

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Tihomir S. Stojković

**EFEKTI DUGOTRAJNE PRIMENE
ANTIPSIHOTIKA NA REDOKS REGULACIJU U
ANIMALNOM MODELU SHIZOFRENIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Tihomir S. Stojković

**THE EFFECTS OF LONG-TERM
ANTIPSYCHOTIC APPLICATION ON REDOX
REGULATION IN THE ANIMAL MODEL OF
SCHIZOPHRENIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTOR:

Prof. dr Nataša Petronijević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

KOMENTOR:

Prof. dr Nela Puškaš, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Ivanka Marković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Doc. dr Maja Ivković, docent,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor,
Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka

DATUM ODBRANE: _____

EFEKTI DUGOTRAJNE PRIMENE ANTIPSIHOTIKA NA REDOKS REGULACIJU U ANIMALNOM MODELU SHIZOFRENIJE

Shizofrenija je hronični psihotični poremećaj sa karakteristikama dezorganizacije većine psihičkih funkcija koji se javlja u oko 1% opšte populacije. Nastaje kao rezultat interakcije naslednih bioloških faktora i faktora sredine. Terapija uključuje upotrebu tipičnih i atipičnih antipsihotika čiji je efekat povezan sa blokadom dopaminskih D₂ receptora. U istraživanju shizofrenije koriste se animalni modeli zasnovani na perinatalnoj blokadi glutamatnih NMDA receptora primenom fenciklidina (PCP) što integriše glutamatnu hipotezu sa neurorazvojnim teorijama o nastanku bolesti. Oksidativni stres i narušena redoks regulacija imaju značaja u patogenezi shizofrenije. Cilj studije bio je ispitivanje uticaja dugotrajne primene haloperidola i risperidona na redoks regulaciju u fenciklidinskom modelu shizofrenije kako bi se ustanovilo u kojoj su meri promene redoks statusa posledica samih patogenetskih procesa bolesti, odnosno primene lekova. U eksperimentu su korišćeni pacovi *Wistar* soja kojima je perinatalno 2, 6, 9. i 12. postnatalnog (PN) dana aplikovan PCP (10 mg/kg, s.c.) ili fiziološki rastvor (0,9% NaCl). Od 35. PN dana formirano je šest grupa kojima je preko vode za piće tokom devet nedelja aplikovan haloperidol u dozi od 3 mg/kg (po jedna grupa sa perinatalnom primenom NaCl-a i PCP-a) ili risperidon u dozi od 1 mg/kg (po jedna grupa sa perinatalnom primenom NaCl-a i PCP-a). Preostale dve grupe dobijale su samo vodu za piće. Pacovi su žrtvovani 100. PN dana U izolovanim uzorcima prefrontalnog korteksa i hipokampusu mereni su parametri oksidativnog oštećenja lipida (malondialdehid, MDA), aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD), katalaze, glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR), koncentracija glutationa i aktivnost γ -glutamilcistein ligaze (GCL), aktivnost enzima respiratornog lanca mitohondrija (kompleks I i citohrom c oksidaza (COX)) i koncentracija metabolita azot-monoksida odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama, dok je ekspresija izoenzima SOD i azot-monoksid sintaze i subjednica

NADPH oksidaze određivana tehnikom *Western blot*-a. Ekspresija subjednice p22^{phox} NADPH oksidaze dodatno je praćena i imunohistochemijskom metodom. Pokazano je da perinatalna primena PCP-a dovodi do dugoročnih efekata na redoks status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu koji uključuju povećanje koncentracije MDA, smanjenje aktivnosti SOD i GPx i smanjenje količine ukupnog glutaciona uz smanjenje aktivnosti regulatornog enzima njegove sinteze GCL i povećanje oksidativne forme, kao i smanjenje metabolita azot-monoksida. Ispitivani antipsihotici uticali su na povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima, normalizaciju nivoa ukupnog glutaciona i aktivnost GCL. Haloperidol je u mitohondrijama doveo do smanjenja ekspresije SOD. Antipsihotici nisu pokazali znaćajan efekat na nivoe nitrata i nitrita. Haloperidol je za razliku od risperidona uzrokovao smanjenje ekspresije neuronalne azot-monoksid sintaze. Perinatalna primena PCP-a nije bila praćena dugoroćnim efektima na aktivnost enzima respiratornog lanca. Haloperidol je uzrokovao smanjenje ekspresije COX u prefrontalnom korteksu. Pokazana je povećana ekspresija membranskih subjednica NADPH oksidaze nakon perinatalne primene PCP-a, dok je upotreba antipsihotika dovela do reverzije ovih promena. Ekspresija aktivišuće citosolne subjednice NADPH oksidaze u obe moždane strukture bila je povišena nakon primene PCP-a. Povećanje ekspresije subjednica NADPH oksidaze uz normalnu aktivnost enzima respiratornog lanca sugeriše da ovaj enzim može biti glavni izvor narušene redoks ravnoteže nakon perinatalnog tretmana PCP-om i potencijalna meta za razvoj novih terapijskih strategija u lećenju shizofrenije. Dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona ne izaziva oksidativni stres u korteksu i hipokampusu, a nakon perinatalnog tretmana PCP-om pokazuje i određene antioksidativne efekte.

Ključne reći: shizofrenija, fenciklidin, haloperidol, risperidon, redoks regulacija, oksidativni stres, antioksidativni enzimi, glutation, azot-monoksid, NADPH oksidaza

Naućna oblast: Medicina

Uža naućna oblast: Neuronauke

THE EFFECTS OF LONG-TERM ANTIPSYCHOTIC APPLICATION ON REDOX REGULATION IN THE ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA

Schizophrenia is a chronic psychotic disorder with characteristics of the disorganization of most mental functions that affects about 1% of the general population. It develops as a result of the interaction of hereditary biological factors and environmental factors. Therapy includes the use of typical and atypical antipsychotics, the effect of which is associated with the blockade of dopamine D₂ receptors. In the research of schizophrenia, animal models based on the perinatal blockade of NMDA receptors using phencyclidine (PCP) are used to integrate the glutamate hypothesis with neurodevelopmental theories of the onset of the disease. Oxidative stress and redox dysregulation have significant role in the pathogenesis of schizophrenia. The aim of the study was to investigate the effect of long-term haloperidol and risperidone application on redox regulation in the PCP model of schizophrenia to determine the extent to which redox status changes are the result of the disease itself or the use of drugs. In this study, we have used Wistar rats perinatally treated on 2nd, 6th, 9th and of 12th postnatal (PN) day with PCP (10 mg/kg, s.c.) or saline (0.9% NaCl). From 35 PN days, six groups were formed; two groups received haloperidol at a dose of 3 mg/kg (one group with perinatal administration of NaCl and PCP) dissolved in drinking water for nine weeks, or risperidone at a dose of 1 mg/kg (one group with perinatal administration of NaCl and PCP). The remaining two groups received drinking water without dissolved drugs. After 100 PN days prefrontal cortex and hippocampus were isolated and parameters of oxidative damage of lipids (malondialdehyde - MDA), antioxidant enzyme activity (superoxide dismutase - SOD, and catalase) glutathione concentration and activity of enzymes involved in glutathione metabolism (glutathione reductase, glutathione peroxidase - GPx, and γ -glutamylcysteine ligase - GCL), mitochondrial respiratory chain enzymes activity, nitric oxide metabolite levels, and expression of isozymes of SOD and nitric oxide synthase, as well as NADPH oxidase subunits were determined by

appropriate spectrophotometric methods, Western blot and immunohistochemical method. It has been shown that perinatal administration of PCP caused long-term effects on redox status in cortex and hippocampus including increased MDA, reduction in the SOD and GPx activity, and reduction of total glutathione levels, reduction the activity of the regulatory enzyme of its synthesis GCL and increase of its oxidative form, as well as the decrease of the nitric oxide metabolites. The antipsychotics caused the increase in the activity of antioxidant enzymes, the normalization of total glutathione levels and GCL activity. It has been shown that haloperidol decreased the expression of SOD in mitochondria. Antipsychotics have shown no significant effect on levels of nitrates and nitrites. Haloperidol, unlike risperidone, caused a reduction in neuronal nitric oxide synthase expression. Perinatal administration of PCP was not followed by long-term effects on the activity of the respiratory chain enzymes. Haloperidol caused a decrease in the expression of cytochrome c oxidase in the prefrontal cortex. We found increased expression of NADPH oxidase membrane subunits after perinatal administration of PCP, while the use of antipsychotics led to the reversal of these changes. The expression of the activating cytosolic subunit of NADPH oxidase in both brain structures was elevated after the PCP treatment. The increased expression of subunits of NADPH oxidase with normal activity of the respiratory chain enzymes suggests that this enzyme may be a major source of redox dysbalance after perinatal PCP treatment and a potential target for the development of new therapeutic strategies in the treatment of schizophrenia. Long-term oral administration of haloperidol and risperidone does not cause oxidative stress in the cortex and the hippocampus, and after perinatal PCP treatment also exhibits certain antioxidant effects.

Key words: schizophrenia, phencyclidine, haloperidol, risperidone, redox regulation, oxidative stress, antioxidant enzymes, glutathione, nitric oxide, NADPH oxidase

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Neuroscience

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Shizofrenija.....	1
1.1.1. Epidemiologija i klinička slika shizofrenije	1
1.1.2. Etiopatogeneza shizofrenije	2
1.1.2.1. Faktori rizika: genetski i sredinski faktori.....	3
1.1.2.2. Morfološke promene u shizofreniji: makroskopski i mikroskopski nalazi.....	5
1.1.2.3. Neurohemijske promene u shizofreniji: uloga dopaminergičke neurotransmisije...6	
1.1.2.4. Neurohemijske promene u shizofreniji: uloga glutamatergičke neurotransmisije...7	
1.1.2.5. Neurofiziološke promene u shizofreniji	11
1.1.3. Terapija shizofrenije	12
1.1.3.1. Opšti principi lečenja shizofrenije.....	12
1.1.3.2. Tipični antipsihotici.....	13
1.1.3.3. Atipični antipsihotici.....	14
1.1.4. Fenciklidinski animalni model shizofrenije.....	14
1.2. Oksidativni stres i redoks regulacija	17
1.2.1. Slobodni radikali	17
1.2.1.1. Superoksidni radikal, vodonik-peroksid i hidroksilni radikal.....	18
1.2.1.2. Azot-monoksid.....	20
1.2.1.3. Oštećenje biomolekula uzrokovano slobodnim radikalima: lipidna peroksidacija 22	
1.2.2. Antioksidativna zaštita	25
1.2.2.1. Superoksid dizmutaza	25
1.2.2.2. Katalaza	27

1.2.2.3. Glutation	29
1.2.3. Familija NADPH oksidaza.....	32
1.2.4. Redoks regulacija.....	35
1.3. Oksidativni stres i shizofrenija.....	36
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	39
3. MATERIJAL I METODE	41
3.1. Eksperimentalne životinje.....	41
3.2. Eksperimentalni protokol.....	41
3.2.1. Perinatalna primena fenciklidina.....	41
3.2.2. Primena antipsihotika	42
3.3. Protokoli spektrofotometrijskih metoda.....	43
3.3.1. Priprema uzoraka.....	43
3.3.2. Određivanje količine malondialdehida	44
3.3.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	45
3.3.4. Određivanje aktivnosti katalaze	45
3.3.5. Određivanje količine ukupnog, redukovanog i oksidovanog glutaciona.....	46
3.3.6. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze	47
3.3.7. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze.....	47
3.3.8. Određivanje aktivnosti γ -glutamilcistein ligaze	48
3.3.9. Određivanje količine nitrita i nitrata.....	49
3.3.10. Određivanje aktivnosti kompleksa I.....	50
3.3.11. Određivanje aktivnosti citohrom c oksidaze	51
3.4. Protokol <i>Western blot</i> metode	51

3.5. Protokol imunohistohemijske metode	53
3.6. Statistička analiza.....	54
4. REZULTATI	55
4.1. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na parametre oksidativnog stresa u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom	55
4.1.1. Uticaj haloperidola i risperidona na količinu malondialdehida	55
4.1.2. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost superoksid dizmutaze	56
4.1.3. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju izoenzima superoksid dizmutaze	57
4.1.4. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost katalaze	59
4.2. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na količinu i metabolizam glutaciona u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom	59
4.2.1. Uticaj haloperidola i risperidona na količinu i odnos redukovanog i oksidovanog glutaciona.....	59
4.2.2. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost glutacion reduktaze	62
4.2.3. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost glutacion peroksidaze.....	63
4.2.4. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost γ -glutamilcistein ligaze	64
4.3. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na sintezu i metabolizam azot-monoksida u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom.....	65
4.3.1. Uticaj haloperidola i risperidona na količinu nitrata i nitrita	65
4.3.2. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju izoenzima azot-monoksid sintaze	66
4.4. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na enzime respiratornog lanca u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom.....	69

4.4.1. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost kompleksa I.....	69
4.4.2. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost citohrom c oksidaze	69
4.5. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na ekspresiju NADPH oksidaze u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom	70
4.5.1. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju membranske subjedinice p22 ^{phox}	70
4.5.2. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju NOX2 izoenzima (gp91 ^{phox}) ...	73
4.5.3. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju citosolnih subjedinica p67 ^{phox} i p47 ^{phox}	74
5. DISKUSIJA.....	77
6. ZAKLJUČCI.....	98
7. LITERATURA	102

1. UVOD

1.1. Shizofrenija

1.1.1. Epidemiologija i klinička slika shizofrenije

Pre nešto više od jednog veka švajcarski psihijatar Eugen Blojler (1857–1939) označio je terminom shizofrenija (prema grč. *skhizein* cepati, *phrēn* um) hronično mentalno oboljenje iz spektra psihotičnih poremećaja sa karakterističnom dezorganizacijom većine psihičkih funkcija. Do današnjih dana shizofrenija nastavlja da intrigira stručnjake različitih disciplina, a put koji je pređen ka boljem razumevanju same bolesti i adekvatnijem tretmanu bolesnika nije konačan.

U svetu preko 20 miliona ljudi boluje od shizofrenije (Charlson i sar., 2018). Stopa incidencije bolesti je relativno stabilna i ujednačena širom sveta i iznosi od 10 do 40 na 100 000 stanovnika, sa nešto češćim javljanjem kod muškaraca (odnos 14:10) i u urbanim sredinama (McGrath i sar., 2008). Bolest tipično počinje u mladosti, ima hroničan tok sa pogoršanjima i remisijama, čime značajno umanjuje funkcionalnost obolele osobe. Prognoza bolesti varira, ali tek 13,5% obolelih uz adekvatan tretman doživi oporavak (Jääskeläinen i sar., 2013). Očekivano trajanje života osoba sa shizofrenijom kraće je u proseku 20 godina u odnosu na opštu populaciju. Bolest je često udružena sa somatskim oboljenjima, najčešće kardiovaskularnim bolestima, dijabetesom, respiratornim bolestima i tumorima pojedinih organa, što delom uzrokuje veći rani mortalitet, dok samoubistvo izvrši oko 15% obolelih (Laursen i sar., 2014). Shizofrenija ne remeti samo lični razvoj i produktivnost pojedinca, već pogađa širu društvenu zajednicu pred koju postavlja izazov adekvatnog odgovora na ekonomske i socijalne posledice koje ova bolest za sobom ostavlja. Prema najnovijim podacima Svetske zdravstvene organizacije, shizofrenija se nalazi na dvanaestom mestu liste bolesti koje doprinose ukupnom opterećenju bolesti svetske populacije (Charlson i sar., 2018).

Shizofrenija predstavlja heterogeni klinički sindrom koji se manifestuje poremećajem gotovo svih psihičkih funkcija, ali bez kliničkog simptoma ili znaka koji je patognomoničan za ovo oboljenje (Jašović Gašić i Marić, 2007). Brojni psihopatološki fenomeni koji se javljaju kod obolelih mogu se razvrstati u tri domena koja čine pozitivni simptomi (halucinacije, sumanute ideje i formalni poremećaj mišljenja), negativni simptomi (alogija, apatija, anhedonija i socijalno povlačenje) i kognitivni simptomi (poremećaji pažnje, radne memorije i drugih egzekutivnih funkcija) (Lindenmayer i Khan, 2006).

Dijagnoza shizofrenije se postavlja isključivo psihijatrijskim pregledom kojim se utvrđuje postojanje simptoma bolesti, prema dijagnostičkim kriterijumima 10. revizije Međunarodne klasifikacije bolesti Svetske zdravstvene organizacije (MKB-10) ili petog izdanja Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje Američke psihijatrijske asocijacije (DSM-V). Trenutno ne postoje laboratorijski testovi i dodatne dijagnostičke metode koje bi mogle da potvrde prisustvo bolesti.

U odnosu na dominantne kliničke simptome i znake prema MKB-10, postoje sledeći tipovi shizofrenije: paranoidna, hebefrena, katatona, nediferencirana, rezidualna i jednostavna (simpleks) shizofrenija (Jašović Gašić i Marić, 2007).

1.1.2. Etiopatogeneza shizofrenije

Tokom poslednjih nekoliko decenija, brojne epidemiološke studije, veliki napredak na polju molekularne genetike, razvoj savremenih neurovizuelizacionih metoda i otkriće novih psihofarmaka doprineli su jasnijem razumevanju etiopatogeneze shizofrenije. Iako uzrok bolesti nije poznat, savremeno shvatanje je da je reč o složenom mentalnom oboljenju multifaktorske etiologije, koje je uslovljeno interakcijom naslednih bioloških faktora i stečenih faktora sredine. Smatra se da genetska predispozicija udruženo sa ranim prenatalnim i perinatalnim uticajima okoline utiče na normalan tok neurorazvoja što kasnije tokom života uslovljava pojavu različitih neuroanatomskih, neurohemijskih i neurofizioloških abnormalnosti (Insel, 2010).

1.1.2.1. Faktori rizika: genetski i sredinski faktori

Počevši od najranijih opisa shizofrenije, zapaženo je da se bolest češće javlja u pojedinim porodicima. Brojne genetske epidemiološke studije pokazale su nedvosmisleno postojanje povećanog rizika za oboljevanje među srođnicima. Deca roditelja, od kojih jedan boluje od shizofrenije, imaju rizik od 6%, dok se rizik povećava ako su dva ili više članova porodice obolela, tako da je rizik za oboljevanje ukoliko su jedan brat ili sestra bolesni i roditelj – 17%, a ako su oba roditelja bolesna verovatnoća raste na 46% (Gottesman, 1994). Konkordantnost kod monozigotnih blizanaca iznosi 48%, odnosno 17% kod dizigotnih blizanaca (Cardno i Gottesman, 2000). Meta-analizom rezultata blizanačkih studija pokazano je da heritabilnost shizofrenije iznosi oko 80% (Sullivan i sar., 2003).

Mogućnost da je za nastanak shizofrenije odgovoran jedan gen je davno napuštena i danas se pouzdano zna da se bolest nasleđuje poligeniski. Rezultati citogenetskih ispitivanja hromozomskih aberacija, analiza genske povezanosti (*linkage* analize) i asocijativnih studija ukazuju na ulogu nekoliko genskih lokusa. Jedan od prvih takvih gena, *disc1* (engl. *disrupted in schizophrenia 1*) na hromozomu 1, interesovanje naučne zajednice je stekao kada je ustanovljeno da je balansirana translokacija između hromozoma 1q42 i 11q14.3 pri kojoj se narušava integritet ovog gena, povezana sa nastankom shizofrenije najpre u jednoj Škotskoj porodici, što su zatim potvrdile i druge studije (Millar i sar., 2000). Među ostalim genima kandidatima od značaja za shizofreniju, ističu se geni za: neuregulin (*nrg1*), disbindin (*dtnbp1*), aktivator oksidaze D-aminokiselina (*daoa*) i regulator signalizacije G-proteina (*rgs4*) (Farrel i sar, 2015). Poslednjih godina, zahvaljujući GWAS (engl. *genome-wide association studies*) istraživanjima otkriven je veliki broj novih genskih lokusa povezanih sa shizofrenijom (Fabbri i Serretti, 2017).

Među sredinskim faktorima koji se povezuju sa povećanim rizikom za nastanak shizofrenije najvažniji su prenatalni i perinatalni faktori. Jedan od najstabilnijih epidemioloških podataka je da su osobe obolele od shizofrenije češće rodene zimi i u

proleće (Davies i sar., 2003). Moguće objašnjenje ovog fenomena jesu češće virusne infekcije u zimskim mesecima, čemu govore u prilog rezultati istraživanja da prenatalna izloženost infekcijama, poput influence, rubele, kao i toksoplazmoze, povećava rizik za kasnije oboljevanje od shizofrenije (Brown, 2006; Khandaker i sar., 2013). Maternalna infekcija i inflamacija mogu narušiti normalni rani razvoj mozga (Miller i sar., 2013), a pretkliničke studije na animalnim modelima ukazuju na važnu ulogu proinflamatornih citokina u ovim procesima (Ashdown i sar., 2006). Takođe, maternalna malnutricija (Xu i sar., 2009) i teški nepovoljni životni događaji (Khashan i sar., 2008) tokom prvog trimestra trudnoće smatraju se faktorima rizika za nastanak shizofrenije. Pokazano je da su osobe obolele od shizofrenije češće bile izložene komplikacijama tokom trudnoće i porođaja, uključujući krvarenje u drugoj polovini trudnoće, gestacijski dijabetes, Rh inkompatibiliju, preeklampsiju, intrauterini zastoje rasta i malu telesnu masu na rođenju, atoniju uterusa, asfiksiju i hitan carski rez (Cannon i sar., 2002). Iako su precizni mehanizmi kojima pojedine opstetričke komplikacije povećavaju rizik za shizofreniju nepoznati, najčešće se kao mogući patogenetski činioci navode hipoksija i ishemija fetusa (Zornberg i sar., 2000). Pored navedenih maternalnih faktora rizika, podaci iz literature ukazuju i da se godine starosti oca smatraju dodatnim riziko-faktorom za razvoj shizofrenije (de Kluiver i sar., 2017).

Faktori okoline koji se javljaju kasnije tokom života uglavnom utiče na pojavu i manifestaciju bolesti, pre nego na njen razvoj. Među njima, najznačajne mesto zauzima upotreba kanabisa, za koju neki autori smatraju da je direktnije povezana sa etiopatogenetskim procesom (Ortiz-Medina i sar., 2018). U suprotnosti sa dominantnim shvatanjima tokom jednog perioda dvadesetog veka, teorije o neadekvatnom roditeljstvu, „duplim porukama“ tokom detinjstva i drugi psihodinamički konstrukti o etiologiji shizofrenije su danas u potpunosti odbačeni (Keshavan i sar., 2006).

1.1.2.2. Morfološke promene u shizofreniji: makroskopski i mikroskopski nalazi

Od prvih opisa shizofrenije iz vremena Krepelina i Blojlera, intenzivno se traga za neuropatološkim osnovama shizofrenije sa promenljivim uspehom. Nakon početnog perioda bez značajnijih rezultata, danas, u eri novih neurovizuelizacionih metoda, kao i sofisticarnih imunohemijskih i molekularnih tehnika, slika koja je dobijena o makroskopskim i mikroskopskim promenama u mozgu obolelih značajno je jasnija. Činjenica da u shizofreniji postoji oko 4% smanjenja moždanog volumena (Wright i sar., 2000) nepobitno ukazuje na postojanje morfoloških promena u mozgu, koje iako suptilne značajno narušavaju funkcionisanje mozga i mentalno zdravlje obolelih.

Najznačajniji nalazi strukturnih neurovizuelizacionih metoda ukazuju na uvećanje lateralnih i treće moždane komore za 20-30% kod obolelih od shizofrenije i istovremeno, redukciju volumena određenih moždanih regiona, na prvom mestu hipokampusa i talamusa (Shenton i sar., 2001). Pored toga, postoji smanjene debljine moždane kore, naročito u frontalnom i temporalnom lobusu (Haukvik i sar., 2013).

Na mikroskopskom nivou zapaža se čitav spektar promena prvenstveno u citoarhitekturi i sinapsama, najizraženijih u hipokampalnoj formaciji, dorzolateralnom prefrontalnom korteksu i talamusu. Odsustvo glioze sugeriše izostanak klasičnog neurodegenerativnog procesa u mozgu (Harrison, 1999). Istraživanja pokazuju da je u prefrontalnom korteksu debljina kore smanjena za 5–10%, bez promena u ukupnom broju neurona, ali uz prisustvo redukcija neuropila koga čine dendriti i aksonski završeci (Selemon i Goldman-Rakic, 1999). U skladu sa tzv. hipotezom o „redukciji neuropila“ jesu dokazi o manjem broju i dužini dendrita piramidalnih neurona, kao i abnormalnosti u ekspresiji pojedinih sinaptičkih proteinima, poput sinaptofizina i SNAP-25 (Eastwood i sar., 2000; Najera i sar., 2019). Dodatno, uočeno je smanjenje veličine some piramidalnih neurona u lamini III u prednjem cingularnom korteksu (Pierri i sar., 2001). U hipokampusu, nalazi ukazuju na postojanje promenjene laminarne organizacije, odnosno neuronalnu dezorganizaciju (Conrad i sar., 1991), što može ukazivati na defekte u migraciji neurona tokom ranog razvoja. Postoje dokazi o

promenjenom obliku i veličini neurona u hipokampusu, kao i prisustvu sinaptičkih promena nalik onim u korteksu (Harrison, 2004). Navedene celularne promene u mozgu obolelih mogu dovesti do promena u neuronskim krugovima, odnosno vezama između pojedinih delova korteksa, kao i korteksa i supkortikalnih struktura koje su odgovorne za patogenetske procese u shizofreniji.

1.1.2.3. Neurohemijske promene u shizofreniji: uloga dopaminergičke neurotransmisije

Uprkos nepoznatoj etiologiji shizofrenije, u godinama za nama sakupljen je veliki broj dokaza o poremećajima unutar nekoliko neurotransmiterskih sistema koji su uključeni u patofiziološke procese ove bolesti. Među neurotransmiterima posebno se ističu dopamin i glutamat, dok se određena uloga pripisuje i GABA, serotoninu, acetilholinu, kao i opioidnim peptidima.

„Dopaminska hipoteza“ predstavlja vodeću teoriju o shizofreniji više od pola veka (Meltzer i Stahl, 1976; Howes i Kapur, 2009). Prema originalnoj pretpostavci, u osnovi psihopatoloških promena karakterističnih za shizofreniju leži hiperdopaminergička aktivnost u supkortikalnim strukturama, pre svega stijatumu. Koreni ove teorije nalaze se u rezultatima dve grupe farmakoloških zapažanja (Javitt i Laruelle, 2006). Najpre, svi poznati lekovi koji poseduju antipsihotično dejstvo i smanjuju pozitivne simptome shizofrenije deluju preko blokade dopaminskih D2 receptora. Pri tome, potentnost antipsihotika povezana je sa njihovim afinitetom prema ovim receptorima. Dodatno, aplikacija visokih doza amfetamina i drugih lekova koji stimulišu oslobađanje dopamine kod zdravih osoba dovodi do pojave simptoma koji se viđaju kod paranoidne shizofrenije, dok kod osoba koje boluju od shizofrenije pogoršava simptome bolesti. Ova rana zapažanja podstakla su temeljno istraživanje dopaminergičkog sistema, te su usledile decenije različitih prekliničkih, *post mortem* i neuroimidžing studija, čiji rezultati su često bivali oprečni (Javitt i Laruelle, 2006). Jedan od doslednih nalaza u većem broju studija jeste povećana gustina D2 receptora u

strijatumu obolelih, (Seeman i sar., 1987) ali se ta promena može objasniti i hroničnom terapijom antispihoticima.

Najvažniji nedostatak teorije o hiperaktivnosti dopaminergičke transmisije u supkortikalnim strukturama je nemogućnost objašnjenja negativnih i kognitivnih simptoma shizofrenije. Iz tog razloga, prvobitna formulacija „dopaminske hipoteze“ dopunjena je idejom o dopaminskoj hipofunkciji u prefrontalnom korteksu. Pretkliničke i funkcionalne neurovizuelizacione studije istakle su značaj prefrontalnog korteksa i dopaminskih D1 receptora za promene u kognitivnim funkcijama (Abi-Dargham i Grace, 2011).

1.1.2.4. Neurohemijske promene u shizofreniji: uloga glutamatergičke neurotransmisije

Počevši od osamdesetih godina 20. veka kada su se zahvaljujući otkriću mehanizma dejstva disocijativnih anestetika poput fenciklidina javili prvi dokazi o učešću glutamatergičke neurotransmisije u etiopatogenezi shizofrenije, tzv „glutamatna hipoteza“ shizofrenije postepeno je sticala sve veću popularnost u naučnoj zajednici. Centralna pretpostavka koji leži u osnovi ove teorije jeste postojanje hipofunkcije glutamatnih N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora (Olney i sar., 1999).

Glutamat je glavni ekscitatorni neurotransmiter u CNS-u i za razliku od dopamina ograničenog na relativno malu subpopulaciju neurona u mezencefalonu koji šalju projekcije ka korteksu i supkortikalnim strukturama, zastupljen je u oko 60% neurona u mozgu, uključujući između ostalog sve piramidalne neurone korteksa (Javitt, 2004). S obzirom na svoju sveprisutnost u mozgu, svaka hipoteza koja se zasniva na disfunkciji glutamatergičke neurotransmisije implicuje generalizovaniji obrazac poremećaja moždanih procesa, za razliku od dopaminergičkih modela ili modela koji uključuju druge modulatorne neurotransmitere (npr. serotonin), koji su fokusirani na specifične moždane regione, npr. prefrontalnu koru ili strijatum. Neurotransmiter glutamat svoje efekte ostvaruje preko različitih receptora koji se mogu podeliti u dve

klase: jonotropne i metabotropne. Jonotropni receptori su dalje diferencirani na osnovu senzitivnosti prema sintetičkim derivatima glutamata na NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropanska kiselina) i kainatne receptore. Metabotropni receptori su povezani sa G-proteinom i dalje su klasifikovani u tri grupe na osnovu signalne kaskade koju pokreću i senzitivnosti prema određenim ligandima. Efekti posredovani ovim receptorima su obično sporiji i uključuju presinaptičku regulaciju oslobađanja glutamata, kao i modulatorne postsinaptičke efekte (Watkins i Jane, 2006, Gereau i Swanson, 2008).

NMDA receptori predstavljaju ligand-zavisne jonske kanale za Ca^{2+} , koji aktivacijom dovode do nastanka eksitatornog postsinaptičkog potencijala, ali usled povećanja intracelularne koncentracije Ca^{2+} kao sekundarnog glasnika i do pokretanja signalnih puteva koji regulišu mnogobrojne procese u neuronima, uključujući i sinaptičku plastičnost. NMDA receptori poseduju jedinstvene karakteristike koje ih čine najsloženijim jonotropnim receptorima u CNS-u (Paoletti i Neyton, 2007). Najpre, pored mesta za vezivanje glutamata kao agoniste, NMDA receptori sadrže i dodatno alosterno modulatorno mesto za koje se vezuju ko-agonisti glicin ili D-serin, neophodni za maksimalnu aktivaciju ovih receptora. S obzirom na relativno velike količine glicina i D-serina u mozgu, potrebna je precizna regulacija intrasinaptičkih koncentracija ovih aminokiselina u neposrednoj blizini NMDA receptora, što se ostvaruje posebnim mehanizmima. U slučaju glicina, to se postiže prisustvom specifičnog transportera za glicin (GLYT1) koji je kolokalizovan sa NMDA receptorima (Javitt i sar., 2005), dok na koncentraciju D-serina utiče obim njegove sinteze pod dejstvom serin racemaze i razgradnje učešćem enzima oksidaze D-aminokiselina (DAO) i proteina aktivatora ovog enzima (DAAOA) (Wolosker i sar., 2008).

Druga značajna osobina NMDA receptora je voltažno-zavisna aktivnost, što podrazumeva blokadu jonskog kanala posredstvom Mg^{2+} pri mirovnom membranskom potencijalu, koja biva otklonjena depolarizacijom membrane (Mayer i sar., 1984). To znači da aktivacija NMDA receptora započinje porastom membranskog potencijala

usled aktivacije AMPA receptora i influksa Na⁺, a posledična depolarizacija, uz prisustvo agonista glutamata i glicina (ili D-serina), omogućava otvaranje NMDA receptorskog kanala.

Dodatna karakteristika NMDA receptora jeste prisustvo regulatornih mesta u NMDA receptorskom kompleksu za koja se vezuju poliamini, poput spermidina, spermina i agmantina, zatim Zn²⁺ i protoni, kao i redoks-zavisno mesto (Gereau i Swanson, 2008). Činjenica da NMDA receptori zavise od redoks statusa poznata je već više decenija, mada potpuni značaj toga nije razjašnjen (Aizenman i sar., 1989). Redukujuća sredstva, poput glutaciona povećavaju aktivnost NMDA receptora, dok obrnuto, oksidujućim agensima, uključujući slobodne radikale, smanjuju njihovu aktivnost (Aizenman i sar., 1990). Azot-monoksid, takođe, inhibira funkciju NMDA receptora prvenstveno preko S-nitrozilacije određenih sulfhidrilnih grupa cisteina u molekulu receptora (Choi i Lipton, 2000).

NMDA receptori su heterotetrameri, pri čemu je jedna subjedinica uvek GluN1 (prema ranijoj nomenklaturi NR1), a ostale neke iz GluN2 (GluN2A–GluN2D) ili GluN3 (GluN3A, GluNRB) familije (Cull-Candy i sar., 2001; Karakas i sar., 2015). Sastav pojedinačnih subjedinica u sklopu NMDA receptora razlikuje se u sinapsama različitih regiona mozga, kao i u različitim fazama razvoja. Tako, neonatalni mozak dominantno sadrži NR2B i NR2D, dok je u adultnom mozgu najviše prisutna NR2A subjedinica. NR2C subjedinica je najzastupljenija u Purkinjeovim ćelijama cerebeluma (Gereau i Swanson, 2008). NMDA receptori su osim u sinaptičkim pukotinama, eksprimirani i ekstrasinaptički na neuronima, ali i na ćelijama glije gde pokazuju određene strukturne i funkcionalne razlike u odnosu na neuronske receptore (Verkhratsky i Kirchhoff, 2007).

Poznati su brojni selektivni i neselektivni kompetitivni ili nekompetitivni antagonisti NMDA receptora, među kojima posebno mesto po značaju zauzima grupa tzv. disocijativnih anestetika, u koje spadaju fenciklidin (engl. *phencyclidine*, PCP), ketamin i dizocilpin (MK-801) (Lodge i Mercier, 2015). Ovi agensi deluju kao

neselektivni nekompetitivni antagonisti NMDA receptora vezujući se za mesto u jonskom kanalu (tzv. PCP-mesto) pri otvaranju kanala čime sprečavaju normalno odvijanje NMDA receptorima posredovane neurotransmisije.

Najsnažniji dokazi koji podržavaju ulogu NMDA receptora u shizofreniji potiču iz istraživanja farmakoloških dejstava fenciklidina i ketamina. Naime, pokazano je da njihova primena kod zdravih ljudi dovodi do pojave dozno-zavisnih efekata koji podsećaju na kliničke karakteristike shizofrenije (Krystal i sar., 1994; Lahti i sar., 2001). Pri tome, za razliku od amfetamina ili dietilamida lizerginske kiseline (LSD) čija primena uzrokuje pojavu efekata nalik prvenstveno pozitivnim simptomima shizofrenije, PCP i ketamin su sposobni da kod zdravih indukuju čitav spektar simptoma koji se viđaju kod obolelih, uključujući negativne simptome i kognitivnu disfunkciju. Dodatno, sama kognitivna disfunkcija je zapanjujuće slična kao kod obolelih, pre svega obuhvata narušenu radnu memoriju i otežano formiranje deklarativne memorije (Malhotra i sar., 1996, Morgan i sar., 2004). Istovremeno, primena ketamina kod obolelih od shizofrenije dovodi do pogoršanja simptoma bolesti (Malhotra i sar., 1997, Lahti i sar., 2001).

Drugu liniju farmakoloških dokaza o NMDA receptorskoj hipofunkciji u shizofreniji čine kliničke studije lekova koji stimulišu NMDA receptore ili njima posredovanu glutamatergičku neurotransmisiju. Pokazano je da jedinjenja poput endogenih agonista NMDA receptora glicina i D-serina, ili sintetičkog agoniste D-cikloserina kod pacijenata dovode do poboljšanja kliničke slike kada se primene kao adjuvanta terapija uz antipsihotike (Tsai i sar., 1998, Shim i sar., 2008, Hashimoto i sar., 2013). Slično je i sa sarkozinom, koji deluje kao inhibitor GLYT1 čime povećava intrasinaptičku koncentraciju endogenog glicina (Tsai i sar., 2004). Zanimljivo, više studija je pokazala da primena ovih lekova nema kliničku efikasnost ukoliko su pacijenti na terapiji klozapinom, što ukazuje na mogućnost da klozapin svoje dejstvo ostvaruje već značajnom potencijacijom glutamatergičke neurotransmisije za razliku od drugih antipsihotika (Lane i sar., 2006, Shim i sar., 2008).

Osim farmakoloških dokaza o ulozi glutamatergičke neurotransmisije u etiopatogenezi shizofrenije, postoje i dodatni nalazi koji ukazuju na ovu činjenicu. Nalazi *post mortem* studija kod obolelih pokazuju izmenjenu ekspresiju različitih proteina odgovornih za normalnu funkciju NMDA receptora, uključujući i proteine postsinaptičke gustine, koji su neophodni za pravilnu lokalizaciju i interakciju receptora sa okolnim proteinima (Banerjee i sar, 2015). Takođe, genetske studije ukazuju na potencijalne gene kandidate od značaja za shizofreniju, čiji produkti ostvaruju funkciju pri glutamatergičkoj neurotransmisije, npr. geni za neuroligin 1, disbindin i aktivator oksidaze D-aminokiselina (Javitt i Laruelle, 2006).

1.1.2.5. Neurofiziološke promene u shizofreniji

U shizofreniji se javljaju specifične elektrofiziološke abnormalnosti koje su posledica neurokognitivnih disfunkcija karakterističnih za ovo oboljenje. Kod obolelih postoji prevashodno narušeno normalno senzorno procesiranje informacija koje između ostalog zahteva očuvanu sposobnost inhibicije odgovora na sporedne i neinformativne stimulse i istovremeno preusmeravanje pažnje na stimulse od značaja. Kao posledica oštećenja filtriranja senzornih informacija javljaju se fenomeni poput deficita prepulsne inhibicije, supresije P50 auditivnog evociranog potencijala, „*mismatch negativity*“ i antisakadirani očni pokreti (Turetsky i sar., 2007). Prepulsna inhibicija je normalan inhibitorni fenomen gde slab prestimulus, ili prepuls, dovodi do smanjenje magnitude odgovora na sledeći jak stimulus. U shizofreniji postoji deficit prepulsne inhibicije što predstavlja jedan od čestih endofenotipova, odnosno markera shizofrenije, koji se koristi u animalnim modelima ove bolesti (Swerdlow i sar., 2001).

Takođe, u skorije vreme uočeno je da u shizofreniji postoje promene u sinhronizovanoj aktivnosti neurona, odnosno oscilacijama u gama opsegu frekvenci (>30 Hz) koje su inače povezane sa nizom viših kognitivnih procesa (Uhlhaas i Singer, 2010). Gama oscilacije su najvećim delom generisane aktivnošću brzo-okidajućih (engl. *fast-spiking*) GABA-ergičkih interneurona (Hájos i sar., 2004).

1.1.3. Terapija shizofrenije

1.1.3.1. Opšti principi lečenja shizofrenije

Terapija shizofrenije se zasniva na integrativnom pristupu koji uključuje primenu psihofarmakološke terapije, psihoterapijske i psihosocijalne intervencije. U toku akutne faze bolesti osnovni cilj terapije je redukcija ili povlačenje postojeće simptomatologije i uspostavljanje remisije sa odgovarajućim stepenom funkcionisanja, što se prevashodno postiže upotrebom psihofarmaka. Nakon uspostavljanja remisije, u stabilnoj fazi bolesti, neophodno je nastaviti farmakološko lečenje, ali je važan i psihosocijalni tretman koji uključuje kognitivnu rehabilitaciju, trening socijalnih veština i psioedukaciju bolesnika i njegove porodice (Mueser i McGurk, 2004; Jašović Gašić i Marić, 2007).

Farmakološka terapija je ključna komponenta tretmana shizofrenije i zasniva se na upotrebi antipsihotika. Savremena primena antipsihotika datira iz ranih pedesetih godina 20. veka kada su Deniker i Delay prvi opisali antipsihotički efekat hlorpromazina (Stroup i sar., 2006). Ovi lekovi su efikasni u smanjenju intenziteta psihotičnih (pozitivnih) simptoma poput halucinacija i sumanutih ideja, skraćuju trajanje akutne epizode i redukuju rizik od relapsa kod stabilnih pacijenata (Sherin i Marder, 2011). Nažalost, antipsihotici pokazuju minimalne efekte na negativne i kognitivne simptome shizofrenije.

Postoje dve grupe antipsihotika – tipični ili antipsihotici prve generacije i atipični ili antipsihotici druge generacije, koje se međusobno razlikuju po farmakološkom profilu. Uprkos početnom entuzijazmu nakon uvođenja u kliničku primenu, atipični antipsihotici, sa izuzetkom klozapina, ne pokazuju značajnu prednost u efikasnosti u odnosu na tipične u terapiji shizofrenije (Jones i sar., 2006). Najznačajnije razlike među antipsihoticima jesu u neželjenim dejstvima do kojih dovode (tabela 1).

Tabela 1. Karakteristike pojedinih tipičnih i atipičnih antipsihotičkih lekova. Preuzeto i modifikovano iz Rang i sar., 2005.

