

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**BIOLOŠKI FAKULTET**

Harisa N. Ferizović

**UTICAJ ENDOKANABINOIDA NA SINTEZU I  
TRANSPORT KATEHOLAMINA U SRCU,  
SLEZINI I NADBUBREŽNIM ŽLEZDAMA  
HRONIČNO STRESIRANIH PACOVA OBA  
POLA**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF BIOLOGY**

Harisa N. Ferizović

**INFLUENCE OF ENDOCANABINOIDS ON THE  
SYNTHESIS AND TRANSPORT OF  
CATECHOLAMINES IN THE HEART, SPLEEN  
AND ADRENAL GLANDS IN CHRONICLY  
STRESSED RATS OF BOTH SEX**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

## KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

### MENTORI

**dr Slađana Dronjak Čučaković**, naučni savetnik,  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju  
Univerzitet u Beogradu

**Dr Jelena Đorđević**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

### ČLANOVI KOMISIJE

**Dr Nebojša Jasnić**, vandredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**dr Tanja Jevđović**, docent,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**dr Nataša Spasojević Popović**, viši naučni saradnik,  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju  
Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA



Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta OI 173044: „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama CNS-a i perifernog tkiva kod sisara” i u okviru programa 2 “Životna sredina i zdravlje” na temu “Regulacija kateholaminskog sistema u centralnim i perifernim tkivima tokom stresa 0902301” finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke “Vinča”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

U svega nekoliko reči ne mogu iskazati svoju zahvalnost svim dragim ljudima koji su mi pomogli prilikom izrade disertacije. Osećam svoju dužnost i zadovoljstvo da se zahvalim svima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije:

Na prvom mestu, želela bih da iskažem najveću zahvalnost dr Slađani Dronjak Čučaković, naučnom savetniku Instituta „Vinča“, mentorki, za njen neumorni trud, strpljenje, neizmernoj i nesebičnoj pomoći pri svakom koraku u toku naučnog i akademskog rada i pri pisanju disertacije. Hvala na ukazanom poverenju, usmeravanju i podršci. Divno iskustvo, još jednom, Hvala!

prof. dr Jeleni Đorđević, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentorki, na kritičkoj oceni ove teze, sugestijama i savetima.

dr Nataši Spasojević Popović, na svesrdnoj pomoći tokom svih ovih godina u timu laboratorije, na prenetom znanju i iskustvu, velikoj pomoći, savetima u eksperimentalnom radu i ukazanom poverenju, ali i na druženju.

Ovom prilikom želim posebno da se zahvalim dr Nebojši Jasniću, vandrednom profesoru Biološkog fakulteta, na nesebičnoj pomoći, izuzetno konstruktivnim savetima prilikom čitanja i izdvojenom vremenu.

dr Tanji Jevđović na dragocenoj pomoći, stručnim savetima i izdvojenom vremenu.

dr Neli Puškaš na saradnji prilikom izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i dragim kolegama Kristini Virijević, Bojani Stefanović i dr Predragu Jovanoviću zahvaljujem na velikoj pomoći, od fizičke do prijateljske i svake vrste koja mi je bila potrebna. Dragim prijateljima Mineli Prepoljac, Sabini Avdović, dr Mariji Aleksić, Milici Janković veliko hvala na razumevanju, bezrezervnoj podršci, bodrenju i pomoći.

Posebno hvala mojoj ekipi sa kursa engleskog jezika Jeleni, Saneli, Maji, Mariji i Milici na prenesenoj ogromnoj količini pozitivne energije i prijateljstvu.

Posebno hvala mom suprugu Nurudinu Memiću, roditeljima, nani i sestri na ogromnoj i nesebičnoj podršci, razumevanju, strpljenju, ljubavi i iskrenom radovanju svakom mom uspehu postignutom tokom školovanja i u životu.

Na kraju ovu disertaciju posvećujem mojoj mami!

*Harisa Ferzović*

## **Uticaj endokanabinoida na sintezu i transport kateholamina u srcu, slezini i nadbubrežnim žlezdama hronično stresiranih pacova oba pola**

### **SAŽETAK**

Hronični nepredvidivi i nekontrolisani stresori predstavljaju veliki rizik za razvoj depresije i kardiovaskularnih oboljenja. Fiziološki odgovor na stres uključuje aktivaciju simpatoadrenomedularnog sistema i oslobađanje kateholamina (KA). U ovoj studiji korišćen je hronični nepredvidivi stres (CUS) koji izaziva simptome nalik onima uočenim kod pacijenata sa depresijom, praćene povećanom frekvencijom srčanih kontrakcija i smanjenom varijabilnošću srčanog ritma. Endokanabinoidi se oslobađaju tokom stresa i ostvaruju svoje protektivno dejstvo vezujući se za kanabinoidne receptore. URB597 je veoma moćan i selektivan inhibitor enzima hidrolaze masnokiselinskih amida (FAAH), koji razgrađuje endokanabinoide i na taj način povećava količinu endokanabinoida. U ovoj disertaciji je posredstvom korišćenja URB597 ispitivano dejstvo endokanabinoida na ponašanje; proinflamatorne (IL-6) i antiinflamatorne citokine (IL-10); regulaciju sinteze (TH, DBH i PNMT), preuzimanja (NET i DAT), degradacije (MAO-A i COMT) i količinu kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda, slezini i srcu kao i na histološke promene i JAK/STAT signalni put u levoj komori srca hronično stresiranih životinja oba pola. Mužjaci i ženke Wistar soja pacova, starosti dva meseca, svakodnevno su izlagani CUS tokom 42 dana. Inhibitor FAAH – URB597, u koncentraciji od 0,3 mg/kg ili rastvarač iste zapremine, aplikovan je intraperitonealno (i.p.) dva puta dnevno, u toku poslednje dve nedelje protokola stresa. Prikazani rezultati pokazuju da endokanabinoidi ispoljavaju antidepresivni, anksiolitički i antiinflamatorni efekat u animalnom modelu depresije. Rezultati ove doktorske disertacije pružaju dodatne dokaze o terapeutskom potencijalu inhibitora FAAH u lečenju kardiovaskularnih i neuroimunoloških poremećaja. Dobijeni rezultati predstavljaju značajan doprinos razumevanju modulatornog dejstva endokanabinoida na regulaciju kateholaminskog sistema u ispitivanim organima kod pacova oba pola i pokazuju da je njegovo dejstvo polno zavisno.

***Ključne reči:*** hronični nepredvidivi stres, FAAH inhibitor URB597, kateholamini, simpatoadrenomedularni sistem, citokini, signalni put JAK-2/STAT3, ponašanje

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Animalna i humana fiziologija

## **Influence of endocannabinoids on the synthesis and transport of catecholamines in the heart, spleen and adrenal glands in chronically stressed rats of both sex**

### **ABSTRACT**

Chronic unpredictable stressors can significantly increase a risk of developing depression and cardiovascular diseases. Physiological response to stress includes activation of sympatho-adrenomedullary system and increased catecholamine secretion. In this PhD thesis we used chronic unpredictable stress which is known to elicits symptoms similar to those patients with depression. These include increased heart rate and decreased heart rate variability. Endocannabinoids are released during stress and exert their protective effect by binding to cannabinoid receptors. URB597 is a strong and selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase (FAAH), which increases endocannabinoid levels. URB597 is a highly potent and selective inhibitor of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme, which breaks down endocannabinoids and increases endocannabinoid levels. In this PhD thesis we examined influence of endocannabinoids on behavior; pro-inflammatory (IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-10); regulation of synthesis (TH, DBH and PNMT), uptake (NET and DAT), degradation (MAO-A and COMT) and the levels of catecholamines in adrenal medulla, spleen and heart as well as on histological changes and the JAK/STAT signaling pathway in in the left ventricle of the heart of chronically stressed animals of both sexes. Two-month old male and female Wistar rats were chronically exposed to the unpredictable stressors during 42 days. During the last two weeks of stress protocol, FAAH inhibitor URB597 in the dose of 0.3 mg/kg or the saline solution of the same volume was given intraperitoneally to the animals two times per day. Our results show that endocannabinoids have antidepressant, anxiolytic and anti-inflammatory effects in animal model of depression. Results of this PhD thesis offer additional evidence of therapeutic potential of FAAH inhibitors in treating cardiovascular and neuroimmunological disorders. These results also significantly help in understanding modulatory effects of endocannabinoids in regulation of catecholamine system in examined organs in both sexes and they show that its effects are sex-dependant.

**Key words:** chronic unpredictable stress, FAAH inhibitor, URB597, catecholamines, sympathoadrenal system, cytokines, JAK-2/STAT3 pathway, behavior

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Animal and human physiology

# SADRŽAJ

<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Koncept stresa</b>	<b>1</b>
1.1.1. <i>Fiziologija odgovora na stresor</i>	2
1.1.2. <i>Kateholamini</i>	3
1.1.2.1. <i>Biosinteza kateholamina</i>	4
1.1.2.2. <i>Oslobađanje kateholamina</i>	5
1.1.2.3. <i>Mehanizam delovanja kateholamina</i>	6
1.1.2.4. <i>Inaktivacija i razgradnja kateholamina</i>	8
<b>1.2. Uticaj stresa na razvoj depresije</b>	<b>9</b>
1.2.1. <i>Hronični nepredvidivi stres kao model razvoja depresije</i>	10
<b>1.3. Uticaj stresa na imunski sistem</b>	<b>10</b>
1.3.1. <i>Slezina</i>	12
1.3.2. <i>Citokini i JAK-2/STAT3 signalni put</i>	13
<b>1.4. Kardiovaskularni sistem tokom stresa</b>	<b>15</b>
<b>1.5. Endokanabinoidi</b>	<b>16</b>
1.5.1. <i>Sinteza endokanabinoida</i>	17
1.5.2. <i>Mehanizam delovanja endokanabinoida - kanabinoidni receptori</i>	18
1.5.3. <i>Razgradnja endokanabinoida</i>	19
1.5.4. <i>URB597 - selektivni inhibitor FAAH</i>	19
1.5.5. <i>Endokanabinoidni sistem i stres</i>	20
1.5.6. <i>Polne razlike u funkcionisanju endokanabinoidnog sistema</i>	21
<b>2 CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>22</b>
<b>3 MATERIJAL I METODE</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Eksperimentalne životinje</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Eksperimentalni protokol i protokol tretmana</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Hronični nepredvidivi stres</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Tretman URB597</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Testovi ponašanja</b>	<b>25</b>
3.5.1. <i>Test zainteresovanosti za zaslađeni rastvor</i>	25
3.5.2. <i>Test otvorenog polja</i>	25

<b>3.6. Histološka analiza srca</b>	<b>26</b>
<b>3.7. Metoda određivanja koncentracije kateholamina u plazmi i tkivu</b>	<b>27</b>
<b>3.8. Metoda određivanja koncentracije proinflamatornog IL-6 i antiinflamatornog IL-10 citokina u plazmi, slezini i srcu</b>	<b>27</b>
<b>3.9. Western blot</b>	<b>27</b>
3.9.1. Izolacija ukupnih proteina	27
3.9.2. Određivanje koncentracije proteina	28
3.9.3. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	28
3.9.4. Transfer proteina sa gela na membranu	29
3.9.5. Imunodetekcija proteina	29
<b>3.10. Statistička obrada rezultata</b>	<b>30</b>
<b>4 REZULTATI</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Uticaj stresa i endokanabinoida na ponašanje pacova</b>	<b>31</b>
4.1.1. Test zainteresovanosti za zaslađen rastvor	31
4.1.2. Test otvorenog polja	32
<b>4.2. Dejstvo URB597 na relativne mase nadbubrežnih žlezda, slezine i srca pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Dejstvo URB597 na koncentraciju kateholamina u plazmi pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>36</b>
<b>4.4. Dejstvo URB597 na koncentraciju kateholamina, njihov metabolizam i transportere u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>37</b>
4.4.1. Koncentracija kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda	37
4.4.2. Ekspresija enzima biosinteze kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda	38
4.4.3. Ekspresija transportera za noradrenalin i dopamin u srži nadbubrežnih žlezda	39
4.4.4. Ekspresija enzima koji učestvuju u razgradnji kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda	40
<b>4.5. Dejstvo URB597 na koncentraciju kateholamina, njihov metabolizam i transportere u slezini pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>40</b>
4.5.1. Koncentracija kateholamina u slezini	40
4.5.2. Ekspresija enzima biosinteze kateholamina u slezini	41
4.5.3. Ekspresija transportera za noradrenalin i dopamin u slezini	43
4.5.4. Ekspresija enzima koji učestvuju u razgradnji kateholamina u slezini	44
<b>4.6. Dejstvo URB597 na koncentraciju kateholamina, ekspresiju enzima njihove sinteze, razgradnje i transportera u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>44</b>
4.6.1. Koncentracija kateholamina u levoj komori srca	44
4.6.2. Ekspresija enzima koji učestvuju u biosintezi kateholamina u levoj komori srca	45
4.6.3. Ekspresija transportera za noradrenalin u levoj komori srca	47
4.6.4. Ekspresija enzima koji učestvuju u razgradnji kateholamina u levoj komori srca	47



<b>4.7. Dejstvo URB597 na koncentraciju proinflamatornog IL-6 i antiinflamatornog IL-10 citokina u plazmi, slezini i levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>48</b>
<i>4.7.1. Koncentracija proinflamatornog IL-6 citokina u plazmi, slezini i levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS</i>	48
<i>4.7.2. Koncentracija antiinflamatornog IL-10 citokina u plazmi, slezini i levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS</i>	49
<b>4.8. Dejstvo URB597 na aktivnost JAK-2/STAT3 signalnog puta u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>50</b>
<i>4.8.1. Aktivnost JAK2 u levoj komori pacova</i>	50
<i>4.8.2. Aktivnost STAT3 transkripcionog faktora u levoj komori srca pacova</i>	51
<b>5 DISKUSIJA</b>	<b>53</b>
<b>5.1. Dejstvo URB597 na parametre procene ispoljavanja ponašanja nalik depresivnom i anksioznom kod pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>53</b>
<b>5.2. Dejstvo URB597 na koncentraciju, metabolizam i transportere kateholamina u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>55</b>
<b>5.3. Dejstvo URB597 na koncentraciju, metabolizam i transportere kateholamina u slezini pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>57</b>
<b>5.4. Dejstvo URB597 na koncentraciju, metabolizam i transportere kateholamina u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>59</b>
<b>5.5. Dejstvo URB597 na koncentraciju proinflamatornih i antiinflamatornih citokina u plazmi i slezini pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>60</b>
<b>5.6. Dejstvo URB597 na koncentraciju proinflamatornih i antiinflamatornih citokina i JAK-2/STAT3 signalni put u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS</b>	<b>62</b>
<b>6 ZAKLJUČCI</b>	<b>64</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>66</b>

## SKRAĆENICE KORIŠĆENE U TEKSTU

<b>A</b>	adrenalin
<b>2-AG</b>	2-arahidonil glicerol
<b>AD</b>	aldehid dehidrogenaza
<b>AR</b>	aldehid reduktaza
<b>AEA</b>	N-arahidoniletanolamid; anandamid
<b>ACTH</b>	adrenokortikotropni hormon
<b>AAAD</b>	enzimi dekarboksilaze L- aromatičnih aminokiselina
<b>Ach</b>	acetilholin
<b>ANS</b>	autonomni nervni sistem
<b>BSA</b>	goveđi serum albumin
<b>BDNF</b>	neurotrofni moždani faktor
<b>COMT</b>	katehol O-metiltransferaza
<b>BLA</b>	bazolateralne bademasta jedra
<b>ATP</b>	adenozin tri fosfat
<b>CB</b>	kanabinoidni receptori
<b>CBD</b>	kanabidiol
<b>CBG</b>	kanabigerol
<b>CNS</b>	centralni nervni sistem
<b>CNTF</b>	Cilijarni neurotrofni faktor
<b>CRH</b>	kortikotropni oslobađajući hormon
<b>CREB</b>	cAMP responsivni element
<b>cAMP</b>	ciklični adenzin monofosfat
<b>CUS</b>	hronični nepredvidivi stres
<b>CUMS</b>	hronični blagi nepredidivi stres
<b>CRP</b>	C-reaktivni protein
<b>DA</b>	dopamin
<b>DBH</b>	dopamin- $\beta$ -hidroksilaza
<b>DGL</b>	diacilglicerol lipaza
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DAT</b>	dopaminski transporter
<b>DMSO</b>	dimetil sulfoksid

<b>DHMA</b>	3,4 dihidroksimandelična kiselina
<b>DHPG</b>	3,4 dihidroksifenilglikol
<b>DOPAC</b>	3,4 dihidroksifenilsirćetna kiselina
<b>EMT</b>	ekstraneuronski monoaminski transporter
<b>ECs</b>	endokanabinoidni sistem
<b>EGTA</b>	etilen glikol tetrasirćetna kiselina
<b>FAK</b>	fokalna adhezivna kinaza
<b>FAAH</b>	hidrolaza masno kiselinskih amida
<b>GED1</b>	glicerolfosfodiesteraza
<b>GPCR</b>	receptor spregnut sa proteinom G
<b>GIRK</b>	kalijumski kanali spregnuti sa proteinom G
<b>GAS</b>	generalni adaptacioni sindrom
<b>HPA</b>	hipotalamo-hipofizna adrenokortikalna osovina
<b>HVA</b>	homovanilična kiselina
<b>HR</b>	srčana frekvencija
<b>HRV</b>	varijabilnost u srčnoj frekvenciji
<b>ICA</b>	unutarsrčane kateholaminske ćelije
<b>IL</b>	interleukin
<b>IFN</b>	interferon
<b>IP3</b>	inozitol trifosfat
<b>L-DOPA</b>	dihidroksifenil-alanin
<b>LIF</b>	Inhibitorni faktor leukemije
<b>LPS</b>	lipopolisaharid
<b>MAO</b>	monoamino oksidaza A
<b>MAGL</b>	monoacilglicerol lipaza
<b>MAPK</b>	mitogenom aktivirane protein kinaze
<b>MHPG3</b>	metoksi -4-hidroksifenilglikol
<b>MDMA</b>	3,4-metilendioksi-metamfetamin, "ekstazi"
<b>NA</b>	noradrenalin
<b>NK</b>	ćelije prirodne ubice
<b>NF-Kb</b>	nukleusni faktor kapa B
<b>NArPE</b>	N-arahidonil fosfatidiletanolamin
<b>NAT</b>	N-aciltransferaza

<b>NET</b>	noradrenalinski transporter
<b>NAPE-PLD</b>	N-acilfosfatidiletanolamin fosfolipaza D
<b>PVN</b>	paraventrikularno jedro
<b>PE</b>	fosfatidiletanolamin
<b>PLC</b>	fosfolipaza C
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
<b>PKA</b>	protein kinaza A
<b>PI3K</b>	fosfatidilinozitol-3-kinaza
<b>PIAS</b>	protein inhibitori aktivacije STAT
<b>PPARs</b>	receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma
<b>PNMT</b>	feniletanolamin N-metiltransferaza
<b>PKC</b>	protein kinaza C
<b>PFC</b>	prefrontalna kora
<b>PMSF</b>	fenilmetil sulfonil
<b>PNS</b>	periferni nervni sistem
<b>PSNS</b>	parasimpatički nervni sistem
<b>PVDF</b>	polivinilidenfluorid
<b>ROS</b>	reaktivne vrste kiseonika
<b>VTA</b>	ventralne tegmentalne oblasti
<b>THC</b>	tetrahidrokanabinol
<b>Δ<sup>9</sup> THC</b>	delta 9-tetrahidrokanabinol
<b>TRPV1</b>	katjonski kanali prolaznih receptorskih potencijala vaniloidnog tipa 1
<b>TH</b>	tirozin hidroksilaza
<b>TCA</b>	triciklični antidepresivi
<b>TGF</b>	faktor transformacije rasta
<b>TNF-α</b>	faktor nekroze tumora α
<b>TYK2</b>	tirozin kinaza 2 Janus familije
<b>URB597</b>	cikloheksilkarbaminska kiselina 3'-karbamoilbifenil-3-il-estar
<b>VMA</b>	vanilmandelična kiselina
<b>SDS</b>	natrijum duodecil sulfat
<b>SDS-PAGE</b>	SDS – poliakrilamidna gel elektroforeza
<b>SNS</b>	simpatički nervni sistem
<b>SSRI</b>	inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina

<b>SOCS</b>	supresori citokinske signalizacije
<b>STAT3</b>	prenosioci signala i aktivatori transkripcije
<b>JAK-2</b>	janus kinaza
<b>WKY</b>	soj Wistar Kyoto pacova

# 1 UVOD

Stresna iskustva deo su svakodnevnog života a stresni odgovor je mehanizam preživljavanja koji nam omogućava da odgovorimo na pretnje. Neka stresna iskustva možemo da okarakterišemo kao pozitivna, poput npr. držanja važnog govora ispred mnoštva ljudi. Ipak, to iskustvo, osim što je stresno, istovremeno je izazovno i zadovoljavajuće.

Međutim, kada se sa stresorom ne možemo boriti ili kada ga ne možemo izbeći (npr. gubitak posla kao osnove za materijalnu egzistenciju ili medicinska kriza voljene osobe), ili kada iskustvo stresa postane hronično, sopstveni biološki odgovori mogu narušiti naše fizičko i mentalno zdravlje.

## 1.1. Koncept stresa

“Svi otprilike znaju šta je stres, ali zapravo niko ne zna” (Selye, 1976)

Koncept stresa je veoma širok i doseže u daleku prošlost, mnogo pre nego što je postao predmet istraživanja. Rečenica “*u ogromnom sam stresu*”, koju veoma često čujemo čak i od male dece, ukazuje nam da su stresne situacije stalne i neizbežne pojave sa kojima su svi suočeni. Funkcionalna relevantnost biološkog odgovora na stres potiče iz evolucionog konteksta, gde je hiljadama godina izloženost stresorima često bila potencijalno opasna po život. Savremeni način života je sa sobom doneo konflikt, rascep između olakšanog načina života i toga da su ljudi stekli istančano osećanje stalnog pritiska, suočeni sa sve većim zahtevima kako bi se zadovoljili svi društveni prohtevi. U poređenju sa muškarcima, žene su više podložne hroničnim oblicima stresa (McDonough i Walters, 2001). U odnosu na muškarce, žene su više pogođene svakodnevnim ponavljajućim stresom, povezanim sa poslom i nametnutim tradicionalno-patrijahalnim obavezama u porodici. Polne razlike se ispoljavaju na svim nivoima odgovora na stresore, od početne percepcije stresa do ponašajnih, kognitivnih i afektivnih odgovora i dugoročnih posledica po zdravlje. Različiti odgovori na hronične oblike stresora doprinose faktorima rizika za nastanak „modernih“ bolesti zavisno od pola i njegovog uticaja, ali postoje značajne nedoumice u pogledu interakcije ova tri faktora: pola, stresa i bolesti.

Definisanje stresa kao celovitog fenomena je veoma raznovrsno, zbog činjenice da objašnjenja stresa potiču iz različitih naučnih disciplina (Monroe, 2008). Valter Kanon je početkom 20. veka uveo termin homeostaza (Cannon, 1929; Goldstein i Kopin, 2007). Mehanizam održavanja ovakvog stanja Kanon je nazvao “*bori se ili beži*” odgovorom (*eng. fight or flight*), koji predstavlja način razrešavanja potencijalnih opasnosti i uglavnom je indukovano aktivacijom simpatičkog nervnog sistema (SNS). Međutim, Kanon nikada nije upotrebio izraz “stres”. Ovaj koncept istraživanja kasnije je nastavio Hans Selye, koji je zaslužan za razvoj originalnog koncepta stresa. Provobitni fiziološki odgovor na brojne stimulse iz unutrašnje ili spoljašnje sredine je opisao kao skup međusobno povezanih alarmnih reakcija na akutno ili produženo izlaganje stresorima a ceo taj proces je nazvao generalni adaptacioni sindrom (GAS) (Evans, 1950; Endler, 1997). Sindrom generalne adaptacije se sastoji iz tri sukcesivne faze. U prvoj, neposrednoj alarmnoj reakciji, kada organizam prepozna opasnost ili pretnju, razvija “*bori se ili beži*” odgovor. U ovoj fazi usled energetske veoma zahtevnog procesa, organizam mobilizuje energetske resurse da bi odgovorio na pretnju. Kontinuirana izloženost stresoru tokom dužeg vremena dovodi do druge faze GAS, faze otpora, kada je neophodno da se organizam prilagodi situaciji. U ovoj fazi homeostaza se uspostavlja kroz niz aktivacionih procesa. Međutim, ako izlaganje stresorima nastavi da se ponavlja, organizam će ući u treću fazu, fazu iscrpljenosti i suočiti se sa negativnim ishodima po zdravlje (Selye, 1950). Kasnija istraživanja fiziologije stresnog odgovora dokazuju da pokrenute promene imaju adaptivni karakter i neophodne su za preživljavanje.

Intezitet i trajanje odgovora na stresor zavise od mnogo faktora, uključujući vrstu i trajanje stresora, način na koji ga organizam percipira i individualnu sposobnost da se nosi sa njim (Goldstein and

Kopin, 2007). Stresori se dele u četiri velike grupe na: fizičke stresore, psihološke stresore, socijalne stresore i stresore koji predstavljaju pretnju kardiovaskularnoj i metaboličkoj homeostazi. Sa vremenskog aspekta trajanja, stresori se mogu podeliti na: akutne stresore, stresore koji su vremenski ograničeni, koji se relativno brzo završavaju; hronične stresore, koji deluju tokom dugog vremenskog perioda; i ponavljane stresore koji predstavljaju svakodnevno izlaganje kratkotrajnim stresorima (Kvetnansky i sar., 2009). Hronična izloženost stresoru je praćena brojnim bolestima vezanim za način života savremenog čoveka, u kojem stresni odgovor nije proporcionalan realnoj opasnosti, bilo sa aspekta inteziteta ili trajanja reakcije. Kroz mnogobrojna istraživanja stiže se uvid da se, ukoliko je telo u neprestanom stanju pripravnosti, posledice u najvećem broju slučajeva ogledaju u domenu mentalnog zdravlja (anksioznost i depresija), tegoba u kardiovaskularnom funkcionisanju, kao i slabljenju imunskog sistema (poremećeni urođeni i adaptivni imunski odgovor).

### **1.1.1. Fiziologija odgovora na stresor**

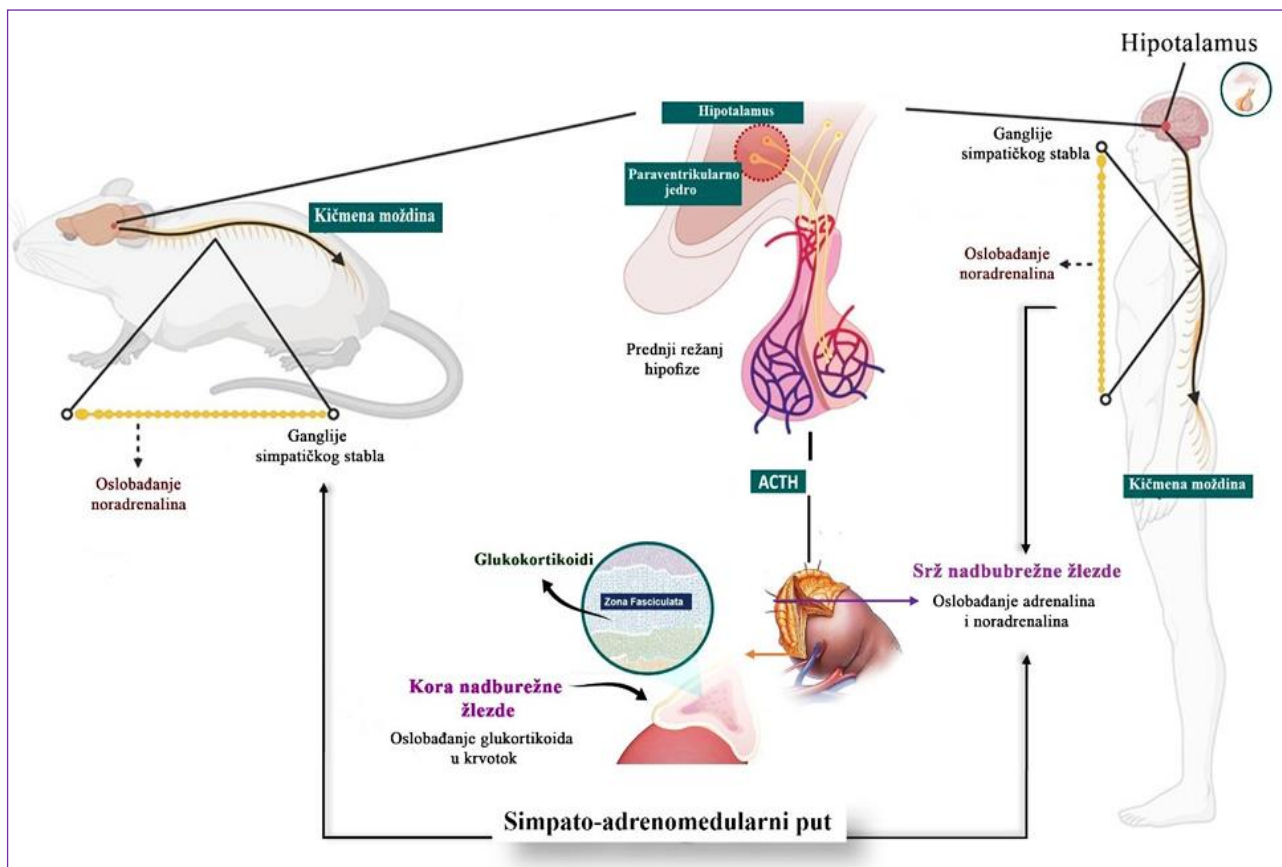
„od alostaze do odgovora „bori se ili beži“

Odgovor na različite vrste stresora započinje skoro istovremenom reakcijom centralnih i perifernih autonomnih odgovora i nešto sporijim endokrinim odgovorom, sa ciljem održavanja fizioloških funkcija organizma (Tsigos i sar., 2020). Fiziološki odgovori (povećanje krvnog pritiska, ubrzanje tempa ventilacije pluća, metaboličke promene koje obezbeđuju energiju) i promene u ponašanju (povećanje pažnje) posredovane su signalnim molekulima koji se oslobađaju iz nervnih i endokrinih ćelija. Za sprovođenje adekvatnog odgovora na stres zaduženi su centri lokalizovani u hipotalamusu i moždanom stablu, a obuhvataju neurone paraventrikularnog jedra (PVN) (*nc. paraventricularis*) i *locus coeruleus-a* (LC). Oni regulišu aktivnost efektorskih sistema poput simpatičko-adrenomedularnog sistema (SAM) i hipotalamo-hipofizne adrenokortikalne osovine (*engl. hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA*), što za posledicu ima pojačano oslobađanje kateholamina i kortikosteroida u cirkulaciju (Slika 1). Ova dva sistema se ne razlikuju samo po prirodi efektorskih hormona koji su uključeni u održavanje homeostaze već i po vremenskom sledu odgovora.

U odgovoru na psihološke stresore posreduje aktiviranje noradrenalinskih neurona *locus coeruleusa*, usled čega dolazi do oslobađanja noradrenalina (NA) u regionima mozga koji su uključeni u kognitivne i emocionalne procese. Povećano oslobađanje NA omogućava organizmu da se lakše prilagodi na delovanje stresora, omogućavajući brži ponašajni odgovor. Istovremena reakcija autonomnog nervnog sistema (ANS) na stresore praćena je aktiviranjem simpatičkog nervnog sistema. Aktivacijom SNS dolazi do lokalnog oslobađanja NA u ciljnim organima kao i oslobađanja adrenalina (A) i NA iz srži nadbubrežnih žlezda (Thiel i Dretsch, 2011) u cirkulaciju, što je neophodno za ponovno uspostavljanje homeostaze. Nakon što se oslobode u cirkulaciju, A i NA ispoljavaju svoje dejstvo vezujući se za odgovarajući tip kateholaminskih receptora  $\alpha$  ili  $\beta$ . Hromafine ćelije u srži nadbubrežnih žlezda inervisane su preganglijskim simpatičkim neuronima čija tela su locirana u intermediolateralnoj sivoj masi torakalnih i gornjih lumbalnih segmenata kičmene moždine. Interesantno, smatra se da hromafine ćelije predstavljaju modifikovane simpatičke postganglijske ćelije, dok kateholamine mogu da sintetišu i neke ne-neuronske ćelije. Kao rezultat ovih fizioloških promena povećava se količina glukoze u cirkulaciji, povećava se glikoliza u jetri i mišićima, intenziviraju se kognitivne aktivnosti, ubrzava se disanje, protok krvi se preusmerava prevashodno prema skeletnim mišićima indukujući na taj način odgovor „bori se ili beži“. U ovakvoj reakciji jedinka odlučuje da li će ostati i boriti se ili će pobeći. U oba slučaja, nezavisno od odluke, simpatička alarmna reakcija podstiče jedinku na snažnu aktivnost (Dhabhar, 2009).

Sporija aktivacija endokrinog sistema posledica je aktivacije HPA osovine. Aktivacija HPA osovine u odgovoru na stresore rezultira stalnim povećanjem cirkulišućih glukokortikoida, koji

doseže pik približno 20-30 minuta nakon pojave akutnog stresora. Glukokortikoidi imaju mnogobrojna permisivna i stimulativna svojstva koja pomažu da se olakša periferno delovanje kateholamina. Na primer, glukokortikoidi olakšavaju efekte kateholamina na vaskularnu reaktivnost, inhibiraju ponovno preuzimanje kateholamina na neuromišićnim spojevima i povećavaju afinitet  $\beta$ -kateholaminskih receptora na glatkim mišićnim ćelijama arterija. Međutim, glukokortikoidi su takođe uključeni u regulaciju intenziteta i trajanja aktivacije HPA osovine. Mehanizmom negativne povratne sprege inhibira se centralni autonomni odgovor, sprečavajući na taj način prekomernu aktivnost osovine koja bi ugrozila homeostazu. Usled hroničnog izlaganja stresorima, HPA osovina može postati deregulisana, najčešće inhibicijom negativne povratne sprege, što dovodi do njene hiperaktivnosti.



**Slika 1.** Šematski prikaz odgovora na stres (Modifikovano prema Helman i sar., 2023)

Važno je napomenuti da u odgovoru na stresor važnu ulogu u regulaciji homeostaze organizma imaju i proinflamatorni i antiinflamatorni citokini koji regulišu jedni druge, a takođe su regulisani glukokortikoidima i kateholaminima. U funkcionalnom smislu imunski sistem je aktivno uključen u homeostatsku regulaciju. Signali iz imunskih ćelija mogu značajno uticati na stopu metabolizma, ponašanje, motivaciju i kogniciju. Značajni paradoks akutnog u odnosu na hronični stres se ogleda u tome da isti sistemi koji u uslovima akutnog stresa učestvuju u održavanju homeostaze, neminovno štete organizmu u uslovima hroničnog stresa (McEven, 1998).

### 1.1.2. Kateholamini

Kateholamini su biološki visoko aktivna jedinjenja, koja u svojoj strukturi sadrže kateholo jezgro sa amino grupom u bočnom nizu. U kateholamine se ubrajaju NA, A i dopamin (DA). Hormoni A i NA se stvaraju u hromafinim granulama srži nadbubrežnih žlezda, odakle se oslobađaju u krvotok, dok je NA neurotransmiter koga u najvećoj meri stvaraju neuroni *locus coeruleus* retikularne



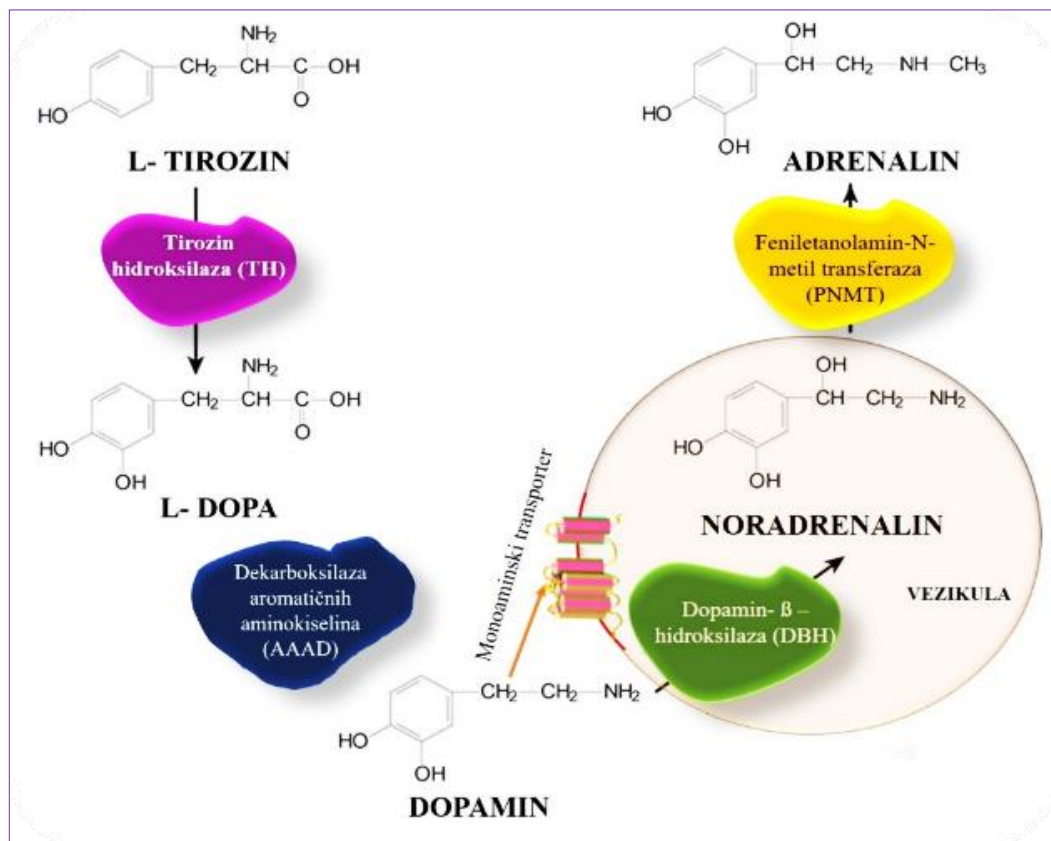
formacije, solitarnog jedra i drugih delova moždanog stabla, kičmene moždine, kao i postganglijski neuroni SNS. DA se sintetiše u delovima mozga kao što su kompaktni deo *substantia nigra* srednjeg mozga, ventralni tegmentum, zadnji deo hipotalamusa itd.

### ***1.1.2.1. Biosinteza kateholamina***

Kateholamini su derivati aminokiseline L-tirozina, koja u svom bočnom lancu sadrži benzenski prsten. To je aminokiselina koja se u jetri stvara od fenilalanina pod dejstvom fenilalanin-hidroksilaze. Sinteza kateholamina počinje od tirozina, čijom hidroksilacijom od strane solubilnog citoplazmatskog enzima tirozin hidroksilaze (TH), nastaje dihidroksi-l-fenilalanin (L-DOPA). Ova reakcija se odigrava u prisustvu kiseonika, divalentnog jona gvožđa kao i tetrahidropteridina. S obzirom da je TH prisutan u svim ćelijama koje sintetišu kateholamine, predstavlja limitirajući enzim u procesu sinteze. Enzimska aktivnost TH je kompleksno regulisana u kratkom i dugom vremenskom periodu. U kratkom vremenskom periodu, aktivnost TH reguliše povratna inhibicija (Kaufman, 1995; Fitzpatrick, 1999), posredstvom DOPA, DA i NA. U dužem vremenskom periodu, regulacija podrazumeva stabilizaciju enzima, RNK i aktivnosti na nivou translacije (Kvetnansky i sar., 2009).

Sledeći korak je dekarboksilacija L-DOPA u DA, pomoću enzima dekarboksilaze L-aromatičnih aminokiselina (AAAD). Aktivnost ovog enzima zavisi od nivoa kofaktora piridoksal 5` fosfata. Dopamin se zatim pakuje u sinaptičke vezikule neurona, a u hromafinim ćelijama srži nadbubrežnih žlezda u hromafine granule, gde se pod dejstvom enzima dopamin beta hidroksilaze (DBH) konvertuje u NA. DBH je jedini enzim biosintetskog puta koji se ne nalazi u citoplazmi nego u granularnim vezikulama i za njegovu aktivnost potrebno je prisustvo askorbinske kiseline, jona bakra i kiseonika.

Finalni korak u biosintezi A je metilacija noradrenalinskog primarnog amina. Reakcija je katalizovana solubilnim citoplazmatskim enzimom feniletanolamin N-metiltransferazom (PNMT) (Axelrod, 1962), (Slika 2). Ovaj enzim koristi S-adenozil-metionin kao kofaktor, a aktivira se pod dejstvom glukokortikoida. Wonga i sar. (1995) su pokazali da se aktivnost PNMT smanjuje za 25% usled hipofizektomije i nedostatka glukokortikoida. Ovaj enzim je primarno zastupljen u hromafinim granulama srži nadbubrežnih žlezda, mada su manje količine zastupljene i u unutaršćanim kateholaminskim ćelijama (*engl.* ICA- intrinsic cardiac adrenergic), ćelijama pluća i kože (Pullar i sar., 2006).

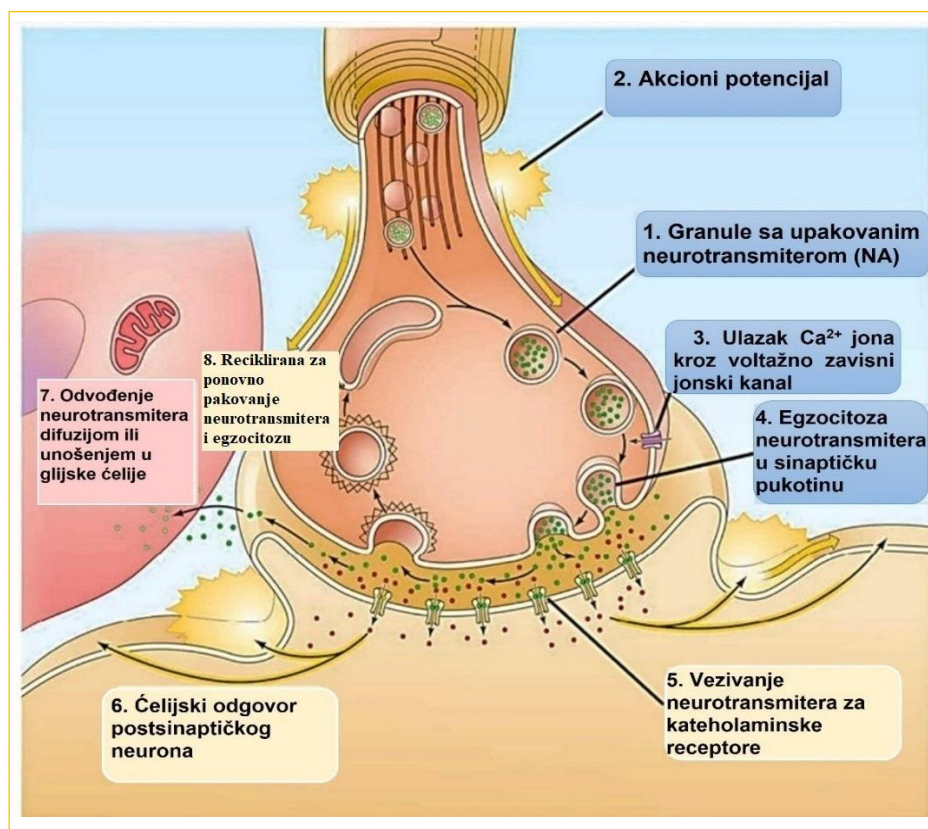


**Slika 2.** Šematski prikaz biosinteze kateholamina. TH- tirozin hidroksilaza; L-DOPA- dihidroksi-1-fenilalanin; AAAD- enzimi dekarboksilaze L- aromatičnih aminokiselina; DBH- dopamin beta hidroksilaza; PNMT- feniletanolamin N-metiltransferaza.

Nakon sinteze, kateholamini su deponovani u sinaptičkim vezikulama nervnih završetaka neurona iz kojih se oslobađaju nakon stimulusa.

### 1.1.2.2. Oslobađanje kateholamina

Proces oslobađanja kateholamina sličan je u simpatičkim nervnim završecima i nadbubrežnim žlezdama. Oslobodeni acetilholin (ACh) sa preganglijskih nervnih završetaka se vezuje za jonotropne nikotinske receptore postganglijskih neurona simpatičkog nervnog sistema ili hromafinih ćelija srži nadbubrežnih žlezda. Kada se ACh veže za nikotinski receptor, ovaj neselektivni katjonski kanal se otvara pa se  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  kreću niz elektrohemijski gradijent, što rezultuje depolarizacijom i stvaranjem akcionog potencijala koji se prenosi do nervnih završetaka. Akcioni potencijal dovodi do otvaranja voltažno zavisnih kanala za kalcijum, koji je neophodan za fuziju i egzocitozu vezikula sa sintetisanim kateholaminima (Slika 3).



**Slika 3.** Modifikovana i pojednostavljena šema kateholaminske sinapse (Purves, 2009)

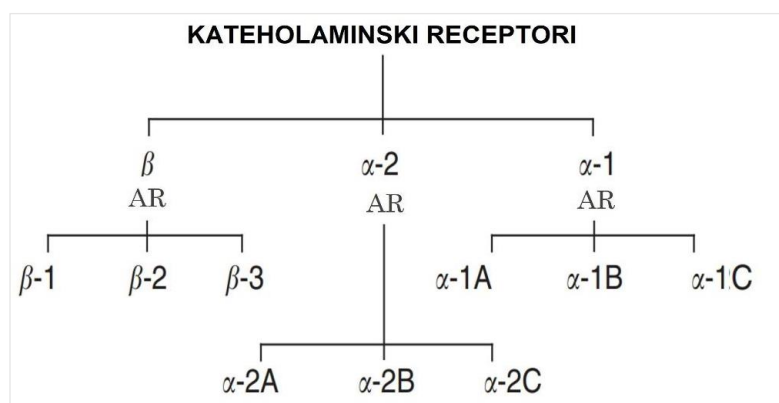
Procesom egzocitoze sa kateholaminima se oslobađaju hromogranini, neuropeptidi, adenzin trifosfat (ATP) i deo DBH. U procesu egzocitoze vezikula sa neurotransmiterima učestvuju i niz proteina vezikule kao što su sinapsin, sinaptotagmin, sinaptofizin, sinaptobrevin, mali protein G itd. Mnoge supstance utiču na količinu oslobođenih kateholamina u toku ćelijske aktivacije. Prostaglandini, GABA, opioidi, Ach (preko muskarinskih receptora) i adenzin inhibiraju, dok adrenokortikotropni hormon (ACTH), angiotenzin II i Ach (preko nikotinskih receptora) podstiču njihovo oslobađanje (Goldstein, 1995).

