у етиологији и лечењу депресивних болесника.

Симптоми депресије могу бити емоционални (лоше расположење, анксиозност, плачљивост); физички (поремећен сан, губитак енергије, поремећај апетита и либида); когнитивни (осећај кривице, песимизам).

Депресија је често описана као поремећај који је повезан са стресом. Међутим, стрес сам по себи није довољан да проузрокује депресију. Већина људи не постаје депресивна после озбиљних стресних искустава, док многи постају депресивни после стресора који је за већину људи прилично благ.

Депресија је болест која се јавља у епизодама. Када се јави први пут, говоримо о депресивној епизоди, а симптоми потребни за постављање дијагнозе морају трајати најмање две недеље. Два најпознатија и најчешће употребљавана критеријума за дијагнозу депресије

су Дијагностички и статистички приручник за душевне поремећаје 5 (енгл. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM-5) који се користи у Сједињеним Америчким Државама и Међународна класификација болести и сродних здравствених проблема 11 (енгл. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, ICD-11) која је у употреби у Европи, објављена од стране Светске здравствене организације.

Према DSM-5 депресија укључује: Дисруптивни поремећај расположења (енгл. *disruptive mood dysregulation disorder*); Велики депресивни поремећај (енгл. *major depressive disorder*, MDD); Хронични депресивни поремећај – Дистимија; Предменструални дисфорични поремећај; Депресивни поремећај изазван супстанцом/леком.

Депресију карактеришу осећај туге, празнине, раздражљивост удружену са поремећајима сна, губитка енергије, апетита и либида) и когнитивним променама (осећај кривице и песимизма).

Табела 1: Дијагностички критеријуми депресије према DSM-V

Депресија Симптоми:
<ul style="list-style-type: none">• Депресивно или узнемирено понашање<ul style="list-style-type: none">• Губитак задовољства (анхедонија)• Проблеми са апетитом/губитак или добијање на телесној маси• Проблеми са спавањем/инсомнија или хиперсомнија• Нарушена психомоторна активност/агитација или ретардација<ul style="list-style-type: none">• Умор или губитак енергије• Осећање мање вредности, кривице и беспомоћности<ul style="list-style-type: none">• Проблеми са концентрацијом и размишљањем• Учестале мисли о смрти или самоубиству• Остали симптоми - анксиозност често присутна у депресији, као и физички бол попут главобоља, болова у леђима и др.
<p>Депресивна епизода се дијагностикује уколико је константно присутно најмање 5 симптома наведених на листи у временском периоду од најмање 2 недеље, који су у исто време и довели до нарушавања нормалног социјалног и друштвеног функционисања. Присуство симптома било депресивног понашања било анхедоније је неопходно за дијагностиковање депресије.</p>

1.3.1. Моноаминска теорија депресије

Педесетих година прошлог века постављена је тзв. „моноаминска“ теорија депресије према којој је депресија последица недостатка или смањења концентрације моноамина првенствено серотонина и норадреналина у неким можданим структурама. Примећено да ипрониазид (инхибитор моноамино оксидазе (*енгл.* monoamine oxidase - MAO), ензима који разграђује моноамине) који се користи у терапији туберкулозе побољшава расположење (Loomer и сар., 1957). Убрзо затим установљено је да антипсихотик имипрамин, такође показује антидепресивни ефекат (Kuhn, 1957). Lemieux и сарадници (1956) су показали да антихипертензив резерпин, који блокира транспорт моноамина подстиче испољавање симптома депресије. Случајно откривени пратећи ефекти поменутих лекова довели су до дизајнирања велике групе антидепресива (Lemberger и сар., 1985). Међутим, антидепресиви из класе инхибитора MAO, трициклични антидепресиви и SSRI (*енгл.* selective serotonin reuptake inhibitors - SSRI) (нпр. флуоксетин), итд., који повећавају ниво моноаминских неуротрансмитера у мозгу имају велики број мана, попут одложених ефеката на понашање, слабе ефикасности и честог повратка болести (Nestler и сар., 2002). Иако постоји консензус о томе да повећани ниво моноаминских неуротрансмитера у мозгу ублажавају симптоме депресије (Hirschfeld, 2000), још увек се врше истраживања у циљу потпунијег разумевања моноаминске хипотезе као и дизајнирања нових лекова који би деловали на моноамине у мозгу (Marathe и сар., 2018).

1.3.2. Анимални модел депресије

Главна препрека у истраживању депресије је недостатак валидних анималних модела, јер се симптоми депресије не могу лако мерити код лабораторијских животиња. Доступни анимални модели депресије се ослањају на испитивање деловања познатих антидепресива или одговора на стрес. Ови модели користе различите типове акутно или хронично примењиваних стресора у циљу испитивања механизма који доприносе развоју депресије (Deussing, 2006; Krishnan и Nestler, 2010), а који не могу бити примењивани код људи због етичких и других сличних разлога. Различити модели хроничног излагања животиња стресу доводе до промена у понашању сличним онима запаженим код пацијената са депресијом, а које се могу нормализовати дуготрајаним третманом антидепресивима (Deussing, 2006; Krishnan и Nestler, 2010).

Хронично излагање животиња непредвидивим различитим стресорима (*енгл.* *chronic unpredictable mild stress* - CUMS) представља анимални модел депресије код пацова, који је у широкој употреби. CUMS је један од најрелевантнијих модела стреса код животиња, који изазива бројне промене у понашању примећене код пацијената са анксиозношћу, депресијом

и сличним поремећајима расположења (Chakravarty и сар., 2013). Протокол подразумева поновљено, непредвидиво излагање различитим благим стресорима током продуженог периода (у распону од 8 дана до 10 недеља). CUMS модел је развијен од стране Wilnera и колега 1985. године и заснован је на клиничким и преклиничким истраживањима етиологије депресије (Katz, 1982; Kessler и сар., 1985). Низ истраживања, почев од раног рада Масона (1975), показала су да понашање и одговор на стресор не зависе само од интензитета штетног стимулуса, већ од специфичних психолошких параметара као што су несигурност и непредвидивост (Anisman и сар., 1993; Huether, 1996; Michael, 1990). У том погледу, варијабилност и непредвидивост стресних искустава којима су животиње секвенцијално изложене спречава развој хабитуације (Cabib и Puglisi-Allegra, 1996) и ствара се хронично стање несигурности и беспомоћности. Према овом моделу, патолошки исходи произилазе из интеракције између околних (стресних) и индивидуалних (генетичких и/или искуствених) фактора. Основна идеја овог модела стреса је да буде ближи ситуацијама код људи у којима се тип стресора са којима се свакодневно сусрећу, као и време када се појављују имају висок степен непредвидивости.

CUMS узрокује низ неуробиолошких промена карактеристичних за депресивне поремећаје и може бити погодан алат за испитивање система који могу бити поремећени у депресији и тако могу помоћи у развоју нових циљева за лечење депресије.

1.3.3. Стрес и хипокампус

Мозак регулише понашање и физиолошке реакције на дати стресор. Стресна искуства и следствено ослобађање хормона стреса производе како адаптивне тако и маладаптивне ефекте на хипокампус и друге регионе мозга. Хипокампус се налази у средишњем слепоочном режњу испод мождане коре има улогу у учењу и памћењу, оријентацији у простору и регулише висцералне функције као и НРА систем.

Хипокампус је повезан са бадемастим једрима, анатомски и функционално (Petrovich и сар., 2001) и ове две структуре су у тесној вези са хипоталамусом и можданим стаблом, и вишим кортикалним структурама, посебно са префронталним кортексом (*енгл.* prefrontal cortex - PFC). Хипокампус садржи рецепторе за глукокортикоиде који имају функционалне ефекте на ову мождану структуру. Ови хормони могу појачати когнитивне процесе, утицати на расположење, мотивацију, појачати раждражљивост али могу имати и штетан ефекат на хипокампус у условима хроничног стреса и алостатског оптерећења.

Бројни анимални модели показују да хронична стресна искуства могу утицати на хипокампусне неуроне и довести до структурних и функционалних промена у хипокампусу. Ови модели указали су на механизам којим понављани стресори узрокују скраћивање

дендрита и супресију неурогенезе која се одвија у дентатном гирусу. Ово је реверзибилан процес и укључује циркулишуће глукокортикоиде као медијаторе, али и ексцитаторне неуротрансмитере и друге ендogene медијаторе и модулаторе. Због улоге хипокампуса у формирању меморије и регулацији активности НРА система, промена у његовој ексцитабилности или трајно оштећење може довести до поремећаја у формирању епизодичне, декларативне и просторне меморије и повећаног лучења глукокортикоида.

„Пластичност нервног система” подразумева способност мозга, односно диференцираних нервних ћелија, да се структурно и функционално прилагоде како на унутрашње, тако и на спољашње стимулусе. Она се посебно односи на јачање или слабљење постојећих веза између неурона, као и на стварање нових веза. Све је већи број података који указују на то да је пластичност нервног система нарушена у депресији, што је највише проучавано у хипокампусу. На структурном нивоу, показано је да хроничан стрес обуздавања покрета (6х дневно, током 3-4 недеља) доводи до атрофије дендрита пирамидних неурона хипокампуса пацова (McEwen, 1999; Watanabe и сар., 1992), као и до смањења масе хипокампуса (Yun и сар., 2010).

Антидепресиви повољно утичу на промене у пластичности нервног система узроковане хроничним стресом и депресијом, јер доводе до повећања броја синапси (Hajszan и сар., 2005), заустављају смањење комплексности дендритске мреже (Magarinos и сар., 1999) и повећавају неурогенезу (Malberg и сар., 2000; Nakagawa и сар., 2002).

Мета-анализе показују да је маса хипокампуса значајно смањена код пацијената са неким видом депресије (McKinnon и сар., 2009; Videbech и Ravnkilde, 2004), посебно код нелечених пацијената (Sheline и сар., 2003). Симптоми депресије као што су тешкоће у концентрисању, проблеми са памћењем и нарушена регулација одговора на стрес су повезани са атрофијом хипокампуса (Pittenger и Duman, 2008).

Многобројни радови су показали да излагање животиња CUMS умањује неурогенезу и неуронску диференцијацију у хипокампусу (Bessa и сар., 2009). Пацови изложени CUMS током 21 дана показују смањењу пролиферацију ћелија у дентатном гирусу (Heine и сар., 2004). Ова редукција неурогенезе је изражена у вентралном региону (Elizalde и сар., 2010) док се не уочава у субвентрикуларној зони, што указује да постоји одређени степен регионалне селективности (Silva и сар., 2008). На основу изложених података, може се закључити да је хипокампус чест предмет изучавања у студијама које се баве ефектима хроничног стреса и негативних последица депресије.

1.4. Катехоламини

Катехоламини - допамин, адреналин и норадреналин имају важну улогу у регулисању бројних физиолошких процеса али посредују и у многим неуролошким, психијатријским, ендокриним и кардиоваскуларним поремећајима. Катехоламини утичу готово на сва ткива и њихове функције. Норадреналин изазива вазоконстрикцију крвних судова, повећава активност миокарда, док инхибира активност гастроинтестиналног тракта. Ефекти адреналина се унеколико разликују од ефеката норадреналина. Адреналин има јачи ефекат на миокард, што је од нарочите важности за прераспodelу крви из других делова у мишиће током одговора на стрес. Норадреналин повећава периферни отпор и тако повећава артеријски крвни притисак. Адреналин у много мањем степену делује на повећање артеријског крвног притиска, али знатно повећава минутни волумен срца. Такође, има неколико пута већи ефекат на метаболизам од норадреналина и овај хормон излучен из сржи надбубрежних жлезда повећава базални метаболизам (Guyton, 1996). Стога је веома важно разумевање функције катехоламинског система како у базалним, тако и у стресним условима. Кенонов концепт постојања јединственог симпато-адреналног система, напуштен је јер је прихваћено да постоји неколико катехоламинских система који могу бити регулисани од стране различитих стресора: симпато-адреномедуларни систем, симпатонеурални систем, и ДОПА-допамински аутокрини/паракрини систем. Катехоламински систем у мозгу чине норадреналински, адреналински, допамински неурони као и они који синтетишу L-DOPA (*енгл.* levodopa или L-3,4-dihydroxyphenylalanine - L-DOPA) (Kvetnansky и сар., 2009).

1.4.1. Биосинтеза катехоламина

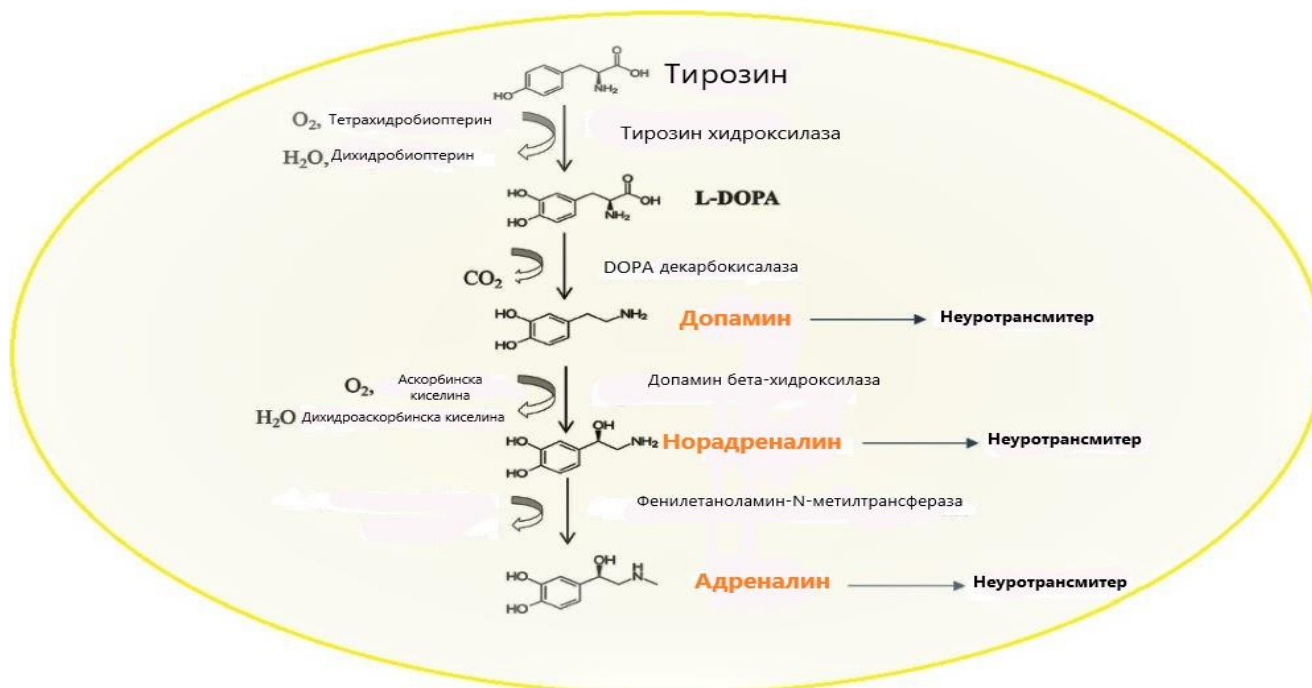
Катехоламини се синтетишу из прекурсора аминокиселине L-тирозина, чији су извор храна и хидроксилација аминокиселине фенилаланина у јетри. Након уласка у хромафине ћелије надбубрежних жлезда, централне и периферне катехоламинске нервне завршетке, тирозин се конвертује у дихидроксифенилаланин (*енгл.* L-3,4-dihydroxyphenylalanine – L-DOPA) помоћу солубилног цитоплазматског ензима тирозин хидроксилазе (*енгл.* tyrosine hydroxylase - TH) (Nagatsu, 1995). По хемијској структури TH је тирозин 3-монооксигеназа. TH ензим користи кисеоник и тетрахидробиоптерин (BH₄) као кофактор. Претварање тирозина у L-DOPA је значајно јер је одговорно за брзину стварања катехоламина („rate limiting step“). Активност TH ензима зависи од доступности његовог кофактора.

DOPA се конвертује у допамин помоћу неспецифичног ензима, ароматичне L-аминокиселинске декарбоксилазе (*енгл.* aromatic L-amino acid decarboxylase - AADC). Активност овог ензима зависи од нивоа његовог кофактора, пиридоксал фосфата (витамин

В6). У допаминским неуронима биосинтеза се овде завршава и допамин је финални производ у синтези катехоламина.

У норадреналинским ћелијама сржи или неуронима, допамин прелази из цитоплазме у синаптичке везикуле, односно хромафине грануле ћелија сржи надбубрежних жлезда где се врши реакција хидроксилације помоћу ензима допамин- β -хидроксилазе (*енгл.* dopamine β -hydroxylase - DBH) при чему настаје норадреналин. Овај ензим се налази солубилној форми али и везан за протеине мембране. DBH за своју активност користи бакар, молекулу кисеоника и аскорбинску киселину (витамин C), као донор електрона у реакцији хидроксилације. DBH се егзоцитозом ослобађа из везикула и гранула заједно са катехоламинима, због чега је присутан у плазми и цереброспиналној течности (Weinshilboum и Axelrod, 1971; Weinshilboum и сар., 1971).

Норадреналин се конвертује у адреналин помоћу солубилног цитоплазматског ензима фенилетаноламин-N-метилтрансферазе (*енгл.* phenylethanolamine N-methyltransferase - PNMT). Овај ензим је локализован у сржи надбубрежних жлезда, међутим симпатички инервисани органи и неки региони мозга су такође способни да синтетишу мале количине адреналина па тако садрже овај ензим (Kvetnansky и сар., 2009). Ген за PNMT се експримира и у неким ненеуронским ћелијама срца и коже (Huang и сар., 2005; Kvetnansky и сар., 2004; Pullar и сар., 2006). Као кофактор овај ензим користи S-аденозил-метионин (*енгл.* S-adenosyl-L-methionine - SAM). PNMT активирају глукокортикоиди. Глукокортикоиди индукују транскрипцију PNMT, надовезујући се на GRE место на промотору гена за PNMT. Очувани НРА систем је најважнији за активност PNMT (Kvetnansky и сар., 2006). У испитивању Wonga и сар. (1995) показано је да недостатак глукокортикоида услед хипофизектомије није утицао на количину иРНК за PNMT, али се активност ензима смањила за приближно 25%. Аплицирањем АСТН долази до повећања количине иРНК за PNMT.



Слика 5: Биосинтеза катехоламина

L-DOPA (енгл. *levodopa* или *L-3,4-dihydroxyphenylalanine* - *L-DOPA*)

1.4.2. Ослобађање катехоламина

У надбубрежним жлездама катехоламини се налазе у гранулама, а у симпатичким нервним завршецима се пакују у везикуле мале (40-60 nm) и велике (80-120 nm) густине. Процес ослобађања катехоламина сличан је у надбубрежним жлездама и симпатичким нервним завршецима. Ацетилхолин ослобођен из преганглијских нервних завршетака везује се за јонотропне никотинске рецепторе постганглијских неурона SNS или хромафиних ћелија сржи. Њихово отварање доводи до уласка Na^+ (изласка K^+) и следствене деполаризације. Деполаризација доводи до отварања волтажно зависних канала за Ca^{2+} и уласка Ca^{2+} који је неопходан за фузију и егзоцитозу гранула (везикула) са синтетисаним катехоламинима. Процесом егзоцитозе са катехоламинима се ослобађају хромогранини, други неуропептиди, АТФ и део солубилне DBH. Везикуларни протеини (*engl. vesicle-associated membrane proteins* - *VAMPs*) који имају улогу у процесу егзоцитозе везикула са неуротрансмитерима су синапсин (омогућава откачивање везикула са актинског цитоскелета), синаптофизин (формира пору током процеса егзоцитозе), синаптотагмин (сензорни протеин за који се везују јони Ca^{2+} што покреће процес егзоцитозе неуротрансмитера), синаптобревин (омогућава укотљавање везикуле), *SV2* (*engl. synaptic vesicle protein 2* – *SV2*), утиче на синаптичку трансмисију. Адреномедуларне ћелије секретују катехоламин директно у крвоток а део може бити поново преузет. После егзоцитозе, мембране везикула бивају враћене из плазма мембране и рециклиране у ново формиране везикуле.

Мања количина катехоламина ослобађа се и током мировања (у физиолошким условима), а током одговора на стрес, велика количина адреналина и знатна количина норадреналина (до 30% укупног циркулишућег норадреналина) може се ослободити из сржи надбубрежних жлезда. Преосталих 70% норадреналина се ослобађа из симпатичких нервних завршетака (Kvetnansky и сар., 1979).

Ослобађање адреналина и норадреналина је врло специфично регулисано у односу на врсту стресора. Надбубрежне жлезде ослобађају адреналин у условима хипогликемије, глукопеније, имобилизације, емоционалног стреса (Dronjak и сар., 2002, 2004). С друге стране, излагање хладноћи или болу стимулише ослобађање норадреналина из симпатичких нервних завршетака (Dronjak и сар., 2002, 2004).

1.4.3. Механизам деловања катехоламина

Катехоламини остварују своје дејство на циљна ткива преко α и β адреналинских рецептора (Ahlquist, 1948) и то α_1 - и α_2 рецептора и β_1 -, β_2 - и β_3 (Levkowitz и сар., 1996). Припадају групи рецептора спрегнутих са протеином G са седам трансмембранских α хеликса. Између петог и шестог хеликса, са цитоплазматске стране, налази се хидрофилна петља која, заједно са хидрофилним карбоксилним крајем интерагује са протеином G. Сви рецептори који интерагују са истим типом протеина G имају идентичну хидрофилну петљу. Специфичност везивања различитих типова лиганда као и инеракција са различитим протеином G, одређена је аминокиселинским разликама између појединих подтипова рецептора.

Три подтипа α_1 - рецептора идентификована су фармаколошки и путем молекуларног клонирања: α_{1A} -, α_{1B} - и α_{1D} (Nieble и сар., 1995). α_1 рецептори се налазе у глатким мишићима крвних судова, уринарног тракта, црева и срца, неуронима и глијским ћелијама CNS (*енгл.* central nervous system - CNS). Физиолошки ефекти који се преко њих остварују су контракција глатких мишића, гликогенолиза и гликонеогенеза. Од свих α рецептора, α_{1A} - подтип рецептора је најзаступљенији у људском срцу (Faure и сар., 1995).

Овај рецептор спрегнут је са протеином G који садржи алфа-q субјединицу. Активацијом протеина G долази до одвајања α_q субјединице од бета-гама комплекса и активације фосфолипазе C (*енгл.* phospholipase C - PLC). PLC врши хидролизу мембранског фосфатидил-инозитол дифосфата (*енгл.* phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate - PIP₂) на IP₃ (*енгл.* inositol 1,4,5-trisphosphate - IP₃) и диацилглицерол (DAG) (*енгл.* diacyl glycerol - DAG). Та два секундарна гласника даље имају различите судбине. IP₃ се везује за IP₃-зависне канале за Ca²⁺ на мембрани ендоплазматичног ретикулума и условљава ослобађање Ca²⁺ у

цитоплазму, док DAG остаје у ћелијској мембрани и заједно са јонима Ca^{2+} посредује у активацији протеин киназе C (PKC).

Ca^{2+} представља изузетно потентан секундарни гласник, који често делује у комплексу са калмодулином. Након везивања Ca^{2+} за калмодулин долази до његове конформационе промене у стање да активира групу Ser/Thr киназа означених као калцијум-калмодулин (Ca/CaM)–зависне киназе. Једна од оваквих киназа је киназа лаког ланца миозина (MLCK) (*енгл.* myosin light-chain kinase – MLCK) неопходна за механизам мишићне контракције, а позната је и CaM киназа II која делује као активатор TNF.

Код људи постоје три подтипа α_2 рецептора (α_{2A} , α_{2B} и α_{2C} ; (Bylund и сар., 1994)). α_2 рецептори имају улогу у инхибирању ослобађања норадреналина у условима повећане симпатичке активности. α_2 рецептори се налазе у бета ћелијама панкреаса, тромбоцитима, норадреналинским неуронима у различитим деловима CNS и глатким мишићима крвних судова. Ефекат адреналина преко α_2 рецептора одвија се инхибирањем аденил циклазе уз учешће GTP (*енгл.* guanosine triphosphate - GTP). Посредством ових рецептора катехоламини утичу на смањење лучења инсулина, агрегацију тромбоцита, и на смањење контракције глатких мишића. Код депресивних пацијената забележена је повећана експресија α_2 рецептора у хипокампусу, хипоталамусу и PFC.

До сада је клонирано и идентификовано три различита подтипа β рецептора: β_1 -, β_2 - и β_3 (Bylund и сар., 1994). β_1 рецептори се налазе у ћелијама бубрега, где њихова стимулација индукује ослобађање ренина. У срцу, њихова активација проузрокује повећање снаге и фреквенције срчаног рада и повећање брзине атриовентрикуларног спровођења.

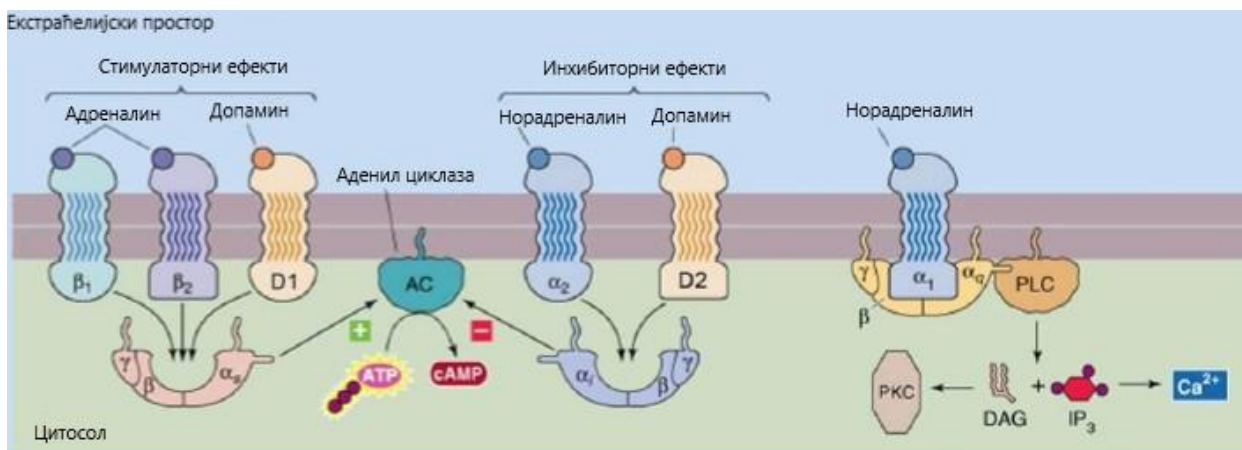
β_2 рецептори се налазе у глатким мишићима бронхија, крвних судова, гастроинтестиналног тракта, скелетним мишићима и јетри. β_1 и β_2 рецептори се налазе у мозгу и активација ових рецептора има антидепресивни ефекат (Piotrowska и сар., 2013).

β_3 рецептор посредује у деловању катехоламина на масно ткиво (Rosebaum и сар., 1993).

β рецептори су спрегнути углавном са протеином G који садржи α_s субјединицу. Стимулацијом α_s субјединице протеина G активира се мембрански везан ензим аденил циклаза (AC), која катализује превођење АТР у циклични АМР (сАМР). Секундарни гласник сАМР потом активира протеин киназу А (PKA), која у кардиомиоцитима фосфорилише бројне протеине, као што су L канали за Ca^{2+} (Gerhardstein и сар., 1999), фосфоламбан (Simmerman и Jones, 1998) и тропонин (Sulakhe и Vo, 1995). Фосфорилацијом L канала за Ca^{2+} повећава се степен уласка овог јона у ћелије миокарда преко саркомере и T тубула. То иницира даље ослобађање Ca^{2+} из саркоплазматичног ретикулума преко ријанодинских

канала активираних ослобађањем Ca^{2+} (Castellano и Vöhm, 1997) иницирајући позитиван, инотропни ефекат (повећање контрактилности). β_1 ресептори везују се за стимулаторну субјединицу G протеина, док се β_2 ресептори везују и за стимулаторну и за инхибиторну субјединицу G протеина. Активација β_1 ресептора појачава апоптозу док активација β_2 ресептора има антиапоптотски ефекат на кардиомиоците (Communal и сар., 1999).

У срцу човека, β_1 ресептора има 60-70% у преткоморама и 70-80% у коморама, док је β_2 ресептора око 30% у преткоморама, а 20% у коморама. Стимулација β_1 ресептора (углавном) и β_2 ресептора (у мањем обиму) у срцу има позитивни инотропни, хронотропни и дромотропни ефекат и повећава стопу релаксације (луситропни ефекат). β_3 ресептори су претежно неактивни у нормалним физиолошким условима, активира их велика количина катехоламина (Skeberdis и сар., 2008). Везују се само за инхибиторни протеин G и своје дејство остварују активацијом NO сигналног пута који укључује ендотелну азот-моноксид синтазу (eNOS) (*engl.* endothelial nitric oxide synthase -eNOS) (Gauthier и сар., 1998). Адреналин има велики афинитет за β_2 подтип адреналинских ресептора. Норадреналин, с друге стране, врши своју физиолошку активност путем активације β_1 подтипа ресептора.



Слика 6: Механизам деловања катехоламина преко различитих типова ресептора.

Elsevier Ltd. Boron & Boulpaep: Medical Physiology, Updated Edition www.studentconsult.com

1.4.4. Инактивација и преузимање катехоламина

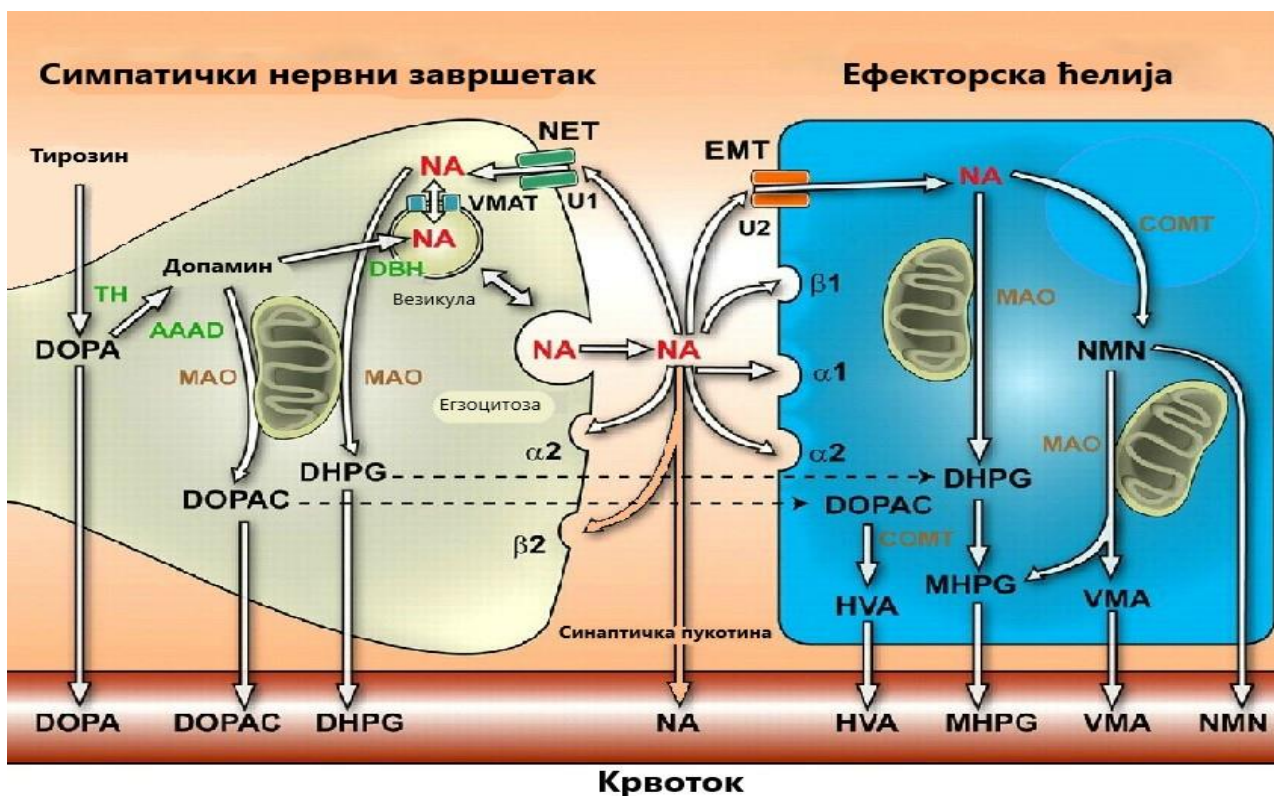
Биолошки ефекти катехоламина отпуштених у синаптичку пукотину завршавају се веома брзо поновним преузимањем у симпатичке нервне завршетке и/или ефекторске ћелије или њиховим превођењем у неактивне метаболите. Механизам инактивације катехоламина преузимањем у пресинаптичке завршетке или ензимском деградацијом открио је Акселрод (Axelrod и сар., 1970). Симпатички нервни завршци преузимају катехолаmine из ванћелијске течности процесом који се разликује у зависности од тога да ли се врши у

неуронима или осталим ћелијама па се неуронско преузимање назива "uptake 1" (UT1), а преузимање у ненеуронске ћелије као "uptake 2".

UT1 представља поновно преузимање ослобођених катехоламина у неуронима и овај процес захтева енергију. UT1 се повећава паралелно са повећаним ослобађањем норадреналина током излагања стресорима. Око 90% ослобођеног норадреналина преузимају неурони (Eisenhofer и сар., 1990).

U1 је посредован транспортером за норадреналин (норадреналински транспортер (енгл. norepinephrine transporter - NET)) и допамин (допамински транспортер (енгл. dopamine transporter - DAT)). Овај транспорт зависи од концентрације Na^+ и температуре (Eisenhofer и сар., 1990).

DAT се експримира у допаминским неуронима мозга, бубрезима, гастроинтестиналном тракту и панкреасу (Eisenhofer, 2001), а NET у норадреналинским неуронима мозга, хромафиним ћелијама надбубрежних жлезда, ендотелним ћелијама плућа и плаценти (Eisenhofer, 2001).



Слика 7: Метаболизам норадреналина ослобођеног на крајевима симпатичких нервних завршетака. DHPG - дихидроксифенилгликол; NMA - норметадреналин; MHPG - метоксиhidроксифенилгликол; HVK - хомованилична киселина; NAT - норадреналински транспортер; VMAT - везикуларни моноамински транспортер (Kvetnansky и сар., 2009).

Ненеуронско преузимање (UT2) представља активни транспорт катехоламина у ненеуронске ћелије и одвија се путем екстранеуронског моноаминског транспортера (*енгл.* extraneuronal monoamine transporter - EMT). EMT је описао Иверсен, 1965. године. UT2 има већи афинитет за адреналин у односу на норадреналин и не зависи од јона Na^+ и Cl^- . U2 је одговоран за формирање катехоламинских метаболита у јетри, бубрезима и плућима и веома је осетљив на инхибицију глукокортикоидима (Trendelenburg, 1988).

У периферним симпатичким неуронима или катехоламинским неуронима мозга, цитоплазматске везикуле активно складиште синтетисане или преузете катехоламинне активношћу везикуларног моноаминског транспортера (*енгл.* vesicular monoamine transporter 2 - VMAT). Ростоје две изоформе овог транспортера: VMAT1 ("неуроендокрина" изоформа) и VMAT2 ("неуронска" изоформа). Неурони, без обзира на то да ли су део централног или периферног нервног система, експримирају само VMAT2 изоформу, док хромафине ћелије надбубрежних жлезда пацова и паракрине мале интензивно флуоресцентне (*енгл.* small intensely fluorescent cells - SIF) ћелије симпатичких ганглија експримирају VMAT1, али током одговора на стрес значајно се повећава и VMAT2 изоформа (Eiden и сар., 2002). Студија Тилингера и сарадника (2010) је показала да је експресија VMAT2 изоформе у хромафиним ћелијама сржи надбубрежних жлезда пацова регулисана стресом. У њиховом експерименту под базалним условима VMAT1 се експримира како у адреналинским тако и у норадреналинским хромафиним ћелијама, док се VMAT2 експримира само у норадреналинским хромафиним ћелијама. Међутим, након излагања пацова стресу имобилизације, долази до повећања количине VMAT2 и у норадреналинским хромафиним ћелијама.

Насупрот уобичајној представи о складиштењу катехоламина у везикуле, ови депои се не налазе у статичном стању чекајући да буду ослобођени у синаптичку пукотину или крвоток процесом егзоцитозе. Они се налазе у динамичкој равнотежи са цитоплазмом, уз пасивно „цурење“ катехоламина и активан транспорт помоћу VMAT (Eisenhofer и сар., 2004).