Lek	Afinitet za receptore						Neželjena dejstva			
	D ₁	D ₂	α-adr.	H ₁	mACh	5-HT ₂	EPS	sed.	hipo.	Ostalo
Tipični										
Hlorpromazin	++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	Hiperprolaktinemija Povećanje telesne mase
Tioridazin	+	++	+++	+	++	++	+	++	++	
Haloperidol	+	+++	++	-	+/-	+	+++	-	++	Hiperprolaktinemija
Atipični										
Klozapin	++	++	++	++	+++	+++	-	++	+	Agranulocitoza Povećanje telesne mase
Risperidon	-	++	++	++	+++	+++	+	++	+	Hiperprolaktinemija Povećanje telesne mase Produžen QT interval
Olanzapin							+	++	+	Povećanje telesne mase
Kvetiapin	-	+	+++	-	+	+	+	++	++	Povećanje telesne mase

α-adr. – α-adrenergički receptori; EPS – ekstrapiramidalni sindrom; sed. – sedacija; hipo. – hipotenzija;

1.1.3.2. Tipični antipsihotici

U najznačajnije tipične antipsihotike spadaju hlorpromazin, tioridazin, flufenazin, perfenazin i haloperidol. Ovi lekovi deluju preko blokade dopaminski D₂ receptora koja je odgovorna za njihov terapijski efekat. Ispitivanja *in vivo* tehnikom pozitronske emisije tomografije pokazala su da je za antipsihotično delovanje za većinu antipsihotika potrebno da 70–85% receptora bude blokirano (Farde i sar., 1989).

Antipsihotici prve generacije su veoma efikasni u tretmanu akutne faze shizofrenije. Ne postoje dokazi koji bi ukazali na superiornost u efikasnosti bilo kog predstavnika ove klase lekova u odnosu na druge. Najznačajnije krakotornočno neželjeno dejstvo povezano sa upotrebom tipičnih antipsihotika jeste pojava ekstrapiramidalnih simptoma, poput parkinsonizma (mišićni rigiditet, tremor i bradikinezija), akutne distonijske reakcije i akatizije. Lekovi sa većim afinitetom prema D₂ receptorima, poput haloperidola, imaju veću sklonost ka ispoljavanju ovih neželjenih dejstava. Dugotrajna

komplikacija upotrebe tipičnih antipsihotika je tardivna diskinezija koja se javlja sa godišnjom incidencijom od 5% (Geddes i sar., 2011).

1.1.3.3. Atipični antipsihotici

U atipične antipsihotike se ubrajaju klopazin, risperidon, olanzapin, kvetiapin, ziprasidon, aripiprazol i drugi. Antipsihotički efekat ove grupe lekova takođe je posledica njihove sposobnosti blokade dopaminskih D₂ receptora, iako se za ove receptore vezuju manjim afinitetom u odnosu na tipične. Sa druge strane, atipični antipsihotici deluju i na čitav spektar drugih receptora, pre svega serotoninske 5-HT receptore, što je od značaja kako za njihov terapijski efekat, tako i neželjena dejstva (tabela 1). Uprkos postojanju kliničkih i farmakoloških razlika, i dalje ne postoji jasan konsenzus oko toga kako definisati „atipičnost“ ove grupe antipsihotika.

Glavna karakteristika atipičnih antipsihotika je ređa učestalost pojave ekstrapiramidalnih simptoma u odnosu na tipične antipsihotike. Počevši od klopazina, koa prvog predstavnika antipsihotika druge generacije, razvijena je desetina lekova koji se svrstavaju u ovu heterogenu grupu. Upotreba atipičnih antipsihotika povezana je sa pojavom metaboličkih promena kod pacijenata, poput povećanja telesne mase, hiperglikemije i dislipidemija (Rang i sar., 2005; Geddes i sar., 2011).

1.1.4. Fenciklidinski animalni model shizofrenije

Fenciklidinski animalni model shizofrenije je farmakološki model koji se zasniva na blokadi glutamatnih NMDA receptora u CNS-u primenom fenciklidina. Fenciklidin, 1-(1-fenilcikloheksil)-piperidin, sintetisan je u prvoj polovini 20. veka i imao je svoju kratkotrajnu kliničku primenu kao opšti anestetik. Uprkos odličnoj kliničkoj efikasnosti i odsustvu značajne supresije arterijskog pritiska i respiracije pri anesteziji, PCP je brzo povučen iz upotrebe zbog brojnih neželjenih fenomena koji su se javljali kod pacijenata po buđenju iz anestezije, uključujući halucinacije, dezorganizovan govor i ponašanje, agitaciju i disforiju (Morris i sar., 2005). Neko vreme primena PCP-a se zadržala u

veterinarskoj medicini, a od 1979. godine potpuno je povučen iz legalne upotrebe. Međutim, zbog relativno jednostavne proizvodnje i efekata do kojih dovodi, PCP se našao u ilegalnoj upotrebi kao rekreativna droga najčešće pod nazivom „*angel dust*“, naročito popularna u Sjedinjenim Američkim Državama. U toku akutne intoksikacije PCP-om kod ljudi obično se javljaju dezorganizovano ponašanje, halucinacije, agitacija, nistagmus, tahikardija, hipertenzija i analgezija (Bey i Patel, 2007).

Mehanizam dejstva fenciklidina prevashodno uključuje, kako je već ranije pomenuto, blokadu jonskog kanala u okviru NMDA receptora, koji su zastupljeni širom CNS-a, uključujući koru velikog mozga, hipokampus, bazalne ganglije i talamus. Afinitet vezujućeg mesta na receptoru (tzv. PCP-mesto) za PCP iznosi 0,2–1,0 umol/L, što odgovara koncentracijama koje su pristune u plazmi kod akutne intoksikacije (Morris i sar., 2005). Međutim, iako značajno manji, PCP pokazuje afinitet i prema drugim ciljnim molekulima u CNS-u, kao što su transporter odgovorni za ponovno preuzimanje noradrenalina, dopamina i serotonina, na koje PCP deluje inhibitorno, kao i sigma receptori koje takođe inhibira. Osim što inhibira preuzimanje dopamina i noradrenalina iz sinaptičke pukotine, PCP povećava i njihovu sintezu stimulišući enzim tirozin hidroksilazu (Morris i sar., 2005, Puran i sar., 2014).

Fenciklidinski animalni model shizofrenije podrazumeva varijante u kojima se fenciklidin aplikuje adultnim jedinkama akutno, subhronično ili hronično, kao i aplikaciju fenciklidina tokom perinatalnog perioda (Mouri i sar., 2007; Bubeníková-Valesová i sar., 2008). Akutna administracija PCP i drugih NDMA antagonista kod adultnih jedinki dovodi do povećanja metaboličke aktivnosti u mozgu, porasta ekstracelularnih nivoa glutamata, dopamina i serotonina, kao i bihevioralnih promena, uključujući hiperlokomotornu aktivnost, deficit prepulsne inhibicije i smanjenu socijalnu interakciju (Jentsch i Roth, 1999). Međutim, promene koje se viđaju u mozgu eksperimentalnih životinja nakon subhronične i hronične primene fenciklidina vernije odražavaju promene opisane kod pacijenata sa shizofrenijom (Jentsch i Roth, 1999). Sa druge strane, perinatalna primene fenciklidina u skladu je sa neurorazvojnoum teorijom

shizofreniji prema kojoj se promene u ranom razvoju CNS-a manifestuju pojavom bolesti u adultnom dobu. Rezultati Ikonomidou i sar. (1999) ukazuju da administracija NMDA antagonista u kasnom fetalnom periodu ili tokom prve dve nedelje postnatalnog perioda, period koji odgovara trećem trimestru trudnoće kod ljudi, povećava ćelijsku smrt procesima apoptoze u CNS-u. Suprotno, aplikacija ovih agenasa kod adultnih životinja dovodi do neuronalnih oštećenja procesima nekroze i sledstvene glioze koja se kod obolelih od shizofrenije ne uočava (Olney i sar., 1991). Perinatalni tretman istovremeno dovodi do dugotrajnih bihejvioralnih promena poput povećane lokomotorne aktivnosti, stereotipnog ponašanja, deficita u procesovanju senzornih informacija, oštećenja radne memorije i socijalnih interakcija (Bubeníková-Valesová i sar., 2008).

1.2. Oksidativni stres i redoks regulacija

Aerobni metabolizam obezbeđuje dovoljno energije za ćelijske potrebe, ali je istovremeno čvrsto spregnut sa stvaranjem potencijalno toksičnih molekula. Toksičnost kiseonika zasniva se na produkciji reaktivnih kiseoničnih metabolita koji predstavljaju slobodne radikale. Pod slobodnim radikalima podrazumevaju se joni, atomi ili molekuli koji su sposobni za nezavisno postojanje i imaju jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 2015). Ova osobina ih ponekad čini veoma reaktivnim, iako se hemijska reaktivnost različitih slobodnih radikala značajno varira.

U fiziološkim uslovima, stvaranje slobodnih radikala uravnoteženo je sistemom antioksidativne zaštite. Ta ravnoteža, međutim, nije idealna, tako da povremeno dolazi do prevage prooksidativnih procesa, što posledično može dovesti do oštećenja različitih molekula u ćeliji. Ovo stanje u literaturi se označava kao oksidativni stres (Sies, 2015). Oksidativni stres nastaje ili u uslovima povećane produkcije slobodnih radikala ili kada postoje oslabljeni mehanizmi antioksidativne zaštite. Poslednjih godina, usled brojnih saznanja o ulozi slobodnih radikala u regulaciji različitih ćelijskih procesa (tzv. redoks regulacija), definicija oksidativnog stresa je proširena i pod njim se podrazumeva neravnoteža između prooksidanasa i antioksidanasa u korist prooksidanasa, koja dovodi do narušene redoks signalizacije i regulacije, kao i potencijalnog oštećenja biomolekula (Halliwell i Gutteridge, 2015).

1.2.1. Slobodni radikali

Najvažniji slobodni radikali nastaju nepotpunom redukcijom kiseonika. Međutim, pri određenim ćelijskim procesima formiraju se i slobodni radikali koji nisu kiseonične prirode, od kojih najznačajnije mesto zauzimaju slobodni radikali azota, ugljenika, sumpora, kao i joni prelaznih metala. Takođe, tokom metabolizma kiseonika nastaju i pojedini reaktivni molekuli koji ne zadovoljavaju kriterijume definicije

slobodnih radikala, te se zato u literaturi koristi pojam reaktivne kiseonične vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*) kako bi se označio široki spektar jona, atoma i molekula koji poseduju veću reaktivnost od kiseonika i deluju kao prooksidansi (Halliwell i Gutteridge, 2015). Slična definicija može se primeniti i na reaktivne vrste drugih elemenata (tabela 2).

Tabela 2. Nomenklatura pojedinih reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta. Preuzeto i modifikovano iz Halliwell i Gutteridge, 2015.

Slobodni radikali	Ne-radikali
Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	Reaktivne kiseonične vrste (ROS)
Superoksidni anjon, $O_2^{\cdot-}$	Vodonik-peroksid, H_2O_2
Hidroksilni radikal, OH^{\cdot}	Hipohlorna kiselina, $HOCl$
Hidroperoksidni radikal, OH_2^{\cdot}	Organski peroksidi, $ROOH$
Peroksidni radikal, ROO^{\cdot}	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Alkoksidni radikal, RO^{\cdot}	Peroksinitrat, O_2NOO^-
Singletni kiseonik, $O_2^1\Sigma_g^+$	
Reaktivne azotne vrste (RNS)	Reaktivne azotne vrste (RNS)
Azot-monoksid, NO^{\cdot}	Nitrozilni katjon, NO^+
Azot-dioksid, NO_2^{\cdot}	Nitroksilni anjon, NO^-

1.2.1.1. Superoksidni radikal, vodonik-peroksid i hidroksilni radikal

Molekulski kiseonik ima dva nesparena elektrona lokalizovana u odvojenim molekulskim orbitalama, što ga i samog čini slobodnim radikalom. Kiseonik je dobar oksidujući agens i u ćelijskom metabolizmu potpuno se redukuje do vode uz učešće 4 e⁻. Međutim, postupnom redukcijom, odnosno primanjem po jednog elektrona nastaju delimično redukovani oblici kiseonika: superoksidni anjon-radikal ($O_2^{\cdot-}$), peroksidni jon (O_2^{2-}) i hidroksil-radikal (OH^{\cdot}).

Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$) nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika (Hayyan i sar., 2016). $O_2^{\cdot-}$ ima kratak poluživot u vodenoj sredini, poseduje relativno slabu reaktivnost i stupa u reakcije prvenstveno sa drugim slobodnim

radikalima. S obzirom na svoju anjonsku prirodu, $O_2^{\cdot-}$ ne prolazi lako kroz membrane i svoje dejstvo ostvaruje uglavnom u ćelijskom odeljku gde je formiran.

Značajna količina stvorenog superoksidnog radikala u ćeliji potiče iz mitohondrija (Figueira i sar., 2013). Oko 1–3% kiseonika koje mitohondrije iskoriste pretvori se u $O_2^{\cdot-}$. Tokom prenosa elektrona kroz respiratorni lanac, deo elektrona prevremeno „pobegne“ na molekularni kiseonik, pri čemu nastaje $O_2^{\cdot-}$, najčešće na nivou kompleksa I i III elektron-transportnog lanca, a pod određenim uslovima kompleksa II, kao i enzima glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, prisutnog na spoljašnjoj strani unutrašnje mitohondrijalne membrane nekih tkiva (Lambert i Brand, 2009; Brand, 2016). Sav produkovani $O_2^{\cdot-}$ sa kompleksa I oslobađa se u matriks mitohondrija, dok se $O_2^{\cdot-}$ sa kompleksa III oslobađa i u međumembranski prostor (Muller i sar., 2004). Osim mitohondrija, važan izvor $O_2^{\cdot-}$ jesu enzimske reakcije katalisane enzimima koji prenose elektrone na molekularni kiseonik, uključujući NADPH oksidazu, ksantin oksidazu, aldehid oksidazu i mnoge druge (Vignais, 2002, Westover i sar, 2009, Kundu i sar, 2012). Takođe, u eritrocitima $O_2^{\cdot-}$ nastaje pri transportu kiseonika hemoglobinom (Rifkind i sar., 2004).

Vodonik-peroksid je proizvod dvoelektronske redukcije kiseonika i predstavlja najstabilniji, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Iako je u visokim koncentracijama toksičan za većinu ćelija, produkcija H_2O_2 je značajna zbog prenosa signala u ćeliji. Može nastati u reakcijama jednoelektronske redukcije ili dizmutacije $O_2^{\cdot-}$, kao i direktno iz molekula kiseonika aktivnošću brojnih enzima.

Hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) predstavlja najreaktivniji oblik ROS-a. Može nastati dejstvom jonizujućeg zračenja koje dovodi do homolize kovalentne veze između dva atoma kiseonika u molekulu vode, ili češće iz H_2O_2 tzv. Fentonovom reakcijom u prisustvu dvovalentnih jona prelaznih metala, najčešće gvožđa, kao i u Haber-Vajsovoj reakciji između H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ ((Halliwell i Gutteridge, 2015).

1.2.1.2. Azot-monoksid

Azot-monoksid (NO) je gas male molekulske mase sa jednim nesparenim elektronom što ga čini slobodnim radikalom, hemijski reaktivnim i sa relativno kratkim poluživotom (Toledo i Augusto, 2012). Posедуje lipofilnu prirodu, te lako prolazi kroz membrane u ćeliji. Reaktivnost NO je relativno mala u poređenju sa drugim slobodnim radikalima i uglavnom dobro reaguje sa drugim radikalim, poput tiilnih radikala (RS^{\bullet}), pri čemu nastaju nitrozotioili, npr. S-nitrozoglutation. U reakciji sa $O_2^{\bullet-}$ nastaje peroksinitrit ($ONOO^-$). Ova reakcija se odvija spontano velikom brzinom i njen značaj ogleda se u dva aspekta. Najpre, reakcija između NO i $O_2^{\bullet-}$ govori o antagonizmu bioloških efekata ova dva molekula, na šta ukazuje i dobro poznata činjenica da su efekti posredovani NO pojačani dodatkom superoksid dizmutaze koja uklanja $O_2^{\bullet-}$. Drugi značaj pomenute reakcije je samo formiranje $ONOO^-$ koji ima značajan prooksidativni kapacitet i dovodi do oksidativnih modifikacija biomolekula putem nitracije DNK, lipida ili proteina (npr. nastanak 3-nitrotirozina). Kao degradacioni produkti NO i $ONOO^-$ nastaju relativno stabilna jedinjenja nitriti (NO_2^-) i nitrati (NO_3^-) (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Osim toga što ima potencijalno toksične efekte koje ispoljava kao slobodni radikal, NO predstavlja važan celularni signalni medijator. Njegova uloga je najpre prepoznata u krvnim sudovima kada je označen kao endotelni faktor relaksacije (EDRF) (Furchgott i Zawadzki, 1980). Kasnije su pokazane njegove uloge u različitim fiziološkim procesima, uključujući ulogu u neurotransmisiji u CNS-u (Garthwaite i sar., 1988). Svoje dejstvo NO ostvaruje prevashodno aktiviranjem solubilne guanilat ciklaze (sGC), što uzrokuje porast cGMP-a u ćeliji koji zatim deluje na specifične protein kinaze čime se pokreće odgovarajuća signalna kaskada. NO reaguje sGC vezujući se za hem-grupu ovog proteina, molekularnim mehanizmom koji je opisan kao značajan za interakciju NO i sa drugim hem-proteinima, poput hemoglobina i citohrom c oksidaze (Toledo i Augusto, 2012). Mitohondrijalni enzim citohrom c oksidaza je važna meta dejstva NO koji dovodi do reverzibilne inhibicije ovog enzima čime reguliše

mitohondrijalnu respiraciju (Brown, 2001). Osim interakcije sa hem-proteinima, NO i produkti koji nastaju iz NO imaju sposobnost da reaguju sa drugim proteinima preko S-nitrozilacije cisteina čime ostvaruju regulaciju njihove aktivnost.

NO se sintetiše iz aminokiseline L-arginina pod dejstvom enzima azot-monoksid sintaze (NOS) (EC 1.14.13.39) (Alderton i sar., 2001). NOS predstavlja homodimer, a svaka subjedinica sadrži C-terminalni oksidazni domen i N-terminalni reduktazni domena. Za katalitičku aktivnost NOS potreban je niz kofaktora, uključujući hem, tetrahidrobiopterin (BH₄), FAD, FMN, NADP i Zn²⁺. Reakcija uključuje prenos e⁻ sa NADPH na reduktazni domen koji sadrži FAD i FMN koji prenose e⁻ do oksidaznog domena gde se uz pomoć henskog gvožđa, BH₄ i O₂ vrši transformacija L-arginina do citrulina i formiranje NO. U slučaju niskih nivoa BH₄ usled narušene sinteze ili regeneracije iz dihidrobiopterina (BH₂), NOS može proizvoditi O₂⁻ (Halliwell i Gutteridge, 2015). Postoje tri različita izoenzima NOS koji su produkti različitih gena i razlikuju se po lokalizaciji, katalitičkim i regulatornim karakteristikama i osetljivosti prema inhibitorima, a pokazuju 51–57% homologije aminokiselina u polipeptidnom lancu. Ovi izoenzimi se označavaju kao NOS1 (nNOS, neuronalna NOS), koji se predominantno eksprimira u nervnom tkivu, NOS2 (iNOS, inducibilna NOS), čija se ekspresija može značajno povećati u različitim tkivima pro-inflamatornim citokinima ili endotoksinom, i NOS3 (eNOS, endotelna NOS), koji je ekspimiran u endotelnim ćelijama. NOS1 i NOS3 su konstitutivni enzimi i regulisani su kalcijumom preko interakcije sa Ca²⁺-kalmmodulinom, za razliku od NOS2 čija aktivnost ne zavisi od Ca²⁺, sadrži stalno vezan kalmmodulin i čiji nivo transkripcije može biti značajno indukovano, naročito u makrofagima tokom infekcije ili inflamacije (Toledo i Augusto, 2012).

U CNS-u oko 90% produkovanog NO nastaje aktivnošću nNOS izoenzima (Bernstein i sar., 2005). Ovaj izoenzim ima PDZ-domen kojim se vezuje za PSD-95 (engl. *postsynaptic density protein-95*) čime se dovodi u neposrednu blizinu NMDA receptora, što ima veliki biološki značaj (Christopherson i sar., 1999). Naime, aktivacijom NMDA receptora dolazi do influksa Ca²⁺ što aktivira NOS i dovodi do

produkcije NO (Knowles i Moncada, 1994; Girouard i sar., 2009). Prođukovani NO može pokrenuti signalnu kaskadu u samom postsinaptičkom neuronu ili dufundovati kroz ćelijsku membranu i delovati na presinaptički neuron i druge ćelije. Takode, NO ima sposobnost regulacije samih NMDA receptora negativnom povratnom spregom njihovom S-nitrozilacijom, čime ostvaruje jednu od centralnih ulogu u modulaciji neurotransmisije i procesa koji se dešavaju posredstvom ovih receptora, uključujući sinaptičku plastičnost (Mungrue i Bredt, 2004). Postoje razlike u regionalnoj i ćelijskoj distribuciji nNOS u CNS-u. Najveće količine enzima pristune su u *substantia innominata*, cerebralnom korteksu, *nc. accumbens*-u, hipotalamusu, subtalamusu i cerebelumu, dok su najniži nivoi u *corpus callosum*-u, talamusu i okcipitalnom korteksu (Bernstein i sar., 2005). Oko 1–2% neurona korteksa ekspirira nNOS (Snyder i Bredt, 1991).

Iako je nNOS prisutan i u glijalnim ćelijama, dominantni izoenzim koji ove ćelije ekspiriraju jeste iNOS. Najveći nivoi iNOS prisutni su u mikroglialnim ćelijama. Transkripcija iNOS gena je regulisana brojnim faktorima, poput endotoksina i citokina, a količine ovog inducibilnog enzima značajno rastu u CNS-u u stanju septičkog šoka, nakon ishemije, tokom multiple skleroze i u Alchajmerovoj bolesti (Bernstein i sar., 2005). eNOS izoenzim je u CNS-u najviše zastupljen u endotelu krvnih sudova, gde kao i u drugim tkivima, nakon stimulacije Ca^{2+} uzrokuje povećanu produkciju NO koji deluje na glatke mišićne ćelije i posledično dovodi do relaksacije krvnih sudova (Knowles i Moncada, 1994).

1.2.1.3. Oštećenje biomolekula uzrokovano slobodnim radikalima: lipidna peroksidacija

Kao posledica narušene ravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa dolazi do značajnih promena u ćelijama. U uslovima blagog do umerenog stepena oksidativnog stresa, mnoge ćelije reaguju povećanom proliferacijom, kao i adaptivnim odgovorom koji uključuje podizanje nivoa različitih komponenti antioksidativne zaštite

(Halliwell i Gutteridge, 2015). Istovremeno, u ćeliji nastaju oštećenja različitih biomolekula, uključujući DNK, proteine i lipide, koja pokreću reparativne mehanizme ili u krajnjem slučaju u uslovima značajnih oštećenja vode u ćelijsku smrt. Potrebno je istaći da oštećenja biomolekula nastaju prvenstveno direktno pod uticajem slobodnih radikala, ali da su određena oštećenja posledica i indirektnih promena koje nastaju u uslovima oksidativnog stresa, npr. porast intracelularnog Ca^{2+} dovešće do aktivacije niza enzima koji menjaju strukturu i funkciju velikog broja proteina i drugih molekula (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Niske koncentracije produkata oksidativnog oštećenja molekula DNK, odnosno njegovih sastavnih komponenti purina, pirimidina i deoksiriboze, prisutne su i u fiziološkim uslovima u ćelijama sa aerobnim metabolizmom. Međutim, tokom oksidativnog stresa značajano je povećan nastanak modifikovanih azotnih baza i drugih promena u DNK. Najčešće oksidativne modifikacije jesu hidroksilni adukti azotnih baza nastali u reakciji sa OH^{\bullet} , na primer 8-hidroksiguanin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 5-hidroksicitozin, 5-(hidroksimetil)-uracil itd, ali i ciklični produkti sa deoksiribozom, poput 8,5'-ciklo-2'-deoksiguanozina i 8,5'-ciklo-2'-deoksiadenozina. (Dizdaroglu i Jaruga, 2012). Neka od ovih jedinjenja (npr. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) određuju se kao biomarkeri oksidativnog oštećenja DNK u biološkim tečnostima, najčešće urinu (Nishimura, 2011).

Oksidativno oštećenje proteina nastaje direktnim dejstvom slobodnih radikala ili sekundarno usled Ca^{2+} posredovane aktivacije proteaza, oksidativnog oštećenja DNK/RNK ili interakcije sa nastalim produktima oksidativnog oštećenja lipida i ugljenih hidrata. Pojedine promene na proteinima koje nastaju pod uticajem ROS su reverzibilne, poput formiranja disulfidnih mostova, S-nitrozilacije, narušavanje Fe-S klastera i glutationilacija. Neke od ovih promena su mehanizmi kovalentne regulacije funkcije mnogih proteina. Ireverzibilna oksidativna oštećenja proteina uključuju raskidanje peptidne veze i oksidativne modifikacije pojedinačnih aminokislina pri čemu nastaju 2-oksohistidin, metionin-sulfoksid, glutamat-semialdehid, 2-aminoadipat-

semialdehid, 3-nitrotirozin, dihidroksifenilalanin i niz drugih produkata (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Pored DNK i proteina, meta oksidativnog oštećenja su i lipidi u procesu koji se označava kao lipidna peroksidacija (Niki, 2014). Lipidnom peroksidacijom mogu biti zahvaćeni lipidi u sastavu ćelijskih membrana, lipoproteina i drugi. Ovaj proces je dobro proučen najpre u industriji hrane gde je prepoznat kao osnov za pojavu užeglosti tokom čuvanja hrane koja sadrži masti ili ulja. Lipidna peroksidacija odvija se kroz nekoliko faza. U fazi inicijacije dolazi do oduzimanja vodonika od strane ROS iz metilenske grupe najčešće polinezasićene masne kiseline, pri čemu nastaje lipidni radikal. Lipidni radikal može dovesti do preraspodele dvostrukih veza unutar polinezasićene masne kiseline i formiranje konjugovanih diena ili češće može reagovati sa O₂ pri čemu nastaje peroksidni radikal (ROO•). ROO• zatim ima sposobnost da inicira oduzimanje atoma vodonika sa susednih molekula masnih kiselina i ta faza se označava kao faza propagacije. Zajedno sa atomom vodonika, ROO• predstavlja lipidni (hidro)peroksid (ROOH). Reakcija će teći autokatalitički sve dok u fazi terminacije dva slobodna radikala međusobno ne reaguju čime se zaustavlja lančana reakcija lipidne peroksidacije. U ovom procesu može nastati niz intermedijera ili finalnih produkata lipidne peroksidacije, uključujući ciklične perokside i endoperokside, alkoksi radikale (RO•), izoprostane, izoketale i kratkolančane ugljovodonike tipa alkana, alkena i aldehida, poput malondialdehida (MDA) i 4-hidroksi-2-*trans*-nonenala (HNE). MDA nastaje peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina koje sadrže više od dve dvostruke veze i sam predstavlja potencijalno toksični molekul s obzirom na svoju sposobnost da reaguje sa proteinima stvarajući intra i inter-molekulske mostove, kao i sa DNK čime ostvaruje mutageno dejstvo. Određivanje izoprostana, MDA i HNE u biološkim tečnostima koristi se kao biomarker oksidativnog stresa. Posledice oksidativnog oštećenje lipida u ćelijskoj membrani jesu smanjenje fluidnosti membrane, povećana razmena fosfolipida između dva fosfolipidna sloja, povećana propustljivost za određene jone (npr. za jone Ca²⁺) i oštećenje membranskih proteina, uključujući

receptore, transportne proteine i enzime, a pri najtežim oštećenjima dolazi do potpunog narušavanja integriteta membrane.

1.2.2. Antioksidativna zaštita

Antioksidansom se smatra bilo koja supstanca koja sprečava, usporava ili uklanja oksidativna oštećenja nastala dejstvom slobodnih radikala (Halliwell i Gutteridge, 2015). Pojedini antioksidansi se sintetišu *in vivo*, dok se drugi moraju unositi u organizam hranom. S obzirom na raznolikost reaktivnih kiseoničnih i drugih vrsta, kao i oštećenja do kojih dovode, antioksidativna zaštita koristi različite strategije kako bi ostvarila svoje dejstvo (Sies, 1993). Prvi nivo zaštite obuhvata kontrolu stvaranja ROS, što se između ostalog postiže proteinima koji smanjuju ili sprečavaju kontakt između prooksidanasa; npr. joni gvožđa i bakra vezani su za proteine poput transferina, ceruloplazmina, albumina. Potom, sledeći nivo uključuje mehanizme kojima se stvoreni ROS uklanjaju, bilo enzimskim reakcijama ili ne-enzimskim putem, molekulima poput glutationa, α -tokoferola, askorbinske kiseline, urata i drugih. Konačno, poslednji nivo zaštite koji određeni autori ne smatraju antioksidativniom zaštitom u užem smislu, čine enzimi i drugi molekuli uključeni u reparatorne procese kojima se uklanjaju nastala oksidativna oštećenja DNK, proteina i lipida (Halliwell i Gutteridge, 2015).

1.2.2.1. Superoksid dizmutaza

Superoksid dizmutaza (SOD, EC 1.15.1.1) predstavlja enzim koji katališe reakciju dizmutacije superoksidnog radikala do vodonik-peroksida i molekuskog kiseonika. Enzim je prvi put opisan 1969. godine kada su McCord i Fridovich pokazali da eritrociti poseduju protein koji katalitički uklanja $O_2^{\cdot-}$ (McCord i Fridovich, 1969). Kasnije je utvrđeno da SOD predstavlja prvu liniju odbrane organizma od slobodnih radikala i da gotovo svi aerobni organizmi poseduju ovaj enzim. Kod čoveka, postoje najmanje tri izoenzima koji se međusobno razlikuju po metalnom jonu koji koriste kao kofaktor i subcelularnoj lokalizaciji: SOD1 (bakar, cink-zavisna superoksid dizmutaza,

Cu,Zn-SOD), SOD2 (mangan-zavisna superoksid dizmutaza, Mn-SOD) i SOD3 (ekstracelularna superoksid dizmutaza) (Zelko i sar., 2002). Za sve izoenzime zajednički je ping-pong mehanizam reakcije dizmutacije koji uključuje naizmeničnu oksidaciju i redukciju metalnog jona u aktivnom mestu (Sheng i sar., 2014). Katalizovana dizmutacija O_2^- je izuzetno efikasna i odvija se oko 10^4 puta brže od spontane dizmutacije.

SOD1 je prevashodno citosolni enzim, iako se u malim količinama nalazi i u lizozomima, jedru i međumembranskom prostoru mitohondrija (Okado-Matsumoto i Fridovich, 2001). Enzim poseduje molekulsku masu od oko 32 kDa i predstavlja homodimer, pri čemu obe subjedinice sadrže u aktivnom mestu Cu^{2+} i Zn^{2+} , kao i jedan intramolekularni disulfidni most (između Cys 57 i 146) i dve slobodne SH-grupe (Cys 6 i 111) koje učestvuju u disulfidnom povezivanju dve subjedinice (Sheng i sar, 2014). Jon cinka ne učestvuje u samoj katalizi, već je neophodan za stabilizaciju strukture enzima. Ugradnja bakarnog jona zahteva prisustvo posebnog proteina, metalošaperona koji je označen kao CCS (engl. *copper chaperone for SOD*) koji ujedno učestvuje i u pravilnom formiranju disulfidnog mosta (Banci i sar., 2012). SOD1 je izuzetno stabilan enzim, otporan na dejstvo visoke temperature i mnogih deterženata (Sheng i sar., 2014), a inhibiran je cijanidom i dietilditiokarbamidom (Heikkila i sar., 1976). Gen za SOD1 smešten je na hromozomu 21q22.11; mutacije u ovom genu povezane su sa familijarnom formom amiotrofične lateralne skleroze (Rosen i sar., 1993).

SOD2 predstavlja mitohondrijalni enzim koji je prisutan kao homotetramer, sa subjedinicama molekulske mase od 22 kDa koje sadrže po jedan Mn^{3+} (Sheng i sar, 2014). Enzim je kodiran od strane gena na hromozomu 6q25.3 i nakon sinteze se upućuje u mitohondrije zahvaljujući signalnoj sekvenci na N-terminalnom kraju (Miao i St Clair., 2009).

Studije na *knockout* miševima pokazale su da je od tri izoenzima SOD, jedino Mn-SOD neophodan za preživljavanje. Miševi homozigoti ($-/-$) za *sod2* imaju potpuni gubitak aktivnosti ovog enzima što nema efekta na embrionalni razvoj, ali dovodi do

smrti ubrzo po rođenju usled dilatativne kardiomiopatije (Li i sar., 1995). Zapaženo je značajno smanjenje aktivnosti nekoliko mitohondrijalnih enzima, uključujući sukcinat dehidrogenazu i akonitazu, najizraženije u srčanom mišiću. Kod heterozigota (+/-) za *sod2* pokazano je povećanje oksidativnog oštećenja jedarne i mitohondrijalne DNK i duplo veća učestalosti tumora u odnosu na *wild-type* miševe, dok životni vek i biomarkeri starenja nisu bili izmenjeni (Van Remmen i sar., 2003). U studiji Copin i sar. (2000) pokazano je da prekomerna ekspresije Cu,Zn-SOD ne kompenzuje neonatalnu smrtnost uzrokovanu gubitakom aktivnosti Mn-SOD kod *knockout* miševa, što ukazuje na značaj različite subcelularne lokalizacije ova dva izoenzima.

1.2.2.2. Katalaza

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je enzim koji katališe reakciju dizmutacije vodonik-peroksida do molekuskog kiseonika i vode. Osim katalaze, uklanjanje potencijalno toksičnog H₂O₂ vrši se pod dejstvom enzima koji deluju kao peroksidaze, kao što su glutation peroksidaza ili peroksiredoksini (Halliwell i Gutteridge, 2015). CAT predstavlja homopolimerni enzim sastavljen iz četiri subjedinice, a svaka subjedinica sadrži (Fe³⁺)-hem u aktivnom mestu. Takođe, za svaku subjedinicu vezan je po jedan molekul NADPH (Putnam i sar., 2000). Katalitička aktivnost je prisutna samo u tetramernom obliku enzima. Reakcija koju katališe CAT se odvija u dva koraka. Najpre, Fe³⁺ iz hema redukuje prvi molekul H₂O₂ do vode pri čemu nastaje oksiferilni jon (FeO³⁺) koji se označava kao kompleks I. Potom, u drugom koraku kompleks I oksiduje drugi molekul H₂O₂ do O₂, dok se kiseonik iz oksiferilnog jona otpušta kao H₂O (Putnam i sar., 2000). Osim opisanog katalaznog tipa reakcije, u određenim uslovima katalaza poseduje i peroksidaznu aktivnost kada kompleks I oksiduje druge supstrate (npr. metanol, etanol, formaldehid, acetaldehid, nitrite i dr.), a iz ove reakcije izlaze oksidovani supstrat, voda i nativni enzim (Nicholls, 2012). Aktivnost katalaze nespecifično je inhibirana azidom, cijanidom, kao i specifičnim inhibitorom aminotriazolom (Nicholls, 2012).

Katalaza je zastupljena u svim tkivima, a najveća aktivnost je prisutna u jetri i eritrocitima. Eritrociti uklanjaju H_2O_2 poreklom iz samih eritrocita dizmutacijom $O_2^{\cdot-}$ koji nastaje autooksidacijom hemoglobina, ali, takođe, s obzirom na to da molekul H_2O_2 lako prolazi kroz ćelijsku membranu imaju ulogu i u zaštiti ostalih tkiva od ekstracelularnog H_2O_2 (Winterbourn i Stern, 1987). Unutar ćelija, sa izuzetkom eritrocita, enzim se gotovo u celosti nalazi u peroksizomima gde ima osnovnu ulogu u redoks metabolizmu ove organele, ali i čitave ćelije (Nordgren i Fransen, 2014). Naime, u peroksizomima nastaje značajna količina H_2O_2 učešćem velikog broja enzima različitih metaboličkim putevima, između ostalog β -oksidacije dugolančanih masnih kiselina što je od naročitog značaja u CNS-u. Deo stvorenog H_2O_2 i u normalnim okolnostima izlazi iz peroksizomima u citosol i učestvuje u redoks statusu mitohondrija i drugih organela ćelije (Ivashchenko i sar., 2011).

Gen za katalazu nalazi se na hromozomu 11 i opisane su mutacije u ovom genu koje kod ljudi dovode do akatalazemije (Góth L i Nagy, 2013). Prvi opisi ovog relativno blagog stanja, tzv. Takahara bolesti, potiču iz Japana i najuočljivija klinička karakteristika jeste povećana incidencija oboljenja desni. Međutim, kod obolelih postoji povećana osetljivost na toksične efekte H_2O_2 koji između ostalog dovodi do methemoglobinemije ili preko oštećenja β -ćelije pankreasa povećanog rizika za oboljevanje od dijabetesa melitusa (Góth L i Nagy, 2013). Slično, kod *knockout* miševa za *cat* (-/-) postoji normalno preživljavanje, bez izraženog fenotipa, iako ovi miševi pokazuju veću osetljivost prema toksičnim efektima H_2O_2 (Ho i sar., 2004). Zanimljivo, kod ovih životinja nije primećeno kompenzatorno povećanje aktivnosti drugih antioksidativnih enzima, poput glutation perokidaze (Kobayashi i sar., 2005). Sa druge strane, kod transgenih miševa sa prekomernom ekspresijom CAT u mitohondrijama, gde se inače ovaj enzim ne nalazi, dolazi do poboljšanja staranjem uzrokovanog smanjenja funkcije srčanog i skeletnih mišića i blagog produženja životnog veka (Dai i sar., 2012).

1.2.2.3. Glutation

Tripeptid glutation (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin) je najvažnije neproteinsko tiolno jedinjenje, široko rasprostranjeno u humanim tkivima, ali i svim eukariotskim i mnogim prokariotskim ćelijama. Kada je prvi put izolovan iz ćelija plesni i opisan 1888. godine, nazvan je „filotion“, kako bi se naglasila njegova naročito reaktivnost prema sumporu (Halliwell i Gutteridge, 2015). U ćeliji, glutacion je dominantno prisutan u redukovanom obliku (GSH), a manje kao disulfid, u oksidovanom obliku (GSSG) koji nastaje spajanjem dva molekula GSH pri čemu se sulfhidrilne grupe cisteina oksiduju i formiraju disulfidni most. Kako je intracelularna koncentracija glutaciona visoka i kreće se u milimolarnom opsegu, redoks par GSSG/2GSH smatra se glavnim doprinosiocem ukupnog redoks statusa ćelije (Go i Jones, 2013). Enzim glutation reduktaza odgovoran je za prevođenje oksidovane forme glutaciona u redukovanu uz utrošak NADPH kao kofaktora.

Glutation ima mnogobrojne funkcije u ćeliji. Iako je njegov značaj kao antioksidansa u odbrani od slobodnih radikala najevidentniji, njegova uloga u biohemijskim procesima u ćeliji se tu ne završava. Glutation učestvuje u detoksikaciji ksenobiotika, sintezi leukotrijena, sintezi DNK i neophodan je za pravilno uvijanje proteina, kao i degradaciju proteina sa disulfidnim vezama. Glutation je uključen u homeostazu kalcijuma, transport aminokiselina kroz ćelijsku membranu i komunikaciju među ćelijama. Konačno, glutacion je neophodan i za procese mitogeneze, kao i za regulaciju ćelijskog ciklusa. Većinu ovih funkcija, glutacion ostvaruje u sadejstvu sa različitim enzimima od kojih su najvažniji za njegov metabolizam, glutacion peroksidaza, glutacion reduktaza i glutacion S-transferaza (Halliwell i Gutteridge, 2015).

U CNS, koncentracija glutaciona nalazi se u opsegu 1–3 mmol/L (Dringen, 2000). Postoje značajne razlike u nivoima glutaciona u različitim ćelijskim populacijama i anatomskim regijama. Nalazi histohemijskih i imunohistohemijskih studija ukazuju na primarnu lokalizaciju glutaciona u glijalnim ćelijama, kao i aksonima i nervnim završecima, dok tela neurona sadrže relativno male količine glutaciona, uz nekoliko

izuzetaka, npr. Purkinjeove ćelije u cerebelumu (Dringen, 2000). Takođe, sadržaj glutaciona naročito je visok u endotelijalnim ćelijama koje oblažu lateralne komore i ćelijama u subventrikularnoj zoni (Sun i sar., 2006). Dodatno, neuroni u razvoju u subgranularnoj zoni *girus dentatus*-a sadrže oko tri puta više glutaciona u odnosu na okolne neurone u granularnom sloju (Sun i sar., 2006). Kao i u većini drugih tipova ćelija, glutacion u ćelijama CNS-a dominantno je prisutan u citosolu, dok se 10–20% nalazi u mitohondrijama. Mitohondrije preuzimaju glutaciona iz citosola posredstvom barem dva specifična transportna sistema (Lash, 2006). U jedru se takođe nalaze određene količine glutaciona (García-Giménez i sar., 2013). Oksidovani oblik glutaciona čini oko 1–2% ukupnog glutaciona u mozgu, slično kao i u drugim tkivima.

Metabolizam glutaciona je detaljno proučen. Sinteza glutaciona odigrava se u citosolu u dva koraka. Najpre, γ -karboksilna grupa glutamata reaguje sa amino-grupom cisteina u reakciji koju katališe enzim γ -glutamilcistein ligaza. U sledećoj reakciji, nastali dipeptid γ -L-glutamil-L-cistein reaguje sa glicinom uz aktivnost enzima glutacion sintetaze. U obe reakcije, troši se po jedan mol ATP-a (Lu, 2013).