Oslobađanje A i NA je specifično regulisano i u zavisnosti je od vrste stresora. Izlaganje hladnoći stimuliše oslobađanje NA iz simpatičkih nervnih završetaka (Dronjak i sar., 2002), dok nadbubrežne žlezde oslobađaju A u uslovima hipoglikemije, glukopenije i imobilizacije (Dronjak i sar., 2004).

### **1.1.2.3. Mehanizam delovanja kateholamina**

Oslobodeni kateholamini svoju funkciju ostvaruju posredstvom membranskih  $\alpha$  i  $\beta$  kateholaminskih receptora spregnutih sa proteinom G, koje čine 7 transmembranskih domena od po 22-28 aminokiselina, tri unutarćelijske i tri vanćelijske petlje (Bylund, 2007).

Kateholaminski receptori se klasifikuju u tri familije i devet podtipova: tri  $\alpha$ 1-receptora ( $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1B,  $\alpha$ 1D), tri  $\alpha$ 2- receptora ( $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B,  $\alpha$ 2C) i tri  $\beta$  receptora ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3 receptor), (Slika 4). Ovi receptori ostvaruju različito dejstvo, u zavisnosti od toga sa kojim G proteinom su povezani i mehanizma signalne transdukcije vezanog za njegove subjedinice. Ovo je bitno jer će izazvana fiziološka dejstva varirati u zavisnosti od specifičnosti receptora za koji se kateholamini vežu.



**Slika 4.** Šematski prikaz podele kateholaminskih receptora.

$\alpha$ 1-kateholaminski receptori ( $\alpha$ 1-AR) posreduju u mnogim efektima simpatičkog nervnog sistema. Kao i drugi kateholaminski receptori,  $\alpha$ 1-AR se aktiviraju kateholaminima, A i NA. Od svih  $\alpha$  receptora,  $\alpha$ 1A- podtip receptora je najzastupljeniji u ljudskom srcu (Faure i sar., 1995). Ovaj receptor spregnut je sa proteinom G koji sadrži  $\alpha$ q subjedinicu. Aktivacijom proteina G dolazi do odvajanja  $\alpha$ q subjedinice od  $\beta$ y subjedinice i aktivacije fosfolipaze C (PLC). PLC vrši hidrolizu membranskog fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata ( $PIP_2$ ) na inozitol-3 fosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). Ta dva sekundarna glasnika dalje imaju različite sudbine. IP3 se vezuje za IP3-zavisne kanale za  $Ca^{2+}$  na membrani endoplazminog retikuluma što omogućava oslobađanje  $Ca^{2+}$  u citoplazmu, dok DAG ostaje u ćelijskoj membrani i zajedno sa jonima  $Ca^{2+}$  posreduje u aktivaciji protein kinaze C (PKC). Sa druge strane, efekat adrenalina preko  $\alpha$ 2 receptora odvija se inhibiranjem adenil ciklaze. Poznato je da  $\alpha$ 2 receptori imaju važnu ulogu u zaustavljanju oslobađanja neurotransmitera iz simpatičkih nervnih završetaka i kateholaminskih neurona u centralnom nervnom sistemu (CNS). Osim toga, određene studije sugerišu ulogu  $\alpha$ - kateholaminskih receptora u modulaciji imunskih funkcija (Spengler i sar., 1990; Maestroni i Conti, 1994 a, b). Pretpostavlja se da se ova vrsta receptora eksprimira u nekim patološkim stanjima ili u specifičnim ćelijskim odeljcima imunskog sistema, u određenim fazama sazrevanja ćelija imunskog sistema ili u aktiviranim ćelijama (Elenkov i sar., 2000; Kavelaars, 2002).

Ljudsko srce sadrži sva tri podtipa beta kateholaminskih receptora.  $\beta$ 1 kateholaminski receptori su zastupljeniji u ljudskom srcu (70-80%) od  $\alpha$  kateholaminskih receptora.  $\beta$  receptori su spregnuti uglavnom sa proteinom G koji sadrži  $\alpha$ s subjedinicu. Vezivanje kateholamina za receptor spregnut sa  $G_s$  proteinom dovodi do odvajanja  $\alpha$ s od  $\beta$ y subjedinice, i aktivacije adenil ciklaze, koja prevodi ATP u ciklični adenzin monofosfat (cAMP). Ovu kaskadu nastavlja protein kinaza A (PKA), enzim koji se aktivira vezivanjem cAMP za regulatornu subjedinicu, i čija katalitička subjedinica sledstveno vrši fosforilaciju nishodnih molekula, kao što je, na primer, L-kanal za  $Ca^{+}$  na sarkolemi i T-tubulama kardiomiocita. Njegova fosforilacija rezultira značajnim povećanjem unutarćelijske koncentracije  $Ca^{2+}$ , koji je glavni regulator kontrakcije srčanog mišića. Aktivacija  $\beta$ 1- i  $\beta$ 2- kateholaminskih receptora u srcu dovodi do povećanja performansi ovog organa.  $\beta$ 1-receptor spregnut je sa  $G_s$  proteinom, a  $\beta$ 2 kateholaminski receptor sa  $G_s$  i  $G_i/o$  proteinom. Aktivacija  $G_s$  signalnog puta deluje kao svojevrsan “aktivator”, a  $G_i$  kao “kočnica” (Feldman i sar., 2005). U ćelijama imunskog sistema stimulacija  $\beta$ 2 kateholaminskih receptora može aktivirati efektorske molekule, poput PKA, koja stimuliše MAPK signalni put (Chhatar i Lal, 2021). Značaj  $\beta$ 3 kateholaminskih receptora u humanom miokardu nije u potpunosti razjašnjen. Kannavo i Koch, (2017) na osnovu činjenice da je ovaj tip receptora takođe spregnut sa proteinom G klase  $G_{\alpha i}$ , smatraju da  $\beta$ 3 kateholaminski receptor sprečava prekomernu aktivnost  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 kateholaminskih receptora u srcu. Za razliku od  $\beta$ 2, značajno se manje eksprimira u srcu ali se više eksprimira u patološkim stanjima fibroze, insuficijencije, sepse, itd. Ovaj tip receptora aktivira se pri mnogo većim koncentracijama kateholamina u odnosu na  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 (Niu i sar., 2012).

Receptori za dopamin takođe pripadaju familiji receptora spregnutih sa proteinom G (GPCR) i imaju posebnu funkciju u mozgu i krvnim sudovima bubrega i splahnhične vaskularne mreže (Hofmann, 1998).

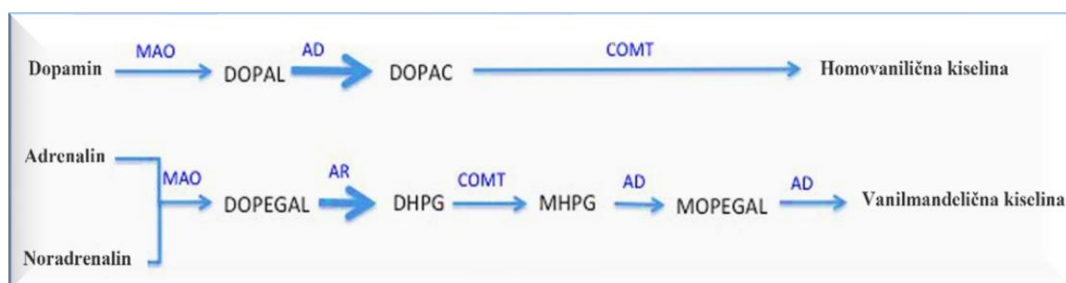
#### 1.1.2.4. Inaktivacija i razgradnja kateholamina

Posle oslobađanja kateholamina u sinaptičku pukotinu i interakcije sa odgovarajućim kateholaminskim receptorima, dolazi do njihove inaktivacije. Oslobođeni kateholamini vraćaju se i preuzimaju u nervne završetke procesom koji je poznat pod nazivom „uptake 1“ (neuronsko preuzimanje), dok se u drugim tipovima ćelija taj proces preuzimanja naziva „uptake 2“ (Eisenhofer, 2001).

Neuronsko preuzimanje kateholamina je energetski zahtevan proces koji zahteva prisustvo unutarćelijskih jona kalijuma i vanćelijskih jona natrijuma a posredovan je proteinskim transporterima (Aggarwal i Mortensen, 2017). Noradrenalinski transporter (NET) i dopaminski transporter (DAT), pripadaju porodici monoaminskih transportera, koji imaju ulogu u fiziološkim funkcijama monoamina, jer ih uklanjaju iz sinapse i omogućavaju njihovo preuzimanje u presinaptičku ćeliju, gde se zatim transportuju u vezikule u kojima se čuvaju ili metabolišu uz pomoć enzima za razgradnju kateholamina. Između ovih transportera postoje razlike. NET dva puta efikasnije preuzima NA od A (Phillips i sar., 2001). Sa druge strane, DAT efikasnije transportuje DA u poređenju sa NA i A (Eisenhofer, 2001).

Drugi tipovi ćelija, poput miocita, hepatocita, hromafinih ćelija, glijskih ćelija CNS, glatkih mišićnih ćelija i ćelija placente, takođe aktivno preuzimaju kateholamine procesom poznatim kao uptake 2 (Martel i Azavedo, 2003; Wang i sar., 2013). Uptake 2 proces se odvija putem ekstraneuronskog monoaminskog transportera (EMT), niskog afiniteta i specifičnosti za kateholamine. On favorizuje preuzimanje A u odnosu na NA i funkcioniše nezavisno od vanćelijskih jona natrijuma.

Metabolička inaktivacija kateholamina odigrava se O-metilacijom, uz posredstvo katehol O-metiltransferaze (COMT) koja je lokalizovana u sinaptičkoj pukotini i citoplazmi ćelija, ili oksidativnom deaminacijom posredstvom monoamino oksidaze A (MAO-A). MAO je flavoprotein, a nalazi se na spoljašnjoj membrani mitohondrija presinaptičkog neurona. Ona razgrađuje kateholamine u odgovarajuće aldehide, koji se potom oksiduju u kiseline dejstvom enzima aldehyd dehidrogenaze (AD), ili se pretvaraju u alkohole ili glikole dejstvom enzima aldehyd reduktaze (AR). Stvoreni produkti se u jetri konjuguju sa glukuronskom ili sumpornom kiselinom, a zatim izlučuju urinom. U fiziološkim uslovima, NA, A i 5-HT (serotonin) su supstrati koji se primarno razgrađuju uz pomoć MAO-A, dok je MAO-B odgovorna za razgradnju DA (Slika 5).



**Slika 5.** Šematski prikaz degradacije kateholamina (prema: Kamal i Lappin, 2019). MAO- monoamino oksidaza; DOPAL- 3,4- dihidroksifenil acetaldehyd; DOPAC- 3,4 dihidroksifenilsirćetna kiselina; COMT- katehol O-metiltransferaza; DOPEGAL - 3,4-dihidroksifenil glikoaldehyd; AD - aldehyd dehidrogenaza; AR - aldehyd reduktaza; DHMA- 3,4-dihidroksimandelična kiselina; DHPG- dihidroksifenilglikol; MHPG- 3 metoksi-4-hidroksifenilglikol; MOPEGAL- 3-dihidroksi-4-hidroksifenil glikoaldehyd.

NA i A se razgrađuju u nervnim završecima dejstvom MAO-A. U prvom koraku, deaminacijom se formira aldehidni intermedijer 3,4-dihidroksifenil glikoaldehid (DOPEGAL). Aldehidi nastali iz A i NA, delovanjem MAO-A se dalje redukuju do odgovarajućih alkoholnih metabolita u dihidroksifenilglikol (DHPG). Sledeći korak koji vodi produkciji 3 metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG) je ekstraneuronska O-metilacija. AD konvertuje MHPG u 3-dihidroksi-4-hidroksifenil glikoaldehid (MOPEGAL) u jetri do vanilmandelične kiseline (VMA) (Eisenhofer i sar., 2004). Metabolit koji nastaje deaminacijom DA pod dejstvom MAO-B u prvom koraku je 3,4-dihidroksifenil acetaldehid DOPA. Nastali aldehid se dalje posredstvom aldehid dehidrogenaze konvertuje u 3,4 dihidroksifenilsirćetnu kiselinu (DOPAC), koja se u sledećem koraku metaboliše u homovaniličnu kiselinu (HVA).

## 1.2. Uticaj stresa na razvoj depresije

Kliničke studije su potvrdile korelaciju između stresnih događaja i nastanka depresije (Mc Ewen, 1999). Depresija predstavlja jedan od najčešćih zdravstvenih problema savremenog društva. Prema podacima o zdravlju Svetske Zdravstvene Organizacije iz 2023. godine, procenjuje se da oko 280 miliona ljudi u svetu pati od depresije. Učestalost depresije u humanoj populaciji je 16%, ali je dvostruko veća kod žena. Recidiv je uobičajen kod 60% ljudi koji su doživeli više od jedne doživotne depresivne epizode (Monroe i sar., 2014). Faktori koji čine osobu podložnu depresiji mogu biti biohemijski, endokrini, genetski, ekološki i hormonski (Duman i sar., 2016).

Depresija je rasprostranjena hronična bolest koja može uticati na misli, raspoloženje i fizičko zdravlje. Karakteriše je loše raspoloženje, nedostatak energije, tuga i nesanica (Cui, 2015). Simptomi depresije predstavljaju najverovatnije zajednički ishod mnoštva različitih patoloških procesa u mozgu, izazvanih stresnim događajima (Calcia i sar., 2016). Neurobiološka osnova depresije još nije u potpunosti shvaćena. Postoji više teorija o nastanku depresije. Jedna od najzastupljenijih teorija implicira poremećaje u monoaminskom sistemu (tj. serotoninском, noradrenalinskom i dopaminskom), ali podaci ukazuju i na druge uzročnike depresije. Depresija može nastati usled smanjene neurogeneze u hipokampusu odraslih, kao i disregulacije neurotrofnih faktora (Duman i Monteggia, 2006). Takođe, poremećaj regulacije HPA osovine (Nestler i sar., 2002), kao i promene u sposobnosti imunskih ćelija da luče proinflamatorne citokine mogu pospešiti nastanak depresije (Dantzer i sar., 2008). Citokinska hipoteza depresije implicira da su proinflamatorni citokini ključni faktori u neuromodulaciji i medijaciji bihevioralnih, neuroendokrinih i neurohemijskih karakteristika depresije (Schiepers i sar., 2005; Yazar, 2021). Pacijenti sa depresijom, ne samo da pokazuju poremećaj raspoloženja, anksioznost i druge kognitivne poremećaje, već pokazuju i pojačanu osetljivost na bolesti, kao što su bolesti srca i cerebrovaskularne bolesti (Duman i sar., 2016). Epidemiološke studije su potvrdile visok komorbiditet između depresije i kardiovaskularnih oboljenja. Komorbiditet je dvosmeran dok su mehanizmi složeni i višestruki. Pored genskih i psihosocijalnih faktora, u komorbiditet su uključeni centralni i autonomni nervni sistem (ANS), neuroendokrini, imunski, kao i kardiovaskularni sistem. Kod kardiovaskularnih oboljenja prisutna je hronična inflamacija koja potencijalno doprinosi razvoju depresije što za posledicu ima dalju aktivaciju upalnih procesa. Literaturni podaci pokazuju da je komorbiditet depresije i kardiovaskularnih oboljenja veći kod žena (Möller-Leimkühler, 2010). Kliničke studije su pokazale da su žene nakon infarkta miokarda i koronarnog bajpasa imale teže simptome depresije, koji su duže trajali u odnosu na muškarce (Drory i sar., 2003; Bjerkeset i sar., 2005). To bi se moglo objasniti različitom specifičnom strategijom suočavanja jer žene imaju tendenciju da na stresne životne događaje reaguju većom anksioznošću i depresijom, dok muškarci pri tom suočavanju ispoljavaju bes i agresiju (Möller-Leimkuhler i sar., 2002).

### 1.2.1. Hronični nepredvidivi stres kao model razvoja depresije

Animalni modeli depresije, uprkos njihovoj ograničenosti, intenzivno se koriste u istraživanju i proučavanju neurobiološke osnove depresije i mehanizama delovanja antidepressiva. Hronični nepredvidivi stres (*engl.* chronic unpredictable stress - CUS), jedan je od najrelevantnijih modela stresa kod životinja, koji izaziva brojne promene u ponašanju slične onima kod pacijenata sa anksioznošću, depresijom i sličnim drugim poremećajima ponašanja. Gorbunova i sar. (2017) su pokazali da izlaganje životinja CUS dovodi do smanjenja lokomotorne aktivnosti, anhedonije i poremećaja memorije i učenja. Lista stresora u ovom modelu CUS uglavnom uključuje oduzimanje hrane i vode, nagnut kavez, moker kavez, imobilizaciju, trčanje na traci i socijalnu izolaciju. Grippo i sar. (2002) su pokazali da CUS u trajanju od 4 nedelje dovodi do pojave depresivnog ponašanja praćenog anhedonijom kao ključnim pokazateljem ponašanja nalik depresivnom. Pored poremećaja u ponašanju, neophodno je pomenuti da su Grippo i sar. (2002) pokazali da se kod pacova izlaganim CUS povećava broj srčanih kontrakcija po jedinici vremena, a sledstveno i krvni pritisak, što ukazuje na validnost i značaj ovog animalnog modela u rasvetljavanju mehanizama postojeće uzročno-posledične veze uticaja stresa na razvoj depresije i kardiovaskularnih oboljenja. Kasnije, u studiji koju je sproveda ista grupa autora (2005) ustanovljeno je da u modelu CUS kod odraslih mužjaka pacova nakon 4 nedelje izlaganja stresorima dolazi i do povećanja nivoa proinflamatornih citokina u plazmi i pojedinim strukturama mozga. Dalla i sar. (2005) su pokazali da su ženke pacova osetljivije na izlaganje CUS u odnosu na mužjake, što se manifestuje povećanim nivoom kortikosterona i smanjenom aktivnošću u testu otvorenog polja, ali i efikasnijim odgovorom na nov dodatni stresor.

Treba napomenuti da su animalni modeli depresije ograničeni u mogućnosti predviđanja ponašanja kod ljudi, što je povezano sa složenom heterogenom prirodom bolesti, kao i činjenicom da su neki od simptoma depresije karakteristični samo za ljude (npr. osećaj bezvrednosti, krivice i samoubilačke misli). Uprkos tome, životinje izložene različitim vrstama stresora pokazuju ponašanje nalik depresivnom, koje je u osnovi praćeno anhedonijom i apatijom, zajedno sa ponašanjima sličnim anksioznosti i blagom kognitivnom disfunkcijom, što se obično opaža kod pacijenata kojima je dijagnostikovana depresija.

Korišćenje ovog modela stresa omogućuje nam bolje razumevanje mehanizama stresa, imunskih i srčanih disfunkcija kao i neurobioloških procesa koji se nalaze u osnovi poremećaja raspoloženja i kardiovaskularnih oboljenja.

### 1.3. Uticaj stresa na imunski sistem

Fiziološki odgovor na akutni stres modulira adaptivni niz fizioloških promena kako bi se optimizovao „*opstanak organizma*“. Jedna od komponenti odgovora na stresore uključuje aktiviranje urođenog imunskog sistema. Urođeni imunitet predstavlja prvu liniju odbrane organizma, pružajući brz odgovor koji obezbeđuje zaštitu od patogena i pre nego što organizam dođe u kontakt sa njima. Njega čine ćelije nastale iz hematopoetskih matičnih ćelija koje potiču iz koštane srži, kao što su monociti, granulociti, makrofagi (van Furth, 1989). Za razliku od urođenog, stečeni imunitet se razvija, odnosno stiče tokom života prepoznavanjem i pamćenjem širokog raspona antigena, zahvaljujući T i B limfocitima. Memorijske T ćelije koje cirkulišu u krvotoku obezbeđuju imunonadzor, dok memorijske T ćelije koje borave uglavnom u sekundarnim limfoidnim organima, kao što su limfni čvorovi i slezina imaju za cilj uspostavljanje imunske memorije (Nakai i sar., 2014). Memorijski T limfociti pokreću brzo oslobađanje citokina. Glavni izvor citokina su pomoćnički T limfociti (Th) i to Th1 limfociti koji stvaraju proinflamatorne citokine interferon gama (IFN- $\gamma$ ), faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukine (IL-2, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ ), i Th2 limfociti koji stvaraju antiinflamatorne citokine IL-4, IL-5 i IL-10.

Stres i hormoni stresa, glukokortikoidi i kateholamini, smanjuju lučenje proinflammatoryh citokina i pomeraju ravnotežu u smeru odgovora koji se odvija posredstvom Th2. Glukokortikoidi stimulišu produkciju antinflammatorynog IL-10 i inhibiraju produkciju proinflammatoryh citokina. Kateholamini inhibiraju diferencijaciju Th1 limfocita i produkciju proinflammatoryh citokina. Na taj način se formira negativna povratna petlja koja štiti organizam od prekomernog zapaljenskog odgovora (Chrousos, 2000). S druge strane, u uslovima hroničnog stresa, kateholamini mogu zapravo pojačati regionalne imunske odgovore, kroz indukciju proinflammatoryh IL-1, TNF- $\alpha$  i prvenstveno IL-8. Ovo pojačano zapaljenje može se opisati kao mač sa dve oštrice. Kratkoročno, zapaljenje pomaže da se prekine imunski izazov, ali tokom zapaljenja može doći do oštećenja tkiva koje negativno utiče na ishod bolesti. Dugotrajne promene u nivou proinflammatoryh citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  mogu ukazati na postojanje patofiziološkog puta od hroničnog stresa do razvoja depresije. Neurobiološki odgovor na stresne stimulse se karakteriše sistemskom promenom imunskog sistema ka povećanju proinflammatoryh i redukciji antiviralnih stanja. Inflamacija dovodi do povećane permeabilnosti krvno-moždane barijere, omogućavajući lakši ulazak inflamatornih molekula i imunskih ćelija u CNS. Inflamatorna signalizacija u CNS dovodi do strukturnih i funkcionalnih promena (promene u sinaptičkoj plastičnosti i neurotransmisiji), indukujući promene u ponašanju koje nalikuju depresivnom ponašanju, uključujući umor, kognitivne poremećaje, anoreksiju, anhedoniju i socijalno povlačenje koje pomažu oporavku od povreda i smanjuju verovatnoću širenja infekcije na okolinu (Deak i sar., 2015; Lee i Giuliani, 2019). Ovakav bio-bihevioralni odgovor ima prednosti, ali i mane. Dobra strana je što povećava verovatnoću preživljavanja organizma tokom stvarnih fizičkih povreda ili pretnji. Međutim, loša strana je što ovaj odgovor može povećati rizik od razvoja depresije i drugih stanja povezanih sa upalom, posebno kada se više puta uključuje ili kada je produžen (Hart, 1988; Dantzer i sar., 2008). Brojne studije su potvrdile povećan nivo proinflammatoryh citokina u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata koji boluju od depresije (Miller i sar., 2009; Hodes i sar., 2015) i potvrđena je efikasnost u lečenju rezistentne depresije antiinflammatorynim lekovima (Raison i sar., 2013).

U dosadašnjim istraživanjima su uočene polne razlike u imunskom odgovoru čoveka i otpornosti na infekcije i inflamatorne procese (Klein i Flangan, 2016; Ferretti i sar., 2018). Generalno, žene su podložnije razvoju depresije i autoimunskih bolesti, dok muškarci pokazuju povećanu osetljivost na nereproduktivne maligne i benigne karcinome. Žene snažnije reaguju na infekcije, sa povećanom proizvodnjom citokina i odgovorom T ćelija (Nalbandian i Kovats, 2005). Pritom su otpornije na bakterijske infekcije, imaju nižu incidencu parazitskih infekcija i snažnije reaguju na vakcine od muškaraca (Bouman i sar., 2005). Moguće je da jači imunski odgovor na patogene može doprineti većoj incidenci autoimunih bolesti, alergija i astme koji se češće primećuju kod žena. Polni hormoni su uključeni u diferencijaciju imunskih ćelija i proizvodnju antitela. Estrogen pri malim dozama stimuliše imunski sistem (Young i sar., 2014), dok je pri visokim dozama immunosupresivan (Pelekanou i sar., 2014). Androgeni su primarno immunosupresivni (Furman i sar., 2014). Uočene su i razlike u mikrogliji mozga. Mikroglija ima sposobnost da oslobađa pro- ili antiinflammatoryne citokine (Sawada i sar., 1989). Ove ćelije kod žena brže sazrevaju i imaju veću ekspresiju gena povezanih sa upalom i apoptozom (Hanamsagar i sar., 2017). Te razlike mogu biti razlog povećane osetljivosti žena na poremećaje raspoloženja nakon dugotrajne i kratkoročne upale. Na taj način inflamacija praćena prekomernim ili predugim izlaganjem stresorima povećava rizik od nastanka depresije kod žena, pored širokog spektra drugih neuropsihijatrijskih, neurodegenerativnih, metaboličkih i kardiovaskularnih poremećaja (Slavich i Sacher, 2019).

Imajući u vidu sve do sada rečeno, može se zaključiti da je razumevanje polnih razlika u imunskom odgovoru neophodno u strategiji terapijske intervencije i razvoju odgovarajućih i efikasnih terapija različitih bolesti kod muškarca i žene.



### 1.3.1. Slezina

Slezina je sekundarni limfoidni organ koji efikasano kontroliše prodor patogena koji se prenose putem krvi i indukuju imunski odgovor (Borges da Silva i sar., 2015). Bogata simpatička inervacija i visok stepen prokrvljenosti olakšavaju pristup signalnim molekulima koji kontrolišu funkcije slezine. Oko 98% inervacije slezine čine simpatička nervna vlakana, sa najvećom gustinom oko centralne arterije u beloj pulpi, gde ostvaruju bliski kontakt sa imunskim ćelijama, posebno T limfocitima (Felten i sar., 1985; Madden i Felten, 1995; Huh i Veiga-Fernandes, 2020). Zbog ovakve vaskularne strukture koja je inervisana simpatičkim vlaknima, promene u simpatičkoj aktivnosti utiču na protok krvi. Slezina životinja može da se kontrahuje i reguliše sopstveni volumen preko unutrašnje nervne mreže, dok se kod čoveka kontrahuju samo zidovi krvnih sudova slezine. Kontrakcija glatkih mišića u slezini ima dve svrhe. Prvo, slezina deluje kao rezervoar eritrocita. Kontrakcije slezine ili njenih krvnih sudova dovodi do izbacivanja eritrocita u cirkulaciju i na taj način se povećava hematokrit i kapacitet prenosa kiseonika putem krvi. Drugo, slezina sadrži veliki broj imunskih ćelija, uglavnom makrofaga i limfocita (Cesta, 2006). Ove imunske ćelije se takođe oslobađaju u cirkulaciju tokom kontrakcije slezine ili njenih krvnih sudova (Seifert i sar., 2012). Kontrakcija kapsule slezine ili krvnih sudova slezine rezultat je aktivacije kateholaminskih receptora. Mnogi fagociti i limfociti u slezini se nalaze u neposrednoj blizini simpatičkih nervnih završetaka i na taj način su izloženi većoj koncentraciji kateholamina što verovatno dovodi do različitih funkcionalnih promena (Sanders i Straub, 2002).

Pored kateholamina iz krvi, kao i onih oslobođenih sa simpatičkih nervnih završetaka, imunski organi i ćelije takođe poseduju sopstvenu mašineriju za *de novo* sintezu kateholamina (Jelokova i sar., 2002; Laukova i sar., 2013). Kateholamini regulišu mnoge imunske funkcije u slezini, kao što je proizvodnja citokina (Curtin i sar., 2009; Laukova i sar., 2010). Oni ostvaruju ovo dejstvo preko kateholaminskih receptora, prevashodno  $\beta_2$  receptora koji su najzastupljeniji na imunskim ćelijama (Laukova i sar., 2012). Dok se ranije smatralo da kateholamini imaju immunosupresivno dejstvo, noviji podaci pokazuju da oni takođe mogu pojačati proinflamatorne odgovore, i količinu proinflamatornih citokina, pretežno preko  $\beta_2$  receptora (Mnich i sar., 2010; Takahashi i sar., 2010) kao i  $\alpha_2$  receptora lokalizovanih na imunskim ćelijama (Flierl i sar., 2007; Bai i sar., 2009). Nekoliko studija je pokazalo prisustvo *rate-limiting* enzima u sintezi kateholamina, TH u različitim imunskim ćelijama periferne krvi kod ljudi (Musso i sar., 1996, Qiu i sar., 2005). Anagnostou i sar. (2007) su u slezini 18-nedeljnog humanog fetusa detektovali TH-pozitivna nervna vlakna koja se protežu u belu pulpu uglavnom oko centralne arterije, kao i u crvenu pulpu. Povećana ekspresija gena za TH uočena je u ćelijama limfocita aktiviranim konkanavalinom-A, perifernim neutrofilima i alveolarnim makrofagima pacova aktiviranim lipopolisaharidom (Qiu i sar., 2005), kao i u neutrofilima i makrofagima kod adrenalektomisanih životinja (Flierl i sar., 2009). Enzim odgovoran za sintezu adrenalina, PNMT se takođe ekspremira u slezini i timusu pacova (Warthan i sar., 2002; Jelokova i sar., 2002).

U normalnim fiziološkim uslovima, SNS aktivira imunski odgovor na povredu ili antigene/toksine/infektivne agense, u cilju održanja homeostaze i oporavka (Bellinger i Lorton, 2014). Produžena ili neodgovarajuća simpatička aktivacija imunskog sistema može dovesti do patoloških stanja poput hronične upale, toksičnog šoka, oštećenja tkiva ili autoimunskih oboljenja. Različiti kateholaminski receptori se ekspimiraju u imunskim ćelijama limfoidnih organa (Lubahn i sar., 2014).  $\beta_2$  kateholaminski receptor se ekspimiru u većini imunskih ćelija (Sanders, 2012) i smatra se glavnim medijatorom u regulaciji imunskog odgovora pomoću kateholamina (Marino i Cosentino, 2013). Ovaj receptor, spregnut sa Gs proteinom, dovodi do odvajanja  $\beta\gamma$  subjedinice proteina G od  $\alpha_s$  subjedinice, koja dalje aktivira adenil ciklazu, enzim zadužen da prevodi ATP u cAMP. Ovaj sekundarni glasnik aktivira PKA, čija se katalitička subjedinica translocira u jedro i fosforiliše CREB, protein koji se vezuje za CRE (*engl.* cAMP response elements) sekvence promotora gena za sintezu citokina. Pri velikim koncentracijama, cAMP može da aktivira EPAC, signalni put odgovoran za regulaciju proliferacije, diferencijacije i migracije imunskih ćelija (Shirshev, 2011). Lajević i sar. (2011) su pokazali da se, kod miševa u uslovima stresa, aktivira p38 MAPK signalni

put, dovodeći do smanjenja diferencijacije T ćelija u timusu. U imunskim ćelijama, p38 MAPK učestvuje u regulisanju proizvodnje citokina, kao što su TNF- $\alpha$  i IL-10 (Dobrevi i sar., 2009). Aktivnost p38 MAPK je takođe važna u razvoju i sazrevanju T ćelija u timusu.

### 1.3.2. Citokini i JAK-2/STAT3 signalni put

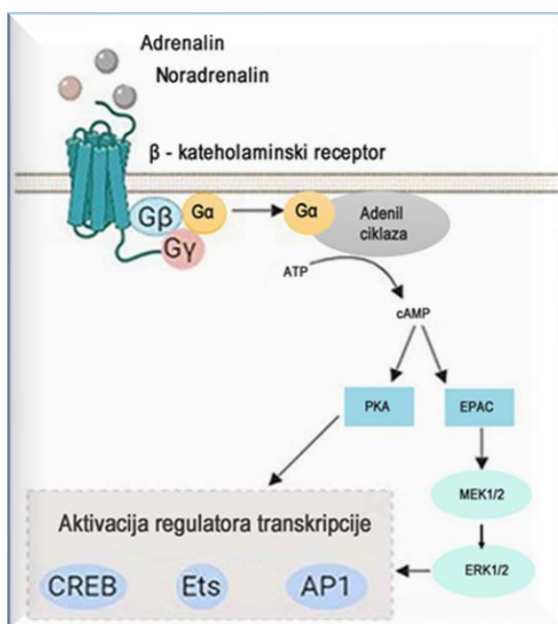
Pro- i antiinflamatorni citokini međusobno interreaguju kako bi očuvali ravnotežu, ali se, usled izloženosti stresorima, produkcija proinflamatornih citokina u cirkulaciji povećava, a antiinflamatornih smanjuje (Felger i Miller, 2014). Ravnotežu između oslobođenih pro- i antiinflamatornih citokina reguliše intezitet i trajanje odgovora na imunske stimulse. Citokini se mogu sintetisati kako u perifernim tkivima/ćelijama (limfocitima i makrofazima), tako i u CNS (astrocitima, mikrogliji, neuronima, endotelnim ćelijama). Citokini sintetisani u imunskim ćelijama na periferiji, mogu dospeti u CNS aktivnim i pasivnim transportom preko cirkumventrikularnih regiona i putem nervnog transporta pomoću vagusa. Citokini mogu delovati direktno na CRH nervne završetke u eminenciji medijani. Oslobođeni citokini su takođe sposobni da se vežu za citokinske receptore na cerebrovaskularnim endotelnim ćelijama, indukujući aktivaciju sekundarnih glasnika kao što su prostoglandini ili azot oksid (NO) (Turnbull i Rivier, 1999). Citokini utiču na dva biološka sistema povezana sa patofiziologijom depresije: HPA osovinu i kateholaminski/simpatički nervni sistem. Veza između CNS i imunskog sistema je dvosmerna. U uslovima stresa, proinflamatorni citokini, kao što su IL-1 $\beta$  i IL-6 stimulišu sekreciju kortikotropnog oslobađajućeg hormona (CRH) iz paraventricularnog jedra hipotalamusa, aktiviraju HPA osovinu i podstiču sekreciju ACTH i glukokortikoida (Jeon i Kim, 2016). Poremećaji spavanja, kao što je kratko trajanje sna i nesanica su jedne od najčešćih neželjenih pojava koje prate depresiju. Čak oko tri četvrtine pacijenata sa depresijom ima simptome nesаницe, a prisutna je kod oko 40% mladih i 10% starijih pacijenata, sa većom zastupljenošću kod žena (Nutt i sar., 2008). Kao i kod depresije, kod osoba koje pate od nesаницe je povećan nivo proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, i TNF- $\alpha$  (Ren i sar., 2021). Bonaccorso i sar. (2002) su pokazali da lečenje pacijenata sa hepatitisom C korišćenjem IFN $\alpha$  nakon tri meseca izaziva visoku stopu incidencije neuropsihijatrijskih komplikacija kao što su spornost, jak zamor, nesanica, letargija, depresivno raspoloženje, razdražljivost, emocionalna labilnost, socijalno povlačenje i nedostatak koncentracije.

IL-10 je antiinflamatorni citokin Th2 ćelija koji inhibira sintezu proinflamatornih citokina, utiče na sazrevanje limfocita B i stvaranje antitela, suzbija delovanje T limfocita tokom infekcije i upale, a utiče i na depresivno ponašanje (Pierson i Liston, 2010). Kliničke studije su pokazale povezanost između smanjenja koncentracije IL-10 u krvi ili smanjenja njegove sekrecije i nastanka depresije. Primećeno je da je koncentracija IL-10 smanjena u krvi pacijenata sa depresijom u poređenju sa zdravim kontrolama (Martin i sar., 2015). Utvrđeno je da veći nivo IL-10 korelira sa kasnijim početkom simptoma depresije, i nivo ovog citokina se smanjuje sa napredovanjem depresije (Gazal i sar., 2015). Ovi i mnogi drugi literaturni podaci ukazuju da nivo ovog antiinflamatornog citokina može imati značajnu ulogu u početku i napredovanju depresije. IL-10 se vezuje za vanćelijski domen IL-10R $\alpha$  što dovodi do fosforilacije JAK1 spregnute sa IL-10R $\alpha$ , kao i TYK2 spregnute sa IL-10R $\beta$ . Ove kinaze fosforilišu tirozinske ostatke unutarćelijskog domena IL-10R $\alpha$ , za koje se vezuju STAT3 svojim SH2 domenima. JAK1 zatim fosforiliše STAT3, koje dimerizuju i ulaze u jedro gde se vezuju za SBE promotora ciljnih gena.

IL-6 je član familije citokina sa pro- i anti-inflamatornim dejstvom u koju se ubrajaju IL-27, IL-11, LIF (*engl.* leukemia inhibitory factor), CNTF (*engl.* ciliary neurotrophic factor), onkostatin itd. Prvobitno je prepoznat kao faktor stimulacije B limfocita, a danas je dobro poznato njegovo plejotropno dejstvo u orkestraciji inflamatornih procesa, promovisanju rasta ćelija kancera, regulaciji metaboličkih procesa, neuroprotektivnom dejstvu itd. Dosadašnje studije su ukazale na značajno povećanje koncentracije proinflamatornog citokina IL-6 u serumu pacijenata kojima su

dijagnostikovani depresija i kardiovaskularna oboljenja (Alesci i sar., 2005), kao i kod životinja koje ispoljavaju ponašanje nalik depresivnom a imaju i promene na srcu (Grippio i sar., 2002; 2005). Antiinflamatorno dejstvo IL-6 se ostvaruje ukoliko se signalni put aktivira na klasičan način, aktivacijom membranskih receptora za IL-6 (IL-6R) i gp130 (Wolf i sar., 2014). Ovakav klasičan prenos signala se nalazi samo na određenim imunskim ćelijama kao što su ćelije jetre (hepatociti) i imunske ćelije (limfociti, neutrofil i monociti) (Scheller i sar., 2011). Trans-signalni put se smatra verovatnijim mehanizmom za vezu između depresije i IL-6. Proinflamatorno svojstvo IL-6 se ostvaruje preko solubilnih formi IL-6 receptora (sIL-6R) koje se nalaze u vanćelijskom prostoru a, po vezivanju za IL-6 se unose u ćeliju pomoću glikoproteina 130 (gp130) transmembranskog proteina. Za razliku od klasičnog, prisutan je u perifernim ćelijama, neuronima, astrocitima i mikroglijii. I u klasičnom i u trans-signalnom putu IL-6/IL-6R/gp130 kompleks aktivira unutarćelijsko prenošenje signala preko receptorskog kompleksa JAK/STAT.

Kompleks citokin-receptor se vezuje za gp130, koji dimerizuje, i pokreće JAK/STAT signalni put autofosforilacijom i aktivacijom tirozin kinaza Janus familije (JAK) sa kojima je spregnut. Aktivirane JAK kinaze fosforilišu tirozinske ostatke unutarćelijskog dela gp130, za koje se dalje svojim SH2 domenima vezuju STAT1 i 3 (prenosioci signala i aktivatori transkripcije) i bivaju fosforilisani od strane JAK. Fosforilisane STAT1 i 3 se odvajaju od gp130, unakrsno dimerizuju preko svojih SH2 domena i ulaze u jedro, gde aktiviraju transkripciju gena čiji promotor sadrži SBE elemente (*engl.* STAT binding elements). Jedan od ciljnih gena je supresor citokinske signalizacije 3 (*engl.* suppressor of cytokine signaling, SOCS3), najvažniji negativni regulator gp130-posredovane signalizacije, koji se vezuje za fosforilisane tirozinske ostatke gp130 i direktno inhibira JAK, a osim toga promovise njihovu degradaciju u proteozomima. Drugi negativni regulator gp130-posredovane signalizacije je protein inhibitor aktiviranog STAT (*engl.* protein inhibitor of activated STAT, PIAS), koji se vezuje za fosforilisane STAT i sprečava njihovo vezivanje za SBE elemente promotora ciljnih gena (Lokau i sar., 2019). S obzirom na svoju negativnu regulatornu ulogu, SOCS i PIAS su značajni unutarćelijski mehanizmi za zaustavljanje potencijalno štetnih efekata citokina u imunskim reakcijama. JAK-2/STAT3 signalni put reguliše imunitet, ćelijsku deobu, ćelijsku smrt i diferencijaciju ćelija (Ayele i sar., 2022).



**Slika 6.**  $\beta$  kateholaminski signalni put. PKA- protein kinaza A; MEK 1/2- kinaza mitogenom-aktivirane protein kinaze; ERK 1/2- kinaza regulisana vanćelijskim signalima; EPAC- Faktor izmene direktno aktiviran pomoću cAMP (*engl.* exchange protein activated by cAMP); CREB- cAMP responsivni element; Ets – transkripcioni faktor (*engl.* E- twenty six transcription factor); AP1- aktivator proteina;

U uslovima visoke koncentracije kateholamina, PKA fosforiliše kinaze G protein-spregnutih receptora (GRK) koje fosforilišu  $\beta$ 2 receptor, stvarajući mesto vezivanja za  $\beta$ -arrestin. Vezivanje  $\beta$ -arrestina dovodi do internalizacije receptora. Internalizovani receptor može se ponovo reciklirati ili razgraditi u lizozomu da bi se održala homeostaza. Bolesti poput srčane insuficijencije i astme su povezane sa neravnotežom u desenzitizaciji receptora (Chhatar i Lal, 2021).

U kulturi Th2 ćelija uzgajanih na podlozi sa niskim nivoom antiinflamatornog IL-4 citokina, aktivacija  $\beta$ 2 receptora dovodi do oslobađanja veće količine IL-4, dok će ćelije kultivisane sa umerenim ili visokim nivoima IL-4 oslobađati manju količinu IL-4 (Sanders, 2012). S druge strane, aktivacija  $\beta$ 2 receptora Th1 ćelija gajenih u medijumu sa visokom koncentracijom IL-12 podstiče oslobađanje IFN- $\gamma$  (Ramer-Quinn i sar., 2000). Rezultati ovih studija nam ukazuju da kateholamini imaju i pro- i antiinflamatorna svojstva a njihov efekat na proizvodnju citokina zavisi od ukupnih signalnih kaskada pokrenutih unutar određene ćelije i prisustva ili odsustva patogena u vreme aktivacije kateholaminskih receptora.

#### **1.4. Kardiovaskularni sistem tokom stresa**

Srce je inervisano simpatičkim i parasimpatičkim neuronima ANS. Povećanjem aktivnosti SNS povećavaju se frekvencija i snaga srčanih kontrakcija, koje se smanjuju sa povećanjem aktivnosti parasimpatičkog nervnog sistema (PSNS) (Vanhoutte i Levy, 1980). Tela postganglijskih neurona SNS koji inervišu srce nalaze se u stelatnim ganglijama i oslobađaju NA na svojim krajevima. Uklanjanje leve i desne stelatne ganglije smanjuje količinu NA u srcu za 89-100% (Pardini i sar., 1989). Do skora se verovalo da je A iz cirkulacije isključivi izvor ovog kateholamina u srcu. Međutim, Huang i saradnici (1996) su identifikovali u kulturi neonatalnih ćelija srca sisara ranije pomenute ICA ćelije, jedinstvene morfologije, sposobne za biosintezu kateholamina. Oni su pokazali da u toku embrionskog razvoja srca ove ćelije obezbeđuju kateholamine i u odsustvu simpatičke inervacije srca. ICA ćelije, koje ekspimiraju enzime neophodne za biosintezu kateholamina, identifikovane su u srcu sisara kao važan izvor kateholamina (Ebert i Thompson, 2001). Sve veći broj radova sugerše da je ICA sistem ključni regulator razvoja srca sisara, inotropne podrške nakon transplantacije srca i kardioprotekcije tokom ishemije (Huang i sar., 2009; Mahmoud i Lee, 2016). Kada se kultura kardiomiocita i ICA ćelija izloži neregularnoj električnoj aktivnosti od 5 Hz, povećava se ekspresija TH i DBH (Saygili i sar., 2011). Postganglijski nastavci SNS oslobađaju NA, koji se vezuje prevashodno za  $\beta$ 1 kateholaminske receptore ćelija srca i povećava srčanu frekvenciju (pozitivno hronotropno dejstvo), brzinu provodljivosti električnih signala (pozitivno dromotropno dejstvo) i kontraktilnost (pozitivno inotropno dejstvo). U animalnom modelu depresije, povećan je nivo iRNK za  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 kateholaminske receptore u srcu glodara (Juberg i sar., 1985; Minneman i sar., 1979).

Zajednički mehanizmi komorbiditeta kardiovaskularnih bolesti i depresije uključuju promene neurohumoralnih, imunskih i autonomnih regulacija i disfunkciju neurotransmiterskih sistema. Disregulacija ANS se smatra jednim od mehanizama koji leže u osnovi depresije i kardiovaskularnih oboljenja (Grippe i Johnson, 2009). Poremećaj homeostaze ANS izazvane stresom povezan je sa promenom u ravnoteži simpatičke i parasimpatičke grane ANS. Smanjenje tonusa vagusa dovodi do dezinhibicije inflamatornog odgovora. Simpatička hiperaktivnost u depresiji dovodi do povećanja koncentracije kateholamina u plazmi, vazokonstrikcije, ubrzanog tempa rada srca i aktivacije trombocita. Sve nabrojane promene imaju štetne efekte na kardiovaskularni sistem. Pacijenti sa simptomima depresije i kardiovaskularnim oboljenjima imaju povećan nivo NA (Otte i sar., 2005). Simpatička hiperaktivacija je uočena nakon infarkta miokarda i (Gardner i Habecker, 2013) u kompenzacionoj hipertrofiji srca (Lu i sar., 2012). Smanjenje parasimpatičkog tonusa može predstavljati predispoziciju za nastanak ventrikularne aritmije, čime je moguće objasniti prekomerni kardiovaskularni mortalitet kod pacijenata sa komorbiditetom depresije i kardiovaskularnih oboljenja.

Žene sa simptomima depresije imaju povećan faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja kao što je infarkt miokarda, moždani udar i koronarna bolest srca (Whang i sar., 2009; Agarwal i sar., 2018). Kod zdravih žena bez istorije kardiovaskularnih oboljenja, uočen je povećan nivo C-reaktivnog proteina (CRP) i IL-6, što ukazuje na prisustvo drugih kardiovaskularnih faktora rizika, kao što su visok indeks telesne mase, krvni pritisak, pušački status, sugerišući da je povećanje kardiovaskularnog rizika kod žena praćeno povećanom inflamacijom (Bermudez i sar., 2002). Smatra se da inflamatorni profili kod žena fluktuiraju tokom životnog ciklusa, pri čemu estradiol ima značajnu ulogu. Estradiol je povezan sa supresijom proinflamatornih citokina, kao što je IL-6 i TNF, kao i sa povećanom proizvodnjom antiinflamatornog citokina IL-10 (An i sar., 1999; Matalka i sar., 2003; Kassem i sar., 2009). Progesteron je još jedan polni hormon čiji su efekti pretežno antiinflamatorni (Klein i Flangan, 2016). Promene u fluktuaciji estrogena i progesterona tokom reproduktivnog perioda kod žena mogu uticati na imunski sistem i shodno tome na razvoj kardiovaskularnih oboljenja i depresije.