1.4.5. Деградација катехоламина

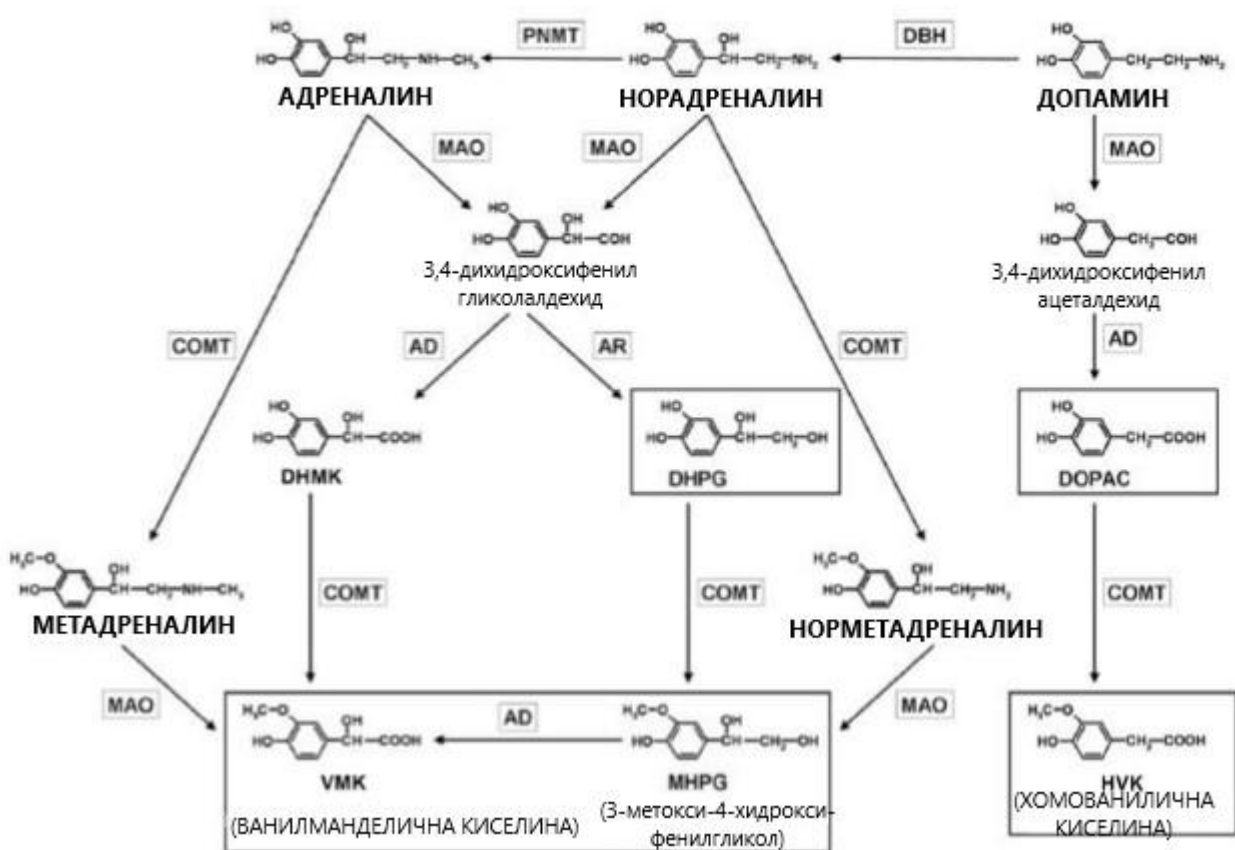
Катехоламини подлежу хемијској деградацији 3-О-метилацијом помоћу ензима катехол-О-метил-трансферазе (COMT) (*енгл.* catechol-O-methyltransferase - COMT), оксидативној деаминацији деловањем ензима моноамино оксидазе (MAO) (*енгл.* monoamine oxidases - MAO) и коњугацијом са сулфатима или глукуронидима.

За процес 3-О-метилације одговоран је COMT. Овај ензим за своју активност захтева присуство кофактора С-аденозилметионина и јона Mg^{2+} . Као продукти реакције 3-О-метилације настају метиловани деривати, метадреналин и норметадреналин. Ови деривати

деловањем MAO деаминацијом прелазе у ванилманделичну киселину (VMK) и 3-метокси-4-хидрокси-фенилгликол (MHPG).

Неуронски метаболизам катехоламина се своди на деаминацију помоћу ензима MAO. Притом настају неактивни деривати као што су 3,4-дихидроксифенилгликолалдехид, који се може редуковати до DHPG или деловањем ензима алдехидне дехидрогеназе може настати 3,4-дихидроксиманделична киселина (DHMK). DHMK и DHPG даље подлежу реакцијама метилације, при чему настају ванилманделична киселина (VMK) и 3-метокси-4-хидрокси-фенилгликол (MHPG). Допамин се деаминује деловањем MAO до 3,4-дихидроксифенилацетата (DOPAC), док се деловањем COMT метилује до хомованиличне киселине (HVK) (Kvetnansky и сар., 2009).

Катехоламини и њихови метаболити (MHPF, DHPG) могу бити коњуговани сулфатима или глукуронидима, и излучивати се из организма путем мокраће. Коњугација глукуронидима је доминантна код пацова, а сулфатима код људи.



Слика 8: Основни путеви метаболизма катехоламина.

(Kvetnansky и сар., 2009).

1.5. Симпато-адреномедуларни систем

Захваљујући Кеноновом истраживању, симпатички нерви и срж надбубрежних жлезда су препознати као кључне компоненте физиолошког одговора животиња у одржању унутрашње хомеостазе током акутог излагања бројним стресорима. Срж надбубрежних жлезда производи око 80% адреналина и 20% норадреналина и главни је извор адреналина у циркулацији. То је измењена симпатичка ганглија која је изгубила своје аксонске наставке. Инервисана је преко спланхичних нерава који полазе из интрамедиолатералних рогова лумбалног дела кичмене мождине. Активност ових неурона регулисана је влакнима која се десцендентно пружају из можданог стабла. Срж надбубрежних жлезда реагује на стресоре попут имобилизације, хипогликемије, и страха и важна је због тога што норадреналин и адреналин могу стимулисати оне структуре тела које нису инервисане симпатичким нервним влакнима. Норадреналин који у крвоток излуче надбубрежне жлезде има исти ефекат као норадреналин излучен са крајева симпатичких влакана, а једна од разлика је у томе што ефекти норадреналина излученог у крвоток трају око 10 пута дуже јер се овај хормон споро елиминише из крвотока.

Било је већ речи о томе да различите врсте стресора специфично регулишу ослобађање катехоламина. Акутни стрес имобилизације у трајању од 2 сата праћен је значајним смањењем укупне количине адреналина у надбубрежним жлездама, без значајних промена количине норадреналина. Након понављаних излагања истом стресору, нивои катехоламина у сржи надбубрежних жлезда се враћају на нормалу и достижу чак и више вредности у односу на нестресиране животиње (Kvetnansky и сар., 1970). Повећан ниво катехоламина у надбубрежним жлездама, уринарна секреција и екскреција у плазми (Dronjak и сар., 2004), као и повећана експресија ензима који учествују у њиховој синтези (Sabban и Kvetnansky, 2001) указују да срж надбубрежних жлезда одговара на понављани стрес имобилизације повећањем капацитета за синтезу катехоламина.

Други стресори такође утичу на активност ензима који учествују у биосинтези катехоламина. Тако хронична изложеност хладноћи (4 °C) пролазно повећава активности ТН, DBH и PNMT у надбубрежним жлездама. После неколико недеља континуираног излагања хладноћи, активност поменутих ензима враћа се на контролни ниво (Baruchin и сар., 1993). Понављано излагање хладноћи (4h сваког дана током 21 дан) повећава активност ТН, али не и активност PNMT (Bhatnagar и сар., 1995).

Активност ТН повећавају и психосоцијални стресори, као што је изолација животиња (Thoa, 1976) или глукопривација индукована инсулином (Fluharty и сар., 1983; Kiran и Ulus,

1992). Једина ситуација у којој је забележена смањена активност ТН надбубрежне жлезде је хронична изложеност топлоти на 34 °С (Petrovic, 1980).

Паралелно са повећањем активности ТН, повећава се и експресија ензима за синтезу катехоламина (Kvetnansky и Sabban, 1998; Kvetnansky, 2007). Након неколико дана излагања хладноћи на 4 °С, ниво иРНК за ТН у надбубрежним жлездама повећава се 3 до 4 пута у односу на контролне животиње, док су количина и активност протеина удвостручени (Caudle и сар., 2007; Richard и сар., 1988). Такође, физички стресори као што су стрес имобилизације (Kvetnansky, 2004; McMahon и сар., 1992), вежбање (Tumer и сар., 1992), хипогликемија (Vietor и сар., 1996) и хронични благи стрес повећавају експресију гена за биосинтезу катехоламина. Експресија гена за DBH и PNMT такође су значајно индуковани хроничним или понављаним излагањима стресорима (McMahon и сар., 1992).

Социјални стрес и услови смештаја такође утичу на експресију гена за ензиме који синтетишу катехоламин у надбубрежним жлездама. Пронађено је да агрегација животиња смањује ниво иРНК за PNMT (Morita и сар., 2001). Конзумирање алкохола повећава концентрацију катехоламина у плазми и експресију гена за ензиме који синтетишу катехоламин и потенцира имобилизацијом индуковано повећање експресије гена за ове ензиме у надбубрежним жлездама (Patterson-Buckendahl и сар., 2005).

Поред повећања биосинтезе катехоламина, стрес такође изазива повећање експресије неуропептида у надбубрежним жлездама, као што је NPY (Han и сар., 2005; Hiremagalur и сар., 1994). NPY у хромафиним ћелијама надбубрежних жлезда има улогу у регулисању секреције катехоламина и крвотока у надбубрежним жлездама. Депривација глукозе, повећава не само ТН, већ и иРНК за NPY и проенкефалин (La Gamma и сар., 1992; Vietor и сар., 1996), а стрес хладноће такође изазва велики пораст нивоа иРНК за NPY (Han и сар., 2005; Куо и сар., 2007, 2008).

Сви ови подаци указују да различити стресори специфично делују на експресију различитих ензима за биосинтезу катехоламина у сржи надбубрежних жлезда.

1.6. Регулација рада срца током одговора на стрес

Аутономни нервни систем (*енгл.* autonomic nervous system - ANS) има кључну улогу у регулисању рада кардиоваскуларног система јер контролише контракцију срчаног мишића, срчану фреквенцију и крвни притисак. Симпатички и парасимпатички систем антагонистички делују на срце. Симпатички део аутономног нервног система укључен је у регулацију „бори се или бежи” реакције, док парасимпатички део регулише рад срца у стању мировања.

Стимулација симпатикуса повећава срчану фреквенцију и снагу контракције миокарда. Током вежбања или под различитим патолошким условима (нпр. срчана инсуфицијенција) активира се симпатички нервни систем.

β_1 - адреналински рецептори су рецептори спрегнути са протеином G, који активирају аденил циклазу (Bristow и сар., 1989). β_1 рецептори су доминантни срцу (SA чвору, AV чвору, кардиомиоцитима преткомора и комора) и одговорни су за контракцију комора. Активација β_1 рецептора повећава срчану фреквенцију (преко SA чвора) и повећава брзину проводљивости кроз AV чвор. Тако се током вежбања или стреса повећава снага и фреквенција срчаних контракција посредством β_1 рецептора. Осим тога, активација ових рецептора такође индукује отпуштање ренина из јукстагломеруларних ћелија бубрега и потпомаже одржавање крвног притиска и нивоа натријума у плазми.

β_2 -адреналински рецептори се углавном експримирају у глатким мишићима кардиоваскуларног система. Главна улога β_2 рецептора је дилатација коронарних артерија у одговору на стрес.

α_1 адреналински рецептори такође се експримирају у васкуларним глатким мишићима. Њихова активација изазива вазоконстрикцију. Као и β_2 рецептори, и α_1 рецептори се слабо експримирају на кардиомиоцитима.

β -адреналински рецептори доминантно утичу на срчану функцију код здравих и код болесника са срчаним обољењима. Досадашњи подаци о заступљености ових рецептора у срцу су да β - адреналински рецептори чине 90% свих рецептора, са односом β_1/β_2 од 80:20, док α_1 - адреналински рецептори чине само 10%, а однос α_{1A}/α_{1B} је 6:4 (Baker, 2014). α_{2A} -адреналински рецептори се налазе на завршецима симпатичких нерава где посредују у повратној спрези која врши инхибицију ослобађања норадреналина и тиме штите срце од претеране стимулације у условима мировања (Gilsbach и Hein 2012).

У физиолошким условима сигнализација β -адреналинских рецептора је примарна у регулацији контрактилности миокарда, међутим њихова непрекидна активација доприноси дисфункцији миокарда који води прогресивном отказивању срца. Потврђено је да прекомерна експресија β_1 рецептора код трансгених мишева доводи до ране хипертрофије, апоптозе миокарда и фиброзе, која води срчаној дисфункцији (Prabhu и сар., 2003; Visognano и сар., 2000). Неколико студија је показало да СаМКII киназа посредује смрти миоцита активацијом β рецептора (Zhang и сар., 2013). Активирање β_1 рецептора појачава апоптозу кардиомиоцита, док β_2 рецептора показује анти-апоптотске учинке на срце, будући да се везује за инхибиторну субјединицу G протеина (Gi) (Zhang и сар., 2007), што има позитивне

ефекте на преживљавање миоцита активирањем Gi-фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K)-Akt сигналног пута (Zhang и сар., 2011).

Повећање нивоа катехоламина изазвано хроничним стресом доводи до прекомерне стимулације адреналинских рецептора кардиомиоцита и може проузроковати њихово адаптивно ремоделирање. Сматра се да стресом изазване промене у β_1 - и β_2 рецепторима срца разликују према његовом типу. У коморама пацова подвргнутих поновљаном или акутном стресу имобилизације (Laukova и сар., 2013) долази до смањења β_2 рецептора, док се експресија β_1 не мења (Tillinger и сар., 2008). Бенес и сарадници (2012) су показали смањење β_1 - и β_2 - рецептора након излагања стресу хладноће, иако Тиллингер и његови сарадници (2008) нису приметили никакве промене у експресији β_1 рецептора. Акутни стрес обуздавања покрета (у трајању од 1h) нема ефекта на ниво β_1 - и β_2 - рецептора у кардиомиоцитима комора (Penna и Bassani, 2010). Неонатални стрес и гладовање се повезују са мањом густином β -рецептора у срцу (Gudbjarnason и Benediktsdottir, 1996). Оксидативни стрес током исхемије-реперфузије, такође утиче на експресију β_1 адреналинских рецептора. У левој преткомори пацова изложених понављаном електрошоку, инотропни ефекат норадреналина посредован β_1 - адреналинским рецепторима је смањен, јер је смањена експресија β_1 рецептора, док је експресија β_2 рецептора у левој комори повећана (Mouga и сар., 2017).

Одговор срца на прекомерну стимулацију SNS (током старења, срчане инсуфицијенције или исхемије-реперфузије) укључује повећање односа β_2/β_1 и већи афинитет β_2 - рецептора према спајању са G_i , пре него са G_s протеином. Ови услови су такође карактерисани повећаном производњом ROS. Прекомерно стварање ROS доводи до оштећења саставних делова ћелије, укључујући ДНК, протеине и липиде, посебно када постоји недовољна активност антиоксидативних ензима. ROS доприноси неповољном ремоделирању миокарда и прогресији срчане инсуфицијенције (Corbi и сар., 2013).

2 **Хипотеза**

Основна хипотеза постављена у овој докторској дисертацији је да мелатонин може имати утицај на регулацију норадреналинске неуротрансмисије у мозгу, аутономну кардиоваскуларну модулацију и симпато-адреномедуларни систем пацова у анималном моделу депресије.

Хипокампус је моздана структура изузетно осетљива на стрес, с тим у вези постављена је хипотеза да мелатонин модулишући експресију гена за ензиме синтезе, разградње, транспорта и адреналинских α и β рецептора у овој мозданој структури нормализује садржај норадреналина у хипокампусу.

С обзиром да је концентрација катехоламина у надбубрежним жлездама промењена у анималном моделу депресије постављена је хипотеза да мелатонин нормализује њихову количину делујући на процесе синтезе и транспорта.

Концентрација катехоламина у левом срцу такође је промењена у анималном моделу депресије а постављена хипотеза је да мелатонин нормализује њихову количину делујући на експресију гена за ензиме синтезе, разградње, транспорта и адреналинских β рецептора у овом ткиву.

3 Циљ истраживања

Општи циљ ове докторске дисертације је био да се испита дејство мелатонина на регулацију норадреналинске неуротрансмисије у мозгу, срцу и симпато-адреномедуларном систему у анималном моделу депресије. У складу с тим проучаван је утицај мелатонина на експресију гена одговорних за процес синтезе, преузимања, складиштења и деловања катехоламина у хипокампусу, срцу и сржи надбубрежних жлезди нестресираних и хронично стресираних пацова.

Конкретни циљ рада био је да се испита дејство мелатонина на:

1. понашање нестресираних и хронично стресираних пацова, како би се установио антидепресивни потенцијал овог хормона.

2. количину катехоламина у хипокампусу, сржи надбубрежних жлезда и срцу нестресираних и хронично стресираних животиња.

3. експресију гена за ензиме који учествују у биосинтези катехоламина (ТН, ДВН, РNMT), NET транспортер који учествује у поновном преузимању ослобођених катехоламина из синапсе, VMAT2 који складишти катехоламин у везикуле, као и деградационе ензиме MAO-A и COMT у хипокампусу, сржи надбубрежних жлезда и срцу нестресираних и хронично стресираних животиња.

4. експресију гена за α_1 -, α_2 -, β_1 - и β_2 адреналинске рецепторе у хипокампусу и срцу нестресираних и хронично стресираних животиња.

4 Материјал и методе

4.1. Животиње

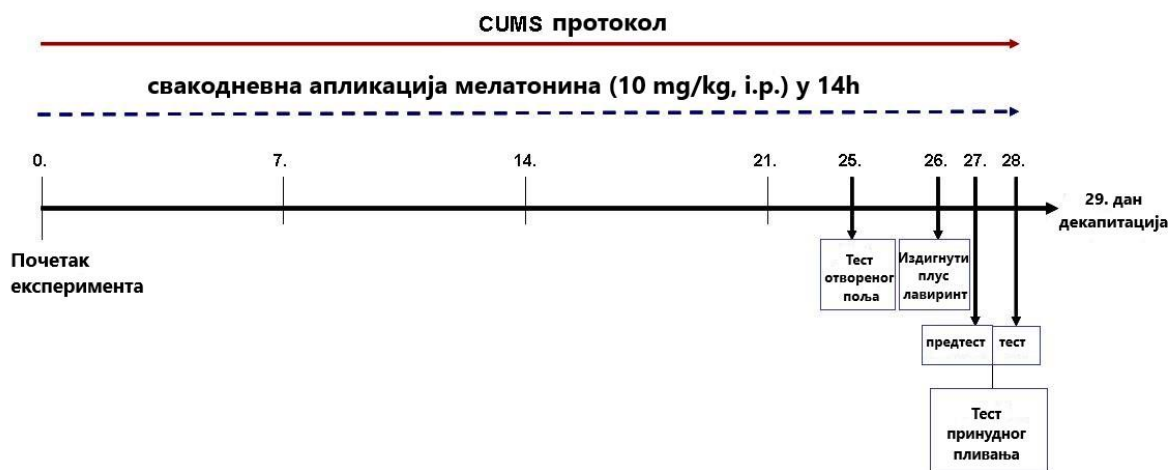
У експериментима су коришћени пацови Wistar соја, старости 11 недеља. Телесна маса животиња на почетку експеримената била је 250 - 310g. Све животиње су одгајане у поликарбонатним кавезима (дужина 37 cm, ширина 21 cm и висина 13 cm) у виваријуму Института за нуклеарне науке „Винча“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, у стандардним лабораторијским условима (константна температура од 21 ± 1 °C, влажност ваздуха од $42 \pm 5\%$, светлосни режим 12h светлост/12h мрак). У кавезима су смештане по четири животиње које су имале *ad libitum* приступ води и храни.

Све експерименталне процедуре над животињама извођене су тако да се максимално минимализује бол и нелагодност, према препорукама Етичког комитета за рад са лабораторијским животињама Института за нуклеарне науке „Винча“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, а засновано на Директиви Европске комисије 2010/63/EU. Решење о одобрењу заведено је под бројем 323-07-04657/2015-05/02.

4.2. Експериментални протокол

Животиње су биле подељене у две групе: нестресирани контроле и животиње хронично излагане благим непредвидивим стресорима (*енгл.* chronic unpredictable mild stress - CUMS) у трајању од 28 дана. Сваког дана током излагања CUMS половина животиња обе групе третирана је мелатонином (10 mg/kg). Пред крај излагања CUMS животиње су у периоду од 9-14h подвргаване тестовима понашања: тест отвореног поља (ТОП), издигнути плус лавиринт и тест принудног пливања приказаним на *Слици 9*. Након експерименталног протокола (29. дан) животиње су декапитоване уз помоћ гиљотине (Harvard Apparatus, Holliston, САД) и дисекцијом су узимана ткива: хипокампус, срж надбубрежних жлезда, лева преткомора и лева комора. Узета ткива су мерена на ваги и одређивана је њихова релативна маса према следећој формули:

$$\text{Релативна маса органа} = \text{Маса органа (mg)}/\text{Маса тела (kg)}$$



Слика 9: Експериментални протокол

Обе групе животиња, (контроле и хронично стресирани) подељене су у две подгрупе, у зависности од третмана који су примале.

- * **K+P** (нестресирани пацови третирани 5% C₂H₅OH)
- * **CUMS+P** (пацови излагани CUMS, третирани етанолом)
- * **K+M** (нестресирани пацови третирани мелатонином)
- * **CUMS+M** (пацови излагани CUMS третирани мелатонином)

Мелатонин је аплициран у дози од 10 mg/kg телесне масе, интраперитонеално (i.p.), (Bassani и сар., 2014), један сат пре почетка мрачне фазе да се не би реметио циркадијални ритам. Мелатонин (Q-1300, Bachem, Швајцарска) је растваран непосредно пре апликације у NaCl (0,9%) који је садржао 5% етанол. Излагање животиња хроничном благом непредвидивом стресу и администрација плацеба (5% етанол), као и мелатонина, започињани су истог дана и настављани током четири недеље. Узимајући у обзир повећање телесне масе, животиње су мерене сваке недеље и доза мелатонина је прилагођавана њиховој телесној маси.

4.3. Хронични благи непредвидиви стрес (CUMS)

CUMS је дизајниран тако да се максимално одржи непредвидивост природе стресора. Један или два стресора су примењивани сваког дана током четири недеље. Да би се избегла хабитуација и одржао аспект непредвидивости, сваке недеље стресирани животиње (CUMS+P и CUMS+M подгрупе) су излагане следећим стресорима по насумичном реду: трчање на траци брзином од 15 m/min током 10 мин.; боравак у мокром кавезу током 5 сати (500 mL воде собне температуре посуте по простирци); боравак у кавезу нагнутом под углом од 45⁰ у односу на вертикалну осу, током 5 сати; гладовање у трајању од 17 сати (од 15.00h до 08.00h); излагање ниској амбијенталној температури током 5 сати у хладној соби на +4 °C

и одузимање воде (комбиновани стрес), излагање стресу агрегације током 5 сати, као и стресу изолације током 48 сати.

Табела 2: Протокол хроничног благог непредвидивог стреса

	Понедељак	Уторак	Среда	Четвртак	Петак	Субота/Недеља
Трчање на траци	15 m/min 10 мин.					
Мокар кавез		10.00- 15.00h				
Нагнут кавез			10.00- 15.00h			
Одузимање хране			15.00h	08.00h		
Хладна соба				10.00- 15.00h		
Одузимање воде				10.00- 15.00h		
Агрегација					10.00- 15.00h	
Изолација						48h

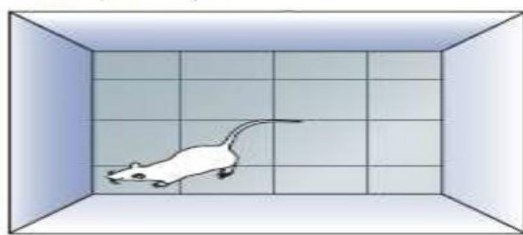
4.4. Тестови понашања животиња

4.4.1. Тест отвореног поља (ТОП)

ТОП је развијен као тест за праћење промена у понашању код пацова (Hall, 1934). Овај тест омогућава системску процену понашања које се огледа у истраживању нове средине, генералне локомоторне активности и пружа иницијалне податке о анксиозном понашању код глодара. Тест се одвијао у слабо осветљеној и звучно изолованој просторији у којој се налазио систем за видео мониторинг (video camcorder: 1/3 in. SSAM H EX VIEW HAD који је био привезан на компјутер са системом за праћење: TiBeSplit). Поступак подразумева постављање животиње у центар арене квадратног облика (100x100 cm и зидовима висине 40 cm) са црном подлогом. Површина арене је подељена на 16 једнаких квадрата величине 25x25 cm, од којих су 12 периферних, а 4 централна. Један сат пре почетка

теста животиње су премештане у собу за тестирање у циљу да им се омогући прилагођавање на амбијенталне услове. Активност пацова је посматрана током периода од 5 минута. Између испитивања сваке животиње арена је брисана 10% алкохолом. Након теста животиње су враћане у њихове кавезе. Понашање сваке животиње је анализирано узимањем у обзир следећих параметара:

- * промене у локомоцији (време проведено у мировању и број пролаза кроз центар арене)
- * знаци анксиозности (број улазака у спољашње квадрате; број улазака у унутрашње квадрате; време проведено у центру)
- * знаци депресије (време проведено у тимарењу (*engl. grooming*))



Слика 10: Тест отвореног поља; шематски приказ апаратуре (преузето са: <https://www.slideshare.net/AdvaitaMv/screening-ofanxiolytics-44529278>)

4.4.2. Издигнути плус лавиринт

Издигнути плус лавиринт је широко коришћен тест за глодаре који се користи за процену анксиолитичких ефеката лекова на основу времена проведеног на отвореним, односно затвореним крацима лавиринта. Животиње које проводе више времена у затвореним крацима су анксиозне и обрнуто. Издигнути плус лавиринт чине четири крака, организована тако да формирају облик крста, дужине 50 cm и ширине 10 cm. Два наспрамна крака су отворена, а друга два имају зидове висине 15 cm. Лавиринт је пола метра издигнут од пода. Отворени краци лавиринта имитирају страх од отворених, светлих простора, док затворени краци пружају добру заштиту од потенцијалних предатора. Јединке пацова су индивидуално постављане у центар платформе, главом окренутом ка једном од затворених кракова где су пуштане да слободно истражују током 5 минута. Понашање сваке јединке је анализирано, узимањем у обзир следећих параметара:

1. Укупан број улазака у кракове
2. Процент уласка у отворен крак (број улазака у отворен крак/укупан број улазака у кракове) $\times 100$ и
3. Време које животиња проводи у отвореном краку (број секунди проведених у отвореном краку/300s) $\times 100$

Процент уласка у отворени крак и време које је животиња проводила у отвореном краку су коришћени као параметри процене нивоа анксиозности, а укупан број улазака у кракове као параметар локомоторне активности.

Улазак животиње у крак подразумева да су све четири шапе лоциране у том краку, а излазак да је са две шапе ван крака. Између испитивања сваке животиње, издигнути плус лавиринт брисан је са 10% алкохолом.



Слика 11: Издигнути плус лавиринт (преузето са: <https://mazeengineers.com/elevated-plusmaze-test/>)

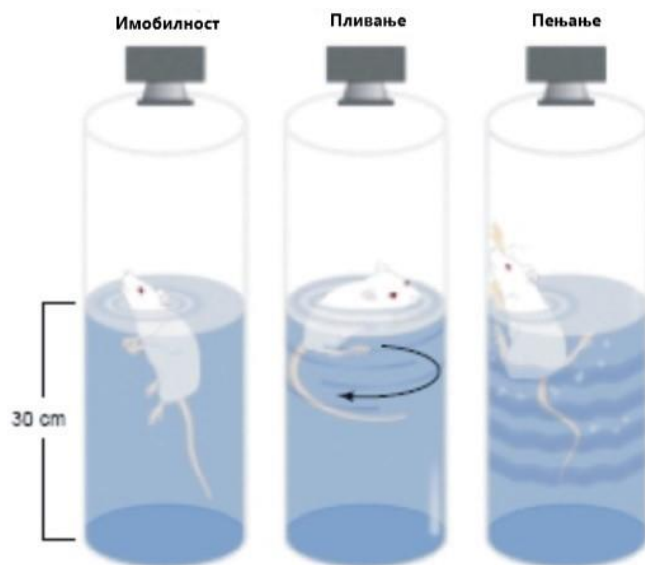
4.4.3. Тест принудног пливања

Ово је тест за праћење понашања налик депресивном (*engl.* depressive-like behavior). Метода је слична оној коју је описао Порсолт са сарадницима (1977). Пацов се урања у стаклени цилиндар висине 50 cm и пречника 21 cm, напуњен водом собне температуре (23-25 °C) до висине од 30 cm. При овој дубини животиња не може да додирне дно задњим шапама, али може репом. Тест је извођен у периоду од два узастопна дана: предтест и тест. Према Порсолту животиње у предтесту у трајању од 15 минута уче да не могу побећи из цилиндра. Након предтеста животиње су вађене из воде, брисане папирним убрусом и враћене у своје кавезе. Двадесет четири сата касније, процедура је понављана али у трајању од 5 минута. Вода је мењана између животиња, зато што је уочено да вода у којој је претходно пливао један пацов утиче на понашање другог пацова. Током теста праћена је:

* имобилност животиња, плутање на површини воде покретима неопходним да се одржи глава изнад воде

Покрети као што су климање главом и брисање очију од воде предњим шапама, су облици понашања које животиња испољава у току теста, али који нису узимани у обзир. Имобилност је резултат сазнања животиње да је бекство немогуће и да губе наду, због чега је овај облик понашања добио назив „понашање очајања“. Због тога се имобилност у овом

тесту користи за испитивање присуства очаја, симптома који су карактеристични за понашање налик депресивном код глодара.



Слика 12: Тест принудног пливања (преузето са:

<http://courses.chem.psu.edu/chem500/Past%20Chem%20500%20pdf%20files/Lucki%20Reference%202.pdf>)

4.5. Метода течне хроматографије високих перформанси - HPLC

За одређивање количине катехоламина у ткиву коришћена је метода течне хроматографије високих перформанси (*engl.* High-performance liquid chromatography - HPLC). Принцип рада HPLC је форсирање проласка анализираниог хомогената ткива кроз колону пумпањем течности (мобилна фаза) под високим притиском кроз систем. У раду су коришћене комерцијално доступне хемикалије: етилен гликол тетрасирћетна киселина (EGTA) и DL-Норадреналин хидрохлорид (NA) купљени од Sigma-Aldrich, Велика Британија; амонијум формијат достављен од Fisher Scientific (Lafboro, Велика Британија); мравља киселина (49-51%) од Fluka analytical (Швајцарска); метанол од J. T. Baker (Deventer, Холандија); перхлорна киселина (70%) од Sigma-Aldrich, Велика Британија и магнезијум хлорид ($MgCl_2 \cdot 5H_2O$) од Sigma-Aldrich, Велика Британија. Пречишћена вода је добијена употребом система за пречићавање воде реверзном осмозом BlueClearRO600P са интегрисаним BlueSoft07-MB мешаним слојем за уклањање соли (Euro-Clear Ltd., Холандија).

Сток стандардних раствора за норадреналин [1mg/mL] је припреман у метанолау и чуван на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Стандардни раствори у концентрацијама од 1, 2, 4, 8, 16, 32, 40 и 50 $\mu\text{g/mL}$ су припремани разблаживањем стока стандардних раствора у DEPROT (2% EGTA; 0,1N $HClO_4$; 0,2% $MgCl_2$).

Амонијум формијат (100 mM, pH 3,6) је коришћен као једна од компоненти мобилне фазе. Амонијум формијат (6,3 g) је прецизно мерен, растваран у приближно 800 mL воде и pH је подешавана на вредност од 3,6 са мрављом киселином. Добијени раствор је допуњаван до 1 L са водом.

Узорци ткива су хомогенизовани у DEPROT (1mg:10 μ L) коришћењем Ultra-turrax хомогенизера (T 10 basic), сонификовани (Branson Sonic Power Company, Данбери, Конектикат; 3 x 10 sec) и центрифугирани (Sorvall SuperT21; 30 мин., 18.000 rpm, +4°C). Добијени супернатант је одливан у одвојене тубе и смештан у ињектор HPLC система.

Подаци су добијени коришћењем Thermo Scientific (DionexUltiMate 3000) HPLC система који се састоји од јединице за отплињавање, бинарне пумпе (HPG-3200SD), аутоемплера (WPS-3000 SplitLoop), одељка за колону (Col. Comp. TCC-3000) и RS електрохемијског детектора опремљеног са угљеничном радном електродом (6041RS ultra Amperometric Analytical Cell). Коришћена је Hibar 125-4 LiCrospher100 RP-18 (5 μ m) HPLC колона (Merck Millipore, Дармштат, Немачка). Контрола инструмента и прикупљање података вршени су Chromeleon7 Chromatography Data System програмским пакетом (Thermo Scientific).

Следећи хроматографски услови су коришћени након оптимизације методе: мобилна фаза која се састоји од амонијум формијата (100 mM, pH 3,6) - А раствор и метанола - В раствор који су пумпани при протоку од 500 μ L/мин према градијенту концентрације. Проток је започињан са мобилном фазом која се састоји од 98% А и 2% В раствора. Почевши од 9-тог минута протока, удео В раствора је повећаван до 50% у 15-ом минуту и 80% у 18-ом минуту. Почевши од 20-ог минута па све до краја прикупљања резултата (30 - ти минут) колона је враћана у равнотежу са мешавином раствора мобилне фазе (2% А и 98% В раствора). Потенцијал за електрохемијско мерење је подешаван на +850 mV, а температура одвајања на +25 °C. Кроз систем је пропуштано 50 μ L узорка и стандардног раствора.

4.6. Изолација рибонуклеинске киселине и ланчана реакција полимеризације у реалном времену (Real-Time polymerase chain reaction (RT-PCR))

4.6.1. Изолација укупне рибонуклеинске киселине

Укупна рибонуклеинска киселина (РНК) је изолована коришћењем Тризол® реагенса (Thermo Fischer Scientific, Масачусетс, САД). Овај реагенс је монофазни раствор фенола и гуанидин изотиоцијаната, који одржава интегритет РНК молекула, а разлаже ћелијске компоненте. Изолација РНК се врши у стерилним условима, због могућности контаминације узорка рибонуклеазама (РНКазе). Ови ензими деградују РНК, веома су стабилни, тешко се

инактивирају и свуда су присутни. Пре почетка рада прављен је диетилпирокарбонат (DPC - H₂O) који, реагујући са хистидинским остацима протеина, инактивира рибонуклеазе (РНКазе), ензиме који катализују разлагање РНК и других протеина. DPC је прављен тако што је стерилној редестилованој води додаван 0,1 mL диетилпирокарбонат 97% NMR (Sigma, Немачка), раствор је аутоклавиран и распитетован у стерилне епрувете.

Замрзнуто ткиво са -70 °C је преношено у стерилне епрувете које су држане у хладним термо-блоковима и у које је, у зависности од ткива, сипано 300-600 µL Тризола® (+4°C). Хомогенизација ткива је вршена електричним хомогенизером (IKA-WERKE, GmbH & Co, Немачка). Пре рада са узорком хомогенизер је стерилисан, испиран редестилованом водом током једног минута, затим са аутоклавираном DPC водом, па Тризолом®. Ткиво је хомогенизовано два до три пута у трајању од 20 до 30 секунди. Између понављања узорци су држани на леду да би се спречило уништавање РНК топлотом коју производи апарат при раду.

Узорци су потом инкубирани 5 минута на +30 °C у термостату (Eppendorf Termosta Plus, Немачка) да би дисосовали преостали нуклеопротеински комплекси. У епрувете је потом пипетором додаван хлороформ (Sigma-Aldrich, Немачка) у количини од 1/5 запремине додатог Тризола®. Епрувете са узорцима су ручно мућкане и поново загреване у термостату на +30 °C, 2-3 минута, а затим центрифугиране на 12000 rpm, 20 минута, на +4 °C (Mikro 200R HETTICH ZENTRIFUGEN, Немачка). Након центрифугирања у епруветама су раздвајане три фазе:

1. Доња – црвено-розе фаза (хлороформ);
2. Средња – беличаста, протеинска фаза и
3. Горња – опалесцентна, водена фаза која садржи укупну РНК.

Запремина водене фазе представља око 60% почетне запремине Тризола® коришћеног за хомогенизацију.

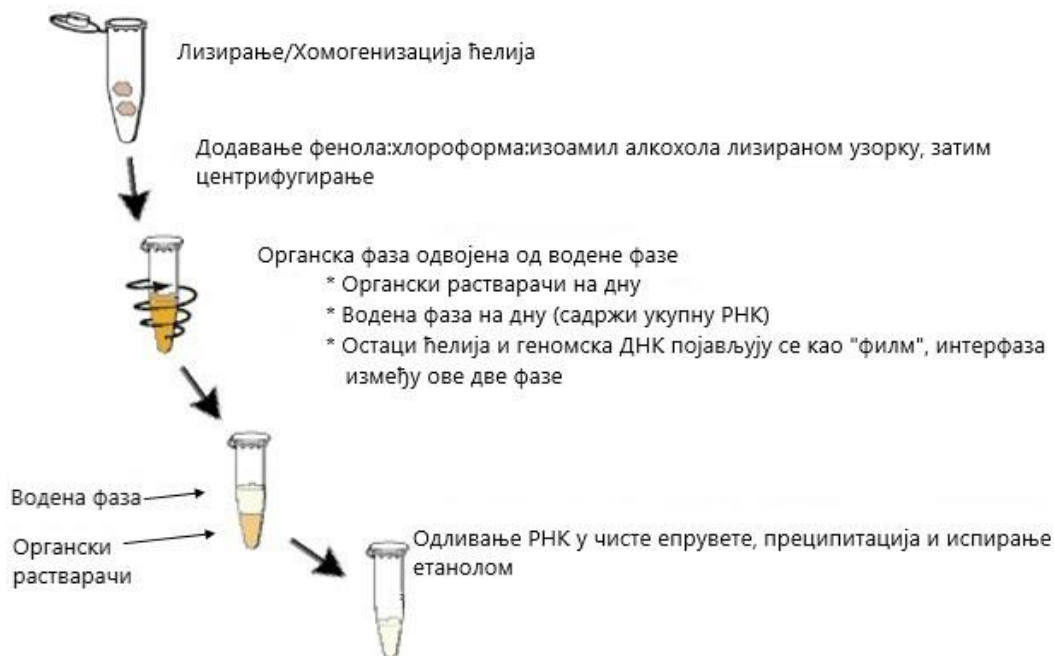
4.6.2. Преципитација РНК

Горња фаза са раствореном РНК је пребацивана у чисте, стерилне епрувете, које су држане на леду. Узорцима је додаван 3M CH₃COONa pH 5,0 (+4 °C) и то 1/10 од количине добијеног супернатанта. Узорци су затим мућкани, и додаван је 96% етанол (-20 °C) у количини од две запремине укупног волумена у епруветама, вортексовани и остављани преко ноћи на -20 °C.

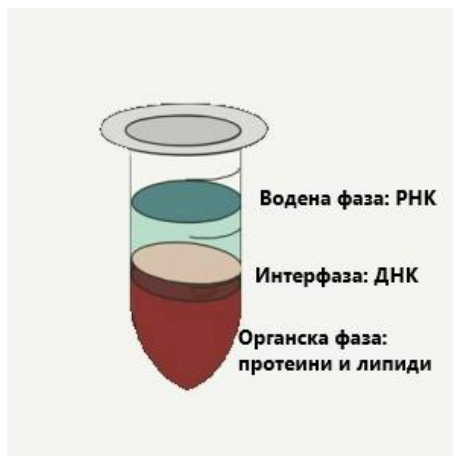
Наредног дана узорци су вортексовани, центрифугирани на 12000 rpm, током 10 минута (+4 °C). Горња фаза је одливана, остатку је додаван 1 mL 75% алкохола, након чега

су опет центрифугирани на 12000 rpm, 20 минута, +4 °C. Поново је одливана горња фаза и додавано је 1 mL 96% алкохола (-20 °C). Узорци су потом чувани на -20 °C.