Prva reakcija u sintezi je kontrolna i nju katališe regulatorni enzim γ -glutamilcistein ligaza (GCL, EC 6.3.2.2, ranije γ -glutamilcistein sintetaza). Humani enzim je izolovan, prečišćen i utvrđene su strukturne, fizičko-hemijske i kinetičke karakteristike (Misra i Griffith, 1998). Enzim je heterodimer i čine ga katalitička subjedinica (GCLC) (73 kDa, teški lanac) i modulatorna subjedinica (GCLM) (27,7 kDa, laki lanac) koje su kodirane različitim genima (Yan i Meister, 1990). Kod ljudi, gen za GCLC smešten je na hromozomu 6p12.1, a za GCLM na hromozomu 1p21.1 (Tsuchiya i sar., 1995). Aktivnost GCL i *de novo* sinteza GSH regulisana je pre svega sledećim faktorima: intracelularnom koncentracijom GSH koji deluje kao kompetitivni inhibitor enzima ($K_i=2,3$ mmol/L) i negativnom povratnom spregom utiče na obim sinteze, i raspoloživošću supstrata L-cisteina, čija koncentracija u ćeliji se nalazi u rangu vrednosti K_m ovog enzima za cistein (0,3 mmol/L) (Lu, 2009). Sa druge strane, vrednost K_m enzima za glutamat je oko deset puta veća od intracelularne koncentracije glutamata.

Subjedinica GCLC poseduje katalitičku aktivnost nezavisno od GCLM, ali GCLM značajno povećava aktivnost enzima smanjujući K_m za glutamat i ATP, takođe povećavajući K_i za GSH, čime umanjuje povratnu inhibiciju glutationom (Yang i sar., 2007). Studije na *knockout* miševima homozigotima za *gclc* ($-/-$) ukazuju na značaj ovog gena za preživljavanje (Dalton i sar., 2000). *Knockout* miševi za *gclm* ($-/-$) imaju normalno preživljavanje, ali su nivoi GSH zavisno od ispitivanog tkiva sniženi na 9–40% vrednosti koje postoje kod *wild type* miševa (Yang i sar., 2002). U mozgu, kod *gclm* ($-/-$) miševa glutation je za 60–70% manji u odnosu na kontrolne vrednosti (Chen i sar., 2005).

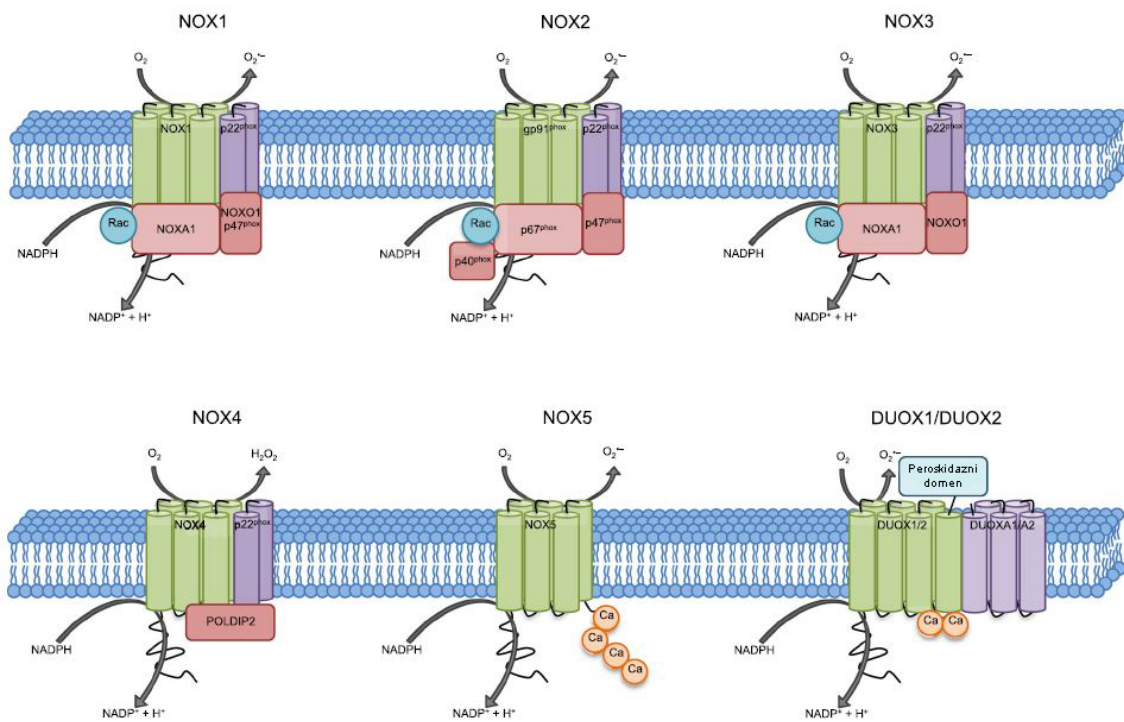
Sinteza glutationa u CNS-u odigrava se identično kao i u drugim tkivima, mada su aktivnosti enzima sinteze značajno niže u poređenju sa nekim drugim organima, poput jetre ili bubrega (Dringen, 2000). Neuronu ne poseduju transportni sistem za preuzimaju glutationa iz ekstracelularnog prostora, tako da neuronske koncentracije glutationa isključivo zavise od intracelularne sinteze. Prekursore za sintezu glutationa neuronu preuzimaju iz okoline u vidu glutamina i cisteina. Sa druge strane, astrociti koriste cistin i glutamat. Takođe, astrociti su glavni izvori ekstracelularnog glutationa u CNS-u zbog sposobnosti da sekretuju glutation posredstvom MRP1 (engl. *multi-drug resistance-associated protein 1*).

Antioksidativna uloga glutationa spregnuta je sa reakcijom koju katališe enzim glutation peroksidaza u kojoj se H_2O_2 prevodi u vodu. Familiju glutation peroksidaza čini za sada osam identifikovanih izoenzima, od kojih pojedini predstavljaju selen-zavisne proteine (GPx1–4 i GPx6). Enzim je prisutan u citosolu, jedru, mitohondrijama, peroksisomima, kao i plazmi. Glutacion peroksidaza između ostalog ima ulogu u redoks regulaciji posredstvom održavanja homeostaze H_2O_2 (Brigelius-Flohé i Maiorino, 2013). U CNS-u prisutno je više izoenzima GPx, a poseban značaj, naročito u razviću mozga ima GPx4 koja se označava i kao fosfolipid-hidroperoksid GPx (Savaskan i sar., 2007).

1.2.3. Familija NADPH oksidaza

NADPH oksidaza (NOX) predstavlja familiju enzima koji prenose elektrone kroz biološke membrane, pri čemu je akceptor elektrona najčešće molekularni kiseonik, a produkt reakcije superoksidni radikal (Bedard i Krause, 2007). Prvi put je opisana u fagocitima u procesu respiratornog praska kao deo sistema odbrane domaćina od bakterija. Fagocitni NOX bio je prvi primer enzima koji ROS ne produkuje kao sporedni produkt reakcije, već u sklopu svoje primarne funkcije (Babior i sar., 1973). Paralelno sa rastućim saznanjima o strukturi i funkciji ovog enzima u fagocitima i značaju za imunski sistem, javili su se dokazi o prisustvu NOX u drugim ćelijama i tkivima. Danas se smatra da je NOX ubikvitaran enzim uključen u regulaciju niza fundamentalnih procesa u ćeliji, poput ćelijskog rasta i diferencijacije, apoptoze, redoks signalizacije, ali i specijalizovanih fizioloških procesa kao što su kontrola vaskularnog tonusa, stvaranje otokonija u unutrašnjem uhu, dejodinacija tireoidnih hormona i dr. (Krause, 2004; Brown i Griendling, 2009).

Familiju NADPH oksidaze čini više proteina koji su neophodni za katalitičku aktivnost i regulaciju NOX enzima. Ekspresija pojedinih članova familije NOX razlikuje se u zavisnosti od tipa ćelije. Katalitička subjedinica prvog identifikovanog NOX izoenzima u fagocitima označava se kao NOX2 (gp91^{phox}) i prisutna je udružena sa transmembranskim proteinom p22^{phox} u kompleksu koji se naziva citohrom b₅₅₈. Pored NOX2, opisano je još šest izoenzima NADPH oksidaze – NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, dualna oksidaza 1 (DUOX1) i DUOX2. Osim NOX2, membranska subjedinica p22^{phox} udružena je sa izoenzimima NOX1, NOX3 i NOX4. Pored membranskih subjedinica, u sastav NADPH oksidaze ulaze i citosolne subjedinice: dve organizatorske subjedinice (p47^{phox} ili NOXO1), dve aktivirajuće subjedinice (p67^{phox} ili NOXA1) i modulatorna subjedinica (p40^{phox}) (Geiszt, 2006; Bedard i Krause, 2007). Na slici 1 i tabeli 3 prikazane su struktura i karakteristike NOX izoenzima.



Slika 1. Shematski prikaz strukture različitih članova porodice NADPH oksidaze. Preuzeto i modificirano iz Ma i sar., 2017, *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 7.

Katalitička subjedinica svih NOX izoenzima poseduje zajedničku građu. Sastoji se iz šest transmembranskih domena, dva hema smeštena između transmembranskih domena III i V i dva domena u citoplazmatskom delu polipeptidnog lanca blizu C-terminalnog kraja koji vezuju FAD, odnosno NADPH. NOX5 i DUOX1 i 2 sadrže i dodatne domene; u slučaju NOX5 Ca^{2+} -vezujući domen sa karakterističnim EF-ručica motivom, dok DUOX1 i 2 pored toga sadrže sedmi transmembranski domen sa peroksidaznom aktivnošću bliže amino-terminalnom kraju. NOX prenosi pojedinačne e^- sa NADPH iz citosola preko FAD, zatim prvog, pa drugog molekula hema do molekuskog kiseonika u ekstracelularnom prostoru ili unutrašnjosti membranske organele uz produkciju $O_2^{\cdot-}$. Enzim je visokospecifičan za redukovani koenzim NADPH u odnosu na NADH (Bedard i Krause, 2007).

Najbolje proučen član porodice NADPH oksidaza je NOX2. Aktivacija ovog enzima zahteva kompleksnu protein-protein interakciju između membranskih i citosolnih subjedini. Translokacija i fosforilacija p47^{phox} omogućava spajanje

aktivnišće subjedinice p67^{phox} sa membranskim subjedinicama što dovodi do nastanka aktivnog kompleksa NADPH oksidaze (Bedard i Krause, 2007).

Tabela 3. Karakteristike izoenzima familije NADPH oksidaze. Preuzeto i modifikovano iz Ma i sar., 2017, *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 7.

Izoenzim	Lokalizacija gena	Dužina polipeptidnog lanca	Udružene subjedinice	Distribucija van CNS-a	Distribucija u CNS-u
NOX1	Xq22	564 ak	p22 ^{phox} NOXO1 NOXA1	Kolon Krvni sudovi Srce Koštana srž Kohlea	Cerebralni korteks Hipokampus Cerebelum <i>Substantia nigra</i> Strijatum Hipotalamus Cerebralni krvni sudovi
NOX2	Xp21.1	570 ak	p22 ^{phox} p67 ^{phox} p47 ^{phox} p40 ^{phox}	Krvni sudovi Fagociti Srce Bubrezi GIT Jetra Pankreas Kohlea	Cerebralni korteks Hipokampus Cerebelum Strijatum <i>Substantia nigra</i> Hipotalamus Subfornikalni organ Lateralne komore Mezencefalom <i>Nc. tractus solitarius</i>
NOX3	6q25.1	568 ak	p22 ^{phox} NOXA1 NOXO1 p67 ^{phox}	Unutrašnje uvo/kohlea Pluća	Cerebralni korteks
NOX4	11q14.2	578 ak	p22 ^{phox}	Bubrezi Krvni sudovi Pluća Kosti Placenta	Cerebralni korteks Hipokampus Cerebelum Subfornikalni organ Glioblastom
NOX5	15q22.31	747 ak	/	Testisi/jajnici Slezina Bubrezi Krvni sudovi Uterus	Glioblastom
DUOX1	15q21	1551 ak	/	Tiroidna žlezda Pluća Koža	nije utvrđena
DUOX2	15q15.3	1548 ak	/	Tiroidna žlezda Pluća GIT Pljuvačne žlezde	nije utvrđena

Dominanti izoenzimi prisutni u CNS-u jesu NOX2 i NOX4, iako se oko tačne zastupljenosti i lokalizacije pojedinih izoenzima NOX i dalje vodi naučna debata (Sorice i sar., 2017). Osim pomenutih, u mozgu su prisutni NOX1 i NOX5 koji su vaskularnog porekla (Gray i Jandeleit-Dahm, 2015). U skladu sa njihovom funkcijom, mikroglije su ćelije CNS-a koje sadrže najveću količinu eksprimiranog NOX2 u mozgu. Produkcija ROS u ovim ćelijama povezana je prvenstveno sa njihovom ulogom u inflamatornom odgovoru (Bedard i Krause, 2007). Neuronu također eksprimiraju NOX2 u različitim strukturama mozga, uključujući hipokampus, posebno *gyrus dentatus*, korteks, talamus, *corpus callosum*, i dr, iako treba napomenuti da se ovi podaci uglavnom odnose na mozak glodara (Sorice i Krause, 2009). Pretpostavka je da u neuronima NOX ima ulogu u modulaciji neuronske aktivnosti. Pokazano je da NOX2 učestvuje u neurotransmisiji posredovanoj NMDA receptorima u hipokampusu i posledično u procesima učenja i pamćenja (Kishida i sar., 2005). Takođe, opisana je indukcija mehanizama ćelijske smrti neurona posredovana aktivacijom NOX2 (Kim i sar., 2002).

1.2.4. Redoks regulacija

Slobodni radikali imaju važnu ulogu u procesima intracelularne signalizacije, te je precizna kontrola njihove produkcije i eliminacije u ćeliji od suštinskog značaja za normalno odvijanje komunikacije među ćelijama, između različitih ćelijskih kompartmana, kao i za odgovor ćelije na brojne stimulse iz spoljašnje sredine. Proteini su direktno podložni redoks regulaciji, uključujući jonske kanale, receptore ili enzime, koja se ostvaruje na barem dva načina. Prvi način uključuje oksidaciju i redukciju tiolnih grupa cisteina, kao i njihovu modifikaciju glutationilacijom ili nitrozilacijom. Drugi vid redoks regulacije se ređe javlja u animalnim ćelijama i uključuje oksidaciju i redukciju jona gvožđa, prvenstveno u sklopu Fe-S centara (Halliwell i Gutteridge, 2015). Pored opisane direktne regulacije proteina redoks statusom u ćeliji, redoks regulacija ostvaruje se i na nivou promene genske ekspresije posredstvom redoks-senzitivnih transkripcionih faktora, poput NF- κ B, AP-1 i Nrf2 (Brigelius-Flohé i Flohé, 2011).

1.3. Oksidativni stres i shizofrenija

Povećana produkcija slobodnih radikala može dovesti do štetnih efekata po brojne ćelijske procese i učestvovati u patogenezi različitih oboljenja. Takođe, pojedini efekti ROS su korisni u fiziološkim uslovima, te je adekvatna redoks homeostaza neophodna za normalnu funkciju ćelija i organizma. U literaturi postoje brojni podaci o značaju oksidativnog stresa u nastanku nekih od najčešćih oboljenja današnjice, poput, ateroskleroze, dijabetesa, malignih oboljenja i dr. (Dröge, 2002).

Centralni nervni sistem je posebno osetljiv na oksidativna oštećenja (Halliwell, 2006). Najvažniji razlog ovome leži u činjenici da mozak koristi oko 20% kiseonika, a s obzirom na relativno malu ukupnu težinu mozga, to uzrokuje visok odnos potrošnje O₂ prema jedinici mase. Pored visoke metaboličke aktivnosti neurona i produkcije slobodnih radikala od strane mitohondrija, dodatni faktori koji čine CNS podložnim oksidativnom stresu jesu prisustvo velikih količina prelaznih metala poput gvožđa i bakra, neurotransmitera koji mogu biti autooksidovani (npr. dopamin i noradrenalin), kao i brojnih oksidaza i oksigenaza (Halliwell, 2006). Takođe, antioksidativni kapaciteti mozga su relativno skromni, odnosno aktivnost pojedinih antioksidativnih enzima, poput katalaze, niska je u poređenju sa drugim organima (Halliwell i Gutteridge, 2015). Membrane neurona čine lipidi sa visokim sadržajem višestruko nezasićenih masnih kiselina podložnih lipidnoj peroksidaciji koja dovodi do oštećenja samih membrana, ali i stvaranja toksičnih produkata lipidne peroksidacije koji dalje mogu delovati neurotoksično (Lin i sar., 2005).

Iako je uloga oksidativnog stresa najčešće ispitivana u neurodegenerativnim oboljenjima CNS-a, poput Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti, zatim u ekscitotoksičnosti i ishemijsko-reperfuzionom oštećenju mozga postoje različite studije koje govore u prilog učešću slobodnih radikala i narušenih antioksidativnih mehanizama u patogenezi psihijatrijskih bolesti, uključujući shizofreniju (Rao i Balachandran, 2002).

Prva pretpostavka da je shizofrenija posredovana redoks mehanizmima datira iz sredine 20. veka (Hoffer i sar., 1954). Usledile su godine istraživanja uloge slobodnih radikala u shizofreniji, prvenstveno indirektnim metodama, određivanjem parametara oksidativnog stresa, uključujući antioksidativne enzime i druge antioksidanse, u krvi obolelih (Wood i sar., 2009; Wu i sar., 2013). Najčešće određivani parametar enzimske antioksidativne zaštite je superoskid dizmutaza, a podaci iz literature nisu uvek jednosmerni. Meta-analiza sprovedena od strane Flatow i sar. (2013) ukazuje na snižene vrednosti aktivnosti periferne superoksid dizmutaze kod pacijenata nezavisno od faze bolesti. Pored toga, zapažene su promene u aktivnosti drugih antioksidativnih enzima (Flatow i sar., 2013; Wu i sar., 2013).

Kod obolelih je takođe uočeno smanjenje važnih antioksidanasa u plazmi, poput bilirubina i mokraćne kiseline, kako u prvoj epizodi bolesti (Reddy i sar., 2003), tako i kod hroničnih pacijenata (Yao i sar., 2000). Pokazano je da kod pacijenata u prvoj epizodi bolesti u plazmi postoje niži nivoi α -tokoferola (Dadheech i sar., 2008), askorbinske kiseline (Suboticanec i sar., 1990; Dadheech i sar., 2008) i viši nivoi tioredoksina (Owe-Larsson i sar., 2011). Ukupni antioksidativni status plazme je smanjen kod obolelih u aktunoj fazi bolesti (Li i sar., 2011), sa postojanjem negativne korelacije sa negativnim simptomima shizofrenije i pojedinim kognitivnim deficitima (Zhang i sar., 2012).

Istraživanja na *post mortem* uzocima takođe su dala neke važne rezultate. Uočeno je smanjenje količine ukupnog glutaciona u uzorcima prefrontalnog korteksa (Gawryluk i sar., 2011) i *nucleus caudatus*-a (Yao i sar., 2006). Takođe, zapažene su povećane količine oba intracelularna izoenzima SOD u frontalnom korteksu obolelih od shizofrenije (Michel i sar., 2004).

Uzevši u obzir navedene studije, uz dokaze koji potiču iz studija na animalnim modelima (Radonjić i sar., 2010), može se pretpostaviti da oksidativni stres igra određenu ulogu u patogenezi shizofrenije, makar u jednoj subpopilaciji obolelih. Nije međutim sasvim jasno da li je narušena redoks ravnoteža posledica primarnih

patogenetskih procesa koji dovode do povećanja produkcije slobodnih radikala ili smanjenja antioksidativnog kapaciteta ili oba pomenuta faktora, ili nastaje kao sekundarna promena, između ostalog i usled primene dugotrajne terapije koja neizostavno prati ovo oboljenje.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uzimajući u obzir dokaze o narušenom redoks statusu kod obolelih od shizofrenije i činjenicu da bolest prati hronična terapija antipsihoticima koji mogu uticati na redoks ravnotežu, svrha ovog istraživanja bila je da se ispitivanjem uticaja dugotrajne oralne primene haloperidola i risperidona na redoks regulaciju u fenciklidinskom animalnom modelu shizofrenije ustanovi da li su promene redoks statusa posledica samih patogenetskih procesa koji leže u osnovi ove bolesti ili nastaju kao posledica primene tipičnih ili atipičnih antipsihotika.

U skladu sa navedenim, postavljeni su sledeći pojedinačni ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati uticaj dugotrajne oralne primene haloperidola i risperidona na pokazatelje oksidativnog oštećenja lipida malondialdehida i aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dizmutaze i katalaze u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom.
2. Ispitati uticaj dugotrajne oralne primene haloperidola i risperidona na metabolizam glutationa određivanjem količine ukupnog glutationa, odnosa redukovane i oksidovane forme glutationa i aktivnosti enzima glutation reduktaze, glutation peroksidaze i γ -glutamilcistein ligaze u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom.
3. Ispitati uticaj dugotrajne oralne primene haloperidola i risperidona na metabolizam azot-monoksida određivanjem količine nitrita i nitrata i ekspresije izoenzima azot-monoksid sintaze (NOS1, NOS2 i NOS3) u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom.
4. Ispitati uticaj dugotrajne oralne primene haloperidola i risperidona na metabolizam mitohondrija određivanjem aktivnosti enzima respiratornog lanca

kompleksa I i citohrom c oksidaze u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom.

5. Ispitati uticaj dugotrajne oralne primene haloperidola i risperidona na enzim NADPH oksidazu određivanjem ekspresije membranskih (gp91^{phox} i p22^{phox}) i citosolnih (p67^{phox} i p47^{phox}) subjedinica enzima u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni pacovi (lat. *Rattus norvegicus*) Wistar soja iz uzgajališta Instituta za biomedicinska istraživanja Galenika u Beogradu. Pacovi su čuvani u standardnim, transparentnim kavezima od pleksiglasa, obloženim piljevinom, sa žičanom rešetkom na vrhu, pri kontrolisanim uslovima okruženja (temperatura $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost vazduha $55\pm 3\%$ i 12-časovni režim svetlo-tama). Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja) i voda su bili dostupni *ad libitum*. Tokom rada sa eksperimentalnim životinjama postupalo se u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja (Sl. glasnik RS, br. 41/09). Eksperiment je odobren od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije – Uprava za veterinu (rešenje br. 323-07-03370/2017-05/2).

3.2. Eksperimentalni protokol

3.2.1. Perinatalna primena fenciklidina

Skotne ženke pacova uzete su 14. dana graviditeta i čuvane pojedinačno u kavezima do okota. Dan okota mladunaca označen je kao nulti postnatalni dan (PN0). Mladunci iz jedne polovine legala su tokom PN3, PN6, PN9 i PN12 tretirani fenciklidinom. Fenciklidin-hidrochlorid (*Sigma*, SAD) je rastvoren u 0,9% NaCl u koncentraciji 1 mg/mL i aplikovan supkutano 10 mg/kg t.m./dan u jednoj dozi. Mladuncima iz druge polovine legala injektovan je fiziološki rastvor (0,9% NaCl) u istoj zapremini, na isti način i u isto vreme kao fenciklidin. Mladunci su čuvani u leglima sa majkom do PN30 kada su razvrstani po polu i odvojeni u posebne kaveze sa po 3–4 jedinke. U nastavku eksperimenta su korišćeni samo mužjaci.

3.2.2. Primena antipsihotika

U daljem toku eksperimenta životinje su podeljene u šest grupa i počevši od PN35 izložene su devetonedeljnom oralnom tretmanu antipsihoticima. Grupe su bile sledeće:

1. Kontrolna grupa (n=18) – pacovi koji su perinatalno tretirani fiziološkim rastvorom; od PN35 do PN100 životinje su dobijale vodu za piće kojoj je dodat rastvor sirćetne kiseline u istoj finalnoj koncentraciji korišćenoj za rastvaranje antipsihotika (1 mmol/L).
2. PCP grupa (n=18) – pacovi koji su perinatalno tretirani PCP-om; od PN35 do PN100 životinje su dobijale vodu za piće kojoj je dodat rastvor sirćetne kiseline u istoj finalnoj koncentraciji korišćenoj za rastvaranje antipsihotika (1 mmol/L).
3. Hal grupa (n=18) – pacovi koji su perinatalno tretirani fiziološkim rastvorom; od PN35 do PN100 životinje su podvrgnute oralnom tretmanu haloperidolom (*Krka*, Slovenija) (3 mg/kg t.m.) rastvorenom u rastvoru sirćetne kiseline finalne koncentracije 1 mmol/L. Lek je aplikovan putem vode za piće. Doziranje je vršeno u skladu sa podacima o prosečnoj dnevnoj potrošnji vode i prosečnoj telesnoj masi jedinki po kavezu.
4. PCP-Hal grupa (n=18) – pacovi koji su perinatalno tretirani PCP-om; od PN35 do PN100 životinje su podvrgnute oralnom tretmanu haloperidolom (3 mg/kg t.m.) na isti način kao Hal grupa.
5. Ris grupa (n=18) – pacovi koji su perinatalno tretirani fiziološkim rastvorom; od PN35 do PN100 životinje su podvrgnute oralnom tretmanu risperidonom (*Alkaloid*, Makedonija) (1 mg/kg t.m.) rastvorenom u rastvoru sirćetne kiseline finalne koncentracije 1 mmol/L. Lek je aplikovan putem vode za piće. Doziranje je vršeno u skladu sa podacima o prosečnoj dnevnoj potrošnji vode i prosečnoj telesnoj masi jedinki po kavezu.

6. PCP-Ris grupa (n=18) – pacovi koji su perinatalno tretirani PCP-om; od PN35 do PN100 životinje su podvrgnute oralnom tretmanu risperidonom (1 mg/kg t.m.) na isti način kao Ris grupa.

Po završetku tretmana antipsihoticima sve eksperimentalne životinje su žrtvovane PN100. Za spektrofotometrijske i *Western blot* analize pacovi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom i nakon odvajanja glave su trenutno zamrzavane u tečnom azotu, prethodno zaštićene aluminijumskom folijom, a zatim odlagane na -80°C do daljeg korišćenja. Žrtvovanje pacova i priprema uzoraka za imunohistohemijske analize opisani su kasnije.

3.3. Protokoli spektrofotometrijskih metoda

3.3.1. Priprema uzoraka

Spektrofotometrijske metode su korišćene za određivanje enzimske aktivosti i merenje količine malondialdehida, glutationa i nitrita i nitrata. Iz svake eksperimentalne grupe po šest eksperimentalnih životinja su iskorišćene za izolovanje dorzolateralnog prefrontalnog korteksa i hipokampusa koji su preparisani na hladno i homogenizovani u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25 mol/L saharoza, 10 mmol/L fosfatni pufer pH=7,0 i 1 mmol/L EDTA). Homogenizacijom usitnjeno tkivo je potom centrifugirano (1000G, 15 minuta). Supernatanti su zatim centrifugirani 30 minuta na 20000G. Ovako dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu sinaptosomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule nastale od glatkog i granulisanog endoplazmatičnog retikuluma, Goldžijevog aparata i plazma membrane kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen 60 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ uz povremeno mešanje, a zatim centrifugiran na 1700G 15 minuta. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome. U svim uzorcima određivana je koncentracija proteina

metodom po *Lowry*-ju, a kao standard je korišćen rastvor govedeg serumskog albumina (*Lowry i sar.*, 1951).

3.3.2. Određivanje količine malondialdehida

Malondialdehid (MDA) predstavlja jedan od najčešće određivanih markera lipidne peroksidacije. U toku oksidativnog oštećenja lipida nastaju lipidni peroksidi koji daljim raspadanjem (u prisustvu metalnih jona ili zagrevanjem) daju složenu mešavinu produkata, uključujući aldehide poput MDA i 4-hidroksi-2-*trans*-nonenala (HNE).

Količina MDA u homogenatima tkiva je merena opšteprihvaćenom metodom koja se zasniva na reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (*Esterbauer i Cheeseman*, 1990). U kiseloj sredini i na povišenoj temperaturi, jedan mol MDA reaguje sa dva mola TBA pri čemu nastaje ljubičasto obojeni $(TBA)_2$ -MDA konjugat sa maksimumom apsorpcije na 530–535 nm. Kako bi se sprečila naknadna lipidna peroksidacija tokom izvođenja reakcije, uzorcima se dodaje antioksidans butilovani hidroksitoluen (BHT).

U epruvetu se odmeri 100 μ L uzorka (10% tkivni homogenat) i doda 10 μ L alkoholnog rastvora BHT-a (20 mmol/L). Potom se doda 500 μ L *orto*-fosforne kiseline (0,2 mol/L) i 200 μ L vodenog rastvora TBA (50 mmol/L), zatim se smeša inkubira 45 minuta u vodenom kupatilu na 95°C. Nakon hlađenja na ledu, u reakcionu smešu se sipa 800 μ L *n*-butanola, energično promućka sadržaj epruvete i centrifugira 10 minuta na 3000 obrt/min. Iz gornjeg butanolskog sloja se prenese 200 μ L supernatanta u mikroploču sa 96 bunarića i apsorbanca se očitava na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na talasnoj dužini od 530 nm.

Za konstruisanje kalibracione krive priprema se standardni rastvor MDA koji se dobija kiselom hidrolizom 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP). Radni standardni rastvor MDA (4 mmol/L) se priprema hidrolizom 10 μ L TEP-a (97% v/v) u 10 mL hlorovodonične kiseline (0,01 mol/L) tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Od radnog standardnog rastvora MDA pravi se serija razblaženja mernih standardnih rastvora koncentracija u rasponu od 1 do 100 μ mol/L, koji se dodaju u istoj zapremini

umesto uzorka u reakcionu smešu. Koncentracija MDA se izračunava na osnovu regresione jednačine kalibracione krive, a dobijeni rezultati se izražavaju prema sadržaju proteina i vrednosti se prevode u nmol MDA/100 mg proteina.

3.3.3. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze

Aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) je merena u citosolnoj frakciji homogenata tkiva metodom koja se zasniva na određivanju procenta inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini po Sun i Zigman-u (1978).

Reakciona smeša za određivanje aktivnosti SOD sadržala je 1 mL bikarbonatnog pufera (50 mmol/L, pH=10,2) i 50 μ L uzorka. Reakcija otpočinje dodavanjem 100 μ L rastvora adrenalina. Promena apsorbance se prati u toku 4 minuta (linearnost je postizana posle 0,5–1 minuta nakon dodavanja adrenalina). Procenat inhibicije se računa u odnosu na promenu apsorbance iste reakcione smeše u kojoj je umesto uzorka dodato 50 μ L destilovane H₂O.

Aktivnost SOD se izražava u jedinicama (U) pri čemu 1 U odgovara aktivnosti enzima koja dovodi do 50% inhibicije spontane autooksidacije adrenalina. Izračunata aktivnost SOD se prevodi u U/mg proteina u uzorku.

3.3.4. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) je merena u citosolnoj frakciji homogenata tkiva UV-spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na merenju potrošnje vodonik-peroksida (H₂O₂), što je praćeno smanjenjem apsorbance na 240 nm (Beers i Sizer, 1952; Weydert i Cullen, 2010).

U epruvetu se odmeri 4 mL kalijum-fosfatnog pufera (50 mmol/L, pH=7,0) i od 20 do 50 μ L uzorka (tako da ukupna količina proteina iznosi oko 100 μ g). Sadržaj epruvete se promeša i podeli na dva dela od po 2 mL. U prvi deo se dodaje 1 mL kalijum-fosfatnog pufera (negativna kontrola), a u drugi 1 mL rastvora H₂O₂ (30 mmol/L u kalijum-fosfatnom puferu). Koncentracija rastvora H₂O₂ se proverava

neposredno pre upotrebe očitavanjem apsorbance i upotrebom molarnog apsorpcionog koeficijenta za H₂O₂ (ϵ na 240 nm iznosi 39,4 mol⁻¹ L cm⁻¹), tako da je:

$$[\text{H}_2\text{O}_2 \text{ mmol/L}] = (\text{Apsorbanc}_{240\text{nm}} \times 1.000) / 39,4$$

Neposredno nakon toga, u oba dela reakcione smeše prati se promena apsorbance na 240 nm tokom 2 minuta na svakih 30 s.

Kao pozitivna kontrola koristi se rastvor katalaze goveđe jetre (400 U/L) koji se dodaje u istoj zapremini kao uzorak. Aktivnost CAT se izražava u internacionalnim jedinicama (U) pri čemu 1 U odgovara količini enzima potrebnoj za razlaganje 1 μ mol H₂O₂ u minutu pri pH 7,0 i temperaturi 25°C. Izmerena aktivnost CAT se prevodi u U/mg proteina u uzorku.

3.3.5. Određivanje količine ukupnog, redukovano i oksidovanog glutaciona

Količina ukupnog, redukovano i oksidovanog glutaciona je merena u citosolnoj frakciji modifikovanom enzimskom metodom po Tietze-u (Tietze, 1969; Rahman i sar., 2006). Metoda se zasniva na reakciji redukovano glutaciona sa 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB, Elmanov reagens) pri čemu nastaje TNB (5-tio-2-nitrobenzoeva kiselina) sa maksimumom apsorpcije na 412 nm, i disulfidni adukt GS-TNB koji se u reakciji koju katališe glutation reduktaza uz učešće NADPH vraća u redukovani glutation.

Za određivanje ukupnog glutaciona u epruvetu se odmeri 700 μ L kalijum-fosfatnog pufera (0,1 mol/L, pH=7,5) i 100 μ L uzorka, a zatim se doda po 60 μ L rastvora DTNB (0,6 mmol/L), glutation reduktaze (1 U/mL) i NADPH (1,2 mmol/L). Neposredno nakon toga prati se promena apsorbance na 412 nm tokom 2 minuta. Na osnovu kalibracione krive koja se konstruiše upotrebom standradnih rastvora glutaciona dobija se vrednost ukupnog glutaciona.

Za određivanje oksidovanog glutaciona potrebno je uzrocima najpre dodati 2 μ L 2-vinilpiridina i inkubirati sat vremena na sobnoj temperaturi. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 6 μ L trietanolamina. Potom se ponavlja postupak kao za merenje ukupnog

glutaciona. Koncentracija redukovanog glutaciona se dobija oduzimanjem vrednosti oksidovanog glutaciona od vrednosti ukupnog glutaciona, a zatim se izračunava odnos oksidovane i redukovane forme. Sve koncentracije se izražavaju u nmol/mg proteina.

3.3.6. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost glutation reduktaze (GR) je merena u citosolnoj frakciji homogenata tkiva kinetičkom spektrofotometrijskom metodom (Carlberg i Mannervik, 1985). Metoda se zasniva na praćenju utroška NADPH u reakciji prevođenja glutation-disulfida (GSSG) u redukovani glutation (GSH) koju katališe GR.

U epruvetu se odmeri 850 µL fosfatnog pufera (0,1 mol/L kalijum-fosfatni pufer sa 2 mmol/L EDTA, pH=7,0), 50 µL rastvora NADPH (2 mmol/L) i 50 µL rastvora GSSG (20 mmol/L). Sadržaj epruvete se promeša i reakciona smeša se inkubira 5 minuta na 37°C. Zatim se dodaje 50 µL uzorka čime otpočinje reakcije. Neposredno po dodavanju uzorka prati se promena (smanjenje) apsorbance pri 340 nm tokom 3 minuta.

Kao pozitivna kontrola korišćen je radni rastvor glutation reduktaze (1 U/mL), od koga se pravi serija mernih rastvora aktivnosti u rasponu od 0,01 do 0,1 U/mL, koji se dodaju u istoj zapremini kao uzorak. Aktivnost GR se izražava u internacionalnim jedinicama (U) pri čemu enzimska aktivnost od 1 U odgovara oksidaciji 1 µmol NADPH minutu pri pH 7,0 i temperaturi 37°C, a izračunava se prema formuli:

$$\text{Aktivnost GR (U/mL)} = (A/6,22) * (1000/50)$$

Izmerena aktivnost GR se prevodi u mU/mg proteina u uzorku.

3.3.7. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) je merena u citosolnoj frakciji homogenata tkiva kinetičkom spektrofotometrijskom metodom (Flohé i Günzler, 1984; Weydert i Cullen, 2010). Metoda se zasniva na praćenju potrošnje NADPH u reakciji

koju katališe enzim glutation reduktaza, koja je spregnuta sa reakcijom oksidacije redukovano g glutationa u kojoj učestvuje glutation peroksidaza.

Kao supstrat za GPx koristi se H₂O₂ što je prednost u odnosu na korišćenje organskih peroksida, poput *terc*-butil-hidroperoksida ili kumen-hidroperoksida, s obzirom na to da su pomenuta jedinjenja supstrat i glutation-S-transferaze (Senezavisna peroksidazna aktivnost). Aktivnost katalaze se inhibira dodatkom natrijumazida.

U epruvetu se odmere sledeći rastvori: 550 µL fosfatnog pufera (0,1 mol/L kalijum-fosfatni pufer sa 2 mmol/L EDTA i 2 mmol/L NaN₃, pH=7,0), 100 µL rastvora GSH (10 mmol/L), 100 µL rastvora GR (5 U/mL), 100 µL rastvora NADPH (2 mmol/L) i 50 µL uzorka. Sadržaj epuvete se promeša i reakciona smeša se inkubira 5 minuta na 37°C. Reakcija započinje dodavanjem 100 µL rastvora H₂O₂ (2,5 mmol/L). Neposredno po započinjanju reakcije prati se promena (smanjenje) apsorbance pri 340 nm tokom 5 minuta. Za praćenje neenzimskog utroška NADPH koristi se slepa proba u koju se umesto uzorka dodaje fosfatni pufer u istoj zapremini.

Kao pozitivna kontrola korišćen je radni rastvor glutation peroksidaze (1 U/mL), od koga se pravi serija mernih rastvora aktivnosti u rasponu od 0,01 do 0,1 U/mL, koji se dodaju u istoj zapremini kao uzorak. Aktivnost GPx se izražava u internacionalnim jedinicama (U) pri čemu enzimaska aktivnost od 1 U odgovara 1 µmol NADPH oksidovanog u minutu (ili 1 µmol produkovanog GSH u minutu) pri pH 7,0 i temperaturi 37°C, a izračunava se prema formuli:

$$\text{Aktivnost GPx (U/mL)} = (A/6,22) * (1000/50) * 2$$

Izmerena aktivnost GPx se prevodi u mU/mg proteina u uzorku.

3.3.8. Određivanje aktivnosti γ -glutamilcistein ligaze

Aktivnost γ -glutamilcistein ligaze je određivana u citosolnoj frakciji homogenata tkiva kinetičkom spektrofotometrijskom metodom (Seeling i Meister, 1985). Enzimaska aktivnost se određuje u reakcionoj smeši koja sadrži L-glutamat, L- α -aminobutirat i

ATP, pomoću spregnute enzimske reakcije u kojoj se brzina formiranja ADP-a prati u prisustvu piruvat kinaze, laktat dehidrogenaza i fosfoenolpiruvata kao smanjenje apsorbance koja potiče od NADH na 340 nm. Aminobutirat se koristi kao supstrat umesto cisteina kako bi sprečile komplikacije koje nastaju usled oksidacije cisteina.

U epruvetu se odmeri 550 µL TRIS-HCl pufera (0,1 mol/L, pH=8,0), a zatim se doda po 50 µL rastvora kalijum-hlorida (150 mmol/L), magnezijum-hlorida (20 mmol/L), Na₂ATP (5 mmol/L), fosfoenolpiruvata (2 mmol/L), L-glutamata (10 mmol/L) i L-α-aminobutirata (10 mmol/L) i po 25 µL piruvat kinaze (10 U/mL) i laktat dehidrogenaze (10 U/mL). Reakciona smeša se preinkubira na 37°C, a zatim se dodaje 50 µL rastvora NADH (0,2 mmol/L) i 50 µL uzorka. Neposredno nakon toga prati se promena apsorbance na 340 nm tokom tri minuta u jednominutnim intervalima.

Aktivnost GCL se izražava u internacionalnim jedinicama (U) pri čemu enzimski aktivnost od 1 U odgovara 1 µmol NADH oksidovanog u minutu, a izmerena aktivnost se prevodi u U/mg proteina u uzorku.

3.3.9. Određivanje količine nitrita i nitrata

Nitrati i nitriti nastaju oksidacijom azot-monoksida, tako da se njihova koncentracija uzima kao indikator NO produkcije. Korišćena metoda za određivanje koncentracije nitrita i nitrata je modifikovana kadmijum-redukciona metoda (Sastry i sar., 2002). Ova metoda zasniva se na reakciji između sulfanilne kiseline (*Griess-ov I reagens*) i nitritnog jona u jako kiselj sredini pri čemu formirano diazonijum jedinjenje reaguje sa α-naftilaminom (*Greiss-ov II reagens*) stvarajući azo jedinjenje ljubičaste boje, a intezitet nastale boje meri se na 492 nm. Pošto *Griess-ov reagenss* ne reaguje sa nitratima, neophodno je neposredno pre kolorimetrijske reakcije nitrata redukovati elementarnim kadmijumom do nitrita.

U epruvetu se odmeri 200 µL prethodno deproteinisanog uzorka što se postiže modifikovanim *Somogyi-jev*im reagensom: na 120 µL homogenata tkiva dodati 480 µL 75 mmol/L rastvora cink-sulfata i 600 µL 100 mmol/L NaOH, a potom centrifugirati tokom

10 minuta na 8000 obraja u minuti. Uzorku se dodaje 1–1,5 g kadmijumskih granula sveže aktiviranih u rastvoru bakar-sulfata (5 mmol/L) i inkubira se 90 minuta na sobnoj temperaturi. Potom, iz svake epruvete se uzima po 100 μ L rastvora i prenosi u mikroploču sa 96 bunarića radi izvođenja bojene reakcije dodatkom po 100 μ L rastvora sulfanilne kiseline (34,6 mmol/L) i α -naftilaminom (2,1 mmol/L). Nakon 30 minuta apsorbance se očitava na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na talasnoj dužini od 492 nm.