### 1.5. Endokanabinoidi

Termin endokanabinoidi se koristi za jedinjenja koja se sintetišu u organizmu i imaju afinitet za kanabinoidne receptore (CB), bilo da deluju kao agonisti ili antagonisti. Po hemijskoj građi endokanabinoidi su lipofilni molekuli, čiji su prekursori estri, etri i amidi arahidonske kiseline i drugih polinezasićenih masnih kiselina (Marzo, 2006). Najviše proučavani endokanabinoidi su anandamid (AEA) i 2-arahidonoil glicerol (2-AG). Početkom 1992. godine sprovedeno je istraživanje gde je iz mozga svinje izolovan ligand, već okarakterisanog receptora, identifikovan kao anandamid (amid arahidonske kiseline i etanolamina). On je nazvan po sanskritskoj reči annanda, što u prevodu znači “unutrašnje blaženstvo”, upućujući na njegovo dejstvo. Nakon toga je iz mozga pacova (a kasnije i iz mnogih drugih perifernih tkiva kao što su bubreg, jetra, slezina i pluća) izolovan još jedan endogeni ligand receptora za kanabinoid, nazvan 2-AG (Kondo i sar., 1998). Za razliku od peptidnih i aaminskih neurotransmitera, AEA i 2-AG su lipofilni molekuli i ne mogu biti pakovani u sinaptičke vezikule (Marzo, 2006), već se sintetišu i oslobađaju na “stimulus” nakon ćelijske depolarizacije ili stimulacije receptora, dejstvom specifičnih enzima, i oslobađaju se u vanćelijski prostor.

Endokanabinoidi, zajedno sa proteinima koji regulišu sintezu i razgradnju endokanabinoida i kanabinoidnim receptorima, predstavljaju deo složenog sistema nazvanog endokanabinoidni sistem (ECs). ECs predstavlja složen neuromodulatorni sistem u sklopu kojeg funkcionišu brojni signalni molekuli. Postojanje ECs je potvrđeno kod gotovo svih životinja, od *Cnidarie* do sisara, a to ukazuje na njegovu biološku važnost. Biljna tkiva takođe poseduju endokanabinoidnu signalnu mrežu sličnu onoj prisutnoj kod sisara, sugerišući na dobro očuvan ECs u eukariotskim ćelijama tokom evolucije (Shrestha i sar., 2006; Kim i sar., 2013).

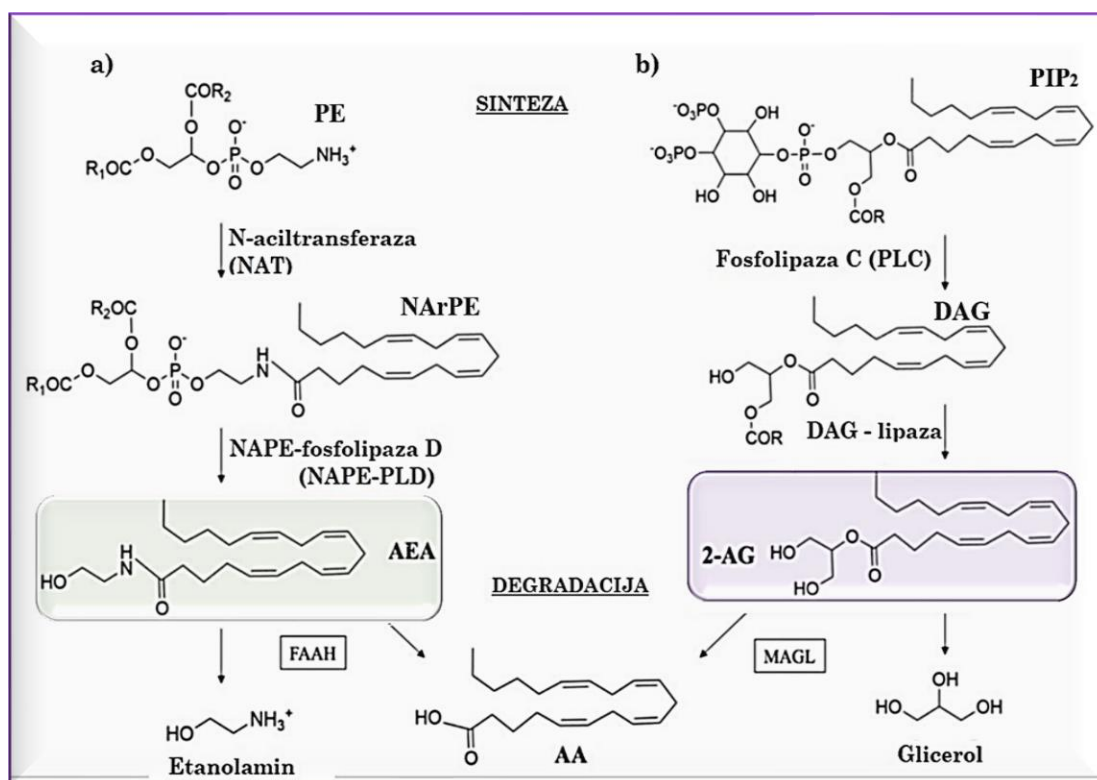
Derivati biljke roda konoplja (*Cannabis*), poput marihuane (*Canabis indica*) i industrijske konoplje (*Canabis sativa*), se koriste već hiljadama godina (Zuardi, 2006; Kano i sar., 2009). Kanabis je jedna od prvih biljaka koja se uzgajala i koristila radi vlakana, koja su se koristila u proizvodnji odeće, konopaca i mreža, a pored toga konoplja je korišćena u ishrani i medicini. Počeci interesovanja za fitokanabinoide vezani su za otkriće nekih komponenti kanabisa. Prvu nepsihotropnu komponentu kanabinoida, kanabinodol, izolovali su Jacob i Tod, 1940. godine prošlog veka. Dvadesetak godina kasnije delta-9-tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC) identifikovan je kao glavna psihoaktivna komponenta kanabisa. Na početku istraživanja mehanizam delovanja nije bio poznat, a zbog lipofilne prirode tetrahidrokanabinola (THC) i većine kanabinoida mislilo se da oni mogu delovati nespecifično, menjajući svojstva ćelijske membrane. Devedesetih godina, identifikovana su dva receptora za koja se ova jedinjenja vezuju, CB1 (Devane i sar., 1988) i CB2 (Munro i sar., 1993) kanabinoidni receptori. Otkriće kanabinoidnih receptora omogućilo je razumevanje fiziološke funkcije ECs i njegovu

potencijalnu uključenost u različite fiziološke procese. Poslednjih godina intenzivno se ispituju potencijalne fiziološke funkcije i povezanost ECs sa nekim patološkim stanjima. Fiziološka funkcija ECs je kompleksna i povezana je sa kontrolom složene motorike, kognicijom, učenjem i pamćenjem, regulacijom sna i budnosti. Ima direktan uticaj na ublažavanje anksioznosti, posttraumatski stresni poremećaj, opsesivno kompulzivni poremećaj, depresiju, neurogenezu, neuroprotekciju, percepciju bola, plodnost, trudnoću i pre- i postnatalni razvoj (Blessing i sar., 2015).

### 1.5.1. Sinteza endokanabinoida

Putevi sinteze i degradacije endokanabinoida *in vivo* su posredovani različitim enzimima, uprkos tome što u svojoj hemijskoj strukturi sadrže arahidonsku kiselinu.

AEA nastaje od fosfolipidnog prekursora N-arahidonil fosfatidiletanolamina (NArPE) (Freund i sar., 2003). Prvi korak u sintezi je transfer arahidonske grupe sa sn-1 pozicije fosfolipida na primarnu amino grupu fosfatidiletanolamina (PE), čime se dobija NArPE. Ova reakcija je katalizovana N-acil transferazom (NAT). Drugi korak je hidroliza NArPE do anandamida i fosfatidinske kiseline, što je katalizovano N-acilfosfatidiletanolamin specifičnom fosfolipazom D, (NAPE-PLD). Aktivnost NAT enzima je stimulisana  $Ca^{2+}$ , pa se pretpostavlja da on može biti ograničavajući faktor u produkciji AEA (Kano i sar., 2009), (Slika 7-a).



**Slika 7.** Mehanizam sinteze i razgradnje AEA (a) i 2-AG (b). PE- fosfatidiletanolamin; NAT- N-acil transferaza; NArPE- N-arahidonil fosfatidiletanolamin; NAPE-PLD- N-acilfosfatidiletanolamin specifična fosfolipaza D; PIP<sub>2</sub>- fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat; DAG- diacilglicerol; DAGL- diacilglicerol lipaza.

U prvom koraku sinteze 2-AG, PLC hidrolizuje fosfolipid membrane koji sadrži arahidonsku kiselinu na sn-2 poziciji kao što je PIP<sub>2</sub> i nakon hidrolize nastaje diacilglicerol. DAG takođe u svom hemijskom sastavu sadrži arahidonsku kiselinu. U sledećem koraku aktivnošću diacilglicerol lipaze (DAGL), hidrolizuje se DAG i nastaje 2-AG (Slika 7-b). Poznato je da ovo jedinjenje, osim prvobitne

funkcije stimulacije kanabinoidnih receptora, predstavlja takođe i glavni izvor arahidonske kiseline u sintezi prostaglandina.

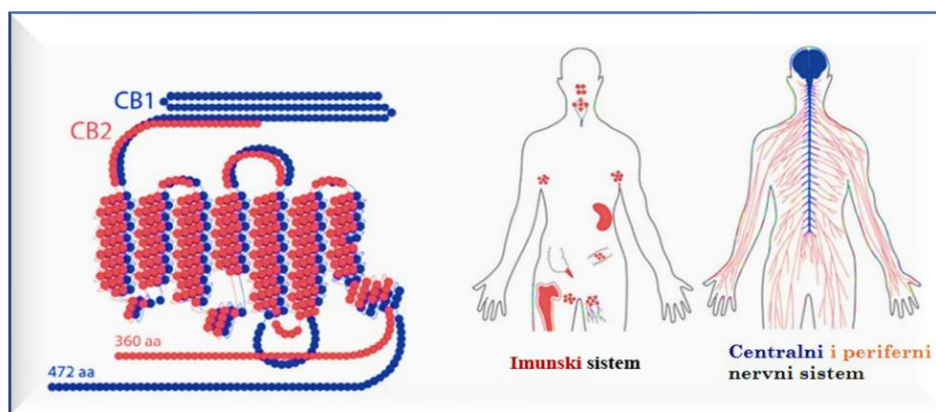
Nakon biosinteze, endokanabinoidi AEA i A-AG se otpuštaju u vanćelijsku sredinu, odakle se njihova signalizacija završava dvostepenim procesom, transportom endokanabinoida u ćeliju i hidrolizom specifičnim enzimima. Oba koraka su podjednako bitna u kontroli količine endokanabinoida u tkivima, omogućavajući na taj način njihovu brzu eliminaciju i prestanak dejstva (Svíženská i sar., 2008). S obzirom na lipofilnu prirodu, endokanabinoidi se mogu prenositi kroz ćelijsku membranu prostom difuzijom, ukoliko je njihova vanćelijska koncentracija viša od unutarćelijske (Svíženská i sar., 2008). Međutim, transport endokanabinoida kroz ćelijsku membranu može biti ubrzan endokanabinoidnim membranskim transporterom (EMT) koji je široko rasprostranjen u CNS (Fowler, 2013).

### ***1.5.2. Mehanizam delovanja endokanabinoida - kanabinoidni receptori***

Endokanabinoidi ostvaruju svoje dejstvo vezujući se za kanabinoidne CB1 i CB2 receptore. AEA je parcijalni agonist oba receptora, ali sa većim afinitetom za CB1 receptore, a ujedno je i endogeni ligand katjonskog kanala prolaznih receptorskih potencijala vaniloidnog tipa 1 (TRPV1). 2-AG se takođe vezuje za CB1 i CB2 i deluje kao potpuni agonist oba receptora (Di Marzo, 2018).

Oba tipa kanabinoidnih receptora, CB1 i CB2, pripadaju porodici receptora spregnutih sa proteinom G,  $G_i/o$  klase. Međusobno se razlikuju po aminokiselinskoj sekvenci, signalnim mehanizmima i tkivnoj rasprostranjenosti. Aktivacijom CB1 receptora smanjuje se nivo cAMP blokadom adenil ciklazne aktivnosti. CB1 receptori otvaraju Kir kanale za kalijum spregnute sa proteinom G (GIRK kanali). Izlazak kalijuma uslovljava hiperpolarizaciju membrane i odlaganje geneze akcionog potencijala.  $G_i/o$  protein, aktiviran preko CB1 receptora može direktno da inhibira N i P/Q-tip kalcijumskih kanala. Pored toga, aktivacija CB1 receptora može da aktivira i različite unutarćelijske kinaze, kao što su fokalna adhezivna kinaza (FAK), fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) i mitogenom aktivirana protein kinaza (*engl.* mitogen-activated protein kinases, MAPK), što dalje može da aktivira transkripcione faktore i gensku ekspresiju (Di Marzo, 2008). Ovaj kanabinoidni receptor mogu aktivirati i egzogeni kanabinoidi poput THC i sintetskih analoga (Lu i Anderson, 2017). CB1 receptori su najzastupljeniji kanabinoidni receptori u CNS (olfaktornoj kvržici, hipokampusu, jedrima cerebruma) i u manjoj količini u perifernom nervnom sistemu (PNS) (Zou i Kumar, 2018). U CNS, CB1 receptori se uglavnom nalaze na presinaptičkim nervnim završecima, gde učestvuju u retrogradnoj signalizaciji. Efekat endokanabinoida zavisi od lokalizacije CB1 receptora i neurotransmitera koji se otpuštaju iz tih neurona (Vinod i Hungund, 2006). U znatno manjoj količini CB1 receptori se nalaze u perifernim tkivima kao što su srce, jetra, masna tkiva, skeletni mišići, kosti, reproduktivni sistem (Zou i Kumar, 2018), nadbubrežne žlezde, pluća, koštana srž, timus i krajnici (Galiègue i sar., 1995).

CB2 receptor se u velikim količinama nalazi u tkivima slezine, tonzila i timusa (Slika 8). Pretpostavlja se da CB2 receptori učestvuju u regulaciji imunskog odgovora i inflamatornim reakcijama (Sugiura i Waku, 2002). Budući da su ovi receptori najviše eksprimirani u ćelijama imunskog sistema (Schurman i sar., 2020) kao što su monociti, makrofagi, B-limfociti i T-limfociti, ranije se smatralo da učestvuju isključivo u imunomodulaciji. CB2 receptori su detektovani u sru čoveka (Galiègue i sar., 1995) i pacova (Bouchard i sar., 2003) a umereno se eksprimiraju i u drugim perifernim tkivima kardiovaskularnog, gastrointestinalnog, reproduktivnog sistema, kao i jetri, kostima i masnom tkivu (Turcotte i sar., 2016; Zou i Kumar, 2018).



**Slika 8.** Šematski prikaz ekspresije CB1 (plavo) i CB2 (braon) receptora kod čoveka (Miljuš, 2018).

### 1.5.3. Razgradnja endokanabinoida

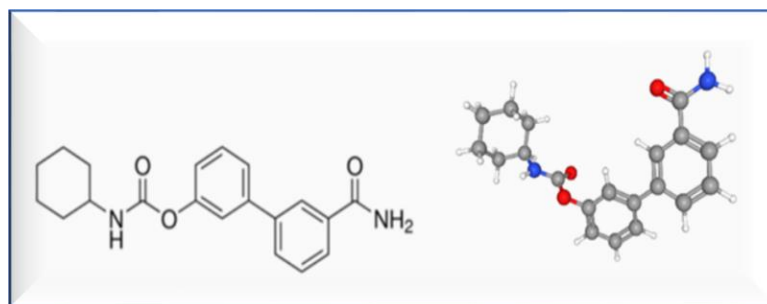
Hidrolaza masnokiselinskih amida (FAAH) predstavlja ključni enzim za razgradnju AEA (Naughton i sar., 2013). Katalitičkom aktivnošću ovog enzima iz AEA nastaju arahidonska kiselina i etanolamin, a iz 2-AG nastaje glicerol (Slika 7-a). Mada FAAH može da hidrolizuje 2-AG, važno je napomenuti da je primarni katalizator hidrolize 2-AG, monoacilglicerol lipaza (MAGL), serin hidrolaza, koja katalizuje hidrolizu 2-AG do arahidonske kiseline i glicerola (Sviženska i sar., 2008) (Slika 7-b). Razgradnjom endokanabinoida na sastavne komponente, omogućeno je njihovo ponovno korišćenje u ćeliji.

Uloga FAAH enzima je otkrivena 1993. godine. FAAH je protein od 65 kDa i 579 amino kiselina koji je prvi put prečišćen 1996. godine iz membrane ćelija jetre pacova. Ubrzo je ustanovljeno, uz pomoć analize sekvenci da pripada amidaznoj porodici proteina. Smatra se da je regulacija aktivnosti FAAH važna za modifikaciju dejstva endokanabinoidnog sistema. FAAH se u velikim količinama eksprimira u CNS, posebno u neokorteksu, hipokampusu i jedrima cerebruma i u mnogim perifernim tkivima, poput jetre, pluća, slezine, bubrega, testisa, tankog creva, oka, srca i endotelnih ćelija (Papa i sar., 2022). Farmakološkom inhibicijom aktivnosti FAAH povećava se nivo AEA. Zbog toga su razvijena brojna jedinjenja koja deluju kao inhibitori enzima FAAH koji učestvuje u katabolizmu endokanabinoida, a jedan od njih je URB597.

### 1.5.4. URB597 - selektivni inhibitor FAAH

Cikloheksilkarbaminska kiselina 3'-karbamoilbifenil-3-il-estar (URB597) je aril ester arhilkarbaminske kiseline i ima sposobnost da selektivno inhibira FAAH (Fegley i sar., 2005; Makara i sar., 2005). To je kristalna bela čvrsta supstanca molekulske mase 338,4 kDa, poznata i kao KDS-4103. Ovo jedinjenje ima dva donora i pet akceptora vodonične veze (Mor i sar., 2004; Piomelli, 2006). Takođe ima veliku sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu, sa koeficijentom permeabilnosti od  $45,3 \times 10^{-6}$  cm/sec. URB597 je kovalentni ireverzibilni inhibitor koji vrši hidrolizu enzima, karbamilacijom nukleofilnog ostatka enzima na Ser241 (Slika 9). URB597 pokazuje i značajne analgetske, anksiolitičke i antidepresivne efekte, ne izazivajući pritom efekte karakteristične za kanabinoide, kao što su katalapsija, hipotermija i hiperfagija. Ovo jedinjenje ima izuzetnu selektivnost za FAAH, ne utiče na transport AEA, ne interaguje sa kanabinoidnim receptorima, jonskim kanalima, transporterima i enzimima.

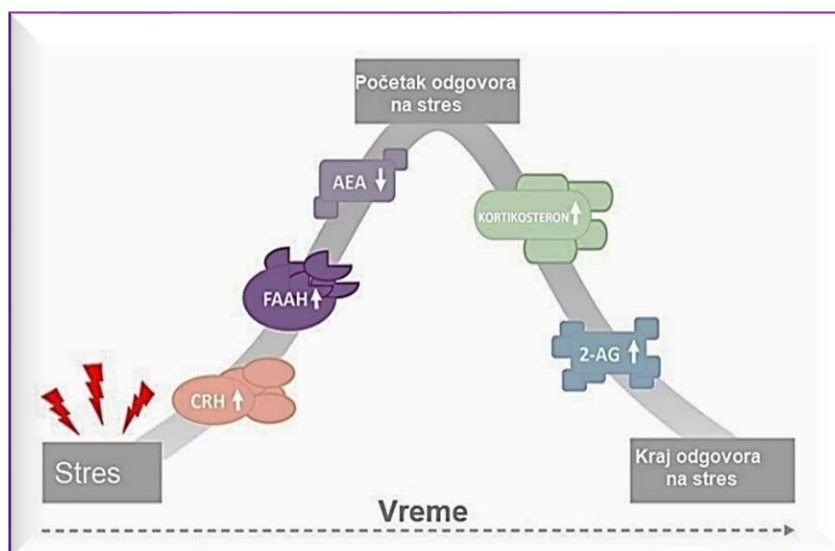




**Slika 9.** Hemijska struktura URB597 (Piomelli i sar., 2006).

### 1.5.5. Endokannabinoidni sistem i stres

Istraživanja su pokazala da je ECs neuromodulatorni sistem koji učestvuje u regulaciji stresnog odgovora. Na ulogu endokannabinoida u odgovoru na stresore ukazuje činjenica da konzumiranje kanabisa obično rezultira smanjenom percepcijom stresa i ublažavanjem osećaja anksioznosti (Green i sar., 2003). Endokannabinoidi pokazuju i kardioprotektivno dejstvo u stresnim situacijama (O'Sullivan i sar., 2012). Tretman inhibitorom FAAH enzima, URB694 sprečava aritmiju srca kod socijalno stresiranih Wistar Kyoto pacova (WKY), (Carnevali i sar., 2015). Efekti stresora na ECs su prilično kompleksni i regionalno specifični, a zavise od trajanja i učestalosti izlaganja stresorima. Tokom proteklih godina, veliki broj istraživanja na životinjskim modelima i humanim studijama, ukazuju da u uslovima akutnog ili hroničnog izlaganja stresorima dolazi do aktivacije ECs. Istraživanja na životinjama sugerišu da ECs učestvuje u prekidanju početne faze odgovora na stresore, koji se odvija preko HPA osovine. Izlaganje stresorima dovodi do brzog povećanja nivoa CRH, prevenstveno u bazolateralnim bademastim jedrima glodara (BLA), što dalje dovodi do povećanja nivoa FAAH. Povećanje količine FAAH enzima posledično dovodi do degradacije i smanjenja nivoa AEA te se na taj način smanjuje inhibitorni tonus AEA, što doprinosi aktivaciji HPA osovine. Povećanjem nivoa glukokortikoida u sistemsnoj cirkulaciji dolazi do povećanja nivoa 2-AG u medijalnoj prefrontalnoj kori (mPFC) i PVN hipotalamusa. Putem negativne povratne sprege, 2-AG inhibira aktivaciju ekscitatornih glutamatskih neurona koji inervišu CRH ćelije u PVN, suprimirajući oslobađanje CRH čime dovodi do završetka odgovora na stresor (Slika 10).



**Slika 10.** Endokannabinoidna signalizacija nakon izlaganja stresorima (Spohrs, 2020). CRH- kortikotropni oslobađajući hormon; FAAH- hidrolaza masno kiselinskih amida; AEA- anandamid; 2-AG - 2 arahidonil glicerol.

Promena količine 2-AG se dešava znatno sporije u odnosu na AEA. Akutno i hronično izlaganje miševa stresu ograničenog kretanja povećava nivo 2-AG u mPFC, hipokampusu i hipotalamusu (Morena i sar., 2016). Sumislawski i sar. (2011) su pokazali da hronično izlaganje stresorima dovodi do smanjenja ekspresije MAGL u bademastim jedrima, ukazujući da smanjena hidroliza doprinosi povećanju količine 2-AG u uslovima ponavljano izlaganja stresorima istog tipa.

### ***1.5.6. Polne razlike u funkcionisanju endokanabinoidnog sistema***

Literaturni podaci ukazuju da postoje polne razlike u odgovoru na egzogene kanabinoide (Fattore i Fratta, 2010). Egzogeni kanabinoide kod muškaraca povećavaju apetit i smanjuju libido, dok kod žena povećavaju libido i imaju analgetsko dejstvo. Studije na glodarima takođe su pokazale da su ženke osetljivije od mužjaka na anksiogene, hipotermičke, antinociceptivne i sedativne efekte kanabinoide, kao i na negativan uticaj kanabinoide na prostornu memoriju (Tseng i Craft 2001; Romero i sar., 2002; Cha i sar., 2007; Fattore i sar., 2007; Harte i Dow-Edwards 2010; Craft i sar., 2012). Ove polne razlike u efektima egzogenih kanabinoide kod odraslih jedinki su pod uticajem polnih hormona, naročito estradiola. Pokazano je da nivo endokanabinoide kod ženki miševa fluktuiraju u toku estrusnog ciklusa. Promene u nivou endokanabinoide kod ženki pacova se dešavaju predominantno u periodu oko ovulacije. U toku estrusne faze kod ženki je izmeren viši nivo 2-AG u hipotalamusu, srednjem mozgu i hipofizi, dok je u talamusu i hipokampusu smanjen (Bradshaw i sar., 2006). Takođe su ustanovljene polne razlike koje se odnose na distribuciju CB1 receptora, bazalnu aktivnost ECs, brzinu desenzitizacije receptora i razlike u signalnoj transdukciji CB1 u hipokampusu (López - Gallardo i sar., 2012; Viveros i sar., 2012; Tabatadze i sar., 2015). Značajno je veća ekspresija CB1 u frontalnom korteksu i hipokampusu odraslih ženki pacova u odnosu na mužjake, dok je ekspresija ovih receptora u bademastim jedrima i strijatumu slična (Marco i sar., 2014; Xing i sar., 2014). S druge strane, ekspresija CB1 je veća u ostalim regionima mozga mužjaka u odnosu na ženke, ali ovi receptori kod odraslih ženki bolje odgovaraju na agoniste (Llorente-Berzal i sar., 2011; Castelli i sar., 2014). Takođe su ustanovljene polne razlike u odgovoru mužjaka i ženki pacova na endokanabinoidnu signalizaciju u mozgu nakon intenzivnog stresa (Zer-Aviv i Akirav, 2016). Pokazano je da URB597, inhibicijom aktivnosti FAAH i povećanjem dostupnosti AEA normalizuje povećan nivo CB1 receptora izazvan stresom u bademastim jedrima, prefrontalnoj kori (PFC) i hipokampusu mužjaka, dok je kod stresiranih ženki normalizovao povećan nivo CB1 u bademastim jedrima i PFC, ali ne i hipokampusu. CB1 receptor pod dejstvom liganda podleže brzom internalizaciji (endozomskoj reciklaži), tako da povećanjem nivoa liganda URB597 indirektno utiče na količinu receptora (Hsieh i sar., 1999).

Za razliku od postojanja velikog broja podataka o uticaju endokanabinoide na centralni nervni sistem, nema naučnih podataka o eventualnom postojanju polnih razlika u efektu endokanabinoide na kardiovaskularni i imunski sistem.

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Tokom odgovora na stresore, aktiviraju se HPA, SNS i SAM, koji dovode do lučenja neuroendokrinih medijatora stresa, neophodnih za preživljavanje i reuspostavljanje homeostaze. Međutim, dugotrajno izlaganje stresorima dovodi do toga da neuroendokrini medijatori stresa ispoljavaju štetno dejstvo na fiziološke sisteme, između ostalog i na kardiovaskularni i imunski sistem, a uzrokuju i razvoj depresije. Reakcije na stres su polno specifične, pa se u humanoj populaciji poremećaji u ponašanju, kao što su depresija i anksioznost, češće javljaju kod žena nego kod muškaraca. Endokanabinoidni sistem se takođe aktivira tokom odgovora na stresor i ostvaruje polno specifično protektivno dejstvo.

Imajući u vidu napred navedeno, postavljen je glavni cilj ove doktorske disertacije da se ispita uticaj endokanabinoide na regulaciju sinteze, preuzimanja, transporta, degradacije i količinu kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda, organima primarne sinteze kateholamina, kao i u slezini i srcu hronično stresiranih eksperimentalnih životinja oba pola. Uticaj endokanabinoide ispitivan je primenom URB597 - selektivnog inhibitora enzima koji razgrađuje endokanabinoide, čime se povećava njihova dostupnost.

Specifični ciljevi bili su da se kod pacova oba pola izlaganih hroničnim nepredvidivim stresorima ispita dejstvo URB597 na:

- ponašanje pacova;
- koncentraciju kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda, slezini i srcu;
- količinu biosintetskih enzima kateholamina: tirozin hidroksilaze (TH), dopamin beta hidroksilaze (DBH) i feniletanolamin-N-metiltransferaze (PNMT); noradrenalinskog transportera (NET) koji učestvuje u ponovnom preuzimanju oslobođenih kateholamina, kao i enzima koji razgrađuju kateholamine, monoamin-oksidade A (MAO-A) i katehol-O-metil transferaze (COMT), u nadbubrežnim žlezdama, slezini i srcu;
- koncentraciju proinflatarnog interleukina-6 i antiinflatarnog interleukina-10 u plazmi, slezini i srcu;
- JAK/STAT signalni put u srcu;
- histološke promene na srcu, odnosno na veličinu kardiomiocita.

## 3 MATERIJAL I METODE

### 3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni mužjaci i ženke Wistar soja, starosti 11 nedelja, telesne mase između 250 i 300 g. Sve životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u standardnim laboratorijskim uslovima (konstantna ambijentalna temperatura od  $21 \pm 1$  °C, vlažnost vazduha od  $42 \pm 5\%$ , svetlosni režim 12h svetlost/ 12h mrak). U polikarbonatnim kavezima (dužina 37 cm, širina 21 cm i visina 13 cm) sa žičanom rešetkom i podlogom od drvene strugotine bile su smeštane po tri ili četiri životinje koje su imale slobodan pristup vodi i hrani.

Sve eksperimentalne procedure na životinjama odobrio je Etički komitet za rad sa laboratorijskim životinjama Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, kao i Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije, Uprava za veterinu (rešenja br. 323-07-04254/2016-05 i 323-07-03311/2017-05). U radu sa eksperimentalnim životinjama se vodilo računa da se maksimalno smanji bol i nelagodnost jedinki, u skladu sa preporukama Direktive Evropske komisije 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe.

### 3.2. Eksperimentalni protokol i protokol tretmana

Tokom eksperimenta životinje oba pola su bile podeljene u dve grupe: nestresirane kontrole i životinje izlagane hroničnom nepredvidivom stresu u trajanju od 6 nedelja. Mužjaci i ženke pacova, bili su smešteni u različitim prostorijama u vivarijumu, u strogo kontrolisanim uslovima bez bilo kakvog kontakta tokom celog eksperimentalnog rada. Poslednjeg dana protokola u periodu od 09 do 14 h životinje su podvrgavane testovima ponašanja – testu otvorenog polja i testu zainteresovanosti za zaslađen rastvor. Sutradan, 24h nakon izlaganja testu ponašanja, životinje su žrtvovane brzom dekapitacijom uz pomoć giljotine (Harvard Apparatus, Holliston, SAD) i iz njih su disekcijom izolovane slezina, nadbubrežne žlezde i srce, nakon čega je izmerena njihova masa. Masa organa je merena na analitičkoj vagi ( $\pm 0.0001$  g), gde je dalje prikazana kao relativna masa prema formuli: [apsolutna masa organa (mg) / masa tela (kg)] x100 %. Za zamrzavanje tkiva je najpre korišćen tečni azot, a kasnije su tkiva prebacivana i čuvana na temperaturi od -80 °C.

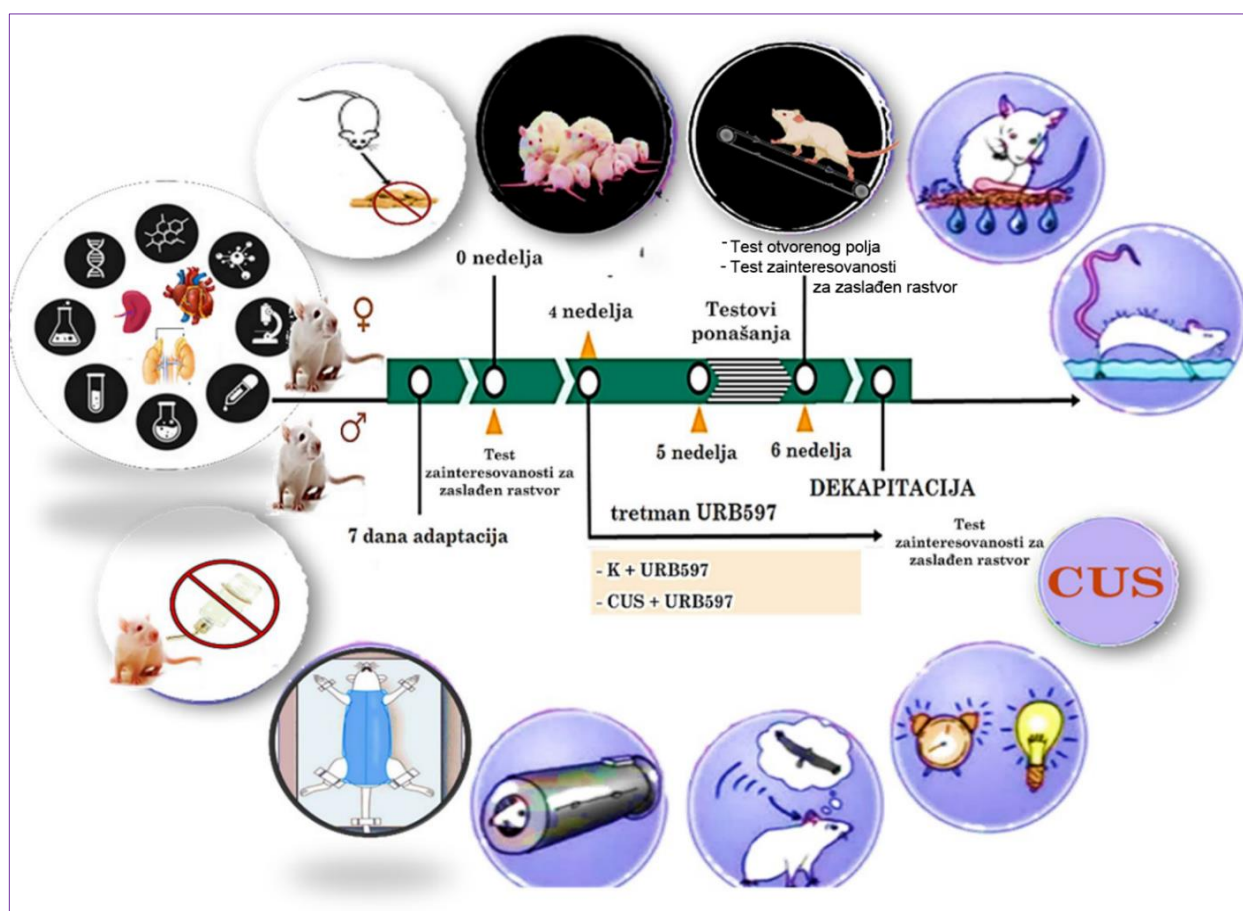
Dizajn eksperimenta je podrazumevao podelu grupe kontrolnih pacova oba pola i grupe pacova izloženih hroničnom nepredvidivom stresu oba pola na četiri podgrupe, u zavisnosti od pola i tretmana koji su primale.

- **K** (kontrolne podgrupe mužjaka i ženki, tretiranih rastvaračem)
- **CUS** (podgrupe stresiranih mužjaka i ženki, tretiranih rastvaračem)
- **K + URB597** (kontrolne podgrupe mužjaka i ženki, tretiranih URB597)
- **CUS + URB597** (podgrupe stresiranih mužjaka i ženki, tretiranih URB597)

Telesna masa životinja je merena jednom nedeljno da bi se pratio stepen telesne uhranjenosti životinja. Faza estrusnog ciklusa je praćena uzimanjem i ispitivanjem vaginalnih briseva u više navrata. Kako bi se izbegao uticaj polnih hormona na dobijene rezultate, ženke pacova su u vreme testova ponašanja i žrtvovanja bile u fazi niske koncentracije estrogena u diestrusu i metestrusnoj fazi ciklusa.

### 3.3. Hronični nepredvidivi stres

Hronično izlaganje nepredvidivim stresorima podrazumeva da se životinje svakog dana izlažu drugom obliku stresa, kako bi se izbegla habituacija i održao aspekt nepredvidivosti. U toku 42 dana eksperimenta, mužjaci i ženke bili su izlagani sledećim stresorima nasumičnim redosledom: *vežbanje* - prinudno trčanje na traci pri konstantnoj brzini, u trajanju od 15 min; *boravak u kavezu nagnutom pod uglom od 45°* (4–6 h) u odnosu na vertikalnu osu; *boravak u mokrom kavezu* u trajanju od 5 sati (500 ml vode sobne temperature posute po prostirci); *stres hladnoće* – izlaganje niskoj ambijentalnoj temperaturi od 4 °C, u trajanju od 5 sati; *oduzimanje hrane* u trajanju od 18 sati sa dostupnom vodom; *oduzimanje vode*, uz dostupnu hranu u trajanju od 5 sati; *agregacija* – boravak 8 životinja u kavezu, u trajanju od 5 sati sa dostupnom hranom i vodom; *imobilizacija* ili *stres ograničenog kretanja*, oba u trajanju od po 1h; *buka (stres vrištanja)*, u trajanju od 60 min; *promena režima osvetljenja* (zamena osvetljenog i mračnog perioda dana).



Slika 11. Šematski dijagram eksperimentalnog dizajna ove studije.

### 3.4. Tretman URB597

Tretman URB597 i rastvaračem započinjan je četiri nedelje nakon početka izlaganja životinja hroničnom nepredvidivom stresu i trajao je 14 dana. URB597 (cikloheksilkarbaminska kiselina 3'-karbamoilbifenil-3-il-estar; cat. no. A4372, APExBIO, USA) poznat i kao KDS-4103, apliciran je u dozi od 0,3 mg/kg telesne mase, intraperitonealno. URB597 je rastvaran neposredno pred aplikaciju. Rastvarač je mešavina dimetil sulfoksida (DMSO, Carlo Erba reagents, Spain), Tween80 (Acros Organics, USA) i fiziološkog rastvora (0,9 % NaCl) u odnosu 1:1:18. Ova mešavina je korišćena za

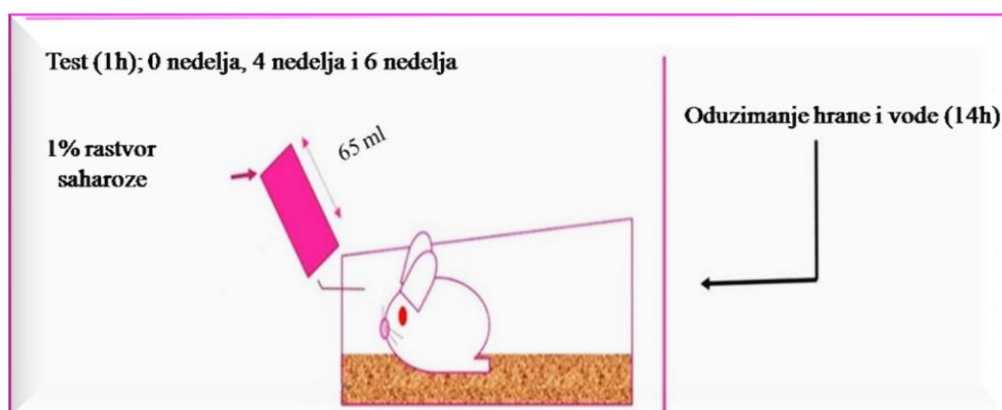
tretman kontrolnih životinja. Uzimajući u obzir povećanje telesne mase, životinje su merene svake nedelje i doza URB597 je prilagođavana njihovoj telesnoj masi. Efektivni poluživot URB597 je kratak, tako da se pun terapijski efekat dobija kada se primenjuje u dve doze dnevno (Toczek i sar., 2016; Polak i sar., 2018).

### 3.5. Testovi ponašanja

Životinje su tokom eksperimenta izlagane testovima merenja parametara ponašanja, kako bi se utvrdilo da li su i kako CUS i terapija URB597 izazvali promene u ponašanju. Test otvorenog polja korišćen je kako bi se analizirale promene, kako u lokomotornom i istraživačkom ponašanju, tako i u ponašanju sličnom anksioznom. S druge strane, test zainteresovanosti za zaslađen rastvor je korišćen kako bi se ustanovilo prisustvo anhedonije, komponente ponašanja sličnog depresiji.

#### 3.5.1. Test zainteresovanosti za zaslađeni rastvor

Test zainteresovanosti za zaslađeni rastvor služi za procenjivanje prisustva anhedonije karakteristične za depresiju. Pacovima se nakon višečasovnog oduzimanja hrane i vode nudi samo zaslađen 1% rastvor saharoze (LACHEMA, a.s., NERATOVICE CZECH REPUBLIC). Tokom testiranja, u svakom kavezu se nalazila po jedna životinja. Flašica sa rastvorom saharoze merena je neposredno pre postavljanja na kavez. Nakon 1h, boce su sklanjane i ponovo merene.



**Slika 12.** Šematski prikaz testa zainteresovanosti za zaslađen rastvor.

Količina popijene tečnosti je računata kao razlika u masi flašica (g) pre i nakon testiranja. Zainteresovanost za zaslađeni rastvor računata je po sledećoj formuli:

$$\text{Zainteresovanost za zaslađeni rastvor} = \frac{\text{popijena količina saharoze (g)}}{\text{telesna masa životinje (kg)}/1\text{h}}$$

#### 3.5.2. Test otvorenog polja

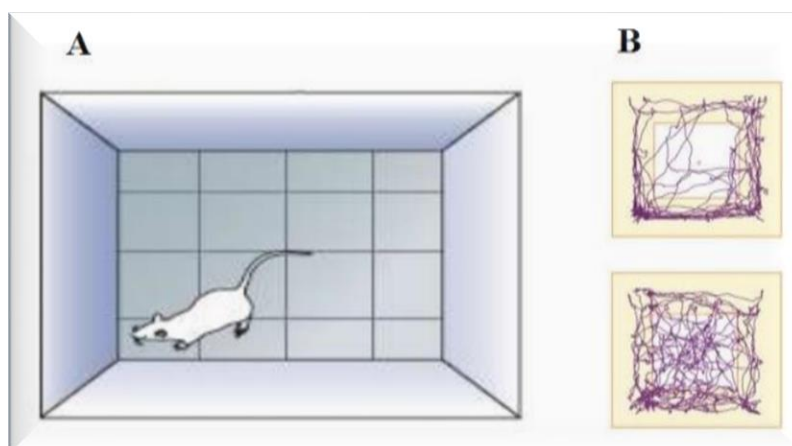
Poslednjeg dana eksperimentalne procedure tretmana, životinje su podvrgavane testu otvorenog polja. Test otvorenog polja se odvijao u areni kvadratnog oblika dimenzija 100 cm (dužina) × 100 cm (širina) × 40 cm (visina zida arene) čiji je pod podeljen na 16 jednakih kvadrata dimenzija 25×25 cm radi lakše kvantifikacije lokomotorne aktivnosti. Testiranje se odvijalo u zvučno izolovanoj sobi sa

kontrolisanom temperaturom i osvetljenjem, uz sistem za video nadzor (video camcorder: 1/3 in. SSAM H EX VIEW HAD koji je povezan na kompjuter sa sistemom za praćenje: TiBeSplit). Radi prilagođavanja, pre testiranja životinje su unošene u sobu za testiranje 60 minuta pre početka testa. Trajanje testa je iznosilo 5 minuta.

Za procenu ponašanja nalik anksioznom se analiziraju dva parametra u centru arene - ukupan broj prelaza kroz centar arene i vreme provedeno unutar centralnog područja (s) (Prut i Belzung, 2003). Pacovi koji ispoljavaju ponašanje nalik anksioznom će izbegavati centralna polja i kretati se pored zidova. Ovo ponašanje je poznato još i kao tigmotaksija.

Međutim, za procenu anksioznosti se koriste i merenja lokomotornih i istraživačkih aktivnosti. Ukupan broj pređenih kvadrata se smanjuje, a ukupno vreme provedeno u mirovanju (s) povećava sa povećanjem anksioznosti ispitivane životinje. Istraživačka aktivnost, utvrđivana brojem izdizanja na zadnje ekstremitete, se, takođe, smanjuje jer životinje koje ispoljavaju ponašanje nalik anksioznom zauzimaju prirodno odbrambeni stav - sva četiri ekstremiteta na podu, u slučaju potrebe za beg od potencijalnih opasnosti (Hall, 1934; Prut i Belzung, 2003). Izdizanje na zadnje ekstremitete se sastoji od dve komponente: propinjanja uz zidove arene i propinjanje u vazduhu. Kod glodara čišćenje (timarenje) ima važnu ulogu u prilagođavanju ponašanja usled izlaganja stresorima (Spruijt i sar., 1992) i može se klasifikovati kao kratkotrajno (dva do tri pokreta prednjih ekstremiteta u blizini glave) ili dugotrajno (više pokreta, u kombinaciji sa čišćenjem drugih delova tela). Smanjeno vreme koje pacovi provode u timarenju, ukazuje na ponašanje nalik depresivnom.

Arena je čišćena 10% rastvorom etanola nakon svakog pojedinačnog testiranja, da bi se uklonili mirisi i tragovi životinje, koji bi uticali na ponašanje sledeće jedinke.



**Slika 13.** A) Standardna aparatura za sprovođenje testa otvorenog polja. B) ukupan pređeni put eksperimentalne životinje.

### 3.6. Histološka analiza srca

Odmah po dekapitaciji, izolovano je srce. Za histološke analize uzimana su po tri srca iz svake grupe životinja. Srca su stavljana u 10% pufervisani neutralni formalin koji je služio kao fiksator i takva su dalje išla na obradu za parafinske preseke. Histološki preparati leve komore srca dobijeni su serijskim sečenjem preseka debljine 5  $\mu\text{m}$  na kriokatu Microtome (Leica RM2135, Houston, Texas). Isečci su deparafinizirani i rehidrirani destilovanom vodom, i zatim bojani hematoksilin i eozin (H&E) bojenjem - osnovnom histološkom metodom kojom se jedra ćelija boje ljubičasto, a citoplazma ružičasto. Isečci obojeni ovom tehnikom su korišćeni za merenje poprečnog preseka kardiomiocita u nivou jedra. Promene u nivou kolagena u zidovima srčanog mišića praćene su na presecima bojenim Masson's trichome staining (Massonov kiseli fuksin, Massonovo anilinsko plavo,

Massonovo svetlo zeleno). Rezultat je crno obojeno jedro, crveno obojena citoplazma i elementi u njoj i mišićna vlakna, narandžasta crvena krvna zrnca, a zelena ili plava kolagena vlakna.

Reprezentativne fotografije preseka su dobijene uz pomoć BX4 mikroskopa sa C50-60 ADU kamerom (Olympus, Japan), uz upotrebu kompjuterskog softvera za obradu slike softverskog sistema Olympus DPsoft 5.0.

### **3.7. Metoda određivanja koncentracije kateholamina u plazmi i tkivu**

Krv je sakupljena nakon dekapitacije u hladne polietilenske epruvete sa EDTA kao koagulatorom i odmah je centrifugirana na 9000 rpm, 5 minuta na +4 °C da bi se odvojila plazma. Tkiva (srž nadbubrežne žlezde, slezina i leva srčana komora) su nakon izolacije homogenizovana u 0,01N HCl puferu, sa 1mM EDTA i 4 mM natrijum metabisulfitom u odnosu 1:100. Homogenat je zatim centrifugiran 15 min na 10 000 rpm prema preporuci dobavljača. Uzorci plazme i homogenata su čuvani na -20 °C do analize. Za određivanje nivoa dopamina, noradrenalina i adrenalina u uzorcima korišćen je komercijalno dostupan LDN - 3 - CAT Research ELISA kit (Catalog No: BAE -5600, Labor Diagnostic Nord GmbH & Co., Germany). Imunoeseji su pripremani prema instrukciji dobavljača. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 450 nm i referentnoj talasnoj dužini od 650 nm, korišćenjem spektrofotometra (Wallac, multilabel counter VICTOR2 1420, Perkin Elmer, Turku, Finland). Dobijene vrednosti su predstavljene kao pg kateholamina po ml plazme (pg/ml), odnosno mg kateholamina po g tkiva (mg/g).