4.6.3. Изоловање укупне РНК



Слика 13: Органска екстракција укупне РНК



Слика 14: Раздвојене фазе у процесу изолације РНК (преузето са: <https://insitutech.wordpress.com/2016/05/28/trizol-total-rna-isolation/>)

4.6.4. Мерење концентрације укупне РНК

Узорци РНК чувани у етанолу на -20 °C, центрифугирани су на 12000 rpm, током 20 минута на +4 °C. Након тога етанол је одливан, а епрувете сушене на чистом филтер папиру током 5 минута. РНК је растварана додавањем 12 μ L DPC воде и два пута је добро вортексована. Концентрација РНК је одређивана спектрофотометријски на апарату Nano

Drop (Thermo Scientific, САД) мерењем апсорпције светлости на 260 nm. За чистоћу узорка и евентуалну контаминацију протеинима одређиван је однос апсорпција светлости на 260 nm vs. 280 nm; однос $OD_{260}: OD_{280} \sim 2$ указује на одсуство протеина у анализираном узорку.

4.6.5. Синтеза комплементарне ДНК (cDNK)

Реверзна транскрипција је вршена коришћењем Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads Реверзне Транскриптазе (GE Healthcare, Велика Британија) и $pd(N)_6$ прајмера по протоколу произвођача. За потребе преписа узорци су припремани тако да је у 12 μL било 1500 ng РНК. У термостату (Eppendorf ThermoStat Plus, Немачка) су узорци инкубирани 10 минута на $+65\text{ }^\circ\text{C}$. Узорци су затим држани на хладном а за то време су по две куглице реакционе смеше растваране у 40 μL DPC воде и додавано је по 2 μL $pd(N)_6$ прајмера раствореног у концентрацији од 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Сваком узорку је додавано по 21 μL ове реакционе смеше. Узорак је благо измешан и инкубиран један сат на $+37\text{ }^\circ\text{C}$. Добијена cDNK је чувана на $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

4.6.6. PCR у реалном времену (Real-Time PCR)

Квантитативни Real-Time PCR омогућава праћење умножавања дефинисане секвенце ДНК, у реалном времену, односно квантификацију добијеног продукта. Заснован на детекцији флуоресценције коју продукује флуоресцентни репортерски молекул чиме се прати процес умножавања и квантификује количина добијеног продукта. Флуоресценција се повећава са сваким циклусом умножавања, односно са повећањем количине продукта. На основу природе реакције и врсте репортерског молекула може се применити:

***Неспецифична детекција умножавања** коришћењем флуоресцентних репортерских боја (SYBR Green)

***Специфична детекција умножавања** (TaqMan пробе и молекуларни светионик - molecular beacon)

4.6.7. Специфична детекција умножавања помоћу TaqMan пробе

Једноланчане пробе величине 15-30 нуклеотида, које су комплементарне циљној секвенци, на 5' и 3' крајевима имају прикачену репортерску флуоресцентну боју (R-reporter), односно пригушивачку боју (Q-quencher). Када је TaqMan проба слободна или везана за комплементарну циљну секвенцу, нема емисије флуоресценције. У току фазе синтезе нових ланаца, захваљујући 5'-3' егзонуклеазној активности Taq полимеразе, долази до хидролизе пробе која је праћена емисијом флуоресценције.

Молекуларни светионик (“molecular beacon”)

То је једноланчана ДНК проба величине 40-50 нуклеотида која у слободном стању формира структуру сличну укосници. Састоји од средишњег региона који је комплементаран циљној секвенци и кратких комплементарних низова на 5' и 3' крајевима на које су прикачени репортерска флуоресцентна боја (R-reporter), односно боја пригушивач (Q-quencher). Док проба заузима облик укоснице, нема емисије. Током умножавања, у фази денатурације, долази до нарушавања форме укоснице, а линеарна форма молекуларног светионика формира дволанчане структуре са комплементарном секвенцом циљне ДНК. Када је проба везана за циљну секвенцу, долази до престанка блокаде емисије репортерске флуоресцентне боје.

За Real-Time PCR припремана је реакциона смеша која је садржала следеће компоненте:

*Есеј за квантитативно утврђивање генске експресије са специфичним прајмерима за амплификацију циљаног гена обележеним 6-FAM бојом и Taqman MGB (Minor groove binder) пробом која је лоцирана између два прајмера и која садржи нефлуоресцентни пригушивач у запремини од 1,25 μL по бунарићу. Коришћени су есеји Assay-on-Demand Gene Expression Products (Thermo Fisher Scientific, Масачусетс, САД) за TH (ID:Rn00562500_m1), DBH (ID:Rn00565819_m1), PNMT (ID:Rn01495589_g1), NET (ID:Rn00580267_m1), VMAT2 (ID:Rn00565488_m1), COMT (ID:Rn01404927_g1), MAO-A (ID:Rn01430950_m1), адреналински α_1 рецептор (ID:Rn00567876_m1), адреналински α_2 рецептор (ID:Rn00562488_s1), адреналински β_1 рецептор (ID:Rn00824536_s1), адреналински β_2 рецептор (ID:Rn00560650_s1) и циклофилин А (ID:Rn00690933).

*Master mix у запремини од 12,5 μL . Коришћен је TaqMan Universal Master Mix with AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific, Масачусетс, САД), који у свом саставу има Taqman полимеразу, dNTP, пуфер, MgCl_2 и пасивну боју ROX. Додавана је DPC вода до укупног волумена од 15 μL по бунарићу и микс са есејем, master mix и DPC водом наношен је на плочу. У бунариће су затим додавани узорци cDNK (10 μL) у концентрацији од 1-10 ng преписане cDNK у зависности од ткива и испитиваног гена.

PCR реакција је извођена на апарату ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Thermo Fisher Scientific, Масачусетс, САД). Протокол реакције је био: 2 минута на 50 $^{\circ}\text{C}$; затим 10 минута на 95 $^{\circ}\text{C}$; праћено са 40 циклуса на 95 $^{\circ}\text{C}$ по 15 sec и 60 sec на 60 $^{\circ}\text{C}$. Квантификација је вршена коришћењем квантитативне C_T методе (Livak и Schmittgen, 2001). Добијени резултати анализирани су софтвером RQ Study Add ON software за 7000 v 1.1 SDS instrument (ABI Prism Sequence Detection System) са поузданошћу од 95% ($p < 0.05$). Вредност

релативне експресије узорка је добијена коришћењем формуле $N_{uzorka} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$. Сви транскрипти су нормализовани у односу на експресију гена за циклофилин А (ендогена контрола). Претходно су проверавани нивои овог гена у узорцима различито третираних животиња да би се утврдило да сами третмани немају ефекат на његову експресију. Сваки узорак је мерен у трипликату и утврђивана је његова C_T вредност. Због индивидуалних разлика међу животињама, као калибратор је узиман узорак контролне групе чија је вредност близу средње вредности свих узорака и са најмањом грешком мерења.

4.7. Изолација протеина и Western blot анализа

4.7.1. Изолација укупних протеина

Ткива су хомогенизована у RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Далас, Тексас, САД, sc-24948) помоћу хомогенизера T8 IKA-WERKE на $+4\text{ }^\circ\text{C}$. RIPA Lysis Buffer System се састоји од 4 компоненте:

*1x Lysis Buffer System (1x Tris HCL pH 8.0; полиетилен гликол моно ((1,1,3,3-тетраметилбутил)фенил) етар; натријум хлорид; 0,5% натријум деоксилат; 0,1% натријум додецил сулфат и 0,0004% натријум азид)

*Фенилметил сулфонил (PMSF) у диметилсулфоксиду (DMSO)

*Коктел протеазних инхибитора у DMSO

*Натријум ортованадат у води

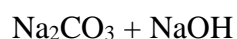
Коришћено је 3 mL RIPA Lysis Buffer System по граму ткива приликом изолације протеина. Сваки пут непосредно пре изолације прављен је свеж пуфер. Након хомогенизације, узорци су остављани на лизирање 1h, на $+4\text{ }^\circ\text{C}$, а затим су центрифугирани 20 минута на 12000 обртаја у минути. Супернатант је одливан у прохлађене епрувете. Тако припремљени узорци су остављани на $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

4.7.2. Мерење концентрације укупних протеина

Концентрација укупних протеина одређивана је методом по Лорију (1951). Метода се користи када је очекивана концентрација протеина у узорку у опсегу од 1 mg/mL до 10 mg/mL. Стандард за одређивање концентрације протеина је говеђи серум албумин (*engl. bovine Serum Albumin – BSA*) у концентрацијама од 0,2–10 mg/mL. Поступак се заснива на биуретској реакцији купри (Cu^{2+}) јона са пептидним везама протеина у алкалној средини и реакцији фосфолибденско-фосфоволфрамског реагенса (Folin-Ciocalteu реагенс) са ароматичним аминокиселинама тирозином и триптофаном, које су градивне јединице испитиваних протеина. Након везивања за пептидне везе, јони Cu^{2+} редукују се у купро јоне

(Cu⁺) и формира се комплекс Cu⁺-протеин, који реагује са додатим Folin-Ciocalteu реагенсом при чему се ствара плаво обојен комплекс.

Сваки узорак је рађен у дупликату. Прво је растварано 10 µL узорка у 990 µL ddH₂O (100 пута разблажење). Од тога је узимано 25 µL и растварано у 75 µL ddH₂O (4 пута разблажење, укупно разблажење 400 пута). Упоредо су прављена разблажења са албумином из говеђег серума (5 mg BSA у 5 mL ddH₂O) за стандардну криву, у запремини од 100 µL. Слепа проба (бланк) је садржала 100 µL ddH₂O. У слепој проби, BSA и узорке додавано је 100 µL 2% натријум додецил сулфата (SDS). Затим је додавано по 1 mL радног раствора по следећој форми:



Na ₂ CO ₃	2 g
NaOH	0,4 g
Допунити до	100 ml ddH ₂ O



0,025 g CuSO ₄ ·5H ₂ O раствореног у 5 mL ddH ₂ O
↓
0,002 g K, Na – тартарата раствореног у 2 mL 0,5% CuSO ₄
↓
1 mL овог раствора помешано је са 49 mL Na ₂ CO ₃ + NaOH

Смеша је инкубирана 10 минута на собној температури. Након тога је додавано 100 µL Folin-Ciocalteu реагенса (Sigma-Aldrich, Немачка) и ddH₂O (1.5 mL фолина у 3 mL ddH₂O) и остављано да стоји 20 минута на собној температури, у мраку до развијања боје. У свим међу фазама слепа проба, BSA и узорак су вортексовани. Апсорбанца је мерена спектрофотометријски на таласној дужини од 750 nm на спектрофотометру S-30 (Воесо, Немачка).

4.7.3. Припрема узорка и SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)

Концентрације протеина у узорцима су разблаживане на 3 mg/mL са ddH₂O. Непосредно пред употребу узорци су мешани са Laemmli Sample Buffer за припрему узорка протеина за SDS-PAGE и β-меркаптоетанолом у односу 1:1, тако да су финалне концентрације у узорцима биле 1,5 mg/mL. После кувања на 100 °C, током 5 минута, узорци су хлађени и наношени на SDS-полиакриламидни гел.

Протеини су раздвајани по молекулским масама SDS-PAGE електрофорезом (*engl.* polyacrylamide gel electrophoresis), (Laemmli, 1970). Електрофореза је рађена на систему Mini Protean II (Bio Rad, Калифорнија, САД). Принцип ове методе заснива се на коришћењу анјонског детерџента SDS који денатурише протеине обмотавајући се око њихових полипептидних веза. Негативно наелектрисан SDS условљава међусобно одбијање, што доводи до раздвајања протеинских ланаца. Протеини у електричном пољу путују према позитивно наелектрисаном полу брзином која зависи искључиво од њихове молекулске масе. Структура полиакриламидног гела пружа отпор кретању протеина при чему се протеини мање молекулске масе крећу брже од протеина веће молекулске масе. Полиакриламидни гел чине гел за раздвајање и гел за сабијање у коме се протеини прво концентришу пре него што пређу у гел за раздвајање. Коришћен је 12% гел за раздвајање (pH 8,8) и 4% гел за сузбијање (pH 6,8).

Полиакриламидни гел за раздвајање:

ddH ₂ O	3,35 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 mL
10% SDS	100 µL
30% акриламид/N’N’-бис-метил-акриламид	4 mL
10% APS	50 µ
TEMED	5µ

Полиакриламидни гел за сабијање:

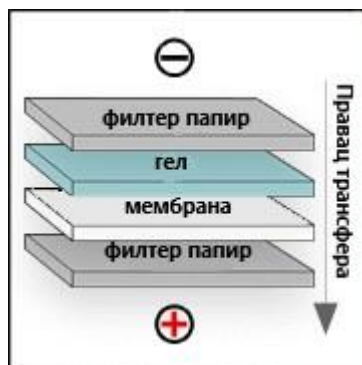
ddH ₂ O	3,05 mL
0,5 M Tris (pH 6,8)	1,25 mL
10% SDS	50 µL
30% акриламид/N’N’-бис-метил-акриламид	665 µL
10% APS	25 µL
TEMED	5µL

На гел је наношено по 30 µL припремљених узорак (~ 45 µg укупних протеина). Електрофореза је трајала око 90 минута при константном напону од 100 V на собној температури и одвијала се у пуферу за електрофорезу који је садржавао 0,25 M TRIS, 0,192 M глицин, 0,1% SDS и ddH₂O. На сваки гел наношен је узорак познатих молекулских маса PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Масачусетс, САД) који се састоји од 9 протеина различитих молекулских маса (10-170 kDa), ради локализовања испитиваних протеина по завршетку електрофорезе и стандардни узорак ради анулирања грешке у процедури.

4.7.4. Трансфер протеина са гела на мембрану

Након завршене електрофорезе вршен је трансфер протеина са гелова на PVDF (поливинилиден флуорид) мембране помоћу Trans-Blott Cell система (Bio Rad, Калифорнија,

САД). Мембране су резане на нешто веће димензије од гела и активирани потапањем у 100% метанол у трајању од 15 секунди, а затим испирани дестилованом водом 2 минута и потапане у трансфер пуфер (неограничено). Мембране и гелови потопани су у трансфер пуфер (20% метанол, 0,192 М глицин, и 0,025 М Tris рН 8,3). Формирани су сендвичи који су се састојали од једног папира Whatman GB003 (Whatman Inc, Велика Британија), полиакриламидног гела, PVDF мембране и још једног папира. Овако направљен сендвич постављан је у рам апарата за трансфер и потапан у пуфер за трансфер. Пренос протеина са гела на PVDF мембрану одвијан је при константној амперажи од 20 mA по гелу, на +4 °C, преко ноћи.



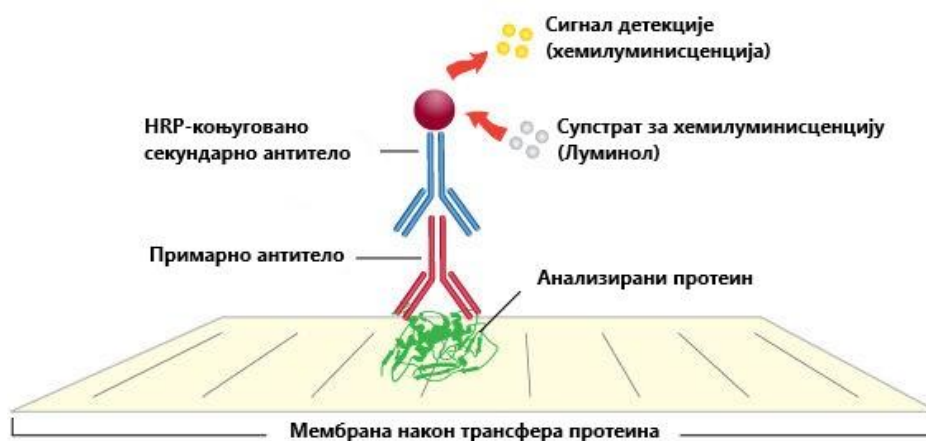
Слика 15: Шематски приказ Western blot „сендвича” (преузето са: <http://www.cardio-research.com/protocols/western-blot>)

4.7.5. Имунодетекција протеина

Бојењем са 1% Ронсеау S бојом раствореној у 5% сирћетној киселини проверавана је успешност трансфера протеина са гела на мембрану. Ронсеау S боја уклањана је испирањем са водом. Потом су PVDF мембране инкубирани 1h у пуферу за блокирање, 5 % немасном млеку у праху раствореном у TBST пуферу (50 mM TRIS HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween-20), на собној температури уз благо мешање. Блокирање мембране омогућава да се слободна, неспецифична места на мембрани заштите тако да се специфична антитела за њих не могу везати. Након тога третирана мембрана је сечена на одређеним молекулским масама и инкубирана преко ноћи на +4 °C са одговарајућим примарним антителима за ТН (anti-ТН, Abscam, Велика Британија, ab 51191, разблажење 1:1000, TBST), DBH (anti-DBH, Abscam, Велика Британија, ab 43868, разблажење 1:2500, TBST), PNMT (anti-PNMT, Abscam, Велика Британија, ab 90862, разблажење 1:1000, TBST), NET (anti-NET, Abscam, Велика Британија, ab 41559, разблажење 1:1000, TBST), VMAT2 (anti-VMAT, Abscam, Велика Британија, ab 81855, разблажење 1:5000, TBST), COMT (anti-COMT, Abscam, Велика Британија, ab 126618, разблажење 1:5000, TBST), MAO-A (anti-MAO-A, Abscam, Велика Британија, ab 126751, разблажење 1:1000, TBST), адреналински α_1 рецептор (anti- α_1 , Santa Cruz Biotechnology, Калифорнија, САД, sc-28982, разблажење 1:500, TBST), адреналински α_2 рецептор (anti- α_2 ,

Santa Cruz Biotechnology, Калифорнија, САД, sc-28983, разблажење 1:500, TBST), адреналински β_1 рецептор, (anti- β_1 , Abcam, Велика Британија, ab 3442, разблажење 1:1000, TBST), адреналински β_2 рецептор (anti- β_2 , Abcam, Велика Британија, ab 182136, разблажење 1:1000, TBST), β -actin (anti beta-Actin, Abcam, Велика Британија, ab 8226, разблажење 1:2500, TBST). По завршеној инкубацији са примарним антителом, мембране су испирание 3 x по 10 минута TBST пуфером на собној температури уз благо мућкање. Након испирања, мембране су инкубирание 1,5 h уз мућкање са секундарним Goat Anti-Rabbit IgG HRP, Abcam, Велика Британија (ab 6721) и Goat Anti-Mouse IgG HRP, Abcam, Велика Британија (ab 6789) антителима (разблажење 1:5000, TBST).

Након инкубације, мембране су опет испирание 3 x по 10 минута у TBST пуферу и наношен је Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Fisher Scientific, Масачусетс, САД). Детекција је вршена у мрачној соби. Мембрана је постављана између две провидне фолије у касети за детекцију Hypercassette (Amersham Life Science, САД), а преко мембране је стављан филм Ortho CPU (Agfa, Белгија). Интензитет сигнала на филмовима, који представља концентрацију одређеног протеина, одређен је дензитометријски. Филмови су скенирани помоћу Lexmark x 2650 а интензитет сигнала квантификован је помоћу програма Image J 2.0. Измерене вредности OD (*engl.* optical density) сигнала су кориговане у односу на позадину и изражене у арбитарним јединицама (а.ј.). Све вредности су изражене у односу на β -actin са истог блота.



Слика 16: Илустрација механизма детекције Western blot сигнала (преузето са:

http://www.leinco.com/general_wb).

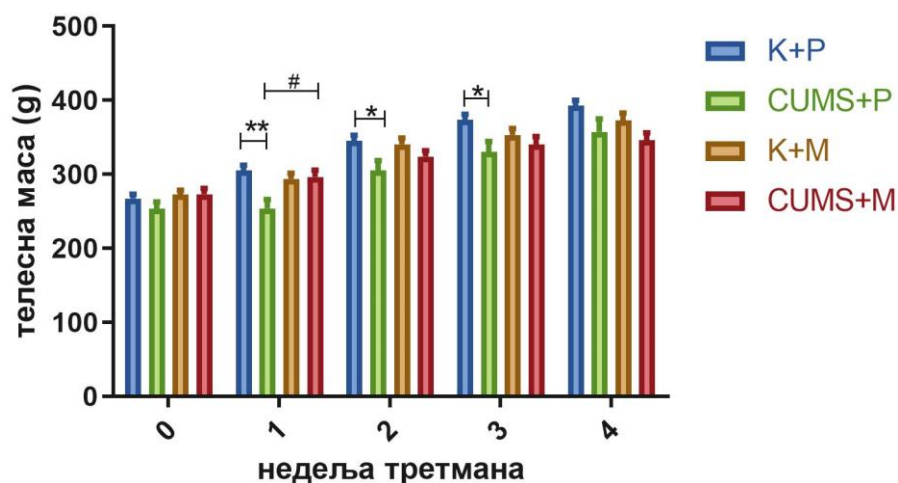
4.8. Статистичка обрада резултата

Сви резултати су обрађени применом одговарајућих статистичких тестова и изражени су као средња вредност \pm стандардна грешка (SEM). Резултати експеримента су статистички анализирани коришћењем анализе варијанси са два фактора (Two-way ANOVA) са циљем да се утврди да ли постоје разлике између средњих вредности за задате факторе различитих експерименталних група. Tuckey Post-hoc анализом је даље утврђивана статистичка значајност између група које су се поредиле. За граничне вредности значајности узимане су вредности $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. Обрада резултата је урађена у софтверском програму OriginPro, верзија 8.0 (OriginLab Corporation, Масачусетс, САД).

5 Результати

5.1. Ефекат мелатонина на морфометријске карактеристике пацова излаганих CUMS

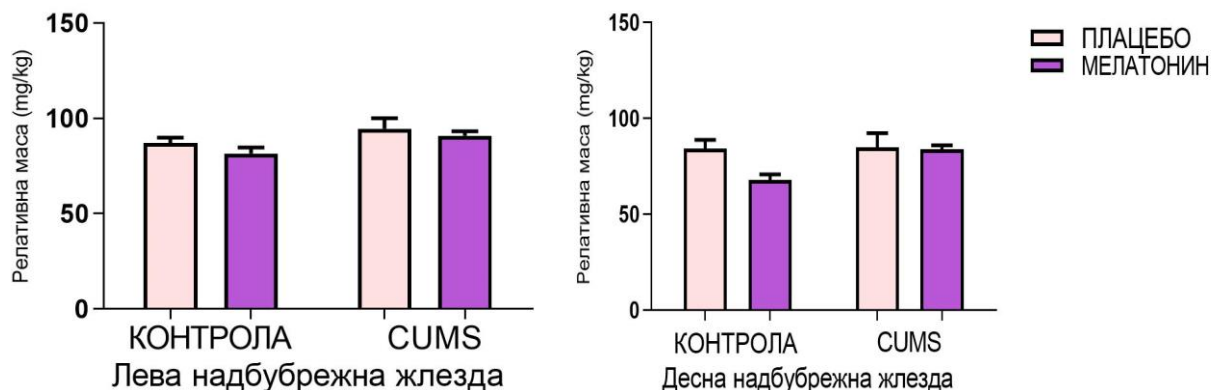
5.1.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на телесну масу нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 17: Телесна маса нестресираних и пацова излаганих CUMS на почетку експеримента и на крају прве, друге, треће и четврте недеље. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 8 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

На Слици 17. приказан је ефекат третмана мелатонином на телесну масу нестресираних и пацова излаганих CUMS. Two-way ANOVA је показала ефекат стреса на телесну масу животиња током прве три недеље експеримента (прва недеља $F_{(1,31)}=5.25$, $p < 0,01$; друга недеља $F_{(1,31)}=8.72$, $p < 0,05$; трећа недеља $F_{(1,31)}=6.72$, $p < 0,05$). Post hoc анализа даље је показала да CUMS након прве недеље доводи до смањена телесне масе за 17% ($p < 0,01$), а након наредне две недеље за 12% ($p < 0,05$). Из приказаних резултата се такође види да третман мелатонином има позитиван ефекат на телесну масу стресираних пацова само у првој недељи (17%, $p < 0,05$). На крају четврте недеље експеримента није постојала статистички значајна разлика у телесној маси животиња.

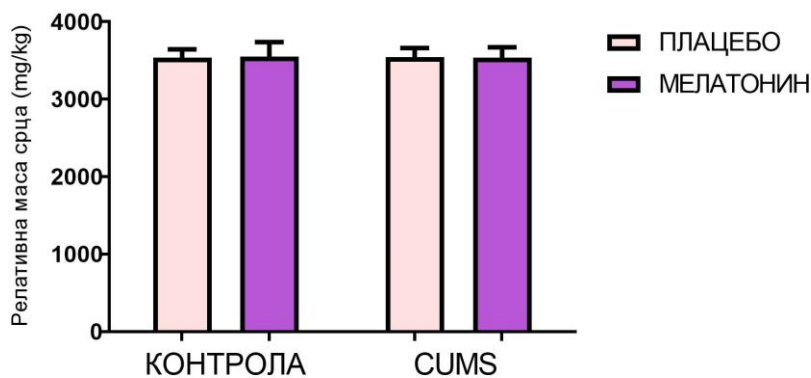
5.1.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на масу леве и десне надбубрежне жлезде нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 18: Ефекат хроничног третмана мелатонином на масу леве и десне надбубрежне жлезде нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 8 пацова.

Приказани резултати на Слици 18. указују да CUMS, као и третман мелатонином, нису имали ефекат на масу леве и десне надбубрежне жлезде.

5.1.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на масу срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

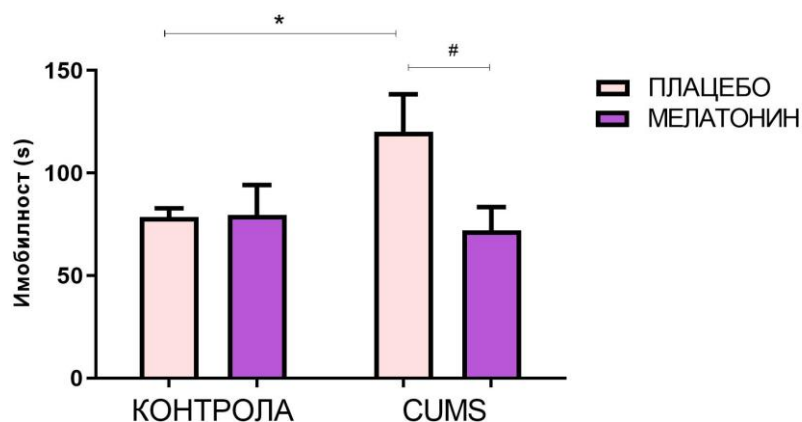


Слика 19. Ефекат хроничног третмана мелатонином на масу срца нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 8 пацова.

Хронични стрес, као и третман мелатонином нису утицали на масу срца нестресираних и стресираних животиња.

5.2. Ефекат мелатонина на понашање пацова излаганих CUMS

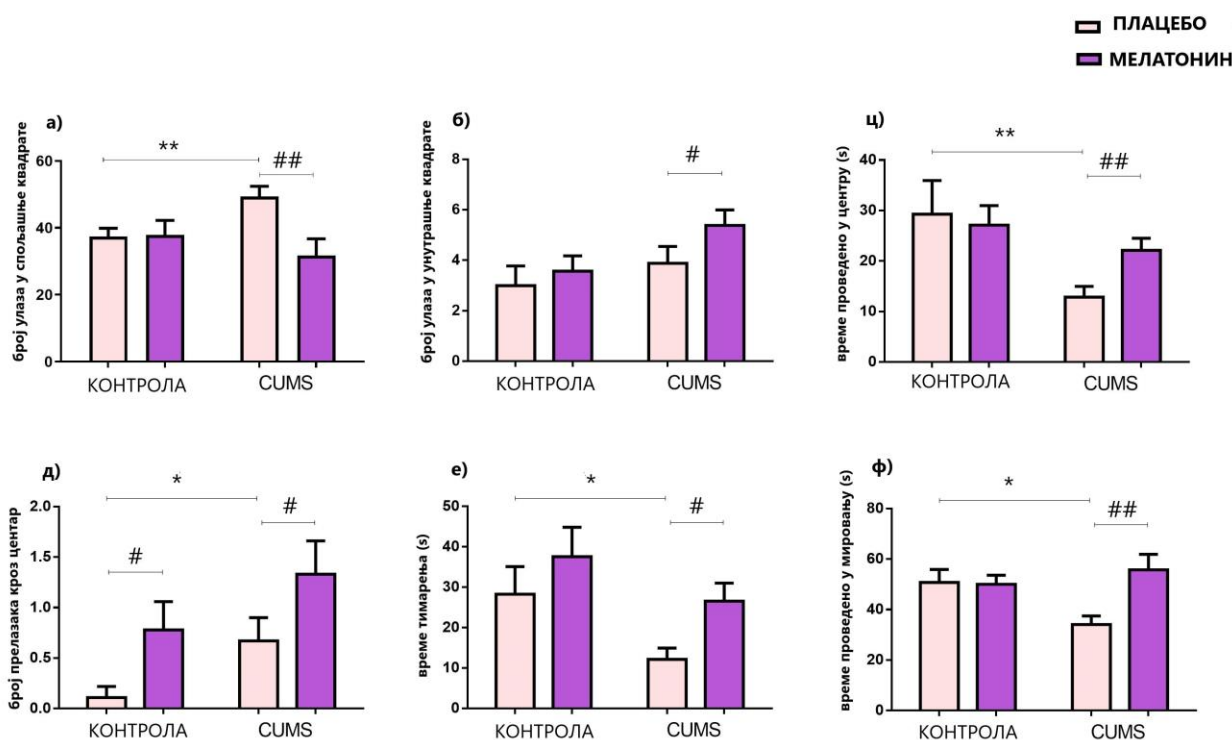
5.2.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на имобилност нестресираних и пацова излаганих CUMS процењивану тестом принудног пливања



Слика 20: Ефекат хроничног третмана мелатонином на имобилност нестресираних и пацова излаганих CUMS у тесту принудног пливања. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 8 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$, плацебо vs. мелатонин.

Two-way ANOVA је показала значајан ефекат третмана мелатонином ($F_{(1,31)}=4.25$; $p < 0,05$) на време које пацов проводи беспомоћно плутајући по води током теста принудног пливања. Хронично излагање непредвидивим стресорима је повећало време имобилности (за 53%, $p < 0,05$). Мелатонин је овај параметар вратио на ниво уочен код контрола ($p < 0,05$) (Слика 20).

5.2.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на локомоцију у тесту отвореног поља нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 21: Ефекат хроничног третмана мелатонином на број улаза у спољне квадрате (а); број улаза у унутрашње квадрате (б); време проведено у центру (в); број прелаза кроз центар (д); време тимарења (е); време проведено у мировању (ф) у тесту отвореног поља нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 8 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Резултати приказани на Слици 21. показују дејство хроничног третмана мелатонином на параметре локомоције у тесту отвореног поља код нестресираних и пацова излаганих CUMS током 28 дана.

Two-way ANOVA роказала је значајне ефекте мелатонина на број улаза у спољашње квадрате ($F_{(1,31)}=6.17$, $p < 0,05$), (Слика 21а). Стресирани пацови су истраживали спољашње квадрате више од нестресираних животиња (за 32%, $p < 0,01$). Третман мелатонином је смањио истраживачку активност у спољним квадратима код пацова излаганих CUMS (16%, $p < 0,01$).

Као што се види на Слици 21б, у тесту отвореног поља, пацови излагани CUMS и пацови из контролне групе улазили су приближно исти број пута у унутрашње квадрате током праћеног периода од 5 минута. Међутим, стресирани животиње третиране са

мелатонином улазили су за 38% више у унутрашње квадрате од пацова излаганих CUMS које су третиране плацебом ($p < 0,05$).

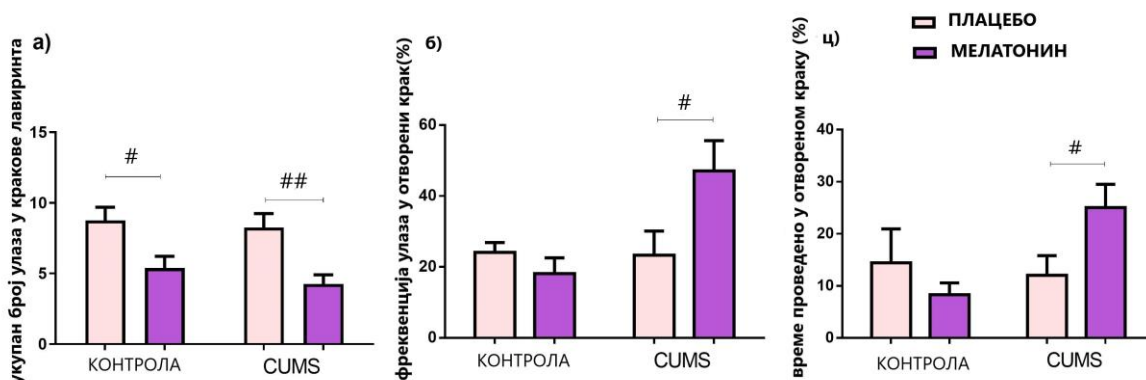
Two-way ANOVA је показала да је хронични стрес имао значајне ефекте ($F_{(1,31)}=10.08$, $p < 0,01$) на време проведено у центру (Слика 21ц). Пацови излагани CUMS проводили су мање времена у центру од контролних пацова (54%, $p < 0,01$). Третман мелатонином је вратио овај параметар на ниво забележен код контрола.

На Слици 21д графички је приказан ефекат CUMS ($F_{(1,31)}=4.82$, $p < 0,05$) и третмана мелатонином ($F_{(1,31)}=6.94$, $p < 0,05$) на укупан број прелаза кроз центар. Из приказаних резултата се види да је хронични стрес значајно повећао број прелаза кроз центар (500%, $p < 0,05$). Третман мелатонином додатно је повећао број прелаза кроз центар како контролних животиња (600%, $p < 0,05$) тако и хронично стресираних пацова (98%, $p < 0,01$).

Значајан ефект стреса ($F_{(1,31)}=5.80$, $p < 0,05$) и третмана мелатонином ($F_{(1,31)}=4.43$, $p < 0,05$) уочили смо и у времену које су пацови провели у тимарењу (Слика 21е). Tukey test је показао да стресирани пацови проводе мање времена у тимарењу (57%, $p < 0,05$) од контрола у тесту отвореног поља. Третман мелатонином подстицао је „улепшавање“ код стресираних јединки (118%, $p < 0,05$).

Two-way ANOVA је показала значајне ефекте мелатонина на време проведено у мировању (Слика 21ф) ($F_{(1,31)}=4.89$, $p < 0,05$) као и интеракцију између третмана и стреса ($F_{(1,31)}=5.62$, $p < 0,05$). Пацови излагани CUMS провели су мање времена у мировању (33%, $p < 0,05$), у односу на контролне животиње. Насупрот томе, стресиране животиње под дејством мелатонина проводили су више времена у мировању (63%, $p < 0,01$).

5.2.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на параметре анксиозности нестресираних и пацова излаганих CUMS у тесту издигнутог плус лавиринта

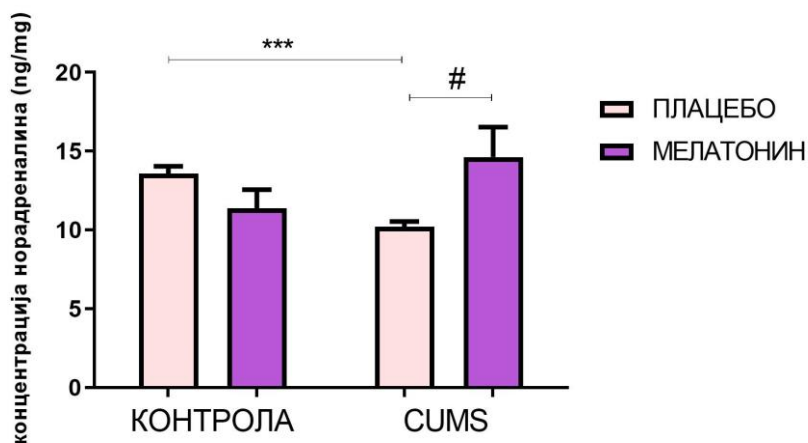


Слика 22. Ефекат хроничног третмана мелатонином на укупни број улазака у кракове лавиринта (а), фреквенцију улазака у отворени крак (б) и проценат времена проведеног на отвореном краку (ц) нестресираних и пацова излаганих CUMS у тесту издигнутог плус

лабирината. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 8 пацова. Статистичка значајност: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Стрес није имао утицај на укупан број улазака у кракове, као и на фреквенцију улазака и време проведено у отвореним крацима лабиринта. Насупрот томе, мелатонин је значајно смањио укупан број улазака у кракове лабиринта како контролних група животиња (за 38%, $p < 0,05$) тако и животиња излаганих CUMS (за 48%, $p < 0,01$), (Слика 22а). Осим тога, мелатонин код хронично стресираних пацова је повећао фреквенцију улазака (за 102%, $p < 0,05$), као и време које су провели у отвореним крацима лабиринта (за 108%, $p < 0,05$) (Слика 22б, ц).