Za konstruisanje kalibracione krive priprema se standardni rastvor nitrata. Od radnog standardnog rastvora nitrata (0,1 mol/L) pravi se serija razblaženja mernih standardnih rastvora koncentracija u rasponu od 0,1 do 10 μ mol/L, koji se dodaju u istoj zapremini umesto uzorka. Koncentracija nitrita i nitrata se izračunava na osnovu regresione jednačine kalibracione krive, a dobijeni rezultati se izražavaju prema sadržaju proteina i vrednosti se prevode u nmol nitrita i nitrata po mg proteina.

3.3.10. Određivanje aktivnosti kompleksa I

Aktivnost kompleksa I respiratornog lanca je merena u neprečišćenoj mitohondrijalnoj frakciji metodom koja se zasniva na praćenju reakcije u kojoj kompleks I redukuje sintetički analog ubihinona decilubihinon (decilCoQ), koji potom prenosi elektrone na plavo obojeno jedinjenje 2,6-dihidroindofenol (DCIP) koje se redukcijom obezbojava (Janssen i sar., 2007). Brzina redukcije DCIP-a se prati spektrofotometrijski na 600 nm. Reakcija se odvija u prisustvu antimicina A koji inhibira kompleks III elektron-transportnog lanca.

U epruvetu se odmeri 800 μ L kalijum fosfatnog pufera (30 mmol/L, pH=7,8), 50 μ L govedeg serumskog albumina, 20 μ L DCIP (3 mmol/L), 20 μ L decilCoQ (3,5 mmol/L) i 20 μ L antimicina A (50 mmol/L), potom se reakciona smeša preinkubira 3 minuta na 37°C. Nakon toga dodaje se 20 μ L uzorka i neposredno nakon dodatka 20 μ L NADPH prati se promena apsorbance na 600 nm tokom 5 minuta u jednodominutnim intervalima. Molarni apsorpcioni koeficijent DCIP-a iznosi 19,1 L*cm/mmol.

Aktivnost kompleksa I se izražava u internacionalnim jedinicama (U) pri čemu čemu enzimska aktivnost od 1 U odgovara 1 μ mol DCIP-a redukovano u minuti. Izmerena aktivnost kompleksa I se prevodi u U/mg proteina u uzorku.

3.3.11. Određivanje aktivnosti citohrom c oksidaze

Aktivnost citohrom c oksidaze (COX) je merena u neprečišćenoj mitohodrijalnoj frakciji spektrofotometrijskom metodom po Hess i Pope-u (1953). Metoda je zasnovana na oksidaciji ferocitohroma c do fericitohroma c pomoću citohrom c oksidaze, što je praćeno smanjenjem apsorbance na 350 nm.

Uzorcima se najpre dodaje deoksiholat u finalnoj koncentraciji 0,75%. U epruvetu se sipa 950 μ L rastvora redukovano citohroma c u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu, pH=7,1 ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L), a potom se dodaje uzorak u zapremini od 50 μ L, reakciona smeša se energično promućka i prati se promena aporbance tokom tri minuta.

Aktivnost citohrom c oksidaze se izražava u internacionalnim jedinicama (U) i izračunana se prema formuli:

$$\text{Aktivnost citohrom c oksidaze (U/mL)} = (\Delta A_{\text{min}}/23,9) * (1000/50)$$

Izmerena aktivnost citohrom c oksidaze se prevodi u mU/mg proteina u uzorku.

3.4. Protokol *Western blot* metode

Ekspresija ispitivanih proteina praćena je tehnikom *Western blot*-a. Za ove analize korišćeno je po šest životinja iz svake eksperimentalne grupe. Strukture dorzolateralnog prefrontalnog korteksa i hipokampusu su preparisane na hladno i tkivo je potom homogenizovano u RIPA puferu (50 mmol/L TRIS pH=8,0, 150 mmol/L NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Na-deoksiholat, 1,0% NP-40) sa dodatkom smeše inhibitora fosfataza i proteaza (koktel inhibitora proteaza – PIC, 1 mmol/L fenilmetilsulfonil-fluorid, 10 mmol/L NaF, 0,1 mmol/L Na-ortovanadat). Nakon inkubacije od 30 minuta na ledu, uzorci su

centrifugirani 15 min na 14000 g na +4°C, a dobijeni supernatant je korišćen za analizu. Koncentracija proteina u uzorcima određena je metodom po Bradford-u (1976).

Razdvajanje proteina iz uzoraka vrši se vertikalnom elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Pre nalivanja na gel, uzorci se pripremaju u 2X *Laemmli* puferu (125 mmol/L TRIS pH=6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,004% bromofenol-plavo, 10% 2-merkaptoetanol) kako bi se izvršila denaturacija i omogućila uniformna negativna naelektrisanost proteina. Jednake zapremine uzorka sa istom količinom proteina (20 µg) se nanose na gelove različite gustine (8, 12 ili 15%) u odnosu na veličinu proteina od interesa. Nakon elektroforeze izvršen je transfer proteina sa gela na nitroceluloznu membranu (*Bio-Rad*, SAD). Membrane su potom inkubirane u 5% rastvoru nemasnog mleka u TBS-T-u (100 mmol/L TRIS, pH=7,6, 150 mmol/L NaCl, 0,05% Tween-20) radi blokiranja nespecifičnih mesta vezivanja. Po blokiranju, membrane se inkubiraju preko noći na +4°C sa sledećim primarnim antitelima: anti-SOD1 (1:500, kozje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), anti-SOD2 (1:500, kozje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), anti-NOS1 (1:500, mišje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), anti-NOS2 (1:500, zečje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), anti-NOS3 (1:500, zečje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), anti-p22^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), anti-gp91^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), anti-p67^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD) i anti-p47^{phox} (1:500, zečje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD). Nakon inkubacije višak primarnog antitela je uklonjen ispiranjem u TBS-T-u, a zatim su membrane inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (1:2000, anti-zečje, anti-mišje ili anti-kozje, *Southern Biotech*, SAD) sa vezanom peroskidazom rena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) tokom 60 minuta. Višak sekundarnog antitela se uklanja na isti način kao višak primarnog antitela. Membrane su zatim izložene radnom rastvoru luminola koji je aktiviran 30% rastvorom H₂O₂. U reakciji koju katališe HRP dolazi do produkcije fotona svetlosti, a intenzitet hemiluminiscence je direktno proporcionalan količini proteina od interesa koji je vezan za membranu. Vizuelizacija specifičnih proteinskih traka se vrši na *ChemiDoc* aparatu (*Bio-Rad*, SAD). Sa svih membrana su potom uklonjena vezana antitela pomoću *stripping* pufera koji sadrži

TRIS, glicin i Tween-20 (pH=2,2), a zatim se membrane ponovo inkubiraju sa anti- β -aktin antitelom (1:10000, mišje monoklonsko, *Sigma-Aldrich*, Nemačka). Ekspresija proteina je kvantifikovana denzitometrijski upotrebom softvera *ImageLab* i izražena je kao relativan broj u odnosu na intenzitet ekspresije β -aktina u istom uzorku.

3.5. Protokol imunohistohemijske metode

Za imunohistohemijska ispitivanja korišćeno je šest životinja iz svake eksperimentalne grupe. Pacovi su najpre anestetizirani 3,6% hloral-hidratom (10 mL/kg t.m, i.p.) i zatim perfundovani 4% paraformaldehidom. Nakon perfuzije, odvojene su glave i izolovani mozgovi su prebaćeni u rastvore saharoze rastućeg gradijenta koncentracije (10%, 20%, 30%), a potom trenutno zamrzavani uranjanjem u rashlađeni 2-metilbutan. Zamrznuti mozgovi su sećeni na kriokatu (*Leica Instruments*, Nemačka), a debljina isečaka je iznosila 25 μ m. Odabrani su preseci prefrontalnog korteksa i hipokampusa za dalju analizu. Po protokolu imunohistohemijske metode, najpre je izvršeno demaskiranje antigena u mikrotalasnoj peći u citratnom puferu (pH=6) tokom 21 min na 800W. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je 3% rastvorom vodonik-peroksida (H_2O_2), nakon čega su uzorci inkubirani tokom jednog sata u normalnom kozjem serumu na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, preseci su inkubirani 24 h na +4°C sa primarnim anti-p22^{phox} antitelom (1:500, zečje poliklonsko, *Santa Cruz*, SAD), a zatim sa odgovarajućim sekundarnim antitelom tokom 1 sata, potom i ABC kompleksom tokom 1 sata na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju je korišćen *Vectastain ABC Kit (HRP)* (*Vector Laboratories*, UK), koji sadrži sekundarno antitelo konjugovano sa biotinom i ABC kompleks za koji je vezan enzim peroksidaza rena (HRP). Preseci se inkubiraju sa 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) koji je hromogeni supstrat za HRP i u reakciji dolazi do formiranja braon reakcionog proizvoda na mestu prisustva antigena. Preseci su kontrastirani Majerovim hematoksilinom, dehidrirani u seriji alkohola rastuće koncentracije, prosvetljeni u ksilolu i pokriveni pokrovnim stakalcima. Obojeni isecci su analizirani svetlosnim mikroskopom *Olympus BX41* sa *Olympus C5060-ADU*

digitalnom kamerom. Kvantifikacija imunohistohemijskog bojenja je rađena pomoću softvera *ImageJ*, tako što je izračunavan procenat površine preseka na uveličanju 1:100 za prefrontalni korteks, odnosno 1:40 za hipokampus, pokriven signalom poreklom od DAB-a vezanog za protein od interesa.

3.6. Statistička analiza

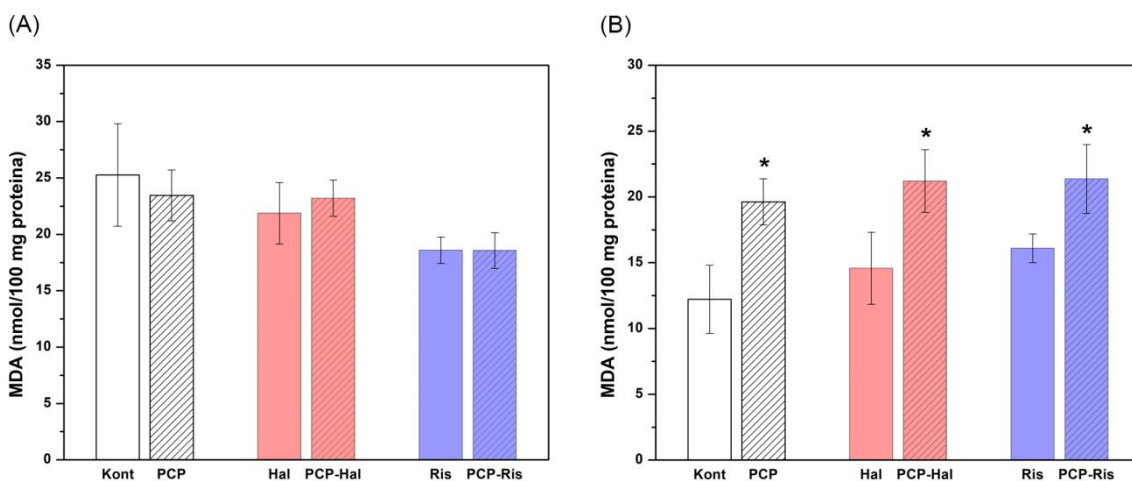
Svi podaci su obrađeni metodama deskriptivne i analitičke statistike. Rezultati su prikazani tabelarno ili grafički stubičastim dijagramima. Kao mera centralne tendencije rezultata korišćena je aritmetička sredina, a kao mera varijabiliteta standardna greška aritmetičke sredine (SE). Normalnost raspodele podataka je testirana pomoću *Shapiro-Wilk*-ovog testa. U zavisnosti od raspodele podataka za poređenje razlike u aritmetičkim sredinama među grupama korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) ili *Kruskal-Wallis*-ov test praćeni *post hoc Fisher*-ovim testom. Razlike su smatrane statistički značajnim za vrednost $p < 0,05$. Sve statističke analize i grafičko prikazivanje rezultata su urađeni korišćenjem softvera *OriginLab 8.5*.

4. REZULTATI

4.1. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na parametre oksidativnog stresa u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom

4.1.1. Uticaj haloperidola i risperidona na količinu malondialdehida

Rezultati određivanja stepena lipidne peroksidacije u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja prikazani su na slici 2. Statistička analiza rezultata nije pokazala statistički značajnu razliku u srednjim vrednostima MDA među eksperimentalnim grupama u prefrontalnom korteksu [$F(5,35)=1,136$; $p=0,363$], dok je u hipokampusu uočena značajna razlika [$F(5,35)=2,780$; $p=0,035$]. U hipokampusu, perinatalna primena fenciklidina dovela je do statistički značajnog povećanja količine MDA u odnosu na kontrolu ($p<0,05$), koje je pokazano i u grupama u kojima je nakon tretmana PCP-om usledila primena haloperidola ($p<0,05$) ili risperidona ($p<0,05$).

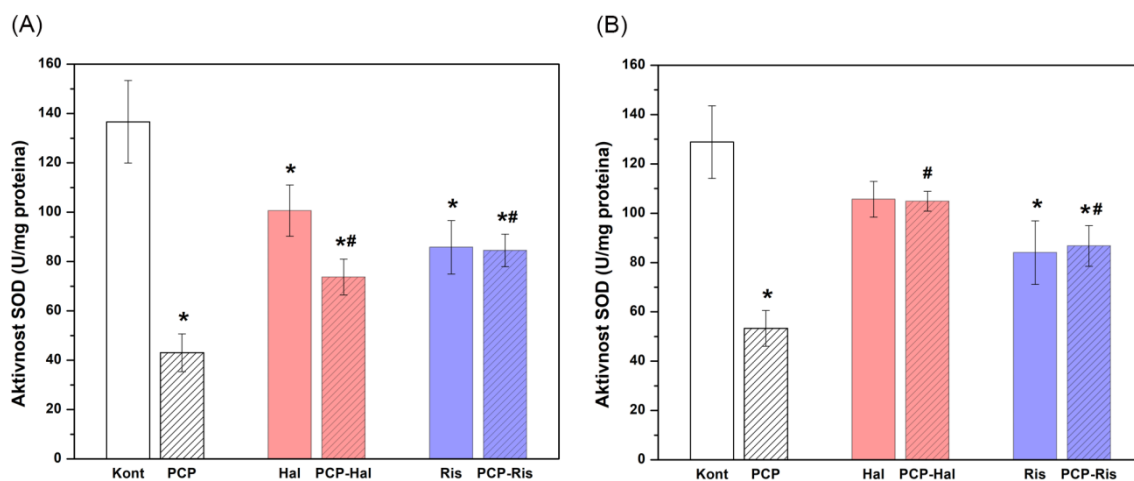


Slika 2. Količina malondialdehida (MDA) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p<0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.1.2. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost superoksid dizmutaze

Aktivnost superoksid dizmutaze u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja prikazana je na slici 3. Statističkom analizom rezultata pokazana je statistički značajna razlika u srednjim vrednostima enzimske aktivnosti među ispitivanim grupama u prefrontalnom korteksu [$F(5,35)=8,653$; $p<0,001$], kao i u hipokampusu [$F(5,35)=6,861$ $p<0,001$]. Daljom *post hoc* analizom pokazano je da u korteksu postoji smanjenje aktivnosti SOD u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Međutim, u grupama PCP-Hal i PCP-Ris zapažene su veće prosečne vrednosti aktivnosti SOD u odnosu na PCP grupu ($p<0,05$). U hipokampusu, snižena aktivnost SOD u odnosu na kontrolu zapažena je u PCP grupi i obe eksperimentalne grupe tretirane risperidonom, odnosno Ris i PCP-Ris grupi ($p<0,05$), dok kod eksperimentalnih životinja koje su tretirane haloperidolom razlika nije zapažena. U obe eksperimentalne grupe koje su nakon perinatalnog PCP tretmana dobijale antipsihotike, odnosno PCP-Hal i PCP-Ris grupi, postojali su statistički značajno viši nivoi aktivnosti SOD u odnosu na PCP grupu ($p<0,05$).



Slika 3. Aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

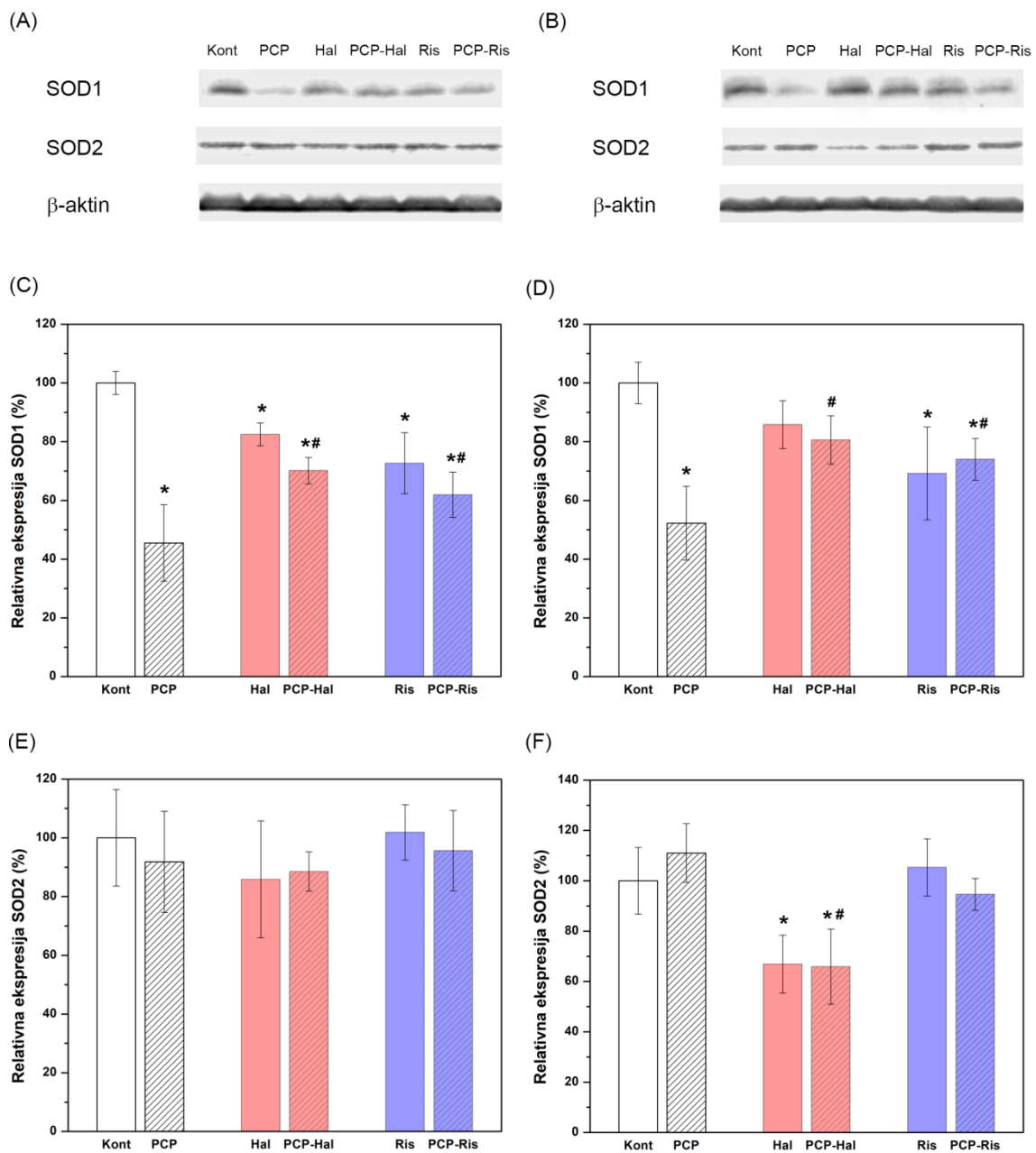
* – $p<0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

– $p<0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.1.3. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju izoenzima superoksid dizmutaze

Ekspresija izoenzima superoksid dizmutaze u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja praćena tehnikom *Western blot*-a prikazana je na slici 4. Statistička obrada rezultata dobijenih denzitometrijskom analizom ekspresije SOD1 ukazala je na prisustvo značajne razlike među eksperimentalnim grupama u korteksu [$F(5,35)=13,527$; $p<0,001$] i hipokampusu [$F(5,35)=4,704$; $p=0,003$]. U korteksu postoji značajno smanjenje ekspresije SOD1 u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu ($p<0,05$). Međutim, nivoi SOD1 su statistički značajno viši u obe grupe tretirane antipsihoticima nakon perinatalnog PCP tretmana, odnosno PCP-Hal i PCP-Ris grupi u odnosu na PCP grupu ($p<0,05$). U hipokampusu, statistički značajno niže vrednosti ekspresije SOD1 postoje u PCP grupi i grupama na tretmanu risperidonom, odnosno Ris i PCP-Ris grupi u odnosu na kontrolu ($p<0,05$), dok ta razlika nije primećena nakon terapije haloperidolom. Pored toga, slično kao u korteksu, u obe grupe koje su nakon tretmana PCP-om bile izložene terapiji antipsihoticima postoje značajno viši nivoi SOD1 u odnosu na PCP grupu ($p<0,05$).

Statističkom analizom ekspresije SOD2 pokazana je razlika u eksperimentalnim grupama u hipokampusu [$F(5,35)=3,389$; $p=0,015$], dok je u korteksu ekspresija SOD2 bila ujednačena među grupama [$F(5,35)=0,218$; $p=0,952$]. *Post hoc* analizom ekspresije ovog proteina u hipokampusu pokazano je značajno smanjenje SOD2 u grupama Hal i PCP-Hal u odnosu na kontrolnu, kao i PCP grupu ($p<0,05$). U grupama Ris i PCP-Ris ta razlika nije primećena ($p>0,05$).



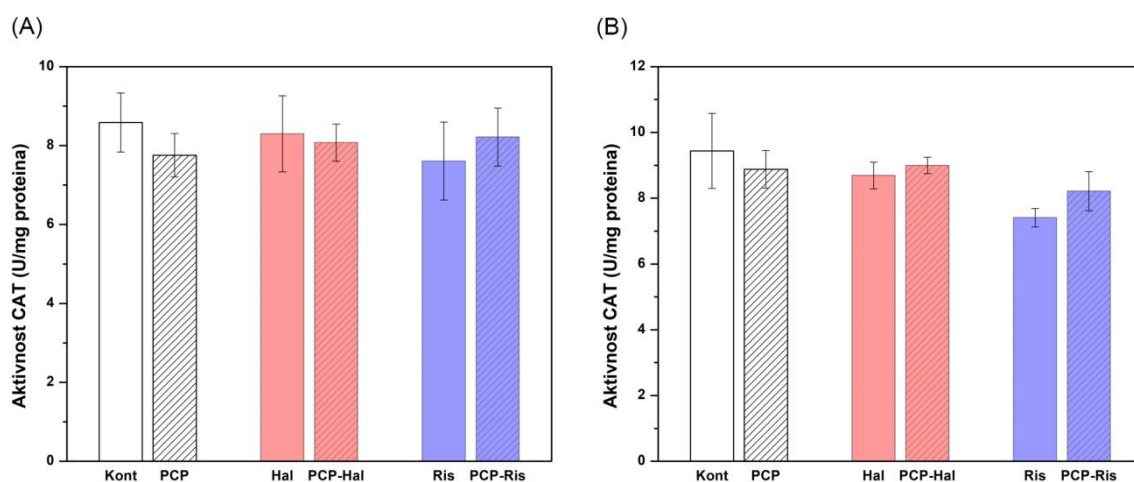
Slika 4. Ekspresija superoksid dizmutaze 1 (SOD1) i superoksid dizmutaze 2 (SOD2) u mozgu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije proteina u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) i denzitometrijska analiza nivoa proteina u odnosu na količinu aktina u prefrontalnom korteksu (C, E) i hipokampusu (D, F) Rezultati su prikazani u odnosu na ekspresiju proteina u kontrolnoj grupi koja je svedena na 100% i kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.1.4. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja prikazana je na slici 5. Statističkom analizom rezultata nije pokazana razlika u srednjim vrednostima enzimske aktivnosti među ispitivanim grupama u prefrontalnom korteksu [$F(5,35)=0,220$; $p=0,951$] ni hipokampusu [$F(5,35)=1,319$; $p=0,282$].



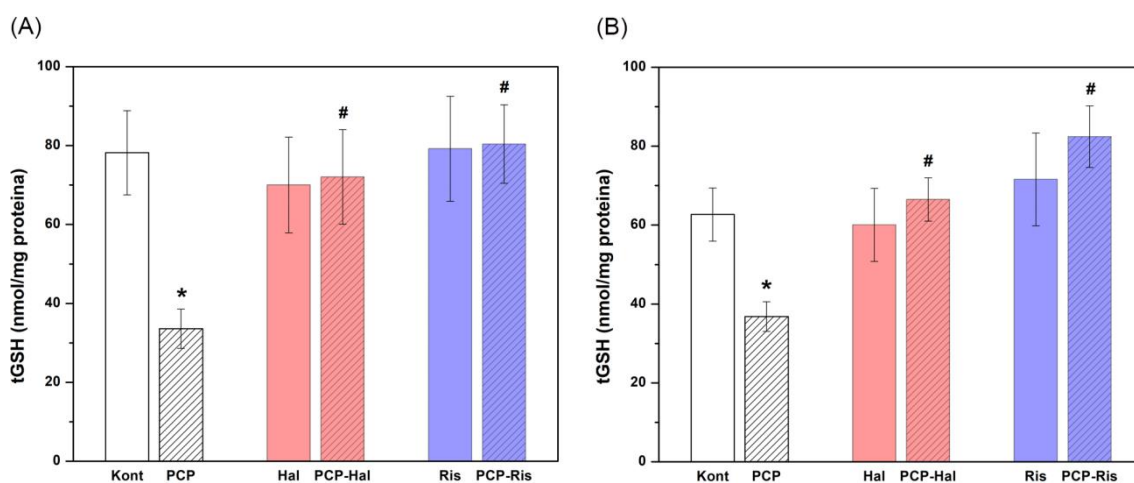
Slika 5. Aktivnost katalaze (CAT) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

4.2. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na količinu i metabolizam glutaciona u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom

4.2.1. Uticaj haloperidola i risperidona na količinu i odnos redukovano i oksidovanog glutaciona

U prefrontalnom korteksu i hipokampusu eksperimentalnih životinja određivana je količina ukupnog, redukovano i oksidovanog glutaciona i odnos redukovane i oksidovane forme. Rezultati dobijeni merenjem ukupnog glutaciona (tGSH) u ispitivanim moždanim regijama prikazani su na slici 6. Statističkom analizom

zapaženo je da se srednje vrednosti količine tGSH značajno razlikuju među eksperimentalnim grupama kako u korteksu [$F(5,35)=2,690$; $p=0,040$], tako i u hipokampusu [$F(5,35)=3,703$; $p=0,010$]. *Post hoc* analiza ukazala je na identične promene u obe ispitivane strukture. Naime, nakon perinatalne primene PCP-a dolazi do značajnog smanjenja količine tGSH u PCP grupi u odnosu na kontrolu ($p<0,05$), dok se u grupama koje su bile tretirane haloperidolom i risperidonom to smanjenje ne uočava. Takođe, u PCP-Hal i PCP-Ris grupi nivoi tGSH su statistički značajno viši u odnosu na PCP grupu ($p<0,05$).



Slika 6. Količina ukupnog glutationa (tGSH) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p<0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

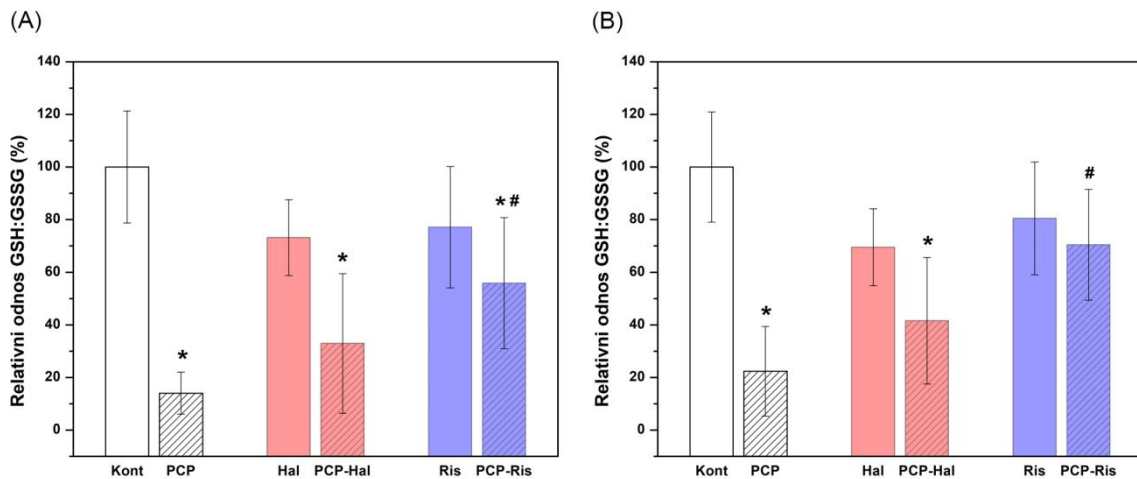
– $p<0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

Količine ukupnog, redukovanog i oksidovanog glutationa i odnos redukovane i oksidovane forme su prikazani u tabeli 4. Odnos redukovane i oksidovane forme glutationa (GSH:GSSG) u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja prikazana je na slici 7. Statistička analiza rezultata pokazala je prisustvo značajne razlike u odnosu GSH i GSSG među eksperimentalnim grupama u obe ispitivane strukture, pri čemu je vrednost ANOVA testa za korteks iznosila $F(5,35)=5,125$ ($p=0,002$), a za hipokampus $F(5,35)=3,963$ ($p=0,007$). *Post hoc* analiza je

ukazala na sledeće promene. U korteksu, postoji značajno smanjenje odnosa GSH:GSSG u grupama sa perinatalnim tretmanom PCP-om, odnosno PCP, PCP-Hal i PCP-Ris grupi u odnosu kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Međutim, u PCP-Ris grupi pokazan je porast odnosa GSH:GSSG u odnosu na PCP grupu ($p < 0,05$). U hipokampusu je zapažen sličan trend promena. Ipak, odnos GSH:GSSG je smanjen jedino u PCP i PCP-Hal grupi u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), dok u PCP-Ris grupi ne postoji razlika u odnosu na kontrolne vrednosti ($p > 0,05$). Kao i u korteksu, u PCP-Ris grupi postoji viši odnos GSH:GSSG u odnosu na PCP grupu ($p < 0,05$).

Tabela 4. Količina ukupnog (tGSH), redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) i odnos redukovane i oksidovane forme (GSH:GSSG) u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

	Prefrontalni korteks				Hipokampus			
	tGSH (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)	GSSG (nmol/mg)	GSH/GSSG	tGSH (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)	GSSG (nmol/mg)	GSH/GSSG
Kontrola	78,2 \pm 10,7	76,2 \pm 10,3	2,01 \pm 0,6	52,2 \pm 11,1	62,7 \pm 6,7	61,1 \pm 6,7	1,5 \pm 0,2	44,7 \pm 9,4
PCP	33,6 \pm 5,0	29,4 \pm 4,3	4,2 \pm 0,7	7,3 \pm 0,6	36,8 \pm 3,8	33,0 \pm 3,6	3,8 \pm 0,7	10,0 \pm 1,7
Hal	70,0 \pm 12,1	67,9 \pm 11,7	2,1 \pm 0,5	38,2 \pm 5,5	60,1 \pm 9,2	57,9 \pm 8,7	2,2 \pm 0,6	31,1 \pm 4,5
PCP-Hal	72,0 \pm 12,0	66,3 \pm 10,5	5,7 \pm 1,6	17,2 \pm 4,6	66,5 \pm 5,5	62,3 \pm 5,0	4,1 \pm 0,8	18,6 \pm 4,5
Ris	79,2 \pm 13,3	76,9 \pm 13,1	2,2 \pm 0,4	40,3 \pm 9,3	71,6 \pm 11,7	69,3 \pm 11,4	2,3 \pm 0,6	36,0 \pm 7,7
PCP-Ris	80,4 \pm 9,9	76,7 \pm 9,7	3,6 \pm 0,9	29,2 \pm 7,3	82,4 \pm 7,8	79,4 \pm 7,5	2,9 \pm 0,5	31,5 \pm 6,6



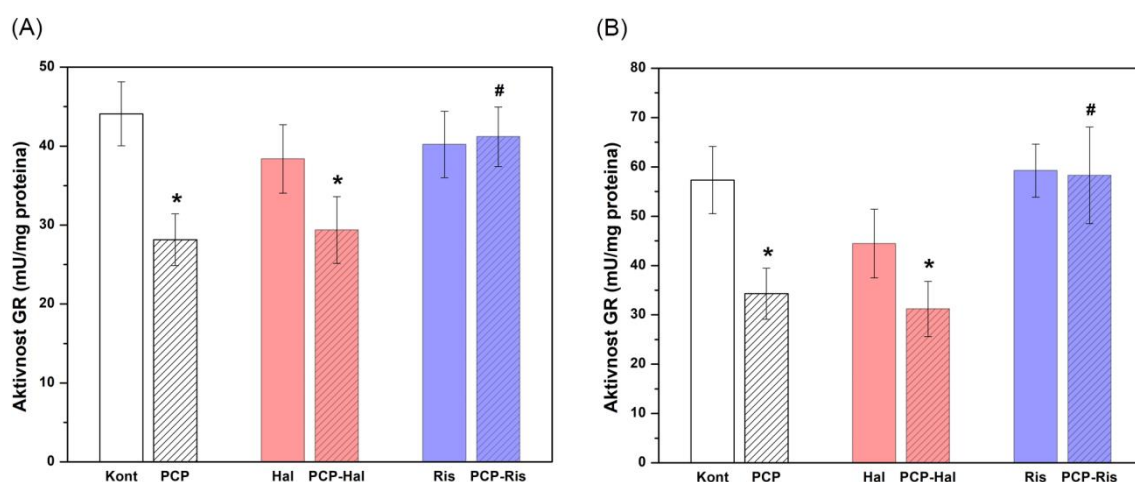
Slika 7. Odnos redukovanе i oksidovanе forme glutationa (GSH:GSSG) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Prikazan je relativni odnos GSH:GSSG u odnosu na kontrolnu grupu koja je arbitrarno svedena na 100%. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.2.2. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost glutathion reduktaze

Rezultati ispitivanja aktivnosti glutathion reduktaze u moždanim strukturama od interesa prikazani su slici 8.. Statistička analiza je pokazala značajnu razliku u prosečnim nivoima aktivnosti GR među grupama u korteksu [$F(5,35)=2,715$; $p=0,039$] i u hipokampusu [$F(5,35)=3,456$; $p=0,014$]. *Post hoc* analizom uočen je isti trend promena aktivnosti enzima nakon tretmana PCP-om i primene antipsihotika u obe ispitivane moždane regije. U PCP-grupi i PCP-Hal grupi aktivnost enzima bila je značajano smanjena u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), dok su u PCP-Ris grupi nivoi enzimske aktivnosti bili na nivoima aktivnosti GR u kontrolnoj grupi i statistički značajno viši u odnosu na PCP grupu ($p < 0,05$).



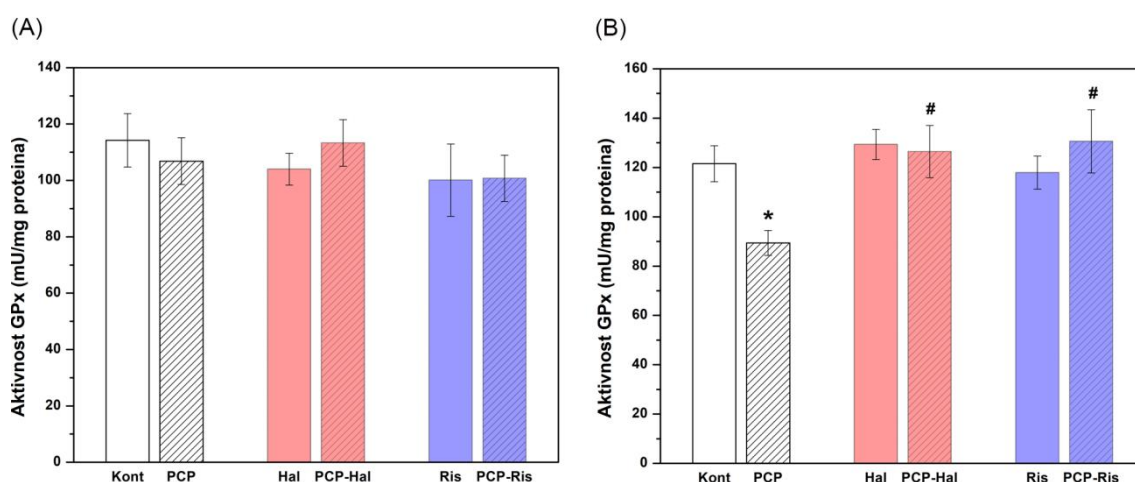
Slika 8. Aktivnost glutation reduktaze (GR) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.2.3. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost glutation peroksidaze

Aktivnost glutation peroksidaze u prefrontalnom korteksu i hipokampusu eksperimentalnih životinja prikazana je na slici 9. Statističkom analizom dobijenih rezultata nije pokazana značajna razlika u prosečnim nivoima aktivnosti enzima u korteksu među eksperimentalnim grupama [$F(5,35)=0,455$; $p=0,806$]. Sa druge strane, u hipokampusu je postojala statistički značajna razlika u aktivnosti enzima između grupa [$F(5,35)=3,245$; $p=0,018$]. *Post hoc* analizom pokazano je da je perinatalna primena PCP-a dovela do smanjenja aktivnosti GPx u PCP grupi u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), dok je hronična terapija antipsihoticima bila praćena vrednostima aktivnosti GPx koje su bile na nivou kontrolnih vrednosti i ujedno značajno veće od onih u PCP grupi ($p < 0,05$).



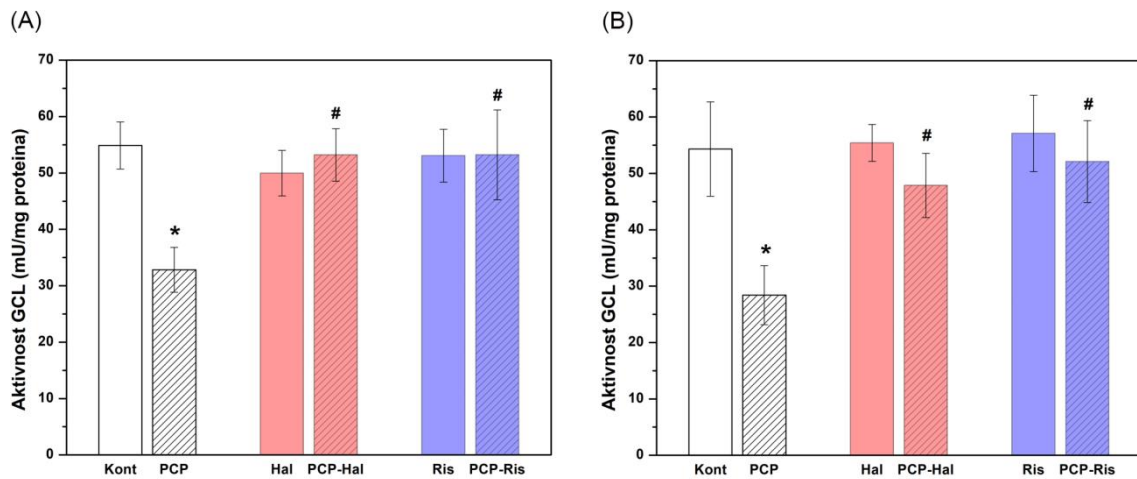
Slika 9. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.2.4. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost γ -glutamilstein ligaze

Rezultati merenja aktivnosti regulatornog enzima sinteze glutaciona γ -glutamilstein ligaze u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova nakon perinatalne primene PCP-a i hronične terapije ispitivanim antipsihoticima prikazani su na slici 10. U obe ispitivane moždane strukture statističkom analizom je pokazana značajna razlika u nivoima enzimske aktivnosti među grupama. Vrednost ANOVA testa za aktivnosti u korteksu iznosila je $F(5,35)=2,662$ ($p=0,042$), a u hipokampusu $F(5,35)=2,860$ ($p=0,031$). *Post hoc* analiza je pokazala prisutvo razlike u aktivnost GCL u istim grupama u obe strukture. Naime, u PCP grupi postoji značajno smanjenje aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), dok u ostalim grupama aktivnost enzima nije statistički značajno različita u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Pti tome grupe PCP-Hal i PCP-Ris imaju značajno više nivoe enzimske aktivnosti u odnosu na PCP grupu ($p < 0,05$).