### **3.8. Metoda određivanja koncentracije proinflamatornog IL-6 i antiinflamatornog IL-10 citokina u plazmi, slezini i srcu**

Za merenje koncentracije proinflamatornog IL-6 i antiinflamatornog IL-10 u plazmi, srcu i slezini kontrolnih životinja koje nisu izlagane stresorima i hronično stresiranih pacova oba pola, primenjivan je ELISA test. Za ovaj postupak korišćeni su komercijalno dostupni ELISA kitovi specifični za određenu vrstu interleukina (Rat IL-10 (interleukin 10), Catalog no. E-EL-R0016, Elabscience, USA; rat IL-6 (interleukin 6), Catalog no. E-EL-R0015, Elabscience, USA). Prema preporuci proizvođača, tkivo slezine i leve komore je homogenizovano u PBS puferu u odnosu 1:9 (masa tkiva (g): zapremina pufera (ml)). Vrednosti su izražene kao pg interleukina po ml plazme ili homogenizovanog tkiva (pg/ml).

### **3.9. Western blot**

#### **3.9.1. Izolacija ukupnih proteina**

Tkiva su homogenizovana u komercijalnom RIPA puferu (RIPA Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dalas, Teksas, SAD, sc-24948) pomoću homogenizera D-160 (Cat. No 8014110000, brzina 8000-30000 r/min). RIPA pufer se sastoji od 4 komponente:

1. pufer za liziranje (pH 7.4 ±0.1)
2. 200mM fenilmetil sulfonil (PMSF) u DMSO
3. koktel proteaznih inhibitora u DMSO
4. 100mM natrijum ortovanadat u vodi



Prilikom izolacije proteina korišćeno je 3 mL RIPA pufera po gramu tkiva. Nakon homogenizacije, uzorci su ostavljani na liziranje na +4 °C tokom 1h, a zatim su centrifugirani 20 minuta na 12000 obrtaja u minutu. Supernatant je odlivan u prohlađene epruvete. Tako pripremljeni uzorci su ostavljani na -20 °C.

### 3.9.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom po Loriju (Lowry i sar., 1951). Očekivana koncentracija proteina u uzorku bila je u opsegu od 1 mg/mL do 10 mg/mL. Standard za određivanje koncentracije proteina je goveđi serum albumin (*engl.* Bovine Serum Albumin - BSA) u koncentracijama od 0,2–10 mg/mL.

Za svaki uzorak (BSA STANDARD/UZORAK) su urađena merenja u duplikatu. Prvo je rastvarano 5 µL uzorka u 495 µL ddH<sub>2</sub>O (100 puta razblaženje). Od toga je uzimano 25 µL i rastvarano u 75 µL ddH<sub>2</sub>O (4 puta razblaženje, ukupno razblaženje 400 puta). Uporedo su napravljena razblaženja sa albuminom iz goveđeg seruma (5 mg BSA u 5 mL ddH<sub>2</sub>O) za standardnu krivu, u volumenu od 100 µL. Slepna proba (blank) je sadržala 100 µL ddH<sub>2</sub>O. U slepu probu, BSA i uzorke dodavano je 100 µL 2% natrijum duodecil sulfata (SDS). Zatim je dodavano po 1 mL radnog rastvora koji se sastojao od 5% CuSO<sub>4</sub>, K, Na – tartarata i Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + NaOH.

Smeša je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodavano 100 µL Folin - Ciocalteu reagensa (Sigma-Aldrich, Nemačka) i ddH<sub>2</sub>O (1,5 mL folina u 3 mL ddH<sub>2</sub>O) i ostavljano da stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku do razvijanja boje. U svim međufazama slepa proba, BSA i uzorak su vorteksovani. Nakon toga, uzorcima je očitavana apsorbancija na talasnoj dužini od 750 nm na spektrofotometru S-30 (Boeco, Nemačka).

### 3.9.3. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Koncentracije proteina u uzorcima su razblaživane na 3 mg/mL sa ddH<sub>2</sub>O. Neposredno pred upotrebu uzorci su mešani sa denaturišućim puferom (SLB - *engl.* Lemli Sample Buffer) i β-merkaptioetanolom u odnosu 1:1, tako da su finalne koncentracije u uzorcima bile 1,5 mg/mL. Posle kuvanja na 100 °C, u trajanju od 5 minuta, uzorci su hlađeni i nanošeni na SDS-poliakrilamid gel.

Proteini su razdvajani po molekulskim masama SDS-PAGE elektroforezom (Laemmly, 1970). Elektroforeza je rađena na sistemu Mini Protean II (Bio Rad, Kalifornija, SAD). Princip ove metode zasniva se na korišćenju anjonskog deterdženta SDS koji denaturiše proteine obmotavajući se oko njihovih polipeptidnih veza. Negativno naelektrisan SDS uslovljava međusobno odbijanje, što dovodi do razdvajanja proteinskih lanaca. Proteini u električnom polju putuju prema pozitivno naelektrisanom polu brzinom koja zavisi isključivo od njihove molekulske mase. Struktura poliakrilamidnog gela pruža otpor kretanju proteina pri čemu se proteini manje molekulske mase kreću brže od proteina veće molekulske mase. Poliakrilamidni gel sastoji se od gela za razdvajanje i gela za sabijanje u kome se proteini prvo koncentrišu pre nego što pređu u gel za razdvajanje. Korišćen je 12% gel za razdvajanje (pH 8,8) i 4% gel za sabijanje (pH 6,8).

Na gel je nanošeno po 30 µL pripremljenih uzoraka (~ 45 µg ukupnih proteina). Elektroforeza je trajala oko 90 minuta pri konstantnom naponu od 100 V na sobnoj temperaturi i odvijala se u puferu za elektroforezu koji je sadržao 0,25 M TRIS, 0,192 M glicin, 0,1% SDS i ddH<sub>2</sub>O. Na svaki gel nanošeni su i proteini poznatih molekulskih masa (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD), odnosno 9 proteina različitih molekulskih masa (10–170kDa), radi lokalizovanja ispitivanih proteina po završetku elektroforeze. Nanošen je i standardni uzorak (SLB i ddH<sub>2</sub>O) radi anuliranja greške u proceduri.

### **3.9.4. Transfer proteina sa gela na membranu**

Nakon završene elektroforeze vršen je transfer proteina sa gela na PVDF (polivinilidenfluorid) membrane pomoću aparata Trans-Blott Cell sistemu (Bio Rad, Kalifornija, SAD). Membrane su rezane na nešto veće dimenzije od gela i aktivirane potapanjem u 100% metanolu u trajanju od 15 sekundi, a zatim ispirane destilovanom vodom 2 minuta i potapane u pufer za transfer. Membrane i gelovi potapani su u pufer za transfer (20% metanol, 0,192 M glicin, i 0,025 M Tris pH 8,3). Formirani su sendviči koji su se sastojali od jednog papira Whatman GB003 (Whatman Inc, Velika Britanija), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i još jednog papira. Ovako napravljen sendvič postavljan je u ram aparata za transfer i potapan u pufer za transfer. Prenos proteina sa gela na PVDF membranu odvijan je pri konstantnoj amperaži od 20mA po gelu, na +4 °C, preko noći.

### **3.9.5. Imunodetekcija proteina**

Bojenjem sa 1% Ponceau S bojom rastvorenom u 5% sirćetnoj kiselini proveravana je uspešnost transfera proteina sa gela na membranu. Ponceau S uklanjana je ispiranjem vodom. Potom su PVDF membrane inkubirane 1h u puferu za blokiranje, 5% nemasnom mleku u prahu rastvorenom u TBST puferu (50 mM TRIS HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween-20), na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon toga tretirana membrana je sečena na određenim molekulskim masama i inkubirana preko noći na +4 °C sa odgovarajućim primarnim antitelima. Po završetku inkubacije sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 3 x po 10 minuta TBST puferom na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon ispiranja, membrane su ponovo inkubirane 1 sat sa sekundarnim antitelom na sobnoj temperaturi uz stalno i blago mućkanje na mešalici (DLAB-SK-R807-E, Cat. No. 8032311200, Rumunija). Nakon inkubacije, membrane su opet ispirane 3 x po 10 minuta u TBST puferu i nanošen je Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Fisher Scientific, Masačusets, SAD). Detekcija je vršena u mračnoj sobi pomoću lampe Darkroom Safe Light (Paterson Photographic Ltd., Velika Britanija). Membrana je postavljana između dve providne folije u kaseti za detekciju Hypercassette (Amersham Life Science, SAD), a preko membrane je stavljan film Ortho CPU (Agfa, Belgija). Intenzitet signala na filmovima, koji predstavljaju koncentraciju određenog proteina, određivani su denzitometrijski. Filmovi su skenirani pomoću Lexmark x 2650 a intenzitet signala je kvantifikovan pomoću programa Image J 2.0. Dobijene vrednosti su izražene u odnosu na  $\beta$ -aktin sa istog blota.

Za Western blot sve vrednosti su izražene u odnosu na optičku gustinu trake koja odgovara  $\beta$ -aktinu sa istog blota, a rezultati su potom predstavljeni kao procenat odgovarajuće kontrole.

**Tabela br. 1.** Karakteristike i razblaženja primarnih i sekundarnih antitela korišćenih u Western blot analizi.

Antitelo	Proizvođač	Kat.Br	Razblaženje
TH	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc374048	1: 1000
DBH	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc-47707	1:250
PNMT	Abcam, United Kingdom	Catalog No. ab90862	1: 10 000
DAT	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc-32258	1: 1000
NET	Abcam, United Kingdom	Catalog No. ab41559	1: 2000
COMT	Abcam, United Kingdom	Catalog No. ab 126618	1: 5000
MAO-A	Abcam, United Kingdom	Catalog No. ab126751	1: 2000
$\beta$ -aktin	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc-47778	1:5000
JAK	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc-390589	1:1000
p-pJAK	Sigma – Aldrich, USA	Catalog No. sab 450447-100UG	1:1000
STAT	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc-8019,	1:1000
p-pSTAT	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc-56747	1:1000
Sekundarno mišje poliklonalno antitelo	Santa Cruz Biotechnology, USA	Catalog No. sc2005	1:5000
Sekundarno zečje poliklonalno antitelo	Abcam, United Kingdom	Catalog No. ab6721	1:10 000

### 3.10. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati su obrađeni primenom odgovarajućih statističkih testova i izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SEM). Rezultati eksperimenta su statistički analizirani korišćenjem analize varijansi sa dva faktora (dvofaktorska ANOVA) [faktori: tretman (rastvarač, selektivni inhibitor URB597), stresor (životinje koje nisu izlagane stresorima i životinje izlagane hroničnim nepredvidivim stresorima)] i tri faktora) [faktori: tretman (rastvarač, selektivni inhibitor URB597), stresor (životinje koje nisu izlagane stresorima i životinje izlagane hroničnim nepredvidivim stresorima); pol (mužjaci i ženke)] sa ciljem da se utvrdi da li postoje statistički značajne razlike efekata ispitivanih faktora između različitih eksperimentalnih grupa. Tukey Post-hoc analizom je dalje utvrđivana statistička značajnost između grupa koje su se poredile. Za granične vrednosti značajnosti uzimane su vrednosti  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ .

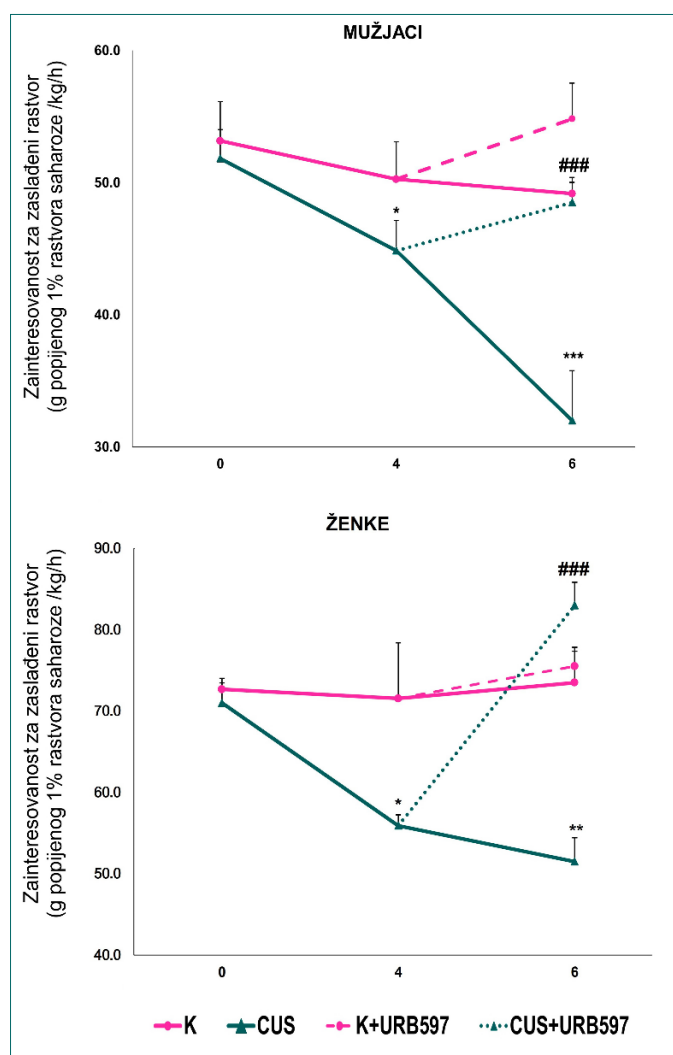
Obrada rezultata je urađena u softverskom programu OriginPro, verzija 8.0 (OriginLab Corporation, Masačusets, SAD), STATISTICA Release 7 i GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego). ImageJ program je korišćen za denzitometriju proteinskih traka sa radiografskog filma.

## 4 REZULTATI

### 4.1. Uticaj stresa i endokannabinoida na ponašanje pacova

#### 4.1.1. Test zainteresovanosti za zaslađen rastvor

Merenje unosa količine 1% zaslađenog rastvora je korišćeno za ispitivanje anhedonije, jednog od simptoma ponašanja nalik depresivnom, kod hronično stresiranih životinja, ali i za proveru antidepresivnog potencijala URB597. Smanjena zainteresovanost za uzimanjem zaslađenog rastvora se koristi kao parametar mere prisustva anhedonije. Svi pacovi su testirani pre početka izlaganja CUS (nulta nedelja), pre početka tretmana sa URB597 (4. nedelja) i na kraju tretmana (6. nedelja) što predstavlja završetak eksperimenta.



**Slika 14.** Efekat tretmana URB597 na zainteresovanost za zaslađen rastvor kod pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=10). Statistička značajnost: \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,001 kontrole vs. CUS; ###p<0,001 URB597 vs. rastvarač

Dvofaktorskim ANOVA testom pokazani su statistički značajni efekti stresa i tretmana (četvrta nedelja  $F_{(1,39)} = 9,62$ ,  $p < 0,05$ ; šesta nedelja  $F_{(1,39)} = 6,15$ ,  $p < 0,01$ ) kod pacova oba pola. Rezultati prikazani na Slici 14. pokazuju da su ženke koje nisu izlagane hroničnom stresu, inicijalno pile veću količinu zaslađenog rastvora za 37% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na nestresirane mužjake. Rezultati *post-hoc* testa su pokazali da izlaganje životinja CUS u trajanju od četiri nedelje je uticalo na smanjenje

zainteresovanosti za zaslađeni rastvor kod pacova oba pola (mužjaci: 16%,  $p < 0,05$ ; ženke: 22%,  $p < 0,05$ ) i ovaj trend je nastavljan do kraja eksperimentalne procedure. Nakon 6 nedelja hroničnog stresa, životinje oba pola pokazale su dodatnu nezainteresovanost za zaslađenim rastvorom (mužjaci: 35%,  $p < 0,001$ ; ženke: 29%,  $p < 0,01$ ) u odnosu na nestresirane jedinke. Tretman URB597 je uticao na povećanje zainteresovanosti za zaslađeni rastvor kod stresiranih životinja oba pola (Tukey test CUS vs CUS+URB597,  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.2. Test otvorenog polja

Rezultati prikazani na Slici 15 pokazuju efekat tretmana URB597 na lokomotornu aktivnost, istraživačko ponašanje i znake anksioznosti u testu otvorenog polja kod pacova oba pola, kako kontrolnih tako i životinja izlaganih CUS.

Ovim testom je praćen efekat tretmana URB597 na procenu ispoljavanja ponašanja nalik anksioznom (produžen period vremena proveden u mirovanju i smanjeno propinjanje na zadnje ekstremitete, izbegavanje centralnih polja i kretanje pored zidova arene) kao i procenu ponašanja nalik depresivnom (skraćeni period vremena proveden u timarenju).

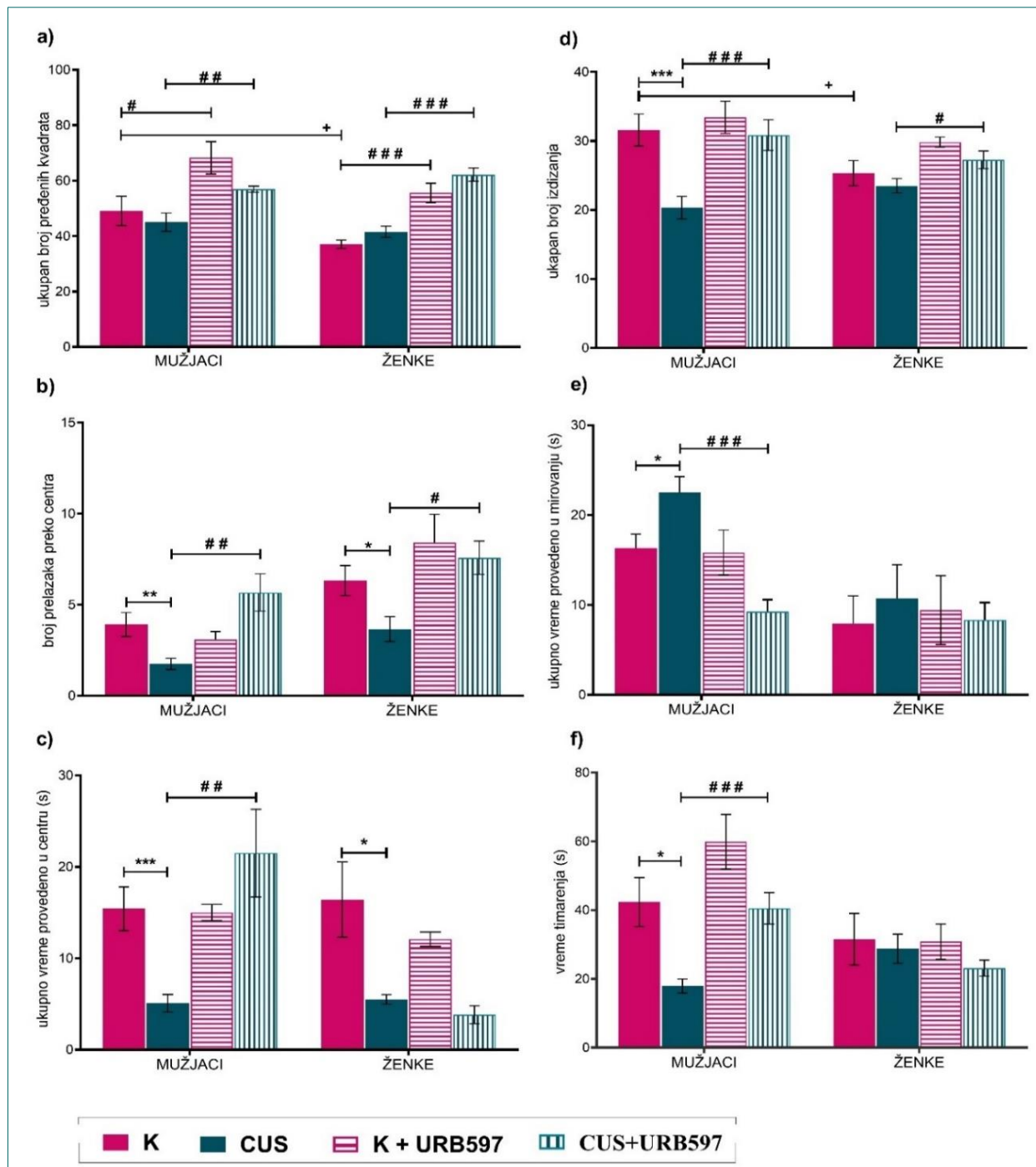
Kontrolne ženke su prešle značajno manji broj kvadrata tokom trajanja testa i manji broj puta su se uzdizale na zadnje noge u odnosu na kontrolne mužjake (Slika 15a i 15d;  $p < 0,05$ ). Izlaganje hroničnom stresu je samo kod mužjaka statistički značajno uticalo na smanjenje lokomotorne i istraživačke aktivnosti u testu otvorenog polja, budući da su 38% (Slika 15e;  $p < 0,05$ ) više vremena provodili u mirovanju i 30% (Slika 15d;  $p < 0,001$ ) su se manje uzdizali na zadnje ekstremitete u odnosu na životinje koje nisu izlagane CUS (Slika 15). Broj ulazaka u centar arene (Slika 15b; ženke: za 42%,  $p < 0,05$ ; mužjaci: za 55%,  $p < 0,01$ ) i vreme provedeno u centru (Slika 15c; ženke: za 42%,  $p < 0,05$ ; mužjaci: za 67%,  $p < 0,001$ ) je bilo smanjeno kod stresiranih jedinki oba pola. Stresirani mužjaci su 58% manje vremena proveli u timarenju (Slika 15f;  $p < 0,05$ ) u odnosu na ženke, što ukazuje da izlaganje stresorima više utiče na mužjake da ispolje anksiozno ponašanje i ponašanje nalik depresivnom.

Poznato je da anksiolitici produžavaju vreme koje životinje provode u potencijalno opasnom prostoru, povećavaju lokomotornu aktivnost, kao i učestalost izdizanja na zadnje ekstremitete. Rezultati prikazani na slici 15 pokazuju statistički značajan uticaj tretmana URB597 na lokomotornu aktivnost. Analiza trofaktorskog ANOVA testa ukazuje na statistički značajan uticaj tretmana URB597 na ukupan broj pređenih kvadrata ( $F_{(1,88)} = 49,99$ ,  $p < 0,001$ ), kao i interakciju tretmana inhibitorom URB597 i pola na vremenski interval koje životinje provode u mirovanju ( $F_{(1,88)} = 13,64$ ,  $p < 0,001$ ). *Post hoc* analizom je utvrđeno da je tretman povećao broj kvadrata koje su prešle jedinke oba pola, kako hronično stresirane (Slika 15a; mužjaci za 26%,  $p < 0,01$ ; ženke za 49%,  $p < 0,001$ ), tako i kontrole (Slika 15a; mužjaci za 39%,  $p < 0,05$ ; ženke za 50%,  $p < 0,001$ ). Pored toga što je tretman povećao ukupan broj pređenih kvadrata, URB597 je samo kod stresiranih mužjaka skratio vreme provedeno u mirovanju za 59%, (Slika 15e;  $p < 0,001$ ) tokom testa što ukazuje na njegov anksiolitički efekat (Slika 15e).

Tretman FAAH inhibitorom je značajno povećao istraživačku aktivnost stresiranih životinja oba pola, povećavajući učestalost propinjanja na zadnje ekstremitete (Slika 15d; mužjaci za 52%,  $p < 0,001$ ; ženke za 16 %,  $p < 0,05$ ), što ukazuje da URB597 ispoljava anksiolitički efekat kod pacova oba pola.

Analiza varijansi je ukazala na postojanje interakcije između CUS i tretmana URB597 u uticaju na broj prelaza kroz centar ( $F_{(1,88)} = 7,02$ ,  $p < 0,01$ ), kao i interakcije između stresa, tretmana i pola na vreme provedeno u centru polja ( $F_{(1,88)} = 4,88$ ,  $p < 0,05$ ) i trajanje timarenja ( $F_{(1,88)} = 4,88$ ,  $p < 0,05$ )

tokom 5 minuta provedenih u polju. Hronično stresirani pacovi, tretirani sa URB597 pokazali su smanjenu anksioznost sudeći po frekventnijim prelascima preko centra arene (Slika 15b; mušjaci za 224%,  $p < 0,01$ ; ženke za 106%,  $p < 0,05$ ) u poređenju sa stresiranim pacovima tretiranim rastvaračem. S druge strane, URB597 je samo kod mušjaka produžio vreme provedeno u centru (Slika 15c; za 323%,  $p < 0,01$ ) i „ulepšavanju“ (Slika 15f; 126%,  $p < 0,001$ ), ukazujući na izraženije anksiolitičko dejstvo ovog leka kod pacova muškog pola.

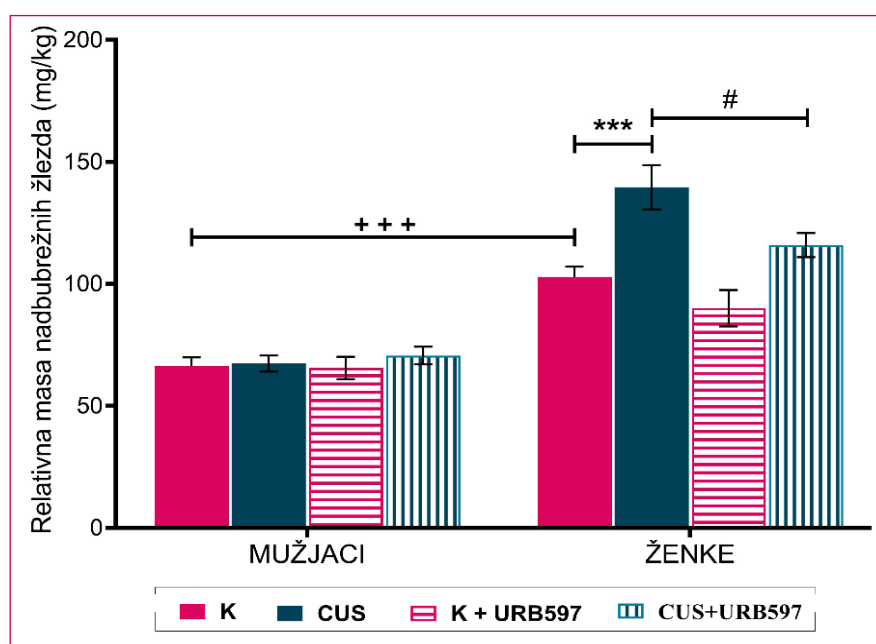


**Slika 15.** Efekat tretmana URB597 na parametre ponašanja u testu otvorenog polja kod pacova oba pola izlaganih CUS. a) ukupan broj pređenih kvadrata; b) broj prelazaka preko centra arene; c) ukupno vreme provedeno u centru arene (s); d) ukupan broj izdizanja; e) ukupno vreme provedeno u mirovanju (s) i f) vreme timarenja (s). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=10$ ). Statistička značajnost:  $^+p < 0,05$  mušjaci vs. ženke;  $^*p < 0,05$ ;  $^{**}p < 0,01$ ;  $^{***}p < 0,001$  kontrole vs. CUS;  $^{\#}p < 0,05$ ;  $^{\#\#}p < 0,01$ ;  $^{\#\#\#}p < 0,001$ ; URB597 vs. rastvarač

#### 4.2. Dejstvo URB597 na relativne mase nadbubrežnih žlezda, slezine i srca pacova oba pola izlaganih CUS

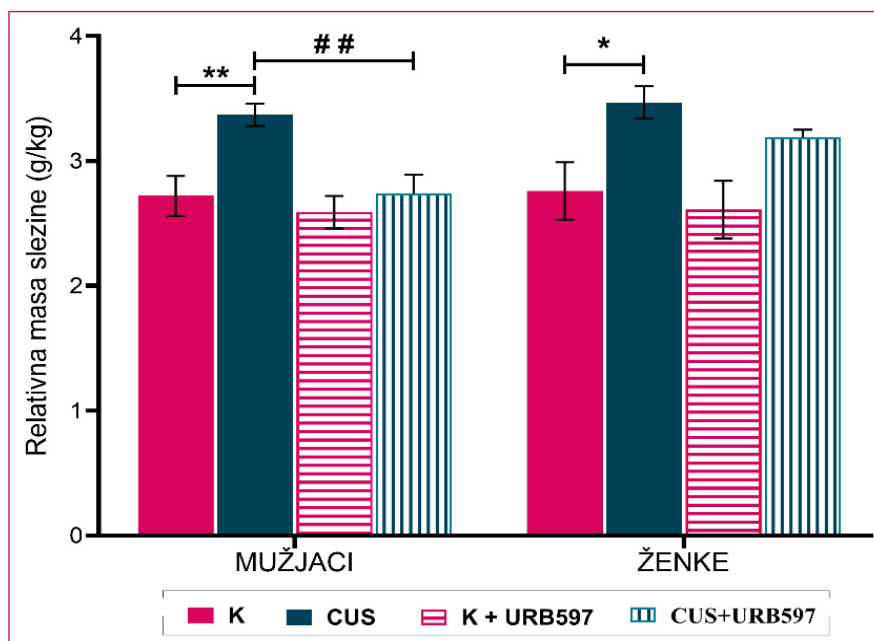
Na Slici 16 su prikazane relativne mase nadbubrežnih žlezda pacova oba pola. *Post-hoc* testom je pokazano da ženke pacova imaju veću relativnu masu nadbubrežnih žlezda u odnosu na mužjake pacova koji nisu hronično izlagani nepredvidivim stresorima za 84% (Tukey test,  $p < 0,001$ ).

Izlaganje nepredvidivim stresorima tokom 6 nedelja je samo kod ženki prouzrokovalo povećanje mase nadbubrežnih žlezda za 36% ( $p < 0,001$ ), dok je aplikacija URB597 smanjila vrednost ovog parametra za 46% ( $p < 0,05$ ). Kod mužjaka, izlaganje stresorima kao i URB597 nisu uticali na relativnu masu nadbubrežnih žlezda.



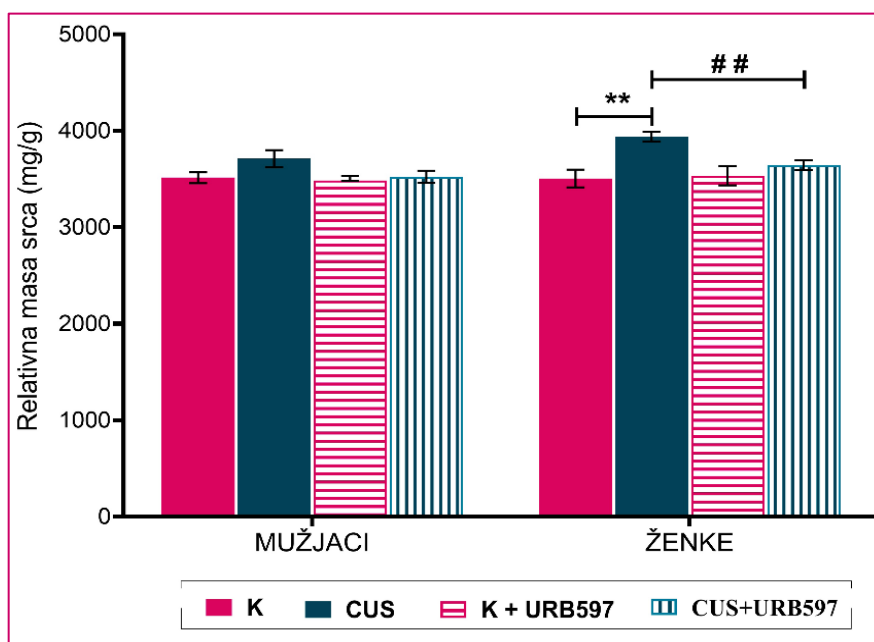
**Slika 16.** Efekat tretmana URB597 na relativnu masu nabubrežnih žlezda pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistička značajnost: +++ $p < 0,001$  mužjaci vs. ženke; \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; # $p < 0,05$  URB597 vs. rastvarač

Na Slici 17 je prikazano dejstvo CUS i tretmana URB597 na relativnu masu slezine pacova oba pola. Rezultati dvofaktorskog ANOVA testa su pokazali statistički značajan efekat stresa na relativnu masu slezine mužjaka ( $F_{(1,23)} = 7,86$ ,  $p < 0,01$ ), i ženki ( $F_{(1,23)} = 5,056$ ,  $p < 0,05$ ). CUS u trajanju od 6 nedelja je značajno povećao relativnu masu slezine mužjaka za 23% (Tukey test: K vs CUS;  $p < 0,01$ ) a ženki za 26% (Tukey test: K vs CUS;  $p < 0,05$ ). Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat tretmana URB597 kod mužjaka ( $F_{(1,23)} = 7,23$ ,  $p < 0,01$ ). Naime, relativna masa slezine stresiranih mužjaka tretiranih URB597, za razliku od ženki, je bila smanjena u odnosu na masu slezine stresiranih mužjaka na vrednosti izmerene kod životinja koje nisu izlagane CUS.



**Slika 17.** Efekat tretmana URB597 na relativnu masu slezine pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*p<0,05; \*\*p<0,01 kontrole vs. CUS; ##p<0,01 URB597 vs rastvarač

Na Slici 18 je prikazano dejstvo CUS i tretmana URB597 na relativnu masu srca pacova oba pola. Dvofaktorska ANOVA analiza ovog parametra pokazala je značajan efekat stresa ( $F_{(1,23)} = 12,62$ ,  $p < 0,01$ ) kao i značajnu interakciju između tretmana i stresa ( $F_{(1,23)} = 4,47$ ,  $p < 0,05$ ) kod ženki, ali ne i mužjaka pacova. Relativna masa srca ženki izloženih CUS povećala se za 10% (Tukey test;  $p < 0,01$ ) u odnosu na jedinke koje nisu izlagane CUS, dok je kod stresiranih ženki URB597 smanjio relativnu masu srca na vrednosti zabeležene kod nestresiranih životinja.



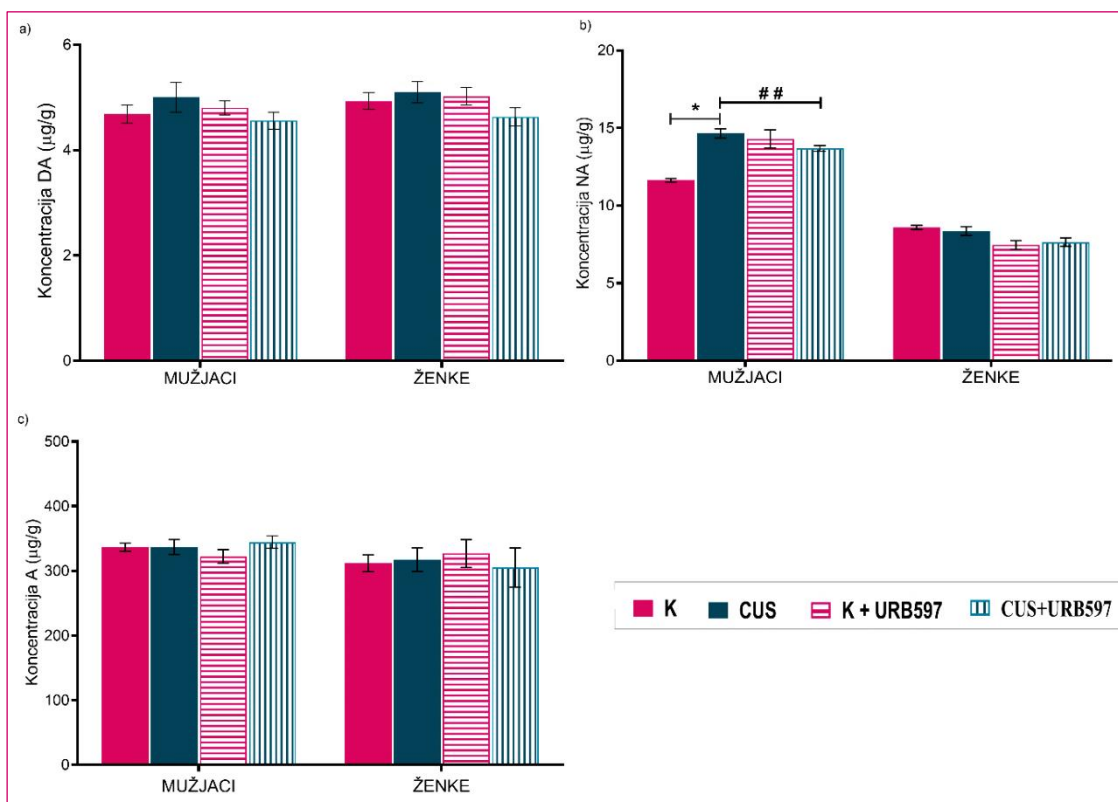
**Slika 18.** Efekat tretmana URB597 na relativnu masu srca pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*\*p<0,01 kontrole vs. CUS, ##p<0,01 URB597 vs. rastvarač



### 4.3. Dejstvo URB597 na koncentraciju katecholamina u plazmi pacova oba pola izlaganih CUS

Na Slici 19 prikazani su rezultati ispitivanja efekta URB597 na koncentraciju katecholamina u plazmi pacova oba pola izlaganih CUS i to: dopamina (19a), noradrenalina (19b) i adrenalina (19c). Rezultati pokazuju da izlaganje nepredvidivim stresorima, kao i tretman URB597 nisu uticali na koncentraciju DA i A u plazmi kod oba pola.

Nasuprot, analizom rezultata dvofaktorskim ANOVA testom uočava se značajan uticaj CUS ( $F_{(1,23)} = 8,69$ ,  $p < 0,05$ ) i tretmana URB597 ( $F_{(1,23)} = 7,37$ ,  $p < 0,01$ ) na koncentraciju NA u plazmi mužjaka. *Post-hoc* testom je pokazano da je izlaganje mužjaka nepredvidim stresorima dovelo do povećanja koncentracije NA za 16%, (Tukey test;  $p < 0,05$ ), dok je dvonedeljni tretman sa URB597 smanjio vrednosti NA na kontrolni nivo u plazmi stresiranih mužjaka (Slika 19b).



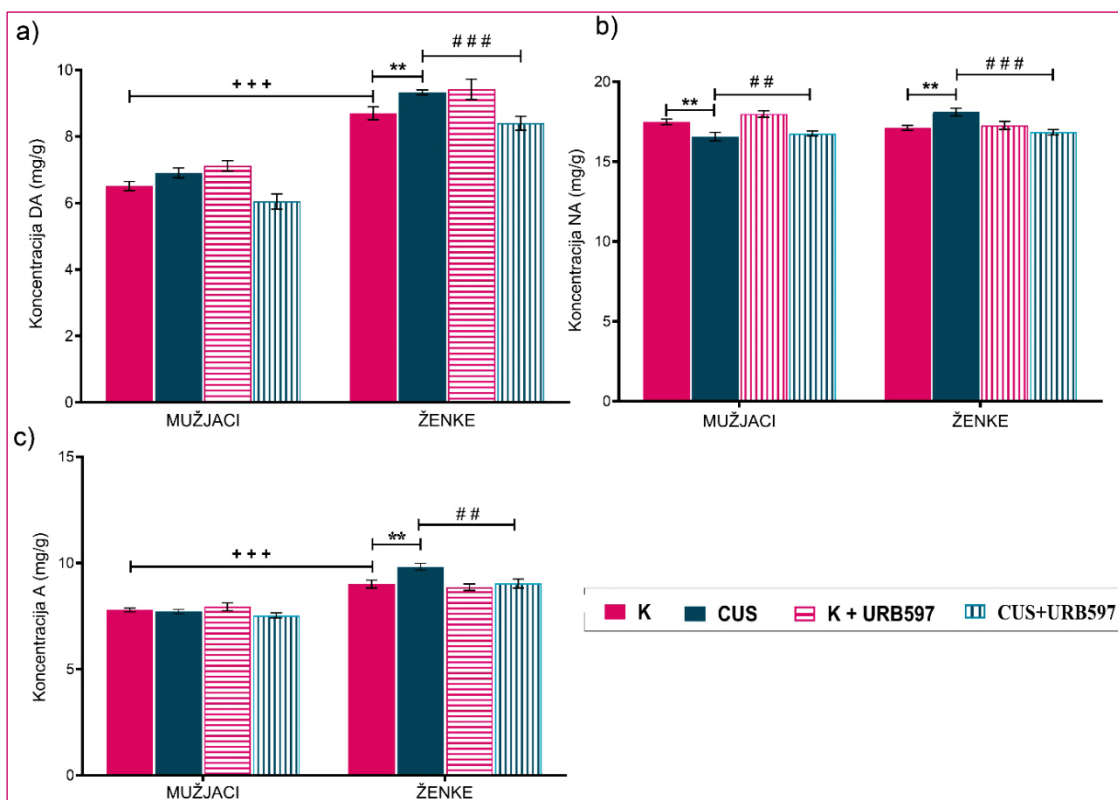
**Slika 19.** Efekat tretmana URB597 na koncentraciju dopamina (a), noradrenalina (b) i adrenalina (c) u plazmi pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \* $p < 0,05$  kontrole vs. CUS; ## $p < 0,01$  URB597 vs. rastvarač

#### 4.4. Dejstvo URB597 na koncentraciju kateholamina, njihov metabolizam i transportere u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS

##### 4.4.1. Koncentracija kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda

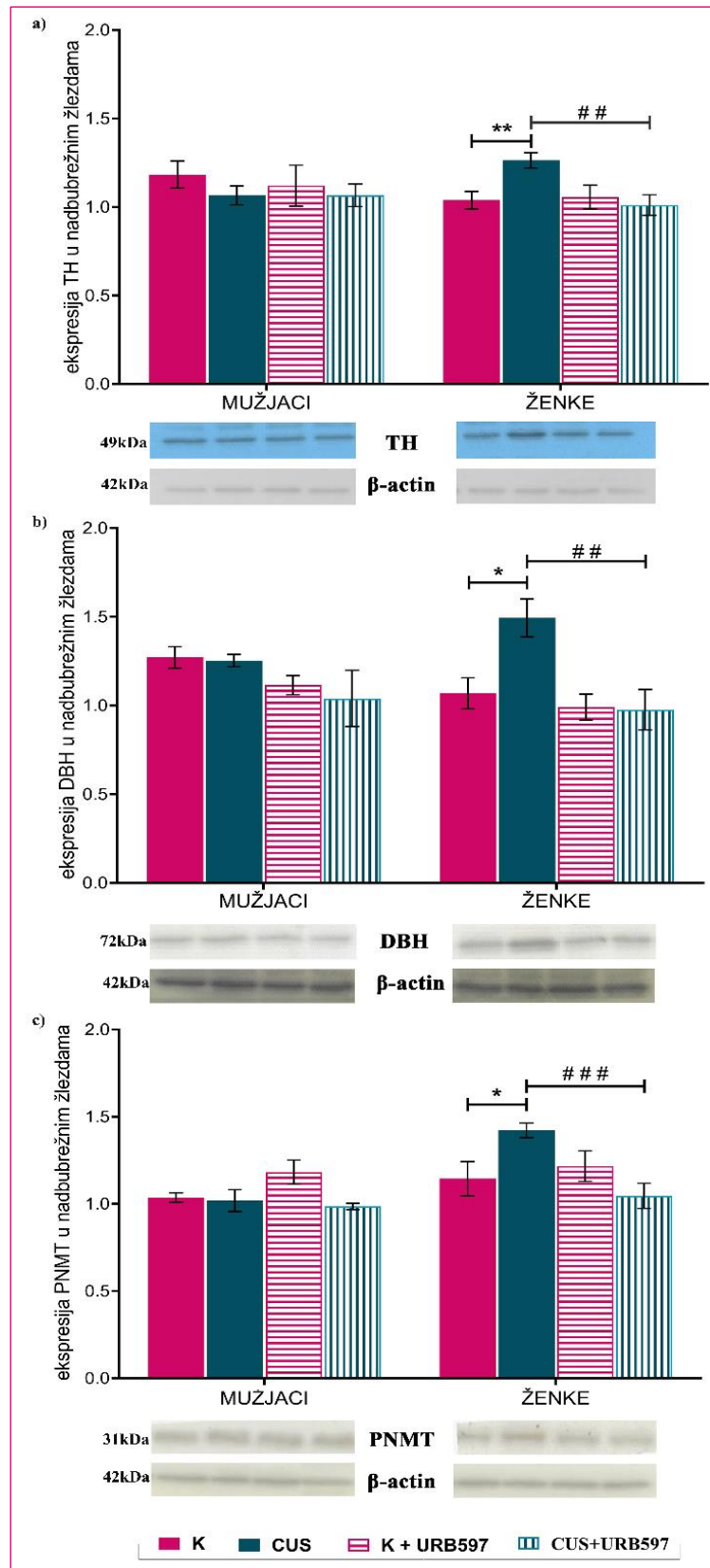
Analizom rezultata prikazanih na Slici 20 uočava se postojanje polno-zavisnih razlika u sadržaju DA (Slika 20a) i A (Slika 20c) u nadbubrežnim žlezdama pacova koje nisu bile izlagane CUS. *Post-hoc* analizom je utvrđeno da je sadržaj DA za 34% ( $p < 0,001$ ), a A za 15% ( $p < 0,001$ ) veći u nadbubrežnim žlezdama ženki kontrolnih pacova. CUS je doveo do povećanja sadržaja sva tri ispitivana hormona (DA za 7%,  $p < 0,01$ ; NA za 6%,  $p < 0,01$ ; A za 9%,  $p < 0,01$ ) u nadbubrežnim žlezdama ženki pacova, dok se u nadbubrežnim žlezdama mužjaka značajno smanjio samo NA za 5% ( $p < 0,01$ ).

Tretman URB597 je u nadbubrežnim žlezdama stresiranih pacova oba pola vratio nivo NA na vrednosti izmerene kod životinja koje nisu izlagane hroničnim nepredvidivim stresorima (Tukey test CUS vs CUS+URB597;  $p < 0,001$ ), a kod ženki samo DA i A (DA  $p < 0,001$ ; A  $p < 0,01$ ).