5.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на концентрацију норадреналина у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS

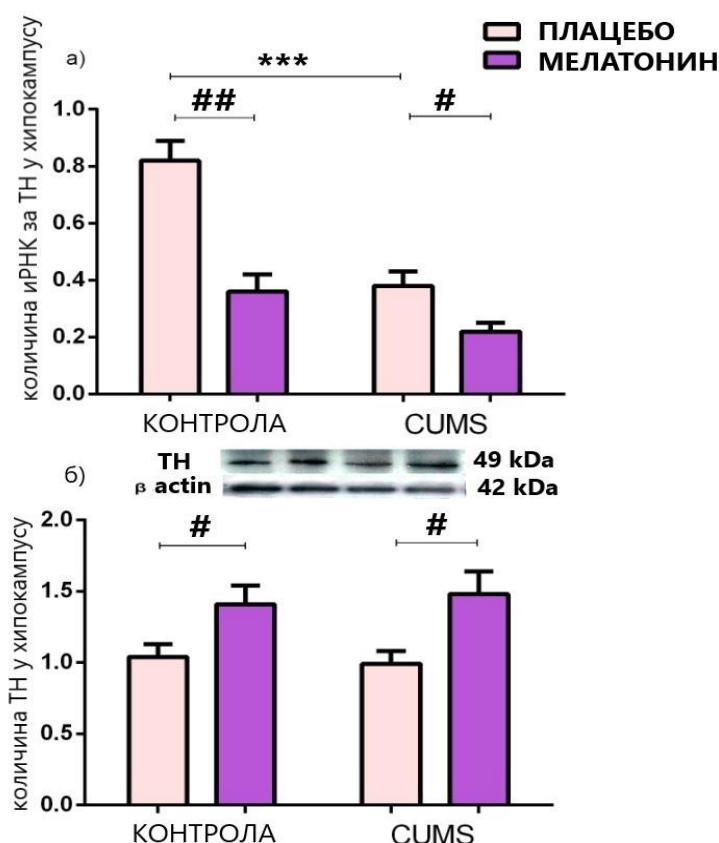


Слика 23: Ефекат хроничног третмана мелатонином на садржај норадреналина у ткиву хипокампуса нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: *** $p < 0,001$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Добијени резултати показују да постоје значајне интеракције између дејства стреса и третмана мелатонином на количину норадреналина у хипокампусу ($F_{(1,23)}=3.56$, $p < 0,05$). Садржај норадреналина у хипокампусу пацова који су излагани CUMS је за 31% мањи у поређењу са нестресираном контролом ($p < 0,001$). Хронична i.p. администрација мелатонина нормализује количину норадреналина у хипокампусу стресираних јединки (52%, $p < 0,05$).

5.4. Ефекат мелатонина на експресију гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у хипокампусу пацова излаганих CUMS

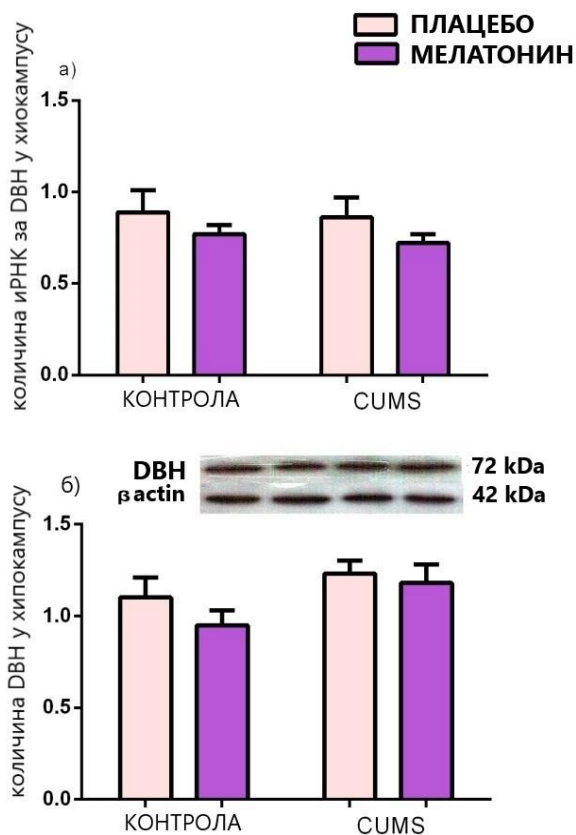
5.4.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 24: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: *** $p < 0,001$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Хронични благи непредвидиви стрес значајно је смањио ниво иРНК за ТН (за 53%, $p < 0,001$), али није утицао на количину овог ензима у хипокампусу (Слика 24). Мелатонин је смањио ниво иРНК за ТН ензим како контролних (за 56%, $p < 0,01$) тако и стресираних животиња (за 42%, $p < 0,05$). Насупрот томе, овај хронични третман је повећао ниво ензима у хипокампусу нестресираних и хронично стресираних пацова ($p < 0,05$).

5.4.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за DBH у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS

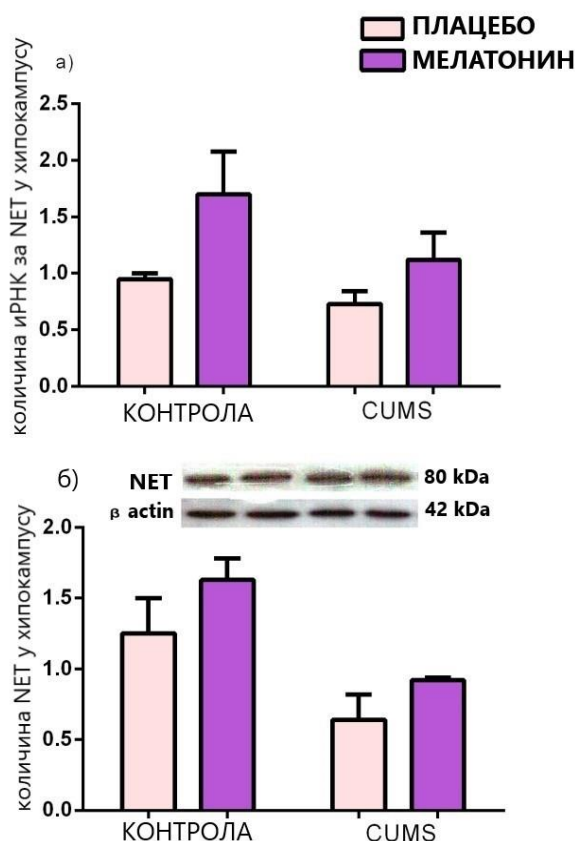


Слика 25: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за DBH у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 25. показују да излагање непредвидивим стресорима као и третман мелатонином нису мењали ниво иРНК за DBH, као и протеинског продукта у хипокампусу свих испитиваних група животиња.

5.5. Утицај мелатонина на експресију гена за транспортере одговорне за преузимање и складиштење катехоламина у хипокампусу пацова излаганих CUMS

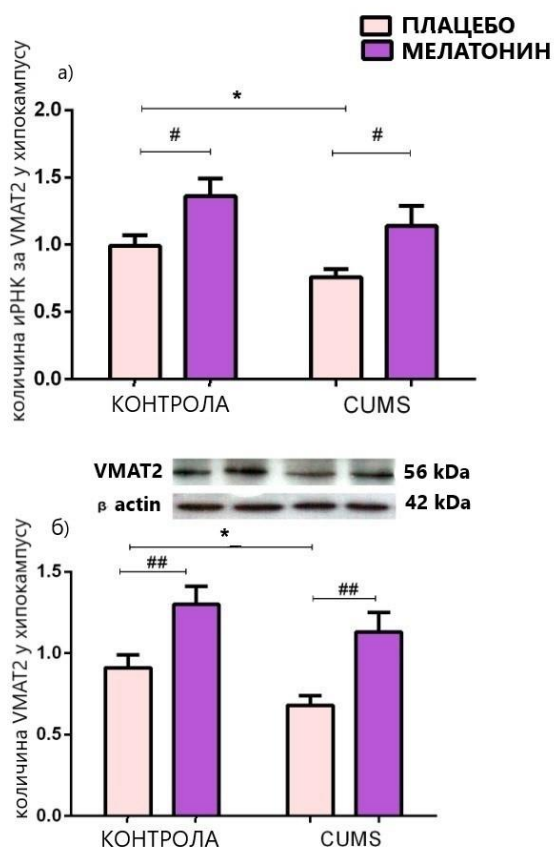
5.5.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 26: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 26. показују да CUMS и мелатонин нису мењали ниво овог транспортера за норадреналин.

5.5.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за VMAT2 у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS

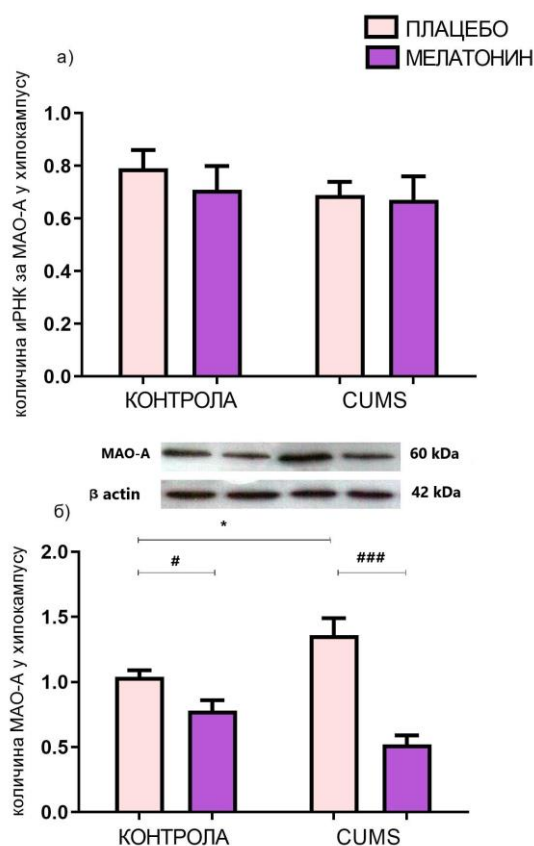


Слика 27: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за VMAT2 у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Приказани резултати указују да је третман мелатонином утицао како на ниво иРНК ($F_{(1,23)}=10.98$, $p < 0,01$) тако и ниво VMAT2 протеина ($F_{(1,23)}=18.06$, $p < 0,001$) у хипокампусу. Хронични стрес је смањив ниво иРНК за овај транспортер за 23% ($p < 0,05$) а ниво протеина за 25% ($p < 0,05$). Насупрот томе, мелатонин је повећао ниво иРНК за VMAT2 у хипокампусу нестресираних (за 37%, $p < 0,05$) и хронично стресираних (за 50%, $p < 0,05$) група животиња. Ово повећање је праћено и повећањем количине овог транспортера код контрола за 43%, а код стресираних јединки за 95% ($p < 0,01$).

5.6. Ефекат мелатонина на експресију гена за ензиме одговорне за разградњу катехоламина у хипокампусу пацова излаганих CUMS

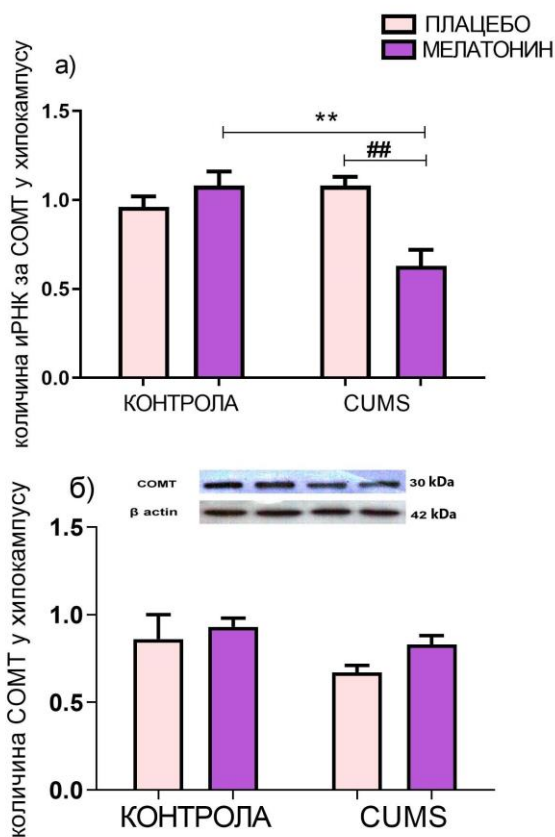
5.6.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за MAO-A у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 28: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за MAO-A у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ плацебо vs. мелатонин.

Из приказаних резултата на Слици 28а уочавамо да излагање животиња хроничном благом непредвидивом стресу, као и третман мелатонином, нису мењали ниво иРНК за MAO-A у хипокампусу свих испитиваних група. Two-way ANOVA је показала значајан ефекат третмана мелатонином ($F_{(1,23)}=38.03$, $p < 0,001$), као и постојање интеракције између третмана и стреса ($F_{(1,23)}=10.52$, $p < 0,01$) на ниво MAO-A. CUMS је довео до повећања овог ензима (за 31%, $p < 0,05$), док је третман мелатонином смањио овај параметар у хипокампусу пацова контролне (за 25%, $p < 0,05$) и стресиране групе (за 62%, $p < 0,001$) (Слика 28б).

5.6.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS

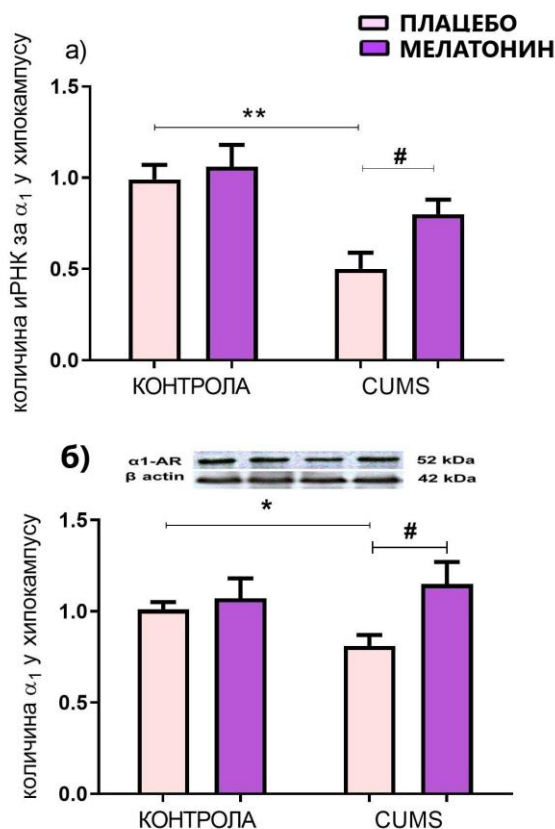


Слика 29: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних контрола и пацова излаганих CUMS. Резултати су приказани као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Као што се са Сlike 29. може уочити излагање CUMS није мењало експресију гена за COMT у хипокампусу. Мелатонин је смањио ниво иРНК за овај ензим који разграђује катехоламинe у хипокампусу стресираних пацова (за 43%, $p < 0,01$).

5.7. Експреција гена за адреналинске рецепторе у хипокампусу пацова излаганих CUMS

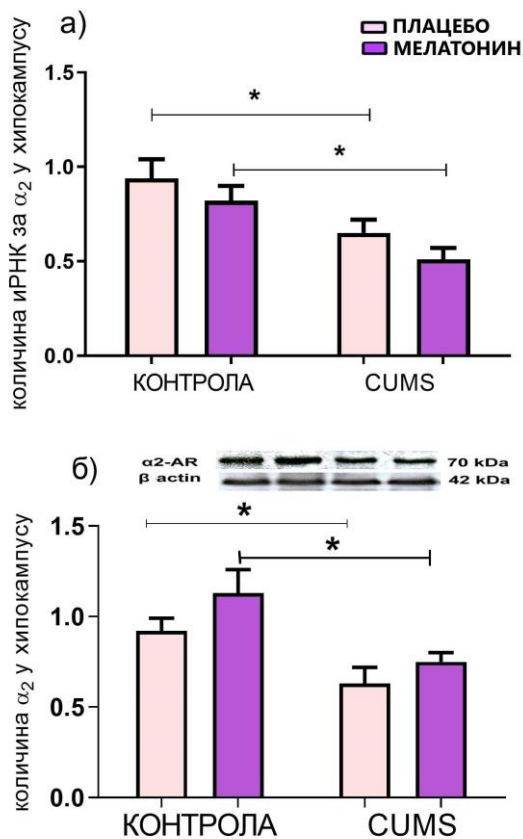
5.7.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију α_1 адреналинског рецептора у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 30: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за α_1 адреналински рецептор у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Код животиња излаганих CUMS, значајно су смањена експресија гена за α_1 адреналински рецептор на нивоу иРНК (за 50%, $p < 0,01$) и протеина (за 80%, $p < 0,05$) (за 80%, $p < 0,05$) у поређењу са контролном групом. Третман мелатонином повећао је генску експресију овог рецептора у хипокампусу хронично стресираних животиња ($p < 0,05$) и тиме вратио ову вредност на контролни ниво.

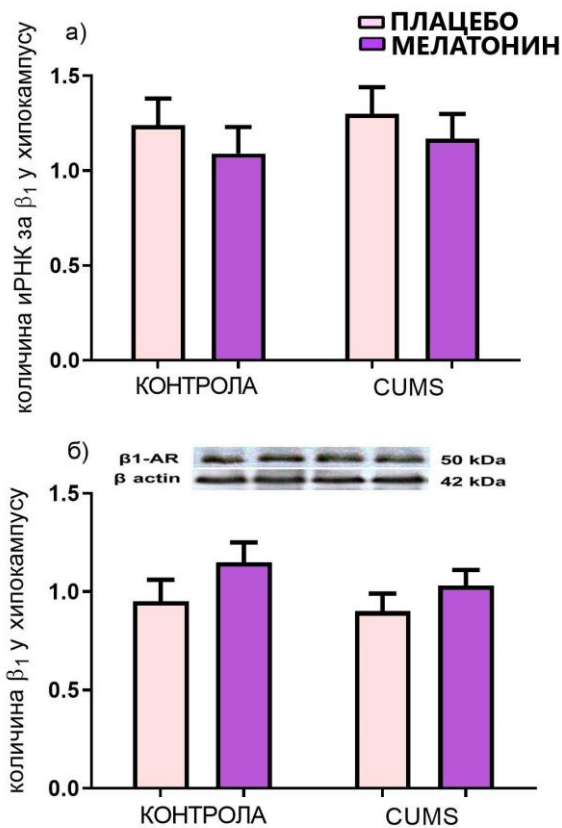
5.7.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за α_2 адреналински рецептор у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 31: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за α_2 адреналински рецептор у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS.

Резултати приказани на Слици 31. указују да је CUMS снизио генску експресију α_2 адреналинског рецептора у хипокампусу (за 69%, $p < 0,05$), и да мелатонин није имао утицаја на експресију овог рецептора.

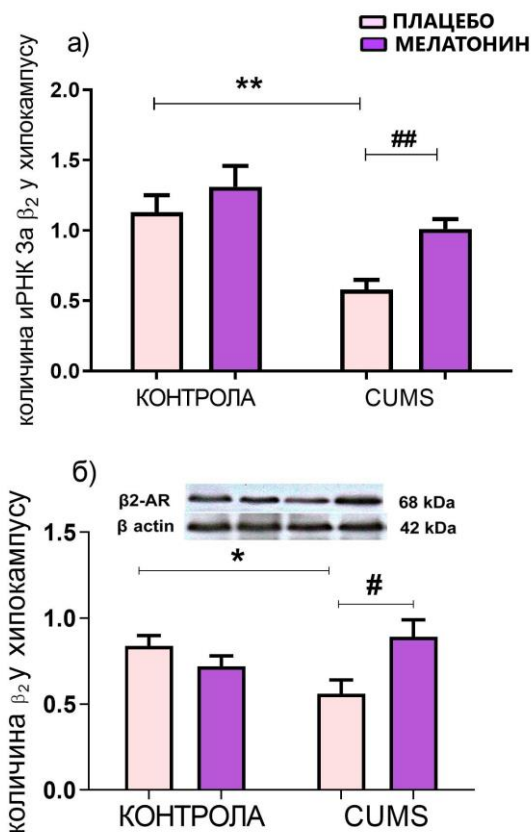
5.7.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 32: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 32. указују да не постоји статистички значајна разлика у експресији β_1 адреналинског рецептора у хипокампусу свих експерименталних група.

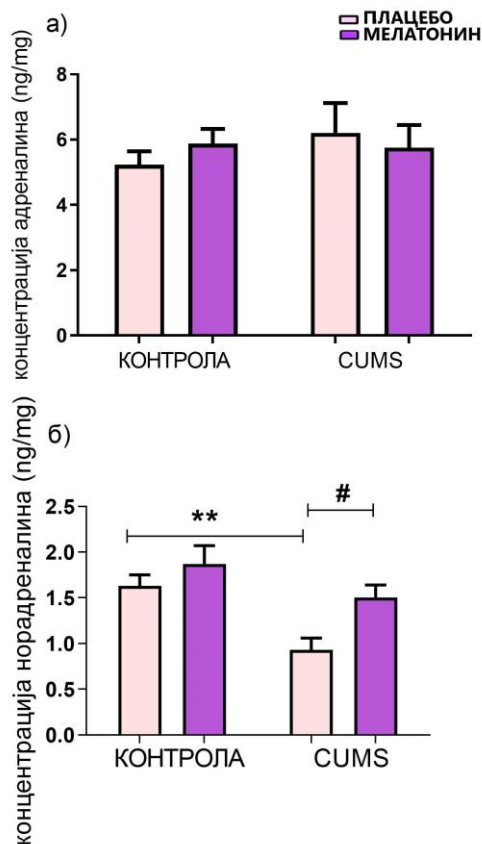
5.7.4. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 33: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у хипокампусу на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Two-way ANOVA показала је значајне ефекте излагања хроничном благом непредвидивом стресу ($F_{(1,23)}=15.55$, $p < 0,001$) као и третмана мелатонином ($F_{(1,23)}=7.93$, $p < 0,05$) на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у хипокампусу. Осим тога, постоји значајна интеракција између третмана и стреса ($F_{(1,23)}=8.78$, $p < 0,01$) у количини β_2 адреналинског рецептора. Хронични стрес је довео до значајног смањења експресије гена за β_2 адреналински рецептор на нивоу иРНК (за 49%, $p < 0,01$) и протеина (за 33%, $p < 0,05$). Мелатонин повећава експресију гена за овај рецептор хронично стресираних животиња враћајући ову вредност на контролни ниво.

5.8. Дејство хроничног третмана мелатонином на концентрацију адреналина и норадреналина у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS

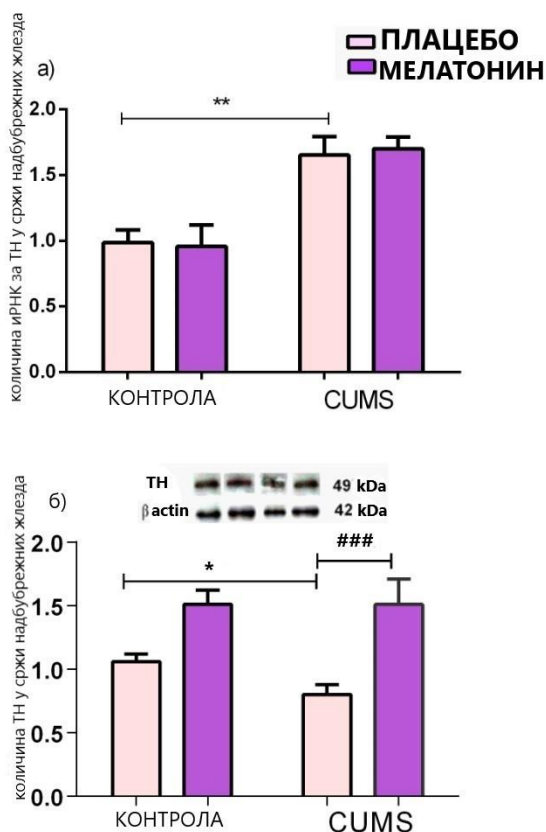


Слика 34: Ефекат хроничног третмана мелатонином на садржај адреналина (а) и норадреналина (б) у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Резултати графички приказани на Слици 34. показују дејство третмана мелатонином на концентрацију катехоламина у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и хронично стресираних пацова. Под испитиваним условима у овој студији није дошло до промене у нивоу адреналина ни под дејством CUMS ни под дејством третмана мелатонином. Two-Way ANOVA анализа је показала значајан ефекат стреса ($F_{(1,23)}=26.09$, $p < 0,001$), третмана ($F_{(1,23)}=21.47$, $p < 0,001$) и интеракцију између стреса и третмана мелатонином ($F_{(1,23)}=6.89$, $p < 0,05$) на садржај норадреналина у сржи надбубрежних жлезда. Post-hoc анализа је показала да у поређењу са контролним животињама стрес доводи до значајног смањења норадреналина (45%, $p < 0,01$). Насупрот овоме, третман мелатонином је повећао садржај норадреналина у надбубрежним жлездама код стресираних животиња (за 60%, $p < 0,05$).

5.9. Ефекат мелатонина на експресију гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у сржи надбубрежних жлезда пацова излаганих CUMS

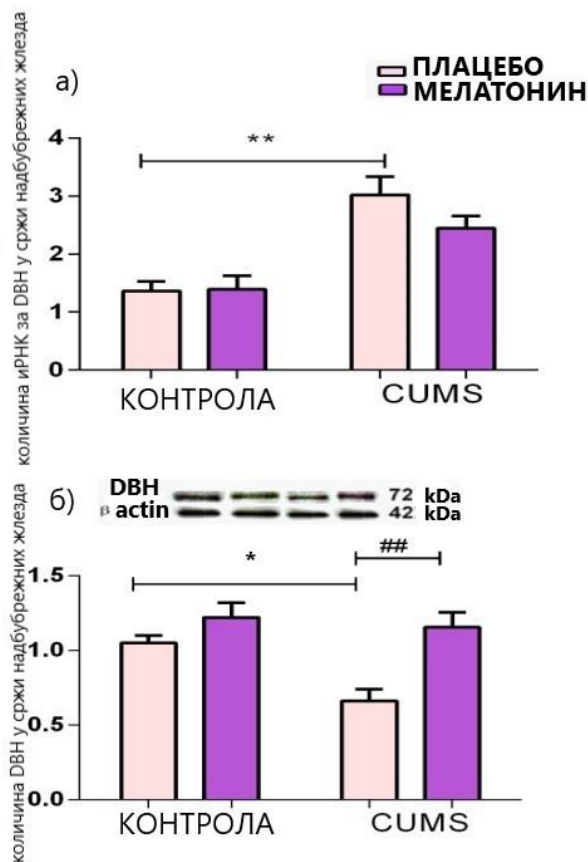
5.9.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 35: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН у сржи надбубрежних жлезда на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; ### $p < 0,001$ плацебо vs. мелатонин.

Анализом варијанси са два фактора (Two-way ANOVA) показано је да је стрес ($F_{(1,23)}=32.04$, $p < 0,001$) имао ефекта на ниво иРНК за ТН, као и постојање интеракције између стреса и третмана мелатонином ($F_{(1,23)}=6.09$, $p < 0,001$) на ниво ТН у сржи надбубрежних жлезда испитиваних животиња. Post-hoc анализом је утврђено да је CUMS повећао ниво иРНК за ТН (за 70%, $p < 0,01$), али је истовремено довео до снижења количине овог ензима (за 24%, $p < 0,05$). Мелатонин није утицао на ниво иРНК за ТН, али значајно повећава количину овог ензима (за 95%, $p < 0,001$) у надбубрежним жлездама стресираних пацова.

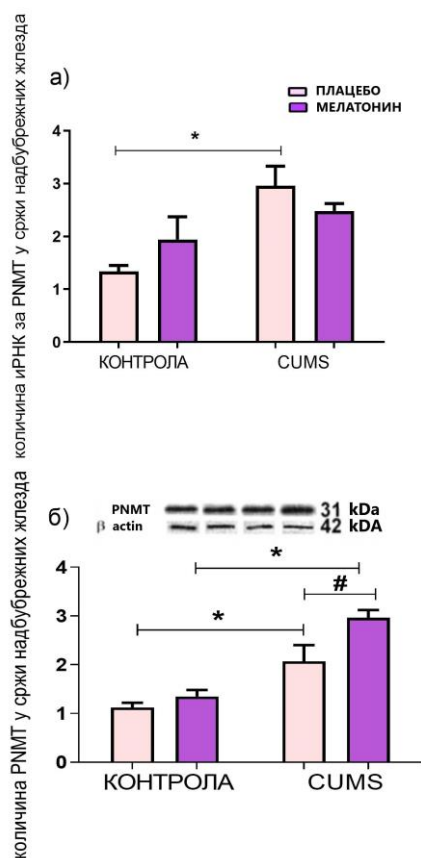
5.9.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за DBH у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 36: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за DBH у сржи надбубрежних жлезда на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Резултати у овој студији показали су да је стрес значајно утицао ($F_{(1,23)}=7.71$, $p < 0,01$) на ниво иРНК за DBH, а мелатонин је утицао на количину овог ензима ($F_{(1,23)}=14.55$, $p < 0,001$) у сржи надбубрежних жлезда. Post-hoc анализа је показала да је стрес повећао ниво иРНК за DBH у надбубрежним жлездама за 123% ($p < 0,01$), али истовремено је довео до снижења количине овог ензима за 22% ($p < 0,05$). Третман мелатонином није мењао ниво иРНК за DBH, али је повећао количину овог ензима у надбубрежним жлездама стресираних животиња и тиме их свео на вредности забележене у надбубрежним жлездама контролне групе животиња ($p < 0,01$) (Слика 36).

5.9.3. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS



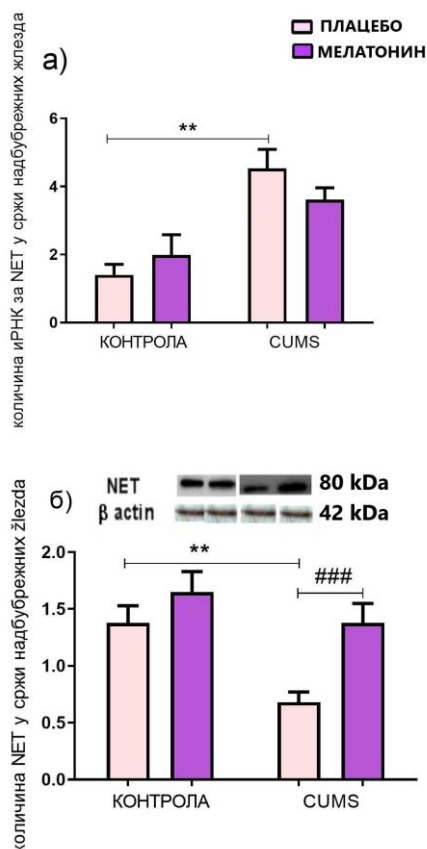
Слика 37: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у сржи надбубрежних жлезда на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Добијени резултати приказани на Слици 37. показују да је стрес имао значајан ефекат на ниво иРНК за PNMT ензим ($F_{(1,23)}=7.70$, $p < 0,05$) у сржи надбубрежних жлезда. Осим тога, и стрес ($F_{(1,23)}=39.59$, $p < 0,001$) и мелатонин ($F_{(1,23)}=7.80$, $p < 0,05$) значајно утичу на количину овог ензима у надбубрежним жлездама.

CUMS је довео до повећања како нивоа иРНК за PNMT ензим (за 113%, $p < 0,001$) тако и количине овог ензима (за 179%, $p < 0,05$) у сржи надбубрежних жлезда. Третман мелатонином није утицао на ниво иРНК овог ензима, али је додатно повећао количину PNMT код стресираних пацова (за 42%, $p < 0,05$).

5.10. Ефекат мелатонина на експресију гена за транспортере одговорне за преузимање и складиштење катехоламина у сржи надбубрежних жлезда пацова излаганих CUMS

5.10.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS

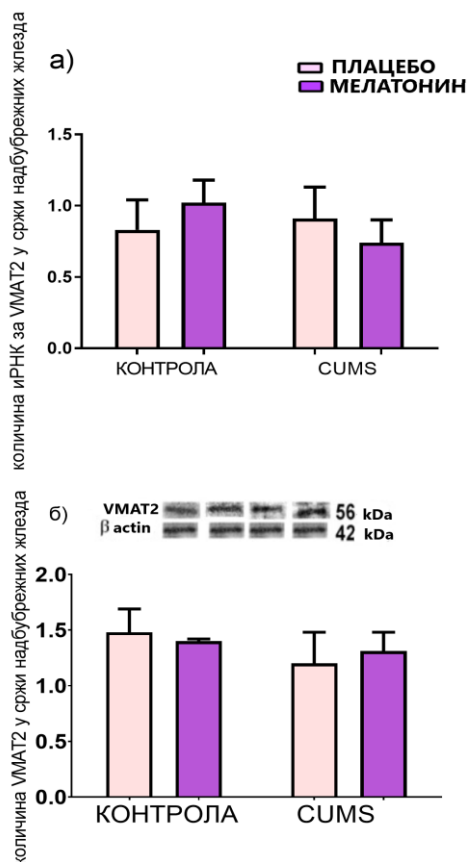


Слика 38: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у сржи надбубрежних жлезда на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; ### $p < 0,001$ плацебо vs. мелатонин.

Резултати у овој студији су показали значајан ефекат стреса ($F_{(1,23)}=26.82$, $p < 0,01$) на ниво иРНК за NET. Осим тога, стрес ($F_{(1,23)}=9.93$, $p < 0,05$) и мелатонин ($F_{(1,23)}=7.92$, $p < 0,01$) утицали су значајно на количину овог транспортера у сржи надбубрежних жлезда.

Хронично излагање животиња CUMS довело је до повећања нивоа иРНК за NET (за 322%, $p < 0,01$), али до смањења количине овог транспортера за 51% ($p < 0,01$) у сржи надбубрежних жлезда. Третман мелатонином није утицао на ниво иРНК за NET, али је код стресираних животиња вратио количину NET на ниво забележен код нестресираних животиња.

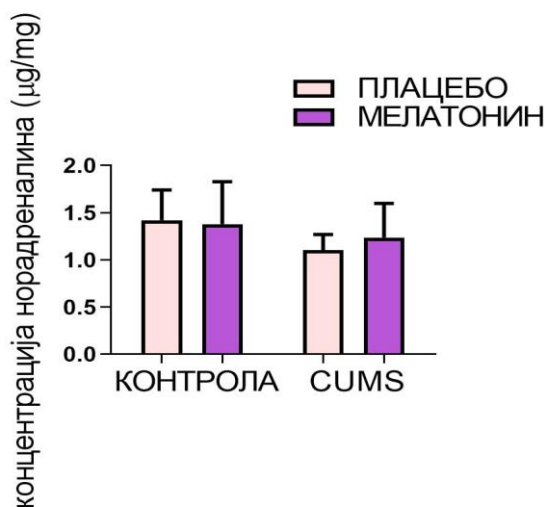
4.10.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за VMAT2 транспортер у сржи надбубрежних жлезда нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 39: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за VMAT2 транспортер у сржи надбубрежних жлезда на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Како се на Слици 39. може видети, CUMS, као и третман мелатонином нису мењали експресију гена за VMAT2 у сржи надбубрежних жлезда.

5.11. Дејство хроничног третмана мелатонином на концентрацију норадреналина у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS



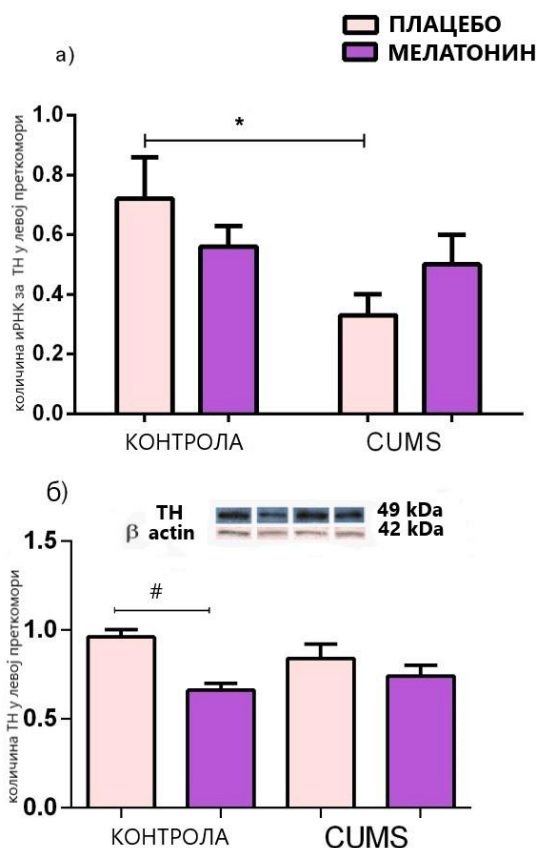
Слика 40: Ефекат хроничног третмана мелатонином на садржај норадреналина у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 38. указују да хронично излагање пацова хроничним непредвидивим стресорима, као и третман мелатонином нису мењали концентрацију норадреналина у левој комори срца.

Концентрација норадреналина у левој преткомори је била сувише ниска да би се детектовала HPLC методом.

5.12. Експресија гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у левој преткомори срца пацова излаганих CUMS

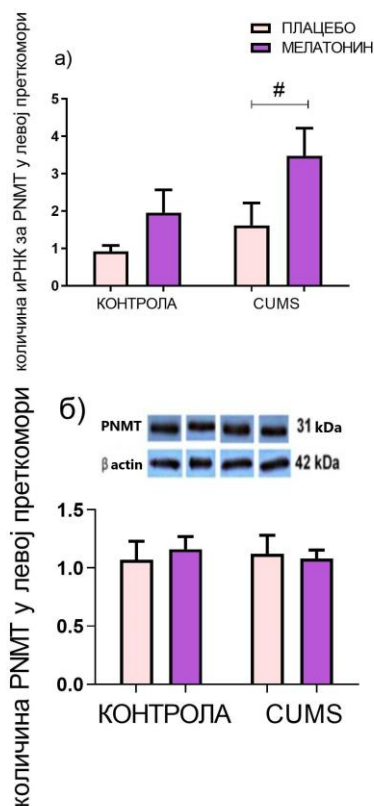
5.12.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 41: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН у левој преткомори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Статистичка анализа резултата је показала да је хронични стрес утицао на ниво иРНК за ТН ($F_{(1,23)}=4.72$, $p < 0,05$), док мелатонин утиче на количину овог ензима ($F_{(1,23)}=12.82$, $p < 0,001$) у левој преткомори срца (Слика 41). Излагање CUMS статистички значајно је смањило ниво иРНК за ТН (за 55%, $p < 0,05$), али није утицало на количину овог ензима у преткомори. Хронични третман мелатонином није утицао на ниво иРНК, али је смањило количину ТН у левој преткомори срца нестресираних пацова (за 32%, $p < 0,05$).