Slika 10. Aktivnost γ -glutamilcistein ligaze (GCL) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

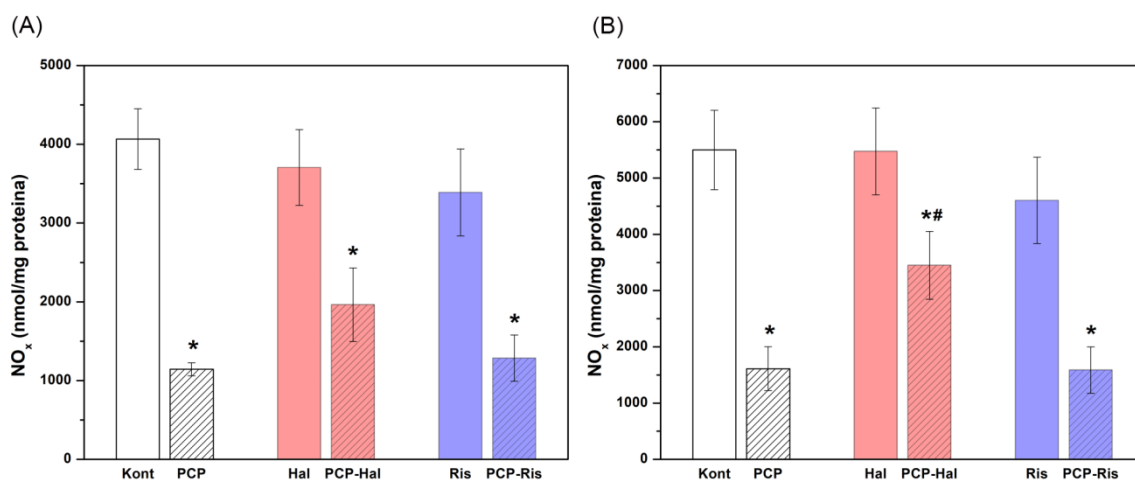
– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.3. Efekte dugotrajne primene antipsihotika na sintezu i metabolizam azot-monoksida u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom

4.3.1. Uticaj haloperidola i risperidona na količinu nitrata i nitrita

Količina azot-monoksida određivana je posredno merenjem količine degradacionih produkata NO metabolizma, nitrita i nitrata (slika 11). Statistička analiza rezultata je pokazala statistički značajnu razliku u srednjim vrednostima količine NO_x među eksperimentalnim grupama u prefrontalnom korteksu [$F(5,35)=9,952$; $p < 0,001$] i u hipokampusu [$F(5,35)=8,139$; $p < 0,001$]. *Post hoc* analizom pokazano je da u korteksu postoji statistički značajno manja prosečna količina NO_x kod eksperimentalnih životinja perinatalno tretiranih PCP-om nezavisno od primene antipsihotika ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne životinje. U hipokampusu je zapaženo identično smanjenje NO_x nakon PCP tretmana u svim eksperimentalnim grupama, odnosno PCP, PCP-Hal i PCP-Ris

grupi ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Međutim, u grupi PCP-Hal vrednosti NO_x su bile statistički značajno više u poređenju sa PCP i PCP-Ris grupom ($p < 0,05$).



Slika 11. Količina nitrita i nitrata (NO_x) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

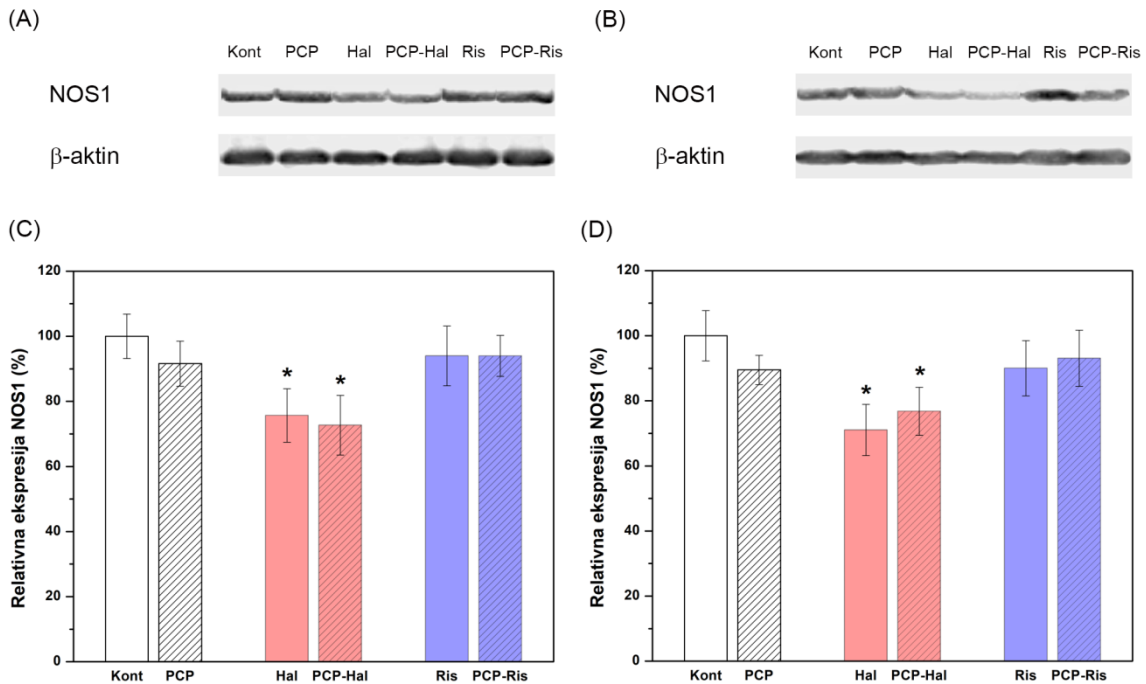
– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.3.2. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju izoenzima azot-monoksid sintaze

Ekspresija izoenzima azot-monoksid sintaze u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja prikazana je na slici 12 i 13. Statističkom analizom rezultata pokazana je statistički značajna razlika u nivoima ekspresije neuronalnog (NOS1) izoenzima među eksperimentalnim grupama u korteksu [$F(5,35)=2,680$; $p=0,041$], kao i u hipokampusu [$F(5,35)=2,658$; $p=0,042$]. *Post hoc* analiza je pokazala da u obe ispitivane strukture postoji snižena ekspresija NOS1 u grupama na tretmanu haloperidolom nezavisno od perinatalne primene PCP-a, odnosno u Hal i PCP-Hal grupi ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu.

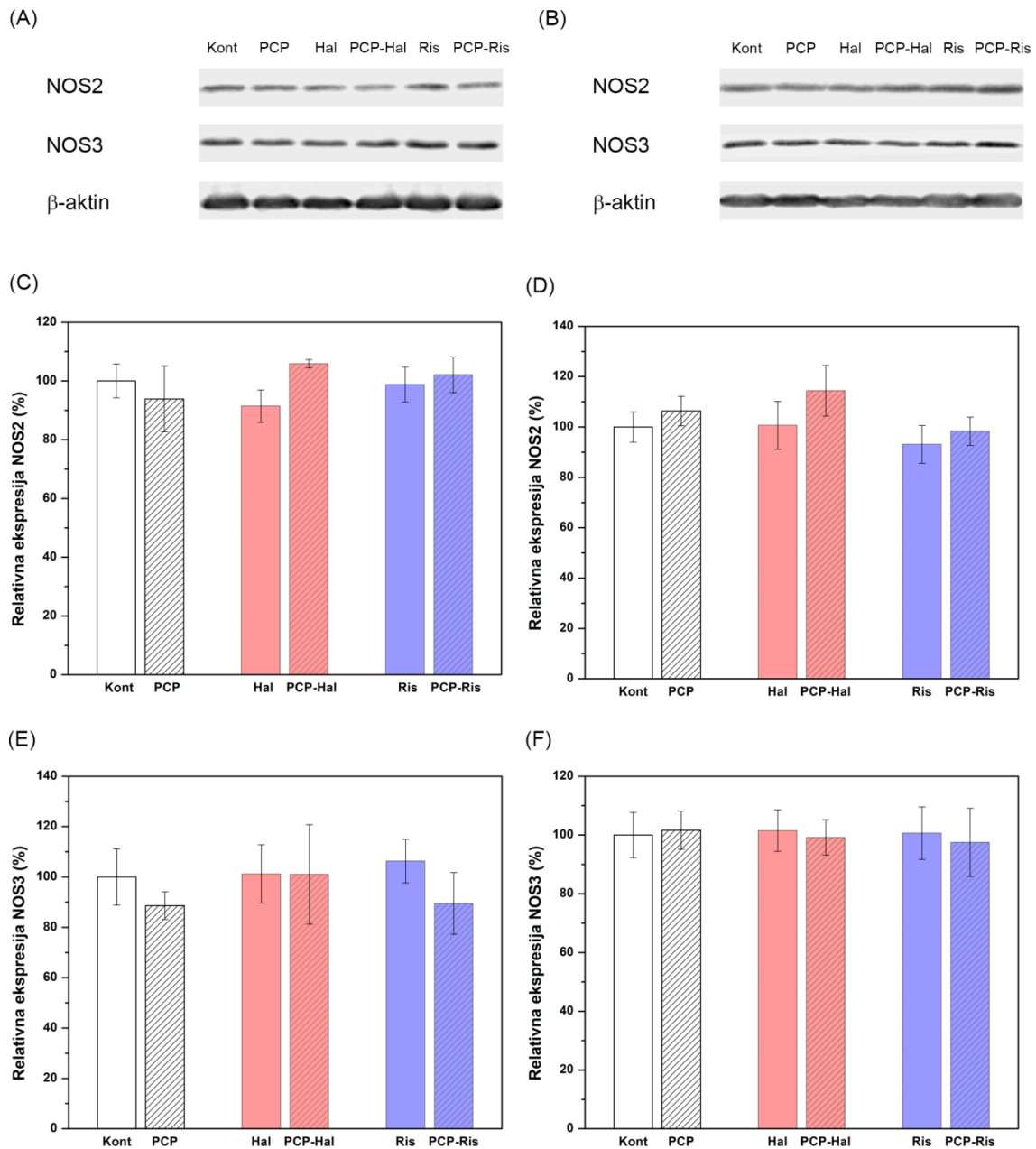
Statistička analiza ekspresije druga dva izoenzima NOS pokazala je sledeće rezultate. U korteksu, ekspresija inducibilnog (NOS2) izoenzima bila je na istom nivou

u svim eksperimentalnim grupama [F(5,35)=0,691; p=0,634], kao i ekspresija endotelnog (NOS3) izoenzima [F(5,35)=0,340; p=0,885]. Slično, u hipokampusu, nije zapažena razlika u ekspresiji ni NOS2 [F(5,35)=0,862; p=0,517], niti NOS3 izoenzima [F(5,35)=0,037; p=0,999] među eksperimentalnim grupama.



Slika 12. Ekspresija azot-monoksid sintaze 1 (NOS1) u mozgu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije proteina u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) i denzitometrijska analiza nivoa proteina u odnosu na količinu aktina u prefrontalnom korteksu (C) i hipokampusu (D) Rezultati su prikazani u odnosu na ekspresiju proteina u kontrolnoj grupi koja je svedena na 100% i kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – p<0,05 u poređenju sa kontrolnom grupom.

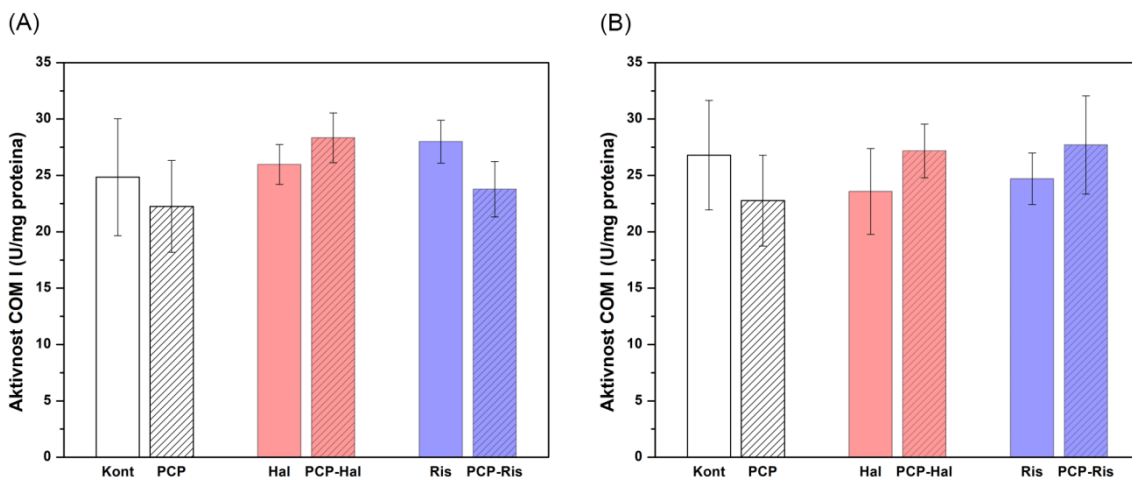


Slika 13. Ekspresija azot-monoksid sintaze 2 (NOS2) i azot-monoksid sintaze 3 (SOD3) u mozgu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije proteina u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) i denzitometrijska analiza nivoa proteina u odnosu na količinu aktina u prefrontalnom korteksu (C, E) i hipokampusu (D, F) Rezultati su prikazani u odnosu na ekspresiju proteina u kontrolnoj grupi koja je svedena na 100% i kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

4.4. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na enzime respiratornog lanca u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom

4.4.1. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost kompleksa I

Aktivnost kompleksa I respiratornog lanca u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja prikazana je na slici 14. Statistička analiza rezultata nije pokazala značajnu razliku u prosečnim vrednostima aktivnosti ovog enzima između eksperimentalnih grupa ni u korteksu [$F(5,35)=0,557$; $p=0,731$], ni u hipokampusu [$F(5,35)=0,301$; $p=0,908$].

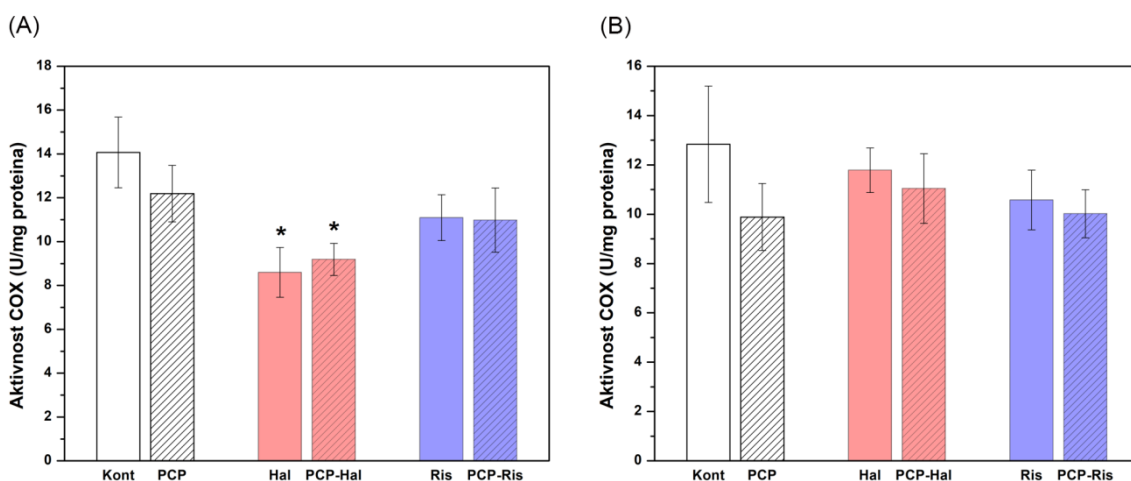


Slika 14. Aktivnost kompleksa I (COM I) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

4.4.2. Uticaj haloperidola i risperidona na aktivnost citohrom c oksidaze

Aktivnost kompleksa IV respiratornog lanca, citohrom c oksidaze, u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova prikazana je na slici 15. Statističkom analizom dobijenih rezultata uočena je značajna razlika u srednjim nivoima aktivnosti enzima u korteksu eksperimentalnih životinja u različitim grupama [$F(5,35)=2,561$; $p=0,048$], dok u hipokampusu aktivnost enzima nije bila statistički značajno različita među eksperimentalnim grupama [$F(5,35)=0,605$; $p=0,696$]. Daljom *post hoc* analizom

aktivnosti enzima u korteksu uočeno je smanjenje aktivnosti nakon primene haloperidola, odnosno u Hal i PCP-Hal grupi ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu.



Slika 15. Aktivnost citohrom c oksidaze (COX) u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

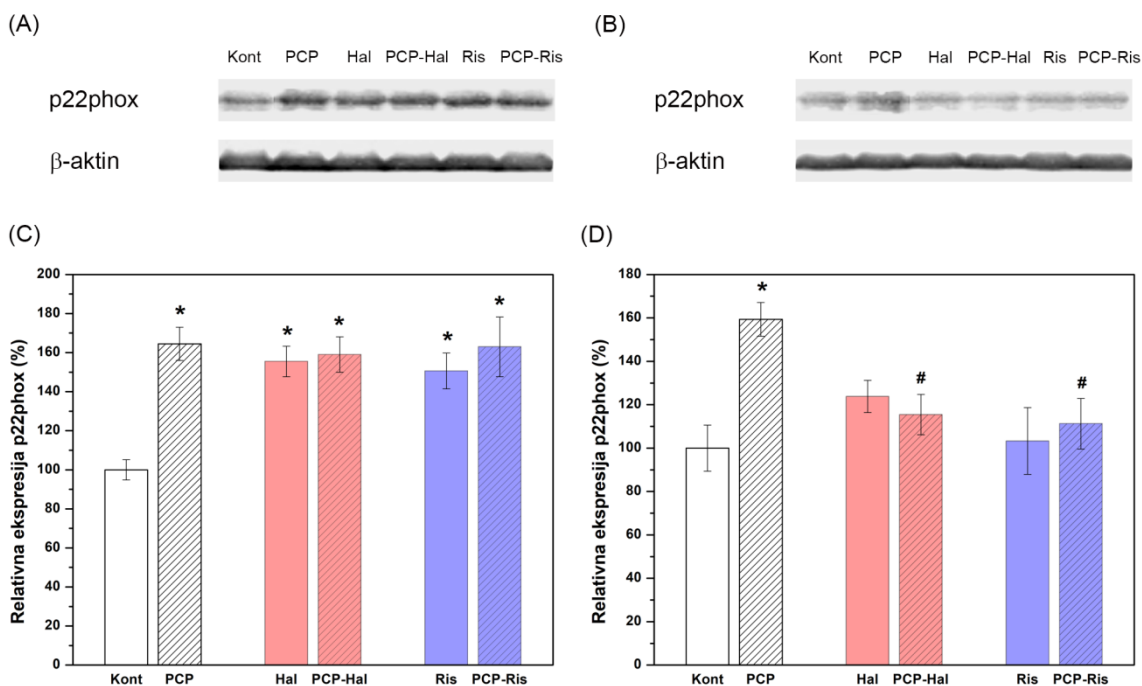
4.5. Efekti dugotrajne primene antipsihotika na ekspresiju NADPH oksidaze u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom

4.5.1. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju membranske subjedinice

p22^{phox}

Ekspresija membranske subjedinice p22^{phox} praćena je tehnikom *Western blot*-a i imunohistohemijskom metodom u prefrontalnom korteksu i hipokampusu eksperimentalnih životinja. Statistička obrada rezultata dobijenih denzitometrijskom analizom ekspresije p22^{phox} ukazala je na prisustvo značajne razlike među eksperimentalnim grupama u korteksu [$F(5,35)=2,572$; $p=0,047$] i hipokampusu [$F(5,35)=3,168$; $p=0,021$] (slika 16). *Post hoc* analiza nivoa proteina u korteksu pokazala je značajno više vrednosti u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu ($p < 0,05$). Međutim, u hipokampusu je primećena povećana ekspresija p22^{phox} nakon

perinatalnog tretmana PCP-om, odnosno u PCP grupi u odnosu na kontrolnu ($p < 0,05$), a nakon primene antipsihotika u PCP-Hal i PCP-Ris grupi ekspresija proteina bila je na nivou kontrolne grupe ($p > 0,05$), odnosno statistički značajno niža u odnosu na PCP-grupu ($p < 0,05$). U Hal i Ris grupi nije pokazana razlika u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



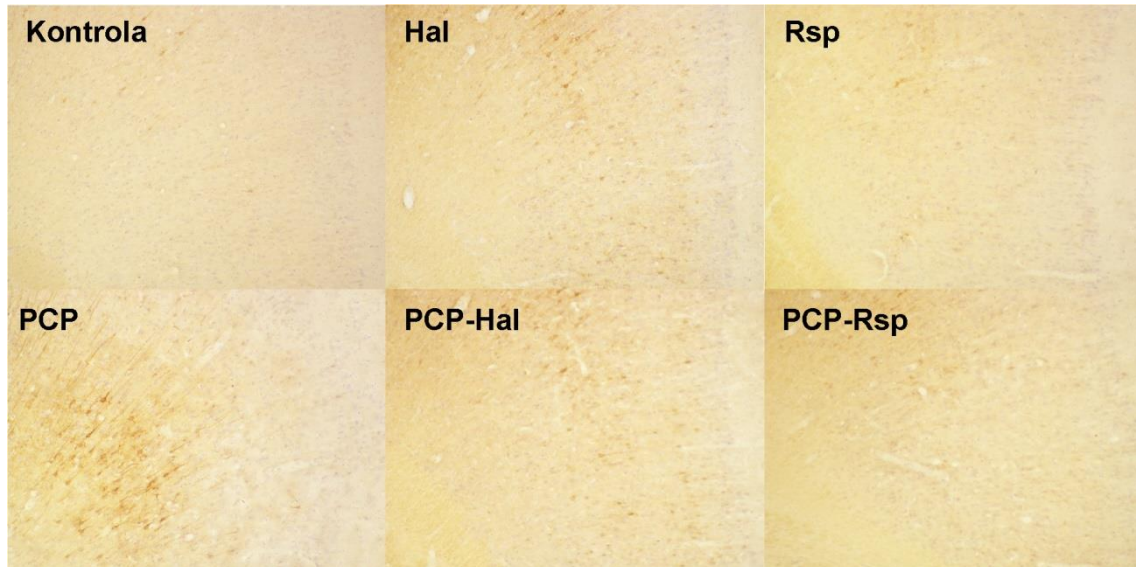
Slika 16. Ekspresija membranske subjedinice p22^{phox} u mozgu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije proteina u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) i denzitometrijska analiza nivoa proteina u odnosu na količinu aktina u prefrontalnom korteksu (C) i hipokampusu (D) Rezultati su prikazani u odnosu na ekspresiju proteina u kontrolnoj grupi koja je svedena na 100% i kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

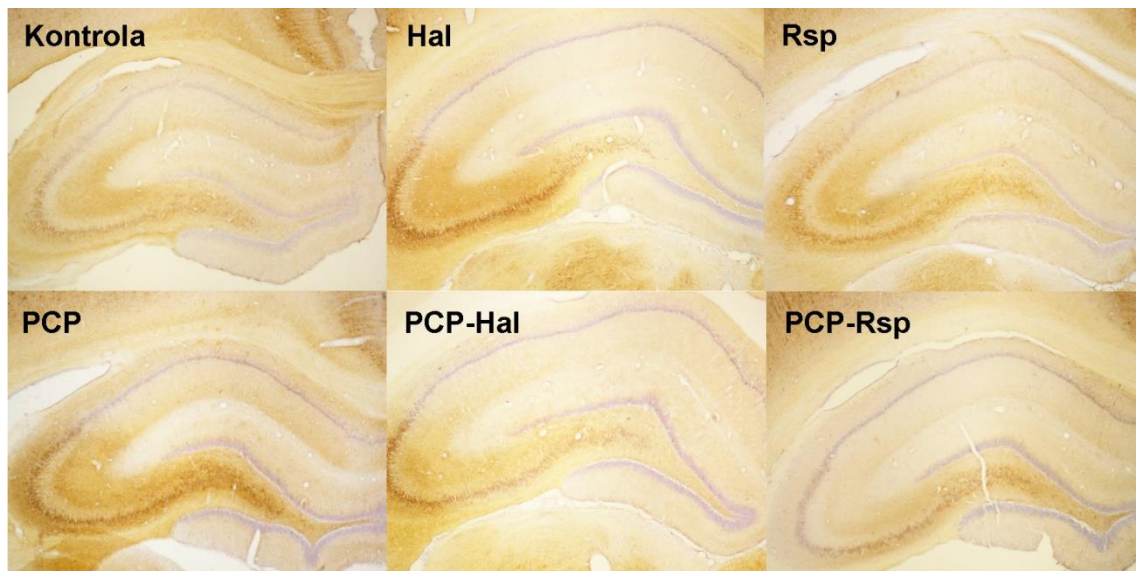
– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

Imunohistohemijsko bojenje ekspresije p22^{phox} u prefrontalnom korteksu i hipokampusu pacova i rezultati relativne površine pokrivena signalom koji potiče od eksprimiranog p22^{phox} prikazani su na slikama 17, 18 i 19. Statističkom analizom pokazana je značajna razlika u ekspresiji p22^{phox} među grupama u obe ispitivane

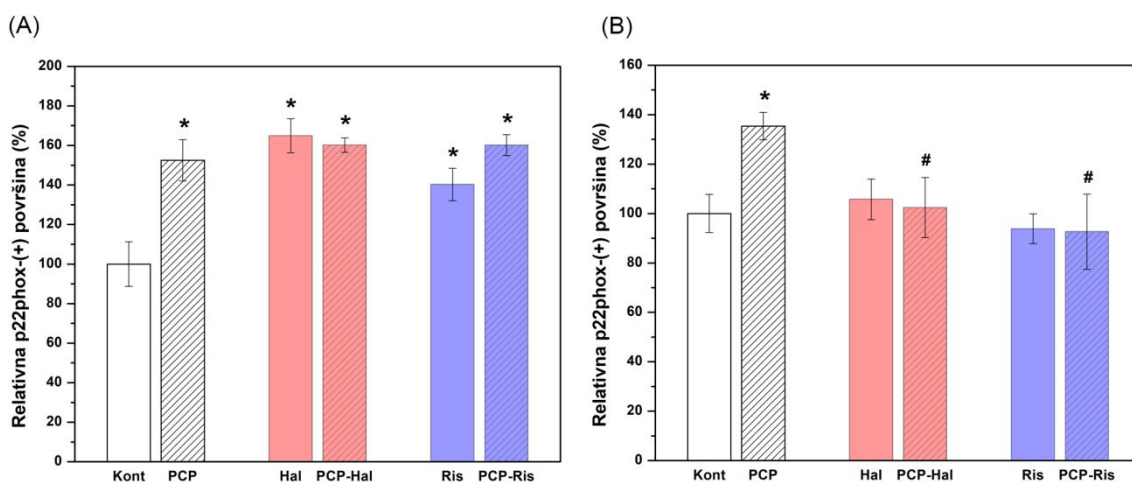
moždane strukture. Vrednost ANOVA testa za zastupljenost proteina u korteksu iznosila je $F(5,35)=2,559$ ($p=0,048$), a u hipokampusu $F(5,35)=2,860$ ($p=0,031$).



Slika 17. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja p22^{phox} u prefrontalnom korteksu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Rsp) (uveličanje 1:100).



Slika 18. Reprezentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja p22^{phox} u hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Rsp) (uveličanje 1:100).



Slika 19. Imunohistohemijska ekspresija membranske subjedinice p22^{phox} u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao relativna površina pokrivena signalom koji potiče od eksprimiranog proteina u odnosu na u kontrolnu grupu koja je svedena na 100% i kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

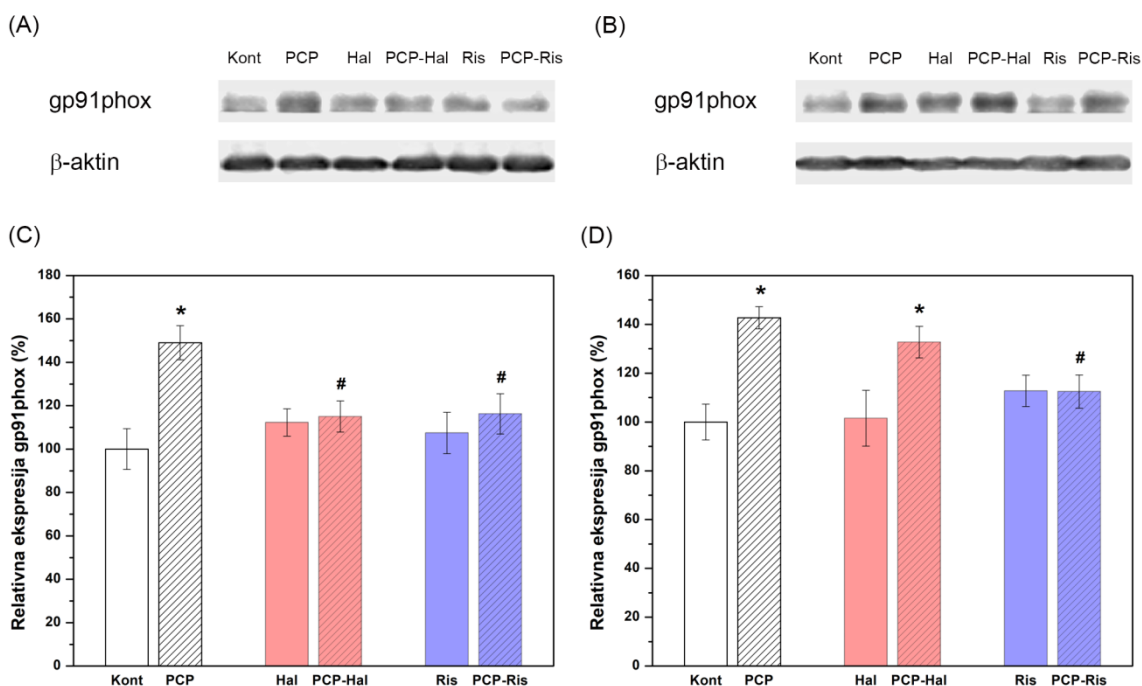
* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.5.2. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju NOX2 izoenzima (gp91^{phox})

Ekspresija membranske subjedinice gp91^{phox} (NOX2) određivana metodom *Western blot*-a prikazana je na slici 20. Analiza rezultata pokazala je statistički značajnu razliku u nivoima ovog proteina kako u korteksu [$F(5,35)=3,036$; $p=0,025$], tako i u hipokampusu [$F(5,35)=4,244$; $p=0,005$]. U korteksu je zapaženo povećanje nivoa gp91^{phox} nakon perinatalnog tretmana PCP-om, odnosno u PCP grupi u odnosu na kontrolnu ($p < 0,05$), koje nije postojalo nakon primene oba ispitivana antipsihotika, odnosno u PCP-Hal i PCP-Ris grupi. Dodatno, u ove dve grupe nivoi proteina su bili značajno niži u odnosu na PCP grupu ($p < 0,05$). U hipokampusu, međutim, povećanje ekspresije gp91^{phox}, zapaženo je u PCP grupi, kao i u PCP-Hal grupi u odnosu na kontrolnu ($p < 0,05$), dok je tretman risperidonom nakon perinatalne primene PCP-om

pokazao isti efekat kao i u korteksu, dakle izjednačavanje nivoa proteina sa kontrolnim vrednostima i značajno niže nivoe u odnosu na PCP grupu ($p < 0,05$).



Slika 20. Ekspresija membranske subjedinice gp91^{phox} u mozgu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije proteina u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) i denzitometrijska analiza nivoa proteina u odnosu na količinu aktina u prefrontalnom korteksu (C) i hipokampusu (D) Rezultati su prikazani u odnosu na ekspresiju proteina u kontrolnoj grupi koja je svedena na 100% i kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

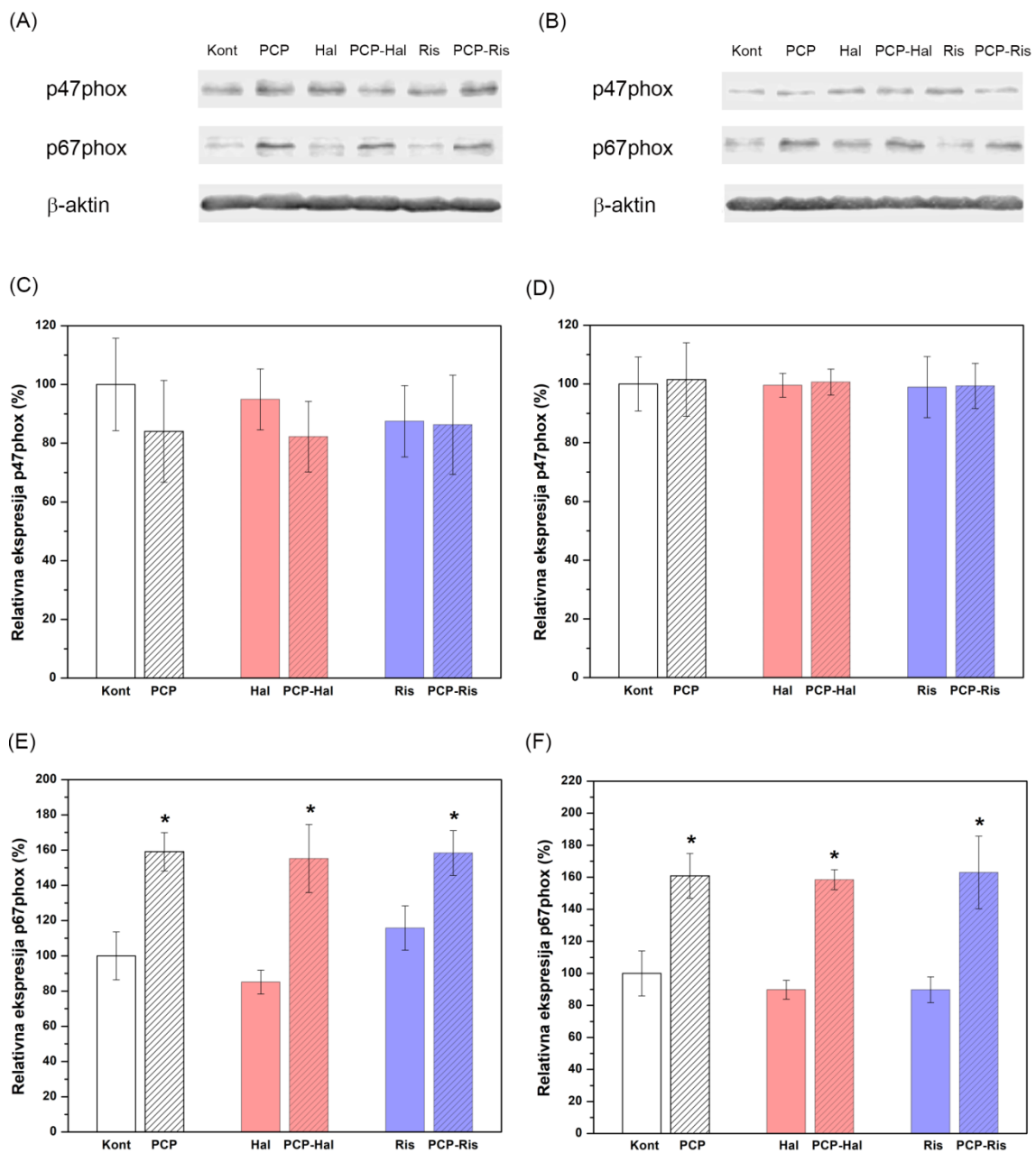
– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

4.5.3. Uticaj haloperidola i risperidona na ekspresiju citosolnih subjedinica p67^{phox} i p47^{phox}

Za aktivnost NOX2 enzima neophodno je prisustvo citosolnih subjedinica, aktivišuće p67^{phox} i organizatorske p47^{phox}, čija ekspresija je praćena u ispitivanim moždanim strukturama eksperimentalnih životinja i prikazana je na slici 21. Statističkom obradom rezultata dobijenih denzitometrijskom analizom ekspresije

p67^{phox} pokazana je značajna razlika u prosečnim nivoima ovog proteina među grupama u korteksu [F(5,35)=3,184; p=0,020], kao i hipokampusu [F(5,35)=3,707; p=0,010]. Dalja *post hoc* analiza pokazala je identične promene u ekspresiji p67^{phox} među grupama u oba moždana regiona. Naime, nakon perinatalnog tretmana PCP-om zapaža se povećana ekspresija proteina koja je prisutna nezavisno od tretmana antipsihoticima, odnosno izmereni nivoi 67^{phox} u PCP, PCP-Hal i PCP-Ris grupi značajno su viši u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,05).

Statistička obrada rezultata dobijenih denzitometrijskom analizom ekspresije p47^{phox} pokazala je da među ispitivanim grupama ne postoji razlika u srednjim nivoima ovog proteina ni u korteksu [F(5,35)=0,289; p=0,915], niti u hipokampusu [F(5,35)=0,012; p=0,999].



Slika 21. Ekspresija citosolnih subjedinica p47^{phox} i p67^{phox} u mozgu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije proteina u prefrontalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) i denzitometrijska analiza nivoa proteina u odnosu na količinu aktina u prefrontalnom korteksu (C, E) i hipokampusu (D, F) Rezultati su prikazani u odnosu na ekspresiju proteina u kontrolnoj grupi koja je svedena na 100% i kao aritmetička sredina \pm SE za metodološki definisan broj životinja.

* – $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

– $p < 0,05$ u poređenju sa PCP grupom.

5. DISKUSIJA

Naša studija pokazala je značajne dugoročne efekte perinatalne primene fenciklidina na redoks ravnotežu u mozgu adultnih pacova nezavisno od primene antipsihotika. Narušen redoks status ogleda se prvenstveno u prisustvu oksidativnog oštećenja lipida u hipokampusu, smanjenja aktivnosti centralnog enzima antioksidativne zaštite superoksid dizmutaze i složenih promena u metabolizmu glutaciona koje rezultuju u smanjenju količine ukupnog glutaciona i izraženog porasta oksidovane forme glutaciona u obe ispitivane moždane strukture. Dodatno, metabolizam azot-monoksida je promenjen kao posledica ranog fenciklidinskog tretmana, što se ogleda u izraženoj redukciji metabolita nitrita i nitrata. Takođe, značajno se povećava ekspresija membranskih subjedinica NADPH oksidaze, kao i citosolne aktivišuće p67^{phox} subjedinice, što sugeriše povećanu aktivnost ovog enzima i posledičnu povećanu produkciju slobodnih radikala. Hronična oralna primena antipsihotika dovodi do delimične reverzije ovih promena, ali se promene u redoks statusu i dalje zapažuju. Sa druge strane, perinatalna primena fenciklidina nije značajno uticala na metabolizam mitohondrija koji je praćen aktivnošću enzima respiratornog lanca, dok je haloperidol pokazao dugotrajan efekat na smanjenje aktivnosti citohrom c oksidaze u mitohondrijama u hipokampusu.

Kao primer oksidativnog oštećenja biomolekula u našem istraživanju ispitivana je lipidna peroksidacija merenjem jednog od krajnjih produkata ovog procesa – malondialdehida. Rezultati ove studije potvrdili su ranije nalaze naše istraživačke grupe da perinatalna primena fenciklidina uzrokuje dugoročno povećanje lipidne peroksidacije u hipokampusu, dok se u prefrontalnom korteksu takav efekat ne zapaža (Radonjić i sar., 2010). Postojanje razlike u korteksu i hipokampusu može ukazivati na regionalnu specifičnost redoks regulacije i drugačiju podložnost prema oksidativnim

oštećenjima različitih struktura mozga, ali ostavljaju mogućnost i različitog efekta fenciklidina na nivou ovih struktura. Dodatno, pokazali smo da dugotrajna primene oba ispitivana antipsihotika nema značajan efekat na stepen lipidne peroksidacije, odnosno ne poseduje mogućnost sprečavanja niti reparacije nastalih oštećenja, te se ne može govoriti o postojanju antioksidativnog efekta. Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali ni značajan prooksidativni kapacitet haloperidola i risperidona u ispitivanim moždanim strukturama.

Pretpostavka o povezanosti oksidativnog stresa i shizofrenije je odavno postavljena (Hoffer i sar., 1954). U literaturi se mogu naći brojni dokazi o postojanju oksidativnih oštećenja različitih biomolekula kod obolelih od shizofrenije kao posledice oksidativnog stresa koji nastaje u sklopu patogenetskih procesa ove bolesti, a nekada i same terapije. Najviše studija bazira se na merenju perifernih markera oksidativnog stresa, na prvom mestu pokazatelja lipidne peroksidacije, među kojima zbog metodološki relativno jednostavnog, jeftinog i brzog određivanja, prvo mesto zauzima MDA. Ipak, kako navode pojedini eksperti u oblasti oksidativnog stresa, korišćenje tzv. TBA eseja za merenje MDA ili TBARS (engl. *TBA-reactive substances*) nije bez manjkavosti, te pri svakom tumačenju ovih rezultata treba biti oprezan u proceni u kojoj meri povećanje MDA jeste odraz povećane lipidne peroksidacije (Halliwell i Gutteridge, 2015). Kod obolelih od shizofrenije najčešće je zapažano povećanje nivoa MDA na periferiji, uključujući plazmu (Khan i sar., 2002; Kuloglu i sar., 2002; D'Souza i D'Souza, 2003; Gonzalez-Lienres i sar., 2014), serum (Pedrini i sar., 2012; Devanarayanan i sar., 2016), eritrocite (Altuntas i sar., 2000; Rukmini i sar., 2004, Dadheech i sar., 2008) i leukocite obolelih (Srivastava i sar., 2001). Međutim, treba istaći da u određenim studijama nije pokazana promena u stepenu lipidne peroksidacije kod obolelih od shizofrenije (Ranjekar i sar., 2003; Ben Othmen i sar., 2008) ili su čak nađene niže količine MDA (Asevedo i sar., 2013). Kada je reč o nalazima povećanog oksidativnog oštećenja lipida i produkcije MDA, oni su uočeni kod pacijenata kako na početku bolesti (Altuntas i sar., 2000; Khan i sar., 2002; Sarandol i sar., 2015), tako i kod hroničnih

pacijenata na terapiji (Altuntas i sar., 2000; Zhang i sar., 2006; Kunz i sar., 2008; Padurariu i sar., 2010; Zhang i sar., 2015). Pojedine studije pokazale su vezu između nivoa MDA i pojedinih sociodemografskih karakteristika obolelih, mada rezultati često nisu usaglašeni ili su čak oprečni (Morera i sar., 2009). Tako su viši nivoi lipidne peroksidacije uočeni kod muškaraca (Ramos-Loyo i sar., 2013), pacijenata sa većim indeksom telesne mase (An i sar., 2018), kao i kod nepušača (Zhang i sar., 2007). Zanimljivo, studija Morera i sar. (2009) ukazala je na sezonske varijacije u količini MDA, sa višim nivoima u plazmi obolelih tokom leta, a kao jedno od mogućih objašnjenje ove pojave autori navode sezonske varijacije u količini melatonina koji deluje kao važan antioksidans.