**Slika 20.** Efekat tretmana URB597 na koncentraciju dopamina (a), noradrenalina (b) i adrenalina (c) u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistička značajnost:  $+++p < 0,001$  mužjaci vs. ženke;  $**p < 0,01$  kontrole vs. CUS;  $##p < 0,01$ ;  $###p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

#### 4.4.2. Ekspresija enzima biosinteze kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda



**Slika 21.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju TH (a), DBH (b) i PNMT (c) u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; kontrola vs. CUS; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  URB597 vs. rasvarač

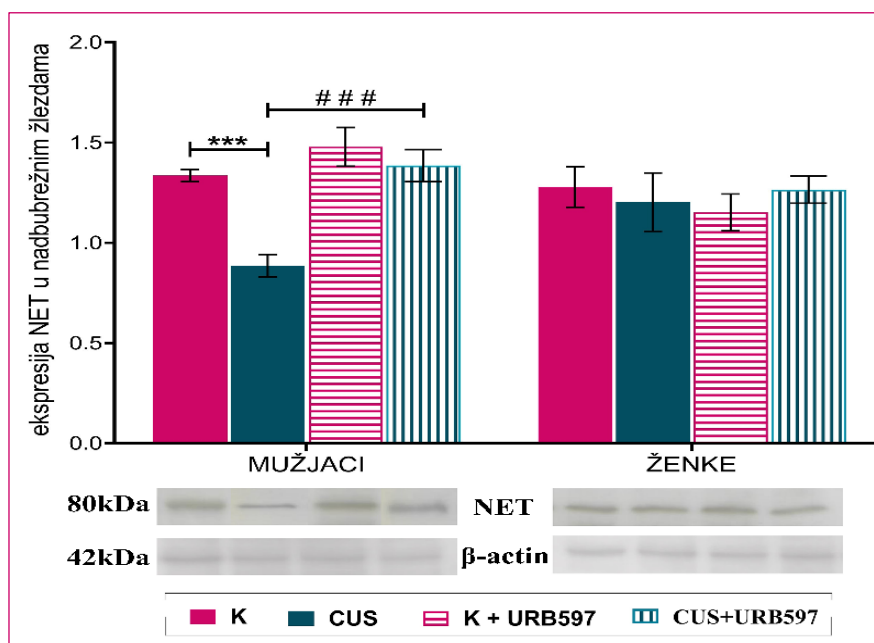
Trofaktorska analiza varijansi je pokazala značajne polne razlike u ekspresiji TH ( $F_{(1,47)} = 13,498$ ,  $p < 0,01$ ); DBH ( $F_{(1,47)} = 5,467$ ,  $p < 0,05$ ); i PNMT ( $F_{(1,47)} = 7,323$ ,  $p < 0,01$ ) kod nestresiranih životinja. Takođe je analizom pokazan nezavisan uticaj stresa na količinu enzima TH ( $F_{(1,47)} = 15,743$ ,  $p < 0,001$ ); DBH ( $F_{(1,47)} = 35,698$ ,  $p < 0,001$ ); i PNMT ( $F_{(1,47)} = 47,926$ ,  $p < 0,001$ ) kao i tretmana (za TH ( $F_{(1,47)} = 11,062$ ,  $p < 0,001$ ); za DBH ( $F_{(1,47)} = 11,257$ ,  $p < 0,001$ ); za PNMT ( $F_{(1,47)} = 13,611$ ,  $p < 0,001$ )) na ekspresiju sva tri enzima biosinteze kateholamina u nadbubrežnim žlezdama. Rezultati *post-hoc* testa su pokazali da je CUS kod ženki doveo do statistički značajnog povećanja ekspresije TH za 22% ( $p < 0,01$ ), DBH za 40% ( $p < 0,05$ ) i PNMT za 24% ( $p < 0,05$ ) u nadbubrežnim žlezdama, dok je URB597 smanjio ove vrednosti na nivo enzima zabeležen kod kontrola (Slika 21). Suprotno od ženki, izlaganje CUS kao i tretman URB597, nisu uticali na ekspresiju nijednog ispitivanog enzima sinteze KA u nadbubrežnim žlezdama mužjaka (Slika 21a,-b,-c).

#### 4.4.3. Ekspresija transportera za noradrenalin i dopamin u srži nadbubrežnih žlezda

Na Slici 22 prikazan je efekat URB597 na ekspresiju NET u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS.

Analizom varijansi je uočen značajan efekat stresa ( $F_{(1,23)} = 11,947$ ,  $p < 0,001$ ) i tretmana ( $F_{(1,23)} = 16,697$ ,  $p < 0,001$ ) na ekspresiju NET u srži nadbubrežnih žlezda mužjaka. *Post-hoc* testom je pokazano da je CUS u nadbubrežnim žlezdama mužjaka pacova smanjio ekspresiju NET ( $p < 0,001$ , Tukey test). URB597 nije uticao na ekspresiju NET kod kontrolnih mužjaka, ali je povećao ovu vrednost na kontrolni nivo u nadbubrežnim žlezdama stresiranih životinja ( $p < 0,001$ , Tukey test). Značajne promene u ekspresiji ovog transportera nisu detektovane u nadbubrežnim žlezdama ženki.

Vrednosti ekspresije DAT u srži nadbubrežnih žlezda bile su ispod nivoa detekcije i zato nisu prikazane u rezultatima.

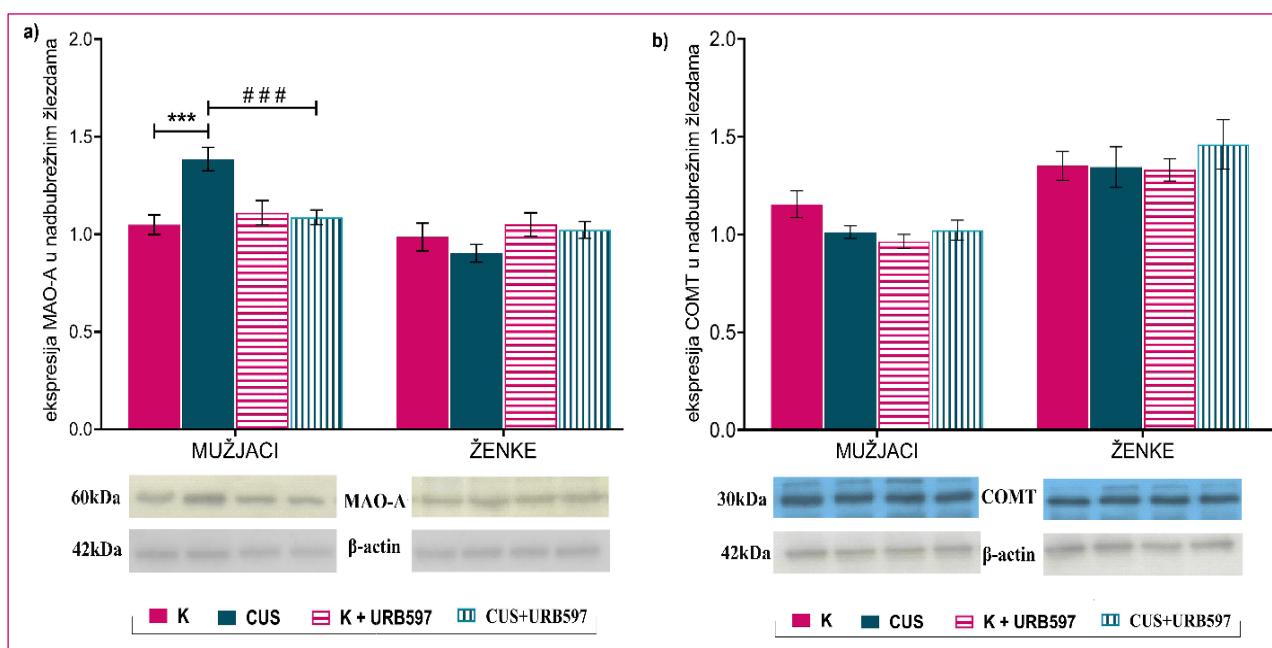


**Slika 22.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju NET u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistička značajnost: \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; ### $p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

#### 4.4.4. Ekspresija enzima koji učestvuju u razgradnji kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda

Rezultati ispitivanja efekta URB597 i CUS na ekspresiju COMT i MAO-A u srži nadbubrežnih žlezda pacova oba pola su prikazani na Slici 23. Kako se na slici može videti, stres i tretman URB597 nisu uticali na ekspresiju COMT u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola, kao ni na MAO-A u nadbubrežnim žlezdama ženki. Rezultati trofaktorskog ANOVA testa su pokazali značajan efekat pola na ekspresiju MAO-A ( $F_{(1,47)} = 8,80$ ,  $p < 0,01$ ), jer se povećanje ekspresije ovog enzima degradacije uočava nakon 6 nedelja izlaganja stresorima različite prirode za 32% (Tukey test,  $p < 0,001$ ), samo kod mužjaka.

*Post-hoc* testom je pokazano da je kod stresiranih životinja, tretman FAAH inhibitorom smanjio ekspresiju MAO-A na nivo zabeležen u nadbubrežnim žlezdama mužjaka koji nisu bili izloženi CUS ( $p < 0,001$ ).



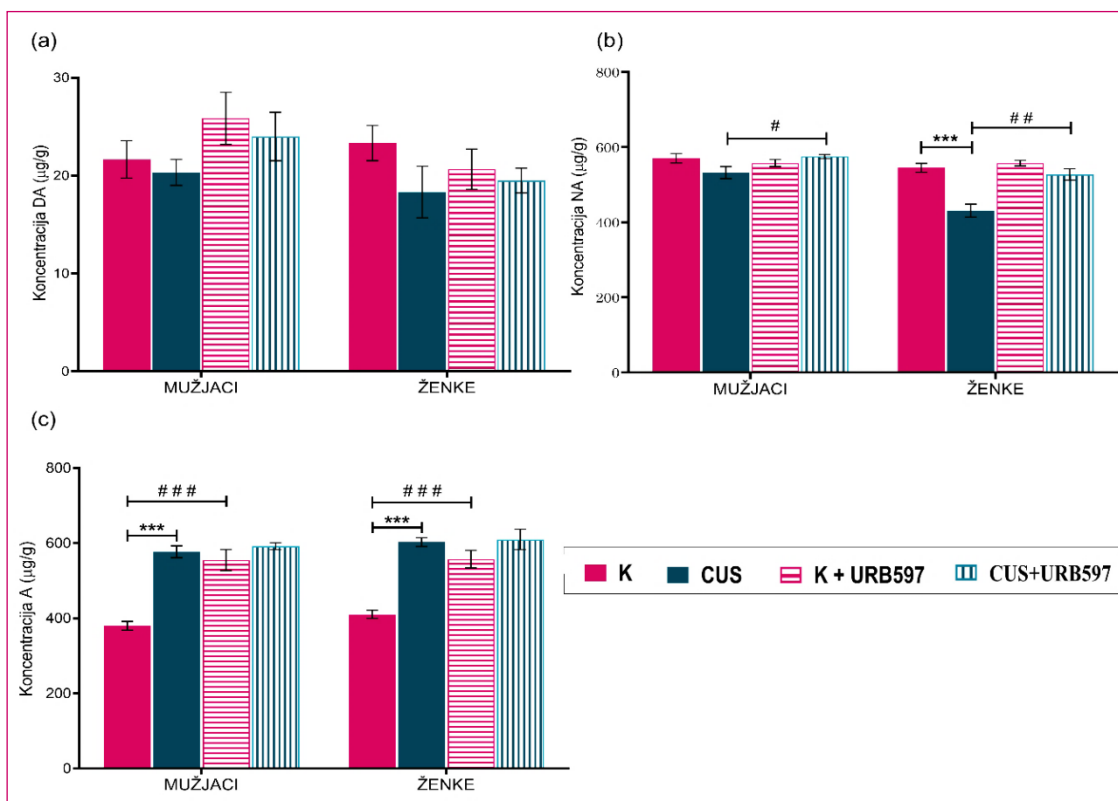
**Slika 23.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju enzima razgradnje kateholamina MAO-A (a) i COMT (b) u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistička značajnost: \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; ### $p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

#### 4.5. Dejstvo URB597 na koncentraciju kateholamina, njihov metabolizam i transportere u slezini pacova oba pola izlaganih CUS

##### 4.5.1. Koncentracija kateholamina u slezini

Na Slici 24 predstavljen je efekat URB597 na koncentraciju kateholamina u slezini pacova oba pola izlaganih CUS. Dobijeni rezultati pokazuju da CUS i URB597 nisu uticali na sadržaj dopamina (Slika 24a) u slezini. Međutim, analizom varijansi uočen je interaktivni efekat stresa i tretmana na koncentraciju NA u slezini mužjaka ( $F_{(1,23)} = 5,85$ ,  $p < 0,05$ ) i ženki pacova ( $F_{(1,23)} = 9,67$ ,  $p < 0,01$ ). *Post-hoc* analiza je pokazala da je svakodnevno izlaganje pacova CUS u trajanju od 42 dana za 12%

smanjilo koncentraciju NA ( $p < 0,001$ ) u slezini ženki, dok ovo smanjenje u slezini mužjaka nije doseglo statističku značajnost (Slika 24b). Stres je, s druge strane, delovao suprotno na koncentraciju A u slezini hronično stresiranih životinja oba pola (slika 24c), gde je detektovano značajno povećanje kod mužjaka za 52% ( $p < 0,001$ ) i ženki za 47% ( $p < 0,001$ ).

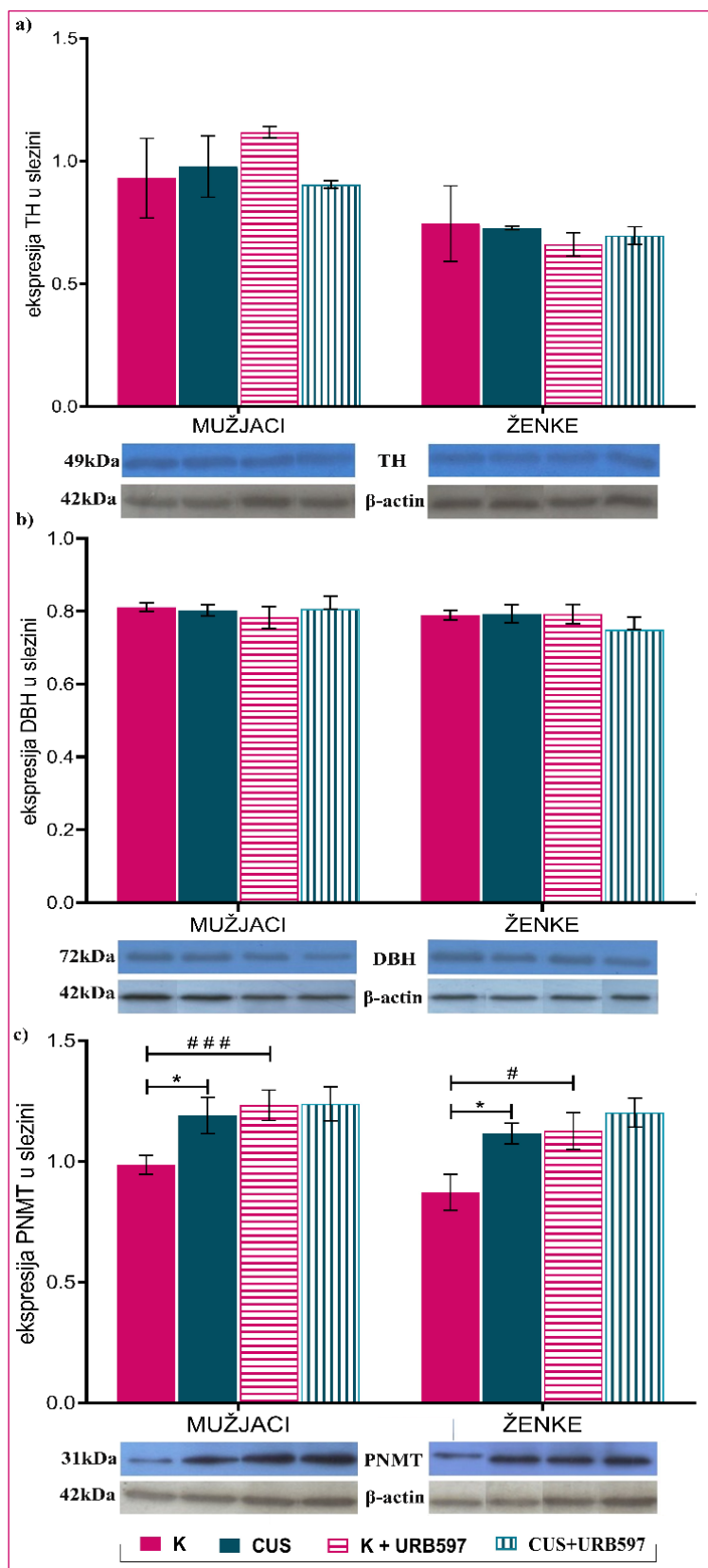


**Slika 24.** Efekat tretmana URB597 na koncentraciju dopamina (a), noradrenalina (b) i adrenalina (c) u slezini pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistička značajnost: \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

*Post-hoc* testom je pokazano da je tretman URB597 povećao koncentraciju NA u slezini stresiranih mužjaka za 8% (Tukey test CUS vs CUS+URB597;  $p < 0,05$ ), i ženki za 22%, (Tukey test CUS vs CUS+URB597;  $p < 0,01$ ), kao i koncentraciju A u slezini nestresiranih životinja oba pola (mužjaci: za 46%,  $p < 0,001$ ; ženke: za 36%,  $p < 0,001$ ), Tukey test K vs K+URB597.

#### 4.5.2. Ekspresija enzima biosinteze kateholamina u slezini

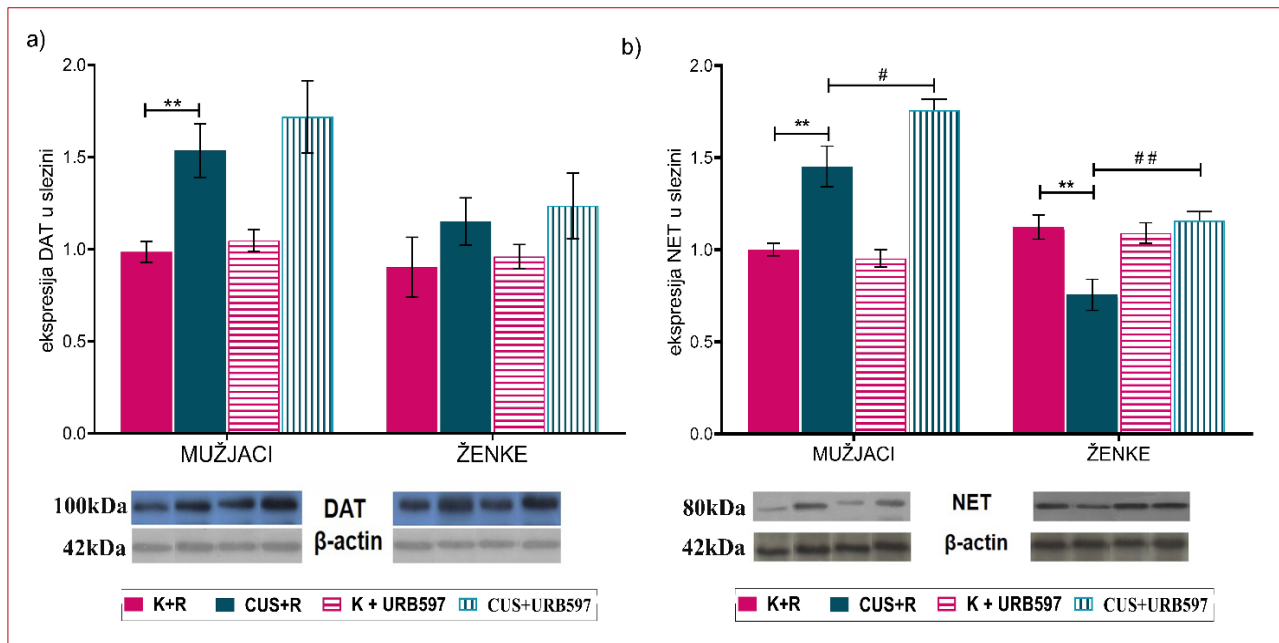
Na Slici 25 prikazani su rezultati analize uticaja tretmana URB597 na količinu enzima biosinteze kateholamina u slezini pacova oba pola izlaganih CUS. Dvofaktorskim ANOVA testom pokazano je da CUS i URB597 nisu uticali na ekspresiju TH (Slika 25a) i DBH (Slika 25b) ali su povećali ekspresiju PNMT u slezini oba pola (mužjaci  $F_{(1,23)} = 5,99$ ,  $p < 0,05$ ; ženke  $F_{(1,23)} = 6,13$ ,  $p < 0,05$ ). *Post-hoc* testom je pokazano da je ekspresija PNMT značajno povećana u slezini hronično stresiranih pacova oba pola (mužjaci za: 21%,  $p < 0,05$ ; ženke za: 28%,  $p < 0,05$ ) u odnosu na pacove koji nisu izlagani stresorima, ali nisu uočene značajne promene u ekspresiji PNMT u slezini nakon dvonedeljnog tretmana URB597. Međutim, tretman URB597 nestresiranih pacova oba pola je povećao ekspresiju PNMT u slezini (mužjaci: za 25%,  $p < 0,001$ ; ženke: za 29%,  $p < 0,05$ ; Slika 25c).



**Slika 25.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju TH (a), DBH (b) i PNMT (c) u slezini pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*p<0,05; kontrole vs. CUS; #p<0,05; ###p<0,001 URB597 vs. rastvarač

### 4.5.3. Ekspresija transportera za noradrenalin i dopamin u slezini

Analiza varijansi rezultata ispitivanja ekspresije DAT u slezini pokazala je značajan efekat pola ( $F_{(1,47)} = 7,43$ ,  $p < 0,01$ ) i stresa ( $F_{(1,47)} = 20,96$ ,  $p < 0,001$ ), budući da je CUS značajno povećao ekspresiju DAT samo kod mužjaka za 56% ( $p < 0,01$ ; Tukey post hoc test, Slika 26a). URB597 je takođe značajno povećao ekspresiju ovog transportera samo u slezini stresiranih mužjaka ( $p < 0,01$ , Tukey test).



**Slika 26.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju DAT (a) i NET (b) u slezini pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistička značajnost: \*\* $p < 0,01$  kontrole vs. CUS; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  URB597 vs. rastvarač

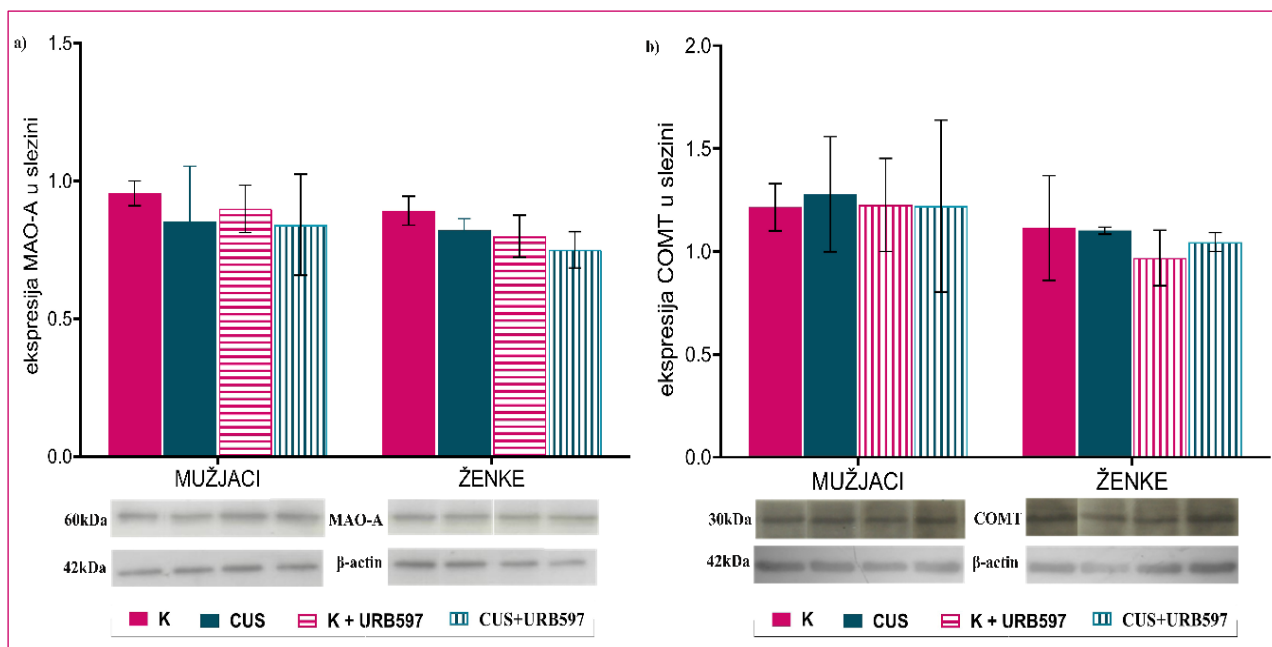
Hronično izlaganje pacova nepredvidivim stresorima imalo je polno specifičan efekat (mužjaci  $F_{(1,23)} = 83,87$ ,  $p < 0,001$ ; ženke:  $F_{(1,23)} = 5,33$ ,  $p < 0,05$ ) i na ekspresiju NET, odnosno povećanje za 45% u slezini mužjaka ( $p < 0,01$ ; Tukey test), a smanjenje za 33% u slezini ženki ( $p < 0,01$ ; Tukey test). Tretman sa FAAH inhibitorom je povećao ekspresiju NET stresiranih jedinki oba pola, s tim da je u slezini ženki ekspresija NET povećana do nivoa kontrolnih vrednosti, dok je u slezini mužjaka detektovano dodatno povećana ekspresije ovog transportera za 21% ( $p < 0,05$ ; Tukey test) u odnosu na stresirane životinje.

Dvonedeljni tretman je imao efekta samo na ekspresiju DAT u slezini mužjaka koji nisu izlagani CUS ( $p < 0,01$ ).



#### 4.5.4. Ekspresija enzima koji učestvuju u razgradnji kateholamina u slezini

Rezultati prikazani na Slici 27 pokazuju da šestonedeljno izlaganje nepredvidivim stresorima kao i tretman URB597 nisu uticali na ekspresiju MAO-A i COMT enzima u slezini pacova oba pola.



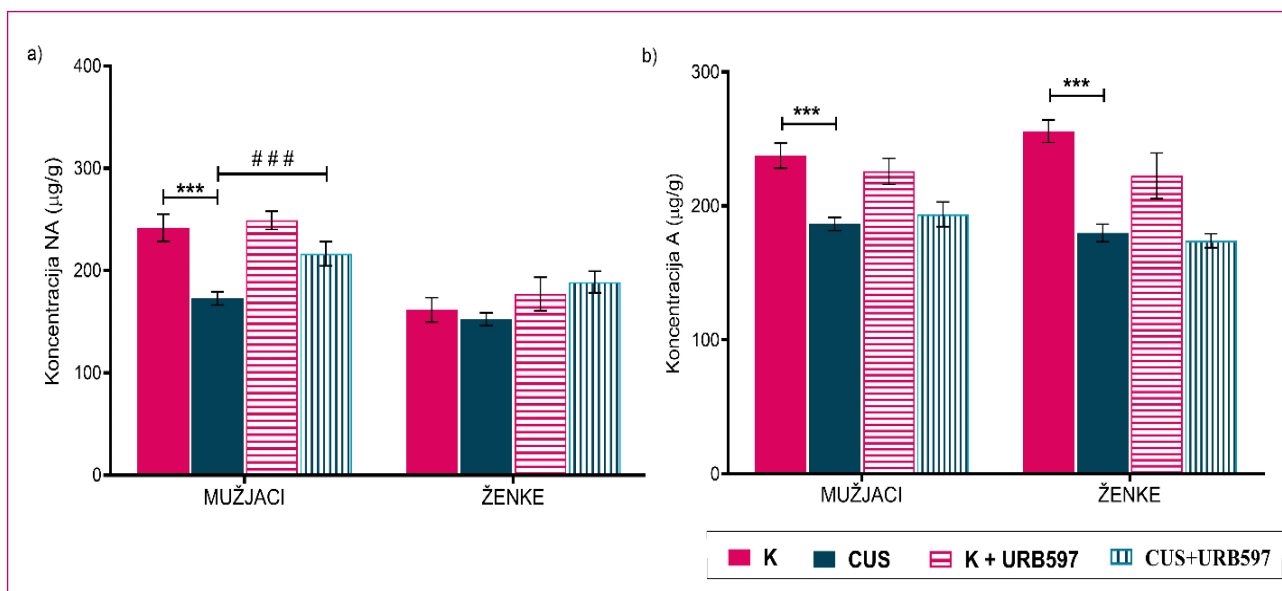
**Slika 27.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju enzima razgradnje kateholamina MAO-A (a) i COMT (b) u slezini pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6).

#### 4.6. Dejstvo URB597 na koncentraciju kateholamina, ekspresiju enzima njihove sinteze, razgradnje i transportera u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS

##### 4.6.1. Koncentracija kateholamina u levoj komori srca

Na Slici 28 prikazani su rezultati ispitivanja efekta URB597 na koncentraciju NA (a) i A (b) u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS.

Analiza rezultata je pokazala postojanje polnih razlika ( $F_{(1,40)} = 16,1$ ,  $p < 0.01$ ) u efektu hroničnog izlaganja stresorima ( $F_{(1,40)} = 23,66$ ,  $p < 0.001$ ) na koncentraciju NA u levoj komori srca, koja je kod mužjaka bila smanjena za 28% ( $p < 0,001$ ), a kod ženki ostala nepromenjena. S druge strane, *post hoc* testom je pokazano da je CUS doveo do smanjenja koncentracije A u levoj komori srca pacova oba pola (mužjaci za 21%,  $p < 0,001$ ; ženke za 35%,  $p < 0,001$ ). Vrednosti dopamina nisu bile detektabilne u levoj komori srca kod pacova oba pola.



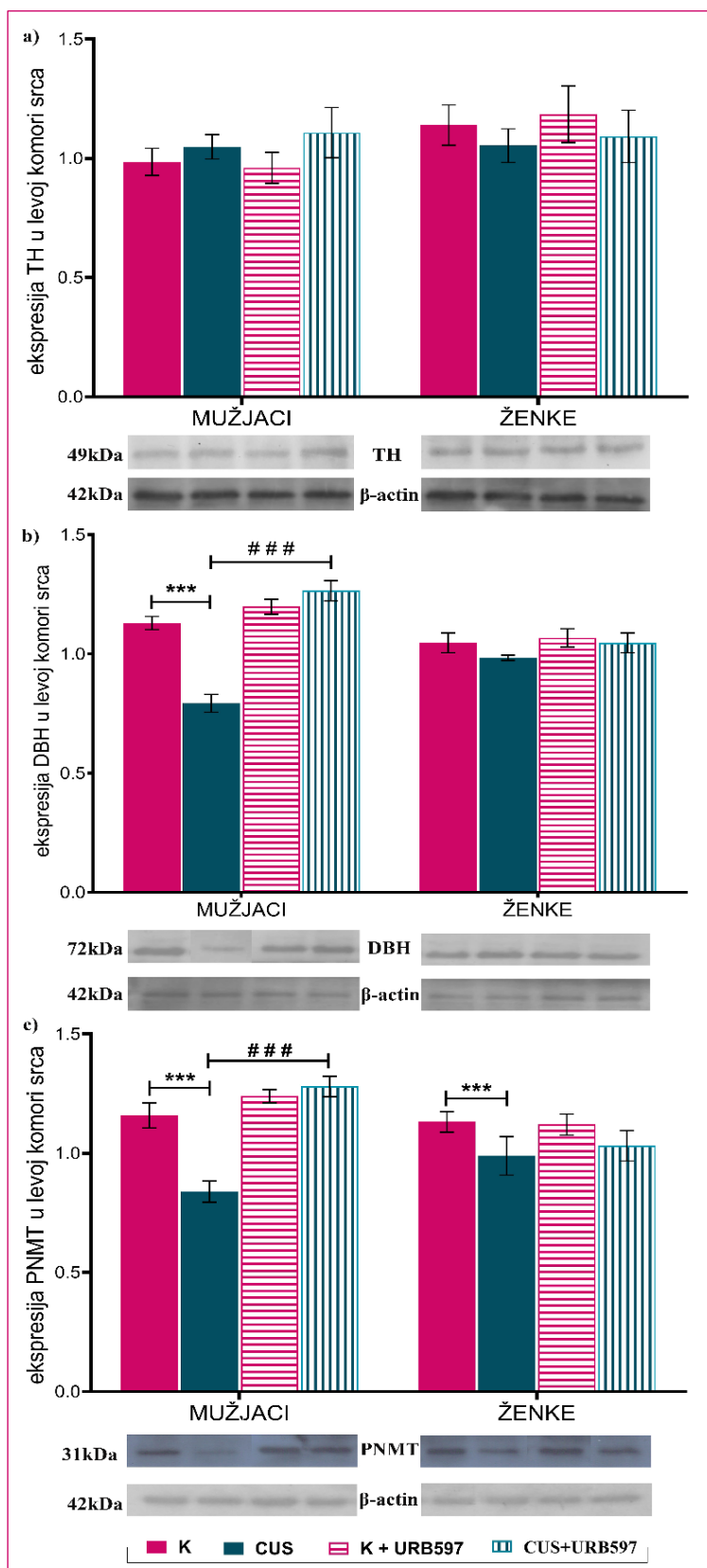
**Slika 28.** Efekat tretmana URB597 na koncentraciju noradrenalina (a) i adrenalina (b) u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*\*\* $p$ <0,01 kontrole vs. CUS; ### $p$ <0,05, URB597 vs. rastvarač

Dvonedeljni tretman inhibitorom FAAH je imao efekte samo na koncentraciju NA u levoj komori srca stresiranih mužjaka ( $p$ <0,001, Tukey test) dok na sadržaj NA u srcu ženki, kao i na sadržaj A u srcu pacova oba pola nije delovao.

#### 4.6.2. Ekspresija enzima koji učestvuju u biosintezi kateholamina u levoj komori srca

Na Slici 29 prikazani su rezultati ispitivanja efekta URB597 na ekspresiju enzima sinteze kateholamina TH (a), DBH (b) i PNMT (c) u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji TH u levoj komori srca svih eksperimentalnih grupa pacova. Nasuprot tome, analizom varijansi pokazano je da stres ima efekta na ekspresiju DBH ( $F_{(1,23)}=10$ ;  $p$ <0,001) kao i postojanje interakcije između stresa i tretmana ( $F_{(1,23)}=4,6$ ;  $p$ <0,05) u levoj komori srca mužjaka. *Post-hoc* analizom je utvrđeno da je CUS smanjio ekspresiju DBH u levoj komori srca mužjaka za 30% ( $p$ <0,001), dok je kod ženki ova vrednost ostala nepromenjena. Ekspresija PNMT bila je snižena u levoj komori srca stresiranih mužjaka za 28% (Tukey test K vs CUS;  $p$ <0,001) i stresiranih ženki za 24% (Tukey test K vs CUS;  $p$ <0,001).

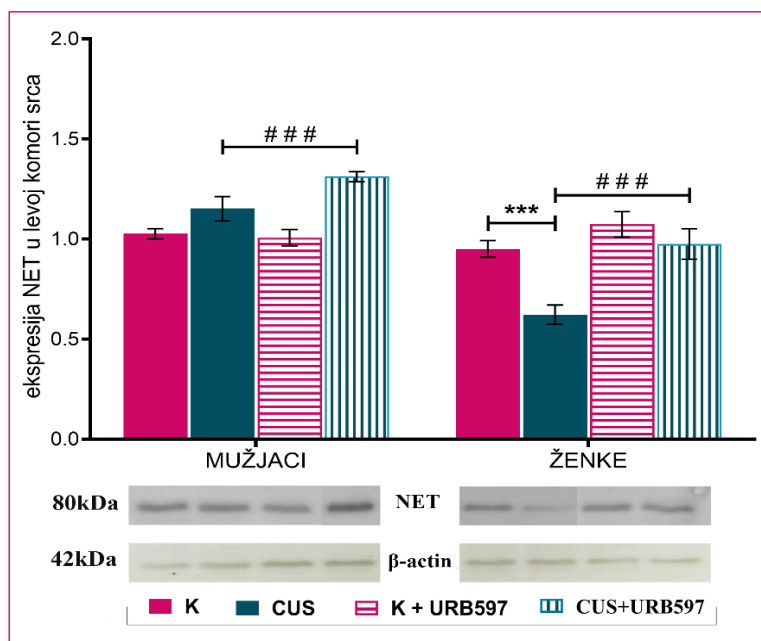
Za razliku od ženki, tretman URB597 je imao efekta na ekspresiju DBH i PNMT u levoj komori srca stresiranih mužjaka ( $p$ <0,001, Tukey test).



**Slika 29.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju TH (a), DBH (b) i PNMT (c) u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljene reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*\*\*p<0,001 kontrole vs. CUS; ###p<0,001 URB597 vs. rastvarač

#### 4.6.3. Ekspresija transportera za noradrenalin u levoj komori srca

Test dvofaktorske ANOVA je pokazao značajnu interakciju stresa i tretmana na ekspresiju NET u srcu ženki pacova ( $F_{(1,23)} = 4,68$ ;  $p < 0,05$ ), dok je CUS snizio ekspresiju NET za 34% ( $p < 0,001$ , Tukey test) samo u levoj komori stresiranih ženki, ali ne i stresiranih mužjaka.



**Slika 30.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju NET u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Statistička značajnost: \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; ### $p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

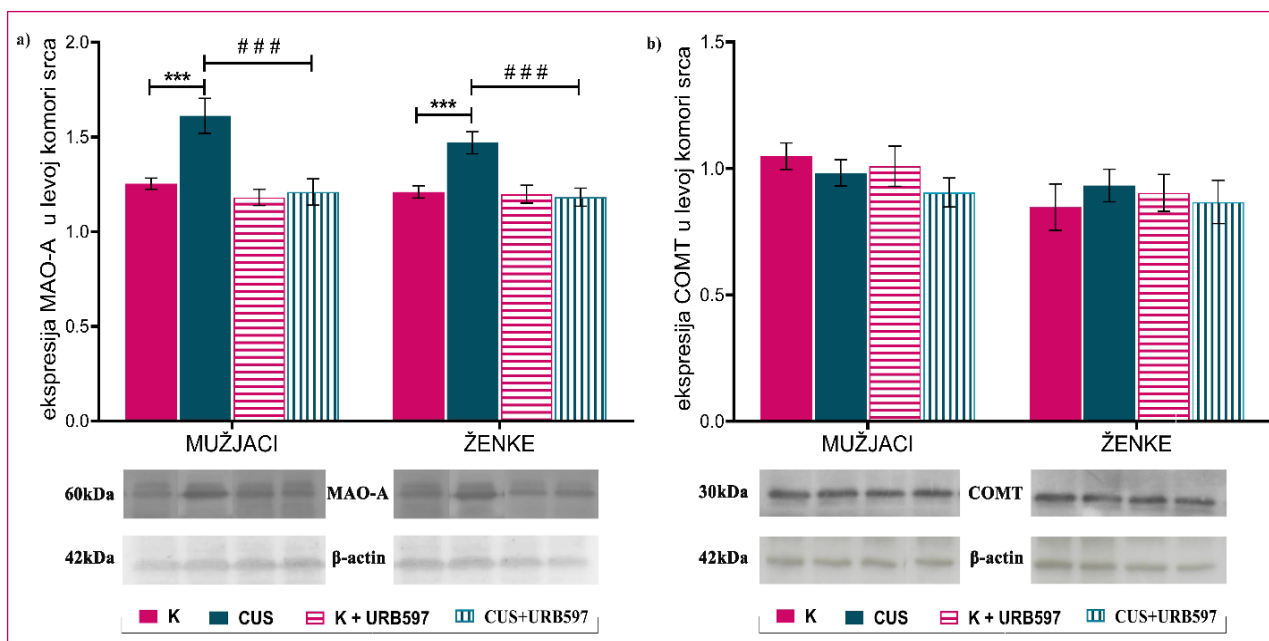
Tretman URB597 je povećao ekspresiju NET u levoj komori srca pacova oba pola (ženke:  $p < 0,001$ ; mužjaci:  $p < 0,001$ ) u odnosu na stresirane životinje. Ekspresija DAT u levoj komori srca pacova oba pola nije detektovana.

#### 4.6.4. Ekspresija enzima koji učestvuju u razgradnji kateholamina u levoj komori srca

Na Slici 31 prikazan je efekat URB597 na ekspresiju enzima razgradnje kateholamina, MAO-A i COMT u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS. Stres i tretman nisu uticali na količinu COMT u levoj komori srca pacova oba pola (slika 31b).

Rezultati dvofaktorskog ANOVA testa su pokazali statistički značajan efekat stresa (ženke:  $F_{(1,23)}=7,37$ ;  $p < 0,05$ ; mužjaci:  $F_{(1,23)} = 10,988$ ;  $p < 0,001$ ) i tretmana (ženke:  $F_{(1,23)} = 4,87$ ;  $p < 0,05$ ; mužjaci:  $F_{(1,23)} = 7,29$ ;  $p < 0,01$ ) na ekspresiju MAO-A u srcu pacova oba pola (Slika 31a). *Post-hoc* testom je pokazano da se ekspresija MAO-A značajno povećala u levoj komori srca životinja hronično izlaganih različitim stresorima, i to mužjaka za 28% ( $p < 0,001$ ) a ženki za 21% ( $p < 0,001$ ).

Dvonedeljni tretman URB597 je smanjio ekspresiju MAO-A u levoj komori srca stresiranih pacova oba pola na nivo zabežen kod kontrolnih pacova.



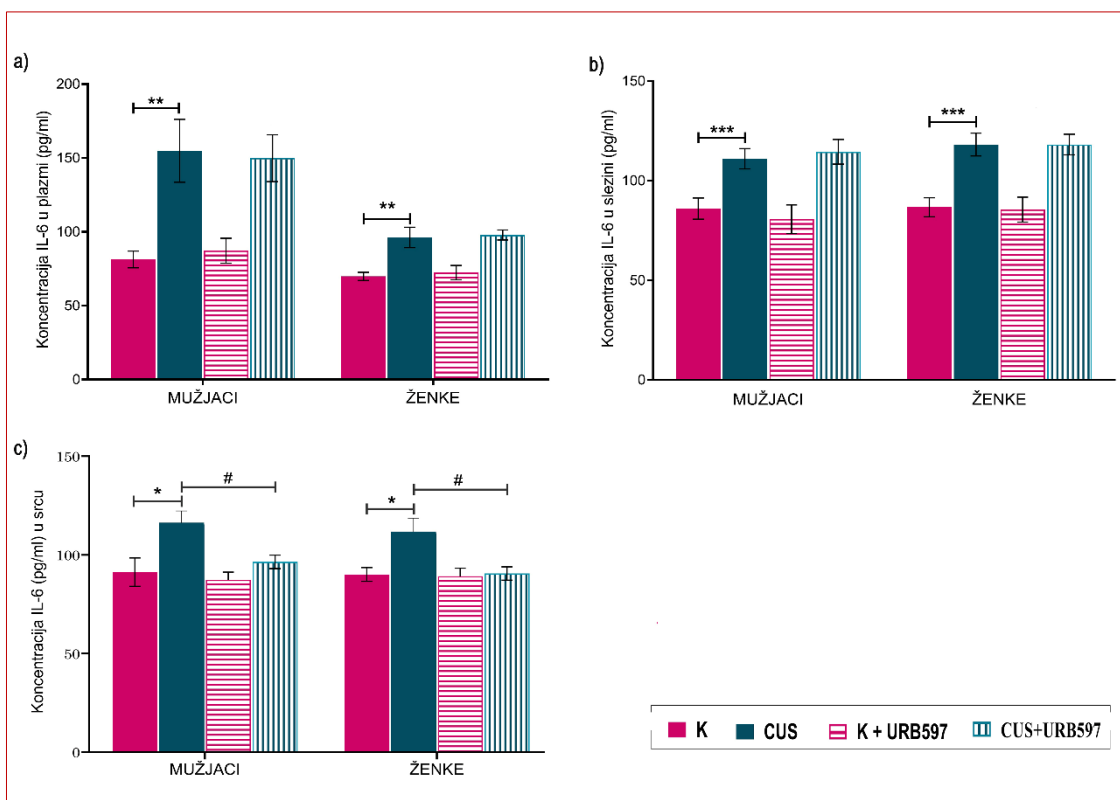
**Slika 31.** Efekat tretmana URB597 na ekspresiju enzima razgradnje kateholamina MAO-A (a) i COMT (c) u levoj komori srca, pacova oba pola izlaganih CUS tokom 6 nedelja. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; ### $p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

#### 4.7. Dejstvo URB597 na koncentraciju proinflamatornog IL-6 i antiinflamatornog IL-10 citokina u plazmi, slezini i levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS

##### 4.7.1. Koncentracija proinflamatornog IL-6 citokina u plazmi, slezini i levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS

Na Slici 32 prikazan je efekat URB597 na koncentraciju proinflamatornog citokina IL-6 u plazmi (a), slezini (b) i levoj komori srca (c) pacova oba pola izlaganih CUS. *Post-hoc* testom je pokazano da izlaganje hroničnim nepredvidivim stresorima je povećalo koncentraciju ovog proinflamatornog citokina u plazmi ( $p < 0,01$ ), slezini ( $p < 0,001$ ) i levoj komori srca ( $p < 0,05$ ) pacova oba pola u poređenju sa grupom pacova koja nije izlagana CUS (Slika 32a,-b,-c).

Tretman URB597 nije uticao na koncentraciju IL-6 u plazmi i slezini kod kontrolnih i stresiranih pacova oba pola (Slika 32a,-b). Međutim, URB597 je ispoljio antiinflamatorni efekat u levoj komori srca, odnosno smanjio je koncentraciju ovog interleukina ( $p < 0,05$ ; Tukey test) kod hronično stresiranih pacova oba pola (Slika 32c).



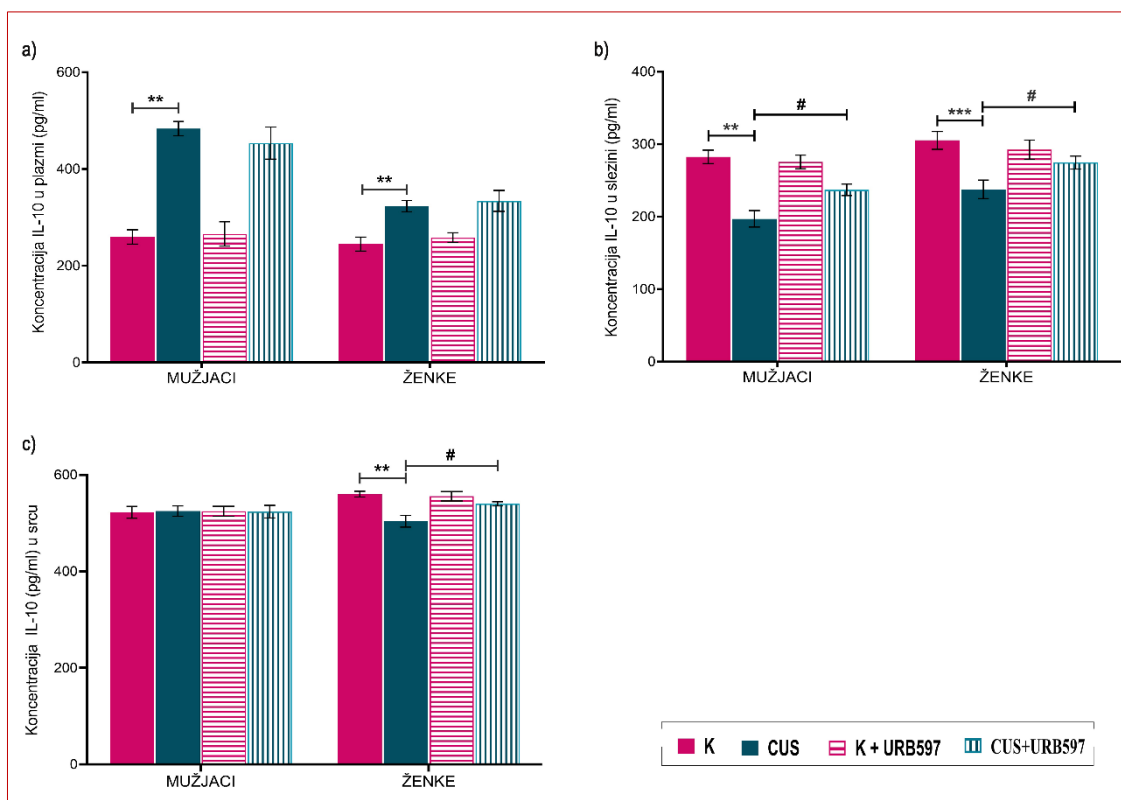
**Slika 32.** Efekat tretmana URB597 na koncentraciju proinflamatornog IL-6 citokina u plazmi (a), slezini (b), i levoj komori srca (c) pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; # $p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

#### 4.7.2. Koncentracija antiinflamatornog IL-10 citokina u plazmi, slezini i levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS

Na Slici 33 prikazan je efekat URB597 na koncentraciju antiinflamatornog citokina IL-10 u plazmi (a), slezini (b) i levoj komori srca (c) pacova oba pola izlaganih CUS. Na slici 33a se uočava povećanje koncentracije antiinflamatornog citokina IL-10 nakon 6-nedeljnog izlaganja CUS (mužjaci za 86%,  $p < 0,01$ ; ženke za 32%,  $p < 0,01$ ) i izostanak efekta URB597, kako u plazmi kontrolnih, tako i stresiranih pacova oba pola.