5.12.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

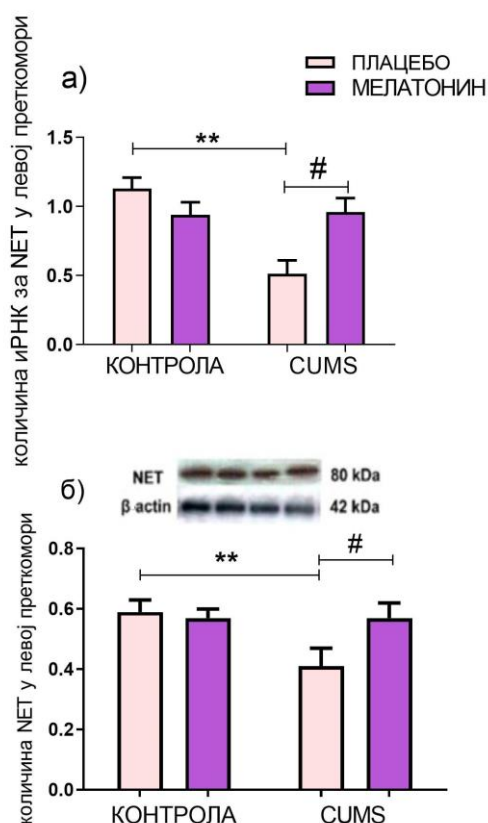


Слика 42: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у левој преткомори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова: # $p < 0,05$, контрола vs. CUMS.

Резултати графички приказани на Слици 42. показују да третман је мелатонином имао значајан ефекат ($F_{(1,23)}=10.65$, $p < 0,01$) на ниво иРНК за PNMT. CUMS није мењао експресију гена за PNMT у левој преткомори, док је хронични третман мелатонином повећао за 114% ($p < 0,05$) само ниво иРНК за овај ензим код хронично стресираних животиња.

5.13. Експресија гена за транспортере одговорне за преузимање катехоламина у левој преткомори срца пацова излаганих CUMS

5.13.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

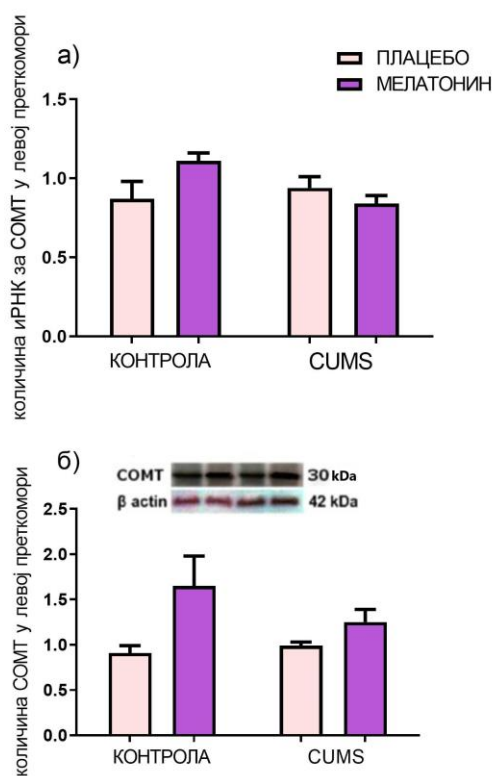


Слика 43: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у левој преткомори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати супредстављени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Анализа резултата приказаних на Слици 43. указала је на постојање интеракције стреса и третмана мелатонином како на нивоу иРНК за NET ($F_{(1,23)}=16.77$, $p < 0,001$), тако и на количину овог транспортера ($F_{(1,23)}=4.63$, $p < 0,05$) у левој срчаној преткомори пацова. Хронично излагање стресу у левој преткомори је довело до смањења како нивоа иРНК (за 55%, $p < 0,01$) за NET, тако и количине овог транспортера (за 30%, $p < 0,01$). Мелатонин је довео до повећања генске експресије за NET ($p < 0,05$) код животиња излаганих CUMS и тиме је вратио његове вредности на ниво забележен код контрола.

5.14. Експресија гена за ензиме одговорне за разградњу катехоламина у левој преткомори срца пацова излаганих CUMS

5.14.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

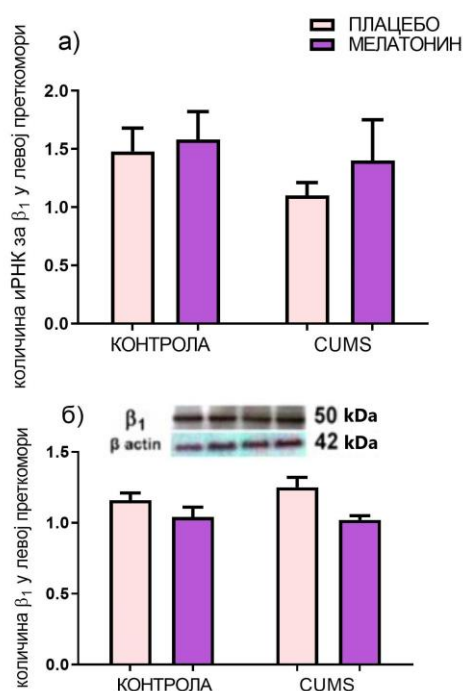


Слика 44: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у левој преткомори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 44. показују да хронично излагање непредвидивим стресорима, као и третман мелатонином нису значајно мењали експресију гена за COMT у левој преткомори срца.

5.15. Експресија гена за адреналинске рецепторе у левој преткомори пацова излаганих CUMS

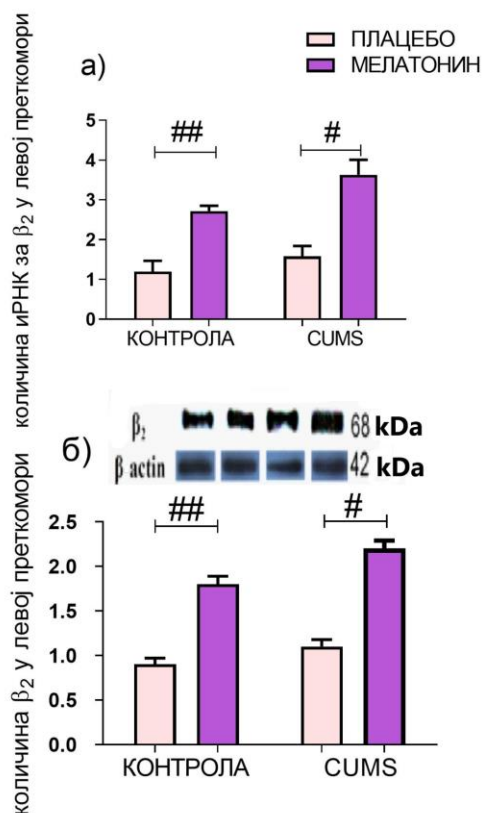
5.15.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 45: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој преткомори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

На Слици 45. је графички приказан ефекат стреса и третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој преткомори срца. Анализа резултата је показала да ни CUMS ни третман мелатонином нису мењали експресију гена за β_1 адреналински рецептор, како на нивоу иРНК тако и на нивоу протеина.

5.15.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у левој преткомори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

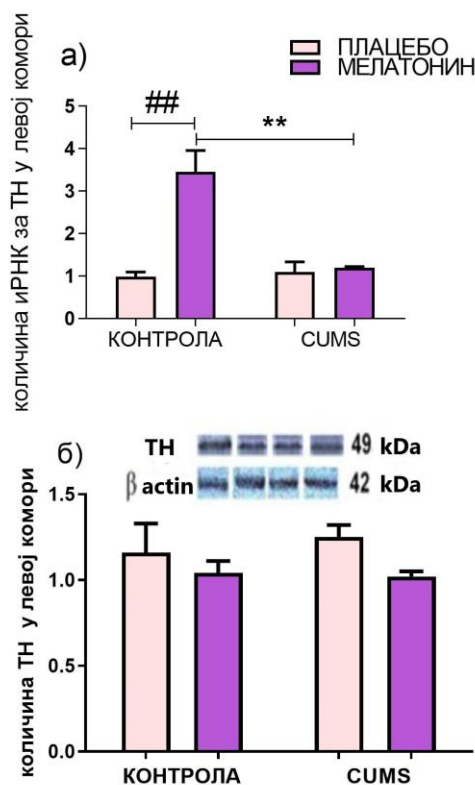


Слика 46: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у левој преткомори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

CUMS није утицао на експресију гена за β_2 адреналински рецептор, али је утврђено да је третман мелатонином имао значајан утицај на ниво иРНК ($F_{(1,23)}=44.34$, $p < 0,001$) и на количину ($F_{(1,23)}=5.21$, $p < 0,001$) овог рецептора у левој преткомори срца. Мелатонин је повећао експресију гена за овај адреналински рецептор како код нестресираних животиња ($p < 0,01$), тако и код пацова излаганих CUMS ($p < 0,05$).

5.16. Експресија гена за ензиме који учествују у синтези катехоламина у левој комори срца пацова излаганих CUMS

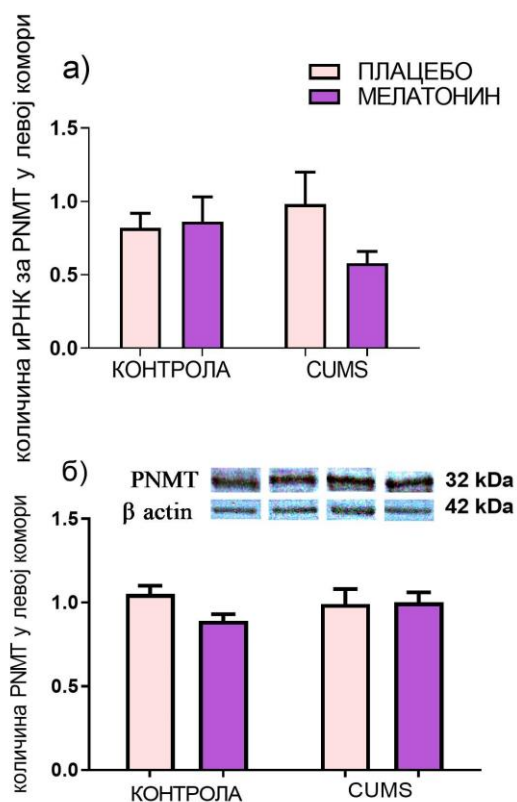
5.16.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 47: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за ТН у левој комори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

CUMS није мењао експресију гена за ТН у левој комори срца. Анализом резултата утврђен је значајан ефекат третмана мелатонином ($F_{(1,23)}=29.82$, $p < 0,001$) на количину иРНК за ТН у левој комори срца. Накнадном анализом утврђено је да мелатонин доводи до повећања количине иРНК овог ензима (за 252%, $p < 0,01$) у левој комори срца нестресираних животиња али да нема ефекта на експресију гена за ТН на нивоу протеина.

5.16.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

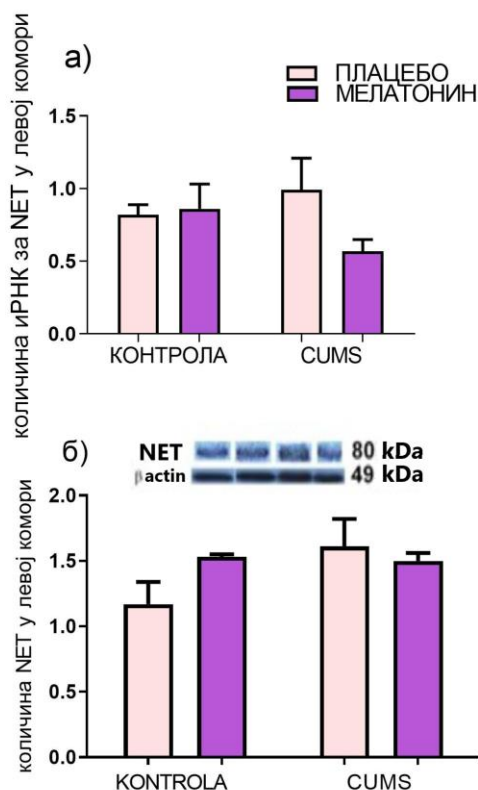


Слика 48: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за PNMT у левој комори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 48. показују да хронично излагање благим непредвидивим стресорима, као и третман мелатонином нису мењали експресију гена за PNMT у левој комори срца.

5.17. Експресија гена за транспортере одговорне за преузимање и складиштење катехоламина у левој комори срца пацова излаганих CUMS

5.17.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

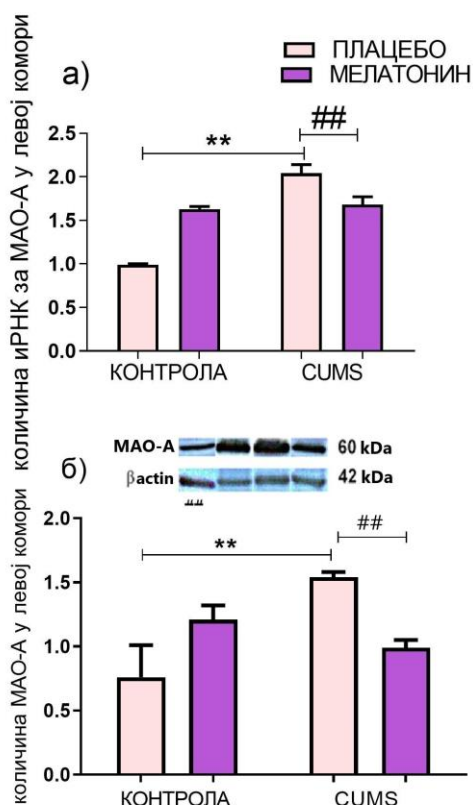


Слика 49: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за NET транспортер у левој комори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 49. показују да ни CUMS ни мелатонин нису мењали генску експресију за NET транспортер у левој комори, како на нивоу иРНК тако и на нивоу протеина.

5.18. Експресија гена за ензиме одговорне за разградњу катехоламина у левој комори срца пацова излаганих CUMS

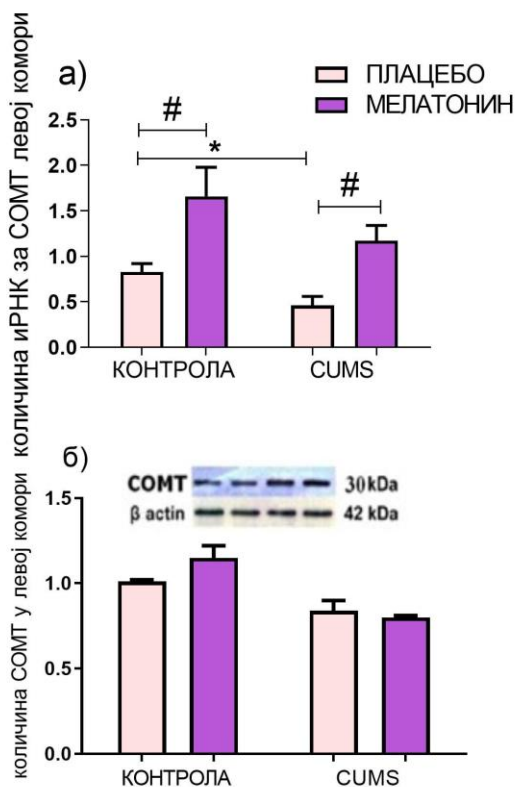
5.18.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за MAO-A ензим у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 50: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за MAO-A у левој комори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: ** $p < 0,01$ контрола vs. CUMS; ## $p < 0,01$ плацебо vs. мелатонин.

Промене као резултат интеракције хроничног стреса и третмана мелатонином на нивоу иРНК ($F_{(1,23)}=48.13$, $p < 0,001$) и количине ($F_{(1,23)}=69.28$, $p < 0,001$) MAO-A у левој комори пацова су приказане на Слици 48. CUMS је повећао експресију гена за MAO-A у левој комори срца ($p < 0,01$), док је мелатонин смањио експресију гена за MAO-A у левој комори срца стресираних пацова ($p < 0,01$).

5.18.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

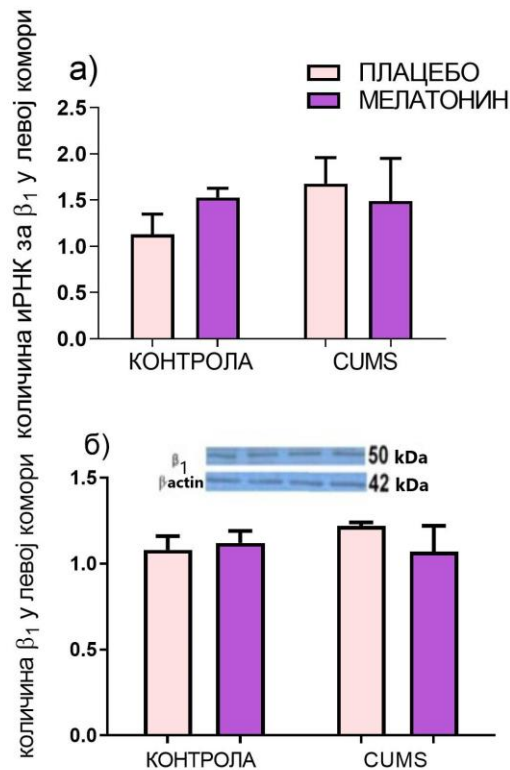


Слика 51: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за COMT у левој комори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Третман мелатонином у трајању од 28 дана имао је значајан ефекат ($F_{(1,23)}=9.50$, $p < 0,001$) на количину иРНК за COMT у левој комори. Анализа резултата је показала да је CUMS смањио ниво иРНК за COMT (за 45%, $p < 0,05$). С друге стране, мелатонин је повећао количину иРНК за овај ензим у левој комори срца нестресираних (за 100%, $p < 0,05$) и стресираних пацова (за 154%, $p < 0,05$). Нису уочене промене у експресији гена за COMT у левој комори срца на нивоу протеина.

5.19. Експресија гена за адреналинске рецепторе у левој комори срца пацова хронично излаганих CUMS

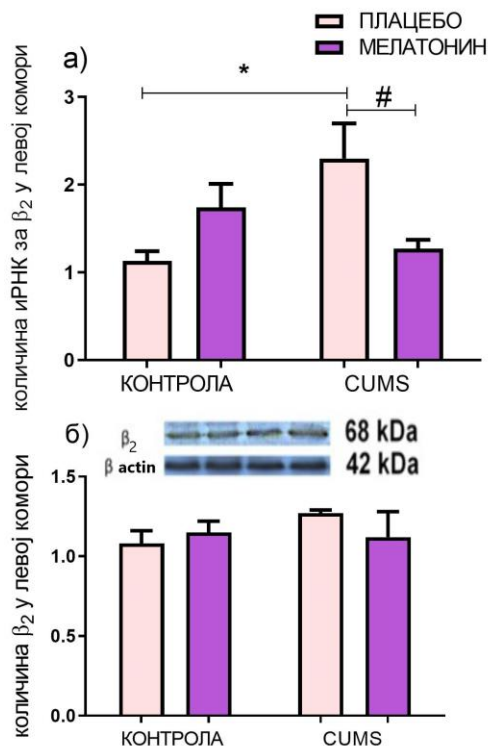
5.19.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 52: Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој комори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова.

Резултати приказани на Слици 52. показују да хронично излагање непредвидивим стресорима, као и третман мелатонином нису значајно мењали експресију гена за β_1 адреналински рецептор у левој комори срца.

5.19.2. Дејство хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у левој комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS



Слика 53. Ефекат хроничног третмана мелатонином на експресију гена за β_2 адреналински рецептор у левој комори срца на нивоу иРНК (а) и протеина (б) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Резултати су представљени као средња вредност \pm SEM за узорак од 6 пацова. Статистичка значајност: * $p < 0,05$ контрола vs. CUMS; # $p < 0,05$ плацебо vs. мелатонин.

Излагање хроничном стресу у интеракцији са третманом мелатонином у трајању од 28 дана имао је значајан ефекат ($F_{(1,23)}=31.81$, $p < 0,001$) на количину иРНК за β_2 адреналински рецептор у левој комори срца. CUMS је значајно повећао количину иРНК за овај адреналински рецептор (за 103%, $p < 0,05$). Мелатонин, с друге стране, је смањио количину иРНК (за 45%, $p < 0,05$) за β_2 рецептор и вратио овај параметар код стресираних пацова на контролни ниво. Излагање CUMS, као и хронично давање мелатонина нису утицали на количину β_2 адреналинског рецептора у левој комори срца.

6 Дискусија

Стрес је неопходан за преживљавање али предуго, прекомерно излагање може постати штетно за организам (Ellis и Del Guidice, 2014), када може нарушити физиолошки и психолошки баланс. Хронични непредвидиви и неконтролисани стресори представљају велики ризик за развој депресије и кардиоваскуларних обољења (Liu и сар., 2017). У овој студији коришћен је CUMS, један од најрелевантнијих анималних модела депресије који изазива симптоме налик онима уоченим код пацијената са депресијом и повезаним поремећајима расположења (Chakravarty и сар., 2013). Депресивна обољења се дефинишу као комбинација неколико симптома: губитак осећаја задовољства и интересовања за свакодневне обавезе, поремећај сна и апетита, осећај кривице, слаба концентрација и умор (Yrondi и сар., 2017). Већ су поменута предвиђања да ће депресија до 2030. године бити на другом месту водећих болести у свету, услед континуираног повећања нивоа стреса. Неке студије показују да око половина популације (можда чак и већина) може очекивати једну или више епизода депресије у току живота (Moffitt и сар., 2010). Моноамински систем има важну улогу у патофизиологији и третману депресије. Модерна моноаминска хипотеза указује да повећање количине моноаминских неуротрансмitera у синапси представља први корак у серији каскадних одговора на третман антидепресивима (Xu и сар., 2016). Мелатонин је неурохормон који регулише многобројне физиолошке функције као што су расположење, понашање и циркардијална хомеостаза (Haridas и сар., 2013). Многе студије показују да мелатонин испољава седативно, анксиолитичко и антидепресивно дејство (Parr и сар., 2006; Detanico и сар., 2009; Ramirez-Rodriguez и сар., 2014). Смањено ослобађање мелатонина током ноћи доказано је у анималном моделу депресије и код пацијената којима је постављена дијагноза депресије (Cai и сар., 2012). У складу са изнетим подацима да мелатонин може да има анксиолитички и антидепресивни ефекат и да утиче на SAM и KVS, у овом истраживању је испитивано његово дејство на понашање животиња, количину катехоламина као и експресију гена за ензиме њихове синтезе и разградње, транспортере и α_1 , α_2 , β_1 и β_2 адреналинске рецепторе у хипокампусу, срцу и надбубрежним жлездама животиња у анималном моделу депресије.

6.1. Дејство хроничног третмана мелатонином на телесну масу и масу леве и десне надбубрежне жлезде и срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

Прва серија експеримената односила се на проучавање ефекта CUMS и третмана мелатонином на телесну масу и масу органа (надбубрежних жлезда и срца) нестресираних и пацова излаганих CUMS. Улогу стреса у развоју и/или одржавању промењених образаца у исхрани истраживали су многи аутори (Connan и сар., 2003; Epel и сар., 2001; Oliver и Wardle, 1999). Неке студије су показале да стрес може изазвати гојазност (Rand и Stunkard, 1978; Wadden, 2002), булимичне епизоде (Lingswiler и сар., 1989), и да измењено функционисање НРА система може допринети развоју анорексије. У одговору на стресор, неке индивидуе повећавају унос калорија (нарочито засићених масти и угљених хидрата), (Dallman и сар., 2004; Freeman и Gil, 2004), док друге губе апетит (Dallman и сар., 2004; Stone и Brownell, 1994). Сантана и сар. (2015) су показали да након излагања CUMS у трајању од 21 дана стресиране животиње добијају на телесној маси, али да је то повећање незнатно у поређењу са нестресираним пацовима. Добијени резултати ове дисертације су показали да је CUMS смањило телесну масу животиња, што је у складу са резултатима Qi и сар. (2006) који су показали да излагања животиња хроничном стресу принудног пливања током 7 дана доводи до смањења телесне масе у односу на контролну групу.

Резултати ове дисертације су показали да је третман мелатонином код животиња хронично излаганим непредвидивим стресорима, вратио телесну масу на вредности забележене код нестресираних животиња само у првој недељи третмана. На крају четврте недеље експеримента није постојала статистички значајна разлика у телесној маси животиња, слично резултатима Sun и сар. (2017). Поменути аутори су показали да је мелатонин поред антидепресивног дејства, повећао редуковану телесну масу у анималном моделу депресије. Клиничке студије су показале да мелатонин повећава телесну масу код неуропсихијатријских поремећаја као што су поремећај пажње са хиперактивношћу и шизофренија (Mostafavi и сар. 2012; Romo-Nava и сар. 2014). Неке студије су, међутим, показале да третман мелатонином може да смањи апетит и телесну масу код пацова (Hussein и сар. 2007; Prunet-Marcassus и сар. 2003). Третман мелатонином побољшава хомеостазу глукозе код Zucker гојазних пацова (Agil и сар., 2012) и смањује повећање телесне масе пацова услед конзумирања хране са високим процентом масти (Ríos-Lugo и сар., 2010). Давање мелатонина у води за пиће, није утицало директно на метаболизам али су третирани пацови показивали повишену локомоторну активност током ноћи, што је довело до смањења пораста телесне масе (Terrón и сар., 2013). Клиничка испитивања су такође показала корелацију између ниског нивоа мелатонина и гојазности (Blaicher и сар., 2000; Sato и сар.,

2013) и предложила његову употребу у терапеутске сврхе (Dzherieva и сар., 2015; Nduhirabandi и сар., 2012; Rastmanesh и de Bruin, 2012). У студији Marková и сар. (2003) показано је да мелатонин није утицао на телесну масу женки које су орално добијале мелатонин. Различити резултати експерименталних студија, које се баве утицајем мелатонина на телесну масу могу се приписати различитој старости експерименталних животиња; дози мелатонина; времену и дужини апликације мелатонина; соју и полу животиња итд.

Поред испитивања дејства CUMS и мелатонина на телесну масу у овој дисертацији испитивано је и њихово дејство на масу надбубрежних жлезда и срца. Резултати ових експеримента су показали да нема значајних промена у маси надбубрежних жлезда и срца после излагања животиња CUMS у трајању од четири недеље. Cruz и сар. (2016) су такође показали да стрес социјалне изолације није утицао на масу срца како младих тако и одраслих пацова. Међутим, Сантана и сар. (2015) су показали да CUMS у трајању од три недеље изазива пропорционално повећање коре и сржи надбубрежних жлезда. Ранији резултати наше лабораторије су показали да стрес социјалне изолације у трајању од 12 недеља повећава масу надбубрежних жлезда за 20% (Jovanovic, 2016). Повећање масе надбубрежних жлезда изазвано стресом може се објаснити хипертрофијом коре и сржи надбубрежних жлезда. Urlich-Lai и сар. (2006) су показали да излагање пацова хроничном варијабилном стресу доводи до хиперплазије и хипертрофије зоне фасцикулате коре надбубрежних жлезди у којој се синтетишу глукокортикоиди, као и хипертрофије сржи надбубрежних жлезда услед повећане активности симпатонеуралног система. Поред повећане активности симпатонеуралног система, повећано лучење АСТН и кортикостерона током стреса такође, могу утицати на количину катехоламина и ензиме синтезе и на тај начин допринети хипертрофији сржи надбубрежних жлезда током хроничног стреса (Laborie и сар., 2003).

Добијени резултати ове дисертације су показали да третман мелатонином није утицао на масу надбубрежних жлезда и срца, што је у складу са резултатима Gomaa и сар. (2017) који су уочили да третман мелатонином нема утицаја на масу надбубрежних жлезда код контролних и стресираних животиња. Међутим, Yamada (1990) је испитивао дејство мелатонина на масу надбубрежних жлезда нестресираних пацова у различитим дозама (1, 5, 15, 30 mg/kg) једном дневно током 10 дана. Показао је да само мелатонин у дози од 30 mg/kg је довео до смањења масе надбубрежних жлезда као и количине кортикостерона услед инхибиторног дејства мелатонина на АСТН и његовог ефекта на надбубрежне жлезде. Изостанак ефекта мелатонина на масу надбубрежних жлезда у овој дисертацији може се приписати мањој дози будући да је мелатонин апликован у дози од 10 mg/kg.

6.2. Ефекти мелатонина на параметре понашања

Будући да је у овој тези испитивано анксиолитичко и антидепресивно својство мелатонина, примењивана су три различита теста понашања како би се потврдило то његово својство.

Тест принудног пливања је коришћен да би се установило да ли је CUMS довео до развоја депресије (што се процењује мерењем времена имобилности) и утицај хроничног третмана мелатонином. Резултати теста у овој дисертацији су потврдили да овакав облик хроничног стреса повећава време имобилности, односно доводи до развоја депресије, што су показали и ранији резултати наше лабораторије (Spasojević и сар., 2008). Хронични третман мелатонином значајно је смањио време имобилности код стресираних пацова и свео га на контролни ниво. Неколико ранијих студија су такође показале да третман мелатонином умањује имобилност у тесту принудног пливања (Hill и сар., 2003; Choudhury и сар., 2016; Yücel и сар., 2016). Показано је да је и мала доза мелатонина од 0,5 mg/kg, довољна да би се постигао овај позитиван, антидепресивни ефекат (Micale и сар., 2006). Недавно је показано да knock-out мишеви којима је уклоњен ген за MT1 рецептор су имали смањену покретљивост током теста принудног пливања, као и неуробиолошке промене које одговарају симптомима меланхоличне депресије код људи (Comai и сар., 2015). Ови резултати указују на повезаност мелатонина и настанка знакова депресије. Као дериват серотонина, може се очекивати да ће мелатонин иницирати неке физиолошке промене и кроз регулацију 5-HT рецептора. Постоје за сада само индиректни докази повезаности мелатонина са серотонинским рецепторима. Код људи који су извршили самоубиство је изузетно висока експресија 5-HT_{2C} рецептора у префронталном кортексу, што потврђује да прекомерна активност овог рецептора у мозгу доприноси знацима анксиозности и депресије (Niswender и сар., 2001). Агомелатин, структурно и функционално сличан мелатонину, осим што је MT₁/MT₂ агониста, показује и 5-HT_{2C} антагонистички ефекат што доприноси његовим анксиолитичким и антидепресивним карактеристикама (Lêo и сар., 2002; Rainer и сар., 2012).

Тест отвореног поља и даље је један од најпопуларнијих поступака у анималној психологији (Belzung, 1999). Процедура се састоји у излагању животиња (глодара) непознатој околини из које је бекство спречено околним зидовима (Walsh и Cummins, 1976). Промене у тимарењу и локомоторној активности у новој, непознатој средини може бити параметар промена у понашању у одговору на стрес (Gray, 1987; Kalueff и Tuohimaa, 2005).

Повећана или смањена локомоторна активност може бити индикатор стања страха или анксиозности код животиња (Archer, 1973). Стресирани животиње испитиване у овој студији су проводиле мање времена у стању мировања у односу на контроле, односно

показивале су повећану локомоторну активност. Осим тога, животиње испитиване у овој студији кретале су се више по спољним квадратима арене и проводиле мање времена у центру отвореног поља након излагања CUMS, што указује на повећану анксиозност. Ови резултати су у складу са резултатима неколико аутора (Harris и сар., 1998; Ieraci и сар., 2016; Gomaa и сар., 2017).

Тимарење је врло важан и еволутивно стар облик понашања које је карактеристично за већи број врста (Sachs, 1988). Осим примарног циља одржавања хигијене, терморегулације и социјалне интеракције, тимарење има функцију и у смањењу стреса (Terry, 1970). Чишћење крзна се код пацова интензивира излагањем животиње акутним стресним ситуацијама као што је нпр. нова средина (Stoessl, 1994; Kalueff и Tuohimaa., 2005). У условима хроничног стреса међутим, смањено је тимарење и долази до пропадања крзна, што је знак депресије (Liu и сар., 2005; Wang и сар., 2013). Резултати ове дисертације су показали да су пацови излагани CUMS испољили знаке депресије јер су провели мање времена у тимарењу. Уочени знаци анксиозности праћени променама у локомоторној активности и тимарењу повезују се са променама нивоа неуротрансмитера допамина у мозгу (Medvedev и сар, 2013; Forestiero и сар., 2006). Yorgason и сар. (2013) су показали да знаци анксиозности и промене у понашању, код хронично стресираних животиња, су резултат повећаног нивоа допамина у делу лимбичког система *nucleus accumbens*. Активност допаминског система у оквиру мезокортиколимбичког система је, такође, одговорна у регулацији дужине трајања тимарења (Vestlund и сар., 2019). Ова možдана регија је богата D1 и D2 рецепторима (Young и сар., 2014). D1 стимулаторни рецептори имају мањи афинитет везивања допамина од D2 инхибиторног, постсинаптичког рецептора, тако да се активирају када су нивои допамина високи (Schultz, 2010). Током акутног стреса, висок ниво ослобађаног допамина активира D1 рецепторе, повећавајући фреквенцију тимарења. С друге стране, код људи са дијагнозом депресије, али и код пацова који показују знаке анхедоније, сензитивност D1 рецептора је снижена (Cannon и сар., 2009; Scheggi и сар., 2011). У таквим условима се примарно активирају D2 рецептори, чиме се смањује тимарење (Ferrari и сар, 1992).

Мелатонин смирује и смањује реакцију људи на неповољне спољне стимулусе (Schachinger и сар., 2008). На анималним моделима такође је показан антиконвулзивни, седативни и анксиолитички ефекат мелатонина (Sugden, 1983; Papp и сар., 2006). У овој студији, третман мелатонином током 28 дана утицао је на локомоцију, продужавајући време проведено у мировању. Третиране животиње су проводиле више времена у центру арене, што указује и на анксиолитичко дејство мелатонина. Осим тога, хронични третман мелатонином је подстакао тимарење животиња излаганих CUMS. Механизми којима

мелатонин испољава анксиолитичко дејство нису још тачно утврђени. Williams (2018) сматра да мелатонин не остварује све физиолошке ефекте само активацијом мелатонинских рецептора. Утврдио је сличност у молекуларној структури овог хормона са другим неуротрансмитерима, као што су допамин и GABA, што му омогућава врло широки спектар деловања. Николаус са сарадницима (2018) је утврдила да су нивои допамина у нигростриатуму и мезолимбичком систему под контролом GABA, инхибиторног неуротрансмитера у централном нервном систему. Мелатонин повећава амплитуду и фреквенцију отварања јонског канала за Cl⁻, везујући се за GABA-A рецептор на истом месту као и бензодиазепини и тако испољава анксиолитичко дејство (Cheng и сар., 2012). Показано је да антидепресиви флуоксетин, десипрамин и кломипрамин повећавају ниво иРНК за MT1 и MT2 (Imbesi и сар., 2006) омогућавајући ендегеном мелатонину да оствари антидепресивно дејство (Hirsch-Rodriguez и сар., 2007).

Мерење понашања уз помоћ издигнутог плус лавиринта се заснива на природној одбојности глодара од висине и отворених простора (Montgomery, 1955). Користи се за праћење анксиозности, као и анксиолитичких и анксиогених дејстава фармаколошких супстанци (Benjamin и сар., 1990). У издигнутом плус лавиринту, број улаза и време проведено у отвореним краковима лавиринта у негативној су корелацији са анксиозношћу пацова. У овом раду је показано да пацови изложени CUMS не показују знаке анксиозности и измењене локомоторне активности у тесту издигнутог плус лавиринта. Qi и сар. (2006) су такође показали да се локомоторна активност не разликује значајно између стресираних и контролних животиња. Резултати овог теста су у контрадикцији са резултатима добијеним на тесту отвореног поља коришћеног у овој дисертацији, где су стресирани животиње показале значајне знаке анксиозности. Један од могућих објашњења је да тест издигнутог плус лавиринта захтева већи степен инвазивности CUMS протокола. Резултати наше лабораторије су показали да у случају коришћења нешто јачих стресора у CUMS протоколу, уочавају се промене у понашању пацова и на овом тесту (Spasojević и сар., 2007). Мора се узети у обзир да су тестови рађени различитим данима, јер ниво анксиозности јединке варира и током дана. Међутим, Рамос и сар. (2008) су физички интегрисали тест отвореног поља и издигнутог лавиринта и утврдили да је корелација између основних параметара ова два теста (број улаза у центар арене и време проведено у отвореним крацима лавиринта) свега 17%. То потврђује да ова два теста показују различите аспекте анксиозности. Управо из тих разлога је и неопходно радити више тестова са другачијим стресором (страх од великог, отвореног простора vs. страх од висине) који би иницирао промене у понашању.

Третман мелатонином довео је до значајног смањења укупног броја улаза у отворене и затворене краке, што указује на смањену локомоторну активност како контролних, тако и стресираних животиња. Иако су стресирани животиње третиране мелатонином показале смањену локомоторну активност оне су ипак чешће улазиле и дужи временски период проводиле у отвореним крацима лавиринта, указујући на његов анксиолитички ефекат. Kalonia и Kumar (2007) су показали да је третман мелатонином у дози 5 или 10 mg/kg повећао број улазака и време проведено у отвореним крацима лавиринта. Овим тестом смо додатно потврдили анксиолитички ефекат мелатонина. У овој докторској дисертацији нису уочене разлике у овим параметрима између контроле и нестресираних група пацова третираних мелатонином, што показују и резултати Goma и сар. (2017).

На основу добијених резултата можемо закључити да је продужено излагање пацова различитим непредвидивим стресорима ниског интензитета изазвало значајне промене у понашању. Мелатонин је ефикасно ублажио бихевиоралне промене изазване стресом, односно испољио антидепресивно и анксиолитичко дејство.

6.3. Дејство мелатонина на концентрацију норадреналина и експресију ензима који учествују у његовој синтези, транспорту, разградњи као и количину рецептора преко којих делује у хипокампусу нестресираних и пацова излаганих CUMS

Норадреналин припада групи неуротрансмitera који могу да модулишу функцију синапсе и због тога га називају неуромодулатором. Примарни извор норадреналина, у CNS, је *locus coeruleus* (Kitchigina и сар., 1997; Sara и сар., 1994), структура која се налази у понсу и пројектује неуроне у многе регионе мозга. Активација норадреналинског система утиче на понашање животиња и има значајну улогу у процесу учења и памћења (Sara, 2009; Sara и Segal, 1991).

Резултати добијени у овој студији су показали да је CUMS изазвао значајно смањење депоа норадреналина у хипокампусу. Sheikh и сар. (2007) су показали смањење нивоа норадреналина, допамина и серотонина у кортексу и хипокампусу стресираних пацова. Смањење нивоа норадреналина у мозгу уочено је и код депресивних пацијената (Lambert и сар., 2000). Добијени резултати у овој студији су показали да је третман мелатонином спречио смањење садржаја норадреналина у хипокампусу стресираних пацова. Одржавање нивоа норадреналина је одраз ефикасности преузимања ослобођеног неуротрансмitera из синапсе и механизма који регулишу његову синтезу.