Na osnovu rezultata istraživanja kojima je utvrđivan uticaj terapije antipsihoticima na stepen lipidne peroksidacije na periferiji kod pacijenata ne može se izvući jednostavan zaključak o njihovom efektu s obzirom na neusaglašene rezultate. Naime, postoje podaci u literaturi da tokom terapije dolazi do narušavanja redoks statusa obolelih i povećanja nivoa MDA (Bai i sar., 2018), što može biti razlog pojave nekih neželjenih dejstava same terapije, uključujući veći rizik od kardiovaskularnih bolesti (Sarandol i sar., 2007; Vidović i sar., 2014) i tardivnu diskineziju (Zhang i sar., 2007, Wu i sar., 2014). Sa druge strane, neki autori naglašavaju antioksidativni efekat antipsihotika (Dakhale i sar., 2004; Al-Chalabi i sar., 2009). Zanimljivo, studija Kartalci i sar. (2011) pokazala je pozitivan efekat elektrokonvulzivne terapije na smanjenje lipidne peroksidacije kod pacijenata sa shizofrenijom, što je praćeno i značajnim kliničkim poboljšanjem. Konačno, postoje podaci koji su saglasni sa rezultatima naše studije da tretman antipsihoticima ne utiče značajno na samu lipidnu peroksidaciju (Huang i sar., 2010; Sarandol i sar., 2015). Dodatno, naši rezultati nisu pronašli razliku u efektu haloperidola i risperidona, kao predstavnika tipičnih, odnosno atipičnih antipsihotika. Slični rezultati postoje u literaturi (Sarandol i sar., 2007; Zhang i sar., 2006), ali i nalazi koji ukazuju na veće količine MDA nakon terapije tipičnim antipsihoticima (Kropp i sar., 2005; Güneş i sar., 2016) ili pak obrnuto, atipičnim antipsihoticima (Gama i sar.,

2006). Dietrich-Muszalska i sar. (2013) pratili su *in vitro* efekat pojedinih antipsihotika na nivoe TBARS u humanoj plazmi i njihovi rezultati ukazuju na razlike i u okviru iste grupe antipsihotika, kao i dozno-zavisni uticaj lekova. Kvetiapin je pokazao najizraženije antioksidativno dejstvo, olanzapin samo u malim dozama ima antioksidativni potencijal, aripriprazol nije pokazao nikakav efekat, dok risperidon, ziprasidon, haloperidol i klopazapin već pri malim dozama ispoljavaju prooksidativno dejstvo mereno povećanim stepenom lipidne peroksidacije (Dietrich-Muszalska i Kolińska-Łukaszuk, 2018).

Dodatne dokaze koji govore o značaju lipidne peroksidacije u shizofreniji pružaju kliničke studije u kojima je pokazan pozitivan efekat suplementacije antioksidansima na smanjenje količine MDA, praćeno poboljšanjem kliničke slike kod obolelih. Pokazano je da suplementacija vitaminom C (Dakhale i sar., 2005), kao i alfa-lipoinskom kiselinom (Vidović i sar., 2014) uz terapiju antipsihoticima dovodi do redukcije lipidne peroksidacije kod obolelih. Slični efekti su uočeni i nakon primene probiotika i vitamina D (Ghaderi i sar., 2019).

Iako daleko najčešće određivan biomarker lipidne peroksidacije, MDA nije jedini, te se u literaturi mogu naći podaci o promenjenim nivoima i drugih produkata lipidne peroksidacije u shizofreniji. Tako, kod pacijenata su izmereni viši nivoi 4-hidroksinonenala (Medina-Hernández i sar., 2007; Ramos-Loyo i sar., 2013), kao i izoprostana – 8-izoprostanglandina F2 α u plazmi (Lee i sar., 2016) ili urinu (Dietrich-Muszalska i Olas, 2009, Jordan i sar., 2018), jednog od najosetljivijih markera oksidativnog oštećenja lipida. Takođe, klinička studija Pawełczyk i sar. (2017) dokazala je povoljan efekat suplementacije ω -3 polinezasićenim masnim kiselinama na sadržaj izoprostana kod obolelih u prvoj epizodi shizofrenije i značajnu korelaciju između ovih promena u oksidativnom statusu sa kliničkim skorovima povezanim sa težinom kliničke slike.

Ograničen broj studija na *postmortem* humanim uzorcima potvrdio je nalaze sa periferije. Do sada jedine ispitivane strukture mozga jesu prednji cingularni korteks gde

su pokazani viši nivoi 4-HNE (Wang i sar., 2009), prefrontalni korteks gde je uočena povećana količina MDA i cerebelum gde promene nisu zapažene (MacDowell i sar., 2017). Trenutno, ne postoje metode za *in vivo* praćenje stepena lipidne peroksidacije kod obolelih.

I pored velikog značaja kliničkih studija, detaljniji uvid u ulogu oksidativnih oštećenja, poput lipidne peroksidacije u patogenezi shizofrenije pružaju pretkliničke studije. Različiti animalni modeli koji se koriste za proučavanje shizofrenije potvrdili su nalaze o povećanom stepenu lipidne peroksidacije u mozgu, najčešće prefrontalnom korteksu, hipokampusu i strijatumu (Radonjić i sar., 2010; Ribeiroi sar., 2013; Ozyurt i sar., 2014; El-Sayed El-Sisi i sar., 2016; Zugno i sar., 2016; Yeung i sar., 2018; Zhang i sar., 2018). Za razliku od rezultata naše studije, pojedini podaci iz literature govore o povoljnom efektu risperidonu na smanjenje lipidne peroksidacije u mozgu eksperimentalnih životinja (Monte i sar., 2013; Ben-Azu i sar., 2018b). Ove razlike mogu biti posledica samog eksperimentalnog modela (perinatalni tretman naspram akutnog/hroničnog tretmana), dozi leka, kao i načinu i dužini primene. Sa druge strane, Demirci i sar. (2015) pokazali su da paliperidon, aktivni metabolit risperidona, nema direktnog efekta na lipidnu peroksidaciju, što je u skladu sa našim rezultatima. U slučaju haloperidola, naše istraživanje nije pokazalo značajan prooksidativni efekat ovog leka što je donekle u suprotnosti za rezultatima nekih ranijih studija (Parikh i sar., 2003; Pillai i sar., 2007; Andreazza i sar., 2015). Delimično objašnjenje ovih razlika može biti praćenje lipidne peroksidacije u različitim strukturama mozga, druge primenjene doze i put administracije leka (oralno naspram intraperitonealno). Iako je izostao efekat na stepen lipidne peroksidacije kao direktnog markera oksidativnog stresa, haloperidol je i u našem istraživanju pokazao značajne efekte na redoks ravnotežu.

Nekoliko grupa autora dokazalo je da se bihejvioralne promene nastale usled primene ketamina kao nekompetitivnog antagoniste NMDA receptora u animalnom modelu shizofrenije mogu značajno ublažiti tretmanom različitim agensima koji istovremeno smanjuju oksidativna oštećenja lipida u mozgu eksperimentalnih životinja,

poput ω -3 masnih kiselina (Zugno i sar., 2014), α -lipoiinske kiseline (Vasconcelos i sar., 2015) folne kiseline (Zugno i sar., 2016), melatonina (Onalapo i sar., 2017a), minociklina (Monte i sar., 2013), doksiciklina (Ben-Azu i sar., 2018a), cinka (Onalapo i sar., 2017b) kao i nekih antioksidanasa iz biljaka poput morina (Ben-Azu i sar., 2018b) i mangiferina (Rao i sar., 2012). Mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovih efekata nisu u potpunosti razjašnjeni. Svakako, smanjenje stepena lipidne peroksidacije može se smatrati posledicom složenih promena u nekoliko aspekata narušene redoks ravnoteže, koji kako između ostalog i naše istraživanje sugeriraju obuhvataju aktivnost antioksidativnih enzima, metabolizam glutationa, metabolizam azot-monoksida, mitohondrijalni metabolizam i aktivnost brojnih enzima koji produkuju slobodne radikale, uključujući NADPH oksidazu.

Perinatalna primena PCP-a dovela je do značajnog smanjenje aktivnosti SOD i ekspresije citosolnog izoenzima, dok se ekspresija mitohondrijalne SOD nije menjala. Sa druge strane, nije zapažen efekat na aktivnost CAT, kao drugog važnog enzima antioksidativne zaštite. Rezultati naše studije su pokazali da haloperidol uzrokuje smanjenje aktivnosti i ekspresije SOD, naročito izraženo u korteksu, dok risperidon na opisan način deluje na obe strukture. Međutim, i pored navedenog smanjenja, oba leka uzrokuju povećanje SOD aktivnosti i ekspresije u odnosu na vrednosti koje postoje kod životinja nakon perinatalnog tretmana PCP-om, što govori o pokušaju vraćanja narušenog redoks statusa u ravnotežu. Sa druge strane, haloperidol svoj efekat u hipokampusu ostvaruje i smanjenjem ekspresije mitohondrijalne SOD.

Jedan od najčešćih pristupa ispitivanju eventualnih poremećaja mehanizama antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije je indirektni pristup, koji se zasniva na određivanju perifernih markera redoks statusa, najčešće u plazmi ili eritrocitima. Enzim superoksid dizmutaza zbog svoje primarne pozicije u nizu reakcija kojima se katalitički uklanjaju slobodni radikali, najčešće je ispitivan antioksidativni enzim u shizofreniji i do danas više desetina studija, različitih grupa autora, bavilo se mogućom

povezanošću ovog enzima sa patogenetskim procesima bolesti. Međutim, rezultati ovih studija često su suprotstavljeni i jednostavan odgovor na pitanje da li je i kako aktivnost SOD promenjena u shizofreniji ne može se dati. Takođe, treba imati u vidu da postoje brojni razlozi zašto se indirektni pristup ne može smatrati najadekvatnijim za procenu redoks statusa u CNS-u. Jedan od razloga leži u tome što eritociti ne sintetišu nove proteine, te se njihovim starenjem količina svih proteina, uključujući i antioksidativne enzime postepeno smanjuje, što ukazuje da svaki faktor koji menja životni vek eritrocita ima i značajan efekat na aktivnost eritrocitnih enzima (Halliwell i Whiteman, 2004). Sa druge strane, aktivnost enzima iz plazme može biti promenjena usled brojnih fizioloških i patoloških okolnosti, npr. ishrane, fizičke aktivnosti, povećanog oslobađanja iz oštećenih ćelija i slično (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Enzim SOD je ispitivan u različitim populacijama obolelih. Kod pacijenata u prvoj epizodi bolesti, pre primene terapije, zapažena je povećana aktivnost ili količina enzima u eritrocitima (Abdalla i sar., 1986) i plazmi/serumu (Zhang i sar., 2001; Zhang i sar., 2003a; Wu i sar., 2012). Pojedine studije, međutim, navode sniženje aktivnosti na početku bolesti (Mukerjee i sar., 1996; Raffa i sar., 2009). Kod stabilnih hroničnih pacijenata na terapiji, aktivnost SOD je u većini studija snižena (Ranjekar i sar., 2003; Dietrich-Muszalska i sar. 2005; Ben Othmen i sar., 2008; Dadheech i sar., 2008; Raffa i sar., 2009; Raffa i sar., 2012; Al-Asmari i Khan, 2014; Gonzales-Liencre i sar., 2014; Zhang i sar., 2015), što je potvrdila i meta-analiza sprovedena od strane Flatow i sar. (2013), mada postoji i nemali broj istraživanja čiji rezultati govore u prilog povišenoj (Altuntas i sar., 2000; Gama i sar., 2006; Kunz i sar., 2008; Miljevic i sar., 2010; Wu i sar., 2012; Vidović i sar., 2014) ili nepromenjenoj aktivnosti (Herken i sar., 2001; Srivastava i sar., 2001; Tunçel i sar., 2015). Aktivnost SOD na periferiji negativno korelira sa stepenom lipidne peroksidacije (Rukmini i sar., 2004; Tsai i sar., 2013). Dodatno, pokazana je korelacija između nivoa SOD i pozitivnih simptoma i to u oba smera (Zhang i sar., 2003a; Wu i sar., 2012). Takođe, Zhang i sar. (2013) uočili su niže nivoe aktivnosti MnSOD u plazmi hroničnih pacijenata, koji su negativno korelirali sa

pozitivnim i kognitivnim simptomima, posebno kod obolelih koji su nosioci Ala-9Val polimorfizma u *sod2* genu (Zhang i sar., 2014). Đorđević i sar. (2017) zapazili su više nivoe aktivnosti SOD kod mladih pacijenata, naročito ukoliko su imali više akutnih epizoda bolesti. Međutim, niži nivoi aktivnosti serumske SOD pokazani su kod mladih koji su pod visokim rizikom za oboljevanje od shizofrenije (Zeni-Graiff i sar., 2017). Ipak, meta-analiza koju su sproveli Farguas i sar. (2017) nije utvrdila postojanje razlika u aktivnosti SOD, niti ostalim ispitivanim parametrima oksidativnog stresa, kod obolelih u prvoj epizodi shizofrenije sa ranim početkom.

Nekoliko studija bavilo se uticajem antipsihotika na aktivnost periferne SOD. Najviše rezultata govori u prilog smanjenja aktivnosti SOD nakon primene antipsihotika (Zhang i sar, 2003b; Dakhale i sar., 2004; Zhang i sar., 2006; Zhang i sar., 2009; Bai i sar., 2018), mada pojedini autori navode nepromenjenu aktivnost enzima (Sarandol i sar., 2007; Sarandol i sar., 2015) Nije pokazana značajna razliku u efektu tipičnih u odnosu na atipične antipsihotike (Gama i sar., 2006; Zhang i sar., 2012). Međutim, među atipičnim antipsihoticima uočeno je da klopazin dovodi do značajnijeg povećanja aktivnosti enzima u odnosu na risperidon (Hendouei i sar., 2018). Ovi nalazi o uticaju terapije na aktivnost SOD mogu se tumačiti kao oporavak redoks disregulacije koja postoji kod obolelih, mada pojedini autori posmatraju promene u aktivnosti enzima kao dodatno narušavanje antioksidativnih mehanizama, odgovorno između ostalog za nastanak tardivne diskinezije kao neželjenog dejstva antipsihotika (Zhang i sar., 2003c; Wu i sar., 2014; Wu i sar., 2015). Jedinstven zaključak se ne može izvući na osnovu rezultata ovih istraživanja, pre svega jer nije u potpunosti jasno šta aktivnost SOD na periferiji predstavlja u konceptu redok regulacije u mozgu obolelih, niti kako se periferni efekat antipsihotika može dovesti u vezu sa njihovim centralnim dejstvom na neurotransmiterske sisteme.

U slučaju katalaze, drugog važnog enzima antioksidativne zaštite, nalazi ispitavanja aktivnosti perifernog enzima kod obolelih od shizofrenije su prilično heterogeni. Kod obolelih su zapažene povećane (Herken i sar., 2001; Kartalci i sar., 2011;

Al-Asmari i sar., 2014; González-Blanco i sar., 2018), snižene (Li i sar., 2006; Ben Othmen i sar., 2008; Raffa i sar., 2009; Raffa i sar., 2011; Raffa i sar., 2012; Ruiz-Litago i sar., 2012), kao i nepromenjene vrednosti aktivnosti CAT (Srivastava i sar., 2001; Tsai i sar., 2013) u odnosu na zdrave. Ovako izražene razlike mogu se makar delom pripisati različitim populacijama koje su ispitivane, različitim fazama bolesti i terapijskim statusom kod obolelih, drugačijim uzorcima koji su korišćeni (plazma ili krvne ćelije) kao i analitičkim varijacijama. U meta-analizi, Flatow i sar. (2013) doneli su zaključak da se eritrocitna katalaza može smatrati markerom stanja u shizofreniji, s obzirom na to da je niska aktivnost prisutna u prvoj epizodi bolesti, dok je kod hroničnih, stabilnih pacijenata aktivnost povećana. Terapija antipsihoticima može biti uzrok povećanja aktivnosti CAT kod hroničnih pacijenata (Raffa i sar., 2009; Ruiz-Litago i sar., 2012). Slično kao u slučaju SOD, niži nivoi periferne aktivnosti CAT zapaženi su kod obolelih sa tardivnom diskinezijom u odnosu na obolele koji nisu razvili ovo neželjeno dejstvo terapije (Zhang i sar., 2007).

Određivanje aktivnosti SOD u cerebrospinalnoj tečnosti kod obolelih od shizofreniji pružilo je nove dokaze o značaju narušenih mehanizama antioksidativne zaštite u ovom oboljenju. Pokazano je da su nivoi aktivnosti SOD1 u likvoru obolelih smanjeni na početku bolesti u odnosu na zdrave, dok kod hroničnih pacijenata nije uočena razlika (Coughlin i sar., 2013). Dodatno, aktivnost SOD korelira sa kognitivnim simptomima u ranoj fazi bolesti (Coughlin i sar., 2017). Autori sugerišu da bi niži nivoi solubilne SOD1 u likvoru mogli biti praćeni povećanim nivoima nesolubilne SOD1 u moždanom tkivu, praveći moguću paralalu sa amiloidom beta i Alchajmerovom bolešću, a s obzirom na to da SOD1 ima amiloidogenu prirodu i dobro je utvrđena njegova veza sa neurodegenerativnim oboljenjem ALS-om (Chattopadhyay i Valentine, 2009). Što se tiče aktivnosti CAT, u literaturi za sada ne postoje podaci o aktivnosti ovog enzima u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od shizofrenije.

Direktniji pristup u proceni redoks regulacije u mozgu obolelih od shizofrenije i uticaju terapije antipsihoticima na parametre redoks statusa omogućavaju studije na

post mortem uzorcima. U jednoj od prvih studija ovog tipa nisu primećene razlike u aktivnosti SOD u mozgu obolelih od shizofrenije (Wise i sar., 1974). Kasnije, iako na malom uzorku obolelih na hroničnoj terapiji, pokazano je povećanje količine Mn-SOD izoenzima u frontalnom i temporalnom korteksu, dok je Cu,Zn-SOD izoenzim bio na kontrolnim nivoima (Loven i sar., 1996). U istraživanju Michel i sar. (2004) zapažene su povećane količine oba intracelularna izoenzima Cu,Zn-SOD i Mn-SOD u frontalnom korteksu i *substantia innominata* obolelih od shizofrenije. Međutim, nova studija druge grupe autora nije ponovila nalaz različite ekspresije SOD u prefrontalnom korteksu, iako je u ovoj studiji pokazano smanjenje nivoa iRNK za protein UCP2 (engl. *uncoupling protein 2*) koji u mitohondrijama ima ulogu u ograničenju produkcije ROS (Gigante i sar., 2011), što ukazuje na moguću narušenu redoks ravnotežu u mitohondrijama u prefrontalnom korteksu obolelih. Komparativnom analizom proteoma u hipokampusu obolelih, uočeno je da kod obolelih postoji smanjenje količine MnSOD (Edgar i sar., 2000). Zanimljivo, pored *sod2* gena geni za još tri od ukupno 18 proteina čija je ekspresija promenjena u ovoj studiji smešteni su na dugom kraku hromozoma 6, što upućuje na mogući značaj ovog dela genoma i shizofrenije.

Smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima pokazano je i u studijama na animalnim modelima shizofrenije (Hou i sar., 2013, Xuan i sar., 2015, Réus i sar., 2017, Ben Azu i sar., 2018; Zhang i sar., 2018). Saglasno sa našim rezultatima, sveobuhvatna analiza proteoma kod životinja tretiranih MK-801 pokazala je, između ostalog, smanjenje nivoa SOD u prefrontalnom korteksu (Paulson i sar., 2003). U istraživanju Réus i sar. (2018) zapažena je snižena aktivnost SOD u hipokampusu nakon primene ketamina, koja je, međutim, izostala sa istovremenom primenom inhibitora indolamin-2,3-dioksidaze, što ukazuje na moguću povezanost inhibicije kinureninskog puta sa antioksidativnim efektima. Naročiti značaj smanjenja aktivnosti SOD za shizofreniju pokazan je u perinatalnom fenciklidinskom modelu. Naime, primenom jedinjenja M40403 koje deluje kao mimetik SOD-a i značajno smanjuje količinu superoksidnog anjona, dolazi do sprečavanja nastanka apoptoze kortikalnih neurona i izostanka PCP-

om posredovane prepulsne inhibicije (Wang i sar., 2003). U našoj studiji, smanjenje SOD, prvenstveno citosolnog izoenzima, ostaje kao dugoročni efekat perinatalne blokade NMDA receptora i samo delimično biva poboljšano pod uticajem antipsihotika. U mitohondrijama hipokampusa, sa druge strane, haloperidol samostalno dovodi do smanjenje ekspresije superoksid dizmutaze, što se uzevši u obzir značaj ovog enzima u antioksidativnoj zaštiti mitohondrija, može smatrati njegovom značajnom prooksidativnom osobinom

Najveći broj istraživanja o povezanosti shizofrenije i glutaciona zasniva se na određivanju sadržaja glutaciona ili aktivnosti enzima uključenih u metabolizam glutaciona iz uzoraka krvi obolelih. Rezultati ovih istraživanja ukazuju na niže vrednosti koncentracije glutaciona u punoj krvi (Raffa i sar., 2009; Raffa i sar., 2012; Ballesteros i sar., 2013; Gonzalez-Lienres i sar., 2014), plazmi (Raffa i sar., 2011; Nucifora i sar., 2017), serumu (Tsai i sar., 2013; Ivanova i sar., 2015) i eritrocitima (Altuntas i sar., 2000) pacijenata u odnosu na zdravu populaciju. Smanjenje glutaciona uočeno je kod novoobolelih pre primene terapije (Raffa i sar., 2011), kao i kod hroničnih pacijenata na dugotrajnoj terapiji antipsihoticima (Altuntas i sar., 2000, Raffa i sar., 2009, Nucifora i sar., 2017). Niže vrednosti glutaciona na periferiji negativno koreliraju sa pozitivnim simptomima shizofenijom (Nucifora i sar., 2017), kao i sa psihotičnim simptomima kod bipolarnog poremećaja, što ukazuje na potencijalnu ulogu glutaciona kao perifernog markera psihotičnosti. Nedavna studija Lavoie i sar. (2017) ukazuje na prediktivnu vrednost niskih koncentracija glutaciona u eritrocitima za nastanak psihoze kod osoba pod rizikom. Sa druge strane, udruženost glutaciona sa narušenom neurokognicijom i socijalnom kognicijom kod obolelih od shizofrenije nije pronađena (Gonzalez-Lienres i sar., 2014). Ballesteros i sar. (2013) ispitali su uticaj medikamentozne terapije, ishrane i pušenja na prisustvo niskih vrednosti glutaciona i veći procenat oksidovanog glutaciona u krvi obolelih i zaključak njihove studije je da se nijedan od spoljašnjih faktora ne može smatrati odgovornim za narušen redoks status glutaciona u shizofreniji. Efekti terapije

antipsihoticima na sadržaj glutaciona na periferiji, iz do sada objavljenih rezultata, nisu dovoljno jasni. Prema Ivanova i sar. (2015) atipični antipsihotici ne utiču na snižene nivoe glutaciona, dok tipični antipsihotici dovode do daljeg snižavanja glutaciona, povećavajući redoks disbalans koji postoji kod obolelih. Slično, terapija paliperidonom ne utiče na koncentraciju glutaciona u serumu pacijenata (Tsai i sar., 2013). Međutim, postoje podaci u literaturi prema kojima kod pacijenata sa shizofrenijom na hroničnoj terapiji antipsihoticima nema razlike u nivoima glutaciona u plazmi u odnosu na zdrave ispitanike (Samuelsson i sar., 2013; Tunçel i sar., 2015). Ovakvi nalazi mogu da se interpretiraju na dva načina: antipsihotici dovode do normalizacije sniženih nivoa glutaciona na periferiji obolelih ili u ispitivanoj subpopulaciji obolelih promene u sadržaju glutaciona nisu postojale ni pre terapije. Koja god od ove dve ponuđene alternative da je tačna, ostaje pitanje da li periferni efekti antipsihotika imaju veze sa njihovim centralnim dejstvom.

Kada je reč o aktivnosti glutacion peroksidaze u krvi pacijenata koji boluju od shizofrenije, većina istraživanja govori u prilog smanjenju aktivnosti GPx. Niža aktivnost GPx zapažena je kod pacijenata na početku bolesti pre primene terapije (Bai i sar., 2018), nakon kratkotrajne primene terapije (Ruiz-Litago i sar., 2012; Sarandol i sar., 2015) i kod hroničnih pacijenata na dugotrajnoj terapiji (Altuntas i sar., 2000; Zhang i sar., 2006; Miljevic i sar., 2010; Padurariu i sar., 2010). Snižena aktivnost GPx izmerena je najčešće u eritrocitima (Altuntas i sar., 2000; Ranjekar i sar., 2003; Li i sar., 2006; Dadheech i sar., 2008), ali i plazmi (Zhang i sar., 2006), serumu (Al-Asmari i sar., 2014; Bai i sar., 2018) i trombocitima obolelih (Dietrich-Muszalska i sar., 2014). Ipak, pojedine studije nisu pronašle razlike u aktivnosti periferne GPx (Mukerjee i sar., 1996; Yao i sar., 1999; Srivastava i sar 2001; Raffa i sar., 2009; Raffa i sar., 2012; Xin i sar., 2016), dok je u populaciji obolelih u istraživanju koje su sproveli Raffa i sar. zapažen porast aktivnosti GPx u eritrocitima (Raffa i sar., 2011). Takođe, Herken i sar. (2001) navode značajno povišenu aktivnost eritrocitne GPx kod obolelih od dezorganizovane i rezidualne forme shizofrenije, ali ne i kod paranoidnog oblika. Zanimljivo, više aktivnosti GPx prisutne su

kod zdrave braće i sestara obolelih od shizofrenije u odnosu na opštu populaciju zdravih (Ben Othmen i sar., 2008), što autori tumače kao protektivni mehanizam. Dakle, suprotstavljeni rezultati pojedinih istraživanja mogu se delom objasniti razlikama u formama bolesti, ali pri tumačenju rezultata treba uzeti u obzir druge pridružene faktore (npr. pušenje), kao i analitičke razlike, npr. upotrebu različitih uzorka i različite metode merenja enzimske aktivnosti. Uticaj antipsihotika je ispitivan u nekoliko studija čiji rezultati takođe nisu jednoobrazni. Bai i sar. (2018) pronašli su da hronična terapija povećava aktivnost GPx. Slično, četvoronedeljna terapija atipičnim antipsihoticima dovela je do povećanja aktivnosti GPx kod obolelih žena (Tsai i sar., 2013). Međutim, rezultati većine ostalih studija sugerišu suprotno. Podaci ukazuju na snižavanje aktivnosti GPx tokom terapije haloperidolom (Yao i sar., 1998; Bošković i sar., 2013) i drugim tipičnim ili atipičnim antipsihoticima (Ruiz-Litago i sar., 2012). Dugotrajna terapija tipičnim ili atipičnim antipsihoticima nije pokazala značajnu razliku u efektu ove dve grupe lekova na aktivnost periferne GPx (Zhang i sar., 2006).

Periferna aktivnost glutation reduktaze, enzima odgovornog za reakciju redukcije glutationa, ređe je ispitivana kod obolelih od shizofrenije, a rezultati dosadašnjih studija su neusaglašeni. Pokazana je snižena (Langbein i sar., 2018), povišena (Al-Asmari i sar., 2014) i nepromenjena aktivnost GR u krvi obolelih (Miljevic i sar., 2010; Xin i sar., 2016). Rezultati jedne grupe autora ukazuju na sniženu vrednost GR u trombocitima obolelih, dok eritrocitni enzim nije pokazao razliku u aktivnosti kod obolelih u odnosu na zdrave (Savushkina i sar., 2018). Prema Langbein i sar. (2018), aktivnost GR u plazmi je u negativnoj korelaciji sa negativnim simptomima shizofrenije.

Osnovno pitanje koje se postavlja pri tumačenju perifernih promene u metabolizmu glutationu i aktivnosti enzima jeste jesu li te promene povezane sa patogenetskim procesima u CNS-u obolelih. U slučaju antioksidativnih enzima povezanih sa metabolizmom glutationa, nekoliko studija se bavilo ispitavanjem njihove periferne aktivnosti i veze sa morfološkim i neurofiziološkim poremećajima u shizofreniji. U prvim studijama tog tipa zapaženo je da aktivnost GPx u trombocitima

negativno korelira sa atrofijom mozga na kompjuterizovanoj tomografiji kod pacijenata sa hroničnom shizofrenijom (Buckman i sar., 1987), naročito u slučaju dijagnoze neparanoidnih formi bolesti, većeg stepena hroniciteta i predominacije negativnih simptoma (Buckman i sar., 1990). Međutim, nedavno je pokazano da su više vrednosti GPx u krvi povezane sa manjim volumenom hipokampusa kod pacijenata u ranoj psihozi (Baumann i sar., 2016). U istoj studiji, sadržaj glutaciona nije korelirao sa strukturama forniksa i hipokampusa obolelih. Takođe, uočeno je da je smanjena aktivnost GR u plazmi povezana sa redukcijom sive mase u levom orbitofrontalnom korteksu (BA 47) kod pacijenata u prvoj epizodi shizofrenije pre primene terapije (Langbein i sar., 2018).

Kod obolelih od shizofrenije uočeno je smanjenje količine glutaciona u cerebrospinalnoj tečnosti (Do i sar., 2000). U studiji Do i sar. pokazano je sniženje sadržaja glutaciona u likvora za 27% kod pacijenata pre primene terapije u odnosu na zdravu kontrolu, što sugeriše da deficit glutaciona može biti u osnovi samog oboljenja, a ne posledica terapije antipsihoticima. Zanimljivo, kod pacijenata na hroničnoj terapiji olanzapinom nije zapažena razlika u nivoima glutaciona u plazmi niti u cerebrospinalnoj tečnosti (Samuelsson i sar., 2013), što ostavlja mogućnost da terapija dovodi do reverzije promena koje postoje na početku bolesti.

Iako su studije u kojima je određivan sadržaj glutaciona i enzimskih aktivnosti GPx i GR u mozgu obolelih od shizofrenije koristeći *post mortem* materijal malobrojne, dobijeni su značajni rezultati. Smanjenje količine ukupnog glutaciona i odnosa GSH:GSSG pokazano je u *post mortem* uzorcima prefrontalnog korteksa (Gawryluk i sar., 2011) i *nucleus caudatus*-a (Yao i sar., 2006). U prefrontalnom korteksu obolelih uočena je istovremeno niža aktivnosti GPx, dok je GR aktivnost bila nepromenjena (Gawryluk i sar., 2011). Yao i sar. (2006) pokazali su smanjenu aktivnost GPx i GR u kaudatusu obolelih. Niže vrednosti oksidovanog glutaciona i smanjene GR aktivnosti korelirale su sa godinama starosti pacijenata. Takođe, autori su uočili postojanje pozitivne korelacije između nivoa GSH i GPx, GSH i GR, kao i GPx i GR kod kontrolnih

ispitanika bez psihijatrijskih oboljenja, dok ta korelacija nije postojala kod obolelih. Ova korelacija ukazuje na prisustvo dinamičke ravnoteže kojom se kontroliše redoks status u normalnim okolnostima, koja se kod obolelih gubi, posebno kako bolest duže traje. Glavni nedostatak ovakvih istraživanja je što se uočene promene ne mogu jasno odvojiti od promena koje nastaju pod uticajem dugotrajne terapije antipsihoticima.

Poslednjih godina razvojem novih tehnologija omogućen je drugačiji prisup određivanju glutaciona u mozgu. Metodom protonske magnetno rezonantne spektroskopije (¹H-MRS) može se izvršiti *in vivo* kvantifikacija glutaciona (Wijtenburg i sar., 2015). Direktnim merenjem glutaciona u mozgu obolelih načinjen je važan korak unapred, ali je iz dosadašnjih rezultata ovih ispitivanja teško izvući jednoznačan zaključak s obzirom na to da se studije međusobno razlikuju po moždanoj regiji koja je ispitivana kod pacijenata, trajanju bolesti i terapijskom statusu, kao i jačini magnetnog polja i tehnikama prikupljanja signala pri ¹H-MRS (Rae i Williams, 2017). Među prvim studijama ovog tipa bila je pomenuta studija Do i sar. (2000) sa nalazima sniženih nivoa glutaciona u medijalnom prefrontalnom korteksu obolelih u odnosu na zdrave. Međutim, povećanje nivoa glutaciona uočeno je u medijalnom temporalnom lobusu obolelih u prvoj epizodi bolesti (Wood i sar., 2009). Iako Matsuzawa i sar. (2008) nisu našli razlike u sadržaju glutaciona u posteriornom medijalnom frontalnom korteksu obolelih, pokazana je značajna negativna korelacija između nivoa glutaciona i težine negativnih simptoma, što ukazuje na potencijalnu ulogu koju glutacion u ovom području frontalnog korteksa ima u razvoju negativne simptomatologije shizofenije. Uprkos oprečnim rezultatima *in vivo* studija, nedavna meta-analiza donela je zaključak da postoji malo ali značajno smanjenje količine glutaciona u prednjem cingularnom korteksu kod obolelih u odnosu na zdravu kontrolu (Das i sar., 2018). Kao i kod rezultata *post mortem* ispitivanja, ostaje nerazjašnjeno da li su takve promene posledica samih patofizioloških procesa bolesti ili pridružene terapije antipsihoticima.

Dodatni dokazi o promenjenom metabolizmu glutaciona u shizofreniji proistekli su iz studija u kojima je utvrđena povezanost γ -glutamilcistein ligaze i shizofrenije.

Najpre, Tosic i sar. (2006) utvrdili su niže nivoe iRNK za modulatornu subjedinicu pomenutog enzima (GCLM) u fibroblastima obolelih u odnosu na zdravu kontrolu. Isti autori zapazili su i značajnu genetsku povezanost shizofrenije i dva polimorfizma pojedinačnog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) rs2301022 u intronu 1 i rs3170633 na 3' kraju gena za GCLM u dve geografski odvojene evropske populacije obolelih (Tosic i sar., 2006). Međutim, pomenuti polimorfizmi nisu pokazali značajnu povezanost sa shizofrenijom u populaciji obolelih iz Japana (Hanzawa i sar., 2011) i Kine (Che i sar., 2009). Ipak, nalazi jedne od ovih studija potvrdili su smanjenje ekspresije gena za GCLM kod obolelih na terapiji klozapinom u odnosu na kontrolu (Che i sar., 2009). Paralelno sa genetskom povezanošću modulatorne subjedinice GCL sa shizofrenijom, pojavili su se dokazi o značaju polimorfizama GAG trinukleotidnog ponovka u genu koji kodira katalitičku subjedinicu enzima (GCLC) (Gysin i sar., 2007). Naime, na 5' kraju ovog gena nalazi se 7, 8 ili 9 GAG ponovaka i pojedini genotipovi (7/8, 8/8, 8/9 i 9/9), označeni kao „visokorizični“, bili su značajno češći u populaciji obolelih. Dodatno, kod nosioca ovih genotipova utvrđeni su značajno niži nivoi GCLC proteina, niža GCL aktivnost, kao i smanjena količina glutaciona u fibroblastima (Gysin i sar., 2007) i narušen tiolni redoks status u plazmi (Gysin i sar., 2011). Takođe, analizom proteoma ćelijske kulture fibroblasta osoba sa „visokorizičnim“ genotipovima pokazano je da kada se ove ćelije izlože oksidativnom stresu primenom *tert*-butilhidrohinona dolazi do izraženih promena u ekspresiji niza proteina uključenih u energetske metabolizam, antioksidativnu zaštitu, organizaciju citoskeleta i regulaciju genske ekspresije (Gysin i sar., 2009). Nedavna studija Xin i sar. (2016) pokazala je postojanje povezanosti „visokorizičnih“ genotipova za GCLC gen sa sniženom količinom glutaciona u prefrontalnom korteksu izmerenom metodom ¹H-MRS.

Premda se dosadašnja istražavanja potencijalne uloge glutaciona u etiopatogenetskim procesima u shizofreniji zasnivaju na različitim metodološkim pristupima, može se izvesti zajednički zaključak – kod obolelih od shizofrenije, makar u jednoj subpopulaciji obolelih, postoji narušena homeostaza glutaciona što dovodi do

redoks disregulacije i predstavlja jedan od faktora vulnerabilnosti za shizofreniju. Postavlja se pitanje na koji način se može napraviti veza između glutationa i drugih hipoteza o etiopatogenezi shizofrenije

Drugi deo rezultata naše studije odnosi se na potencijalnu ulogu nitrozivnog stresa u patogenezi shizofrenije i značaju azot-monoksida u ovom oboljenju. Rezultati ukazuju da nakon perinatalne primene fenciklidina u mozgu eksperimentalnih životinja dolazi do dugoročnog smanjenje nitrita i nitrata kao produkata metabolizma azot-monoksida. Primena antipsihotika nije pokazala uticaj na ovaj efekat fenciklidina, sa izuzetkom efekta haloperidola u hipokampusu gde su zapažene neznatno više vrednosti nitrata i nitrita koje su, međutim, bile niže u odnosu na kontrolne vrednosti. Sa druge strane, fenciklidin nije pokazao uticaj na ekspresiju nijednog izoenzima azot-monoksid sintaze što ukazuje na to da je ukoliko postoji smanjena sinteza azot-monoksida ona posredovana drugim mehanizmima, a ne preko regulacije količine enzima. Dodatno, rezultati pokazuju da je haloperidol uzrokovao smanjenje ekspresije neuronalne azot-monoksid sintaze.

U studijama koje su kod obolelih od shizofrenije pratile koncentraciju azot-monoksida ili metabolita NO u krvi pacijenata mogu se naći različiti podaci. Naime, postoje suprotstavljeni rezultati o povećanju (Taneli i sar., 2004; Yilmaz i sar., 2007), kao i sniženju (Srivastava i sar., 2001; Nakano i sar., 2010) koncentracije NO, odnosno nitrita i nitrata u plazmi pacijenata. U meta analizi Maia-de-Oliveira i sar. (2012) nije uočena razlika u sadržaju nitrita u plazmi obolelih u odnosu na zdrave ispitanike, ali je pokazano da terapija antipsihoticima dovodi do povećanja nivoa NO. Sa druge strane, u studiji Ramirez i sar. (2004) zapaženo je smanjenje koncentracije NO u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih, što bi ukazivalo na smanjenu produkciju NO u mozgu pacijenata. Ovaj nalaz jeste u saglasnosti sa našim rezultatima koji takođe sugerišu smanjenje NO kao dugotrajnu posledicu perinatalnog tretmana PCP-om.

Nalazi na *post mortem* uzorcima pružaju dodatne dokaze o promjenjenoj produkciji NO u određenim regionima mozga kog obolelih (Yao i sar., 2004), iako ni ovde rezultati usaglašeni. Rezultati pojedinih autora ukazuju na povećanu ekspresiju nNOS u prefrontalnom korteksu (Baba i sar., 2004), ali postoje i oprečni rezultati (Xing i sar., 2002). Takođe, uočeno je smanjenje i morfološke promene NOS-pozitivnih interneurona u strijatumu obolelih (Lauer i sar., 2005; Fritzen i sar., 2007). Sa druge strane, u cerebelumu je pokazano povećanje broja Purkinjeovim ćelijama koje ekspimiraju NOS (Bernstein i sar., 2001). Uzevši u obzir nalaze ovih studija i ulogu koju NO igra kao sekundarni glasnik pri aktivaciji NMDA receptora, ali i pri neurotransmisiji posredovanoj drugim transmitterima, kao i drugim ulogama u CNS-u, poput formiranju sinapsi (Cooke i sar., 2013), regulaciji protoka krvi i dr. (Virarkar i sar., 2013), može se zaključiti da je makar za jedan deo patogenetskih procesa u shizofeniji odgovoran i narušen metabolizam NO. Tome u prilog govore i povoljni efekti na redukciju simptoma shizofrenije koje u pretkliničkim i kliničkim fazama ispitivanja ispoljavaju molekuli koji utiču na metabolizam NO (Pitsikas, 2015; Pitsikas, 2016).

U našoj studiji, dugotrajna oralna primena haloperidola uticala je na smanjenje ekspresije nNOS, za razliku od risperidona koji ovaj efekat nije uzrokovao. Ovaj rezultat je sličan nekim ranijim istraživanjima drugih autora (Nel i Harvey, 2003) koji ovakav efekat haloperidola posebno u strijatumu povezuju sa tardivnom diskinezijom kao neželjenim dejstvom primene tipičnih antipsihotika. Slično, studija Zhang i sar. (2012) ukazuje na smanjenje ekspresije nNOS u hipotalamusu i povezanosti ovog efekta sa seksualnom disfunkcijom koju terapija antipsihoticima izaziva.

Rezultati naše studije ukazuju da perinatalna primena fenciklidina dovodi do dugoročnog efekta povećanja ekspresije NADPH oksidaze u prefrontalnom korteksu i hipokampusu. Porast količine membranskih subjednica gp91^{phox} i p22^{phox}, kao i citosolne subjednice p67^{phox}, sugerišu povećano stvaranje superoksidnog anjona u

mozgu u uslovima rane izloženosti NMDA antagoniste fenciklidina i potvrđuju pretpostvaku o značaju redoks disregulacije u etiopatogenezi shizofrenije. Oba ispitivana antipsihotika efekat su ispoljila na ekspresiju membranskih komponenti NOX familije. Naime, nakon primene haloperidola i risperidona izostaje povećanje ekspresije NOX2 izoenzima, pri čemu haloperidol svoje dejstvo ostvaruje samo u korteksu, za razliku od risperidona koji je efekat pokazao u obe ispitivane strukture. Dodatno, upotreba oba antipsihotika dovela je do reverzije povećane ekspresije p22^{phox} nakon primene fenciklidina u hipokampusu.