Šestonedeljno izlaganje CUS je dovelo do statistički značajnog smanjenja nivoa IL-10 u slezini mužjaka za 30% ( $p < 0,01$ ) i ženki za 22% ( $p < 0,001$ ). Rezultati dvofaktorskog ANOVA testa su pokazali značajan efekat tretmana sa URB597 (mužjaci:  $F_{(1,23)} = 77,787$ ,  $p < 0,001$ ; ženke:  $F_{(1,23)} = 26,178$ ,  $p < 0,001$ ) na nivo IL-10 u slezini. Rezultati *post-hoc* testa su pokazali da su da tretman inhibitorom URB597 je značajno povećao nivo ovog antiinflamatornog citokina u slezini hronično stresiranih pacova oba pola (Tukey test: CUS vs CUS+URB597;  $p < 0,05$ ), ali nije uticao na ovaj parametar u slezini životinja koje nisu izlagane stresorima (Slika 33b).

*Post-hoc* testom je utvrđeno da je hronično izlaganje različitim stresorima smanjilo koncentraciju antiinflamatornog IL-10 u levoj komori srca ženki pacova za 10% (Tukey test: K vs CUS;  $p < 0,01$ ) dok kod mužjaka nije imao efekta. Tretman stresiranih ženki, inhibitorom razgradnje endokanabinoida je ispoljio antiinflamatorno dejstvo, budući da je povećao koncentraciju ispitivanog citokina na nivo zabeležen u srcu ženki koje nisu bile izlagane CUS (Slika 33c).

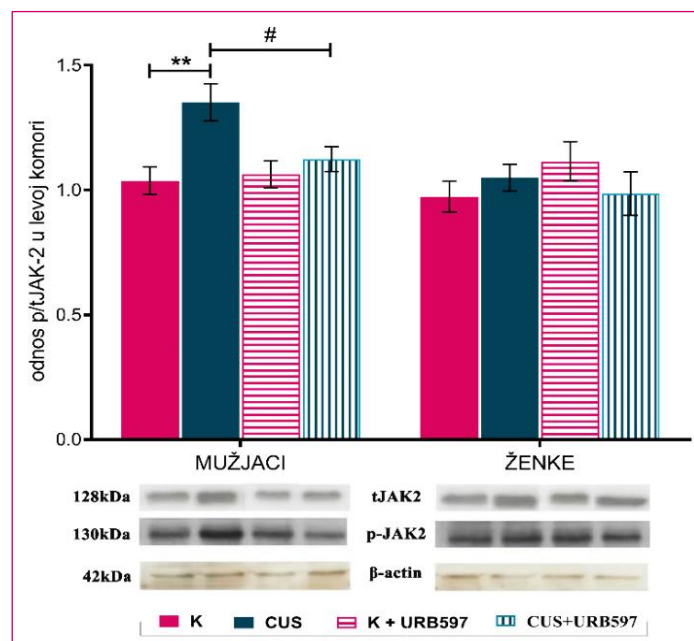


**Slika 33.** Efekat tretmana URB597 na koncentraciju antiinflamatornog IL-10 citokina u plazmi (a), slezini (b), i levoj komori srca (c) pacova oba pola izlaganih CUS. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; # $p < 0,05$  URB597 vs. rastvarač

#### 4.8. Dejstvo URB597 na aktivnost JAK-2/STAT3 signalnog puta u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS

##### 4.8.1. Aktivnost JAK2 u levoj komori pacova

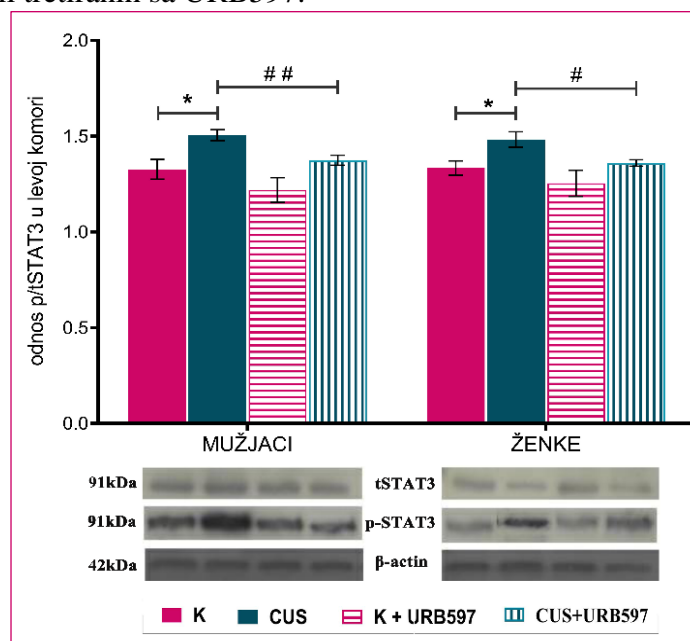
Receptori za interleukine spadaju u grupu receptora spregnutih sa tirozin kinazama, kao što su JAK, stoga je procenjivana njihova aktivnost u levoj komori srca posredstvom merenja relativnog odnosa fosforilisanane i ukupne forme (p/tJAK2) u istim eksperimentalnim uslovima. Rezultati prikazani na Slici 34 pokazuju da je hronično izlaganje stresu povećalo odnos p/tJAK2 za 30% (Tukey test: K vs CUS;  $p < 0,01$ ) samo u srcu mužjaka, i da je URB597 smanjio ovu vrednost za 14% (Tukey test: CUS vs CUS+URB597;  $p < 0,05$ ). CUS, tretman URB597 kao i njihova kombinacija nisu imali uticaja na aktivnost JAK2 u srcu ženki.



**Slika 34.** Efekat URB597 na odnos p/tJAK-2 u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*\*p<0,01 kontrole vs. CUS; #p<0,05 URB597 vs. rastvarač

#### 4.8.2. Aktivnost STAT3 transkripcionog faktora u levoj komori srca pacova

Aktivacija signalnog puta “nizvodno” od receptora za interleukine, je analizirana merenjem odnosa fosforilisane i ukupne forme transkripcionog faktora STAT u kardiomiocitima leve komore srca pacova izlaganih CUS i/ili tretiranih sa URB597.



**Slika 35.** Efekat URB597 na odnos p/t STAT3 u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS. U donjem delu slike su predstavljeni reprezentativni signali dobijeni Western blot metodom. Protein  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje uzoraka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=6). Statistička značajnost: \*p<0,05 kontrole vs. CUS; #p<0,05; ##p<0,01 URB597 vs. rastvarač



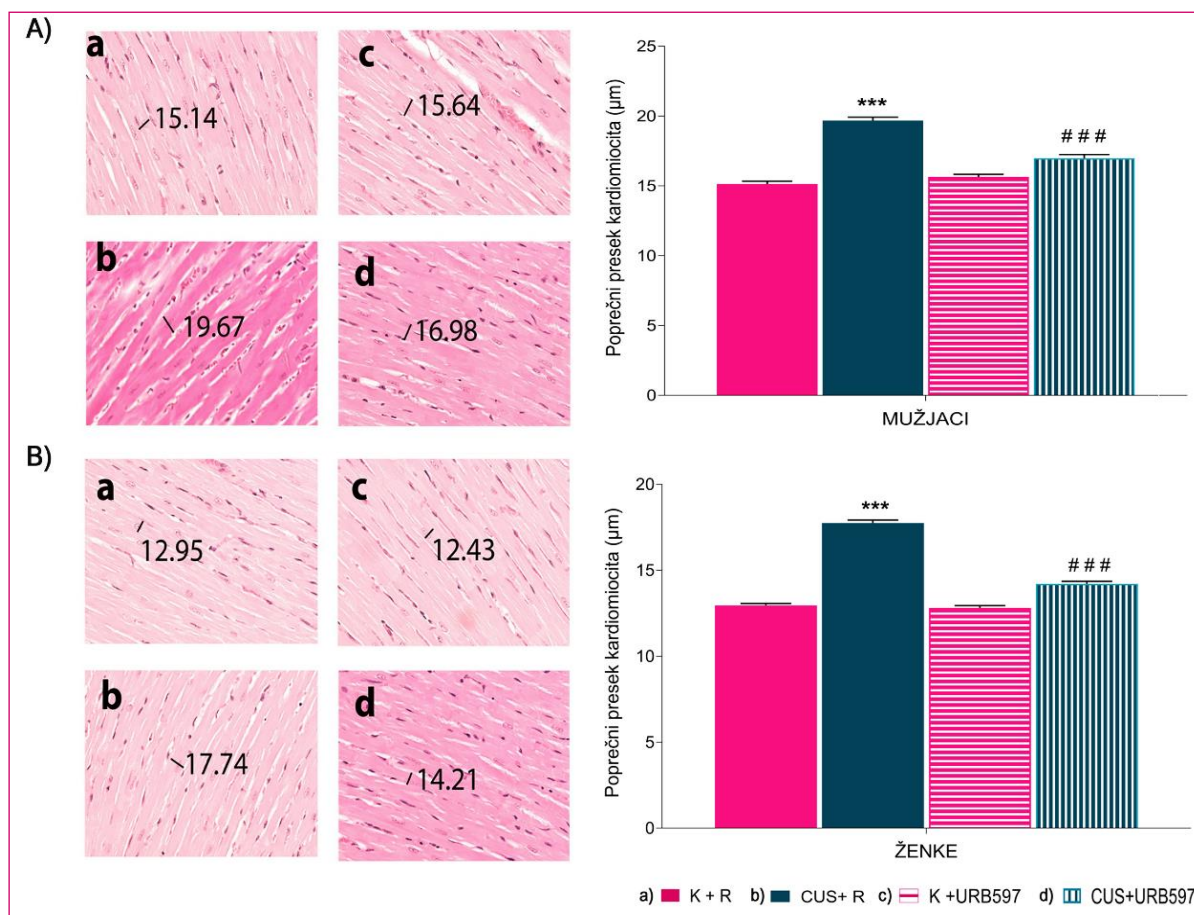
Kako se može videti na Slici 35, hronično izlaganje različitim nepredvidivim stresorima povećalo je stepen aktivacije STAT3 molekula u srcu pacova oba pola i to za 14% (Tukey test: K vs CUS;  $p < 0,05$ ) kod mužjaka, odnosno za 11% (Tukey test: K vs CUS;  $p < 0,05$ ) kod ženki.

Rezultati *post-hoc* testa pokazuju da je dvonedeljni tretman sa URB597 doveo do značajnog smanjenja odnosa p/t STAT3 u srcu stresiranih pacova oba pola (mužjaci za 8%,  $p < 0,01$ ; ženke za 15%,  $p < 0,05$ ).

#### 4.8.3. Histološka analiza srca

Histološka analiza srca je pokazala da se veličina kardiomiocita menjala samo u levoj komori srca ispitivanih životinja (rezultati nisu pokazani), te je za dalje analize korišćen samo taj deo srca. Analiza veličine kardiomiocita leve komore srca pacova izlaganih CUS je pokazala da je ova vrednost statistički značajno povećana kod pacova oba pola (ženke za 37%,  $p < 0,001$ ; mužjaci za 30%,  $p < 0,001$ ) u odnosu na veličinu kardiomiocita nestresiranih životinja.

Tretman URB597 je doveo do značajnog smanjenja prečnika kardiomiocita leve komore srca stresiranih pacova oba pola (Tukey test: CUS vs CUS+URB597;  $p < 0,001$ ), ali nije uticao na ovaj parametar kod pacova koji nisu bili izlagani CUS.



**Slika 36.** Reprezentativne fotografije preseka mišićnog tkiva leve komore srca pacova oba pola. A) mužjaci; B) ženke; Crne linije ukazuju na poprečni presek kardiomiocita. Brojevi predstavljaju prosečni poprečni prečnik kardiomiocita u svakoj od četiri grupa pacova izražen u mikrometrima, H&E, na skali od 100 µm i reprezentativni grafikon sa sumiranim podacima poprečnog preseka kardiomiocita. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3). Statistička značajnost: \*\*\* $p < 0,001$  kontrole vs. CUS; ### $p < 0,001$  URB597 vs. rastvarač

## 5 DISKUSIJA

Stres se opisuje kao stanje narušene homeostaze, koje može da podstakne nastanak brojnih oboljenja kao što su depresija, kardiovaskularna, autoimunska i druga oboljenja. Polne razlike su detektovane na svim nivoima odgovora na stres od početne percepcije stresa do ponašajnih, kognitivnih i afektivnih odgovora. Iako su antidepresivi generalno efikasni u smanjenju depresije, odavno su prepoznati njihovi negativni efekti na kardiovaskularni sistem (Lin i sar., 2012; Yekehtaz i sar., 2013) kao što je povećani srednji arterijski pritisak i aritmija (Ungvari i sar., 2019). Modulacija endokanabinoidnog sistema se pojavila kao novi pristup u terapiji različitih inflamatornih, neurodegenerativnih i kardiovaskularnih poremećaja (Toczek i Malinowska, 2018). Povećana dostupnost endogenih opioda, usled inhibicije aktivnosti enzima njihove degradacije FAAH, predstavlja obećavajući terapijski pristup u lečenju mnogih bolesti. Rezultati studija na životinjama pokazuju da ECs u mozgu podleže polno-specifičnim promenama (Zer-Aviv i Akirav, 2016; Vecchiarelli i sar., 2022), što sugerise da efikasnost terapije zasnovane na endokanabinoidima može takođe zavisiti od pola. Polno-specifične razlike koje se javljaju na nivou endokanabinoidne signalizacije mogu biti posledica različitih faktora kao što su: polno-specifična gustina kanabinoidnih receptora i koncentracija endokanabinoida u moždanim regionima (Atkinson i sar., 2010), direktan uticaj polnih hormona kao i promene tokom estrusnog ciklusa na endokanabinoidni sistem (Atkinson i sar., 2010; Tabatadze i sar., 2015; Ney i sar., 2018).

U skladu sa iznetim podacima, u ovom istraživanju je postavljen cilj da se ispita dejstvo URB597 - inhibitora aktivnosti FAAH na ponašanje životinja, količinu citokina, kateholamina, ekspresiju enzima sinteze i razgradnje, kao i transportera kateholamina u slezini, srži nadbubrežnih žlezda i srcu, kao i veličinu kardiomiocita i JAK/STAT signalni put u srcu životinja izlaganih CUS.

### 5.1. Dejstvo URB597 na parametre procene ispoljavanja ponašanja nalik depresivnom i anksioznom kod pacova oba pola izlaganih CUS

Depresija i anksioznost su najčešći psihički poremećaji. Poremećaji serotoninskog, GABA, noradrenalinskog, dopaminskog (Zarrindast i sar., 2011) i endokanabinoidnog sistema u osnovi su patogeneze depresije i anksioznosti (Viveros i sar., 2005; Gobira i sar., 2013). Poznato je da CUS dovodi do razvoja ponašanja nalik depresivnom (Song i sar., 2018). Delovanje CUS i URB597 na ispoljavanje ponašanja nalik depresivnom i anksioznom, procenjivano je testom zainteresovanosti za zaslađeni rastvor i testom otvorenog polja. Kao i ljudi, pacovi preferiraju zaslađenu hranu, koju kada im je dostupna, konzumiraju bez obzira na dnevne kalorijske potrebe organizma (Ahmed i sar., 2013). Test zainteresovanosti za zaslađene rastvore koristi se za procenu ispoljavanja anhedonije, jednog od simptoma depresije, jer smanjena zainteresovanost ukazuje na prisustvo anhedonije. Test otvorenog polja pruža uvid u ponašanje nalik anksioznom, jer se zasniva na postojanju realnog unutrašnjeg konflikta između prirodno usađene potrebe jedinke za istraživanjem novog okruženja i odbojnost prema otvorenom i svetlom prostoru (Gould, 2009). Ovim testom praćena je lokomotorna i istraživačka aktivnost životinje, kao mera anksioznosti, i vreme provedeno u timarenju.

U ovoj studiji korišćen je protokol Papa i Vilnera koji su razvili test preferencije zaslađenih rastvora za utvrđivanje simptoma anhedonije (Papp, 2012). Rezultati prikazani u ovom radu su pokazali da postoje polno-specifične razlike u količini konzumiranog rastvora. Naime, ženke koje nisu izlagane CUS, u odnosu na mužjake, su popile veću količinu zaslađene tečnosti što je u saglasnosti sa studijom McCall i saradnika koji su demonstrirali da ženke pokazuju veću preferenciju za zaslađenim rastvorom (McCall i sar., 2013). Međutim, nakon izlaganja stresu (4 i 6 nedelja) registrovana je smanjena zainteresovanost za zaslađeni rastvor kod pacova oba pola. Naši rezultati su delimično u saglasnosti sa rezultatima Dalla i sar. (2010) koji su pokazali da izlaganje CUS povećava anhedoniju

kod oba pola, ali s izraženijim odgovorom kod mužjaka nego kod ženki dok su druge studije, pokazale da su ženke pacova osjetljivije na hronično izlaganje stresorima i sklonije ispoljavanju depresivnog ponašanja (Xing i sar., 2013; Kokras i Dalla, 2014; Karisetty i sar., 2017; Primo i sar., 2023).

Tretman potentnim i selektivnim FAAH inhibitorom URB597, povećao je unos zaslađenog rastvora kod pacova oba pola izlaganih CUS ali nije imao uticaja na nestresirane životinje, što ukazuje da URB597 verovatno deluje na učesnike signalnih puteva uključenih u odgovor organizma na stres, a ne na centar za ispoljavanje hedonističkog ponašanja ili apetita. Poznato je da aktivacija CB1 receptora u paraventricularnom jedru hipotalamusa i *nucleus accumbens* dovodi do povećanja apetita (Jamshidi i Taylor, 2001; Kirkham i sar., 2002). Međutim, primenjena doza URB597 koja je korišćena u ovoj disertaciji, ne izaziva spektar farmakoloških odgovora tipičnih za aktivaciju CB1 receptora, kao što su katalapsija, hipotermija ili hiperfagija (Kathuria i sar., 2003).

Test otvorenog polja predstavlja jedan od najčešće korišćenih testova u svrhu ispitivanja obrazaca ponašanja nalik anksioznom (Hall, 1934). Nakon 6 nedelja izlaganja CUS uočeni su znaci anksioznosti kod pacova oba pola, što se manifestovalo smanjenim brojem prolaza kroz centar i kraćim vremenskim boravkom u centru polja. Hronični nepredvidivi stres utiče i na lokomotorno ponašanje (Palumbo i sar., 2020), što potvrđuju i rezultati ove studije ali samo kod mužjaka. S druge strane, timarenje predstavlja urođeno stereotipno ponašanje brige o krznu koje glodari ispoljavaju tokom 30-50% aktivne faze (Shiota i sar., 2015). Smanjeno timarenje i zapostavljanje krzna se povezuje sa smanjenim nivom DA u mozgu (Vestlund i sar., 2020) i prisustvom depresije (Yalcin i sar., 2008). Rezultati merenja parametara ponašanja u ovoj studiji, ukazuju da postoji polno-specifičan odgovor na stres i da su stresirani mužjaci ispoljili veći stepen depresivnog ponašanja. Uočene polno-specifične razlike u ponašanju moguće je objasniti činjenicom da mužjaci intenzivnije reaguju na stres/preteću situaciju, dok ženke ispoljavaju relativno diskretan odgovor na stres kako bi prvenstveno zaštitile potomstvo (Palanza, 2001; Deschamps i sar., 2003). Takođe treba istaći da su rezultati ukazali i na značajne polno-specifične razlike u obrascima ponašanja životinja koje nisu bile izlagane CUS. Nestresirane ženke su bile opreznije u istraživanju otvorenog polja, što se manifestovalo manjim ukupnim brojem pređenih kvadrata i brojem izdizanja na dve noge u odnosu na mužjake. Izdizanja i veći stepen istraživanja su znak impulsivnosti i spremnosti na izlaganje riziku, čemu su mužjaci evolutivno skloniji (Gray i McNaughton, 2003).

Rezultati ove disertacije ukazuju da je URB597 uticao na lokomociju kod životinja oba pola. Tretman ne samo da je povećao broj vertikalnih izdizanja kod stresiranih životinja, već je povećao ukupan broj pređenih kvadrata tokom 5 minuta, kako kod stresiranih tako i kod kontrolnih jedinki što ukazuje na povećano istraživanje i lokomociju. Rezultati Patel i Hillard (2006) pokazuju da je davanje agonista CB1 receptora, značajno povećalo lokomociju na testu izdignutog lavirinta. Osim toga, Bambico i sar. (2010) su primetili da se miševi kojima je eliminisan gen za FAAH frekventnije izdižu u testu otvorenog polja. Poznato je da jedinjenja koja izazivaju euforična stanja, kao što su 3,4-metilendioksi-metamfetamin (MDMA; "ekstazi"), ali i  $\Delta^9$ -THC, agonisti endokanabinoidnih receptora u manjim dozama povećavaju izdizanja kod glodara (Mechan i sar., 2002; Wiley, 2003; Wiley i Burston, 2014). Na osnovu prikazanih rezultata može se pretpostaviti da URB597 pokazuje anksiolitička svojstva, što je u saglasnosti sa povećanjem aktivnosti FAAH u bademastim jedrima anksioznih C57/Bl6 miševa izlaganih hroničnom stresu (Hill i sar., 2013). Takođe, tretman URB597 je produžio vremenski period tokom kojeg su stresirani mužjaci, ali ne i ženke, proveli u centru polja i timarenju, što je u saglasnosti sa našim prethodno objavljenim rezultatima o odsustvu uticaja URB597 na povećani stepen anksioznosti kod stresiranih ženki (Janković i sar., 2020). Polno-specifične razlike u ponašanju, se mogu objasniti razlikama u gustini i funkciji CB1 receptora. Naime, poznato je da je gustina CB1 receptora veća u bademastim jedrima mužjaka pacova (Castelli i sar., 2013), a slični rezultati dobijeni su i kod ljudi (Van Laere i sar., 2009). S druge strane, veća sklonost ženki pacova u ispoljavanju hedonističkog i zavisnog ponašanja se povezuje sa gustinom i funkcijom CB1 receptora u određenim regionima mozga (Castelli i sar., 2014).

Analizom parametara procene ponašanja životinja može se zaključiti da su anksiolitički i antidepressivni efekti tretmana URB597 polno-specifični.

## 5.2. Dejstvo URB597 na koncentraciju, metabolizam i transportere kateholamina u nadbubrežnim žlezdama pacova oba pola izlaganih CUS

Nadbubrežne žlezde imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze, oslobađajući glukokortikoide iz kore i kateholamine iz srži (Goldstein, 2010). Pacijenti oboleli od depresije imaju uvećanu zapreminu nadbubrežnih žlezda (Nemeroff i sar., 1992; Rubin i sar., 1995). Odavno je poznato da su nadbubrežne žlezde kod ženki izrazito veće u odnosu na mužjake (Bastida i sar., 2006). Bielohuby i saradnici (2007) su pokazali da je uprkos sličnoj telesnoj masi kod novorođenih životinja, masa nadbubrežnih žlezda ženki veća, već nakon treće nedelje starosti. Ovi autori su utvrdili da se povećava broj i zapremina ćelija *zone fasciculata* kore nadbubrega ženki miševa i sledstveno povećava sekrecija kortikosterona u odnosu na mužjake. Rezultati ove doktorske disertacije takođe pokazuju da se mase nadbubrežnih žlezda razlikuju kod mužjaka i ženki koji nisu izlagani CUS, odnosno da su te vrednosti znatno veće kod ženki.

CUS u trajanju od 42 dana doveo je do značajnog uvećanja mase nadbubrežnih žlezda ženki u odnosu na mužjake, kod kojih se masa nije menjala, što ukazuje na polno-specifičan odgovor na nepredvidive stresore. Ovaj nalaz je delimično u saglasnosti sa rezultatima Trentani i sar. (2003) koji su, ispitujući dejstvo hroničnog izlaganja stopala električnom šoku, ustanovili hipertrofiju nadbubrežnih žlezda pacova oba pola, s tim što je povećanje mase nadbubrežnih žlezda kod ženki značajno veće u odnosu na mužjake. McFadden i sar. (2011) su takođe pokazali da CUS u trajanju od 21 dan izaziva uvećanje mase nadbubrežnih žlezda, koje je znatno veće kod ženki nego kod mužjaka. Saglasno rezultatima ove teze, Goodson i sar. (2017) i Marin i sar. (2007) su takođe ustanovili da CUS ne dovodi do promene mase nadbubrežnih žlezda mužjaka pacova. Nasuprot tome, Urlich i sar. (2006b) su, pokazali da dvonedeljno izlaganje nepredvidivim stresorima dovodi do značajnog povećanja mase nadbubrežnih žlezda mužjaka pacova. Opisane razlike u efektima CUS na masu nadbubrežnih žlezda mužjaka mogu se objasniti različitim intenzitetom, vrstom i trajanjem stresa, kao i činjenicom da su ženke znatno osetljivije na dejstvo stresora u odnosu na mužjake (Dalla i sar., 2005). Rezultati ovog eksperimenta takođe upućuju i na pretpostavku da nepromenjena masa nadbubrežnih žlezda mužjaka može ukazivati na potencijalnu adaptaciju HPA osovine nakon ponovljenog izlaganja stresorima tokom dužeg vremenskog perioda.

Povećanje mase nadbubrežnih žlezda ženki posledica je kontinuirane izloženosti stresorima, što rezultira povećanim odgovorom srži nadbubrežnih žlezda odnosno povećanom ekspresijom enzima sinteze kateholamina. U ovom eksperimentalnom modelu CUS je uzrokovao povećanje koncentracije DA, NA i A u nadbubrežnim žlezdama ženki, a smanjenje koncentracije NA u nadbubrežnim žlezdama mužjaka, praćeno nepromenjenim vrednostima svih kateholamina u plazmi stresiranih ženki, a povećanjem koncentracije NA u plazmi mužjaka. Zajedno ovi rezultati ukazuju da je povećanje mase nadbubrežnih žlezda ženki verovatno rezultat aktivacije kateholaminskog sistema srži, iako se ne može isključiti mogućnost da je povećanje nastalo i usled promena u kori nadbubrežnih žlezda.

U literaturi nema podataka kako tretman URB597 utiče na masu nadbubrežnih žlezda. Stoga je prvi put pokazano da je dvonedeljni tretman sa URB597 smanjio masu nadbubrežnih žlezda hronično stresiranih ženki pacova, dok nije uticao na masu nadbubrežnih žlezda mužjaka.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da u analiziranom animalnom modelu depresije, koji podrazumeva hronično izlaganje životinja nepredvidivim stresorima, CUS doveo samo do

značajnog povećanja mase nadbubrežnih žlezdi ženki i da je tretman sa URB597 smanjio ovaj parametar na nivo zabeležen kod kontrolnih životinja koje nisu izlagane CUS. Kod mužjaka CUS i URB597 nisu imali efekte na masu nadbubrežnih žlezda.

U roku od nekoliko sekundi po početku delovanja stresora A i NA se oslobađaju iz srži nadbubrežnih žlezda i ostvaruju brojne efekte na ponašanje, metabolizam i kardiovaskularni sistem (Romero i Butler, 2007). Podaci iz literature pokazuju da je koncentracija kateholamina veća za oko 50% u nadbubrežnim žlezdama ženki u odnosu na mužjake pacova (Carlsson i Carlsson, 1989). Polno-specifične razlike u regulaciji promotorskog regiona TH u LC (locus coeruleus) uočili su Thanky i sar. (2002). Naime, kod ženki je pokazano da je estrogen povećao transkripciju TH, dok je kod mužjaka smanjio, potvrđujući postojanje polnih razlika u regulaciji ekspresije ovog biosintetskog enzima (Thanky i sar., 2002). Takođe je pokazano da se u okviru promotorskog regiona TH gena eksprimira i E2 $\alpha$  receptor koji vezivanjem estradiola aktivira gensku ekspresiju (Maharjan i sar., 2010). Između ostalog, prisustvo (Fernandez i sar. (1988)) ali i odsustvo (Drake i sar. (1998)) promene koncentracije kateholamina tokom različitih faza estrusnog ciklusa su zabeleženi. U ovoj disertaciji, tokom eksperimenata je praćen estrusni ciklus ženki pacova, koje su žrtvovane u diestrusnoj i metestrusnoj fazi ciklusa, kada je najmanja koncentracija estrogena u sistemske cirkulaciji.

Dobijeni rezultati su pokazali da je koncentracija A i DA veća u nadbubrežnim žlezdama ženki pacova koje nisu bile izlagane CUS u odnosu na mužjake, a da nije bilo razlike u koncentraciji NA među životinjama različitog pola. Istraživanja Yue i saradnika (2022) su pokazala da postoji polni dimorfizam na nivou sekretornih vezikula hromatofinskih ćelija, što je navelo autore da zaključe da se kod mužjaka oslobađa veća količina neurotransmitera u odnosu na ženke pacova, što nije u saglasnosti sa našim rezultatima.

Izlaganje ekperimentalnih životinja nepredvidivim stresorima različite prirode izazvalo je i polno-specifičan simpato-adrenomedularni odgovor: povećanje koncentracije svih ispitivanih kateholamina u nadbubrežnim žlezdama ženki, a smanjenje koncentracije NA u nadbubrežnim žlezdama mužjaka praćeno njegovim povećanjem u krvi. Koncentracija kateholamina u plazmi stresiranih ženki pacova je ostala nepromenjena. Smanjena količina NA u nadbubrežnim žlezdama u prisustvu povećane koncentracije u plazmi stresiranih mužjaka ukazuje na povećanu sekreciju, ali bi mogla biti povezana i sa detektovanom smanjenom ekspresijom membranskog transportera NET u ćelijama srži. Odsustvo promene u koncentraciji DA i A u nadbubrežnim žlezdama mužjaka pacova se može objasniti nepromenjenom ekspresijom TH i PNMT. Naime, enzimi koji učestvuju u metabolizmu kateholamina obezbeđuju njihovu optimalnu koncentraciju u tkivima. Ekspresija enzima koji učestvuju u biosintezi kateholamina, kao i COMT, ostala je nepromenjena dok je ekspresija MAO-A bila povećana u nadbubrežnim žlezdama mužjaka izlaganih CUS. Stoga je izlaganje mužjaka nepredvidim stresorima uticalo na povećanje sekrecije i degradacije NA, kao i smanjenje njegovog preuzimanja u ćelije srži nadbubrežnih žlezda. Nasuprot, u nadbubrežnim žlezdama ženki je bila povećana ekspresija enzima sinteze kateholamina i sledstveno koncentracija svih analiziranih kateholamina, dok se enzimi razgradnje (MAO-A i COMT) i NET nisu promenili. Razlozi postojanja polnih razlika u odgovoru na stresore nisu dovoljno istraženi. Osim uloge polnih hormona, ispitivana je i uloga gena lociranih na polnim hromozomima, kao što je SRY (*engl.* sex-determining region on the Y chromosome), koji se eksprimira u mnogim tkivima, uključujući nadbubrežne žlezde i srce. Prvobitne studije ukazuju da SRY reguliše transkripciju gena za TH i MAO-A, i time potencijalno učestvuje u polno zavisnoj regulaciji sinteze i razgradnje kateholamina (Lee i Harley, 2012). Mehanizam kojim URB597 dovodi do ovih promena je za sada nepoznat.

Endokanabinoidi su važni regulatori mehanizama koji učestvuju u prevazilaženju poremećaja izazvanih stresom (Hill, 2011). Ziegler i saradnici (2010) su pokazali da aktivacija CB1 i CB2 receptora anandamidima inhibira oslobađanje kortikosterona. Takođe, rezultati različitih studija su

pokazali da ligand kanabinoidnog receptora  $\Delta^9$ -THC moduliše aktivnost TH, glavnog enzima uključenog u biosintezu kateholamina (Bonnin i sar., 1993; González i sar., 2005). Opisani efekti primene  $\Delta^9$ -THC na koncentraciju kateholamina kod ljudi su različiti, poput odsustva promene ali i povećanja koncentracije A u urinu (Hollister i sar., 1970; Weiss i sar., 1972). Niederhoffer i sar. (2001) su pokazali da kanabinoidi inhibiraju lučenje A iz nadbubrežnih žlezda zeca, što utiče i na smanjenje koncentracije A u plazmi. Sve veći broj rezultata sugerše da farmakološki agensi koji pospešuju endogenu kanabinoidnu signalizaciju mogu da modulišu i oslobađanje kateholamina (Wyrofsky, 2020). Dejstvo endokanabinoida je strogo kontrolisano njihovom degradacijom. Kao što je već spomenuto ranije, degradacija endokanabinoida uglavnom se odvija posredstvom FAAH i MAGL (Muccioli i sar., 2010), čijom inhibicijom se povećava njihova količina u sinapsi. URB597 koji specifično inhibira FAAH povećava koncentraciju A u mozgu pacova i miša (Kathuria i sar., 2003; Tarzia i sar., 2003). Međutim, na koji način endokanabinoidi deluju na sintezu, transport i razgradnju kateholamina u srži nadbubrežnih žlezda još nije poznato.

Rezultati ove disertacije su pokazali da je dvonedeljni tretman URB597 stresiranih mužjaka smanjio koncentraciju NA u plazmi i srži nadbubrežnih žlezda na kontrolne vrednosti, očigledno posredstvom povećanog preuzimanja i smanjene razgradnje, jer tretman nije uticao na ekspresiju enzima sinteze kateholamina.

Rezultati takođe pokazuju da je tretman URB597 ženki smanjio stresom povećanu koncentraciju kateholamina u nadbubrežnim žlezdama verovatno posredstvom smanjenja ekspresije biosintetskih enzima TH, DBH i PNMT, dok nije uticao na ekspresiju enzima razgradnje i NET.

Poznato je da u promotorskom regionu PNMT gena postoji mesto vezivanja glukokortikoida (*eng.* glucocorticoid responsive element), kao i da glukokortikoidi povećavaju ekspresiju PNMT enzima odgovornog za sintezu adrenalina (Sabban i Kvetnansky, 2001). Smanjena koncentracija adrenalina pod dejstvom URB597 je u saglasnosti sa prethodno pokazanim uticajem CB1R agonista na smanjenje sinteze kortikosterona u kori nadbubrežnih žlezda (Ziegler i sar., 2010) i posledično smanjene sinteze adrenalina (Niederhoffer i sar., 2001).

Sumirajući prikazane rezultate u ovom animalnom modelu depresije, može se zaključiti da postoji polno-specifičan odgovor na izlaganje različitim stresorima, kada je reč o sadržaju kateholamina u nadbubrežnim žlezdama, odnosno kod ženki je povećana sinteza kateholamina, a kod mužjaka sekrecija. Tretman URB597 je kod stresiranih pacova oba pola smanjio koncentraciju kateholamina u nadbubrežnim žlezdama na kontrolne vrednosti, na polno-specifičan način. Kod mužjaka je koncentracija kateholamina smanjena na kontrolni nivo povećanim preuzimanjem i smanjenom razgradnjom kateholamina, a kod ženki smanjenom sintezom kateholamina.

### **5.3 Dejstvo URB597 na koncentraciju, metabolizam i transportere kateholamina u slezini pacova oba pola izlaganih CUS**

Poznato je da citokini mogu indukovati promene u aktivnosti SNS i stopi oslobađanja NA u limfoidnim organima. Rühl i sar. (1994) su pokazali da u *in vitro* uslovima IL-6 stimuliše oslobađanje NA iz simpatičkih nervnih završetaka. Promene u simpatičkoj aktivnosti dovode do metaboličkih promena koje mogu biti odgovorne za nastanak i trajanje inflamacije. Osim što su simpatički inervisane, imunske ćelije slezine poseduju sposobnost *de novo* sinteze kateholamina (Laukova i sar., 2013). Neke studije ukazuju da T i B limfociti sintetišu kateholamine (Qiu i sar., 2005; Flierl i sar., 2008; Jung i sar., 2016; Honke i sar., 2022) kao i molekule uključene u mehanizme za aktivan transport DA (Amenta i sar., 2001) i NA (Gordon i Barnes, 2003).

Rezultati ove studije su pokazali da je CUS izazvao značajno smanjenje koncentracije NA u slezini ženki pacova, dok kod mužjaka zapaženo smanjenje nije bilo statistički značajno. Smanjena koncentracija NA u slezini stresiranih ženki može biti posledica detektovanog smanjenja ekspresije NET transportera, a nepromenjene ekspresije biosintetskih i enzima razgradnje kateholamina. Koncentracija A se povećala, za razliku od DA čija se koncentracija nije menjala u slezini pacova oba pola životinja izlaganih CUS. Roggero i saradnici (2016) su pokazali smanjenu koncentraciju NA istovremeno sa smanjenjem gustine noradrenalinskih nervnih vlakana u slezini mužjaka miševa inficiranih *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) i povećanom aktivnošću HPA osovine, pri čemu su ove promene bile izrazitije kod mužjaka u odnosu na ženke. Povećana koncentracija A u slezini stresiranih pacova oba pola rezultat je značajnog povećanja ekspresije PNMT enzima, iako je ekspresija biosintetskih enzima TH i DBH ostala nepromenjena, kao i ekspresija enzima razgradnje kateholamina MAO-A i COMT. Povećana ekspresija iRNK PNMT i sledstveno povećanje koncentracije A je detektovano u beloj pulpi slezine pacova nakon ponavljano izlaganja imobilizaciji (Jelokova i sar., 2002). PNMT se aktivira u srži nadbubrežnih žlezda pod uticajem glukokortikoida (Jiang i Bohn, 1989), pa se može pretpostaviti da se pod uticajem kortikosterona povećava ekspresija i u slezini usled hroničnog izlaganja nepredvidivim stresorima (Jelokova i sar., 2002). Silberman i saradnici (2003) su pokazali da je akutno izlaganje stresoru ograničenog kretanja, značajno povećalo nivo kortikosterona u serumu kao i nivo kateholamina u slezini.

Za razliku od promena u ekspresiji enzima sinteze i razgradnje, mogu se uočiti polno-specifične razlike u ekspresiji kateholaminskih transportera u slezini pod uticajem CUS, odnosno povećanje ekspresije DAT i NET u slezini mužjaka, a smanjenje ekspresije NET u slezini ženki. Dobijeni rezultati ukazuju na smanjeno preuzimanje NA u slezini ženki i povećano preuzimanje NA i DA u slezini mužjaka tokom izlaganja CUS. Povećana ekspresija DAT i NET kod hronično stresiranih mužjaka može predstavljati kompenzacioni mehanizam usled povećane potrebe za kateholaminima u slezini u uslovima stresa kada je nepromenjena količina NA i DA, kao i ekspresija enzima njihove sinteze. Smanjena ekspresija NET kod hronično stresiranih ženki može dovesti do smanjene količine NA u slezini i povećanja nivoa NA u intersticijskom prostoru. U uslovima povećane količine NA dolazi do pojačane razgradnje i oksidativnog stresa, što doprinosi oštećenju nervnih završetaka. Elkhatib i saradnici (2021) su pokazali da izlaganje miševa hroničnom stresu socijalnog poraza dovodi do deinervacije slezine i smanjene količine NA. Precizni molekularni mehanizmi između funkcije slezine i razvoja psihijatrijskih poremećaja povezanih sa stresom su i dalje nepoznati.

Tretman URB597 doveo je do povećanja nivoa NA i NET u slezini ženki i mužjaka, dok nije uticao na količinu DA, A kao i na ekspresiju DAT, enzima sinteze i razgradnje u slezini pacova oba pola. Ovi rezultati ukazuju da je povećano preuzimanje kateholamina potencijalni uzrok povećane koncentracije NA u slezini stresiranih ženki tretiranih sa URB597, i da endokanabinoidi mogu imati značajnu ulogu u regulaciji oslobađanja i ponovnog preuzimanja NA. Uočeni efekti povećanog preuzimanja NA najverovatnije predstavljaju kompenzacioni mehanizam koji štiti noradrenalinske neurone koji inervišu slezinu od štetnih efekata NA.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je u animalnom modelu depresije značajno smanjen sadržaj NA u slezini ženki i da povećana količina endokanabinoida povećava njegovu preuzimanje i na taj način obnavlja njegovu količinu što doprinosi poboljšanju funkcionisanja imunskog sistema.

#### 5.4. Dejstvo URB597 na koncentraciju, metabolizam i transportere kateholamina u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS

Veliki broj literaturnih podataka pokazuje da simpatička aktivacija predstavlja glavnu komponentu u patogenezi srčanih oboljenja. Hronično izlaganje stresorima doprinosi razvoju kardiovaskularnih oboljenja i može uticati na pojavu srčane insuficijencije, infarkta miokarda i moždanog udara (Torpy i sar., 2007). Rezultati ove disertacije, pokazuju da je CUS povećao relativnu masu srca ženki ali ne i mužjaka, što ukazuje na polno-specifični uticaj stresa na morfologiju srca. Međutim, suprotno našim rezultatima, Nagaraja i Jeganthan (1999) su pokazali da imobilizacija, stres prinudnog plivanja, agregacija i socijalna izolacija u trajanju od 7 dana dovode do povećanja mase srca mužjaka Albino pacova. Hipertrofija kardiomiocita predstavlja adaptivni odgovor srca na sve oblike srčanih bolesti, uključujući hipertenziju, mehaničko opterećenje, infarkt miokarda, srčane aritmije i endokrine poremećaje (Frey i Olson, 2003). Nakon šest nedelja hroničnog izlaganja nepredvidivim stresorima prečnik kardiomiocita leve komore srca ženki i mužjaka pacova se povećao u odnosu na grupu životinja koja nije izlagana stresorima. Nije uočeno povećano prisustvo kolagenih vlakana u vanćelijskom matriksu leve komore stresiranih pacova oba pola. CUS nije uticao na navedene histološke parametre u desnoj pretkomori i komori kao i levoj pretkomori srca pacova oba pola. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Luong i sar. (2021) koji su pokazali da izlaganja hroničnom blagom stresu (CUMS) kod C57BL/6 miševa izaziva blago zadebljanje zida leve komore. Ovi podaci su u saglasnosti sa studijama koja pokazuju komorbiditet depresije i kardiovaskularnih oboljenja, što potvrđuje validnost CUS, kao animalnog modela depresije u ovoj doktorskoj tezi.

U sklopu istraživanja ove disertacije, zabeležen je uticaj dvonedeljnog tretmana URB597 na smanjenje ukupne mase srca kao i veličine kardiomiocita u levoj komori srca stresiranih mužjaka i ženki pacova. Literaturni podaci pokazuju kardioprotektivno dejstvo kanabinoida, što potvrđuju rezultati ove teze. Nedavno je pokazano da kanabidiol (CBD) smanjuje povećanu širinu kardiomiocita leve komore srca kod pacova sa spontanom hipertenzijom (Pędzińska-Betiuk, 2021). U ranije objavljenim studijama, koje su se bavile ispitivanjem efekta kanabinoida kod hipertenzivnih pacova, zabeleženo je da URB597 normalizuje krvni pritisak (Godlewski i sar., 2010; Polak i sar., 2016). Međutim, treba imati na umu odsustvo literaturnih podataka o tačnim mehanizmima koji se odnose na efekte URB597 na srce.

Dobijeni rezultati pokazuju da CUS nije doveo do promena u količini NA u levoj komori srca stresiranih ženki, ali je smanjio vrednost ovog parametra u srcu mužjaka što je u saglasnosti sa studijom Carlsson i Carlsson (1989) gde je pokazano da izlaganje stresu uzrokuje polno-specifične promene. Smanjena koncentracija NA u levoj komori srca hronično stresiranih mužjaka pacova, mogla bi biti posledica smanjene gustine noradrenalinskih simpatičkih vlakana ili smanjene količine enzima koji učestvuju u njegovoj sintezi. Eksperimenti su pokazali da u levoj komori srca pacova muškog pola, hronični nepredvidivi stresori ne dovode do značajnih promena ekspresije TH, ali smanjuje ekspresiju DBH enzima u levoj komori srca. Iako se TH smatra "rate limiting" enzimom, DBH je neophodan za sintezu NA iz DA (Weinshilboum i Axelrod, 1971). Pored količine NA, i ekspresija TH i DBH, koriste se kao markeri dejstva noradrenalina u organima koji su simpatički inervisani. U skladu sa ovim rezultatom, smanjena ekspresija DBH enzima u levoj komori srca hronično stresiranih mužjaka, mogla bi biti uzrok smanjene koncentracije NA u tom tkivu. Osim toga, povećana je ekspresija MAO-A, enzima koji razgrađuje NA. Za razliku od mužjaka, kod hronično stresiranih ženki pacova, koncentracija NA kao i ekspresija TH i DBH su ostale nepromenjene, uz istovremeno smanjenje NET u levoj komori srca. Održavanje koncentracije NA u srcu zavisi od njegovog oslobađanja, ali i ponovnog preuzimanja, koje se u srcu uglavnom vrši posredstvom NET transportera (više od 90%) dok transporter koji se ne eksprimira u neuronima (EMT) ima malu ulogu (Kreusser i sar., 2017). Smanjeno preuzimanje NA u završetke simpatičkih vlakana povezano je sa nastankom kardiovaskularnih bolesti (Shanks i sar., 2013), kao i sa lošom prognozom kod pacijenata sa srčanim zastojem i povećava mogućnost iznenadne smrti (Kreusser i sar., 2017).



Rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da CUS nije menjao ekspresiju COMT, ali je povećao ekspresiju MAO-A u levoj komori srca pacova oba pola, što verovatno doprinosi smanjenju sadržaja NA u srcu. Povećana aktivnost MAO-A može da ima štetne efekte na funkciju srca (Villeneuve i sar., 2013). Naime monoamino oksidaze su glavni izvor reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) koji mogu imati ključnu ulogu u srčanoj insuficijenciji (Kaluderčić i sar., 2011; Datta i Bhattacharjee, 2020). Takođe je pokazano da je ishemija srca kod ljudi povezana sa povećanom aktivnošću obe izoforme MAO enzima u levoj i desnoj komori (Manni i sar., 2016).

Dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj tezi ukazuju da je CUS smanjio koncentraciju A i ekspresiju PNMT u levoj komori srca pacova oba pola, što je u saglasnosti sa studijama drugih autora. Stres izazvan svakodnevnim plivanjem tokom 6 nedelja značajno je smanjio aktivnost PNMT u srcu (Ruppl i sar., 1983) dok su miševi kojima je eliminisan gen za PNMT razvili povećani krvni pritisak, koncentričnu hipertrofiju leve komore srca i oslabljeni inotropni odgovor na dobutamin nakon izlaganja hroničnom vežbanju tokom 6 nedelja (Mendes i sar., 2018).

Literaturni podaci pokazuju da endokanabinoidi imaju kardioprotektivni efekat. Garza-Cervantes i sar. (2020) su pokazali da CBD pokazuje kardioprotektivni efekat, sa antioksidativnim i antiinflamatornim svojstvima. Ovi efekti se ostvaruju aktivacijom ili inhibicijom različitih receptora i ciljnih molekula EC sistema. Pretpostavlja se, da su FAAH inhibitori antihipertenzivni agensi, jer je njihova primena kod spontano hipertenzivnih pacova (SHRs) normalizovala krvni pritisak i smanjila srčanu kontrakciju (Godlewski i sar., 2010). U našem eksperimentalnom modelu tretman URB597 je povećao i time vratio na kontrolni nivo koncentraciju NA kao i ekspresiju DBH, PNMT, i NET u srcu stresiranih mužjaka. Smanjenjem ekspresije, nivo MAO-A je sveden na kontrolne vrednosti. U levoj komori srca stresiranih ženki, URB597 je ispoljio kardioprotektivne efekte povećanjem ekspresije NET, a smanjenjem MAO-A. Studije Rudža i sar. (2012) su pokazale da aktivacija presinaptičkih CB1 receptora u ranoj fazi infarkta miokarda inhibira oslobađanje NA iz simpatičkih nervnih završetaka i time doprinosi inhibiciji tahikardije. Pored kanabinoidnih receptora CB1 i CB2, TRPV1 (Lupin'ski i sar., 2011) je takođe uključen u kardiovaskularne efekte kanabinoida. Ranija studija Mazora i saradnika (1982) je ukazala da THC ispoljava dozno-zavisni inhibicioni efekat na aktivnost MAO-A enzima. Dodatno, postoje dokazi koji ukazuju da endokanabinoidi ostvaruju korisne efekte posredstvom otklanjanja ROS, koje stvara MAO. Ribeiro i saradnici (2012) su pokazali da je selektivni agonist CB2 receptora AM1241, potpuno blokirao stvaranje ROS u odgovoru na tretman lipopolisaharidima (LPS) u BV-2 ćelijama. Takođe je pokazano da aktivacija CB2 receptora smanjuje oštećenja nastala oksidativnim stresom u različitim tipovima tkiva, uključujući mozak (Aso i sar., 2013), bubrege (Mukhopadhyay i sar., 2010), srce (Montecucco i sar., 2009) i jetru (Zet i sar., 2013).

Na osnovu prikazanih rezultata može se pretpostaviti da je URB597 ostvario polno-specifičan kardioprotektivni efekat u animalnom modelu depresije, povećavajući sintezu i preuzimanje, a smanjujući razgradnju kateholamina u srcu mužjaka, dok je kod ženki imao efekta samo na preuzimanje i razgradnju monoamina.

## **5.5. Dejstvo URB597 na koncentraciju proinflamatornih i antiinflamatornih citokina u plazmi i slezini pacova oba pola izlaganih CUS**

Mnogobrojni literaturni podaci ukazuju da različiti stresori utiču na morfologiju i funkciju slezine. Hernandez i saradnici (2013) su kod pacova izlaganih stresu ograničenog kretanja, opisali morfološke promene u veličini folikula u beloj pulpi slezine. Zatim, kod WKY pacova tretiranih hidrokortizonom uporedo sa stresom ograničenog kretanja, smanjila se bela i povećala crvena pulpa slezine (Hernandez i sar., 2013). Zhang i sar. (2019) su pokazali značajno povećanje zapremine i mase slezine miševa

kojima je svakodnevno u kavez ubacivana nepoznata jedinka iste vrste. Vignjević i sar. (2015) i Talerova i sar. (2013), su pokazali da stres ograničenog kretanja povećava masu slezine. Rezultati ove teze takođe ukazuju da je masa slezine pacova oba pola bila povećana nakon izlaganja CUS u trajanju od 6 nedelja. Međutim, tretman URB597 stresiranih životinja ispoljio je polno-specifičan efekat na masu slezine. Naime tretman URB597 stresiranih životinja je smanjio masu slezine mužjaka, dok kod ženki ovo smanjenje nije dostiglo vrednosti pre izlaganja CUS. S obzirom da postoje oskudni literaturni podaci o uticaju endokanabinoida i CUS na masu slezine, dobijeni rezultati po prvi put ističu ulogu endokanabinoida na masu slezine u *in vivo* uslovima kod pacova oba pola.

Prethodno je pokazano da u stanju depresije i hroničnog stresa (Noushad i sar., 2021) u krvi dolazi do povećanja koncentracije proinflammatoryh citokina IL-6 (O' Brien, 2006), IL1- $\beta$  (Himmerich i sar., 2019) i TNF- $\alpha$  (Dowlati i sar., 2010), proteina akutno faznog odgovora kao što je CRP (Li i sar., 2021), broja ćelija prirodnih ubica (NK) (Pace i sar., 2006), ali se smanjuje koncentracija antiinflammatoryh citokina, kao što je IL-10 (Hiles i sar., 2012).

Rezultati ove studije pokazali su da je koncentracija IL-6 i IL-10 u plazmi mužjaka i ženki pacova izlaganih CUS značajno veća u odnosu na vrednosti zabeležene kod kontrolnih životinja koje nisu izlagane CUS. Povećanje pro- i antiinflammatoryh citokina IL-4, IL-6, IL-10 i TNF u serumu dobili su i Himmerich i saradnici (2013), nakon izlaganja mužjaka pacova stresorima prinudnog plivanja i ograničenog kretanja, kao i López-López i saradnici (2016), koji su registrovali povećan nivo IL-10 u krvi mužjaka pacova posle 40 dana izlaganja CUMS, a povećan nivo IL-6 već nakon 20 dana izlaganja stresorima (López-López i sar., 2016).

Međutim, u našoj studiji, CUS je doveo do značajnog povećanja koncentracije IL-6 i smanjenja IL-10 u slezini pacova oba pola, što nije do sada pokazano. Pokazano je da periferna zapaljenjska reakcija može dovesti do razvoja upale CNS posredstvom nekoliko mehanizama kao što su: narušavanje integriteta krvno-moždane barijere, prolaz imunskih ćelija kao i aktivacija glijskih ćelija (Hassamal, 2023). Gotoh i sar. (2012) su pokazali da u slezini gojaznih pacova dolazi do oksidativnog stresa i smanjene sinteze IL-10 što rezultira hroničnom inflamacijom hipotalamusa. Mnoge studije su ukazale na značaj antiinflammatoryh citokina u modulaciji depresivnog ponašanja. Roque i saradnici (2009) su uspeali kod miševa kojima je eliminisan gen za IL-10 da izazovu promene u ponašanju nalik depresivnom. Tretman IL-10 kod ovih miševa značajno je smanjio ili doveo do gubitka simptoma ponašanja nalik depresivnom.

Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji pokazali su da u analiziranom animalnom modelu depresije, koji podrazumeva hronično izlaganje životinja nepredvidivim stresorima, detektovane promene koncentracije proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina u plazmi i slezini nisu polno-zavisne. Nasuprot, Bekhbat i saradnici (2019) su pokazali da hronični stres povećava IL-6 u plazmi adolescentnih mužjaka pacova. Steptoe i saradnici (2018) ukazali su na značajnu ulogu SNS u povećanju IL-6 tokom odgovora na stresore, odnosno oni su pokazali da blokada  $\beta$  kateholaminskih receptora propranololom dovodi do smanjenja koncentracije IL-6 u plazmi tokom odgovora na akutni mentalni stres, ali samo kod muškaraca.

Tretman pacova selektivnim inhibitorom FAAH, nije imao uticaja na koncentraciju IL-6 u plazmi i slezini, ali je značajno povećao koncentraciju antiinflammatoryh citokina IL-10 u slezini hronično stresiranih pacova oba pola. Prethodno je pokazano da endokanabinoidi učestvuju u procesima koji regulišu tranziciju mikroglije sa inflamatornog na antiinflammatoryh fenotip (Young i Wright, 2022). Correa i saradnici (2010) su pretpostavili da su antiinflammatoryh efekti endokanabinoida posredovani produkcijom antiinflammatoryh citokina proinflammatoryh pomoćničkim ćelijama Th17 (Jackson i sar., 2014) koje sekretuju IL-17a, IL-17f, IL-21, IL-22, GM-CSF (De Simone i sar., 2014).

Na osnovu dobijenih rezultata ove disertacije može se zaključiti da endokanabinoidi doprinose antiinflammatoryh odgovoru smanjenjem mase slezine i povećanjem koncentracije IL-10 u slezini pacova oba pola.

## 5.6. Dejstvo URB597 na koncentraciju proinflamatornih i antiinflamatornih citokina i JAK-2/STAT3 signalni put u levoj komori srca pacova oba pola izlaganih CUS

Eksperimentalni i klinički podaci ukazuju da inflamacija ima značajnu ulogu u nastanku i razvoju srčane insuficijencije. Srčana hipertrofija je praćena inflamacijom i pojačanim oslobađanjem citokina koji dovode do hipertrofije kardiomiocita (Zhao i sar., 2017). Klinički podaci sugerišu da se koncentracija IL-6 u cirkulaciji povećava kod pacijenata sa težim oblicima srčane insuficijencije i može predstavljati prognostički marker kod pacijenata sa kongestivnom srčanom insuficijencijom (Hirota i sar., 2004). Takođe je pokazano da kardiomiociti mogu da sintetišu i oslobađaju proinflamatorne citokine koji zatim aktiviraju endotelne i imunske ćelije, kao i fibroblaste, koji sledstveno regrutuju imunske ćelije odgovorne za hipertrofiju i oštećenje srca (Ninh i Brown, 2022). Zatim je pokazano da delecija gena za IL-6 može ublažiti hipertrofiju srca izazvanu hirurškom konstrikcijom transverzalnog luka aorte (Gwechenberger i sar., 1999; Zhao i sar., 2016). Mnogobrojni podaci ukazuju da su citokini uključeni u patogenezu srčanih oboljenja. Kardiomiocite kao i druge ćelije u srcu, osim inflamatornih proizvode citokine i ekspresiraju njihove receptore u uslovima stresa (Yoshida i sar., 2005). Takođe IL-10 može direktno uticati na kardiomiocite pošto je potvrđena ekspresija receptora za IL-10 (IL-10R) u ovim ćelijama (Stafford i sar., 2020). Rezultati Verma i saradnika (2012) su pokazali da aplikacija IL-10 smanjuje hipertrofiju, dok su Stafford i sar. (2020) demonstrirali da signalizacija preko IL-10 receptora može imati zaštitni efekat smanjenjem hipertrofije srca izazvane konstrikcijom transverzalnog dela aorte. Pacijenti sa srčanom insuficijencijom imaju niži nivo IL-10 u plazmi u poređenju sa zdravim pacijentima (Lindberg i sar., 2008; Stumpf i sar., 2008). Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj studiji može se pretpostaviti da hipertrofiji leve komore srca prisutnoj kod stresiranih životinja oba pola doprinosi promena u odnosu između pro- (IL-6) i antiinflamatornih citokina (IL-10), koji se promenio u korist inflamatornog miljea. Ovu pretpostavku podržavaju kliničke i pretkliničke studije, kao i studije na životinjama, koje ukazuju na korelaciju između povećane koncentracije IL-6 u srcu (Meléndez i sar., 2010) i cirkulaciji (Raymond i sar., 2001; Matsubara i sar., 2011) i visokog rizika razvoja hipertrofije leve komore, dilatacije, disfunkcije i fibroze srca.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je u analiziranom animalnom modelu depresije, CUS indukovao povećanu koncentraciju IL-6 u levoj komori srca ženki i mužjaka pacova, što je u skladu sa nedavnim podacima Luonga i saradnika (2021) koji su pokazali da CUMS povećava nivo iRNK za IL-6 u srcu. CUS je doveo do smanjenja IL-10 u levoj komori srca ženki, dok je njegov nivo ostao nepromenjen u levoj komori srca mužjaka pacova.

Tretman URB597 je smanjio koncentraciju IL-6 u levoj komori srca pacova oba pola, a povećao koncentraciju IL-10 u levoj komori srca stresiranih ženki, što ukazuje na pojačani antiinflamatorni odgovor. Ozdemira je sa saradnicima (2014) takođe konstatovao antiinflamatorno svojstvo endokanabinoida. CBD, kanabigerol i THC ispoljavaju antiinflamatorni efekat i smanjuju nivo proinflamatornih citokina TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, i INF $\gamma$  (Verrico i sar., 2020; Henshaw i sar., 2021), a povećavaju ekspresiju IL-10 u cirkulaciji. Kanabinoidni agonist WIN55 je povećao nivo IL-10 u plazmi miševa tretiranih lipopolisaharidima (Smith i sar., 2000).

JAK-2/STAT3 signalni put je evolutivno očuvan i može biti aktiviran citokinima, interferonima, faktorima rasta i sličnim molekulima (Yerabolu i sar., 2021). Poremećaj JAK-2/STAT3 signalnog puta može uzrokovati srčanu hipertrofiju (Fang i sar., 2018), ishemiju miokarda i razvoj srčane insuficijencije (Fan i sar., 2022). Aktivacija JAK/STAT signalnog puta je registrovana u prisustvu hipertenzije i stanju akutnog infarkta miokarda (Frias i sar., 2007; Booz i sar., 2002). Yu i saradnici (2003) su pokazali da IL-6-indukovana aktivacija JAK-2/STAT3, povećava ekspresiju iNOS i produkciju NO u kardiomiocitima odraslih pacova. IL-6 doprinosi hipertrofiji kardiomiocita (Hirota i sar., 1995, Hohensinner i sar., 2011) posredstvom STAT3 molekula čija se ekspresija povećava u

hipertrofiji srca izazvanoj hipoksijom (Kumar i sar., 2019). Fresnais i sar. (2010) su pokazali da je kompleks IL-6/sIL-6R pospešio brzu fosforilaciju STAT3Tyr<sup>705</sup> u pretkomorama miocita odraslih pacova, odnosno da IL-6 indukuje srčanu hipertrofiju posredstvom sIL-6R (trans signalni put). Štaviše, IL-6 trans-signalizacija povećala je sintezu proteina, ekspresiju c-fos gena i sekreciju natriuretskog peptida tipa B, tri markera srčane hipertrofije. Uočena je aktivacija JAK-2/STAT3 signalnog puta i kod hipertrofije srca miša izazvane konstrikcijom transverzalnog dela aorte, kao i da AG490, inhibitor JAK-2 kinaze, blokira razvoj koncentrične hipertrofije (Beckles i sar., 2007). Međutim, IL-6 ne izaziva hipertrofiju neonatalnih kardiomiocita u kulturi u odsustvu sIL-6R. Ovo jasno ukazuje, na to da IL-6 aktivira različite unutarćelijske signale u zavisnosti od toga da li se vezuje za IL-6R ili sIL-6R. Bez obzira da li deluju preko IL-6R ili sIL-6R, oba puta aktivacije uključuju JAK/STAT signalni put (Hirota i sar., 1995). Osim aktivacije JAK-2/STAT3 signalnog puta, IL-6 može aktivirati Ras/MAPK (Ogata i sar., 1997), PI3K signalni put, kao i proteinski kompleks nukleusni faktor kapa B (NF-Kb) (Brasier, 2010; Su i sar., 2017). Takođe, literaturni podaci ukazuju da se u uslovima hroničnog nepredvidivog stresa povećava nivo IL-6 (Bin-Jaliah, 2017; Munshi i sar., 2020; Agarwal i sar., 2021). Luong i saradnici (2021) su demonstrirali da se nakon izlaganja životinja CMS, povećava ekspresija IL-6 iRNK a smanjuje ekspresija neurotrofnog moždanog faktora (*engl.* brain derived neurotrophic factor - BDNF), istovremeno sa povećanjem površine poprečnog preseka kardiomiocita.

Rezultati ove disertacije su pokazali da je CUS izazvao polno-specifičnu aktivaciju JAK/STAT signalnog puta. Naime nakon izlaganja životinja CUS, nivo fosforilisanih STAT3 u citosolu kardiomiocita leve komore pacova oba pola se povećao, dok se nivo fosforilisanih JAK povećao samo u srcu mužjaka. Može se pretpostaviti da je u kardiomiocitima stresiranih ženki fosforilacija i aktivacija STAT3 posredovana drugim kinazama nezavisno od JAK-2. Willey i sar. (2008) su pokazali u *in vivo* modelu hipertrofije da se fosforilacija STAT3 postiže preko porodice TEC proteina, kao što je BMX kinaza.

Dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj tezi pokazuju da je URB597 smanjio aktivaciju JAK-2 u srcu mužjaka, dok je kod stresiranih pacova oba pola smanjio odnos fosforilisanih i ukupnih STAT3 molekula na vrednost zabeleženu kod kontrolnih životinja. Može se zaključiti da uočeno smanjenje aktivacije signalnog puta IL-6/JAK-2/STAT3 pod dejstvom URB597, ukazuje na antiinflamatorno dejstvo endokanabinoida koje ima ulogu u mehanizmu remisije srčane hipertrofije, budući da je URB597 smanjio veličinu kardiomiocita leve komore srca stresiranih pacova oba pola.

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj tezi možemo zaključiti da tretman URB597 utičući na koncentraciju proinflamatornih i antiinflamatornih citokina ostvaruje svoje kardioprotektivno dejstvo nezavisno od pola pacova.

## 6 ZAKLJUČCI

**Hronično izlaganje pacova nepredvidivim stresorima (animalni model depresije) dovelo je do:**

- ispoljavanja simptoma ponašanja nalik depresivnom i anksioznom, koje je bilo izraženije kod mužjaka;
- povećanja relativne mase slezine kod oba pola, a nadbubrežnih žlezda i srca samo kod ženki; kao i uvećanja kardiomiocita leve komore srca pacova oba pola;
- polno- i tkivno-specifičnih razlika u koncentraciji kateholamina i to: povećanja svih kateholamina u nadbubrežnim žlezdama ženki, a smanjenja NA u nadbubrežnim žlezdama mužjaka praćeno njegovim povećanjem u plazmi; smanjenja koncentracije NA u srcu mužjaka, A u srcu životinja oba pola; kao i smanjenja koncentracije NA u slezini ženki i povećanja A u slezini pacova oba pola;
- povećanja ekspresije svih ispitivanih enzima sinteze KA u nadbubrežnim žlezdama ženki, smanjenja u levoj komori srca mužjaka, kao i povećanja ekspresije PNMT u slezini životinja kod oba pola;
- smanjenja ekspresije NET u nadbubrežnim žlezdama mužjaka, slezini i levoj komori srca ženki, a povećanja samo u slezini mužjaka;
- povećanja koncentracije proinflamatornog IL-6 u plazmi, slezini i levoj komori srca pacova oba pola;
- povećanja koncentracije IL-10 u plazmi, ali smanjenja ovog antiinflamatornog citokina u slezini životinja oba pola, i srcu ženki;
- aktivacije JAK samo u levoj komori srca mužjaka, a STAT u srcu pacova oba pola.

**Inhibitor enzima razgradnje endokanabinoida, URB597, je kod pacova hronično izlaganih nepredvidivim stresorima:**

- ispoljio antidepresivno i anksiolitičko dejstvo kod pacova oba pola;
- smanjio povećane mase nadbubrežnih žlezda i srca ženki, kao i slezine mužjaka;
- smanjio veličinu kardiomiocita leve komore srca kod životinja oba pola;
- smanjio povećane koncentracije svih kateholamina u svim ispitivanim tkivima, osim koncentracije A u srcu i slezini pacova oba pola;
- smanjio povećan nivo ekspresije enzima sinteze u nadbubrežnim žlezdama ženki, kao i ekspresije enzima razgradnje MAO-A u srcu životinja oba pola;

- povećao smanjen nivo ekspresije noradrenalinskog transportera NET u nadbubrežnim žlezdama mužjaka, slezini ženki i srcu pacova oba pola;
- ispoljio antiinflamatorno dejstvo, budući da je povećao koncentraciju antiinflamatornog citokina (IL-10) u srcu ženki i slezini životinja oba pola, a smanjio nivo proinflamatornog citokin (IL-6) u srcu pacova oba pola;
- smanjio povećanu aktivnost JAK/STAT signalnog puta u srcu životinja oba pola.

**Na osnovu rezultata mogu se izvesti generalni zaključci da je URB597 kod stresiranih pacova ispoljio:**

- antidepresivna i anksiolitička dejstva kod životinja oba pola;
- polno-specifičan efekat na aktivnost kateholaminskog sistema u nadbubrežnim žlezdama, slezini i srcu pacova
- antiinflamatorni odgovor u slezini životinja oba pola i srcu ženki;
- kardioprotektivno dejstvo kod pacova oba pola

## LITERATURA

**An, J., Ribeiro, R. C., Webb, P., Gustafsson, J. Å., Kushner, P. J., Baxter, J. D., & Leitman, D. C. (1999).** Estradiol repression of tumor necrosis factor- $\alpha$  transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15161-15166.

**Alesci, S., Martinez, P. E., Kelkar, S., Ilias, I., Ronsaville, D. S., Listwak, S. J., Ayala, A.R., Licinio, J., Gold, H.K., Kling, M.A., Chrousos, G.P., & Gold, P. W. (2005).** Major depression is associated with significant diurnal elevations in plasma interleukin-6 levels, a shift of its circadian rhythm, and loss of physiological complexity in its secretion: clinical implications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(5), 2522-2530.

**Agarwal, S., Presciutti, A., Verma, J., Pavol, M. A., Anbarasan, D., Brodie, D., ... & Stern, Y. (2018).** Women have worse cognitive, functional, and psychiatric outcomes at hospital discharge after cardiac arrest. *Resuscitation*, 125, 12-15.

**Aggarwal, S., & Mortensen, O. V. (2017).** Overview of monoamine transporters. *Current protocols in pharmacology*, 79(1), 12-16.

**Ahmed, S. H., Guillem, K., & Vandaele, Y. (2013).** Sugar addiction: pushing the drug-sugar analogy to the limit. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16(4), 434-439.

**Anagnostou, V. K., Doussis-Anagnostopoulou, I., Tiniakos, D. G., Karandrea, D., Agapitos, E., Karakitsos, P., & Kittas, C. (2007).** Ontogeny of intrinsic innervation in the human thymus and spleen. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(8), 813-820.

**Amenta, F., Bronzetti, E., Cantalamessa, F., El-Assouad, D., Felici, L., Ricci, A., & Tayebati, S. K. (2001).** Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, 117(1-2), 133-142.

**Aso, E., & Ferrer, I. (2014).** Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Frontiers in pharmacology*, 5, 37.

**Atkinson, H. C., Leggett, J. D., Wood, S. A., Castrique, E. S., Kershaw, Y. M., & Lightman, S. L. (2010).** Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis circadian rhythm by endocannabinoids is sexually diergic. *Endocrinology*, 151(8), 3720-3727.

**Axelrod, J. (1962).** Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 237(5), 1657-1660.

**Ayele, T. M., Muche, Z. T., Teklemariam, A. B., Kassie, A. B., & Abebe, E. C. (2022).** Role of JAK2/STAT3 Signaling Pathway in the Tumorigenesis, Chemotherapy Resistance, and Treatment of Solid Tumors: A Systemic Review. *Journal of Inflammation Research*, 15, 1349.

**Bai, A., Lu, N., Guo, Y., Chen, J., i Liu, Z. (2009).** Modulation of inflammatory response via  $\alpha$ 2-adrenoceptor blockade in acute murine colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 156(2), 353-362.

**Bambico, F. R., Cassano, T., Dominguez-Lopez, S., Katz, N., Walker, C. D., Piomelli, D., & Gobbi, G. (2010).** Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and

serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 35(10), 2083-2100.

**Bastida, C. M., Cremades, A., Castells, M. T., López-Contreras, A. J., López-García, C., Sánchez-Mas, J., i Penafiel, R. (2007).** Sexual dimorphism of ornithine decarboxylase in the mouse adrenal: influence of polyamine deprivation on catecholamine and corticoid levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(4), E1010-E1017.

**Bátkai, S., Pacher, P., Osei-Hyiaman, D., Radaeva, S., Liu, J., Harvey-White, J., Offertáler, L., Mackie, K., Rudd, A., Bukoski, R., & Kunos, G. (2004).** Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*, 110(14), 1996-2002.

**Beckles, D. L., Mascareno, E., & Siddiqui, M. A. Q. (2006).** Inhibition of Jak2 phosphorylation attenuates pressure overload cardiac hypertrophy. *Vascular pharmacology*, 45(6), 350-357.

**Bekhbat, M., Howell, P. A., Rowson, S. A., Kelly, S. D., Tansey, M. G., & Neigh, G. N. (2019).** Chronic adolescent stress sex-specifically alters central and peripheral neuro-immune reactivity in rats. *Brain, behavior, and immunity*, 76, 248-257.

**Bellinger, D. L., Millar, B. A., Perez, S., Carter, J., Wood, C., ThyagaRajan, S., Molinaroa, C., Lubahn C., & Lorton, D. (2008).** Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cellular immunology*, 252(1-2), 27-56.

**Bermudez, E. A., Rifai, N., Buring, J., Manson, J. E., & Ridker, P. M. (2002).** Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(10), 1668-1673.

**Bielohuby, M., Herbach, N., Wanke, R., Maser-Gluth, C., Beuschlein, F., Wolf, E., & Hoeflich, A. (2007).** Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time-and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.

**Bin-Jaliah, I. (2017).** Quercetin inhibits chronic stress-induced myocardial infarction in rats. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1363-1369.

**Blessing, E. M., Steenkamp, M. M., Manzanares, J., i Marmar, C. R. (2015).** Cannabidiol as a potential treatment for anxiety disorders. *Neurotherapeutics*, 12(4), 825-836.

**Bjerkeset, O., Nordahl, H. M., Mykletun, A., Holmen, J., i Dahl, A. A. (2005).** Anxiety and depression following myocardial infarction: gender differences in a 5-year prospective study. *Journal of psychosomatic research*, 58(2), 153-161.

**Bonaccorso, S., Marino, V., Biondi, M., Grimaldi, F., Ippoliti, F., & Maes, M. (2002).** Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *Journal of affective disorders*, 72(3), 237-241.

**Bouman, A., Heineman, M. J., & Faas, M. M. (2005).** Sex hormones and the immune response in humans. *Human reproduction update*, 11(4), 411-423.

**Borges da Silva, H., Fonseca, R., Pereira, R. M., Cassado, A. D. A., Álvarez, J. M., & D'Império Lima, M. R. (2015).** Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections. *Frontiers in immunology*, 6, 480.



- Bouchard, J. F., Lépicier, P., & Lamontagne, D. (2003).** Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sciences*, 72(16), 1859-1870.
- Booz, G. W., Day, J. N., & Baker, K. M. (2002).** Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(11), 1443-1453.
- Bonnin, A., Fernandez-Ruiz, J. J., Martin, M., Rodriguez de Fonseca, F., Hernandez, M. L., & Ramos, J. A. (1993).**  $\delta$ 9-Tetrahydrocannabinol affects mesolimbic dopaminergic activity in the female rat brain: interactions with estrogens. *Journal of Neural Transmission/General Section JNT*, 92(2), 81-95.
- Bradshaw, H. B., Rimmerman, N., Krey, J. F., & Walker, J. M. (2006).** Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(2), R349-R358.
- Brasier, A. R. (2010).** The nuclear factor- $\kappa$ B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovascular research*, 86(2), 211-218.
- Calcia, M. A., Bonsall, D. R., Bloomfield, P. S., Selvaraj, S., Barichello, T., & Howes, O. D. (2016).** Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*, 233(9), 1637-1650.
- Cannavo, A., & Koch, W. J. (2017).** Targeting  $\beta$ 3-adrenergic receptors in the heart: selective agonism and  $\beta$ -blockade. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 69(2), 71.
- Cannon, W. B. (1929).** Pharmacological injections and physiological inferences. *Science*, 70(1821), 500-501.
- Carlsson, M., & Carlsson, A. (1989).** Effects of mild stress on adrenal and heart catecholamines in male and female rats. *Journal of neural transmission*, 77(2), 217-226.
- Carnevali, L., Vacondio, F., Rossi, S., Callegari, S., Macchi, E., Spadoni, G., Bedini, A., Rivara, S., Mor, M., & Sgoifo, A. (2015).** Antidepressant-like activity and cardioprotective effects of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB694 in socially stressed Wistar Kyoto rats. *European Neuropsychopharmacology*, 25(11), 2157-2169.
- Castelli, P. M., Fadda, P., Casu, A., Sabrina Spano, M., Casti, A., Fratta, W., & Fattore, L. (2014).** Male and female rats differ in brain cannabinoid CB1 receptor density and function and in behavioural traits predisposing to drug addiction: effect of ovarian hormones. *Current pharmaceutical design*, 20(13), 2100-2113.
- Cesta, M. F. (2006).** Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 34(5), 455-465.
- Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Loría, F., Spagnolo, A., Docagne, F., Di Marzo, V., & Guaza, C. (2010).** Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB2 receptors: Roles of ERK1/2, JNK, and NF- $\kappa$ B. *Glia*, 58(2), 135-147.
- Cui, R. (2015).** A systematic review of depression. *Curr Neuropharmacol*, 13(4), 480.

- Curtin, N. M., Boyle, N. T., Mills, K. H., & Connor, T. J. (2009).** Psychological stress suppresses innate IFN- $\gamma$  production via glucocorticoid receptor activation: Reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain, behavior, and immunity*, 23(4), 535-547.
- Cha, Y. M., Jones, K. H., Kuhn, C. M., Wilson, W. A., & Swartzwelder, H. S. (2007).** Sex differences in the effects of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol on spatial learning in adolescent and adult rats. *Behavioural pharmacology*, 18(5-6), 563-569.
- Chhatar, S., & Lal, G. (2021).** Role of adrenergic receptor signalling in neuroimmune communication. *Current Research in Immunology*, 2, 202-217.
- Chrousos, G. P. (2000).** The stress response and immune function: clinical implications. *Ann NY Acad Sci*, 917(8), 38-67.
- Craft, R. M., Wakley, A. A., Tsutsui, K. T., & Laggart, J. D. (2012).** Sex differences in cannabinoid 1 vs. cannabinoid 2 receptor-selective antagonism of antinociception produced by  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol and CP55, 940 in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 340(3), 787-800.
- Dantzer, R., O'connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008).** From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews neuroscience*, 9(1), 46-56.
- Dalla, C., Antoniou, K., Drossopoulou, G., Xagoraris, M., Kokras, N., Sfikakis, A., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005).** Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience*, 135(3), 703-714.
- Dalla, C., Pitychoutis, P. M., Kokras, N., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2010).** Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviours in the rat. *Biological basis of sex differences in psychopharmacology*, 97-118.
- Datta, C., & Bhattacharjee, A. (2020).** Role of monoamine oxidase A (MAO-A) in cardiac aging. *Journal of Cardiology and Cardiovascular Sciences*, 4(2).
- De Simone, V., Franze, E., Ronchetti, G., Colantoni, A., Fantini, M. C., Di Fusco, D., Sica, GS., Sileri P., MacDonald, TT., Pallone1, F., Monteleone, G., & Stolfi, C. (2015).** Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- $\alpha$  synergistically activate STAT3 and NF- $\kappa$ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 34(27), 3493-3503.
- Deak, T., Bellamy, C., & D'Agostino, L. G. (2003).** Exposure to forced swim stress does not alter central production of IL-1. *Brain Research*, 972(1-2), 53-63.
- Devane W, Dysarz F, Johnson M, Melvin L, Howlett A (1988).** Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology* 34: 605 - 613.
- Deschamps, S., Woodside, B., & Walker, C. D. (2003).** Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. *Journal of neuroendocrinology*, 15(5), 486-497.
- Dobрева, Z. G., Miteva, L. D., & Stanilova, S. A. (2009).** The inhibition of JNK and p38 MAPKs downregulates IL-10 and differentially affects c-Jun gene expression in human monocytes. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 31(2), 195-201.

- Duman, R. S., Aghajanian, G. K., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2016).** Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nature medicine*, 22(3), 238-249.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006).** A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry*, 59(12), 1116-1127.
- Di Marzo, V. (2008).** Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nature reviews Drug discovery*, 7(5), 438-455.
- Di Marzo, V. (2018).** New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(9), 623-639.
- Dhabhar, F. S. (2009).** Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 300-317.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010).** A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*, 67(5), 446-457.
- Drake, K., Gateva, E., Deutsch, J., & Cohen, W. R. (1998).** Sex differences in the adrenal catecholamine response to hypoglycemia in rats. *Metabolism*, 47(1), 121-124.
- Dronjak, S., Ondriska, M., Svetlovska, D., Jezova, D., & Kvetnansky, R. (2002).** Effects of novel stressors on plasma catecholamine levels in rats exposed to long-term cold. *Stress neural, endocrine and molecular studies*, 83-89.
- Dronjak, S., Gavrilović, L., Filipović, D., & Radojčić, M. B. (2004).** Immobilization and cold stress affect sympatho–adrenomedullary system and pituitary–adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology & Behavior*, 81(3), 409-415.
- Drory, Y., Kravetz, S., Hirschberger, G., & Israel Study Group on First Acute Myocardial Infarction. (2003).** Long-term mental health of women after a first acute myocardial infarction. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 84(10), 1492-1498.
- Ebert, S. N., & Thompson, R. P. (2001).** Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circulation research*, 88(1), 117-124.
- Eisenhofer, G. (2001).** The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacology & therapeutics*, 91(1), 35-62.
- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (2004).** Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological reviews*, 56(3), 331-349.
- Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., & Vizi, E. S. (2000).** The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews*, 52(4), 595-638.
- Elkhatib, S. K., Moshfegh, C. M., Watson, G. F., Schwab, A. D., Katsurada, K., Patel, K. P., & Case, A. J. (2021).** Splenic Denervation Attenuates Repeated Social Defeat Stress-Induced T Lymphocyte Inflammation. *Biological psychiatry global open science*, 1(3), 190-200.

- Endler, N. S. (1997).** Stress, Anxiety and coping: the multidimensional interaction model. *Canadian Psychology/Psychologie canadienne*, 38(3), 136.
- Evans, G. S. W. (1950).** Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 2(4670), 105.
- Evans, J. M., Ziegler, M. G., Patwardhan, A. R., Ott, J. B., Kim, C. S., Leonelli, F. M., & Knapp, C. F. (2001).** Gender differences in autonomic cardiovascular regulation: spectral, hormonal, and hemodynamic indexes. *Journal of Applied Physiology*, 91(6), 2611-2618.
- Fan, C. L., Liang, S., Ye, M. N., Cai, W. J., Chen, M., Hou, Y. L., Guo, J. & Dai, Y. (2022).** Periplocymarin alleviates pathological cardiac hypertrophy via inhibiting the JAK2/STAT3 signalling pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 26(9), 2607-2619.
- Fang, X., Liu, Y., Lu, J., Hong, H., Yuan, J., Zhang, Y., ... & Ye, J. (2018).** Protocatechuic aldehyde protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391(12), 1373-1385.
- 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.
- Fattore, L., & Fratta, W. (2010).** How important are sex differences in cannabinoid action?. *British journal of pharmacology*, 160(3), 544-548.
- Fattore, L., Spano, M. S., Altea, S., Angius, F., Fadda, P., & Fratta, W. (2007).** Cannabinoid self-administration in rats: sex differences and the influence of ovarian function. *British journal of pharmacology*, 152(5), 795-804.
- Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santucci Chadha, A., Baracchi F., Girouard H., Misoch S., Giacobini E., Depypere, E., & Hampel, H. (2018).** Sex differences in Alzheimer disease—the gateway to precision medicine. *Nature Reviews Neurology*, 14(8), 457-469.
- Feldman, D. S., Carnes, C. A., Abraham, W. T., & Bristow, M. R. (2005).** Mechanisms of disease:  $\beta$ -adrenergic receptors—alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2(9), 475-483.
- Felger, J. C., & Miller, A. H. (2014).** Neurotherapeutic implications of brain-immune interactions. *Neuropsychopharmacology*, 39(1), 242.
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., & Livnat, S. (1985).** Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 135(2 Suppl), 755s-765s.
- Fernandez-Ruiz, J. J., Martinez-Arrieta, R., Hernandez, M. L., & Ramos, J. A. (1988).** Possible direct effect of prolactin on catecholamine synthesis and release in rat adrenal medulla: in vitro studies. *Journal of endocrinological investigation*, 11(8), 603-608.
- Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., & Piomelli, D. (2005).** Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(1), 352-358.

**Fitzpatrick, P. F. (1999).** Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annual review of biochemistry*, 68, 355.

**Flierl, M. A., Rittirsch, D., Nadeau, B. A., Chen, A. J., Sarma, J. V., Zetoune, F. S., McGuire, S.R., List, R.P., Day, D.E., Hoesel, L.M., Gao, H., Rooijen, N.V., Huber-Lang, M. H., Neubig, R.R., & Ward, P. A. (2007).** Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*, 449(7163), 721-725.

**Flierl, M. A., Rittirsch, D., Nadeau, B. A., Sarma, J. V., Day, D. E., Lentsch, A. B., Huber-Lang, M.S., & Ward, P. A. (2009).** Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PloS one*, 4(2), e4414.

**Flierl, M. A., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2008).** Catecholamines—crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora’s box? *Molecular medicine*, 14(3), 195-204.

**Frias, M. A., Rebsamen, M. C., Gerber-Wicht, C., & Lang, U. (2007).** Prostaglandin E2 activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: a role in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research*, 73(1), 57-65.

**Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003).** Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews*.

**Frey, N., & Olson, E. N. (2003).** Cardiac Hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol*, 65, 45-79.

**Fowler, C. J. (2013).** Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. *The FEBS journal*, 280(9), 1895-1904.

**Furman, D., Hejblum, B. P., Simon, N., Jojic, V., Dekker, C. L., Thiébaud, R., ... & Davis, M. M. (2014).** Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(2), 869-874.

**Gardner, R. T., & Habecker, B. A. (2013).** Infarct-derived chondroitin sulfate proteoglycans prevent sympathetic reinnervation after cardiac ischemia-reperfusion injury. *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7175-7183.

**Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, M., Fur, G.L., & Casellas, P. (1995).** Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry*, 232(1), 54-61.

**Garza-Cervantes, J. A., Ramos-González, M., Lozano, O., Jerjes-Sánchez, C., & García-Rivas, G. (2020).** Therapeutic applications of cannabinoids in cardiomyopathy and heart failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

**Gazal, M., Jansen, K., Souza, L. D., Oses, J. P., Magalhães, P. V., Pinheiro, R., Ghisleni, G., Quevedo, L., Kaster, M.P., Kapczinski, F., & Silva, R. A. D. (2015).** Association of interleukin-10 levels with age of onset and duration of illness in patients with major depressive disorder. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 37, 296-302.

**Gobira, P. H., Aguiar, D. C., & Moreira, F. A. (2013).** Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the elevated T-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 110, 33-39.

- Goodson, M. L., Packard, A. E. B., Buesing, D. R., Maney, M., Myers, B., Fang, Y., Basforde, J.E., Huie, D.Y., Ulrich-Laid, Y.M., Hermand, P., & Ryan, K. K. (2017).** Chronic stress and Rosiglitazone increase indices of vascular stiffness in male rats. *Physiology & behavior*, 172, 16-23.
- Goldstein, J. M., Jerram, M., Abbs, B., Whitfield-Gabrieli, S., & Makris, N. (2010).** Sex differences in stress response circuitry activation dependent on female hormonal cycle. *Journal of Neuroscience*, 30(2), 431-438.
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2007).** Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2), 109-120.
- Goldstein, D. S. (1995).** Stress, catecholamines, and cardiovascular disease. Oxford University Press.
- Goldstein, D. S. (2010).** Catecholamines 101. *Clinical Autonomic Research*, 20(6), 331-352.
- Godlewski, G., Alapafuja, S. O., Bátkai, S., Nikas, S. P., Cinar, R., Offertáler, L., Douglas Osei-Hyiaman, D.O., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Harvey-White, J., Tam, J., Pacak, K., Blankman, J.L., Cravatt, B.F., Makriyannis, A., & Kunos, G. (2010).** Inhibitor of fatty acid amide hydrolase normalizes cardiovascular function in hypertension without adverse metabolic effects. *Chemistry & biology*, 17(11), 1256-1266.
- González, S., Cebeira, M., & Fernández-Ruiz, J. (2005).** Cannabinoid tolerance and dependence: a review of studies in laboratory animals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(2), 300-318.
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009).** The open field test. *Mood and anxiety related phenotypes in mice*, 1-20.
- Gorbunova, A. A., Kudryashova, I. V., Manolova, A. O., Novikova, M. R., Stepanichev, M. Y., & Gulyaeva, N. V. (2017).** Effects of individual stressors used in a battery of “chronic unpredictable stress” on long-term plasticity in the hippocampus of juvenile rats. *Acta Neurobiol Exp*, 77, 244-253.
- Gordon, J., & Barnes, N. M. (2003).** Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? *Trends in immunology*, 24(8), 438-443.
- Gotoh, K., Inoue, M., Masaki, T., Chiba, S., Shimasaki, T., Ando, H., Fujiwara, K., Katsuragi, I., Kakuma, T., Seike, M., Sakata, T., & Yoshimatsu, H. (2012).** A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. *Journal of neurochemistry*, 120(5), 752-764.
- Gray J. A. & McNaughton N. (2003).** The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system. NY: Oxford University Press
- 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(5), R1333-R1341.
- Grippo, A. J., Francis, J., Beltz, T. G., Felder, R. B., & Johnson, A. K. (2005).** Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiology & behavior*, 84(5), 697-706.

- Grippe, A. J. (2009).** Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(2), 171-180.
- Grippe, A. J., & Johnson, A. K. (2009).** Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress*, 12(1), 1-21.
- Green, B. O. B., Kavanagh, D., & Young, R. (2003).** Being stoned: a review of self-reported cannabis effects. *Drug and alcohol review*, 22(4), 453-460.
- Gwechenberger, M., Mendoza, L. H., Youker, K. A., Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., Michael, L. H., & Entman, M. L. (1999).** Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*, 99(4), 546-551.
- Hanamsagar, R., Alter, M. D., Block, C. S., Sullivan, H., Bolton, J. L., & Bilbo, S. D. (2017).** Generation of a microglial developmental index in mice and in humans reveals a sex difference in maturation and immune reactivity. *Glia*, 65(9), 1504-1520.
- Hart, B. L. (1988).** Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 12(2), 123-137.
- Harte, L. C., & Dow-Edwards, D. (2010).** Sexually dimorphic alterations in locomotion and reversal learning after adolescent tetrahydrocannabinol exposure in the rat. *Neurotoxicology and teratology*, 32(5), 515-524.
- 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(3), 385.
- Hassamal, S. (2023).** Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. *Frontiers in Psychiatry*, 14, 1130989.
- Helman, T. J., Headrick, J. P., Stapelberg, N. J., & Braid, N. (2023).** The sex-dependent response to psychosocial stress and ischaemic heart disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 10, 1072042.
- Henshaw, F. R., Dewsbury, L. S., Lim, C. K., & Steiner, G. Z. (2021).** The effects of cannabinoids on pro- and anti-inflammatory cytokines: a systematic review of in vivo studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(3), 177-195.
- Hernandez, M. E., Martinez-Mota, L., Salinas, C., Marquez-Velasco, R., Hernandez-Chan, N. G., Morales-Montor, J., Pérez-Tapia, M., Streber, M.L., Granados-Camacho, I., Becerril, E., Javier, B., & Pavón, L. (2013).** Chronic stress induces structural alterations in splenic lymphoid tissue that are associated with changes in corticosterone levels in Wistar-Kyoto rats. *BioMed research international*, 2013.
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Pan, B., Fitzgerald, M. L., Roberts, C. J., Lee, T. T. Y., Karatsoreos I.N., Mackie, K., Viau, V., Pickel, V.M., McEwen, B.S., Liu, Q., Gorzalka, B.B., & Hillard, C. J. (2011).** Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10506-10515.

- Hill, M. N., Kumar, S. A., Filipski, S. B., Iverson, M., Stuhr, K. L., Keith, J. M., Cravatt, B.F., Hillard, C.J., Chattarji, S., & McEwen, B. S. (2013).** Disruption of fatty acid amide hydrolase activity prevents the effects of chronic stress on anxiety and amygdalar microstructure. *Molecular psychiatry*, *18*(10), 1125-1135.
- Hiles, S. A., Baker, A. L., de Malmanche, T., & Attia, J. (2012).** A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: exploring the causes of heterogeneity. *Brain, behavior, and immunity*, *26*(7), 1180-1188.
- Himmerich, H., Patsalos, O., Lichtblau, N., Ibrahim, M. A., & Dalton, B. (2019).** Cytokine research in depression: principles, challenges, and open questions. *Frontiers in Psychiatry*, *10*, 30.
- Himmerich, H., Fischer, J., Bauer, K., Kirkby, K. C., Sack, U., & Krügel, U. (2013).** Stress-induced cytokine changes in rats. *European cytokine network*, *24*(2), 97-103.
- Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T., & Taga, T. (1995).** Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(11), 4862-4866.
- Hirota, H., Izumi, M., Hamaguchi, T., Sugiyama, S., Murakami, E., Kunisada, K., Fujio, Y., Oshima Y., Nakaoka, Y., & Yamauchi-Takahara, K. (2004).** Circulating interleukin-6 family cytokines and their receptors in patients with congestive heart failure. *Heart and vessels*, *19*(5), 237-241.
- Hodes, G. E., Kana, V., Menard, C., Merad, M., & Russo, S. J. (2015).** Neuroimmune mechanisms of depression. *Nature neuroscience*, *18*(10), 1386-1393.
- Hohensinner, P. J., Niessner, A., Huber, K., Weyand, C. M., & Wojta, J. (2011).** Inflammation and cardiac outcome. *Current opinion in infectious diseases*, *24*(3), 259.
- Hofmann, M. A., Kohl, B., Zumbach, M. S., Borcea, V., Bierhaus, A., Henkels, M., Amiral, J., Schmidt, A. M., Fiehn, W., Ziegler, R., Wahl, P., & Nawroth, P. P. (1998).** Hyperhomocyst (e) inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes care*, *21*(5), 841-848.
- Hollister, L. E., Moore, F., Kanter, S., & Noble, E. (1970).**  $\Delta^1$ -Tetrahydrocannabinol, synhexyl and marijuana extract administered orally in man: Catecholamine excretion, plasma cortisol levels and platelet serotonin content. *Psychopharmacologia*, *17*(4), 354-360.
- Honke, N., Lowin, T., Opgenoorth, B., Shaabani, N., Lautwein, A., Teijaro, J. R., Schneider, M., & Pongratz, G. (2022).** Endogenously produced catecholamines improve the regulatory function of TLR9-activated B cells. *PLoS biology*, *20*(1), e3001513.
- Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., & Mackie, K. (1999).** Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of neurochemistry*, *73*(2), 493-501.
- Huang, M. H., Friend, D. S., Sunday, M. E., Singh, K., Haley, K., Austen, K. F., Kelly, R.A., & Smith, T. W. (1996).** An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *The Journal of clinical investigation*, *98*(6), 1298-1303.
- Huang, M. H., Nguyen, V., Wu, Y., Rastogi, S., Lui, C. Y., Birnbaum, Y., ... & Fujise, K. (2009).** Reducing ischaemia/reperfusion injury through  $\delta$ -opioid-regulated intrinsic cardiac adrenergic cells: adrenoceptor co-signalling. *Cardiovascular research*, *84*(3), 452-460.