Резултати ове дисертације су показали да је CUMS значајно смањио ниво иРНК за TH у хипокампусу, ензима који је задужен за синтезу катехоламина, али није утицао на количину овог ензима у хипокампусу у поређењу са контролном групом.

Хронични благи непредвидиви стрес, међутим у хипокампусу није променио експресију гена за ДВН, другог ензима укљученог у синтезу катехоламина.

Скоро 90% норадреналина ослобођеног у синаптичку пукотину се поново враћа преузимањем у пресинаптичке неуроне помоћу NET, где се већином складишти у синаптичким везукулама помоћу VMAT2 (Оноа и сар., 2010; Wimalasena, 2011; Zheng и сар., 2006). Добијени резултати у овој дисертацији су показали да је експресија гена за NET у хипокампусу пацова излаганих CUMS остала непромењена у поређењу са нестресираним пацовима, док је смањена експресија гена за VMAT2. Браво и сар. (2014), су показали да CUMS не мења количину NET у *locus coeruleus*, главном норадреналинском једру у мозгу које инервише хипокампус. VMAT2 је одговоран за паковање допамина, норадреналина и серотонина у синаптичке везикуле, тако да смањена количина овог транспортера може смањити количину моноамина и на тај начин и њихову трансмисију. Осим улоге у неуротрансмисији VMAT2 има значајну улогу у неуропротекцији, јер транслокацијом неуротрансмитера из цитозола у везикуле штити неуроне од оксидативног стреса и повећане токсичности (Guillot и Miller, 2009). На основу изнетих података може се претпоставити да смањена количина овог транспортера код животиња изложених CUMS у овој дисертацији указује на повећану могућност оксидативног стреса. Неурохемијска истраживања показала су да су промене у VMAT2 укључене у етиологији депресивних обољења. Код генетског модела депресије пацова, Schwartz и сар. (2003) су учили смањење експресије VMAT2 у лимбичком систему. Смањена количина овог транспортера уочена је у *striatum* и *nucleus accumbens* пацова у анималном моделу депресије изазваног стресом понављаног пливања (Zucker и сар., 2005).

Дејство норадреналина завршава се првенствено преузимањем у пресинаптичке нервне завршетке (uptake 1), где се или враћа у везикуле за складиштење или метаболише помоћу MAO-A. Други пут, преузимање у глијске ћелије (uptake 2), где се норадреналин метаболише помоћу COMT (Vieira-Coelho и сар., 2009). Резултати добијени у овој дисертацији су показали да је ниво MAO-A повећан у хипокампусу стресираних пацова, док је ниво COMT непромењен. Повећана количина MAO-A доводи до појачане разградње катехоламина и настанка токсичних реактивних врста кисеоника и настанка оксидативног стреса, што је у основи патобиологије неуропсихијатријских и неуродегенеративних поремећаја (Duncan и сар., 2012). Приказани резултати ове дисертације указују да смањена количина норадреналина у хипокампусу хронично стресираних пацова је последица смањеног складиштења и повећане разградње овог неуротрансмитера.

Мелатонин је довео до смањења количине иРНК за ТН и повећања садржај овог ензима у хипокампусу нестресираних и стресираних животиња. Једно од могућих објашњења повећане количине ТН је повећана стабилност и/или смањена разградња овог протеина. Стабилност овог ензима је повећана фосфорилацијом на позицијама Ser19 и Ser40 (Kleppe и сар., 2014). Испитујући ефекте мелатонина на неуродегенеративне промене у култури SK-N-SH ћелија хуманог неуробластома, Klongpanichapak и сар. (2008) су уочили да мелатонин спречава дефосфорилацију ТН и тиме повећава његову стабилност. Други аутори су утврдили да је хроничан третман мелатонином значајно повећао ниво ТН *in vitro* (McMillan и сар., 2007) и његову активност у *striatumu* хрчка (Alexiuk и Vriend, 2007). Мелатонин није утицао на генску експресију за DBH и NET у хипокампусу.

Третман пацова излаганих CUMS мелатонином повећао је експресију гена за VMAT2 док је значајно смањио ниво MAO-A и количину иРНК за COMT у хипокампусу. Mukda и сар. (2011) показали су да хронична администрација амфетамина у постнаталном периоду живота пацова доводи до допаминског дефицита у стриатуму, укључујући и смањење нивоа VMAT2, док је третман са мелатонином повећао количину VMAT2. С обзиром на то да је VMAT2 одговоран за унутарћелијско депоновање и регулацију ослобађања моноамина, повишена експресија VMAT2 након третмана мелатонином може објаснити обновљену редуковану количину норадреналина у хипокампусу хронично стресираних пацова.

На основу приказаних резултата можемо закључити да је мелатонин нормализовао ниво норадреналина у хипокампусу изазвано CUMS, тако што је повећао синтезу и унутарћелијско складиштење, смањио разградњу норадреналина и производњу реактивних врста кисеоника и оксидативног стреса и на тај начин умањио губитак норадреналинских неурона чиме је мелатонин испољио протективно дејство у хипокампусу хронично стресираних пацова.

Норадреналин се везује за адреналинске рецепторе (α - или β) и остварује своје ефекте у периферном и централном нервном систему. Будући да су α - и β -адренорецептори укључени у регулацију мноштва процеса у организму, може се претпоставити да промене у њиховој експресији чине молекуларну основу за физиолошке промене током одговора на стресоре као и у развоју депресије. Постоје студије које показују промене у густини α - и β -адренорецептора код депресивних пацијената (Pytka и сар., 2016; Arango и сар., 1993; Meana и сар., 1992). Неколико студија подржава тезу да активација β_1 - и β_2 -адренорецептора у хипокампусу и кори великог мозга доводи до антидепресивног ефекта (Gu и сар., 2012; Zhang и сар., 2003).

Резултати добијени у овој докторској дисертацији показују смањену експресију гена за α_1 - и α_2 -адренорецепторе у хипокампусу пацова подвргнутих хроничном благом непредвидивом стресу. Студије на мужјацима ровчица су показале да хронични психосоцијални стрес смањује експресију иРНК за α_2A -адренорецепторе у *locus coeruleus*, неуронима солитарног тракта и латералног ретикуларног језгра (Meуer и сар., 2000). Друга студија је показала да понављан стрес значајно смањује количину иРНК за α_1 адренорецепторе у средњем мозгу и хипоталамусу (Miyahara и сар., 1999). α_1 - и α_2 -адренорецептори и њихов сигнални систем су важне мете антидепресивних лекова (Nalera и Vetulani, 1994). Stone и сар. (2003) су утврдили да је количина α_1 адренорецептора смањена у мозгу депресивних пацијената и код животиња у анималном моделу депресије и да се може обнови помоћу више антидепресива. Трициклични антидепресиви, имипрамин и десимпрамин довели су до ендоцитозе и регулисали су експресију α_2A -адренорецептора (Cottingham и сар., 2015). Kreiner и сар. (2004) су утврдили да имипрамин и електро-конвулзивна терапија доводе до повећане експресије иРНК за α_{1A} -адренорецептор у префронталном коретксу, док хронична администрација циталопрама не мења ниво иРНК за α_{1A} -адренорецептор. Будући да α_1 -адренорецептори утичу на функцију хипокампуса тако што доводе до ексцитације неурона (Segal и сар., 1991; Stone и сар., 2003), претпоставља се да смањена експресија ових рецептора приказана у овој дисертацији може указати на смањену норадреналинску неуротрансмисију у овој можданој структури.

Различити подтипови β адренорецептора се експримирају у хипокампусу. β_1 - и β_2 -адренорецептори су од посебног значаја због њихове улоге у синаптичкој пластичности хипокампуса (Gelinas и сар., 2008; Kemp и Manahan-Vaughan, 2008; Yang и сар., 2002).

Добијени подаци у овом експерименту су показали да је CUMS довео до смањења експресије гена за β_2 -адренорецептор у хипокампусу, док није било промене у експресији гена за β_1 -адренорецепторе. Flügge и сар. (1997) су показали да понављано излагање животиња психосоцијалном стресу изолације такође смањује експресију β_2 -адренорецептора у хипокампусу. Познато је да β -адренорецептори имају значајну улогу у формирању дуготрајне меморије. Стимулација ових рецептора агонистима повећава консолидацију дуготрајне меморије (Yu и сар., 2011; Cahill и McGaugh, 1996). β_1 -адренорецептори су нађени на мембрани и цитоплазми неурона хипокампуса, док су β_2 -адренорецептори поред мембране и цитоплазме нађени и у једру и сматра се да на тај начин утичу и на експресију гена одговорних за формирање меморије (Guo и Li, 2007). Редукована генска експресија β_2 -адренорецептора пацова излаганих CUMS у овој докторској дисертацији можда би могла указати на смањену меморију ових животиња. Иако у овој дисертацији нису коришћени

тестови меморије, студије других аутора су показале да излагање животиња CUMS умањује учење и меморију (Gu и сар., 2014; Luo и сар., 2016; Yang и сар., 2018).

Подаци добијени у овој дисертацији су показали да је третман стресираних пацова мелатонином повећао и тиме свео експресију гена за α_1 -адренорецепторе на контролни ниво, али није утицао на експресију гена за α_2 -адренорецепторе који су остали снижени.

Резултати ове докторске дисертације су показали да је третман мелатонином повећао експресију β_2 -адренорецептора у хипокампусу пацова излаганих CUMS. Активација ових адренорецептора доводи до активације аденил циклазе, што доводи до повећања cAMP а затим и активације протеин киназе А која посредством cAMP фосфорилише CREB протеин који се везује за CRE секвенцу (*engl. cAMP response element*) у промотору гена неопходних за регулацију синаптичке пластичности (Ahmed и Frey, 2005) и дугорочну меморију (Kandel, 2012). Maity и сар. (2015) сматрају да норадреналин који се везује и активира β -адренорецепторе подстиче дуготрајну потенцијацију (LTP) која се огледа у повећању густине синапси које су неопходне за формирање меморије.

На основу резултата добијених у овој дисертацији можемо претпоставити да мелатонин, утичући на повећање експресију гена за α_1 - и β_2 -адренорецептора у хипокампусу пацова излаганих CUMS, може побољшати неуротрансмисију, као и учење и памћење.

6.4. Дејство мелатонина на концентрацију норадреналина, адреналина и експресију ензима који учествују у његовој синтези и транспорту у надбубрежним жлездама нестресираних и пацова излаганих CUMS

У физиолошким реакцијама на стрес посредују два главна система - НРА и симпатоадренални систем. Надбубрежне жлезде, као део оба система, имају кључну улогу у одржавању хомеостазе (Goldstein, 2010), ослобађајући глукокортикоиде и катехолаmine из коре и сржи. Иако су ови хормони корисни и потребни за преживљавање током акутног стреса, у условима хроничног стреса, могу изазвати промене које мењају нормално функционисање физиолошких система. Повећана количина катехоламина може довести до настанка кардиоваскуларних и метаболичких поремећаја, као и депресије (Bradley и Rumsfeld, 2015; Chrousos, 2009). Малобројне анималне студије су до сада испитивале промене у функцији сржи надбубрежних жлезда код депресивних поремећаја. Испитивање улоге и функције сржи надбубрежних жлезда у анималном моделу депресије могло би допринети бољем разумевању механизма који се налазе у основи патофизиологије депресије.

У овом експерименту показано је да хронични благи непредвидиви стрес, као и третман мелатонином нису утицали на концентрацију адреналина, док је CUMS довео до

значајног смањења норадrenalина у сржи надбубрежних жлезда испитиваних животиња а третман мелатонином је повећао његову редуковану вредност и свео га на контролне вредности. Сантана и сарадници (2015) су показали да је код мишева излаганих CUMS током 21 дана смањена функција надбубрежних жлезда. Непромењен ниво адреналина у надбубрежним жлездама хронично стресираних пацова може указивати на повећану синтезу. Добијени резултати у овој дисертацији су показали да је CUMS повећао експресију гена за PNMT у надбубрежним жлездама стресираних животиња. У условима стреса експресија гена за PNMT је регулисана глукокортикоидима (Wong и сар., 1995; Tai и сар., 2002). Ранији резултати наше лабораторије су показали да је CUMS повећао количину кортикостерона у плазми (Dronjak и сар., 2007) што може бити разлог за повећану експресију PNMT и очувану количину адреналина у надбубрежним жлездама током хроничног стреса. Резултати ове студије су показали да је излагање животиња CUMS довело до повећања ниво иРНК за TH и DBH док је количина ових ензима смањена. На основу ових резултата може се закључити да ниво иРНК за TH и DBH не прати количину ових ензима. Xu и сар. (2007) су показали да излагање пацова акутном стресу, повећава ниво иРНК за TH током 24h, али не и ниво протеина и његову активност. До инхибиције транслације протеина може доћи услед различите регулације активности рибозомске транслационе машинерије или помоћу miRNK (Biggar и сар., 2015). Gai и сар. (2017) су показали да се miR-375 експримира у хромафиним ћелијама надбубрежних жлезда и да се тамо понаша као негативни посредник у биосинтези и ослобађању катехоламина у надбубрежним жлездама. Током стреса, експресија miR-375 је смањена и тиме је спречено њено инхибиторно дејство на транскрипцију TH и DBH и отуда повећана количина иРНК за ове ензиме. На количину протеина могу утицати и различити фактори као што су стабилност и стопа његове деградације или синтезе (Pratt и сар. 2002; Glickman и Ciechanover, 2002). Serova и сар. (1998) су документовали повишени ниво иРНК за TH у надбубрежним жлездама у Flinder's Sensitive Line (FSL), инбред моделу генетске депресије пацова код којих је повишена активност холинског система.

Из великог броја истраживања закључено је да реакција надбубрежних жлезда на стрес у великој мери зависи од трајања и понављања стреса. Једна кратка епизода имобилизације била је довољна да изазове промене у нивоу иРНК за ензиме који учествују у биосинтези катехоламина, иако су ове промене биле пролазне и нису биле праћене променом количине и активности ензима. С друге стране, дуготрајна и/или понављана имобилизација индуковала је изражено и трајно повећање нивоа иРНК за TH, DBH и PNMT уз истовремено повећање активности ензима, која је остала повећана дуго времена након завршетка деловања стресора (Kvetnansky и сар., 2009). Такође је показано да је активација

катехоламинског система у надбубрежним жлездама специфична за стресор (Sabban и Serova, 2007). Излагање стресу хладноће доводи до повећања иРНК за ТН, која се враћа на базалне вредности након 28 дана изложености истом стресору (Varuchin и сар., 1990). Овај ефекат није примећен код пацова изложеним стресу имобилизације, у којој су експресија гена за ТН, као и активност овог ензима, остали повишени 40 дана након престанка деловања стресора (Nankova и сар., 1994).

Хронични благи непредвидиви стрес код животиња у овој студији није утицао на експресију гена за VMAT2 али је повећао ниво иРНК за NET и смањео количину овог транспортера у хромафиним ћелијама надбубрежних жлезда. Смањења количина овог транспортера може се објаснити повећаним потребама организма за катехоламинима у условима стреса. Стога је преузимање ослобођених катехоламина у условима хроничног стреса смањено, а њихово отпуштање у циркулацију је повећано. Претходни радови ове лабораторије показали су да излагање животиња хроничним непредвидивим стресорима повећава количину катехоламина у плазми (Spasojevic и сар., 2010).

Сантана и сарадници. (2015) су показали да мишеви после излагања хроничном благом непредвидивом стресу у трајању од 21. дана, показују депресивно понашање и да је у надбубрежним жлездама смањен ниво ТН и NET, што указује на редуковану синтезу и преузимање катехоламина. Ти резултати су у складу са резултатима добијеним у овој докторској дисертацији. Исти аутори су такође испитивали и промене у експресији VMAT2 у надбубрежним жлездама мишева изложених током 21. дана CUMS и уочили да је ниво иРНК за VMAT2 транспортер остао непромењен, што је такође у складу са резултатима ове докторске дисертације. Резултати ове дисертације указују да је у овом анималном моделу депресије смањена количина нордреналина у надбубрежним жлездама резултат његове смањење синтезе и преузимања.

Тakoђе, резултати у овој докторској дисертацији су показали да је свакодневна администрација мелатонина повећала ниво ТН, DBH и PNMT у надбубрежним жлездама хронично стресираних пацова. Mokhtar и сар. (2017) су показали повећану експресију ТН у хромафиним ћелијама надбубрежних жлезда код животиња које су третиране мелатонином у поређењу са нестресираним контролама.

Третман мелатонином, је повећао ниво NET, али није утицао на експресију гена за VMAT2 транспортер, код животиња изложених CUMS испитиваних у овој студији.

На основу добијених резултата може се закључити да је третман мелатонином у трајању од 28 дана утицао на количину ензима и транспортера и тиме подстакао процес

синтезе, преузимања и повећања катехоламина у надбубрежним жлездама у моделу депресије изазване хроничним стресом.

6.5. Дејство мелатонина на концентрацију норадреналина и експресију ензима који учествују у његовој синтези, транспорту и разградњи ксо и рецептора преко којих делује у левој преткомори и комори срца нестресираних и пацова излаганих CUMS

Депресију и кардиоваскуларна обољења карактеришу сличне промене у активности неуроендокриног и аутономног нервног система. Тако је примећено да депресију прати снижен тонус парасимпатчког нервног система, а повишен SNS, што повећава ризик за настанак хипертензије и развој кардиоваскуларних обољења као што су атеросклероза, исхемија миокарда, аритмија, срчана инсуфицијенција и вентрикуларна фибрилација али и поремећај метаболизма (Kjekshus и сар., 1981; Kleiger и сар., 1987; Grippo и сар., 2004).

Осим тога примећена је већа срчана фреквенција код пацијентата са депресијом и кардиоваскуларним обољењима у поређењу са пацијентима са кардиоваскуларним обољењима који нису депресивни (Carney и сар., 1993). Ови налази могу пружити увид у механизме који су у основи депресије и кардиоваскуларних болести код људи.

Излагање животиња CUMS повећава симпатички тонус, што доводи до повећања крвног притисака и тахикардије, чинећи овај модел погодним за проучавање кардиоваскуларних болести изазваних депресијом. (Grippo и сар., 2002). Кардиоваскуларне промене у анималном моделу депресије су у складу са променама које се примећују код људи (Carney и сар., 1988; Lahmeyer и Bellur, 1987; Lechin и сар., 1995).

Резултати ове докторске дисертације су показали да CUMS, са и без третмана мелатонином не мења концентрацију норадреналина у левој комори срца. Јовановић и сарадници (2019) су показали да стрес социјалне изолације у трајању од 12 недеља повећава количину норадреналина у левој преткомори и комори али не мења његов ниво у десној преткомори и комори срца, што указује да се количина овог неуротрансмитера у срцу мења зависно од типа стреса.

Добијени резултати ове дисертације су показали снижену количину иРНК за ТН у левој преткомори срца животиња излаганих CUMS, док је његова експресија непромењена у левој комори. Гавриловић и сарадници. (2010) у својој студији нису уочили промене на нивоу експресије гена за ТН у коморама срца социјално изолованих животиња. Исти аутори су показали да стрес изолације у трајању од 3 месеца, доводи до снижења нивоа иРНК за ТН у преткоморама (Gavrilovic и сар., 2009). Поменути аутори показали су да је то смањење у корелацији са смањеном експресијом транскрипционог фактора CREB, што значи да је експресија вероватно регулисана посредством сАМР и РКА. Смањен ниво CREB у срцу

може довести до разних обољења, јер је познато да CREB (A133) трансгени мишеви показују кардиомиопатију која је анатомски, физиолошки и клинички слична кардиомиопатији код људи (Fentzke и сар., 2001).

Ензим PNMT служи као маркер за ткива и ћелије које производе адреналин, који значајно повећава снагу и фреквенцију срчаних контракција. У овој студији је показано да се не мења експресија гена за PNMT у левој преткомори и комори срца хронично стресираних пацова у односу на контролну групу животиња.

Приказани резултати у овој дисертацији су показали да је CUMS смањено генску експресију NET у левој преткомори срца, док је експресија овог транспортера остала непромењена у левој комори. Смањено симпатонеурално преузимање норадреналина је повезано са настанком кардиоваскуларних болести (Shanks и сар., 2013). Wehrwein и сар. (2013) су показали смањено преузимање норадреналина помоћу NET у срцу током хипертензије изазване деоксикортикостероном (DOCA), што заједно са нашим резултатима потврђује повезаност депресије и кардиоваскуларних обољења. Смањена количина овог транспортера у левој преткомори срца у анималном моделу депресије у овој докторској дисертацији показује да је CUMS довео до дисрегулације симпатичког система у срцу, што се манифестује смањеним преузимањем норадреналина и његовом повећаном концентрацијом у интерстицијалном простору кардиомиоцита.

Резултати у овој докторској дисертацији су показали да стрес није довео до промена на нивоу иРНК и количине COMT ензима у преткомори срца, али је смањено ниво иРНК за овај ензим у левој комори. Стресом настале промене у деградирајућим ензимима катехоламина нису јединствене и сигурно зависе од врсте животиња, модела стреса, времена трајања стресора и многих других фактора. COMT има већи афинитет за норадреналин него за адреналин и допамин. Сматра се да је COMT активан само при високим концентрацијама норадреналина и да доприноси инактивацији високог нивоа катехоламина (Kuroko и сар., 2005).

У експерименталном моделу CUMS у овој докторској дисертацији уочено је повећање нивоа MAO у левој комори срца. Повећана активност овог ензима је повезана са повећањем нивоа слободних радикала, који додатно штете ремоделовању и утичу на дисфункцију леве коморе у срцу током хроничног стреса (Kaludercic и сар., 2010). Резултати Sorato и сар. (2014) су показали да оксидативни стрес који настаје услед повећане активности MAO доводи до митохондријске дисфункције. Активношћу MAO ствара се H₂O₂ који може реметити нормалну функцију кардиомиоцита и довести до настанка хипертрофије и/или дилатације леве коморе (Carasso и сар., 1990; Lenaz, 2001; Olivetti и сар., 1991; Sawyer и сар.,

2002). Резултати у овој докторској дисертацији су показали да је коришћени анимални модел депресије повећао експресију гена за MAO иако је количина норадреналина непромењена. Будући да је у овој дисертацији мерена укупна количина норадреналина али не и количина ослобођеног норадреналина можемо претпоставити да је повећана количина MAO последица повећаног ослобађања норадреналина и његове повећане количине у синаптичкој пукотини услед смањеног транспорта због редуковане количине NET.

Током одговора на стрес, долази до повећане активности симпато-адреномедуларног и НРА система што изазива превелику стимулацију β адреналинских рецептора у кардиомиоцима. Ослобођени катехоламини у миокарду преткомора и комора повећавају контрактилност срца везивањем за постсинаптичке β рецепторе преко којих катехоламини остварују позитивно хронотропни, дромотропни и инотропни ефекат (Bengel и Schwaiger, 2004; Riemann и сар., 2003).

Оба подтипа рецептора (β_1 и β_2) су спрегнути са стимулаторним Gs протеином, тако да њихова активација резултира у повећању нивоа cAMP, активирајући HCN (*engl.* hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-sensitive) канале (Liao и сар., 2010). Прекомерна стимулација β_1 адренорецептора може узроковати некрозу и апоптозу миоцита (Zaugg и сар., 2000), која је удружена са повећаном унутарћелијском концентрацијом Ca^{2+} , што активира Ca^{2+} -калмодулин-зависну протеин киназу II. Овај пут је независан од активације PKA (Zhu и сар., 2003). β_2 адренорецептори могу бити купловани са инхибиторним Gi протеинима и тако могу инхибирати пут аденил-циклазе (Daaka и сар., 1997).

Из резултата ове докторске дисертације није уочена промена у количини β_1 рецептора у левој преткомори и комори срца пацова након деловања CUMS, али је примећено значајно повећање нивоа иРНК за β_2 адренорецепторе у левој комори срца. Спасојевић и сарадници (2011), су међутим, показали повећани ниво иРНК за β_2 адренорецепторе у левој преткомори животиња излаганих хроничном стресу у поређењу са нестресираним контролама. Неколико аутора који раде на моделу трансгених мишева су показали да прекомерна експресија β_2 адренорецептора значајно побољшава контракције срчаног мишића срца без патолошког дејства на срце (Gao и сар., 1999; Milano и сар., 1994).

Постоје докази који показују да мелатонин утиче на срчану функцију. Ниво мелатонина значајно опада старењем, када се повећава настанак болести срца (Reiter и сар., 1992). Учесталост срчаних напада услед исхемије или поремећаја провођења акционог потенцијала у срчаном мишићу, највећа је током раних јутарњих сати, у време када је ниво мелатонина у крви низак (Pandi-Pegumal и сар., 2016). Осим тога хронични срчани болесници имају знатно нижи ниво мелатонина у крви него здраве особе (Marktl и сар., 1997), а 1 mg

мелатонина у виду капсуле значајно побољшава проток артеријске крви и смањује крвни притисак (Cagnassi и сар., 1998) младим, здравим женама нормалне телесне масе. Tan и сар. (1993) као и Marktl и сар. (1997) су показали да мелатонин супримира периферну симпатичку активност, смањује ослобађање и промет норадреналина у срцу.

Мелатонин може директно утицати на физиологију срца преко својих рецептора пошто је њихова генска експресија доказана у кардиомиоцима пацова (Peliciari-Garcia и сар., 2011). У једном клиничком испитивању код људи показано је да давање мелатонина побољшава контракцију леве коморе код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (Garakyaraghi и сар., 2012). Према томе, третман мелатонином може имати клинички значајну улогу у фармакотерапији срчаних болести. Показано је да мелатонин у дози од 30-40 mg/kg инхибира симпатички систем и стимулише парасимпатикус, што доводи до хипотензије и брадикардије код пацова (Chuang и сар., 1993).

Посматрањем резултата добијених у овом експерименту након третмана мелатонином уочено је да је експресија гена за TH и PNMT непромењена у левој преткомори и комори срца животиња излаганих CUMS. Међутим, третман нестресираних пацова мелатонином је повећао иРНК за TH у левој комори а смањио његову количину у левој преткомори срца.

Испитивањем генске експресије NET транспортера у овој докторској дисертацији, уочено је да третман мелатонином повећава његову количину у левој преткомори, без видљивог ефекта на нивоу леве коморе. С обзиром на то да је активност NET смањена код срчане инсуфицијенције (Bucks и сар., 2001; Meredith и сар., 1993) и да је показано да инхибиција NET доводи до оштећења на нивоу кардиоваскуларног система (Schroeder и Jordan, 2012), може се претпоставити да мелатонин повећавајући количину овог транспортера може остварити кардиопротективни ефекат на нивоу леве преткоморе.

Даљим испитивањима у овој докторској дисертацији, показано је да третман мелатонином није имао утицај на количину COMT у левој преткомори, док је у левој комори хронично стресираних животиња довео до повећања нивоа иРНК за овај ензим. Са друге стране, уочено је да мелатонин снизио ниво MAO-A ензима у левој комори срца. Nava и сар. (2003) показали су да код спонтано хипертензивних пацова третман мелатонином током 6 недеља смањује оксидативни стрес у ћелијама бубрега. Високе концентрације Ca^{2+} активирају ROS који доводи до стварања слободних радикала (Hu и сар., 2018). Студија Salie и сар. (2001) је показала да мелатонин кроз инхибицију стварања ROS и унутарћелијског складиштења Ca^{2+} штити миоците комора пацова од морфолошког оштећења изазваног исхемијом/реперфузијом. Мелатонин штити ћелије од оксидативног стреса тако што стимулише MAPK/ERK сигнални пут који блокира inositol 1,3,4-trisphosphate рецептор

(IP3R), кључни медијатор у одржавању унутарћелијског нивоа Ca^{2+} . Antkiewicz-Michaluk и сар. (2001) су показали да је третман неуропротективног једињења (1MeTIQ) инхибирао MAO-зависни катаболички пут и активирао O-метилацију преко COMT и на тај начин смањило стварање слободних радикала. На основу добијених резултата ове докторске дисертације може се претпоставити да је мелатонин смањујући количину MAO-A, тиме смањило оксидацију и остварио кардиопротективне ефекте.

Из резултата ове докторске дисертације утврђено је да третман мелатонином није мењао генску експресију β_1 адренорецептора у левој преткомори и комори срца. Третман пацова мелатонином је снизио ниво мРНК за β_2 адренорецептор али није даље утицао на количину овог рецептора у левој комори стресираних животиња док је повећао генску експресију β_2 адренорецептора у левој преткомори нестресираних и стресираних животиња.

Регулација генске експресије од стране мелатонина је сложена због учешћа великог броја протеина укључујући киназе, транскрипционе факторе, једарне рецепторе и епигенетске ензиме (Fustin и сар., 2009; Korkmaz и сар., 2012).

На основу приказаних резултата може се претпоставити да мелатонин остварује кардиопротективно дејство делујући на експресију гена за NET повећавајући преузимање норадреналина у преткоморама и смањујући његову деградацију делујући на количину MAO-A у коморама животиња излаганих CUMS.

7 ЗАКЉУЧЦИ

У складу са постављеним циљевима утврђено је да хронични третман мелатонином животиња излаганих CUMS током 28 дана:

- Доводи до спречавања развоја понашања налик депресивном или анксиозном, што значи да испољава антидепресивна и анксиолитичка својства.
- Повећава садржај норадреналина у хипокампусу, повећавајући експресију TH и VMAT2 и снижавајући експресију ензима за разградњу (MAO-A и COMT).
- Повећава експресију гена за α_1 и β_2 адренорецепторе у хипокампусу и тиме вероватно остварује антидепресивно својство.
- Повећава садржај норадреналина и нормализује садржај катехоламина у надбубрежним жлездама, укључујући директно стимулисање експресије гена за њихову биосинтезу и транспорт.
- Остварује кардиопротективно својство повећавајући експресију гена за NET и истовремено смањујући експресију гена MAO-A катехоламинског деградирајућег ензима.

8 ЛИТЕРАТУРА

Agil, A., Rosado, I., Ruiz, R., Figueroa, A., Zen, N., Fernández-Vázquez, G., 2012. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research* 52, 203–210.

Ahmed, T., Frey, J.U., 2005. Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro. *Neuropharmacology* 49, 477-492.

Albrecht, U., 2012. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74, 246-260.

Alexiuk, N.A., Vriend, J., 2007. Melatonin: effects on dopaminergic and serotonergic neurons of the caudate nucleus of the striatum of male Syrian hamsters. *Journal of neural transmission* 114, 549-554.

Alzoubi, K.H., Mayyas, F.A., Khabour, O.F., Bani Salama, F.M., Alhashimi, F.H., Mhaidat, N.M., 2016. Chronic melatonin treatment prevents memory impairment induced by chronic sleep deprivation. *Molecular neurobiology* 53, 3439-3447.

Andreasen NC, B.D., 2001. Introductory Textbook of Psychiatry. American Psychiatric Publishing, Inc.

Anisman, H., Zalcman, S., Zacharko, R.M., 1993. The impact of stressors on immune and central neurotransmitter activity: bidirectional communication. *Reviews in the neurosciences* 4, 147-180.

Antkiewicz-Michaluk, L., Michaluk, J., Mokrosz, M., Romanska, I., Lorenc-Koci, E., Ohta, S., Vetulani, J., 2001. Different action on dopamine catabolic pathways of two endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines with similar antidopaminergic properties. *Journal of neurochemistry* 78, 100-108.

Anwar, M.M., Meki, A.R., Rahma, H.H., 2001. Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators. *Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology and pharmacology* 130, 357-367.

Arango, V., Ernsberger, P., Sved, A.F., Mann, J.J., 1993. Quantitative autoradiography of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors in the cerebral cortex of controls and suicide victims. *Brain research* 630, 271-282.

Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal behaviour* 21, 205-235.

Armstrong, S.M., 1989. Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia* 45, 932-938.

Axelrod, J., 1974. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184, 1341-1348.

Axelrod, J., Mueller, R.A., Henry, J.P., Stephens, P.M., 1970. Changes in enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of noradrenaline and adrenaline after psychosocial stimulation. *Nature* 225, 1059-1060.

Backs, J., Haunstetter, A., Gerber, S.H., Metz, J., Borst, M.M., Strasser, R.H., Kubler, W., Haass, M., 2001. The neuronal norepinephrine transporter in experimental heart failure: evidence for a posttranscriptional downregulation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33, 461-472.

Baker, A.J., 2014. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Archiv-european journal of physiology* 466, 1139-1150.

Baruchin, A., Weisberg, E.P., Miner, L.L., Ennis, D., Nisenbaum, L.K., Naylor, E., Stricker, E.M., Zigmond, M.J., Kaplan, B.B., 1990. Effects of cold exposure on rat adrenal tyrosine hydroxylase: an analysis of RNA, protein, enzyme activity, and cofactor levels. *Journal of neurochemistry* 54, 1769-1775.

Baruchin, A., Vollmer, R.R., Miner, L.L., Sell, S.L., Stricker, E.M., Kaplan, B.B., 1993. Cold-induced increases in phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) mRNA are mediated by non-cholinergic mechanisms in the rat adrenal gland. *Neurochemical research* 18, 759–766.

Bassani, T.B., Gradowski, R.W., Zaminelli, T., Barbiero, J.K., Santiago, R.M., Boschen, S.L., da Cunha, C., Lima, M.M., Andreatini, R., Vital, M.A., 2014. Neuroprotective

and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain research* 1593, 95-105.

Belmaker, R.H., Agam, G., 2008. Major depressive disorder. *N Engl. J Med* 358, 55-68.

Belzung, C., 1999. Measuring exploratory behavior. Elsevier, Amsterdam.

Bengel, F.M., Schwaiger, M., 2004. Assessment of cardiac sympathetic neuronal function using PET imaging. *Journal of nuclear cardiology:official publication of the american society of nuclear cardiology* 11, 603-616.

Benjamin, D., Lal, H., Meyerson, L.R., 1990. The effects of 5-HT_{1B} characterizing agents in the mouse elevated plus-maze. *Life sciences* 47, 195-203.

Bessa, J.M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J.J., Palha, J.A., Almeida, O.F., Sousa, N., 2009. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular psychiatry* 14, 764-773, 739.

Bhatnagar, S., Mitchell, J.B., Betito, K., Boksa, P., Meaney, M.J., 1995. Effects of chronic intermittent cold stress on pituitary adrenocortical and sympathetic adrenomedullary functioning. *Physiology and behavior* 57, 633-639.

Biggar, K.K., Storey, K.B., 2015. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *Journal of experimental biology* 218, 1281-1289.

Bisognano, J.D., Weinberger, H.D., Bohlmeier, T.J., Pende, A., Reynolds, M.V., Sastravaha, A., Roden, R., Asano, K., Blaxall, B.C., Wu, S.C., Communal, C., Singh, K., Colucci, W., Bristow, M.R., Port, D.J., 2000. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 32, 817-830.

Blaicher, W., Speck, E., Imhof, M.H., Gruber, D.M., Schneeberger, C., Sator, M.O., Huber, J.C., 2000. Melatonin in postmenopausal females. *Archives of gynecology and obstetrics* 263, 116-118.

Bradley, S.M., Rumsfeld, J.S., 2015. Depression and cardiovascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* 25, 614-622.

Bravo, L., Torres-Sanchez, S., Alba-Delgado, C., Mico, J.A., Berrocoso, E., 2014. Pain exacerbates chronic mild stress-induced changes in noradrenergic transmission in rats. *European neuropsychopharmacology : the journal of the european college of neuropsychopharmacology* 24, 996-1003.

Bristow, M.R., Hershberger, R.E., Port, J.D., Minobe, W., Rasmussen, R., 1989. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Molecular pharmacology* 35, 295-303.

Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Molecular endocrinology* 13, 2025-2038.

Bubenik, G.A., 2002. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive diseases and sciences* 47, 2336-2348.

Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., Jr., Trendelenburg, U., 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological reviews* 46, 121-136.

Cabib, S., Puglisi-Allegra, S., 1996. Stress, depression and the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology (Berl)*, 128, 331-342.

Cai, C., Qian, G., Zhao, G., Peng, X., Liang, X., 2012. Study on regulatory effect of Kaixin San on endogenous melatonin biosynthesis in rat depression model, *China journal of chinese materia medica* 37, 1638-1641.

Cagnacci, A., Arangino, S., Angiolucci, M., Maschio, E., Melis, G.B., 1998. Influences of melatonin administration on the circulation of women. *The American journal of physiology* 274, R335-338.

- Cahill, L., McGaugh, J.L., 1996.** Modulation of memory storage. *Current opinion in neurobiology* 6, 237–242.
- Capasso, J.M., Palackal, T., Olivetti, G., Anversa, P., 1990.** Severe myocardial dysfunction induced by ventricular remodeling in aging rat hearts. *The American journal of physiology* 259, H1086-1096.
- Cardinali, D.P., Pevet, P., 1998.** Basic aspects of melatonin action. *Sleep medicine reviews* 2, 175-190.
- Carney, R.M., Freedland, K.E., Rich, M.W., Smith, L.J., Jaffe, A.S., 1993.** Ventricular tachycardia and psychiatric depression in patients with coronary artery disease. *The American journal of medicine* 95, 23-28.
- Carney, R.M., Rich, M.W., teVelde, A., Saini, J., Clark, K., Freedland, K.E., 1988.** The relationship between heart rate, heart rate variability and depression in patients with coronary artery disease. *Journal of psychosomatic research* 32, 159-164.
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., Garcia-Maurino, S., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., 2004.** Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 537-539.
- Castellano, M., Bohm, M., 1997.** The cardiac β -adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. *Hypertension* 29, 715–722.
- Caudle, W.M., Richardson, J.R., Wang, M.Z., Taylor, T.N., Guillot, T.S., McCormack, A.L., Colebrooke, R.E., Di Monte, D.A., Emson, P.C., Miller, G.W., 2007.** Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience* 27, 8138-8148.
- Chakravarty, S., Reddy, B.R., Sudhakar, S.R., Saxena, S., Das, T., Meghah, V., Brahmendra Swamy, C.V., Kumar, A., Idris, M.M., 2013.** Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. *PLoS One*; 8, e63302.
- Chan, A.S., Lai, F.P., Lo, R.K., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Stanbridge, E.J., Wong, Y.H., 2002.** Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cellular signalling* 14, 249–257.
- Cheng, X.P., Sun, H., Ye, Z.Y., Zhou, J.N., 2012.** Melatonin modulates the GABAergic response in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of pharmacological science*, 119, 177-185.
- Choudhury, A., Singh, S., Palit, G., Shukla, S., Ganguly, S., 2016.** Administration of N-acetylserotonin and melatonin alleviate chronic ketamine-induced behavioural phenotype accompanying BDNF-independent and dependent converging cytoprotective mechanisms in the hippocampus. *Behavioural brain research* 297, 204-212.
- Chrousos, G.P., 1998.** Stress as a medical and scientific idea and its implications. In: "Catecholamines: bridging basic science with clinical medicine". *Advances in pharmacology*, 42, (eds).
- Chrousos, G.P., 2009.** Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews. Endocrinology* 5, 374-381.
- Claustrat, B., Brun, J., Chazot, G., 2005.** The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews* 9, 11-24.
- Comai, S., Ochoa-Sanchez, R.O., Dominguez-Lopez, S., Bambico F.R., Gobbi, G., 2015.** Melancholic-like behaviors and circadian neurobiological abnormalities in melatonin MT1 receptor knockout mice. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 18, 1-10.
- Communal, C., Singh, K., Sawyer, D.B., Colucci, W.S., 1999.** Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100, 2210-2212.