Prvi dokazi o povezanosti NADPH oksidaze i shizofrenije potiču iz istraživanja na ketaminskom modelu shizofrenije i studije Behrens i sar. (2007) kojom je pokazano da ketamin dovodi do povećane ekspresije, kao i aktivnosti NADPH oksidaze *in vitro* na kulturi neurona, kao i *in vivo* u mozgu eksperimentalnih miševa i posledično povećava produkciju superoksidnog anjona što direktno uzrokuje smanjenje ekspresije GAD67 odgovornog za sintezu GABA u subpopulaciji parvalbumin-pozitivnih GABAergičkih interneurona, čija se disfunkcija smatra odgovornom za neurokognitivne defekte koji se viđaju u shizofreniji. Istovremeno, primenom inhibitora NOX apocinina ili SOD-mimetika ovaj efekat ketamina na PV-pozitivne interneurone izostaje. Dodatno, ista grupa autora pokazala je da svoje dejstvo na NOX2 ketamin ostvaruje prvenstveno posredstvom IL-6 (Behrens i sar., 2008). Opisani efekti ketamina kod adultnih životinja su reverzibilni (Behrens i sar., 2009). Sa druge strane, perinatalna primena NMDA antagonista dovodi do ireverzibilnog gubitka PV-pozitivnih interneurona i dugoročnih neurohemijskih i bihevioralnih promena, koje su dokumentovane od strane više autora, među ostalima i naše istraživačke grupe, što je u skladu sa neurorazvojnou hipotezom o shizofreniji (Stefani i Moghaddam, 2005; Wang i sar., 2008; Radonjić i sar., 2013). Behrens i Sejnowski (2009) sugerišu da repetitivna aktivacija IL-6/NOX2 puta i produkcija superoksidnog anjona uslovljena primenom NDMA antagonista tokom perinatalnog perioda u kome dolazi do maturacije PV-interneuronskih mreža vodi ka trajnoj disfunkciji inhibitornih krugova u mozgu i kognitivnih defekata karakterističnih

za shizofreniju. Naši rezultati, dodatno, govore u prilog tome da i sama disfunkcija NOX enzima perzistira tokom adultnog perioda nakon perinatalne primene fenciklidina i može biti odgovorna za dugotrajnu redoks disregulaciju u mozgu.

Uloga NOX enzima za normalnu strukturu i funkciju PV-pozitivnih interneurona u prefrontalnom korteksu pokazana je i u drugim modelima shizofrenije. U studiji Yuan i sar. (2015) pokazano je da intermitentna hipoksija dovodi do povećanja ekspresije gp91^{phox} (NOX2) što je praćeno gubitkom PV-pozitivnih interneurona kao i odgovarajućih bihejvioralnih promena, dok je taj efekat izostao kod *knock-out* miševa za *nox2* ili primenom apocinina kao inhibitora ovog enzima. Dodatno, povećana ekspresija NOX2 u korteksu očekivano je bila praćena povećanjem markera oksidativnog oštećenja lipida, poput HNE, i molekula DNK (Yuan i sar., 2015). U modelu na *knock-out* miševima za *shn2* gen koji kodira vezujući protein za nuklearni faktor- κ B, pokazane su bihejvioralne abnormalnosti karakteristične za shizofreniju i smanjenje parvalbumina u interneuronima u korteksu, kao i povećanje p22^{phox} subjedinice NOX familije (Takao i sar., 2015). S obzirom na ulogu koja membranska subjedinica p22^{phox} ima i u funkciji ostalih izoenzima NOX, izuzev NOX2, a u skladu i sa nalazima naše studije o promenjenoj ekspresiji ovog enzima u korteksu kao i hipokampusu, pretpostavka je da i drugi članovi NOX familije imaju značaja u etiopatogenezi shizofrenije, verovatno kroz preciznu regulaciju produkcije superoksidnih anjona i sledstvene redoks signalizacije u različitim delovima CNS-a, kao i pomoću drugih za sada nedovoljno jasnih mehanizama. Posebno je značajno da je u našoj studiji pokazan efekat antipsihotika na normalizaciju povećane ekspresije p22^{phox} u hipokampusu, efekat koji se ne može povezati sa kognitivnim defektom u shizofreniji s obzirom na činjenicu da ovi lekovi ne pokazuju značajno farmakološko dejstvo na kognitivne simptome. Rezultati našeg istraživanja sugerišu da bi povećana ekspresija p22^{phox} u hipokampusu mogla biti povezana sa pozitivnim simptomima u shizofreniji, iako postoji mogućnost da efekat antipsihotika na p22^{phox} nije povezan sa njihovim farmakološkim dejstvom na nivou dopaminskih receptora. Naime, pokazano je da

haloperidol ima sposobnost da inhibira voltažno-zavisne protonske kanale u mikroglijalnim ćelijama čija aktivnost je neophodna u generisanju superoksidnog anjona posredstvom NOX, kao i u produkciji proinflamatornih citokina, što delom može objasniti antioksidativni, a moguće i antiinflamatorni efekat, koji haloperidol pokazuje na nivou NOX enzima (Shin i Song, 2014), što potvrđuje i naše istraživanje. U grupi atipičnih antipsihotika, postoje dokazi u literaturi o efektu aripiprazola na smanjenje produkcije superoksidnog anjona posredstvom NOX2 u mikroglijji, mehanizmom koji uključuje inhibiciju translokaciju citosolne subjediniice p47^{phox} u aktivni membranski kompleks enzima NOX (Kato i sar., 2011). Sličan efekat zapažen je i u slučaju aktivnih metabolita klozapina, klozapin-N-oksida i N-desmetilklozapina, koji inhibirajući NOX-posredovano stvaranje ROS deluju neuroprotektivno (Jiang i sar., 2016). U našoj studiji, risperidon nije pokazao efekat na ispitivane citosolne subjediniice koje su ostale nepromenjene, odnosno u slučaju p47^{phox} na kontrolnim nivoima, dok je aktivnija subjediniica p67^{phox} bila povećano eksprimirana u obe moždane strukture nakon primene fenciklidina, kao i nakon upotrebe leka. Sa druge strane, risperidon je doveo do smanjena ekspresije membranskih subjediniica NOX familije. Sličan rezultat je zapažen i nakon primene ketamina (Ben-Azu i sar., 2018a)

6. ZAKLJUČCI

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

1. Perinatalna primena fenciklidina praćena je dugoročnim povećanjem lipidne peroksidacije u hipokampusu. Dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona ne utiče na oksidativno oštećenje lipida u korteksu i hipokampusu bez obzira na perinatalni tretman.
2. Perinatalna primena fenciklidina dovodi do dugoročnog smanjenja aktivnosti superoksid dizmutaze u korteksu i hipokampusu. Dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona dovodi do smanjenja aktivnosti superoksid dizmutaze u korteksu, a u slučaju risperidona i u hipokampusu bez obzira na perinatalni tretman. Smanjenje aktivnosti superoksid dizmutaze koje nastaje kao posledica perinatalnog tretmana PCP-om se ne zapaža u hipokampusu nakon primene haloperidola.
3. Efekti perinatalne primene fenciklidina i dugotrajne oralne primene antipsihotika na ekspresiju citosolnog izoenzima superoksid dizmutaze odgovaraju prethodno opisanim efektima na aktivnost ovog enzima. Na ekspresiju mitohondrijalnog izoenzima superoksid dizmutaze uticaj je imala samo dugotrajna oralna primena haloperidola koja je u obe ispitivane strukture dovela do smanjenja ekspresije.
4. Dugotrajna oralna upotreba oba antipsihotika dovodi do reverzije smanjenja ukupnog sadržaja glutaciona koje nastaje nakon perinatalnog tretmana PCP-om. Smanjen odnos redukovane i oksidovane forme koji nastaje kao posledica

perinatalne primene fenciklidina se održava nakon upotrebe haloperidola, dok risperidon uzrokuje normalizaciju ovog odnosa u hipokampusu.

5. Perinatalna primena fenciklidina dovodi do smanjenja aktivnosti glutation reduktaze u korteksu i hipokampusu. Sama primena oba antipsihotika ne utiče na aktivnost ovog enzima u ispitivanim strukturama mozga. Primena risperidona dovodi do reverzije smanjenja aktivnosti glutation reduktaze uzrokovanog perinatalnom primenom PCP-a.
6. Perinatalna primena fenciklidina i oba antipsihotika ne utiče na aktivnost glutation peroksidaze u korteksu. U hipokampusu perinatalna primena PCP-a dovodi do smanjenja aktivnosti ovog enzima, a haloperidol i risperidon dovode do reverzije zapaženih promena.
7. Dugotrajna oralna upotreba oba antipsihotika dovodi do normalizacije smanjenja aktivnosti γ -glutamylcistein ligaze koje nastaje nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom.
8. Perinatalna primena fenciklidina dovodi do smanjenja koncentracije metabolita azot-monoksida u obe ispitivane strukture mozga, a dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona ne utiče na ovaj parametar.
9. Perinatalna primena fenciklidina i dugotrajna primena risperidona ne utiču na ekspresiju ni jednog ispitivanog izoenzima NOS. Dugotrajna oralna primena haloperidola dovodi do smanjenja ekspresije NOS1 u obe ispitivane strukture mozga bez obzira na perinatalni tretman.
10. Perinatalna primena fenciklidina i dugotrajna primena risperidona ne utiču na aktivnost ispitivanih enzima respiratornog lanca u mozgu pacova. Dugotrajna

oralna primena haloperidola dovodi do smanjenja aktivnosti citohrom c oksidaze u korteksu, bez obzira na perinatalni tretman.

11. Perinatalna primena fenciklidina dovodi do dugoročnog povećanja ekspresije membranske subjedinice p22^{phox} NADPH oksidaze u obe ispitivane strukture mozga. Dugotrajna oralna primena oba antipsihotika je praćena povećanjem ekspresije ove subjedinice u korteksu, bez obzira na perinatalni tretman, dok u hipokampusu i haloperidol i risperidon dovode do normalizacije ekspresije p22^{phox} u pacova perinatalno tretiranih PCP-om.
12. Perinatalna primena fenciklidina dovodi do dugoročnog povećanja ekspresije membranske subjedinice gp91^{phox} NADPH oksidaze u obe ispitivane strukture mozga pacova. Primena haloperidola normalizuje ekspresiju gp91^{phox} u korteksu, a risperidona i u korteksu i u hipokampusu.
13. Dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona ne utiče na ekspresiju citosolne aktivišuće subjedinice p67^{phox} NADPH oksidaze. Povećana ekspresija p67^{phox} koja se zapaža u korteksu i hipokampusu kao dugoročna posledica perinatalne primene fenciklidina ostaje i nakon primene antipsihotika.
14. Perinatalni tretman fenciklidina i dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona ne utiču na ekspresiju citosolne organizatorske subjedinice p47^{phox} NADPH oksidaze u korteksu i hipokampusu.
15. Povećanje ekspresije membranskih i citosolnih subjedinica NADPH oksidaze uz normalnu aktivnost ispitivanih enzima respiratornog lanca ukazuje da ovaj enzim može biti glavni izvor povećanog stvaranja slobodnih radikala i potencijalna meta za razvoj novih terapijskih strategija u lečenju shizofrenije.

16. Sama dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona ne izaziva oksidativni stres u mozgu pacova, a nakon perinatalnog tretmana PCP-om pokazuje i određene antioksidativne efekte. Oba ispitivana leka imaju slično dejstvo, izuzev uticaja na neuronalnu azot-monoksid sintazu, mitohondrijalnu superoksid dizmutazu i citohrom c oksidazu što može biti uzrok različitog profila neželjenih dejstava ovih lekova.

7. LITERATURA

Abdalla, D.S., Monteiro, H.P., Oliveira, J.A., Bechara, E.J. (1986). Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. *Clinical Chemistry*, 32(5), 805-807.

Abi-Dargham, A., Grace, A.A. (2011). *Dopamin and schizophrenia*. U: Weinberger, D.R., Harrison, P.J., ed., *Schizophrenia*, 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 413-432.

Aizenman, E., Hartnett, K.A., Reynolds, I.J. (1990). Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron*, 5(6), 841-846.

Aizenman, E., Lipton, S.A., Loring, R.H. (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron*, 2(3), 1257-1263.

Al-Asmari, A.K., Khan, M.W. (2014). Inflammation and schizophrenia: Alterations in cytokine levels and perturbation in antioxidative defense systems. *Human and Experimental Toxicology*, 33(2), 115-122.

Al-Chalabi, B.M., Thanoon, I.A., Ahmed, F.A. (2009). Potential effect of olanzapine on total antioxidant status and lipid peroxidation in schizophrenic patients. *Neuropsychobiology*, 59(1), 8-11.

Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(Pt 3), 593-615.

Altuntas, I., Aksoy, H., Coskun, I., Caykoylu, A., Akcay, F. (2000). Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(12), 1277-1281.

An, H., Du, X., Huang, X., Qi, L., Jia, Q., Yin, G., Xiao, C., Huang, X.F., Ning, Y., Cassidy, R.M., Wang, L., Soares, J.C., Zhang, X.Y. (2018). Obesity, altered oxidative stress, and clinical correlates in chronic schizophrenia patients. *Transl Psychiatry*, 8(1), 258.

Andreazza, A.C., Barakauskas, V.E., Fazeli, S., Feresten, A., Shao, L., Wei, V., Wu, C.H., Barr, A.M., Beasley, C.L. (2015). Effects of haloperidol and clozapine administration on oxidative stress in rat brain, liver and serum. *Neuroscience Letters*, 591, 36-40.

Asevedo, E., Gadelha, A., Noto, C., Mansur, R.B., Zugman, A., Belangero, S.I., Berberian, A.A., Scarpato, B.S., Leclerc, E., Teixeira, A.L., Gama, C.S., Bressan, R.A., Brietzke, E. (2013). Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 47(10), 1376-1382.

Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., Luheshi, G.N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: Implications for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 47-55.

Baba, H., Suzuki, T., Arai, H., Emson, P.C. (2004). Expression of nNOS and soluble guanylate cyclase in schizophrenic brain. *Neuroreport*, 15(4), 677-680.

Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *Journal of Clinical Investigation*, 52(3), 741-744.

Bai, Z.L., Li, X.S., Chen, G.Y., Du, Y., Wei, Z.X., Chen, X., Zheng, G.E., Deng, W., Cheng, Y. (2018). Serum oxidative stress marker levels in unmedicated and medicated patients with schizophrenia. *Journal of Molecular Neuroscience*, 66(3), 428-436.

Ballesteros, A., Jiang, P., Summerfelt, A., Du, X., Chiappelli, J., O'Donnell, P., Kochunov, P., Hong, L.E. (2013). No evidence of exogenous origin for the abnormal glutathione redox state in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 146(1-3), 184-189.

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Kozyreva, T., Massagni, C., Palumaa, P., Rubino, J.T., Zovo, K. (2012). Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13555-13560.

Banerjee, A., Wang, H.Y., Borgmann-Winter, K.E., MacDonald, M.L., Kaprielian, H., Stucky, A., Kvasic, J., Egbujo, C., Ray, R., Talbot, K., Hemby, S.E., Siegel, S.J., Arnold, S.E., Sleiman, P., Chang, X., Hakonarson, H., Gur, R.E., Hahn, C.G. (2015). Src kinase as a mediator of convergent molecular abnormalities leading to NMDAR hypoactivity in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20(9), 1091-1100.

Baumann, P.S., Griffa, A., Fournier, M., Golay, P., Ferrari, C., Alameda, L., Cuenod, M., Thiran, J.P., Hagmann, P., Do, K.Q., Conus, P. (2016). Impaired fornix-hippocampus integrity is linked to peripheral glutathione peroxidase in early psychosis. *Transl Psychiatry*, 6(7), e859.

Bedard, K., Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245-313.

Beers, R.F., Jr., Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133-140.

Behrens, M.M., Ali, S.S., Dao, D.N., Lucero, J., Shekhtman, G., Quick, K.L., Dugan, L.L. (2007). Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science*, 318(5856), 1645-1647.

Behrens, M.M., Ali, S.S., Dugan, L.L. (2008). Interleukin-6 mediates the increase in NADPH-oxidase in the ketamine model of schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, 28(51), 13957-13966.

Behrens, M.M., Sejnowski, T.J. (2009). Does schizophrenia arise from oxidative dysregulation of parvalbumin-interneurons in the developing cortex? *Neuropharmacology*, 57(3), 193-200.

Ben Othmen, L., Mechri, A., Fendri, C., Bost, M., Chazot, G., Gaha, L., Kerkeni, A. (2008). Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(1), 155-159.

Ben-Azu, B., Aderibigbe, A.O., Eneni, A.O., Ajayi, A.M., Umukoro, S., Iwalewa, E.O. (2018). Morin attenuates neurochemical changes and increased oxidative/nitrergic stress in brains of mice exposed to ketamine: Prevention and reversal of schizophrenia-like symptoms. *Neurochemical Research*, 43(9), 1745-1755.

Ben-Azu, B., Omogbiya, I.A., Aderibigbe, A.O., Umukoro, S., Ajayi, A.M., Iwalewa, E.O. (2018). Doxycycline prevents and reverses schizophrenic-like behaviors induced by ketamine in mice via modulation of oxidative, nitrergic and cholinergic pathways. *Brain Research Bulletin*, 139, 114-124.

Bernstein, H.G., Bogerts, B., Keilhoff, G. (2005). The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophrenia Research*, 78(1), 69-86.

Bey, T., Patel, A. (2007). Phencyclidine intoxication and adverse effects: A clinical and pharmacological review of an illicit drug. *California Journal of Emergency Medicine*, 8(1), 9-14.

- Bernstein, H.G., Krell, D., Braunewell, K.H., Baumann, B., Gundelfinger, E.D., Diekmann, S., Danos, P., Bogerts, B. (2001). Increased number of nitric oxide synthase immunoreactive Purkinje cells and dentate nucleus neurons in schizophrenia. *Journal of Neurocytology*, 30(8), 661-670.
- Boskovic, M., Grabnar, I., Terzic, T., Kores Plesnicar, B., Vovk, T. (2013). Oxidative stress in schizophrenia patients treated with long-acting haloperidol decanoate. *Psychiatry Research*, 210(3), 761-768.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brand, M.D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 14-31.
- Brigelius-Flohe, R., Flohe, L. (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(8), 2335-2381.
- Brigelius-Flohe, R., Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3289-3303.
- Brown, A.S. (2006). Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 32(2), 200-202.
- Brown, D.I., Griending, K.K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9), 1239-1253.
- Brown, G.C. (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1504(1), 46-57.

Bubenikova-Valesova, V., Horacek, J., Vrajova, M., Hoschl, C. (2008). Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(5), 1014-1023.

Buckman, T.D., Kling, A., Sutphin, M.S., Steinberg, A., Eiduson, S. (1990). Platelet glutathione peroxidase and monoamine oxidase activity in schizophrenics with CT scan abnormalities: Relation to psychosocial variables. *Psychiatry Research*, 31(1), 1-14.

Buckman, T.D., Kling, A.S., Eiduson, S., Sutphin, M.S., Steinberg, A. (1987). Glutathione peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 22(11), 1349-1356.

Cannon, M., Jones, P.B., Murray, R.M. (2002). Obstetric complications and schizophrenia: Historical and meta-analytic review. *American Journal of Psychiatry*, 159(7), 1080-1092.

Cardno, A.G., Gottesman, II. (2000). Twin studies of schizophrenia: From bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *American Journal of Medical Genetics*, 97(1), 12-17.

Carlberg, I., Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490.

Charlson, F.J., Ferrari, A.J., Santomauro, D.F., Diminic, S., Stockings, E., Scott, J.G., McGrath, J.J., Whiteford, H.A. (2018). Global epidemiology and burden of schizophrenia: Findings from the global burden of disease study 2016. *Schizophrenia Bulletin*, 44(6), 1195-1203.

Chattopadhyay, M., Valentine, J.S. (2009). Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1603-1614.

Che, R., Tang, W., Shao, L., Zhao, Q., Huang, K., Tang, R., Li, Z., Zhao, X., Ji, W., Zhou, G., Feng, G., He, L., Shi, Y. (2009). Association and expression studies of glutamate-cysteine ligase modifier (GCLM) and schizophrenia in the Chinese Han population. *Psychiatric Genetics*, 19(5), 279-280.

Chen, Y., Shertzer, H.G., Schneider, S.N., Nebert, D.W., Dalton, T.P. (2005). Glutamate cysteine ligase catalysis: Dependence on atp and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33766-33774.

Choi, Y.B., Lipton, S.A. (2000). Redox modulation of the NMDA receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(11), 1535-1541.

Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A., Brecht, D.S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27467-27473.

Conrad, A.J., Abebe, T., Austin, R., Forsythe, S., Scheibel, A.B. (1991). Hippocampal pyramidal cell disarray in schizophrenia as a bilateral phenomenon. *Archives of General Psychiatry*, 48(5), 413-417.

Cooke, R.M., Mistry, R., Challiss, R.A., Straub, V.A. (2013). Nitric oxide synthesis and cGMP production is important for neurite growth and synapse remodeling after axotomy. *Journal of Neuroscience*, 33(13), 5626-5637.

Copin, J.C., Gasche, Y., Chan, P.H. (2000). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1571-1576.

Coughlin, J.M., Hayes, L.N., Tanaka, T., Xiao, M., Yolken, R.H., Worley, P., Leweke, F.M., Sawa, A. (2017). Reduced superoxide dismutase-1 (SOD1) in cerebrospinal fluid

of patients with early psychosis in association with clinical features. *Schizophrenia Research*, 183, 64-69.

Coughlin, J.M., Ishizuka, K., Kano, S.I., Edwards, J.A., Seifuddin, F.T., Shimano, M.A., Daley, E.L., Zandi, P.P., Leweke, F.M., Cascella, N.G., Pomper, M.G., Yolken, R.H., Sawa, A. (2013). Marked reduction of soluble superoxide dismutase-1 (SOD1) in cerebrospinal fluid of patients with recent-onset schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 18(1), 10-11.

Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327-335.

Dadhech, G., Mishra, S., Gautam, S., Sharma, P. (2008). Evaluation of antioxidant deficit in schizophrenia. *Indian Journal of Psychiatry*, 50(1), 16-20.

Dai, D.F., Hsieh, E.J., Liu, Y., Chen, T., Beyer, R.P., Chin, M.T., MacCoss, M.J., Rabinovitch, P.S. (2012). Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: The role of mitochondrial oxidative stress. *Cardiovascular Research*, 93(1), 79-88.

Dakhale, G., Khanzode, S., Khanzode, S., Saoji, A., Khobragade, L., Turankar, A. (2004). Oxidative damage and schizophrenia: The potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology*, 49(4), 205-209.

Dakhale, G.N., Khanzode, S.D., Khanzode, S.S., Saoji, A. (2005). Supplementation of vitamin C with atypical antipsychotics reduces oxidative stress and improves the outcome of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 182(4), 494-498.

Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Yang, Y., Shertzer, H.G., Nebert, D.W. (2000). Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (gclc) gene: Embryonic lethal when

homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 324-329.

Das, T.K., Javadzadeh, A., Dey, A., Sabesan, P., Theberge, J., Radua, J., Palaniyappan, L. (2019). Antioxidant defense in schizophrenia and bipolar disorder: A meta-analysis of MRS studies of anterior cingulate glutathione. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 91, 94-102.

Davies, G., Welham, J., Chant, D., Torrey, E.F., McGrath, J. (2003). A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 29(3), 587-593.

de Kluiver, H., Buizer-Voskamp, J.E., Dolan, C.V., Boomsma, D.I. (2017). Paternal age and psychiatric disorders: A review. *American Journal of Medical Genetics. Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 174(3), 202-213.

Demirci, K., Ozcankaya, R., Yilmaz, H.R., Yigit, A., Uguz, A.C., Karakus, K., Demirdas, A., Akpınar, A. (2015). Paliperidone regulates intracellular redox system in rat brain: Role of purine mechanism. *Redox Rep*, 20(4), 170-176.

Devanarayanan, S., Nandeesh, H., Kattimani, S., Sarkar, S. (2016). Relationship between matrix metalloproteinase-9 and oxidative stress in drug-free male schizophrenia: A case control study. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(3), 447-452.

Dietrich-Muszalska, A., Kolinska-Lukaszuk, J. (2018). Comparative effects of aripiprazole and selected antipsychotic drugs on lipid peroxidation in plasma. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72(5), 329-336.

Dietrich-Muszalska, A., Kopka, J., Kwiatkowska, A. (2013). The effects of ziprasidone, clozapine and haloperidol on lipid peroxidation in human plasma (in vitro): Comparison. *Neurochemical Research*, 38(7), 1490-1495.

Dietrich-Muszalska, A., Kwiatkowska, A. (2014). Generation of superoxide anion radicals and platelet glutathione peroxidase activity in patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 703-709.

Dietrich-Muszalska, A., Olas, B. (2009). Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World Journal of Biological Psychiatry*, 10(1), 27-33.

Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., Rabe-Jablonska, J. (2005). Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets*, 16(7), 386-391.

Do, K.Q., Trabesinger, A.H., Kirsten-Kruger, M., Lauer, C.J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., Cuenod, M. (2000). Schizophrenia: Glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3721-3728.

Dordevic, V.V., Lazarevic, D., Cosic, V., Knezevic, M., Dordevic, V.B. (2017). Age-related changes of superoxide dismutase activity in patients with schizophrenia. *Vojnosanitetski Pregled*, 74(1), 31-37.

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62(6), 649-671.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.

D'Souza, B., D'Souza, V. (2003). Oxidative injury and antioxidant vitamins E and C in schizophrenia. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 18(1), 87-90.

Eastwood, S.L., Cairns, N.J., Harrison, P.J. (2000). Synaptophysin gene expression in schizophrenia. Investigation of synaptic pathology in the cerebral cortex. *British Journal of Psychiatry*, 176, 236-242.

Edgar, P.F., Douglas, J.E., Cooper, G.J., Dean, B., Kydd, R., Faull, R.L. (2000). Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 5(1), 85-90.

El-Sayed El-Sisi, A., Sokkar, S.S., El-Sayed El-Sayad, M., Sayed Ramadan, E., Osman, E.Y. (2016). Celecoxib and omega-3 fatty acids alone and in combination with risperidone affect the behavior and brain biochemistry in amphetamine-induced model of schizophrenia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82, 425-431.

Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.

Fabbri, C., Serretti, A. (2017). Role of 108 schizophrenia-associated loci in modulating psychopathological dimensions in schizophrenia and bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 174(7), 757-764.

Farde, L., Wiesel, F.A., Nordstrom, A.L., Sedvall, G. (1989). D1- and D2-dopamine receptor occupancy during treatment with conventional and atypical neuroleptics. *Psychopharmacology*, 99 Suppl, S28-31.

Farrell, M.S., Werge, T., Sklar, P., Owen, M.J., Ophoff, R.A., O'Donovan, M.C., Corvin, A., Cichon, S., Sullivan, P.F. (2015). Evaluating historical candidate genes for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20(5), 555-562.

Figueira, T.R., Barros, M.H., Camargo, A.A., Castilho, R.F., Ferreira, J.C., Kowaltowski, A.J., Sluse, F.E., Souza-Pinto, N.C., Vercesi, A.E. (2013). Mitochondria as a source of

reactive oxygen and nitrogen species: From molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal*, 18(16), 2029-2074.

Flatow, J., Buckley, P., Miller, B.J. (2013). Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 74(6), 400-409.

Flohe, L., Gunzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114-121.

Fraguas, D., Diaz-Caneja, C.M., Rodriguez-Quiroga, A., Arango, C. (2017). Oxidative stress and inflammation in early onset first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(6), 435-444.

Fritzen, S., Lauer, M., Schmitt, A., Topner, T., Strobel, A., Lesch, K.P., Reif, A. (2007). NO synthase-positive striatal interneurons are decreased in schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, 17(9), 595-599.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376.

Gama, C.S., Salvador, M., Andreatza, A.C., Kapczinski, F., Silva Belmonte-de-Abreu, P. (2006). Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: A study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(3), 512-515.

Garcia-Gimenez, J.L., Markovic, J., Dasi, F., Queval, G., Schnaubelt, D., Foyer, C.H., Pallardo, F.V. (2013). Nuclear glutathione. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3304-3316.

Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336(6197), 385-388.

Gawryluk, J.W., Wang, J.F., Andreatza, A.C., Shao, L., Young, L.T. (2011). Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(1), 123-130.

Geddes, J.R., Stroup, T.S., Lieberman, J.A. (2011). *Comparative efficacy and effectiveness in the drug treatment of schizophrenia*. U: Weinberger, D.R., Harrison, P.J., ed., *Schizophrenia*, 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 525–539.

Geiszt, M. (2006). NADPH oxidases: New kids on the block. *Cardiovascular Research*, 71(2), 289-299.

Gereau, R.W., Swanson, G.T. (2008). *The glutamate receptors*. New Jersey: Humana Press.

Ghaderi, A., Banafshe, H.R., Mirhosseini, N., Moradi, M., Karimi, M.A., Mehrzad, F., Bahmani, F., Asemi, Z. (2019). Clinical and metabolic response to vitamin D plus probiotic in schizophrenia patients. *BMC Psychiatry*, 19(1), 77.

Gigante, A.D., Andreatza, A.C., Lafer, B., Yatham, L.N., Beasley, C.L., Young, L.T. (2011). Decreased mRNA expression of uncoupling protein 2, a mitochondrial proton transporter, in post-mortem prefrontal cortex from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 505(1), 47-51.

Girouard, H., Wang, G., Gallo, E.F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V.M., Iadecola, C. (2009). NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *Journal of Neuroscience*, 29(8), 2545-2552.

Go, Y.M., Jones, D.P. (2013). Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(2), 173-181.

Gonzalez-Blanco, L., Garcia-Portilla, M.P., Garcia-Alvarez, L., de la Fuente-Tomas, L., Iglesias Garcia, C., Saiz, P.A., Rodriguez-Gonzalez, S., Coto-Montes, A., Bobes, J. (2018). Oxidative stress biomarkers and clinical dimensions in first 10 years of schizophrenia. *Rev Psiquiatr Salud Ment*, 11(3), 130-140.

Gonzalez-Liencre, C., Tas, C., Brown, E.C., Erdin, S., Onur, E., Cubukcoglu, Z., Aydemir, O., Esen-Danaci, A., Brune, M. (2014). Oxidative stress in schizophrenia: A case-control study on the effects on social cognition and neurocognition. *BMC Psychiatry*, 14, 268.

Goth, L., Nagy, T. (2013). Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age related disorders? *Mutation Research*, 753(2), 147-154.

Gottesman, II. (1994). Complications to the complex inheritance of schizophrenia. *Clinical Genetics*, 46(1 Spec No), 116-123.

Gray, S.P., Jandeleit-Dahm, K.A. (2015). The role of NADPH oxidase in vascular disease – hypertension, atherosclerosis & stroke. *Current Pharmaceutical Design*, 21(41), 5933-5944.

Gunes, M., Camkurt, M.A., Bulut, M., Demir, S., Ibiloglu, A.O., Kaya, M.C., Atli, A., Kaplan, I., Sir, A. (2016). Evaluation of paraoxonase, arylesterase and malondialdehyde levels in schizophrenia patients taking typical, atypical and combined antipsychotic treatment. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 14(4), 345-350.

Gysin, R., Kraftsik, R., Boulat, O., Bovet, P., Conus, P., Comte-Krieger, E., Polari, A., Steullet, P., Preisig, M., Teichmann, T., Cuenod, M., Do, K.Q. (2011). Genetic dysregulation of glutathione synthesis predicts alteration of plasma thiol redox status in schizophrenia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 2003-2010.

Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tosic, M., Werge, T., Cuenod, M., Do, K.Q. (2007). Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: Convergent genetic and functional evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42), 16621-16626.

Gysin, R., Riederer, I.M., Cuenod, M., Do, K.Q., Riederer, B.M. (2009). Skin fibroblast model to study an impaired glutathione synthesis: Consequences of a genetic polymorphism on the proteome. *Brain Research Bulletin*, 79(1), 46-52.

Hajos, N., Palhalmi, J., Mann, E.O., Nemeth, B., Paulsen, O., Freund, T.F. (2004). Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro. *Journal of Neuroscience*, 24(41), 9127-9137.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*, 5th ed. Oxford: University Press.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231-255.

Hanzawa, R., Ohnuma, T., Nagai, Y., Shibata, N., Maeshima, H., Baba, H., Hatano, T., Takebayashi, Y., Hotta, Y., Kitazawa, M., Arai, H. (2011). No association between glutathione-synthesis-related genes and japanese schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 65(1), 39-46.

Harrison, P.J. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122 (Pt 4), 593-624.

Harrison, P.J. (2004). The hippocampus in schizophrenia: A review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology*, 174(1), 151-162.

Hashimoto, K., Malchow, B., Falkai, P., Schmitt, A. (2013). Glutamate modulators as potential therapeutic drugs in schizophrenia and affective disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 263(5), 367-377.

Haukvik, U.K., Hartberg, C.B., Agartz, I. (2013). Schizophrenia – what does structural MRI show? *Tidsskrift for den Norske Laegeforening*, 133(8), 850-853.

Hayyan, M., Hashim, M.A., AlNashef, I.M. (2016). Superoxide ion: Generation and chemical implications. *Chemical Reviews*, 116(5), 3029-3085.

Heikkila, R.E., Cabbat, F.S., Cohen, G. (1976). In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *Journal of Biological Chemistry*, 251(7), 2182-2185.

Hendouei, N., Farnia, S., Mohseni, F., Salehi, A., Bagheri, M., Shadfar, F., Barzegar, F., Hoseini, S.D., Charati, J.Y., Shaki, F. (2018). Alterations in oxidative stress markers and its correlation with clinical findings in schizophrenic patients consuming perphenazine, clozapine and risperidone. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103, 965-972.

Herken, H., Uz, E., Ozyurt, H., Sogut, S., Virit, O., Akyol, O. (2001). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 66-73.

Hess, H.H., Pope, A. (1953). Ultramicrospectrophotometric determination of cytochrome oxidase for quantitative histochemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 204(1), 295-306.

Ho, Y.S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., Ho, D.S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32804-32812.

Hoffer, A., Osmond, H., Smythies, J. (1954). Schizophrenia; a new approach. II. Result of a year's research. *J Ment Sci*, 100(418), 29-45.

Hou, Y., Zhang, H., Xie, G., Cao, X., Zhao, Y., Liu, Y., Mao, Z., Yang, J., Wu, C. (2013). Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, 107-116.

Howes, O.D., Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III – the final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 549-562.

Huang, T.L., Liou, C.W., Lin, T.K. (2010). Serum thiobarbituric acid-reactive substances and free thiol levels in schizophrenia patients: Effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Research*, 177(1-2), 18-21.

Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovskaja, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283(5398), 70-74.

Insel, T.R. (2010). Rethinking schizophrenia. *Nature*, 468(7321), 187-193.

Ivanova, S.A., Smirnova, L.P., Shchigoreva, Y.G., Semke, A.V., Bokhan, N.A. (2015). Serum glutathione in patients with schizophrenia in dynamics of antipsychotic therapy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(2), 283-285.

Ivashchenko, O., Van Veldhoven, P.P., Brees, C., Ho, Y.S., Terlecky, S.R., Fransen, M. (2011). Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: Oxidative stress and interorganellar cross-talk. *Molecular Biology of the Cell*, 22(9), 1440-1451.

Jaaskelainen, E., Juola, P., Hirvonen, N., McGrath, J.J., Saha, S., Isohanni, M., Veijola, J., Miettunen, J. (2013). A systematic review and meta-analysis of recovery in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 39(6), 1296-1306.

Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T., Stoltenborg-Hogenkamp, B.J., Rodenburg, R.J. (2007). Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clinical Chemistry*, 53(4), 729-734.

Jašović Gašić M., Marić N. (2007). *Shizofrenija*. U: Jašović Gašić M., Lečić Toševski D., ured., *Psihijatrija, udžbenik za studente medicine*, prvo izdanje. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu CIBID, 113–129.

Javitt, D.C. (2004). Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 9(11), 984-997.

Javitt, D.C., Duncan, L., Balla, A., Sershen, H. (2005). Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: Implications for mechanisms of action. *Molecular Psychiatry*, 10(3), 275-287.

Javitt, D.C., Laruelle M. (2006). *Neurochemical theories*. U: Lieberman, J.A., Stroup, T.S., Perkins, D.O., ed., *Textbook of schizophrenia*, 1st ed. Washington DC: The American Psychiatric Publishing, 85–116.

Jentsch, J.D., Roth, R.H. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: From NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20(3), 201-225.

Jiang, L., Wu, X., Wang, S., Chen, S.H., Zhou, H., Wilson, B., Jin, C.Y., Lu, R.B., Xie, K., Wang, Q., Hong, J.S. (2016). Clozapine metabolites protect dopaminergic neurons

through inhibition of microglial NADPH oxidase. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 110.

Jordan, W., Dobrowolny, H., Bahn, S., Bernstein, H.G., Brigadski, T., Frodl, T., Isermann, B., Lessmann, V., Pilz, J., Rodenbeck, A., Schiltz, K., Schwedhelm, E., Tumani, H., Wiltfang, J., Guest, P.C., Steiner, J. (2018). Oxidative stress in drug-naive first episode patients with schizophrenia and major depression: Effects of disease acuity and potential confounders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 268(2), 129-143.

Karakas, E., Regan, M.C., Furukawa, H. (2015). Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(6), 328-337.

Kartalci, S., Karabulut, A.B., Ozcan, A.C., Porgali, E., Unal, S. (2011). Acute and chronic effects of electroconvulsive treatment on oxidative parameters in schizophrenia patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(7), 1689-1694.

Kato, T.A., Monji, A., Yasukawa, K., Mizoguchi, Y., Horikawa, H., Seki, Y., Hashioka, S., Han, Y.H., Kasai, M., Sonoda, N., Hirata, E., Maeda, Y., Inoguchi, T., Utsumi, H., Kanba, S. (2011). Aripiprazole inhibits superoxide generation from phorbol-myristate-acetate (PMA)-stimulated microglia in vitro: Implication for antioxidative psychotropic actions via microglia. *Schizophrenia Research*, 129(2-3), 172-182.

Keshavan, M.S., Gilbert, A.R., Diwadkar, V.A. *Neurodevelopmental theories*. U: Lieberman, J.A., Stroup, T.S., Perkins, D.O., ed., *Textbook of schizophrenia*, 1st ed. Washington DC: The American Psychiatric Publishing, 187-83.

Khan, M.M., Evans, D.R., Gunna, V., Scheffer, R.E., Parikh, V.V., Mahadik, S.P. (2002). Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in

schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research*, 58(1), 1-10.

Khandaker, G.M., Zimbron, J., Lewis, G., Jones, P.B. (2013). Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: A systematic review of population-based studies. *Psychological Medicine*, 43(2), 239–257.

Khashan, A.S., Abel, K.M., McNamee, R., Pedersen, M.G., Webb, R.T., Baker, P.N., Kenny, L.C., Mortensen, P.B. (2008). Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Archives of General Psychiatry*, 65(2), 146-152.

Kim, S.H., Won, S.J., Sohn, S., Kwon, H.J., Lee, J.Y., Park, J.H., Gwag, B.J. (2002). Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *Journal of Cell Biology*, 159(5), 821-831.

Kishida, K.T., Pao, M., Holland, S.M., Klann, E. (2005). NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *Journal of Neurochemistry*, 94(2), 299-306.

Knowles, R.G., Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298 (Pt 2), 249-258.

Kobayashi, M., Sugiyama, H., Wang, D.H., Toda, N., Maeshima, Y., Yamasaki, Y., Masuoka, N., Yamada, M., Kira, S., Makino, H. (2005). Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. *Kidney International*, 68(3), 1018-1031.

Krause, K.H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57(5), S28-29.

Kropp, S., Kern, V., Lange, K., Degner, D., Hajak, G., Kornhuber, J., Ruther, E., Emrich, H.M., Schneider, U., Bleich, S. (2005). Oxidative stress during treatment with first- and second-generation antipsychotics. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 17(2), 227-231.

Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers, M.B., Jr., Charney, D.S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry*, 51(3), 199-214.

Kuloglu, M., Ustundag, B., Atmaca, M., Canatan, H., Tezcan, A.E., Cinkilinc, N. (2002). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochemistry and Function*, 20(2), 171-175.

Kunz, M., Gama, C.S., Andreazza, A.C., Salvador, M., Cereser, K.M., Gomes, F.A., Belmonte-de-Abreu, P.S., Berk, M., Kapczinski, F. (2008). Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(7), 1677-1681.

Lahti, A.C., Weiler, M.A., Tamara Michaelidis, B.A., Parwani, A., Tamminga, C.A. (2001). Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 25(4), 455-467.

Lambert, A.J., Brand, M.D. (2009). Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods in Molecular Biology*, 554, 165-181.

Lane, H.Y., Huang, C.L., Wu, P.L., Liu, Y.C., Chang, Y.C., Lin, P.Y., Chen, P.W., Tsai, G. (2006). Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 60(6), 645-649.

Langbein, K., Hesse, J., Gussew, A., Milleit, B., Lavoie, S., Amminger, G.P., Gaser, C., Wagner, G., Reichenbach, J.R., Hipler, U.C., Winter, D., Smesny, S. (2018). Disturbed glutathione antioxidative defense is associated with structural brain changes in neuroleptic-naive first-episode psychosis patients. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 136, 103-110.

Lash, L.H. (2006). Mitochondrial glutathione transport: Physiological, pathological and toxicological implications. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1-2), 54-67.

Lauer, M., Johannes, S., Fritzen, S., Senitz, D., Riederer, P., Reif, A. (2005).

Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. *Neuropsychobiology*, 52(3), 111-117.

Laursen, T.M., Nordentoft, M., Mortensen, P.B. (2014). Excess early mortality in schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology*, 10, 425-448.

Lavoie, S., Berger, M., Schlogelhofer, M., Schafer, M.R., Rice, S., Kim, S.W., Hesse, J., McGorry, P.D., Smesny, S., Amminger, G.P. (2017). Erythrocyte glutathione levels as long-term predictor of transition to psychosis. *Transl Psychiatry*, 7(3), e1064.

Lee, E.E., Eyler, L.T., Wolkowitz, O.M., Martin, A.S., Reuter, C., Kraemer, H., Jeste, D.V. (2016). Elevated plasma F2-isoprostane levels in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 176(2-3), 320-326.

Li, H.C., Chen, Q.Z., Ma, Y., Zhou, J.F. (2006). Imbalanced free radicals and antioxidant defense systems in schizophrenia: A comparative study. *J Zhejiang Univ Sci B*, 7(12), 981-986.