- Huh, J. R., & Veiga-Fernandes, H. (2020).** Neuroimmune circuits in inter-organ communication. *Nature Reviews Immunology*, 20(4), 217-228.
- Jackson, A. R., Nagarkatti, P., & Nagarkatti, M. (2014).** Anandamide attenuates Th-17 cell-mediated delayed-type hypersensitivity response by triggering IL-10 production and consequent microRNA induction. *PLoS one*, 9(4), e93954.
- Jankovic, M., Spasojevic, N., Ferizovic, H., Stefanovic, B., & Dronjak, S. (2020).** 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 & Behavior*, 227, 113174.
- Jamshidi, N., & Taylor, D. A. (2001).** Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British journal of pharmacology*, 134(6), 1151-1154.
- Jelokova, J., Rusnak, M., Kubovcakova, L., Buckendahl, P., Krizanova, O., Sabban, E. L., & Kvetnansky, R. (2002).** Stress increases gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in spleen of rats via pituitary-adrenocortical mechanism. *Psychoneuroendocrinology*, 27(5), 619-633.
- Jeon, S. W., & Kim, Y. K. (2016).** Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: cause or consequence in that illness?. *World journal of psychiatry*, 6(3), 283.
- Jiang, W., Uht, R., & Bohn, M. C. (1989).** Regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) mRNA in the rat adrenal medulla by corticosterone. *International journal of developmental neuroscience*, 7(5), 513-517.
- Juberg, E. N., Minneman, K. P., & Abel, P. W. (1985).**  $\beta$  1-and  $\beta$  2-adrenoceptor binding and functional response in right and left atria of rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 330(3), 193-202.
- Jung, W. C., Levesque, J. P., & Ruitenber, M. J. (2017, January).** It takes nerve to fight back: the significance of neural innervation of the bone marrow and spleen for immune function. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 61, pp. 60-70). Academic Press.
- Kaluderčić, N., Carpi, A., Menabò, R., Di Lisa, F., & Paolocci, N. (2011).** Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(7), 1323-1332.
- Kaufman, S. (1995).** Tyrosine hydroxylase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 70, 103-220.
- Kamal, S., & Lappin, S. L. (2019).** Biochemistry, Catecholamine Degradation.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009).** Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89:309–380.
- Kavelaars, A. (2002).** Regulated expression of  $\alpha$ -1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain, behavior, and immunity*, 16(6), 799-807.
- Karisetty, B. C., Joshi, P. C., Kumar, A., & Chakravarty, S. (2017).** Sex differences in the effect of chronic mild stress on mouse prefrontal cortical BDNF levels: A role of major ovarian hormones. *Neuroscience*, 356, 89-101.

- Kassem, M., Harris, S. A., Spelsberg, T. C., & Riggs, B. L. (1996).** Estrogen inhibits interleukin-6 production and gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptors. *Journal of Bone and Mineral Research*, *11*(2), 193-199.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., & Piomelli, D. (2003).** Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature medicine*, *9*(1), 76-81.
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016).** Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 626-638.
- Kim, S. C., Faure, L., & Chapman, K. D. (2013).** Analysis of fatty acid amide hydrolase activity in plants. In *Plant Lipid Signaling Protocols* (pp. 115-127). Humana Press, Totowa, NJ.
- Kirkham, T. C., Williams, C. M., Fezza, F., & Marzo, V. D. (2002).** Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *British journal of pharmacology*, *136*(4), 550-557.
- Kokras, N., & Dalla, C. (2014).** Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *British journal of pharmacology*, *171*(20), 4595-4619.
- Komaki, A., Hashemi-Firouzi, N., Shojaei, S., Souri, Z., Heidari, S., & Shahidi, S. (2015).** Study the effect of endocannabinoid system on rat behavior in elevated plus-maze. *Basic and Clinical Neuroscience*, *6*(3), 147.
- Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., & Sugiura, T. (1998).** 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and-independent mechanisms. *FEBS letters*, *429*(2), 152-156.
- Kumar, S., Wang, G., Zheng, N. A., Cheng, W., Ouyang, K., Lin, H., Liao, Y., & Liu, J. (2019).** HIMF (hypoxia-induced mitogenic factor)-IL (interleukin)-6 signaling mediates cardiomyocyte-fibroblast crosstalk to promote cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertension*, *73*(5), 1058-1070.
- Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Haass, M., Buss, S. J., Katus, H. A., & Lossnitzer, D. (2017).** Depletion of cardiac catecholamine stores impairs cardiac norepinephrine re-uptake by downregulation of the norepinephrine transporter. *Plos one*, *12*(3), e0172070.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009).** Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological reviews*, *89*(2), 535-606.
- Laban, T. S., & Saadabadi, A. (2022).** Monoamine oxidase inhibitors (MAOI). In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Lajevic, M. D., Suleiman, S., Cohen, R. L., & Chambers, D. A. (2011).** Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by norepinephrine in T-lineage cells. *Immunology*, *132*(2), 197-208.
- 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*(5), 780-789.

- Laukova, M., Vargovic, P., Csaderova, L., Chovanova, L., Vlcek, M., Imrich, R., Krizanova, O., & Kvetnansky, R. (2012).** Acute stress differently modulates beta 1, beta 2 and beta 3 adrenoceptors in T cells, but not in B cells, from the rat spleen. *Neuroimmunomodulation*, *19*(2), 69-78.
- Laukova, M., Vargovic, P., Krizanova, O., & Kvetnansky, R. (2010).** Repeated stress down-regulates  $\beta$ 2- and  $\alpha$ 2C-adrenergic receptors and up-regulates gene expression of IL-6 in the rat spleen. *Cellular and molecular neurobiology*, *30*(7), 1077-1087.
- Li, S., Zhang, H., Gao, X., Huang, H., He, W., Zhang, H., & Sun, H. (2021).** Prenatal stress induced depressive-like behavior and region dependently high CRP level in offspring rats. *Brain and Behavior*, *11*(4), e02046.
- Lindberg, E., Magnusson, Y., Karason, K., & Andersson, B. (2008).** Lower levels of the host protective IL-10 in DCM—a feature of autoimmune pathogenesis?. *Autoimmunity*, *41*(6), 478-483.
- Lee, J., & Harley, V. R. (2012).** The male fight-flight response: A result of SRY regulation of catecholamines? *BioEssays*, *34*(6), 454-457.
- Lee, C. H., & Giuliani, F. (2019).** The role of inflammation in depression and fatigue. *Frontiers in immunology*, *10*, 1696.
- Lee, T. M., Chen, C. C., & Chang, N. C. (2012).** Cardiac sympathetic hyperinnervation in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Clinical Science*, *123*(7), 445-457.
- Llorente-Berzal, A., Fuentes, S., Gagliano, H., López-Gallardo, M., Armario, A., Viveros, M. P., & Nadal, R. (2011).** Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addiction biology*, *16*(4), 624-637.
- Lokau, J., Schoeder, V., Haybaeck, J., & Garbers, C. (2019).** Jak-stat signaling induced by interleukin-6 family cytokines in hepatocellular carcinoma. *Cancers*, *11*(11), 1704.
- López-López, A. L., Jaime, H. B., Villanueva, M. D. C. E., Padilla, M. B., Palacios, G. V., & Aguilar, F. J. A. (2016).** Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiology & Behavior*, *161*, 15-23.
- López-Gallardo, M., Lopez-Rodriguez, A. B., Llorente-Berzal, A., Rotllant, D., Mackie, K., Armario, A., Nadal, R., & Viveros, M. P. (2012).** Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion. *Neuroscience*, *204*, 90-103.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265-275.
- Lubahn, C. L., Lorton, D., Schaller, J. A., Sweeney, S. J., & Bellinger, D. L. (2014).** Targeting  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors differentially shifts Th1, Th2, and inflammatory cytokine profiles in immune organs to attenuate adjuvant arthritis. *Frontiers in immunology*, *5*, 346.
- Luong, H., Singh, S., Patil, M., & Krishnamurthy, P. (2021).** Cardiac glycosaminoglycans and structural alterations during chronic stress-induced depression-like behavior in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *320*(5), H2044-H2057.

- Lu, Y., & Anderson, H. D. (2017).** Cannabinoid signaling in health and disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(4), 311-327.
- Lupiński, S., Schlicker, E., Pądzińska-Betiuk, A., & Malinowska, B. (2011).** Acute myocardial ischemia enhances the vanilloid TRPV1 and serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated Bezold-Jarisch reflex in rats. *Pharmacological Reports*, 63(6), 1450-1459.
- Madden, K. S., & Felten, D. L. (1995).** Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiological Reviews*, 75(1), 77-106.
- Maestroni, G. J., & Conti, A. (1994a).** Modulation of hematopoiesis via alpha 1-adrenergic receptors on bone marrow cells. *Experimental hematology*, 22(3), 313-320.
- Maestroni, G. J., & Conti, A. (1994b).** Noradrenergic modulation of lymphohematopoiesis. *International journal of immunopharmacology*, 16(2), 117-122.
- Mahmoud, A. I., & Lee, R. T. (2016).** Adrenergic function restoration in the transplanted heart: a role for neural crest-derived cells. *Cardiovascular research*, 109(3), 348-349.
- Maharjan, S., Serova, L. I., & Sabban, E. L. (2010).** Membrane-initiated estradiol signaling increases tyrosine hydroxylase promoter activity with ER $\alpha$  in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*, 112(1), 42-55.
- Makara, J.K., Mor, M., Fegley, D., Szabo, S.I., Kathuria, S., Astarita, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Rivara, S., Freund, F., & Piomelli, D. (2005).** Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nature neuroscience*, 8(9), 1139-1141.
- Manni, M. E., Rigacci, S., Borchini, E., Bargelli, V., Miceli, C., Giordano, C., Raimondi, L., & Nediani, C. (2016).** Monoamine oxidase is overactivated in left and right ventricles from ischemic hearts: an intriguing therapeutic target. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Martel, F., & Azevedo, I. (2003).** An update on the extraneuronal monoamine transporter (EMT): characteristics, distribution and regulation. *Current Drug Metabolism*, 4(4), 313-318.
- Marzo, V. D. (2006).** Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 1-24.
- Marco, E. M., Scattoni, M. L., Rapino, C., Ceci, C., Chaves, N., Macrì, S., Maccarrone, M., & Laviola, G. (2013).** Emotional, endocrine and brain anandamide response to social challenge in infant male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38(10), 2152-2162.
- Marco, E. M., Echeverry-Alzate, V., López-Moreno, J. A., Giné, E., Peñasco, S., & Viveros, M. P. (2014).** Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain. *Behavioural pharmacology*, 25(5 and 6), 547-556.
- Martin, C., Tansey, K. E., Schalkwyk, L. C., & Powell, T. R. (2015).** The inflammatory cytokines: molecular biomarkers for major depressive disorder?. *Biomarkers in medicine*, 9(2), 169-180.
- Marin, M. T., Cruz, F. C., & Planeta, C. S. (2007).** Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology & behavior*, 90(1), 29-35.

- Marino, F., & Cosentino, M. (2013).** Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino acids*, 45, 55-71.
- Matalka, K. Z. (2003).** RIGINAL AR. *Neuroendocrinol Lett*, 24(3/4), 185-191.
- Matsubara, J., Sugiyama, S., Nozaki, T., Sugamura, K., Konishi, M., Ohba, K., Matsuzawa, Y., Akiyama, E., Yamamoto, E., Sakamoto, K., Nagayoshi, Y., Kaikita, K., Sumida, H., Kim-Mitsuyama, S., & Ogawa, H. (2011).** Pentraxin 3 is a new inflammatory marker correlated with left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with normal ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(7), 861-869.
- Mazor, M., Dvilansky, A., Aharon, M., Lazarovitz, Z., & Nathan, I. (1982).** Effect of cannabinoids on the activity of monoamine oxidase in normal human platelets. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 90(1), 15-20.
- McCall, N. M., Sprow, G. M., Delpire, E., Thiele, T. E., Kash, T. L., & Pleil, K. E. (2013).** Effects of sex and deletion of neuropeptide Y2 receptors from GABAergic neurons on affective and alcohol drinking behaviors in mice. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 100.
- McEwen, B. S. (1999).** Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience*, 22(1), 105-122.
- McDonough, P., & Walters, V. (2001).** Gender and health: reassessing patterns and explanations. *Social science & medicine*, 52(4), 547-559.
- McFadden, L. M., Paris, J. J., Mitzelfelt, M. S., McDonough, S., Frye, C. A., & Matuszewich, L. (2011).** Sex-dependent effects of chronic unpredictable stress in the water maze. *Physiology & behavior*, 102(3-4), 266-275.
- Mechan A. O., Moran P. M., Elliott M., Young A. J., Joseph M. H. & Green R. (2002).** A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") on the subsequent long-term behaviour of rats in the plus maze and open field. *Psychopharmacology* 159(2): 167-175.
- Meléndez, G. C., McLarty, J. L., Levick, S. P., Du, Y., Janicki, J. S., & Brower, G. L. (2010).** Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension*, 56(2), 225-231.
- Mendes, P., Martinho, R., Leite, S., Maia-Moço, L., Leite-Moreira, A. F., Lourenço, A. P., & Moreira-Rodrigues, M. (2018).** Chronic exercise induces pathological left ventricular hypertrophy in adrenaline-deficient mice. *International journal of cardiology*, 253, 113-119.
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009).** Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry*, 65(9), 732-741.
- Miljuš, T. (2018).** *The Molecular Basis for Biased Signalling by Human Cannabinoid CB2 Receptor* (Doctoral dissertation, ETH Zurich).
- Minneman, K. P., Hegstrand, L. R., & Molinoff, P. B. (1979).** Simultaneous determination of beta-1 and beta-2-adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. *Molecular pharmacology*, 16(1), 34-46.

- Mnich, S. J., Hiebsch, R. R., Huff, R. M., & Muthian, S. (2010).** Anti-inflammatory properties of CB1-receptor antagonist involves  $\beta$ 2 adrenoceptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(2), 445-453.
- Monroe, S. M., Slavich, G. M., & Gotlib, I. H. (2014).** Life stress and family history for depression: The moderating role of past depressive episodes. *Journal of psychiatric research*, 49, 90-95.
- Monroe, S. M. (2008).** Modern approaches to conceptualizing and measuring human life stress. *Annual Review of Clinical Psychology*, 4, 33–52.
- Montecucco, F., Lenglet, S., Braunersreuther, V., Burger, F., Pelli, G., Bertolotto, M., Mach, F., & Steffens, S. (2009).** CB2 cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(5), 612-620.
- Mor, M., Rivara, S., Lodola, A., Plazzi, P. V., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Piersanti, G., Kathuria, S., & Piomelli, D. (2004).** Cyclohexylcarbamic acid 3'-or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure– activity relationships, and molecular modeling studies. *Journal of medicinal chemistry*, 47(21), 4998-5008.
- Möller-Leimkühler, A. M. (2010).** Higher comorbidity of depression and cardiovascular disease in women: a biopsychosocial perspective. *The world journal of biological psychiatry*, 11(8), 922-933.
- Möller-Leimkühler, A. M. (2002).** Barriers to help-seeking by men: a review of sociocultural and clinical literature with particular reference to depression. *Journal of affective disorders*, 71(1-3), 1-9.
- Morena, M., Patel, S., Bains, J. S., & Hill, M. N. (2016).** Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 80-102.
- Muccioli, G. G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2010).** The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular systems biology*, 6(1), 392.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Pan, H., Patel, V., Mukhopadhyay, B., Bátkai, S., Gao, B., Haskó, G., & Pacher, P. (2010).** Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(3), 457-467.
- Munshi, S., Loh, M. K., Ferrara, N., DeJoseph, M. R., Ritger, A., Padival, M., ... & Rosenkranz, J. A. (2020).** Repeated stress induces a pro-inflammatory state, increases amygdala neuronal and microglial activation, and causes anxiety in adult male rats. *Brain, behavior, and immunity*, 84, 180-199.
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993).** Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65. doi: 10.1038/365061a0
- Musso, N. R., Brenci, S., Setti, M., Indiveri, F., & Lotti, G. (1996).** Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(10), 3553-3557.

- Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M., & Suzuki, K. (2014).** Control of lymphocyte egress from lymph nodes through  $\beta$ 2-adrenergic receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 211(13), 2583-2598.
- Nalbandian, G., & Kovats, S. (2005).** Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunologic research*, 31, 91-106.
- Nagaraja, H. S., & Jeganathan, P. S. (1999).** Influence of different types of stress on selected cardiovascular parameters in rats. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 43, 296-304.
- Naughton, S. S., Mathai, M. L., Hryciw, D. H., & McAinch, A. J. (2013).** Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *International journal of endocrinology*, 2013.
- Nemeroff, C. B., Krishnan, K. R. R., Reed, D., Leder, R., Beam, C., & Dunnick, N. R. (1992).** Adrenal gland enlargement in major depression: a computed tomographic study. *Archives of general psychiatry*, 49(5), 384-387.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002).** Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1), 13-25.
- Ney, L. J., Matthews, A., Bruno, R., & Felmingham, K. L. (2018).** Modulation of the endocannabinoid system by sex hormones: Implications for posttraumatic stress disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 94, 302-320.
- Niederhoffer, N., Hansen, H. H., Fernandez-Ruiz, J. J., & Szabo, B. (2001).** Effects of cannabinoids on adrenaline release from adrenal medullary cells. *British journal of pharmacology*, 134(6), 1319-1327.
- Ninh, V. K., & Brown, J. H. (2021).** The contribution of the cardiomyocyte to tissue inflammation in cardiomyopathies. *Current opinion in physiology*, 19, 129-134.
- Niu, X., Watts, V. L., Cingolani, O. H., Sivakumaran, V., Leyton-Mange, J. S., Ellis, C. L., Miller K.L., Vandegaer K., Bedja Dj., Gabrielson K.L., Paolucci N., Kass D.A., & Barouch, L. A. (2012).** Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(22), 1979-1987.
- Noushad, S., Ahmed, S., Ansari, B., Mustafa, U. H., Saleem, Y., & Hazrat, H. (2021).** Physiological biomarkers of chronic stress: A systematic review. *International journal of health sciences*, 15(5), 46.
- Nutt, D., Wilson, S., & Paterson, L. (2022).** Sleep disorders as core symptoms of depression. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- O'Brien, S. M., Scully, P., Fitzgerald, P., Scott, L. V., & Dinan, T. G. (2007).** Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy. *Journal of psychiatric research*, 41(3-4), 326-331.
- O'Sullivan, S. E., Kendall, P. J., & Kendall, D. A. (2012).** Endocannabinoids and the cardiovascular response to stress. *Journal of Psychopharmacology*, 26(1), 71-82.
- Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S. P., Urashima, M., Schlossman, R. L., & Anderson, K. C. (1997).** IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *The Journal of Immunology*, 159(5), 2212-2221.

- Otte, C., Neylan, T. C., Pipkin, S. S., Browner, W. S., & Whooley, M. A. (2005). Depressive symptoms and 24-hour urinary norepinephrine excretion levels in patients with coronary disease: findings from the Heart and Soul Study. *American Journal of Psychiatry*, *162*(11), 2139-2145.
- Özdemir, B., Shi, B., Bantleon, H. P., Moritz, A., Rausch-Fan, X., & Andrukhov, O. (2014). Endocannabinoids and inflammatory response in periodontal ligament cells. *PLoS one*, *9*(9), e107407.
- Papa, A., Pasquini, S., Contri, C., Gemma, S., Campiani, G., Butini, S., Varani, K., & Vincenzi, F. (2022). Polypharmacological Approaches for CNS Diseases: Focus on Endocannabinoid Degradation Inhibition. *Cells*, *11*(3), 471.
- Pace, T. W., Mletzko, T. C., Alagbe, O., Musselman, D. L., Nemeroff, C. B., Miller, A. H., & Heim, C. M. (2006). Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *American Journal of Psychiatry*, *163*(9), 1630-1633.
- Papp, M. (2012). Models of affective illness: chronic mild stress in the rat. *Current protocols in pharmacology*, *57*(1), 5-9.
- Palumbo, M. C., Dominguez, S., & Dong, H. (2020). Sex differences in hypothalamic–pituitary–adrenal axis regulation after chronic unpredictable stress. *Brain and Behavior*, *10*(4), e01586.
- Palanza, P. (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *25*(3), 219-233.
- Pardini, B. J., Lund, D. D., & Schmid, P. G. (1989). Organization of the sympathetic postganglionic innervation of the rat heart. *Journal of the autonomic nervous system*, *28*(3), 193-201.
- Patel S. and Hillard C. J. (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* *318*(1): 304-311.
- Pelekanou, V., Kampa, M., Kiagiadaki, F., Deli, A., Theodoropoulos, P., Agrogiannis, G., Patsouris, E., Tsapis, A., Castanas, E., & Notas, G. (2016). Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER $\alpha$ 36 and GPR30/GPER1. *Journal of Leucocyte Biology*, *99*(2), 333-347.
- Piomelli D., Tarzia G., Duranti A., Tontini A., Mor M., Compton T. R., Dasse O., Monaghan E. P., Parrott J. A., & Putman D. (2006). Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews* *12*(1): 21-38.
- Pierson, W., & Liston, A. (2010). A new role for interleukin-10 in immune regulation. *Immunology and cell biology*, *88*(8), 769.
- Pędzińska-Betiuk, A., Weresa, J., Schlicker, E., Harasim-Symbor, E., Toczek, M., Kasacka, I., Gajo, B., & Malinowska, B. (2021). Chronic cannabidiol treatment reduces the carbachol-induced coronary constriction and left ventricular cardiomyocyte width of the isolated hypertensive rat heart. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *411*, 115368.
- Polak, A., Harasim, E., & Chabowski, A. (2016). Effects of activation of endocannabinoid system on myocardial metabolism. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, *70*, 542-555.



- Phillips, J. K., Dubey, R., Sesiashvilvi, E., Takeda, M., Christie, D. L., & Lipski, J. (2001).** Differential expression of the noradrenaline transporter in adrenergic chromaffin cells, ganglion cells and nerve fibres of the rat adrenal medulla. *Journal of chemical neuroanatomy*, 21(1), 95-104.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21225-21235.
- Primo, M. J., Fonseca-Rodrigues, D., Almeida, A., Teixeira, P. M., & Pinto-Ribeiro, F. (2023).** Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. *European Neuropsychopharmacology*, 77, 80-92.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003).** The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Purves, D. (2009).** *Schlepped*, 4(8):7204.
- Qiu, Y. H., Cheng, C., Dai, L., & Peng, Y. P. (2005).** Effect of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. *Journal of neuroimmunology*, 167(1-2), 45-52.
- Raison, C. L., Rutherford, R. E., Woolwine, B. J., Shuo, C., Schettler, P., Drake, D. F., Haroon, E., & Miller, A. H. (2013).** A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA psychiatry*, 70(1), 31-41.
- Ramer-Quinn, D. S., Swanson, M. A., Lee, W. T., & Sanders, V. M. (2000).** Cytokine production by naive and primary effector CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *Brain, behavior, and immunity*, 14(4), 239-255.
- Raymond, R. J., Dehmer, G. J., Theoharides, T. C., & Deliargyris, E. N. (2001).** Elevated interleukin-6 levels in patients with asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. *American heart journal*, 141(3), 435-438.
- Ren, C. Y., Rao, J. X., Zhang, X. X., Zhang, M., Xia, L., & Chen, G. H. (2021).** Changed signals of blood adenosine and cytokines are associated with parameters of sleep and/or cognition in the patients with chronic insomnia disorder. *Sleep Medicine*, 81, 42-51.
- Ribeiro, R., Wen, J., Li, S., & Zhang, Y. (2013).** Involvement of ERK1/2, cPLA2 and NF- $\kappa$ B in microglia suppression by cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 100, 1-14.
- Roggero, E., Pérez, A. R., Pollachini, N., Villar, S. R., Wildmann, J., Besedovsky, H., & Del Rey, A. (2016).** The sympathetic nervous system affects the susceptibility and course of *Trypanosoma cruzi* infection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 58, 228-236.
- Romero, M. L., & Butler, L. K. (2007).** Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology*, 20(2).
- Romero, E. M., Fernández, B., Sagredo, O., Gomez, N., Urigüen, L., Guaza, C., Rosario D. M., Ramos, J. A. & Viveros, M. P. (2002).** Antinociceptive, behavioural and neuroendocrine effects of CP 55,940 in young rats. *Developmental brain research*, 136(2), 85-92.

- Roque, S., Correia-Neves, M., Mesquita, A. R., Palha, J. A., & Sousa, N. (2009).** Interleukin-10: a key cytokine in depression?. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2009.
- Rubin, R. T., Phillips, J. J., Sadow, T. F., & McCracken, J. T. (1995).** Adrenal gland volume in major depression: increase during the depressive episode and decrease with successful treatment. *Archives of general psychiatry*, 52(3), 213-218.
- Ruppl, H., Bukhari, A. R., & Jacob, R. (1983).** Modulation of catecholamine synthesizing and degrading enzymes by swimming and emotional excitation in the rat. In *Cardiac adaptation to hemodynamic overload, training and stress* (pp. 267-273). Steinkopff.
- Rühl, A., Hurst, S., & Collins, S. M. (1994).** Synergism between interleukins 1 $\beta$  and 6 on noradrenergic nerves in rat myenteric plexus. *Gastroenterology*, 107(4), 993-1001.
- Rudź, R., Schlicker, E., Baranowska, U., Marciniak, J., Karabowicz, P., & Malinowska, B. (2012).** Acute myocardial infarction inhibits the neurogenic tachycardic and vasopressor response in rats via presynaptic cannabinoid type 1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(1), 198-205.
- Sabban, E. L., & Kvetňanský, R. (2001).** Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in neurosciences*, 24(2), 91-98.
- Sanders, V. M., & Straub, R. H. (2002).** Norepinephrine, the  $\beta$ -adrenergic receptor, and immunity. *Brain, behavior, and immunity*, 16(4), 290-332.
- Sanders, V. M. (2012).** The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet?. *Brain, behavior, and immunity*, 26(2), 195-200.
- Saygili, E., Günzel, C., Saygili, E., Noor-Ebad, F., Schwinger, R. H., Mischke, K., ... & Rana, O. R. (2011).** Irregular electrical activation of intrinsic cardiac adrenergic cells increases catecholamine-synthesizing enzymes. *Biochemical and biophysical research communications*, 413(3), 432-435.
- Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., & Marunouchi, T. (1989).** Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain research*, 491(2), 394-397.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011).** The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5), 878-888.
- Seifert, H. A., Hall, A. A., Chapman, C. B., Collier, L. A., Willing, A. E., & Pennypacker, K. R. (2012).** A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7(4), 1017-1024.
- Selye, H. (1975).** The stress of life. New York: McGraw-Hills; 1956; Selye H. Confusion and controversy in the stress field. *J Hum Stress*, 1, 37-44.
- Shiota, N., Narikiyo, K., Masuda, A., & Aou, S. (2016).** Water spray-induced grooming is negatively correlated with depressive behavior in the forced swimming test in rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 66(3), 265-273.
- Shirshev, S. V. (2011).** Role of Epac proteins in mechanisms of cAMP-dependent immunoregulation. *Biochemistry (Moscow)*, 76, 981-998.

- Schiepers, O. J., Wichers, M. C., & Maes, M. (2005).** Cytokines and major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(2), 201-217.
- Schurman, L. D., Lu, D., Kendall, D. A., Howlett, A. C., & Lichtman, A. H. (2019).** Molecular mechanism and cannabinoid pharmacology. In *Substance Use Disorders* (pp. 323-353). Springer, Cham.
- Shanks, J., Manou-Stathopoulou, S., Lu, C. J., Li, D., Paterson, D. J., & Herring, N. (2012).** Peripheral Cardiac Sympathetic dysfunction in the prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rat.
- Shi, S., Liu, T., Liang, J., Hu, D., & Yang, B. (2017).** Depression and risk of sudden cardiac death and arrhythmias: a meta-analysis. *Psychosomatic medicine*, 79(2), 153-161.
- Shrestha, Rhidaya, et al.** Plant fatty acid (ethanol) amide hydrolases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2006, 1761. Jg., Nr. 3, S. 324-334.
- Silberman, D. M., Wald, M. R., & Genaro, A. M. (2003).** Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *Journal of Neuroimmunology*, 144(1-2), 53-60.
- Slavich, G. M., & Irwin, M. R. (2014).** From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychological bulletin*, 140(3), 774.
- Slavich, G. M., & Sacher, J. (2019).** Stress, sex hormones, inflammation, and major depressive disorder: Extending Social Signal Transduction Theory of Depression to account for sex differences in mood disorders. *Psychopharmacology*, 236(10), 3063-3079.
- Smith, S. R., Terminelli, C., & Denhardt, G. (2000).** Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(1), 136-150.
- Spengler, R. N., Allen, R. M., Remick, D. G., Strieter, R. M., & Kunkel, S. L. (1990).** Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology*, 145(5), 1430-1434.
- Spohrs, J. (2020).** The role of the endocannabinoid system in stress-and fear-related processes (Doctoral dissertation, Universität Ulm).
- Svíženská, I., Dubový, P., & Šulcová, A. (2008).** Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures—a short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(4), 501-511.
- Su, H., Lei, C. T., & Zhang, C. (2017).** Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update. *Frontiers in immunology*, 8, 405.
- Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S., & Waku, K. (2002).** Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 66(2-3), 173-192.
- Sumislawski, J. J., Ramikie, T. S., & Patel, S. (2011).** Reversible gating of endocannabinoid plasticity in the amygdala by chronic stress: a potential role for monoacylglycerol lipase inhibition

in the prevention of stress-induced behavioral adaptation. *Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2750-2761.

**Spruijt, B. M., Van Hooff, J. A., & Gispen, W. H. (1992).** Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological reviews*, 72(3), 825-852.

**Stephoe, A., Ronaldson, A., Kostich, K., Lazzarino, A. I., Urbanova, L., & Carvalho, L. A. (2018).** The effect of beta-adrenergic blockade on inflammatory and cardiovascular responses to acute mental stress. *Brain, behavior, and immunity*, 70, 369-375.

**Stumpf, C., Seybold, K., Petzi, S., Wasmeier, G., Raaz, D., Yilmaz, A., Anger, T., Daniel, W.G., & Garlichs, C. D. (2008).** Interleukin-10 improves left ventricular function in rats with heart failure subsequent to myocardial infarction. *European journal of heart failure*, 10(8), 733-739.

**Stafford, N., Assrafally, F., Prehar, S., Zi, M., De Morais, A. M., Maqsood, A., Cartwright, E.J., Mueller, W., & Oceandy, D. (2020).** Signaling via the interleukin-10 receptor attenuates cardiac hypertrophy in mice during pressure overload, but not isoproterenol infusion. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 559220.

**Szabo-Fresnais, N., Lefebvre, F., Germain, A., Fischmeister, R., & Pomérance, M. (2010).** A new regulation of IL-6 production in adult cardiomyocytes by  $\beta$ -adrenergic and IL-1 $\beta$  receptors and induction of cellular hypertrophy by IL-6 trans-signalling. *Cellular Signalling*, 22(7), 1143-1152.

**Tabatadze, N., Huang, G., May, R. M., Jain, A., & Woolley, C. S. (2015).** Sex differences in molecular signaling at inhibitory synapses in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(32), 11252-11265.

**Takahashi, H. K., Mori, S., Liu, K., Wake, H., Zhang, J., Liu, R., Yoshino, T., & Nishibori, M. (2010).**  $\beta$ 2-adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *European journal of pharmacology*, 627(1-3), 313-317.

**Tallerova, A. V., Kovalenko, L. P., Kuznetsova, O. S., Durnev, A. D., & Seredenin, S. B. (2014).** Correcting effect of Ladasten on variations in the subpopulation composition of T lymphocytes in C57bl/6 mice on the experimental model of an anxious-depressive state. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 156(3), 335-337.

**Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Spadoni, G., Mor, M., Rivara, S., Plazzi, P.V., Kathuria, S., & Piomelli, D. (2003).** Synthesis and structure-activity relationships of a series of pyrrole cannabinoid receptor agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(18), 3965-3973.

**Toczek, M., Baranowska-Kuczko, M., Grzęda, E., Pędzińska-Betiuk, A., Weresa, J., & Malinowska, B. (2016).** Age-specific influences of chronic administration of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on cardiovascular parameters and organ hypertrophy in DOCA-salt hypertensive rats. *Pharmacological Reports*, 68(2), 363-369.

**Torpy, J. M., Lynn, C., & Glass, R. M. (2007).** Chronic stress and the heart. *JAMA*, 298(14), 1722-1722.

- Thanky, N. R., Son, J. H., & Herbison, A. E. (2002).** Sex differences in the regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by estrogen in the locus coeruleus of TH9-LacZ transgenic mice. *Molecular brain research*, 104(2), 220-226.
- Thiel, K. J., & Dretsch, M. N. (2011).** The basics of the stress response: A historical context and introduction. *The handbook of stress: Neuropsychological effects on the brain*, 1-28.
- Toczek, M., & Malinowska, B. (2018).** Enhanced endocannabinoid tone as a potential target of pharmacotherapy. *Life sciences*, 204, 20-45.
- Trentani, A., Kuipers, S. D., te Meerman, G. J., Beekman, J., Ter Horst, G. J., & Den Boer, J. A. (2003).** Immunohistochemical changes induced by repeated footshock stress: revelations of gender-based differences. *Neurobiology of disease*, 14(3), 602-618.
- Tseng, A. H., & Craft, R. M. (2001).** Sex differences in antinociceptive and motoric effects of cannabinoids. *European journal of pharmacology*, 430(1), 41-47.
- Tsigos, C., Kyrou, I., Kassi, E., & Chrousos, G. P. (2020).** Stress: endocrine physiology and pathophysiology. *Endotext* [Internet].
- Turcotte, C., Blanchet, M. R., Laviolette, M., & Flamand, N. (2016).** The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4449-4470.
- Turnbull, A. V., & Rivier, C. L. (1999).** Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological reviews*, 79(1), 1-71.
- Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C., & Herman, J. P. (2006).** Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*, 291(5), E965-E973.
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., & Csiszar, A. (2019).** Potential adverse cardiovascular effects of treatment with fluoxetine and other selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in patients with geriatric depression: implications for atherogenesis and cerebrovascular dysregulation. *Frontiers in genetics*, 10, 898.
- van Furth, R. (1989).** Origin and Turnover of Monocytes and Macrophages. In: Iversen, O.H. (eds) *Cell Kinetics of the Inflammatory Reaction. Current Topics in Pathology, Springer*, (79).
- Van Laere, K., Goffin, K., Bormans, G., Casteels, C., Mortelmans, L., de Hoon, J., Grachev, I., Vandenbulcke, G.P., & Pieters, G. (2009).** Relationship of type 1 cannabinoid receptor availability in the human brain to novelty-seeking temperament. *Archives of General Psychiatry*, 66(2), 196-204.
- Vanhoutte, P. M., & Levy, M. N. (1980).** Prejunctional cholinergic modulation of adrenergic neurotransmission in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 238(3), H275-H281.
- Viveros, M. P., Marco, E. M., & File, S. E. (2005).** Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(2), 331-342.
- Villeneuve, C., Guilbeau-Frugier, C., Sicard, P., Lairez, O., Ordener, C., Duparc, T., Paulis, D.D., Couderc, B., Spreux-Varoquaux, O., Tortosa, F., Garnier, A., Knauf, C., Valet, P., Borchi, E., Nediani, C, Gharib, A., Ovize, M., Delisle, M.B., Parini, A., & Mialet-Perez,**

**J. (2013).** p53-PGC-1 $\alpha$  pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxidants & redox signaling*, 18(1), 5-18.

**Verrico, C. D., Wesson, S., Konduri, V., Hofferek, C. J., Vazquez-Perez, J., Blair, E., Dunner K.J., Salimpour, P., Decker, W.K., & Halpert, M. M. (2020).** A randomized, double-blind, placebo-controlled study of daily cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis pain. *Pain*, 161(9), 2191.

**Verma, S. K., Krishnamurthy, P., Barefield, D., Singh, N., Gupta, R., Lambers, E., Thal M., Mackie, A., Hoxha E., Ramirez, V., Qin, G., Sadayappan, S., Ghosh, A.K., & Kishore, R. (2012).** Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B. *Circulation*, 126(4), 418-429.

**Vestlund, J., Kalafateli, A. L., Studer, E., Westberg, L., & Jerlhag, E. (2020).** Neuromedin U induces self-grooming in socially-stimulated mice. *Neuropharmacology*, 162, 107818.

**Vignjevic, S., Budec, M., Markovic, D., Dikic, D., Mitrovic, O., Diklic, M., Suboticki, T., Cokic, V., & Jovcic, G. (2015).** Glucocorticoid receptor mediates the expansion of splenic late erythroid progenitors during chronic psychological stress. *J Physiol Pharmacol*, 66(1), 91-100.

**Vinod, K. Y., & Hungund, B. L. (2006).** Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Trends in pharmacological sciences*, 27(10), 539-545.

**Wang, C., Qiu, W., Zheng, Y., Li, H., Li, Y., Feng, B., Guo, S., Yan, L., & Cao, J. M. (2013).** Extraneuronal monoamine transporter mediates the permissive action of cortisol in the guinea pig trachea: Possible involvement of tracheal chondrocytes. *PLoS one*, 8(10), e76193.

**Warthan, M. D., Freeman, J. G., Loesser, K. E., Lewis, C. W., Hong, M., Conway, C. M., & Stewart, J. K. (2002).** Phenylethanolamine N-methyl transferase expression in mouse thymus and spleen. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(4), 493-499.

**Weiss, J. L., Watanabe, A. M., Lemberger, L., Tamarkin, N. R., & Cardon, P. V. (1972).** Cardiovascular effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in man. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 13(5part1), 671-684.

**Willey, C. D., Palanisamy, A. P., Johnston, R. K., Mani, S. K., Shiraishi, H., Tuxworth, W. J., Zile, M.R., Balasubramanian, S., & Kuppaswamy, D. (2008).** STAT3 activation in pressure-overloaded feline myocardium: role for integrins and the tyrosine kinase BMX. *International journal of biological sciences*, 4(3), 184.

**Wiley, J. L. (2003).** Sex-dependent effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on locomotor activity in mice. *Neuroscience Letters* 352(2): 77-80.

**Wiley, J. L. & Burston, J. J. (2014).** Sex differences in delta(9)-tetrahydrocannabinol metabolism and in vivo pharmacology following acute and repeated dosing in adolescent rats. *Neuroscience Letters* 576: 51-55.

**Weinshilboum, R., & Axelrod, J. (1971).** Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circulation research*, 28(3), 307-315.

- Whang, W., Kubzansky, L. D., Kawachi, I., Rexrode, K. M., Kroenke, C. H., Glynn, R. J., Garan, H., & Albert, C. M. (2009).** Depression and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease in women: results from the Nurses' Health Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(11), 950-958.
- Wolf, J., Rose-John, S., & Garbers, C. (2014).** Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, 70(1), 11-20.
- Wong, D. L., Siddall, B., & Wei, W. (1995).** Hormonal control of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase. *Neuropsychopharmacology*, 13(3), 223-234.
- Wyrofsky, R. R., Reyes, B. A., Zhang, X. Y., Bhatnagar, S., Kirby, L. G., & Van Bockstaele, E. J. (2019).** Endocannabinoids, stress signaling, and the locus coeruleus-norepinephrine system. *Neurobiology of stress*, 11, 100176.
- Xing, G., Carlton, J., Jiang, X., Wen, J., Jia, M., & Li, H. (2014).** Differential expression of brain cannabinoid receptors between repeatedly stressed males and females may play a role in age and gender-related difference in traumatic brain injury: implications from animal studies. *Frontiers in neurology*, 5, 161.
- Xing, Y., He, J., Hou, J., Lin, F., Tian, J., & Kurihara, H. (2013).** Gender differences in CMS and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. *Neurochemistry International*, 63(6), 570-575.
- Yalcin, I., Belzung, C., & Surget, A. (2008).** Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behavioural brain research* 193, 140-143.
- Yarar, E. (2021).** Role and function of endocannabinoid system in major depressive disease. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 4(1), 1-12.
- Yerabolu, D., Weiss, A., Kojonazarov, B., Boehm, M., Schlueter, B. C., Ruppert, C., Günther, A., Jonigk, D., Grimminger, F., Ghofrani, HA., Seeger, W., Weissmann, N., & Schermuly, R. T. (2021).** Targeting Jak-Stat signaling in experimental pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 64(1), 100-114.
- Yekehtaz, H., Farokhnia, M., & Akhondzadeh, S. (2013).** Cardiovascular considerations in antidepressant therapy: an evidence-based review. *The Journal of Tehran University Heart Center*, 8(4), 169.
- Yoshida, T., Hanawa, H., Toba, K., Watanabe, H., Watanabe, R., Yoshida, K., Abe, S., Kato, K., Kodama, M. & Aizawa, Y. (2005).** Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis. *Cardiovascular Research*, 68(2), 278-288.
- Young, N. A., Wu, L. C., Burd, C. J., Friedman, A. K., Kaffenberger, B. H., Rajaram, M. V., Schlesinger, L.S., James, H., Shupnik, M.A., & Jarjour, W. N. (2014).** Estrogen modulation of endosome-associated toll-like receptor 8: an IFN $\alpha$ -independent mechanism of sex-bias in systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology*, 151(1), 66-77.
- Young, A. P., & Denovan-Wright, E. M. (2022).** The dynamic role of microglia and the endocannabinoid system in neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 806417.

**Yu, X., Kennedy, R. H., & Liu, S. J. (2003).** JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *Journal of biological chemistry*, 278(18), 16304-16309.

**Yue, Q., Wang, K., Guan, M., Zhao, Z., Li, X., Yu, P., & Mao, L. (2022).** Single-Vesicle Electrochemistry Reveals Sex Difference in Vesicular Storage and Release of Catecholamine. *Angewandte Chemie International Edition*, 61(14), e202117596.

**Zarrindast M. R., Mahboobi S., Sadat-Shirazi M. S. & Ahmadi S. (2011).** Anxiolytic-like effect induced by the cannabinoid CB1 receptor agonist, arachydonilcyclopropylamide (ACPA), in the rat amygdala is mediated through the D1 and D2 dopaminergic systems. *Journal of Psychopharmacology* 25(1): 131-140.

**Ziegler, C. G., Mohn, C., Lamounier-Zepter, V., Rettori, V., Bornstein, S. R., Krug, A. W., & Ehrhart-Bornstein, M. (2010).** Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. *Hormone and metabolic research*, 42(02), 88-92.

**Zer-Aviv, T. M., & Akirav, I. (2016).** Sex differences in hippocampal response to endocannabinoids after exposure to severe stress. *Hippocampus*, 26(7), 947-957.

**Zhang, C., Zhang, Y. P., Li, Y. Y., Liu, B. P., Wang, H. Y., Li, K. W., Zhao, S., & Song, C. (2019).** Minocycline ameliorates depressive behaviors and neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat. *Behavioural Brain Research*, 356, 348-357.

**Zhao, C. H., Ma, X., Guo, H. Y., Li, P., & Liu, H. Y. (2017).** RIP2 deficiency attenuates cardiac hypertrophy, inflammation and fibrosis in pressure overload induced mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(2), 1151-1158.

**Zhao, L., Cheng, G., Jin, R., Afzal, M. R., Samanta, A., Xuan, Y. T., Girgis, ., Elias, H.K., Zhu, Y., Davani, A., Yang, Y., Chen, X., Ye, S., Wang, O.L., Chen, L., Hauptman, J., Vincent, R. J., & Dawn, B. (2016).** Deletion of interleukin-6 attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Circulation research*, 118(12), 1918-1929.

**Zou, S., & Kumar, U. (2018).** Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833.

**Zuardi, A. W. (2006).** History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28, 153-157.



## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Harisa Ferizović je rođena 15.11.1990. godine u Novom Pazaru. Srednju školu je završila u Novom Pazaru, a osnovne studije je upisala 2009. godine na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru, Departman za biomedicinske nauke, studijski program Biologija, koje je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,41. Master studije je upisala 2013. godine na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru, Departman za biomedicinske nauke, studijski program Biologija, koje je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,42. Iste godine upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Animalna i humana fiziologija.

Od 2016. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, prvo kao istraživač pripravnik na projektu u okviru projekta Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara” (173044), a potom, od 2020. godine, kao istraživač saradnik u okviru programa 2 “Životna sredina i zdravlje” na temu “Regulacija kateholaminskog sistema u centralnim i perifernim tkivima tokom stresa 0902301” finansirane od strane, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2018. godine je član i aktivni učesnik u radu etičke komisije za zaštitu i dobrobit eksperimentalnih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Član je Srpskog biohemijškog društva i društva za zaštitu i proučavanje ptica Srbije. Samostalno ili kao koautor objavila je devet radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M21), časopisima od međunarodnog značaja (M22) i međunarodnim časopisima (M23), kao i šesnaest saopštenja sa međunarodnih skupova.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписана Хариса Н. Феризовић

број индекса Б3001/2014

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај ендоканабиноида на синтезу и транспорт катехоламина у срцу, слезини и  
надбубрежним жлездама хронично стресираних пацова оба пола**

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.12.2023. године

*Хариса Феризовић*

**Прилог 2.**

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

Име и презиме аутора Хариса Н. Феризовић

Број индекса Б3001/2014

Студијски програм Биологија, модул Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Утицај ендоканабиноида на синтезу и транспорт катехоламина у срцу, слезини и надбубрежним жлездама хронично стресираних пацова оба пола

Ментори: др Слађана Дроњак Чучаковић, научни саветник  
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча”  
Институт од националног значаја за Републику Србију

проф. др Јелена Ђорђевић, редовни професор  
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Потписани/а



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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.12.2023. године



### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

**Утицај ендоканабиноида на синтезу и транспорт катехоламина у срцу, слезини и  
надбубрежним жлездама хронично стресираних пацова оба пола**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.12.2023. године



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