- Connan, F., Campbell, I.C., Katzman, M., Lightman, S.L., Treasure, J., 2003.** A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiology and behavior* 79, 13-24.
- Corbi, G., Conti, V., Russomanno, G., Longobardi, G., Furgi, G., Filippelli, A., Ferrara, N., 2013.** Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Frontiers in physiology* 4, 1–14.
- Cottingham, C., Ferryman, C.J., Wang, Q., 2015.** Alpha2 adrenergic receptor trafficking as a therapeutic target in antidepressant drug action. *Progress in molecular biology and translational science* 132, 207-225.
- Cruz, F.C., Duarte, J.O., Leao, R.M., Hummel, L.F., Planeta, C.S., Crestani, C.C., 2016.** Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: Immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. *Developmental neurobiology* 76, 34-46.
- Chuang, J.I., Chen, S.S., Lin, M.T., 1993.** Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacology*, 47, 91–97.
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Gilad, E., Hake, P., Salzman, A.L., Szabo, C., 1997.** Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *Journal of pineal research* 23, 106-116.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 1997.** Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88-91.
- Dallman, M.F., la Fleur, S.E., Pecoraro, N.C., Gomez, F., Houshyar, H., Akana, S.F., 2004.** Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology* 145, 2633-2638.
- Detanico, B.C., Piato, A.L., Freitas, J.J., Lhullier, F.L., Hidalgo, M.P., Caumo, W., Elisabetsky, E., 2009.** Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European journal of pharmacology* 607, 121-125.
- Deussing, M.J., 2006.** Animal model of depression. *Drug discovery today: Disease models* 3, 375-383.
- Drijfhout, W.J., van der Linde, A.G., Kooi, S.E, Grol, C.J., Westerink, B.H., 1996.** Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *Journal of neurochemistry* 66, 748-755.
- Dronjak, S., Jezova, D., Kvetnansky, R., 2004.** Different effects of novel stressors on sympathoadrenal system activation in rats exposed to long-term immobilization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018, 113-123.
- Dronjak, S., Ondriska, D., S., Jezova, D., Kvetnansky R., 2002.** Effects of novel stressors on plasma catecholamine levels in rats exposed to long-term cold. In: "Stress: Neural, Endocrine and Molecular Studies" (eds) R. McCarty, G. Aguilera, E. Sabban, & R. Kvetnansky. Taylor & Francis, London and New York, pp. 83-89.
- Dronjak, S., Spasojevic, N., Gavrilovic, L., Varagic, V., 2007.** Effects of noradrenaline and serotonin reuptake inhibitors on pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary system of adult rats. *Neuro endocrinology letters* 28, 614-620.
- Dubocovich, M.L., Delagrange, P., Krause, D.N., Sugden, D., Cardinali, D.P., Olcese, J., 2010.** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacological reviews* 62, 343-380.
- Dubocovich, M.L., Hudson, R.L., Sumaya, I.C., Masana, M.I., Manna, E., 2005.** Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *Journal of pineal research* 39, 113–120.
- Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005.** Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27, 101-110.

Duncan, J., Johnson, S., Ou, X.M., 2012. Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism. *Drug discoveries and therapeutics* 6, 112-122.

Dzherieva, I.S., Volkova, N.I., Rapoport, S.I., 2015. [Association between depression and metabolic syndrome--a two-way street]. *Klinicheskaia meditsina* 93, 62-65.

Eisenhofer, G., 2001. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacology and therapeutics* 91, 35-62.

Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R., Reppert, S.M., 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6133-6137.

Eiden LE, Schutz B, Anlauf M, Depboylu C, Schafer MKH, Weihe E., 2002. The vesicular monoamine transporters (VMATs): role in the chemical coding of neuronal transmission and monoamine storage in amine handling immune and inflammatory cells. In: *Catecholamine Research: From Molecular Insights to Clinical Medicine*, eds by Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, Goldstein DS. New York: Kluwer Academic/Plenum, pp. 23-33.

Eisenhofer, G., Esler, M.D., Cox, H.S., Meredith, I.T., Jennings, G.L., Brush, J.E., Jr., Goldstein, D.S., 1990. Differences in the neuronal removal of circulating epinephrine and norepinephrine. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 70, 1710-1720.

Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 2004. Leaky catecholamine stores: undue waste or a stress response coping mechanism? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018, 224-230.

Elizalde, N., Pastor, P.M., Garcia-Garcia, A.L., Serres, F., Venzala, E., Huarte, J., Ramirez, M.J., Del Rio, J., Sharp, T., Tordera, R.M., 2010. Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression: chronic mild stress and decreased expression of VGLUT1. *Journal of neurochemistry* 114, 1302-1314.

Ellis, B.J., Del Giudice, M., 2014. Beyond allostatic load: rethinking the role of stress in regulating human development. *Development and psychopathology*, 26, 1-20.

Ekmekcioglu, C., Thalhammer, T., Humpeler, S., Mehrabi, M.R., Glogar, H.D., Hölzenbein, T., Markovic, O., Leibetseder, V.J., Strauss-Blasche, G., Marktl, W., 2003. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *Journal of pineal research*, 35, 40-44.

Epel, E., Lapidus, R., McEwen, B., Brownell, K., 2001. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26, 37-49.

Faure, C., Gouhier, C., Langer, S.Z., Graham, D., 1995. Quantification of alpha 1-adrenoceptor subtypes in human tissues by competitive RT-PCR analysis. *Biochemical and biophysical research communications* 213, 935-943.

Fava, M., Targum, S.D., Nierenberg, A.A., Bleicher, L.S., Carter, T.A., Wedel, P.C., Hen, R., Gage, F.H., Barlow, C., 2012. An exploratory study of combination buspirone and melatonin SR in major depressive disorder (MDD): a possible role for neurogenesis in drug discovery. *Journal of psychiatric research* 46, 1553-1563.

Fentzke, R.C., Korcarz, C.E., Shroff, S.G., Lin, H., Leiden, J.M., Lang, R.M., 2001. The left ventricular stress-velocity relation in transgenic mice expressing a dominant negative CREB transgene in the heart. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 14, 209-218.

Ferrari, F., Pelloni, F., Giuliani, D., 1992. Suppressive effect of the dopamine D receptor agonist B-HT 920 on rat grooming. *European journal of pharmacology* 216, 345-350.

Fischer, T.W., Slominski, A., Zmijewski, M.A., Reiter, R.J., Paus, R., 2008. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp dermatology* 17, 713-730.

Flügge, G., Ahrens, O., Fuchs, E., 1997. Beta-adrenoceptors in the tree shrew brain. II. Time-dependent effects of chronic psychosocial stress on [125I]iodocyanopindolol bindings sites. *Cellular and molecular neurobiology* 17, 417-432.

Fluharty, S.J., Snyder, G.L., Stricker, E.M., Zigmond, M.J., 1983. Short- and long-term changes in adrenal tyrosine hydroxylase activity during insulin-induced hypoglycemia and cold stress. *Brain research* 267, 384-387.

Forestiero, D., Manfrim, C.M., Guimaraes, F.S., De Oliveira, R.M., 2006. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 184, 166–172.

Friedrich, M.J., 2017. Depression is the leading cause of disability around the world. *JAMA*, 317(15), 1517.

Freeman, L.M., Gil, K.M., 2004. Daily stress, coping, and dietary restraint in binge eating. *The International journal of eating disorders* 36, 204-212.

Fustin, J.M., Dardente, H., Wagner, G.C., Carter, D.A., Johnston, J.D., Lincoln, G.A., Hazlerigg, D.G., 2009. Egr1 involvement in evening gene regulation by melatonin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 764-773.

Gai, Y., Zhang, J., Wei, C., Cao, W., Cui, Y., Cui, S., 2017. miR-375 negatively regulates the synthesis and secretion of catecholamines by targeting Sp1 in rat adrenal medulla. *American journal of physiology. Cell physiology* 312, C663-C672.

Gallego, M., Virshup, D.M., 2007. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 139-148.

Gao, M.H., Lai, N.C., Roth, D.M., Zhou, J., Zhu, J., Anzai, T., Dalton, N., Hammond, H.K., 1999. Adenylyl cyclase increases responsiveness to catecholamine stimulation in transgenic mice. *Circulation* 99, 1618-1622.

Garakyaraghi, M., Siavash, M., Alizadeh, M.K., 2012. Effects of Melatonin on Left Ventricular Ejection Fraction and Functional Class of Heart Failure Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of research in medical sciences*, 17.

Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., Le Marec, H. 1998. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *The journal of clinical investigation* 102, 1377-1384.

Gavrilovic, L., 2010. Uticaj hronicnog psihosocijalnog i fizickog stresa na ekspresiju gena i sintezu enzima koji ucestvuju u biosintezi kateholamina. *Bioloski fakultet, Univerzitet u Beogradu*.

Gavrilovic, L., Spasojevic, N., Zivkovic, M., Dronjak, S., 2009. Effect of immobilization stress on gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes in heart auricles of socially isolated rats. *Brazilian journal of medical and biological research Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 42, 1185-1190.

Geary, G.G., Duckles, S.P., Krause, D.N., 1998. Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *British journal of pharmacology* 123, 1533–1540.

Gelinas, J.N., Tenorio, G., Lemon, N., Abel, T., Nguyen, P.V., 2008. Beta-adrenergic receptor activation during distinct patterns of stimulation critically modulates the PKA-dependence of LTP in the mouse hippocampus. *Learning and memory* 15, 281-289.

Gerhardstein, B.L., Puri, T.S., Chien, A.J., Hosey, M.M., 1999. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 38, 10361-10370.

Guillot, T., Miller, G.W., 2009. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Molecular neurobiology* 39, 149-170.

Gilsbach, R., Hein, L., 2012. Are the pharmacology and physiology of α_2 adrenoceptors determined by α_2 -heteroreceptors and autoreceptors respectively? *British journal of pharmacology*, 165, 90-102.

- Girotti, L., Lago, M., Ianovsky, O., Elizari, M.V., Dini, A., Perez Lloret, S., Albornoz, L.E., Cardinali, D.P., 2003.** Low urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in patients with severe congestive heart failure. *Endocrine* 22, 245-248.
- Glickman, M.H., Ciechanover, A., 2002.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* 82, 373–428.
- Godson, C., Reppert, S.M., 1997.** The Mella melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138, 397–404.
- Goldstein, D.S., 2003.** Catecholamines and stress. *Endocrine regulations* 37, 69-80.
- Goldstein, D.S., 2010.** Adrenal responses to stress. *Cellular and molecular neurobiology* 30, 1433-1440.
- Gomaa, A.M., Galal, H.M., Abou-Elgait, A.T., 2017.** Neuroprotective effects of melatonin administration against chronic immobilization stress in rats. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 9, 16-27.
- Goodwin, G.M., Emsley, R., Rembry, S., Rouillon, F., 2009.** Agomelatine prevents relapse in patients with major depressive disorder without evidence of a discontinuation syndrome: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The journal of clinical psychiatry*, 70, 1128-1137.
- Gray, J.A., 1987.** The psychology of fear and stress. *Problems of behaviour science*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Griefahn, B., Brode, P., Remer, T., Blaszkewicz, M., 2003.** Excretion of 6-hydroxymelatonin sulfate (6-OHMS) in siblings during childhood and adolescence. *Neuroendocrinology* 78, 241-243.
- Grippo, A.J., Moffitt, J.A., Johnson, A.K., 2002.** Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 282, R1333-1341.
- Grippo, A.J., Santos, C.M., Johnson, R.F., Beltz, T.G., Martins, J.B., Felder, R.B., Johnson, A.K., 2004.** Increased susceptibility to ventricular arrhythmias in a rodent model of experimental depression. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286, H619–H626.
- Gu, H.F., Nie, Y.H., Tong, Q.Z., Tang, Y.L., Zeng, Y., Jing, K.Q., Zheng, X.L., Liao, D.F., 2014.** Epigallocatechin-3-gallate attenuates impairment of learning and memory in chronic unpredictable mild stress-treated rats by restoring hippocampal autophagic flux. *PLoS One* 9, e112683.
- Gu, L., Liu, Y.J., Wang, Y.B., Yi, L.T., 2012.** Role for monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of ethanol extracts from *Hemerocallis citrina*. *Journal of ethnopharmacology* 139, 780-787.
- Gudbjarnason, S., Benediktsdottir, V.E., 1996.** Regulation of beta-adrenoceptor properties and the lipid milieu in heart muscle membranes during stress. *Molecular and cellular biochemistry*, 163, 137–143.
- Guo, N.N., Li, B.M., 2007.** Cellular and subcellular distributions of beta1- and beta2-adrenoceptors in the CA1 and CA3 regions of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 146, 298–305.
- Guyton, A.C., 1996.** *Medicinska fiziologija. Savremena administracija*, Medicinska knjiga, Beograd.
- Hajszan, T., MacLusky, N.J., Leranth, C., 2005.** Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 21, 1299-1303.
- Hall, C.S., 1934.** Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of comparative psychology* 18, 385-403.
- Han, S., Chen, X., Yang, C.L., Vickery, L., Wu, Y., Naes, L., Macarthur, H., Westfall, T.C., 2005.** Influence of cold stress on neuropeptide Y and sympathetic neurotransmission. *Peptides* 26, 2603-2609.

- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R., 2005.** Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition and metabolism* 2, 22.
- Haridas, S., Kumar, M., Manda, K., 2013.** Melatonin ameliorates chronic mild stress induced behavioral dysfunctions in mice. *Physiology behavior* 119, 201-207.
- Harms, E., Kivimäe, S., Young, M.W., Saez, L., 2004.** Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *Journal of biological rhythms* 19, 361-373.
- Harris, R.B., Zhou, J., Youngblood, B. D., Smagin, G. N., Ryan, D. H. , 1998.** Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. *Physiology behavior* 63, 91-100.
- Hattori A, S.N., Somei M, 2006.** Melatonin up to date- Melatonin effects on bone. *Anti-Aging Igaku*, 78-86.
- Heine, V.M., Maslam, S., Zareno, J., Joëls, M., Lucassen, P.J. 2004.** Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *The european journal of neuroscience* 19, 131–144.
- Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Ruffolo, R.R., Jr., 1995.** International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacological reviews* 47, 267-270.
- Hill, M.N., Brotto, L.A., Lee, T.T.Y., Gorzalka, B.B., 2003.** Corticosterone attenuates the antidepressant-like effects elicited by melatonin in the forced swim test in both male and female rats. *Progress in neuropsychopharmacology and biological psychiatry*, 27, 905-11.
- Hiremagalur, B., Kvetnansky, R., Nankova, B., Fleischer, J., Geertman, R., Fukuhara, K., Viskupic, E., Sabban, E.L., 1994.** Stress elicits trans-synaptic activation of adrenal neuropeptide Y gene expression. *Brain research. Molecular brain research* 27, 138-144.
- Hirschfeld, R.M., 2000.** History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *Journal of clinical psychiatry* 61, 4–6.
- Hirsch-Rodriguez, E., Imbesi, M., Manev, R., Uz, T., Manev, H., 2007.** The pattern of melatonin receptor expression in the brain may influence antidepressant treatment. *Medical hypotheses* 69, 120-124.
- Ho, M.K., Yung, L.Y., Chan, J.S., Chan, J.H., Wong, C.S., Wong, Y.H., 2001.** Galph(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *British journal of pharmacology* 132, 1431–1440.
- Huang, M.H., Bahl, J.J., Wu, Y., Hu, F., Larson, D.F., Roeske, W.R., Ewy, G.A., 2005.** Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288, 497–503.
- Huether, G., 1996.** The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function. *Progress in neurobiology* 48, 569-612.
- Hussein, M.R., Ahmed, O.G., Hassan, A.F., Ahmed, M.A., 2007.** Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *International journal of experimental pathology* 88, 19-29.
- Ieraci, A., Mallei, A., Popoli, M., 2016.** Social isolation stress induces anxious-depressive-like behavior and alterations of neuroplasticity-related genes in adult male mice. *Neural plasticity* 2016, 6212983.
- Imbesi, M., Uz, T., Yildiz, S., Arslan, A.D., Manev, H., 2006.** Drug- and region-specific effects of protracted antidepressant and cocaine treatment on the content of melatonin MT(1) and MT(2) receptor mRNA in the mouse brain. *International journal of neuroprotection and neuroregeneration* 2, 185-189.

Iwai-Kanai, E., Hasegawa, K., Araki, M., Kakita, T., Morimoto, T., Sasayama, S., 1999. alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation* 100, 305–311.

Iversen, L.L., 1965. The Uptake of Adrenaline by the Rat Isolated Heart. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 24, 387-394.

Jovanovic, P., 2016. Dejstvo oksitocina na simpatoadrenomedularni sistem i srce pacova hronicno izlaganih stresu izolacije. *Bioloski fakultet, Univerzitet u Beogradu*.

Jovanovic, P., Spasojevic, N., Puskas, N., Stefanovic, B., Dronjak, S., 2019. Oxytocin modulates the expression of norepinephrine transporter, β_3 -adrenoceptors and muscarinic M_2 receptors in the hearts of socially isolated rats. *Peptides* 111, 132-141.

Kalonia, H., Kumar, A., 2007. Protective effect of melatonin on certain behavioral and biochemical alterations induced by sleep-deprivation in mice. *Indian journal of pharmacology* 39, 48-51.

Kalueff, A.V., Tuohimaa, P., 2005. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of neuroscience methods* 143, 169-177.

Kaludercic, N., Takimoto, E., Nagayama, T., Feng, N., Lai, E.W., Bedja, D., Chen, K., Gabrielson, K.L., Blakely, R.D., Shih, J.C., Pacak, K., Kass, D.A., Di Lisa, F., Paolocci, N., 2010. Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload. *Circulation research* 106, 193-202.

Kandel, E.R., 2012. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Molecular brain* 5, 14.

Kaplan, K.A., Harvey, A.G., 2009. Hypersomnia across mood disorders: a review and synthesis. *Sleep medicine reviews* 13, 275-285.

Karolczak, M., Korf, H.W., Stehle, J.H., 2005. The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. *Endocrine* 27, 89-100.

Katz, R.J., 1982. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 16, 965-968.

Kemp, A., Manahan-Vaughan, D., 2008. Beta-adrenoreceptors comprise a critical element in learning-facilitated long-term plasticity. *Cerebral cortex* 18, 1326-1334.

Kennedy, N., Abbott, R., Paykel, E.S., 2004. Longitudinal syndromal and sub-syndromal symptoms after severe depression: 10-year follow-up study. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 184, 330-336.

Kessler, R.C., Price, R.H., Wortman, C.B., 1985. Social factors in psychopathology: stress, social support, and coping processes. *Annual review of psychology* 36, 531-572.

Kiran, B.K., Ulus, I.H., 1992. Selective response of rat peripheral sympathetic nervous system to various stress situations. *Neuroendocrine and molecular approaches*, 561–568.

Kitchigina, V., Vankov, A., Harley, C., Sara, S.J., 1997. Novelty-elicited, noradrenaline-dependent enhancement of excitability in the dentate gyrus. *The European journal of neuroscience* 9, 41-47.

Kjekshus, J.K., Blix, A.S., Grottum, P., Aasen, A.O., 1981. Beneficial effects of vagal stimulation on the ischaemic myocardium during beta-receptor blockade. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 41, 383-389.

Kleiger, R.E., Miller, J.P., Bigger, J.T., Jr., Moss, A.J., 1987. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 59, 256-262.

Kleppe, R., Rosati, S., Jorge-Finnigan, A., Alvira, S., Ghorbani, S., Haavik, J., Valpuesta, J.M., Heck, A.J.R., Martinez, A., 2014. Phosphorylation dependence and stoichiometry of the complex formed by tyrosine hydroxylase and 14-3-3 γ . *Molecular and cellular proteomics*, 13, 2017–2030.

- Klongpanichapak, S., Phansuwan-Pujito, P., Ebadi, M., Govitrapong, P., 2008.** Melatonin inhibits amphetamine-induced increase in alpha-synuclein and decrease in phosphorylated tyrosine hydroxylase in SK-N-SH cells. *Neuroscience letters*, 436, 309–313.
- Kolar, J., Machackova, I., 2005.** Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *Journal of pineal research* 39, 333-341.
- Kuhn, R., 1957.** Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355). *Schweizerische medizinische wochenschrift* 87, 35-36.
- Korkmaz, A., Rosales-Corral, S., Reiter, R.J., 2012.** Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. *Gene* 503, 1-11.
- Kreiner, G., Bielawski, A., Zelek-Molik, A., Kowalska, M., Nalepa, I., 2004.** Chronic treatment with citalopram does not affect the expression of alpha1-adrenergic receptor (alpha1-AR) subtypes. *Polish journal of pharmacology* 56, 831-836.
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2010.** Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *The American journal of psychiatry* 167, 1305-1320.
- Kuo, L.E., Czarnecka, M., Kitlinska, J.B., Tilan, J.U., Kvetnansky, R., Zukowska, Z., 2008.** Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148, 232-237.
- Kuo, L.E., Kitlinska, J.B., Tilan, J.U., Li, L., Baker, S.B., Johnson, M.D., Lee, E.W., Burnett, M.S., Fricke, S.T., Kvetnansky, R., Herzog, H., Zukowska, Z., 2007.** Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature medicine* 13, 803-811.
- Kuroko, Y., Fujii, T., Yamazaki, T., Akiyama, T., Ishino, K., Sano, S., Mori, H., 2005.** Contribution of catechol O-methyltransferase to the removal of accumulated interstitial catecholamines evoked by myocardial ischemia. *Neuroscience letters* 388, 61-64.
- Kvetnansky, R., 2004.** Stressor specificity and effect of prior experience on catecholamine biosynthetic enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032, 117-129.
- Kvetnansky, R., Kubovcakova, L., Tillinger, A., Micutkova, L., Krizanova, O., Sabban, E.L., 2006.** Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure. *Cellular and molecular neurobiology* 26, 735-754.
- Kvetnansky, R., Micutkova, L., Rychkova, N., Kubovcakova, L., Mravec, B., Filipenko, M., Sabban, E.L., Krizanova, O., 2004.** Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic Ganglia of stressed rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018, 356-369.
- Kvetnansky R, M.R., 2007.** Adrenal medulla. *Encyclopedia of Stress*, 52-59.
- Kvetnansky, R., Sabban, E.L., 1998.** Stress and molecular biology of neurotransmitter-related enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 342-356.
- Kvetnansky, R., Sabban, E.L., Palkovits, M., 2009.** Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological reviews* 89, 535-606.
- Kvetnansky, R., Weise, V.K., Gewirtz, G.P., Kopin, I.J., 1970.** Synthesis of adrenal catecholamines in rats during and after immobilization stress. *Endocrinology* 89, 46-49.
- Kvetnansky, R., Weise, V.K., Thoa, N.B., Kopin, I.J., 1979.** Effects of chronic guanethidine treatment and adrenal medullectomy on plasma levels of catecholamines and corticosterone in forcibly immobilized rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 209: 287–291.
- Laborie, C., Van Camp, G., Bernet, F., Montel, V., Dupouy, J.P., 2003.** Metyrapone-induced glucocorticoid depletion modulates tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression in the rat adrenal gland by a noncholinergic transsynaptic activation. *Journal of neuroendocrinology* 15, 15–23.

La Gamma, E.F., Agarwal, B.L., DeCristofaro, J.D., 1992. Regulation of adrenomedullary preproenkephalin mRNA: effects of hypoglycemia during development. *Brain research. Molecular brain research* 13, 189-197.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lahmeyer, H.W., Bellur, S.N., 1987. Cardiac regulation and depression. *Journal of psychiatric research* 21, 1-6.

Lambert, G., Johansson, M., Agren, H., Friberg, P., 2000. Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Archives of general psychiatry* 57, 787-793.

Lau, W.W., Ng, J.K., Leem M.M., Chanm A.S., Wong, Y.H., 2012. Interleukin-6 autocrine signaling mediates melatonin MT(1/2) receptor-induced STAT3 Tyr(705) phosphorylation. *Journal of pineal research*, 52, 477-489.

Laukova, M., Vargovic, P., Vlcek, M., Lejavova, K., Hudecova, S., Krizanova, O., Kvetnansky, R., 2013. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. *Immunobiology* 218, 780-789.

Lechin, F., van der Dijs, B., Orozco, B., Lechin, M.E., Baez, S., Lechin, A.E., Rada, I., Acosta, E., Arocha, L., Jimenez, V., León, G., Zulay, G., 1995. Plasma neurotransmitters, blood pressure, and heart rate during supine-resting, orthostasis, and moderate exercise conditions in major depressed patients. *Biological psychiatry* 38, 166-173.

Lemberger, L., Fuller, R.W., Zerbe, R.L., 1985. Use of specific serotonin uptake inhibitors as antidepressants. *Clinical neuropharmacology*, 8, 299-317.

Lenaz, G., 2001. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB life* 52, 159-164.

Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, N., 1958. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* 80, 2587.

Liao, Z., Lockhead, D., D. Larson, E.D., Proenza, C., 2010. Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *The journal of general physiology*, 136, 247-258.

Lingswiler, V.M., Crowther, J.H., Stephens, M.A., 1989. Emotional and somatic consequences of binge episodes. *Addictive behaviors* 14, 503-511.

Liu, Y.H., Liu, A.H., Xu, Y., Tie, L., Yu, H.M., Y.J. Li, 2005. Effect of chronic unpredictable mild stress on brain-pancreas relative protein in rat brain and pancreas. *Behavioural brain research*, 165, 63-71.

Liu, Y.Z., Wang, Y.X., Jiang, C.L., 2017. Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11, 316.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25, 402-408.

Lôo, H., Hale, A., D'haenen, H., 2002. Determination of the dose of agomelatine, a melatonergic agonist and selective 5-HT(2C) antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study. *International clinical psychopharmacology* 17, 239-247.

Loomer, H.P., Saunders, J.C., Kline, N.S., 1957. A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatric research report* 8, 129-141.

Llorca, P.M., 2010. The antidepressant agomelatine improves the quality of life of depressed patients: implications for remission. *Journal of psychopharmacology* 24, 21-26.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.

Luo, Y., Kuang, S., Xue, L., Yang, J., 2016. The mechanism of 5-lipoxygenase in the impairment of learning and memory in rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Physiology and behavior* 167, 145-153.

Marathe, S.V., D'almeida, P.L., Virmani, G., Bathini, P., Alberi, L., 2018. Effects of Monoamines and antidepressants on astrocyte physiology: Implications for monoamine hypothesis of depression. *Journal of experimental neuroscience*, 12, 1-7.

Macchi, M.M., Bruce, J.N., 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in neuroendocrinology* 25, 177-195.

Magarinos, A.M., Deslandes, A., McEwen, B.S., 1999. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *European journal of pharmacology* 371, 113-122.

Maity, S., Rah, S., Sonenberg, N., Gkogkas, C.G., Nguyen, P.V., 2015. Norepinephrine triggers metaplasticity of LTP by increasing translation of specific mRNAs. *Learning and memory* 22, 499-508.

Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 9104-9110.

Marková, M., Adámeková, E., Kubatka, P., Bojková, B., Ahlersová, E. Ahlers, I. 2003. Effect of prolonged melatonin administration on metabolic parameters and organ weights in young male and female Sprague-Dawley rats. *Acta Veterinaria Brno* 72, 163–173.

Marktl, W., Brugger, P., Herold, M., 1997. Melatonin and coronary heart disease. *Wiener klinische Wochenschrift* 109, 747-749.

Mason, J.W., 1975. A historical view of the stress field. *Journal of human stress* 1, 22-36 concl.

Medvedev, I.O., Ramsey, A.J., Masoud, S.T., Bermejo, M.K., Urs, N., Sotnikova, T.D., Beaulieu, J.M., Gainetdinov, Ali Salahpour, A., 2013. D1 dopamine receptor coupling to PLC β regulates forward locomotion in mice. *The journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience*, 33, 18125–18133.

McEwen, B.S., 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience* 22, 105-122.

McEwen, B.S., Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior* 43, 2-15.

McKinnon, M.C., Yucel, K., Nazarov, A., MacQueen, G.M., 2009. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *Journal of psychiatry and neuroscience : JPN* 34, 41-54.

McMahon, A., Kvetnansky, R., Fukuhara, K., Weise, V.K., Kopin, I.J., Sabban, E.L., 1992. Regulation of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase mRNA levels in rat adrenals by a single and repeated immobilization stress. *Journal of neurochemistry* 58, 2124-2130.

McMillan, C.R., Sharma, R., Ottenhof, T., Niles, L.P., 2007. Modulation of tyrosine hydroxylase expression by melatonin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience letters* 419, 202-206.

McNulty, S., Ross, A.W., Barrett, P., Hastings, M.H., Morgan, P.J., 1994. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *Journal of neuroendocrinology* 6, 523–532.

Meana, J.J., Barturen, F., Garcia-Sevilla, J.A., 1992. Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biological psychiatry* 31, 471-490.

Meredith, I.T., Eisenhofer, G., Lambert, G.W., Dewar, E.M., Jennings, G.L., Esler, M.D., 1993. Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure. Evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake. *Circulation* 88, 136-145.

- Meyer, H., Palchadhuri, M., Scheinin, M., Flugge, G., 2000.** Regulation of alpha(2A)-adrenoceptor expression by chronic stress in neurons of the brain stem. *Brain research* 880, 147-158.
- Micale, V., Arezzi, A., Rampello, L., Drago, F., 2006.** Melatonin affects the immobility time of rats in the forced swim test: the role of serotonin neurotransmission. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 16, 538-545.
- Michael, C., 1990.** Behaviour in Situations of Conflict. *Psychobiology of stress* 54, 203-209.
- Milano, C.A., Allen, L.F., Rockman, H.A., Dolber, P.C., McMinn, T.R., Chien, K.R., Johnson, T.D., Bond, R.A., Lefkowitz, R.J., 1994.** Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 264, 582-586.
- Misaka, T., Yoshihisa, A., Yokokawa, T., Sato, T., Oikawa, M., Kobayashi, A., Yamaki, T., Sugimoto, K., Kunii, H., Nakazato, K., Takeishi, Y. 2019.** Plasma levels of melatonin in dilated cardiomyopathy. *Journal of pineal research* 66, e12564.
- Miyahara, S., Komori, T., Fujiwara, R., Shizuya, K., Yamamoto, M., Ohmori, M., Okazaki, Y., 1999.** Effects of single and repeated stresses on the expression of mRNA for alpha1-adrenoceptors in the rat hypothalamus and midbrain. *European journal of pharmacology* 379, 111-114.
- Moffitt, T.E., Caspi, A., Taylor, A., Kokaua, J., Milne, B.J., Polanczyk, G., Poulton, R., 2010.** How common are common mental disorders? Evidence that lifetime prevalence rates are doubled by prospective versus retrospective ascertainment. *Psychological medicine* 40, 125-129.
- Mokhtar, D.M., Hussein, M.T., Hassan, A.H.S., 2017.** Melatonin elicits stimulatory action on the adrenal gland of soay ram: morphometrical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Microscopy and microanalysis* 23, 1173-1188.
- Montgomery, K.C., 1955.** The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of comparative and physiological psychology* 48, 254-260.
- Moore, R.Y., Lenn, N.J., 1972.** A retinohypothalamic projection in the rat. *The journal of comparative neurology* 146, 1-14.
- Morita, K., Kuwada, A., Sano, A., Sakata, M., Sei, H., Morita, Y., 2001.** Semi-quantitative RT-PCR analysis of environmental influence on P450scc and PNMT mRNA expression in rat adrenal glands. *Life sciences* 70, 73-80.
- Mostafavi, S.A., Mohammadi, M.R., Hosseinzadeh, P., Eshraghian, M.R., Akhondzadeh, S., Hosseinzadeh-Attar, M.J., Ranjbar, E., Kooshesh, S.M., Keshavarz, S.A., 2012.** Dietary intake, growth and development of children with ADHD in a randomized clinical trial of Ritalin and Melatonin co-administration: Through circadian cycle modification or appetite enhancement? *Iranian journal of psychiatry* 7, 114-119.
- Moura, A.L., Hyslop, S., Grassi-Kassisse, D.M., Spadari, R.C., 2017.** Functional beta 2 adrenoceptors in rat left atria: effect of foot-shock stress. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 95, 999-1008.
- Mukda, S., Vimolratana, O., Govitrapong, P., 2011.** Melatonin attenuates the amphetamine-induced decrease in vesicular monoamine transporter-2 expression in postnatal rat striatum. *Neuroscience letters* 488, 154-157.
- Nakahara, D., Nakamura, M., Iigo, M., Okamura, H., 2003.** Bimodal circadian secretion of melatonin from the pineal gland in a living CBA mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9584-9589.
- Nakagawa, S., Kim, J.E., Lee, R., Malberg, J.E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2002.** Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 3673-3682.

Nalepa, I., Vetulani, J., 1994. The responsiveness of cerebral cortical adrenergic receptors after chronic administration of atypical antidepressant mianserin. *Journal of psychiatry and neuroscience* : JPN 19, 120-128.

Nankova, B., Kvetnansky, R., McMahon, A., Viskupic, E., Hiremagalur, B., Frankle, G., Fukuhara, K., Kopin, I.J., Sabban, E.L., 1994. Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by a nonneuronal nonpituitary-mediated mechanism in immobilization stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5937-5941.

Nava, M., Quiroz, Y., Vaziri, N., Rodriguez-Iturbe, B., 2003. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 284, F447-454.

Nduhirabandi, F., du Toit, E.F., Lochner, A., 2012. Melatonin and the metabolic syndrome: a tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities? *Acta physiologica* 205, 209-223.

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.

Nikolaus, S., Wittsack, H.J., Beu, M., Antke, C., Silva, M.S., Wickrath, F., Müller-Lutz, A., Huston, J.P., Antoch, G., Müller, H.W., Hautzel, H., 2018. GABAergic control of nigrostriatal and mesolimbic dopamine in the rat brain. *Frontiers in behavioral neuroscience* 12, 38.

Nishiyama, K., Yasue, H., Moriyama, Y., Tsunoda, R., Ogawa, H., Yoshimura, M., Kugiyama, K., 2001. Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. *American heart journal* 141, E9.

Niswender, C.M., Herrick-Davis, K., Dilley, G., Meltzer, H.Y., Overholser, J.C., Stockmeier, C.A., Emeson, R.B., Sanders-Bush, E., 2001. RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor: Alterations in suicide and implications for serotonergic pharmacology. *Neuropsychopharmacology* 24, 478-491.

Okatani, Y., Wakatsuki, A., Kaneda, C., 2000. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *Journal of pineal research* 28, 89-96.

Oliver, G., Wardle, J., 1999. Perceived effects of stress on food choice. *Physiology and behavior* 66, 511-515.

Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J.M., Anversa, P., 1991. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation research* 68, 1560-1568.

Onoa, B., Li, H., Gagnon-Bartsch, J.A., Elias, L.A., Edwards, R.H., 2010. Vesicular monoamine and glutamate transporters select distinct synaptic vesicle recycling pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 7917-7927.

Ortiz, F., García, J.A., Acuña-Castroviejo, D., Doerrier, C., López, A., Venegas, C., Volt, H., Luna-Sánchez, M., López, L.C., Escames, G., 2014. The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *Journal of pineal research*, 56, 71-81.

Pacak, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocineresponses: implications for stress-related disorders. *Endocrinology reviews* 22, 502-548.

Panda, S., Nayak, S.K., Campo, B., Walker, J.R., Hogenesch, J.B., Jegla, T., 2005. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307, 600-604.

Pandi-Perumal, S.R., BaHammam, A.S., Ojike, N.I., Akinseye, O.A., Kendzerska, T., Buttoo, K., Dhandapani, P.S., Brown, G.M., Cardinali, D.P., 2016. Melatonin and Human Cardiovascular Disease. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 22, 122-132.

Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J., Zisapel, N., Cardinali, D.P., 2008. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in neurobiology* 85, 335-353.