Li, X.F., Zheng, Y.L., Xiu, M.H., Chen, D.C., Kosten, T.R., Zhang, X.Y. (2011). Reduced plasma total antioxidant status in first-episode drug-naive patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(4), 1064-1067.

Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C., Epstein, C.J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 11(4), 376-381.

Lin, D., Lee, H.G., Liu, Q., Perry, G., Smith, M.A., Sayre, L.M. (2005). 4-oxo-2-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-2-nonenal. *Chemical Research in Toxicology*, 18(8), 1219-1231.

Lindenmayer, J., Khan, A. (2006). *Psychopatology*. U: Lieberman, J.A., Stroup, T.S., Perkins, D.O., ed., *Textbook of schizophrenia*, 1st ed. Washington DC: The American Psychiatric Publishing, 187–221.

Lodge, D., Mercier, M.S. (2015). Ketamine and phencyclidine: The good, the bad and the unexpected. *British Journal of Pharmacology*, 172(17), 4254-4276.

Loven, D.P., James, J.F., Biggs, L., Little, K.Y. (1996). Increased manganese-superoxide dismutase activity in postmortem brain from neuroleptic-treated psychotic patients. *Biological Psychiatry*, 40(3), 230-232.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 42-59.

Ma, M.W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K.M., Vadlamudi, R.K., Brann, D.W. (2017). NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 7.

MacDowell, K.S., Pinacho, R., Leza, J.C., Costa, J., Ramos, B., Garcia-Bueno, B. (2017). Differential regulation of the TLR4 signalling pathway in post-mortem prefrontal cortex

and cerebellum in chronic schizophrenia: Relationship with SP transcription factors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 79(Pt B), 481-492.

Maia-de-Oliveira, J.P., Trzesniak, C., Oliveira, I.R., Kempton, M.J., Rezende, T.M., Iego, S., Baker, G.B., Dursun, S.M., Machado-de-Sousa, J.P., Hallak, J.E. (2012). Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Braz J Psychiatry*, 34 Suppl 2(S149-155).

Malhotra, A.K., Pinals, D.A., Adler, C.M., Elman, I., Clifton, A., Pickar, D., Breier, A. (1997). Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*, 17(3), 141-150.

Malhotra, A.K., Pinals, D.A., Weingartner, H., Sirocco, K., Missar, C.D., Pickar, D., Breier, A. (1996). NMDA receptor function and human cognition: The effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 14(5), 301-307.

Matsuzawa, D., Obata, T., Shirayama, Y., Nonaka, H., Kanazawa, Y., Yoshitome, E., Takanashi, J., Matsuda, T., Shimizu, E., Ikehira, H., Iyo, M., Hashimoto, K. (2008). Negative correlation between brain glutathione level and negative symptoms in schizophrenia: A 3T 1H-MRS study. *PloS One*, 3(4), e1944.

Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), 261-263.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

McGrath, J., Saha, S., Chant, D., Welham, J. (2008). Schizophrenia: A concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiologic Reviews*, 30, 67-76.

Medina-Hernandez, V., Ramos-Loyo, J., Luquin, S., Sanchez, L.F., Garcia-Estrada, J., Navarro-Ruiz, A. (2007). Increased lipid peroxidation and neuron specific enolase in treatment refractory schizophrenics. *Journal of Psychiatric Research*, 41(8), 652-658.

Meltzer, H.Y., Stahl, S.M. (1976). The dopamine hypothesis of schizophrenia: A review. *Schizophrenia Bulletin*, 2(1), 19-76.

Miao, L., St Clair, D.K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 344-356.

Michel, T.M., Thome, J., Martin, D., Nara, K., Zwerina, S., Tatschner, T., Weijers, H.G., Koutsilieri, E. (2004). Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase levels in brains of patients with schizophrenic psychosis. *J Neural Transm (Vienna)*, 111(9), 1191-1201.

Miljevic, C., Nikolic, M., Nikolic-Kokic, A., Jones, D.R., Niketic, V., Lecic-Tosevski, D., Spasic, M.B. (2010). Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(2), 303-307.

Millar, J.K., Wilson-Annan, J.C., Anderson, S., Christie, S., Taylor, M.S., Semple, C.A., Devon, R.S., St Clair, D.M., Muir, W.J., Blackwood, D.H., Porteous, D.J. (2000). Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 9(9), 1415-1423.

Miller, B.J., Culpepper, N., Rapaport, M.H., Buckley, P. (2013). Prenatal inflammation and neurodevelopment in schizophrenia: A review of human studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 42, 92-100.

Misra, I., Griffith, O.W. (1998). Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. *Protein Expression and Purification*, 13(2), 268-276.

Monte, A.S., de Souza, G.C., McIntyre, R.S., Soczynska, J.K., dos Santos, J.V., Cordeiro, R.C., Ribeiro, B.M., de Lucena, D.F., Vasconcelos, S.M., de Sousa, F.C., Carvalho, A.F., Macedo, D.S. (2013). Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. *J Psychopharmacol*, 27(11), 1032-1043.

Morera, A.L., Intxausti, A., Abreu-Gonzalez, P. (2009). Winter/summer seasonal changes in malondialdehyde formation as a source of variance in oxidative stress schizophrenia research. *World Journal of Biological Psychiatry*, 10(4 Pt 2), 576-580.

Morgan, C.J., Mofeez, A., Brandner, B., Bromley, L., Curran, H.V. (2004). Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 29(1), 208-218.

Morris, B.J., Cochran, S.M., Pratt, J.A. (2005). PCP: From pharmacology to modelling schizophrenia. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(1), 101-106.

Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., Nabeshima, T. (2007). Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochemistry International*, 51(2-4), 173-184.

Mueser, K.T., McGurk, S.R. (2004). Schizophrenia. *Lancet*, 363(9426), 2063-2072.

Mukerjee, S., Mahadik, S.P., Scheffer, R., Correnti, E.E., Kelkar, H. (1996). Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophrenia Research*, 19(1), 19-26.

Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49064-49073.

Mungrue, I.N., Bredt, D.S. (2004). nNOS at a glance: Implications for brain and brawn. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 13), 2627-2629.

Najera, K., Fagan, B.M., Thompson, P.M. (2019). SNAP-25 in major psychiatric disorders: A review. *Neuroscience*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.02.008. [Epub ahead of print]

Nakano, Y., Yoshimura, R., Nakano, H., Ikenouchi-Sugita, A., Hori, H., Umene-Nakano, W., Ueda, N., Nakamura, J. (2010). Association between plasma nitric oxide metabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: A pilot study. *Hum Psychopharmacol*, 25(2), 139-144.

Nel, A., Harvey, B.H. (2003). Haloperidol-induced dyskinesia is associated with striatal no synthase suppression: Reversal with olanzapine. *Behavioural Pharmacology*, 14(3), 251-255.

Nicholls, P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 95-101.

Nordgren, M., Fransen, M. (2014). Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie*, 98, 56-62.

Nucifora, L.G., Tanaka, T., Hayes, L.N., Kim, M., Lee, B.J., Matsuda, T., Nucifora, F.C., Jr., Sedlak, T., Mojtabai, R., Eaton, W., Sawa, A. (2017). Reduction of plasma glutathione in psychosis associated with schizophrenia and bipolar disorder in translational psychiatry. *Transl Psychiatry*, 7(8), e1215.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38388-38393.

Olney, J.W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D.F., Price, M.T., Sesma, M.A. (1991). NMDA antagonist neurotoxicity: Mechanism and prevention. *Science*, 254(5037), 1515-1518.

Olney, J.W., Newcomer, J.W., Farber, N.B. (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 33(6), 523-533.

Onaolapo, A.Y., Aina, O.A., Onaolapo, O.J. (2017). Melatonin attenuates behavioural deficits and reduces brain oxidative stress in a rodent model of schizophrenia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 92, 373-383.

Onaolapo, O.J., Ademakinwa, O.Q., Olalekan, T.O., Onaolapo, A.Y. (2017). Ketamine-induced behavioural and brain oxidative changes in mice: An assessment of possible beneficial effects of zinc as mono- or adjunct therapy. *Psychopharmacology*, 234(18), 2707-2725.

Ortiz-Medina, M.B., Perea, M., Torales, J., Ventriglio, A., Vitrani, G., Aguilar, L., Roncero, C. (2018). Cannabis consumption and psychosis or schizophrenia development. *International Journal of Social Psychiatry*, 64(7), 690-704.

Owe-Larsson, B., Ekdahl, K., Edbom, T., Osby, U., Karlsson, H., Lundberg, C., Lundberg, M. (2011). Increased plasma levels of thioredoxin-1 in patients with first episode psychosis and long-term schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(4), 1117-1121.

Ozyurt, H., Ozyurt, B., Sarsilmaz, M., Kus, I., Songur, A., Akyol, O. (2014). Potential role of some oxidant/antioxidant status parameters in prefrontal cortex of rat brain in an experimental psychosis model and the protective effects of melatonin. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(15), 2137-2144.

Padurariu, M., Ciobica, A., Dobrin, I., Stefanescu, C. (2010). Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neuroscience Letters*, 479(3), 317-320.

Paoletti, P., Neyton, J. (2007). Nmda receptor subunits: Function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 39-47.

Parikh, V., Khan, M.M., Mahadik, S.P. (2003). Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *Journal of Psychiatric Research*, 37(1), 43-51.

Paulson, L., Martin, P., Persson, A., Nilsson, C.L., Ljung, E., Westman-Brinkmalm, A., Eriksson, P.S., Blennow, K., Davidsson, P. (2003). Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. *Journal of Neuroscience Research*, 71(4), 526-533.

Pawelczyk, T., Grancow-Grabka, M., Trafalska, E., Szemraj, J., Pawelczyk, A. (2017). Oxidative stress reduction related to the efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids in first episode schizophrenia: Secondary outcome analysis of the OFFER randomized trial. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 121, 7-13.

Pedrini, M., Massuda, R., Fries, G.R., de Bittencourt Pasquali, M.A., Schnorr, C.E., Moreira, J.C., Teixeira, A.L., Lobato, M.I., Walz, J.C., Belmonte-de-Abreu, P.S., Kauer-Sant'Anna, M., Kapczinski, F., Gama, C.S. (2012). Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *Journal of Psychiatric Research*, 46(6), 819-824.

Pierri, J.N., Volk, C.L., Auh, S., Sampson, A., Lewis, D.A. (2001). Decreased somal size of deep layer 3 pyramidal neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 58(5), 466-473.

Pillai, A., Parikh, V., Terry, A.V., Jr., Mahadik, S.P. (2007). Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: Differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *Journal of Psychiatric Research*, 41(5), 372-386.

- Pitsikas, N. (2015). The role of nitric oxide donors in schizophrenia: Basic studies and clinical applications. *European Journal of Pharmacology*, 766(106-113).
- Pitsikas, N. (2016). The role of nitric oxide synthase inhibitors in schizophrenia. *Current Medicinal Chemistry*, 23(24), 2692-2705.
- Puran, A.C., Holstege, C.P., Jamison, K.P., Wiegand, T.J. (2014). *Phencyclidine*. U: Wexler, P., ed., *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed. London: Academic Press.
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 295-309.
- Radonjic, N.V., Jakovcevski, I., Bumbasirevic, V., Petronijevic, N.D. (2013). Perinatal phencyclidine administration decreases the density of cortical interneurons and increases the expression of neuregulin-1. *Psychopharmacology*, 227(4), 673-683.
- Radonjic, N.V., Knezevic, I.D., Vilimanovich, U., Kravic-Stevovic, T., Marina, L.V., Nikolic, T., Todorovic, V., Bumbasirevic, V., Petronijevic, N.D. (2010). Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of schizophrenia: Long-term effects of perinatal phencyclidine administration. *Neuropharmacology*, 58(4-5), 739-745.
- Rae, C.D., Williams, S.R. (2017). Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 529, 127-143.
- Raffa, M., Atig, F., Mhalla, A., Kerkeni, A., Mechri, A. (2011). Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naive first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry*, 11, 124.

Raffa, M., Barhoumi, S., Atig, F., Fendri, C., Kerkeni, A., Mechri, A. (2012). Reduced antioxidant defense systems in schizophrenia and bipolar i disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 371-375.

Raffa, M., Mechri, A., Othman, L.B., Fendri, C., Gaha, L., Kerkeni, A. (2009). Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(7), 1178-1183.

Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159-3165.

Ramirez, J., Garnica, R., Boll, M.C., Montes, S., Rios, C. (2004). Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: A pilot study. *Schizophrenia Research*, 68(2-3), 357-361.

Ramos-Loyo, J., Medina-Hernandez, V., Estarron-Espinosa, M., Canales-Aguirre, A., Gomez-Pinedo, U., Cerdan-Sanchez, L.F. (2013). Sex differences in lipid peroxidation and fatty acid levels in recent onset schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 44, 154-161.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. (2005). *Farmakologija*, peto izdanje, prvo srpsko izdanje. Beograd: Data status.

Ranjekar, P.K., Hinge, A., Hegde, M.V., Ghate, M., Kale, A., Sitasawad, S., Wagh, U.V., Debsikdar, V.B., Mahadik, S.P. (2003). Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research*, 121(2), 109-122.

- Rao, A.V., Balachandran, B. (2002). Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutritional Neuroscience*, 5(5), 291-309.
- Rao, V.S., Carvalho, A.C., Trevisan, M.T., Andrade, G.M., Nobre-Junior, H.V., Moraes, M.O., Magalhaes, H.I., Morais, T.C., Santos, F.A. (2012). Mangiferin ameliorates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity and oxidative stress in ketamine model of schizophrenia. *Pharmacological Reports*, 64(4), 848-856.
- Reddy, R., Keshavan, M., Yao, J.K. (2003). Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 62(3), 205-212.
- Reus, G.Z., Becker, I.R.T., Scaini, G., Petronilho, F., Oses, J.P., Kaddurah-Daouk, R., Ceretta, L.B., Zugno, A.I., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., Barichello, T. (2018). The inhibition of the kynurenine pathway prevents behavioral disturbances and oxidative stress in the brain of adult rats subjected to an animal model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 81, 55-63.
- Reus, G.Z., Simoes, L.R., Colpo, G.D., Scaini, G., Oses, J.P., Generoso, J.S., Prossin, A.R., Kaddurah-Daouk, R., Quevedo, J., Barichello, T. (2017). Ketamine potentiates oxidative stress and influences behavior and inflammation in response to lipopolysaccharide (lps) exposure in early life. *Neuroscience*, 353, 17-25.
- Ribeiro, B.M., do Carmo, M.R., Freire, R.S., Rocha, N.F., Borella, V.C., de Menezes, A.T., Monte, A.S., Gomes, P.X., de Sousa, F.C., Vale, M.L., de Lucena, D.F., Gama, C.S., Macedo, D. (2013). Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: Reversal by clozapine. *Schizophrenia Research*, 151(1-3), 12-19.
- Rifkind, J.M., Ramasamy, S., Manoharan, P.T., Nagababu, E., Mohanty, J.G. (2004). Redox reactions of hemoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(3), 657-666.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62.

Ruiz-Litago, F., Seco, J., Echevarria, E., Martinez-Cengotitabengoa, M., Gil, J., Irazusta, J., Gonzalez-Pinto, A.M. (2012). Adaptive response in the antioxidant defence system in the course and outcome in first-episode schizophrenia patients: A 12-months follow-up study. *Psychiatry Research*, 200(2-3), 218-222.

Rukmini, M.S., D'Souza, B., D'Souza, V. (2004). Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 19(2), 114-118.

Samuelsson, M., Skogh, E., Lundberg, K., Vrethem, M., Ollinger, K. (2013). Taurine and glutathione in plasma and cerebrospinal fluid in olanzapine treated patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 210(3), 819-824.

Sarandol, A., Kirli, S., Akkaya, C., Altin, A., Demirci, M., Sarandol, E. (2007). Oxidative-antioxidative systems and their relation with serum S100 B levels in patients with schizophrenia: Effects of short term antipsychotic treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(6), 1164-1169.

Sarandol, A., Kirli, S., Akkaya, C., Ocak, N., Eroz, E., Sarandol, E. (2007). Coronary artery disease risk factors in patients with schizophrenia: Effects of short term antipsychotic treatment. *J Psychopharmacol*, 21(8), 857-863.

Sarandol, A., Sarandol, E., Acikgoz, H.E., Eker, S.S., Akkaya, C., Dirican, M. (2015). First-episode psychosis is associated with oxidative stress: Effects of short-term antipsychotic treatment. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 69(11), 699-707.

Sastry, K.V., Moudgal, R.P., Mohan, J., Tyagi, J.S., Rao, G.S. (2002). Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy. *Analytical Biochemistry*, 306(1), 79-82.

Savaskan, N.E., Ufer, C., Kuhn, H., Borchert, A. (2007). Molecular biology of glutathione peroxidase 4: From genomic structure to developmental expression and neural function. *Biological Chemistry*, 388(10), 1007-1017.

Savushkina, O.K., Boksha, I.S., Prokhorova, T.A., Tereshkina, E.B., Burminskiy, D.S., Morozova, M.A., Vorobyeva, E.A., Burbaeva, G.S. (2018). The activity of erythrocyte and platelet glutathione reductase and glutathione-S-transferase in paranoid schizophrenia. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Imeni S.S. Korsakova*, 118(11), 77-81.

Seelig, G.F., Meister, A. (1985). Glutathione biosynthesis; gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods in Enzymology*, 113, 379-390.

Seeman, P., Bzowej, N.H., Guan, H.C., Bergeron, C., Reynolds, G.P., Bird, E.D., Riederer, P., Jellinger, K., Tourtellotte, W.W. (1987). Human brain D1 and D2 dopamine receptors in schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. *Neuropsychopharmacology*, 1(1), 5-15.

Selemon, L.D., Goldman-Rakic, P.S. (1999). The reduced neuropil hypothesis: A circuit based model of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 45(1), 17-25.

Sheng, Y., Abreu, I.A., Cabelli, D.E., Maroney, M.J., Miller, A.F., Teixeira, M., Valentine, J.S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews*, 114(7), 3854-3918.

Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M., McCarley, R.W. (2001). A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 49(1-2), 1-52.

Shim, S.S., Hammonds, M.D., Kee, B.S. (2008). Potentiation of the NMDA receptor in the treatment of schizophrenia: Focused on the glycine site. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 258(1), 16-27.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213-219.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183.

Snyder, S.H., Brecht, D.S. (1991). Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(4), 125-128.

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

Sorce, S., Stocker, R., Seredenina, T., Holmdahl, R., Aguzzi, A., Chio, A., Depaulis, A., Heitz, F., Olofsson, P., Olsson, T., Duveau, V., Sanoudou, D., Skogater, S., Vlahou, A., Wasquel, D., Krause, K.H., Jaquet, V. (2017). NADPH oxidases as drug targets and biomarkers in neurodegenerative diseases: What is the evidence? *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 387-396.

Srivastava, N., Barthwal, M.K., Dalal, P.K., Agarwal, A.K., Nag, D., Srimal, R.C., Seth, P.K., Dikshit, M. (2001). Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology*, 158(2), 140-145.

Stefani, M.R., Moghaddam, B. (2005). Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 57(4), 433-436.

Suboticanec, K., Folnegovic-Smalc, V., Korbar, M., Mestrovic, B., Buzina, R. (1990). Vitamin C status in chronic schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 28(11), 959-966.

Stroup, T.S., Kraus, J.E., Marder, S.R. (2006). *Pharmacotherapies*. U: Lieberman, J.A., Stroup, T.S., Perkins, D.O., ed., *Textbook of schizophrenia*, 1st ed. Washington DC: The American Psychiatric Publishing, 303–325.

Sullivan, P.F., Kendler, K.S., Neale, M.C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: Evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of General Psychiatry*, 60(12), 1187-1192.

Sun, M., Zigman, S. (1978). An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Analytical Biochemistry*, 90(1), 81-89.

Sun, X., Shih, A.Y., Johannssen, H.C., Erb, H., Li, P., Murphy, T.H. (2006). Two-photon imaging of glutathione levels in intact brain indicates enhanced redox buffering in developing neurons and cells at the cerebrospinal fluid and blood-brain interface. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17420-17431.

Swerdlow, N.R., Geyer, M.A., Braff, D.L. (2001). Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: Current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology*, 156(2-3), 194-215.

Takao, K., Kobayashi, K., Hagihara, H., Ohira, K., Shoji, H., Hattori, S., Koshimizu, H., Umemori, J., Toyama, K., Nakamura, H.K., Kuroiwa, M., Maeda, J., Atsuzawa, K., Esaki, K., Yamaguchi, S., Furuya, S., Takagi, T., Walton, N.M., Hayashi, N., Suzuki, H., Higuchi, M., Usuda, N., Suhara, T., Nishi, A., Matsumoto, M., Ishii, S., Miyakawa, T. (2013). Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 38(8), 1409-1425.

Taneli, F., Pirildar, S., Akdeniz, F., Uyanik, B.S., Ari, Z. (2004). Serum nitric oxide metabolite levels and the effect of antipsychotic therapy in schizophrenia. *Archives of Medical Research*, 35(5), 401-405.

Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27(3), 502-522.

Toledo, J.C., Jr., Augusto, O. (2012). Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chemical Research in Toxicology*, 25(5), 975-989.

Tosic, M., Ott, J., Barral, S., Bovet, P., Deppen, P., Gheorghita, F., Matthey, M.L., Parnas, J., Preisig, M., Saraga, M., Solida, A., Timm, S., Wang, A.G., Werge, T., Cuenod, M., Do, K.Q. (2006). Schizophrenia and oxidative stress: Glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. *American Journal of Human Genetics*, 79(3), 586-592.

Tsai, G., Lane, H.Y., Yang, P., Chong, M.Y., Lange, N. (2004). Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 55(5), 452-456.

Tsai, G., Yang, P., Chung, L.C., Lange, N., Coyle, J.T. (1998). D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 44(11), 1081-1089.

Tsai, M.C., Liou, C.W., Lin, T.K., Lin, I.M., Huang, T.L. (2013). Changes in oxidative stress markers in patients with schizophrenia: The effect of antipsychotic drugs. *Psychiatry Research*, 209(3), 284-290.

Tsuchiya, K., Mulcahy, R.T., Reid, L.L., Disteché, C.M., Kavanagh, T.J. (1995). Mapping of the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene (GLCLC) to human chromosome 6p12 and mouse chromosome 9D-E and of the regulatory subunit gene (GLCLR) to human chromosome 1p21-p22 and mouse chromosome 3H1-3. *Genomics*, 30(3), 630-632.

Tuncel, O.K., Sarisoy, G., Bilgici, B., Pazvantoglu, O., Cetin, E., Unverdi, E., Avci, B., Boke, O. (2015). Oxidative stress in bipolar and schizophrenia patients. *Psychiatry Research*, 228(3), 688-694.

Turetsky, B.I., Calkins, M.E., Light, G.A., Olincy, A., Radant, A.D., Swerdlow, N.R. (2007). Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: The viability of selected candidate measures. *Schizophrenia Bulletin*, 33(1), 69-94.

Uhlhaas, P.J., Singer, W. (2010). Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature Reviews: Neuroscience*, 11(2), 100-113.

Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R., Richardson, A. (2003). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological Genomics*, 16(1), 29-37.

Vasconcelos, G.S., Ximenes, N.C., de Sousa, C.N., Oliveira Tde, Q., Lima, L.L., de Lucena, D.F., Gama, C.S., Macedo, D., Vasconcelos, S.M. (2015). Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrergic and neurotrophic mechanisms. *Schizophrenia Research*, 165(2-3), 163-170.

Verkhatsky, A., Kirchhoff, F. (2007). NMDA receptors in glia. *Neuroscientist*, 13(1), 28-37.

Vidovic, B., Milovanovic, S., Dordevic, B., Kotur-Stevuljevic, J., Stefanovic, A., Ivanisevic, J., Miljkovic, M., Spasic, S., Stojanovic, D., Pantovic, M. (2014). Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers and antioxidative defense in patients with schizophrenia. *Psychiatria Danubina*, 26(3), 205-213.

Vidovic, B., Stefanovic, A., Milovanovic, S., Ethordevic, B., Kotur-Stevuljevic, J., Ivanisevic, J., Miljkovic, M., Spasic, S. (2014). Associations of oxidative stress status parameters with traditional cardiovascular disease risk factors in patients with schizophrenia. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 74(3), 184-191.

Virarkar, M., Alappat, L., Bradford, P.G., Awad, A.B. (2013). L-arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(11), 1157-1167.

Wang, C., McInnis, J., West, J.B., Bao, J., Anastasio, N., Guidry, J.A., Ye, Y., Salvemini, D., Johnson, K.M. (2003). Blockade of phencyclidine-induced cortical apoptosis and deficits in prepulse inhibition by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 266-271.

Wang, C.Z., Yang, S.F., Xia, Y., Johnson, K.M. (2008). Postnatal phencyclidine administration selectively reduces adult cortical parvalbumin-containing interneurons. *Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2442-2455.

Wang, J.F., Shao, L., Sun, X., Young, L.T. (2009). Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord*, 11(5), 523-529.

Watkins, J.C., Jane, D.E. (2006). The glutamate story. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1, S100-108.

Weydert, C.J., Cullen, J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51-66.

Wijtenburg, S.A., Yang, S., Fischer, B.A., Rowland, L.M. (2015). In vivo assessment of neurotransmitters and modulators with magnetic resonance spectroscopy: Application to schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 51, 276-295.

Winterbourn, C.C., Stern, A. (1987). Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *Journal of Clinical Investigation*, 80(5), 1486-1491.

Wise, C.D., Baden, M.M., Stein, L. (1974). Post-mortem measurement of enzymes in human brain: Evidence of a central noradrenergic deficit in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 11, 185-198.

Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., Foltyn, V.N. (2008). D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *Febs j*, 275(14), 3514-3526.

Wood, S.J., Berger, G.E., Wellard, R.M., Proffitt, T.M., McConchie, M., Berk, M., McGorry, P.D., Pantelis, C. (2009). Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: A 1H-MRS investigation. *Neurobiology of Disease*, 33(3), 354-357.

Wood, S.J., Yucel, M., Pantelis, C., Berk, M. (2009). Neurobiology of schizophrenia spectrum disorders: The role of oxidative stress. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 38(5), 396-396.

Wright, I.C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P.W., David, A.S., Murray, R.M., Bullmore, E.T. (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 157(1), 16-25.

Wu, J.Q., Chen, D.C., Tan, Y.L., Soares, J.C., Zhang, X.Y. (2015). Mn-superoxide dismutase activity is associated with orofacial involuntary movements in schizophrenia patients with tardive dyskinesia. *Hum Psychopharmacol*, 30(1), 57-63.

Wu, J.Q., Chen, D.C., Tan, Y.L., Tan, S., Wang, Z., Yang, F., Soares, J.C., Zhang, X.Y. (2014). Association of altered CuZn superoxide dismutase and cognitive impairment in schizophrenia patients with tardive dyskinesia. *Journal of Psychiatric Research*, 58, 167-174.

Wu, J.Q., Kosten, T.R., Zhang, X.Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200-206.

Wu, Z., Zhang, X.Y., Wang, H., Tang, W., Xia, Y., Zhang, F., Liu, J., Fu, Y., Hu, J., Chen, Y., Liu, L., Chen, D.C., Xiu, M.H., Kosten, T.R., He, J. (2012). Elevated plasma superoxide dismutase in first-episode and drug naive patients with schizophrenia: Inverse association with positive symptoms. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 36(1), 34-38.

Xin, L., Mekle, R., Fournier, M., Baumann, P.S., Ferrari, C., Alameda, L., Jenni, R., Lu, H., Schaller, B., Cuenod, M., Conus, P., Gruetter, R., Do, K.Q. (2016). Genetic polymorphism associated prefrontal glutathione and its coupling with brain glutamate and peripheral redox status in early psychosis. *Schizophrenia Bulletin*, 42(5), 1185-1196.

Xing, G., Chavko, M., Zhang, L.X., Yang, S., Post, R.M. (2002). Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression. *Schizophrenia Research*, 58(1), 21-30.

Xu, M.Q., Sun, W.S., Liu, B.X., Feng, G.Y., Yu, L., Yang, L., He, G., Sham, P., Susser, E., St Clair, D., He, L. (2009). Prenatal malnutrition and adult schizophrenia: Further evidence from the 1959-1961 Chinese famine. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 568-576.

Xuan, Y., Yan, G., Wu, R., Huang, Q., Li, X., Xu, H. (2015). The cuprizone-induced changes in (1)H-MRS metabolites and oxidative parameters in C57BL/6 mouse brain: Effects of quetiapine. *Neurochemistry International*, 90, 185-192.

- Yan, N., Meister, A. (1990). Amino acid sequence of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(3), 1588-1593.
- Yang, Y., Chen, Y., Johansson, E., Schneider, S.N., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., Dalton, T.P. (2007). Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. *Biochemical Pharmacology*, 74(2), 372-381.
- Yang, Y., Dieter, M.Z., Chen, Y., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., Dalton, T.P. (2002). Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49446-49452.
- Yao, J.K., Leonard, S., Reddy, R. (2006). Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Disease Markers*, 22(1-2), 83-93.
- Yao, J.K., Leonard, S., Reddy, R.D. (2004). Increased nitric oxide radicals in postmortem brain from patients with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 30(4), 923-934.
- Yao, J.K., Reddy, R., McElhinny, L.G., van Kammen, D.P. (1998). Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 32(6), 385-391.
- Yao, J.K., Reddy, R., van Kammen, D.P. (2000). Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia. *Psychiatry Research*, 97(2-3), 137-151.
- Yao, J.K., Reddy, R.D., van Kammen, D.P. (1999). Human plasma glutathione peroxidase and symptom severity in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 45(11), 1512-1515.
- Yeung, R.K., Xiang, Z.H., Tsang, S.Y., Li, R., Ho, T.Y.C., Li, Q., Hui, C.K., Sham, P.C., Qiao, M.Q., Xue, H. (2018). Gabrb2-knockout mice displayed schizophrenia-like and

comorbid phenotypes with interneuron-astrocyte-microglia dysregulation. *Transl Psychiatry*, 8(1), 128.

Yilmaz, N., Herken, H., Cicek, H.K., Celik, A., Yurekli, M., Akyol, O. (2007). Increased levels of nitric oxide, cortisol and adrenomedullin in patients with chronic schizophrenia. *Medical Principles and Practice*, 16(2), 137-141.

Yuan, L., Wu, J., Liu, J., Li, G., Liang, D. (2015). Intermittent hypoxia-induced parvalbumin-immunoreactive interneurons loss and neurobehavioral impairment is mediated by NADPH-oxidase-2. *Neurochemical Research*, 40(6), 1232-1242.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.

Zeni-Graiff, M., Rios, A.C., Maurya, P.K., Rizzo, L.B., Sethi, S., Yamagata, A.S., Mansur, R.B., Pan, P.M., Asevedo, E., Cunha, G.R., Zugman, A., Bressan, R.A., Gadelha, A., Brietzke, E. (2017). Peripheral levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in youths in ultra-high risk for psychosis: A pilot study. *CNS Spectrums*, 1-5.

Zhang, L., Xu, S., Huang, Q., Xu, H. (2018). N-acetylcysteine attenuates the cuprizone-induced behavioral changes and oligodendrocyte loss in male C57BL/7 mice via its anti-inflammation actions. *Journal of Neuroscience Research*, 96(5), 803-816.

Zhang, X.R., Wang, Y.X., Zhang, Z.J., Li, L., Reynolds, G.P. (2012). The effect of chronic antipsychotic drug on hypothalamic expression of neural nitric oxide synthase and dopamine D2 receptor in the male rat. *PloS One*, 7(4), e33247.

Zhang, X.Y., Chen, D.C., Tan, Y.L., Tan, S.P., Wang, Z.R., Yang, F.D., Okusaga, O.O., Zunta-Soares, G.B., Soares, J.C. (2015). The interplay between BDNF and oxidative stress in chronic schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 201-208.

Zhang, X.Y., Chen, D.C., Xiu, M.H., Tan, Y.L., Yang, F.D., Zhang, L.Y., Zhang, L.Y., Haile, C.N., Kosten, T.R. (2013). Clinical symptoms and cognitive impairment associated with male schizophrenia relate to plasma manganese superoxide dismutase activity: A case-control study. *Journal of Psychiatric Research*, 47(8), 1049-1053.

Zhang, X.Y., Chen, D.C., Xiu, M.H., Tang, W., Zhang, F., Liu, L., Chen, Y., Liu, J., Yao, J.K., Kosten, T.A., Kosten, T.R. (2012). Plasma total antioxidant status and cognitive impairments in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 139(1-3), 66-72.

Zhang, X.Y., Chen, D.C., Xiu, M.H., Yang, F.D., Tan, Y., Luo, X., Zuo, L., Kosten, T.A., Kosten, T.R. (2014). Cognitive function, plasma MnSOD activity, and MnSOD Ala-9Val polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls. *Schizophrenia Bulletin*, 40(3), 592-601.

Zhang, X.Y., Tan, Y.L., Cao, L.Y., Wu, G.Y., Xu, Q., Shen, Y., Zhou, D.F. (2006). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophrenia Research*, 81(2-3), 291-300.

Zhang, X.Y., Tan, Y.L., Zhou, D.F., Cao, L.Y., Wu, G.Y., Haile, C.N., Kosten, T.A., Kosten, T.R. (2007). Disrupted antioxidant enzyme activity and elevated lipid peroxidation products in schizophrenic patients with tardive dyskinesia. *Journal of Clinical Psychiatry*, 68(5), 754-760.

Zhang, X.Y., Tan, Y.L., Zhou, D.F., Haile, C.N., Wu, G.Y., Cao, L.Y., Kosten, T.A., Kosten, T.R. (2007). Nicotine dependence, symptoms and oxidative stress in male patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 32(9), 2020-2024.

Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Cao, L.Y., Chen, D.C., Zhu, F.Y., Wu, G.Y. (2003). Blood superoxide dismutase level in schizophrenic patients with tardive dyskinesia: Association with dyskinetic movements. *Schizophrenia Research*, 62(3), 245-250.

Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Cao, L.Y., Zhang, P.Y., Wu, G.Y. (2003). Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: Association with positive symptoms. *Psychiatry Research*, 117(1), 85-88.

Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Cao, L.Y., Zhang, P.Y., Wu, G.Y., Shen, Y.C. (2003). The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 23(2), 128-131.

Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Qi, L.Y., Chen, S., Cao, L.Y., Chen, D.C., Xiu, M.H., Wang, F., Wu, G.Y., Lu, L., Kosten, T.A., Kosten, T.R. (2009). Superoxide dismutase and cytokines in chronic patients with schizophrenia: Association with psychopathology and response to antipsychotics. *Psychopharmacology*, 204(1), 177-184.

Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Shen, Y.C., Zhang, P.Y., Zhang, W.F., Liang, J., Chen, D.C., Xiu, M.H., Kosten, T.A., Kosten, T.R. (2012). Effects of risperidone and haloperidol on superoxide dismutase and nitric oxide in schizophrenia. *Neuropharmacology*, 62(5-6), 1928-1934.

Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Su, J.M., Zhang, P.Y. (2001). The effect of extract of ginkgo biloba added to haloperidol on superoxide dismutase in inpatients with chronic schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 21(1), 85-88.

Zornberg, G.L., Buka, S.L., Tsuang, M.T. (2000). Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: A 19-year longitudinal study. *American Journal of Psychiatry*, 157(2), 196-202.

Zoroglu, S.S., Herken, H., Yurekli, M., Uz, E., Tutkun, H., Savas, H.A., Bagci, C., Ozen, M.E., Cengiz, B., Cakmak, E.A., Dogru, M.I., Akyol, O. (2002). The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 36(5), 309-315.

Zugno, A.I., Canever, L., Heylmann, A.S., Wessler, P.G., Steckert, A., Mastella, G.A., de Oliveira, M.B., Damazio, L.S., Pacheco, F.D., Calixto, O.P., Pereira, F.P., Macan, T.P., Pedro, T.H., Schuck, P.F., Quevedo, J., Budni, J. (2016). Effect of folic acid on oxidative stress and behavioral changes in the animal model of schizophrenia induced by ketamine. *Journal of Psychiatric Research*, 81, 23-35.

Zugno, A.I., Chipindo, H.L., Volpato, A.M., Budni, J., Steckert, A.V., de Oliveira, M.B., Heylmann, A.S., da Rosa Silveira, F., Mastella, G.A., Maravai, S.G., Wessler, P.G., Binatti, A.R., Panizzutti, B., Schuck, P.F., Quevedo, J., Gama, C.S. (2014). Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*, 259, 223-231.

PRILOG I

Spisak skraćenica

5-HT	5-hidroksitriptamin
ABC	engl. <i>avidin-bioitin complex</i>
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropanska kiselina
ANOVA	analiza varijanse
AP-1	engl. <i>activator protein 1</i>
ATP	adenozin-trifosfat
BH2	dihidrobiopterin
BH4	tetrahidrobiopterin
BHT	butilovani hidroksitoluen
CAT	katalaza
CCS	engl. <i>copper chaperone for SOD</i>
cGMP	ciklični guanozin-monofosfat
CNS	centralni nervni sistem
COX	citohrom c oksidaza
DAB	3,3'-diaminobenzidinom
DAO	oksidaza D-aminokiselina; engl. <i>D-amino acid oxidase</i>
DAOA	aktivator oksidaze D-aminokiselina; engl. <i>D-amino acid oxidase activator</i>
DCIP	2,6-dihidroindofenol
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DSM-V	Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje peto izdanje
DTNB	5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoeva kiselina)
DTNBP1	engl. <i>dystobrevin binding protein 1</i>
EDRF	endotelni faktor relaksacije; engl. <i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	etilendiaminotetrasirćetna kiselina
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
GABA	γ -aminobuterna kiselina
GAD67	glutamat dekarboksilaza 67kDa; engl. <i>glutamic acid decarboxylase</i>

GCL	γ -glutamilcistein ligaza
GCLC	katalitička subjedinica γ -glutamilcistein ligaze
GCLM	modulatorna subjedinica γ -glutamilcistein ligaza
GLYT1	engl. <i>glycine type-1 transporter</i>
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	redukovani glutation
GSSG	oksidovani glutation; glutation-disulfid
GWAS	engl. <i>genome-wide association studies</i>
Hal	haloperidol
HNE	4-hidroksi-2-trans-nonanal
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
i.p.	intraperitonealno
Kon	kontrola
LSD	dietilamid lizerginske kiseline; engl. <i>lysergic acid diethylamide</i>
MDA	malondialdehid
MKB-10	Međunarodne klasifikacije bolesti 10. revizija
MRP1	engl. <i>multi-drug resistance-associated protein 1</i>
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF- κ B	engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMDA	N-metil-D-aspartat
NOS	azot-monoksid sintaza
NOX	NADPH oksidaza
Nrf1	engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NRG1	neuregulin1
PCP	fenciklidin, engl. <i>phencyclidine</i>
PIC	engl. <i>protease inhibitor cocktail</i>
PN	postnatalni
PSD-95	engl. <i>postsynaptic density protein-95</i>
PV	parvalbumin
RGS4	engl. <i>regulator of G-protein signaling 4</i>
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>

Ris	risperidon
RNS	reaktivne azotne vrste; engl. <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	reaktivne kiseonične vrste; engl. <i>reactive oxygen species</i>
SDS	natrijum-dodecilsulfat; engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SE	standardna greška aritmetičke sredine
sGC	solubilna guanilat ciklaza
SNAP-25	engl. <i>synaptosomal nerve-associated protein 25</i>
SOD	superoksid dizmutaza
t.m.	telesna masa
TBA	tiobarbiturna kiselina
TEP	1,1,3,3-tetraetoksipropan
tGSH	ukupni glutation
TNB	5-tio-2-nitrobenzoeva kiselina

BIOGRAFIJA

Dr Tihomir S. Stojković je rođen 10. februara 1985. godine u Smederevu, Srbija. Osnovnu i srednju školu je završio u Smederevu kao nosilac Vukove diplome. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao 2004. godine, a diplomirao je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,73. Na istom fakultetu je 2011. godine upisao doktorske akademske studije, studijski program Neuronauke.

Od decembra 2011. godine je angažovan kao istraživač pripravnik na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije #175058: “Strukturne i biohemijske karakteristike poremećaja sinaptičke plastičnosti u psihijatrijskim oboljenjima” kojim rukovodi prof. dr Nataša Petronijević.

Od aprila 2017. godine je zaposlen na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u zvanju saradnika u nastavi, a od aprila 2019. godine u zvanju asistenta za užu naučnu oblast Medicinska i klinička biohemija. Učestvuje u svim oblicima nastave koje organizuje Katedra za medicinsku i kliničku biohemiju na srpskom i engleskom jeziku. Mentor je 3 studentska rada koji su prezentovani na kongresima studenata medicine.

Naučni i istraživačka rad dr Tihomira Stojkovića je usmeren na oblasti neurohemije i molekularne neurobiologije. Autor je u 16 radova štampanih u međunarodnim časopisima, sa *h*-indeksom 5. Autor je u 35 radova koji su kao izvodi predstavljeni na međunarodnim ili nacionalnim naučnim skupovima.

Zdravstvenu specijalizaciju iz Laboratorijske medicine je upisao 2018. godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тихомир Стојковић

Број индекса NN-01/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекти дуготрајне примене антипсихотика на редокс регулацију

у анималном моделу шизофреније

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

Потпис аутора

У Београду, 27. 05. 2019.

TStojkovic

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

Име и презиме аутора _____ Тихомир Стојковић _____
Број индекса _____ NN-01/11 _____
Студијски програм _____ Неуронауке _____
Наслов рада _____ Ефекти дуготрајне примене антипсихотика на редокс
_____ регулације у анималном моделу шизофреније _____
Ментор _____ проф. др Наташа Петронијевић _____

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____ 27. 05. 2019. _____

ТСтојковић

Изјава о коришћењу

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

Ефекти дуготрајне примене антипсихотика на редокс регулацију у
анималном моделу шизофреније

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 27. 05. 2019.

Ђојковић