- Papp, M., Litwa, E., Gruca, P., Mocaer, E., 2006.** Anxiolytic-like activity of agomelatine and melatonin in three animal models of anxiety. *Behavioural pharmacology* 17, 9-18.
- Paredes, S.D., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2009.** Phytomelatonin: a review. *Journal of experimental botany* 60, 57-69.
- Patterson-Buckendahl, P., Kubovcaková, L., Krizanová, O., Pohorecký, L.A., Kvetnansky, R., 2005.** Ethanol consumption increases rat stress hormones and adrenomedullary gene expression. *Alcohol* 37, 157-166.
- Peliciari-Garcia, R.A., Zanutta, M.M., Andrade-Silva, J., Gomes, D.A., Barreto-Chaves, M.L., Cipolla-Neto, J., 2011.** Expression of circadian clock and melatonin receptors within cultured rat cardiomyocytes. *Chronobiology International* 28, 21-30.
- Penna, L.B., Bassani, R.A., 2010.** Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats. *Stress* 13, 73-82.
- Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999.** Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3V-5V-monophosphate pathway. *Biochemical pharmacology* 58, 633-639.
- Petrovic, V.M., Janic-Sibalic, V., 1980.** Catecholamine synthesizing and degrading enzymes in the heat stressed or adapted rats. *Catecholamines and Stress*, 365-370.
- Petrovich, G.D., Canteras, N.S., Swanson, L.W., 2001.** Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews* 38, 247-289.
- Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F., 1994.** Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life sciences* 55, PL271-276.
- Pittenger, C., Duman, R.S., 2008.** Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33, 88-109.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977.** Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Porterfield, V.M., Gabella, K.M., Simmons, M.A., Johnson, J.D., 2012.** Repeated stressor exposure regionally enhances beta-adrenergic receptor-mediated brain IL-1 β production. *Brain, behavior, and immunity* 268, 1249-1255.
- Prabhu, S.D., Wang, G., Luo, J., Gu, Y., Ping, P., Chandrasekar, B., 2003.** Beta-adrenergic receptor blockade modulates Bcl-Xs expression and reduces apoptosis in failing myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 35, 483-393.
- Pratt, J.M., Petty, J., Riba-Garcia, I., Robertson, D.H., Gaskell, S.J., Oliver, S.G., Beynon, R.J., 2002.** Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Molecular and cellular proteomics* 1, 579-591.
- Prunet-Marcassus, B., Desbazeille, M., Bros, A., Louche, K., Delagrangé, P., Renard, P., Casteilla, L., Penicaud, L., 2003.** Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 144, 5347-5352.
- Pullar, C.E., Rizzo, A., Isseroff, R.R., 2006.** Beta-adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *The journal of biological chemistry* 281, 21225-21235.
- Pytka, P., Podkova, K., Rapacz, A., Podkova A., Zmudzka, E., Olczyk, A., Jacek Sapa, J., Filipek, B., 2016.** The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in 4 antidepressant-like effect. *Pharmacological reports* 68, 263-274.
- Qi, X., Lin, W., Li, J., Pan, Y., Wang, W., 2006.** The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress. *Behavioural brain research* 175, 233-240.
- Rainer, Q., Xia, L., Guilloux, J.P., Gabriel, C., Mocaer, E., Hen, R., Enhamre, E., Gardier, A.M., David, D.J., 2012.** Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in

- a model of depression/anxiety. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 15, 321–335.
- Rajaratnam, S.M., Cohen, D.A., Rogers, N.L., 2009.** Melatonin and melatonin analogues. *Sleep medicine clinics* 4, 179–193.
- Ramirez-Rodriguez, G., Vega-Rivera, N.M., Oikawa-Sala, J., Gomez-Sanchez, A., Ortiz-Lopez, L., Estrada-Camarena, E., 2014.** Melatonin synergizes with citalopram to induce antidepressant-like behavior and to promote hippocampal neurogenesis in adult mice. *Journal of pineal research* 56, 450-461.
- Ramos, A., 2008.** Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in pharmacological sciences* 29, 493–498.
- Rand, C., Stunkard, A.J., 1978.** Obesity and psychoanalysis. *The American journal of psychiatry* 135, 547-551.
- Rastmanesh, R., de Bruin, P.F., 2012.** Potential of melatonin for the treatment or prevention of obesity: an urgent need to include weight reduction as a secondary outcome in clinical trials of melatonin in obese patients with sleep disorders. *Contemporary clinical trials* 33, 574-575.
- Reiter, R.J., 1991.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine reviews* 12, 151-180.
- Reiter, R.J., 1992.** The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays*, 14, 169-175.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., 2002.** Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 341-344.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E., 2000.** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science* 7, 444-458.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Paredes, S.D., Fuentes-Broto, L., 2010.** Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Annals of medicine* 42, 276-285.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T., 1994.** Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177–1185.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Godson, C., 1996.** Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in pharmacological science* 17, 100-102.
- Richard, F., Faucon-Biguët, N., Labatut, R., Rollet, D., Mallet, J., Buda, M., 1988.** Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in rat brain and adrenals by exposure to cold. *Journal of neuroscience research* 20, 32-37.
- Riemann, B., Schafers, M., Law, M.P., Wichter, T., Schober, O., 2003.** Radioligands for imaging myocardial alpha- and beta-adrenoceptors. *Nuklearmedizin. Nuclear medicine* 42, 4-9.
- Ríos-Lugo, M.J., Cano, P., Jiménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, M.P., Scacchi, P.A., Cardinali, D.P., Esquifino, A.I., 2010.** Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *Journal of pineal research* 49, 342–348.
- Roca, A.L., Godson, C., Weaver, D.R., Reppert, S.M., 1996.** Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse *Mella* melatonin receptor. *Endocrinology* 137, 3469–3477.
- Rogers, N.L., Dinges, D.F., Kennaway, D.J., Dawson, D., 2003.** Potential action of melatonin in insomnia. *Sleep* 26, 1058-1059.
- Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A.D., Freissmuth, M., Jockers, R., Nanoff, C., 1999.** Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Molecular pharmacology* 56, 1014–1024.
- Romo-Nava, F., Alvarez-Icaza Gonzalez, D., Fresan-Orellana, A., Saracco Alvarez, R., Becerra-Palars, C., Moreno, J., Ontiveros Uribe, M.P., Berlanga, C., Heinze, G., Buijs, R.M., 2014.** Melatonin attenuates antipsychotic metabolic effects: an eight-week randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled clinical trial. *Bipolar disorders* 16, 410-421.

- Roseboom, P.H., Coon, S.L., Baler, R., McCune, S.K., Weller, J.L., Klein, D.C., 1996.** Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137, 3033-3045.
- Sabban, E.L., Kvetnansky, R., 2001.** Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in neurosciences* 24, 91-98.
- Sabban, E.L., Serova, L.I., 2007.** Influence of prior experience with homotypic or heterotypic stressor on stress reactivity in catecholaminergic systems. *Stress*, 10, 137-143.
- Sachs, B.D., 1988.** The development of grooming and its expression in adult animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 525, 1-17.
- Salie, R., Harper, I., Cillie, C., Genade, S., Huisamen, B., Moolman, J., Lochner, A., 2001.** Melatonin protects against ischaemic-reperfusion myocardial damage. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33, 343-357.
- Santana, M.M., Rosmaninho-Salgado, J., Cortez, V., Pereira, F.C., Kaster, M.P., Aveleira, C.A., Ferreira, M., Alvaro, A.R., Cavadas, C., 2015.** Impaired adrenal medullary function in a mouse model of depression induced by unpredictable chronic stress. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 25, 1753-1766.
- Sara, S.J., 2009.** The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature reviews. Neuroscience* 10, 211-223.
- Sara, S.J., Vankov, A., Herve, A., 1994.** Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: a clue to the role of noradrenaline in memory. *Brain research bulletin* 35, 457-465.
- Sartorius, N., 2001.** The economic and social burden of depression. *The Journal of Clinical Psychiatry* 62, 8-11.
- Sato, M., Kanikowska, D., Iwase, S., Shimizu, Y., Nishimura, N., Inukai, Y., Sato, M., Sugeno, J., 2013.** Seasonal differences in melatonin concentrations and heart rates during sleep in obese subjects in Japan. *International journal of biometeorology* 57, 743-748.
- Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K., Colucci, W.S., 2002.** Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34, 379-388.
- Schachinger, H., Blumenthal, T.D., Richter, S., Savaskan, E., Wirz-Justice, A., Krauchi, K., 2008.** Melatonin reduces arousal and startle responsiveness without influencing startle habituation or affective startle modulation in young women. *Hormones and behavior* 54, 258-262.
- Scheer, F.A., Van Montfrans, G.A., van Someren, E.J., Mairuhu, G., Buijs, R.M., 2004.** Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* 43, 192-197.
- Scheggi, S., Marchese, G., Grappi, S., Secci, M.E., de Montis, M.G., Gambarana, C., 2011.** Cocaine sensitization models an anhedonia-like condition in rats. *The international journal of neuropsychopharmacology* 14, 333-346.
- Schnell, A., Albrecht, U., Sandrelli, F., 2014.** Rhythm and mood: relationships between the circadian clock and mood-related behavior. *Behavioral neuroscience* 128, 326-343.
- Schroeder, C., Jordan, J., 2012.** Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 303, H1273-1282.
- Schultz, W., 2010.** Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behavioral and brain function* 6, 24.
- Schwartz, K., Yadid, G., Weizman, A., Rehavi, M., 2003.** Decreased limbic vesicular monoamine transporter 2 in a genetic rat model of depression. *Brain research* 965, 174-179.
- Segal, M., Markram, H., Richter-Levin, G., 1991.** Actions of norepinephrine in the rat hippocampus. *Progress in brain research*, 88, 323-330.
- Selye, H., 1976.** Stress without distress. *Bruxelles medical* 56, 205-210.

Serova, L.I., Saez, E., Spiegelman, B.M., Sabban, E.L., 1998. c-Fos deficiency inhibits induction of mRNA for some, but not all, neurotransmitter biosynthetic enzymes by immobilization stress. *Journal of neurochemistry* 70, 1935-1940.

Shanks, J., Mane, S., Ryan, R., Paterson, D.J., 2013. Ganglion-specific impairment of the norepinephrine transporter in the hypertensive rat. *Hypertension* 61, 187-193.

Sheikh, N., Ahmad, A., Siripurapu, K.B., Kuchibhotla, V.K., Singh, S., Palit, G., 2007. Effect of *Bacopa monniera* on stress induced changes in plasma corticosterone and brain monoamines in rats. *Journal of ethnopharmacology* 111, 671-676.

Sheline, Y.I., Gado, M.H., Kraemer, H.C., 2003. Untreated depression and hippocampal volume loss. *The American journal of psychiatry* 160, 1516-1518.

Silva, R., Mesquita, A.R., Bessa, J., Sousa, J.C., Sotiropoulos, I., Leao, P., Almeida, O.F., Sousa, N., 2008. Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. *Neuroscience* 152, 656-669.

Simmerman, H.K., Jones, L.R., 1998. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiological reviews* 78, 921-947.

Slominski, A., Fischer, T.W., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Semak, I., Zbytek, B., Slominski, R.M., Tobin, D.J., 2005. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 27, 137-148.

Slominski, A., Tobin, D.J., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Paus, R., 2008. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19, 17-24.

Sorato, E., Menazza, S., Zulian, A., Sabatelli, P., Gualandi, F., Merlini, L., Bonaldo, P., Canton, M., Bernardi, P., Di Lisa, F., 2014. Monoamine oxidase inhibition prevents mitochondrial dysfunction and apoptosis in myoblasts from patients with collagen VI myopathies. *Free radical biology and medicine* 75, 40-47.

Spasojevic, N., Gavrilovic, L., Dronjak, S., 2008. Different behavioral effects of maprotiline and fluxilan in rats. *Archives of biological sciences* 60, 33-39.

Spasojevic, N., Gavrilovic, L., Dronjak, S., 2010. Effects of repeated maprotiline and fluoxetine treatment on gene expression of catecholamine synthesizing enzymes in adrenal medulla of unstressed and stressed rats. *Autonomic and autocoid pharmacology*, 30, 213-217.

Spasojevic, N., Gavrilovic, L., Kovacevic, I., Dronjak, S. 2007. Endocrinological and behavioural effects of chronic fluxilan administration in rats. *Journal of medical biochemistry*, 26, 274-279.

Srinivasan, V., Smits, M., Spence, W., Lowe, A.D., Kayumov, L., Pandi-Perumal, S.R., Parry, B., Cardinali, D.P., 2006. Melatonin in mood disorders. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 7, 138-151.

Stephan, F.K., Zucker, I., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 1583-1586.

Stoessl, A.J., 1994. Dopamine D1 receptor agonist-induced grooming is blocked by the opioid receptor antagonist naloxone. *European journal of pharmacology* 259, 301-303.

Stone, A.A., Brownell, K.D., 1994. The stress-eating paradox: Multiple daily measurements in adult males and females. *Psychology and health* 9, 425-436.

Stone, E.A., Lin, Y., Rosengarten, H., Kramer, H.K., Quartermain, D., 2003. Emerging evidence for a central epinephrine-innervated alpha 1-adrenergic system that regulates behavioral activation and is impaired in depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28, 1387-1399.

Storr, M., Koppitz, P., Sibae, A., Saur, D., Kurjak, M., Franck, H., Schusdziarra, V., Allescher, H.D., 2002. Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant

neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. *Journal of pineal research* 33, 101-108.

Sugden, D., 1983. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 227, 587-591.

Sulakhe, P.,V., Vo, X.,T., 1995. Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Molecular and cellular biochemistry* 149-150, 103-126.

Sun, X., Wang, M., Wang, Y., Lian, B., Sun, H., Wang, G., Li, Q., Sun, L., 2017. Melatonin produces a rapid onset and prolonged efficacy in reducing depression-like behaviors in adult rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neuroscience letters* 642, 129-135.

Tai, T.C., Claycomb, R., Her, S., Bloom, A.K., Wong, D.L., 2002. Glucocorticoid responsiveness of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *Molecular pharmacology* 61, 1385-1392.

Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., Reiter, R.J., 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Journal of pineal research* 1, 57-60.

Tan, D.X., Manchester, L.C., Burkhardt, S., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Shohami, E., Huo, Y.S., Hardeland, R., Reiter, R.J., 2001. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for experimental biology* 15, 2294-2296.

Taniguti, E.H., Ferreira, Y.S., Stupp, I.J.V., Fraga-Junior, E.B., Mendonca, C.B., Rossi, F.L., Ynoue, H.N., Doneda, D.L., Lopes, L., Lima, E., Buss, Z.S., Vandresen-Filho, S., 2018. Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Physiology and behavior* 188, 270-275.

Terry, R.L., 1970. Primate grooming as a tension reduction mechanism. *The journal of psychology* 76, 129-136.

Thoa NB, T.Y., Kopin IJ, Maengwyn-Davies GD, 1976. Alterations of mouse adrenal medullary catecholamines and enzymes in response to attack: effect of pre- and post-treatment with phenobarbital. *Psychopharmacology* 51, 53-57.

Tillinger, A., Sollas, A., Serova, L.I., Kvetnansky, R., Sabban, E.L., 2010. Vesicular monoamine transporters (VMATs) in adrenal chromaffin cells: stress-triggered induction of VMAT2 and expression in epinephrine synthesizing cells. *Cellular and molecular neurobiology* 30, 1459-1465.

Touitou, Y., Bogdan, A., 2007. Promoting adjustment of the sleep-wake cycle by chronobiotics. *Physiology and behavior*, 90, 294-300.

Trendelenburg, U., 1988. The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. In *Handbook of experimental pharmacology*, edited by Trendelenburg U. Berlin: Springer-Verlag, 279-319.

Tricoire, H., Moller, M., Chemineau, P., Malpoux, B., 2003. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reproduction* 61, 311-321.

Tumer, N., Hale, C., Lawler, J., Strong, R., 1992. Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat adrenal gland by exercise: effects of age. *Brain research. Molecular brain research* 14, 51-56.

Vestlund, J., Aimilia Lydia Kalafateli, A.L., Erik Studer, E., Westberg, L., Jerlhag, E., 2019. Neuromedin U induces self-grooming in socially-stimulated mice. *Neuropharmacology* 162, 107818.

Videbech, P., Ravnkilde, B., 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *The American journal of psychiatry* 161, 1957-1966.

Vieira-Coelho, M.A., Serrao, M.P., Afonso, J., Pinto, C.E., Moura, E., 2009. Catecholamine synthesis and metabolism in the central nervous system of mice lacking alpha-adrenoceptor subtypes. *British journal of pharmacology* 158, 726-737.

Vietor, I., Rusnak, M., Viskupic, E., Blazicek, P., Sabban, E.L., Kvetnansky, R., 1996. Glucoprivation by insulin leads to trans-synaptic increase in rat adrenal tyrosine hydroxylase mRNA levels. *European journal of pharmacology* 313, 119-127.

Wadden TA, S.A., 2002. *Handbook of Obesity Treatment*. The Guilford Press, New York, NY.

Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychological bulletin* 83, 482-504.

Wang, Z., Zhang, D., Hui, S., Zhang, Y., Hu, S., 2013. Effect of tribulus terrestris saponins on behavior and neuroendocrine in chronic mild stress depression rats. *Journal of traditional Chinese medicine*, 33, 228-232.

Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain research* 588, 341-345.

Wehrwein, E.A., Novotny, M., Swain, G.M., Parker, L.M., Esfahanian, M., Spitsbergen, J.M., Habecker, B.A., Kreulen, D.L., 2013. Regional changes in cardiac and stellate ganglion norepinephrine transporter in DOCA-salt hypertension. *Autonomic neuroscience : basic and clinical* 179, 99-107.

Williams, W.R., 2018. Dampening of neurotransmitter action: molecular similarity within the melatonin structure. *Endocrine regulations*, 52, 199–207.

Wimalasena, K., 2011. Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Medicinal research reviews* 31, 483-519.

Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.J., Firestine, S., Melan, M.A., 2003. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life sciences* 72, 2183-2198.

Witt-Enderby, P.A., Jarzynka, M.J., Melan, M.A., 2001. Microtubules modulate melatonin receptor function. *Neuroscience Abstracts* 27:142.

Witt-Enderby, P.A., Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 1998. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139, 3064–3071.

Witt-Enderby, P.A., MacKenzie, R.S., McKeon, R.M., Carroll, E.A., Bordt, S.L., Melan, M.A., 2000. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell motility and the cytoskeleton* 46, 28–42.

Wong, D.L., Siddall, B., Wang, W., 1995. Hormonal control of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase. Enzyme activity, the final critical pathway. *Neuropsychopharmacology* 13, 223-234.

Xu, L., Chen, X., Sun, B., Sterling, C., Tank, A.W., 2007. Evidence for regulation of tyrosine hydroxylase mRNA translation by stress in rat adrenal medulla. *Brain research* 1158, 1-10.

Yamada, K., 1990. Effects of melatonin on adrenal function in male rats. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 69, 241-244.

Yang, H., Li, W., Meng, P., Liu, Z., Liu, J., Wang, Y., 2018. Chronic unpredictable mild stress aggravates mood disorder, cognitive impairment, and brain insulin resistance in diabetic rat. *Evidence-based complement and alternative medicine*, 2901863.

Yang, H.W., Lin, Y.W., Yen, C.D., Min, M.Y., 2002. Change in bi-directional plasticity at CA1 synapses in hippocampal slices taken from 6-hydroxydopamine-treated rats: the role of endogenous norepinephrine. *The European journal of neuroscience* 16, 1117-1128.

Yaprak, M., Altun, A., Vardar, A., Aktoz, M., Ciftci, S., Ozbay, G., 2003. Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease. *International journal of cardiology* 89, 103-107.

Yorgason, J.T., España, A.R., Konstantopoulos, K.J., Weiner, L.J., Sara R Jones, R.S., 2013. Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. *The European journal of neuroscience*, 37, 1022-1031.

Young, E.A., Dreumont, S.E., Cunningham, C.L., 2014. Role of nucleus accumbens dopamine receptor subtypes in the learning and expression of alcohol-seeking behavior. *Neurobiology of learning and memory*, 108, 28–37.

Yrondi, A., Brauge, D., LeMen, J., Arbus, C., Pariente, J., 2017. Depression and sports-related concussion: A systematic review. *Presse medicale*, 46, 890-902.

Yu, J.T., Wang, N.D., Ma, T., Jiang, H., Guan, J., Tan, L., 2011. Roles of beta-adrenergic receptors in Alzheimer's disease: implications for novel therapeutics. *Brain research bulletin*, 84, 111–117.

Yucel, A., Yucel, N., Ozkanlar, S., Polat, E., Kara, A., Ozcan, H., Gulec, M., 2016. Effect of agomelatine on adult hippocampus apoptosis and neurogenesis using the stress model of rats. *Acta histochemica*, 118, 299-304.

Yun, J., Koike, H., Ibi, D., Toth, E., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yoneyama, M., Ogita, K., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Nagai, T., Yamada, K., 2010. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *Jornal of neurochemistry* 114, 1840-1851.

Zaugg, M., Xu, W., Lucchinetti, E., Shafiq, S.A., Jamali, N.Z., Siddiqui, M.A., 2000. Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation* 102, 344-350.

Zhang, H., Akbar, M., Kim, H.Y., 1999. Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland. *The biochemical journal* 344 Pt 2, 487-493.

Zhang, H.T., Huang, Y., O'Donnell, J.M., 2003. Antagonism of the antidepressant-like effects of clenbuterol by central administration of beta-adrenergic antagonists in rats. *Psychopharmacology* 170, 102-107.

Zhang, X., Szeto, C., Gao, E., Tang, M., Jin, J., Fu, Q., Makarewich, C., Ai, X., Li, Y., Tang, A., Wang, J., Gao, H., Wang, F., Ge, X.J., Kunapuli, S.P., Zhou, L., Zeng, C., Xiang, K.Y., Chen, X., 2013. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic β -adrenergic signaling. *Circulation Research*. 112, 498–509.

Zhang, X.P., Vatner, S.F., Shen, Y.T., Rossi, F., Tian, Y., Peppas, A., Resuello, R., Natividad, F.F., Vatner, D., 2007. Increased apoptosis and myocyte enlargement with decreased cardiac mass, distinctive features of the aging male, but not female, monkey heart. *Jornal of molecular and cellular cardiology* 43, 487–491.

Zhang, W., Yano, N., Deng, M., Mao, Q., Shaw, S.K., Tseng, Y.T., 2011. Beta-adrenergic receptor-PI3 K signaling crosstalk in mouse heart elucidation of immediate downstream signaling cascades. *PLoS One* 6, e26581.

Zheng, G., Dwoskin, L.P., Crooks, P.A., 2006. Vesicular monoamine transporter 2: role as a novel target for drug development. *The Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists (The AAPS journal)* 8, E682-692.

Zhu, W.Z., Zheng, M., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K., Xiao, R.P., 2001. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1607-1612.

Zucker, M., Weizman, A., Rehavi, M., 2005. Repeated stress leads to down-regulation of vesicular monoamine transporter 2 in rat brain nucleus accumbens and striatum. *European neuropsychopharmacology* 15, 199–201.

9 ПРИЛОЗИ

ИЗВОД

Хипокампус је мождана структура веома осетљива на стрес. Мелатонин има улогу у одржавању циркадијалног ритма, а потврђена су његова антиоксидативна својства. Хронични благи непредвидиви стрес (CUMS) је анимални модел који имитира улогу хроничног стреса у настанку депресије код људи. Овај модел је прихваћен као парадигма која реплицира многе поремећаје понашања који прате депресију.

Мужјаци пацова Wistar соја су излагани CUMS у трајању од 4 недеље. Током тог периода животиње су третиране мелатонином у дози од 10 mg/kg телесне масе, i.p. Параметри понашања су праћени тестом отвореног поља, издигнутим плус лавиринтом и тестом принудног пливања.

CUMS је довео до продужене имобилности у тесту принудног пливања. Третман пацова мелатонином смањивао је имобилност у поређењу са контролном групом, испољавајући антидепресивни ефекат. Мелатонин нормализује количину норадреналина деловањем на деградационе ензиме и VMAT2 транспортер у хипокампусу. Ова студија је показала да мелатонин показује антидепресивне ефекте у анималном моделу депресије. У тесту отвореног поља, животиње третиране мелатонином проводе више времена у центру арене, указујући на његов анксиолитички ефекат. Наши резултати су показали смањену експресију гена за α_1 -, α_2 - и β_2 -адренорецептор у хипокампусу стресираних пацова, док није било промене у експресији гена за β_1 -адренорецептор. Третман мелатонином код CUMS пацова спречио је смањење нивоа иРНК и протеина за α_1 - и β_2 -адренорецептор изазвано стресом, док није утицао на ниво иРНК и ниво протеина за β_1 - и α_2 -адренорецептор. Смањење биосинтезе катехоламина и побољшање њиховог поновног преузимања у надбубрежним жлездама пацова излаганих CUMS повезан је са корисним ефектима хроничног третмана мелатонином. Уочени корисни ефекти мелатонина у срцу путем појачаног преузимања и смањене деградације су највероватније компензациони механизми који штите кардиомиоците од штетних ефеката прекомерне стимулације норадреналина.

Добијени резултати доприносе бољем разумевању молекуларних механизма деловања мелатонина праћењем промена у експресији гена одговорних за процес синтезе, преузимања и складиштења катехоламина у мозгу, кардиоваскуларном систему и сржи надбубрежних жлезда као местима примарне синтезе катехоламина.

SUMMARY

The hippocampus is a brain structure highly sensitive to stress. Melatonin plays a role in maintaining the circadian rhythm, and its antioxidant properties have been confirmed. Chronic mild unpredictable stress (CUMS) is an animal model that mimics the role of chronic stress in the development of depression in humans. Male Wistar rats were exposed to CUMS for 4 weeks. During that period, the animals were treated with melatonin at a dose of 10 mg/kg body weight, i.p. Behavioral parameters were monitored in the open field test, elevated plus maze and the forced swim test. This study showed that melatonin exhibits antidepressant effects in an animal model of depression. In the open field test, animals treated with melatonin spent more time in the center of the arena, indicating its anxiolytic effect. Our results showed decreased gene expression for α_1 -, α_2 - and β_2 -adrenoreceptor in the hippocampus of stressed rats, while there was no change in gene expression for β_1 -adrenoreceptor. Melatonin treatment in CUMS rats prevented stress-induced decreases in α_1 - and β_2 -adrenoreceptor mRNA and protein levels, while not affecting β_1 - and α_2 -adrenoreceptor mRNA and protein levels. Reduction of catecholamine biosynthesis and enhancement of their reuptake in the adrenal medulla of rats exposed to CUMS is associated with the beneficial effects of chronic melatonin treatment. The observed beneficial effects of melatonin in the heart via enhanced uptake and reduced degradation are most likely compensatory mechanisms that protect cardiomyocytes from the deleterious effects of excessive noradrenaline stimulation. The obtained results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of action of melatonin by monitoring changes in the expression of genes responsible for the process of synthesis, uptake and storage of catecholamines in the brain, cardiovascular system and medulla of the adrenal glands as sites of primary synthesis of catecholamines.

Биографија

Бојана Стефановић је рођена 2. 10. 1985. године у Лазаревцу, где је завршила основну школу. Средњу медицинску школу „Др Миша Пантић“ завршила је у Ваљевоу 2004. године. Студије биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу, уписала је школске 2004/2005 године. Дипломирала је 2011. године, одбраном дипломског рада под насловом: „Морфо-функционалне ћелије јетре и жучне кесе“ са оценом 10 и стекла звање дипломирани биолог. Просечна оцена током студија била је 9,46. Школске 2020/2021 уписала је докторске студије биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Нишу.

Од 2011. године почиње са радом као стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у групи др Слађане Дроњак Чучаковић у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију, Института за нуклеарне науке „Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, у оквиру два научна пројекта под називом „Молекуларни механизми патофизиолошких промена у ћелијама централног нервног система и периферног ткива сисара“ (173044) и „Ефекат метаболичких и неметаболичких стресора на експресију и деловање неуроендокриних регулатора енергетске хомеостазе” (173023). На истим пројектима почиње да ради као истраживач приправник од 2013. године. На седници Научног већа Института за нуклеарне науке „Винча” – Институт од националног значаја за Републику Србију одржаној 2. 4. 2015. године, донета је одлука о стицању звања истраживач сарадник, а у исто звање реизабрана је на седници одржаној 21. 6. 2018. године. Тренутно је ангажована у оквиру Програма 2 „Животна средина и здравље”, на теми „Регулација катехоламинског система у централним и периферним ткивима током стреса 0902301”. На седници Научног већа Института за нуклеарне науке „Винча” - Института од националног значаја за Републику Србију одржаној 23. 9. 2021. године стиче стручно звање стручни саветник.

До сада је аутор и коаутор 18 радова публикованих у међународним часописима и једног рада у националном часопису као и аутор и коаутор 11 саопштења у зборницима са научних скупова.

Библиографија

Радови у часописима међународног значаја, категорије M21

1. **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Jovanovic P., Jasnic N., Djordjevic J., Dronjak S. Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: Regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels. *European Neuropsychopharmacology*, Vol. 26(10), 1629-1637, 2016, doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.07.005.
2. Ferizovic H., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Jankovic M., Dronjak S. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 modulates splenic catecholamines in chronically stressed female and male rats. *International Immunopharmacology*, Vol. 85, 106615, 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106615.
3. Jankovic M., Spasojevic N., Ferizovic H., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Inhibition of the fatty acid amide hydrolase changes behaviors and brain catecholamines in a sex-specific manner in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiology and Behavior*, Vol. 227, 113174, 2020, doi: 10.1016/j.physbeh.2020.113174.

Радови у часописима међународног значаја, категорије M22

1. Jovanovic P., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Bozovic N., Jasnic N., Djordjevic J., Dronjak S. Peripheral oxytocin treatment affects the rat adreno-medullary catecholamine content modulating expression of vesicular monoamine transporter 2. *Peptides*, Vol. 51, 110-114, 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2013.11.001.
2. Jovanovic P., Spasojevic N., Puskas N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Oxytocin modulates the expression of norepinephrine transporter, β_3 adrenoceptors and muscarinic M₂ receptors in the heart of socially isolated rats. *Peptides*, Vol. 111, 132-141, 2019, doi: 10.1016/j.peptides.2018.06.008.
3. **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Jovanovic P., Dronjak S. Melatonin treatment affects changes in adrenal gene expression of catecholamine biosynthesizing enzymes and norepinephrine transporter in the rat model of chronic-stress-induced depression. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 97(7), 685-690, 2019, doi: 10.1139/cjpp-2018-0612.
4. Ferizovic H., Spasojevic N., Jankovic M., **Stefanovic B.**, Slađana Dronjak. Effects of fatty acid amide hydroxylase inhibitor URB597 on the catecholaminergic activity of the adrenal medulla in stressed male and female rats. *Pharmacology*, Vol. 107(1-2), 81-89, 2022, doi: 10.1159/000519332.

Радови у часописима међународног значаја, категорије M23

1. Jovanovic P., Puskas N., **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Dronjak S. Immunohistochemical detection and gene expression of tyrosine hydroxylase and vesicular monoamine transporter type 2 in intrinsic cardiac ganglia of socially isolated rats. *Archives of Biological Sciences*, Vol. 66(4), 1645-1651, 2014, doi.org/10.2298/ABS1404645J.
2. Spasojevic N., Jovanovic P., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Influence of individual housing in the adult rats on catecholamine synthesis and storage in the right and left medial prefrontal cortex. *Neurochemical Journal*, Vol. 8(4), 277-281, 2014, doi: 10.1134/S1819712414040084.
3. Jovanovic P., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Differential expression of tyrosine hydroxylase and transporters in the right and left stellate ganglion of socially isolated rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, Vol. 181, 85-89, 2014, doi: 10.1016/j.autneu.2014.01.002.

4. Spasojevic N., Jovanovic P., Stanisavljevic D., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Hypothalamic noradrenaline synthesis, uptake and storage in rats during adaptation to long-term individual housing. *Neurochemical Journal*, Vol. 7(2), 139-143, 2013, doi: 10.7868/S1027813313020052.
5. Jovanovic P., **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Puskas N., Dronjak S. Effects of oxytocin on adrenomedullary catecholamine synthesis, uptake and storage in rats exposed to chronic isolation stress. *Endocrine Research*, Vol. 41(2), 124-31, 2016, doi: 10.3109/07435800.2015.1094086 .
6. Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Jovanovic P., Dronjak S. Anxiety and hyperlocomotion induced by chronic unpredictable mild stress can be moderated with melatonin treatment. *Folia Biologica (Praha)*, Vol. 62, 250-257, 2016.
7. Dronjak S., **Stefanovic B.**, Jovanovic P., Spasojevic N., Jankovic M., Jeremic I., Hoffmann M. Altered cardiac gene expression of noradrenaline enzymes, transporter and β -adrenoceptors in rat model of rheumatoid arthritis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, Vol. 208, 165-169, 2017, doi: 10.1016/j.autneu.2017.10.003.
8. **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Jovanovic P., Ferizovic H., Dronjak S. Melatonin modulate the expression of α_1 and β_1 adrenoceptors in the hippocampus of rats subjected to unpredictable chronic mild stress. *Bratislavske lekarske listy*, Vol. 119(7), 429-423, 2018, doi: 10.4149/BLL_2018_078.
9. Ferizovic H., Spasojevic N., Puskas N., **Stefanovic B.**, Jankovic M., Djelic N., Dronjak S. URB597 attenuates stress-induced ventricular structural remodeling by modulating cytokines, NF-kB and JAK2/STAT3 pathways in female and male rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 1–13, 2023, doi.org/10.1139/cjpp-2022-0535.

Радови у часописима међународног значаја, категорије M24

1. **Stefanovic B.**, Virijević K., Spasojević N., Ferizović H., Janković M., Vasiljević P., Dronjak S. Dysregulation of NF-kB and JAK2/STAT3 signaling in the hippocampus of female wky strain, a genetic animal model of depression. *Kragujevac journal of science*, Vol. 45, 149-158, 2023, doi: 10.5937/KgJSci2345149S.

Радови у часописима међународног значаја, категорије M52

1. **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Jovanovic P., Ferizovic H., Jankovic M., Vasiljevic P., Dronjak S. Melatonin affects gene expression of noradrenaline transporter and enzymes in the hearts of stressed rats. *Biologica nyssana*, Vol. 12(2), 167-176, 2021. doi: 10.5281/zenodo.5759829.

Рад у часопису националног значаја, категорије M53

1. Jovanovic P., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Oxytocin decreases gene expression of tyrosine hydroxylase in the right stellate ganglia of stressed rats. *Journal of Clinical and Laboratory Investigation Updates*, Vol. 1, 10-13, 2013, doi: 10.14205/2310-9556.2013.01.01.3.

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја, категорије M34

1. **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Jovanovic P., Dronjak S. Melatonin modulates catecholamine biosynthesis and re-uptake in adrenal medulla of rats exposed to chronic unpredictable mild stress, COMBOS-First Congress of Molecular Biologists of Serbia with international participation, pp. 77-77, Belgrade, Republic of Serbia, 20-22. Sep, 2017.
2. **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Jovanovic P., Ferizovic H., Jankovic M., Dronjak S. Effect of chronic melatonin treatment on catecholamines and adrenoceptors in the heart of rats exposed to chronic unpredictable mild stress. 14th Serbian Congress of Farmacologists and 4th

- Serbian Congress of Clinical Pharmacology with international participation, pp. 207-208, Novi Sad, Republic of Serbia, 18-21. Sep, 2019.
3. Ferizovic H., Jankovic M., **Stefanovic B.**, Spasojevic N., Dronjak S. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 affects catecholamine synthesis in the heart of chronically stressed rats. 4th Congress of Physiological Sciences of Serbia with international participation, pp. 82 -82, Nis, Republic of Serbia, 19-23. Sep, 2018.
 4. Jankovic M., Ferizovic H., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Anxiolytic properties of endocannabinoids on gender-related differences observed in rat behavior after chronic stress. Book of abstracts BYNS2018, pp. 27.-27., Barselona, 13-14. Sep, 2018.
 5. Jankovic M., Ferizovic H., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. The sex differences in the effects of endocannabinoids on anxiety-like behaviour in chronically stressed rats. 4th Congress of Physiological Sciences of Serbia with international participation, pp. 123 -123, Nis, Republic of Serbia, 19-23. Sep, 2018.
 6. Jankovic M., Ferizovic H., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Differential effects of URB597, a selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase, on noradrenaline turnover in prefrontal cortex and hippocampus of chronically stressed rats. FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, July 10-13, 2019.
 7. Ferizovic H., Jankovic M., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. URB597 treatment has sex-specific effects on IL-10 levels in spleen and spleen hypertrophy of rats subjected to the chronic unpredictable stress, 14th Serbian Congress of Farmacologistis and 4th Congress of Clinical Pharmacology with international participation, pp. 206-207, Novi Sad, Republic of Serbia, 18-21. Sep, 2019.
 8. Jankovic M., Ferizović H., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Effects of melatonin treatment on catecholamine synthesis, degradation and α_1 - and β_2 -adrenergic receptors in prefrontal cortex of rats exposed to the chronic mild unpredictable stress, 14th Serbian Congress of Farmacologistis and 4th Congress of Clinical Pharmacology, pp. 206-207, Novi Sad, Republic of Serbia, 18-21. Sep, 2019.
 9. Ferizovic H., Jankovic M., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Dronjak S. Sex-specific effects of treatment with URB597, a selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase, on IL-10 and spleen hypertrophy of rats subjected to the chronic unpredictable stress, Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches, pp. 41, Belgrade, Republic of Serbia, 6-8. Dec, 2019.
 10. **Stefanović B.**, Spasojević N., Ferizović H., Janković M., Vasiljević P., Dronjak S. Disregulacija JAK2/STAT3 signalnog puta u hipokampusu pacova sa genetski predisponiranim depresivnim ponašanjem, Treći kongres biologa Srbije, pp. 359, Zlatibor, Republika Srbija, 21-25. Septembar, 2022.
 11. Spasojević N., **Stefanović B.**, Ferizović H., Janković M., Dronjak S. Uticaj hroničnog blagog stresa na ponašanje Wistar-Kyoto soja pacova kao animalnog modela rezistentne depresije, Treći kongres biologa Srbije, pp. 380, Zlatibor, Republika Srbija, 21-25. Septembar, 2022.
 12. Virijevic K., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Ferizovic H., Jankovic M., Dronjak S. Chronic mild stress induces sustained-activation of p38 MAPK signaling in the female WKY rats with endogenous depression, 8th Congress of Serbian neuroscience society with international participation: the book of abstracts, pp. 84, Belgrade, Republic of Serbia, 31 May - 2 June, 2023.
 13. Jankovic M., Ferizovic H., Spasojevic N., **Stefanovic B.**, Virijevic K., Dronjak S. Fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 shows antidepressant effects through reduction of neuroinflammation and restoration of BDNF levels in mPFC of chronically stressed rats, 8th Congress of Serbian neuroscience society with international participation: the book of abstracts, pp. 118, Belgrade, Republic of Serbia, 31 May – 2 June, 2023.

Изјаве аутора

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
„Дејство мелатонина на регулацију норадреналинске неуротрансмисије у мозгу,
срцу и надбубрежним жлездама у анималном моделу депресије“

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Стефановић В. Ђојана
(Име, средње слово и презиме)

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**„Дејство мелатонина на регулацију норадреналинске неуротрансмисије у мозгу,
срцу и надбубрежним жлездама у анималном моделу депресије“**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам
предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан
штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Стефановић В. Бојане
(Име, средње слово и презиме)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

„Дејство мелатонина на регулацију норадреналинске неуротрансмисије у мозгу, срцу и надбубрежним жлездама у анималном моделу депресије“

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Стефановић В. Божана
(Име, средње слово и презиме)