

ODLOŽENI EFEKTI PERINATALNE PRIMENE FENCIKLIDINA NA MOŽDANE STRUKTURE PACOVA

Vesna Erac

Laboratorijska služba "Doma zdravlja Kragujevac"
Institut za Biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

DELAYED EFFECTS OF PERINATAL APPLICATION OF PHENCYCLIDINE ON RATS' BRAIN STRUCTURE

Vesna Erac

Laboratory Department of Health Center in Kragujevac

Abstract from the specialization thesis completed at the Institute of Biochemistry, Medical Faculty of Belgrade University

SAŽETAK

Neuroni centralnog nervnog sistema i glijalne ćelije posebno su osetljivi na dejstvo slobodnih radikala. Visok sadržaj lipida, nemogućnost neurona da se repliciraju i zamene oštećenu DNK, visoka aktivnost SOD u odnosu na aktivnost katalaze i glutation peroksidaze, enzima iz metabolizma peroksida, doprinosi oštećenju ćelije pri čemu dolazi do funkcionalnog gubitka mitohondrijalnih i mikrozomalnih membrana, remećenja transportne uloge membrane ćelije, uloge u membranskim signalnim mehanizmima koji se sprovode preko receptora i sinaptičke transmisije. Pretpostavljena je neurorazvojna hipoteza o nastanku shizofrenije a kao model su poslužili pacovi koji su perinatalno, subkutano tretirani fenciklidinom, blokatorom NMDA receptora, a promene u aktivnosti citohrom C oksidaze u odnosu na kontrolnu grupu, određivane su u periodu adolescencije životinje. Fenciklidin kod ljudi izaziva simptome slične shizofreniji. NMDA receptorska hipofunkcija (NRH) koja podrazumeva poremećaj na receptorima GABA- neurona ili gubitak istih neurona, dovodi do remećenja toničke inhibitorne kontrole nad multiplim ekscitatorskim putevima koji inervišu neurone prednjeg cingulumuma i retrospleničnog korteksa. Povećan glutamatergični input na piramidnim neuronima dovodi do ekscitotoksičnosti, preko povećanog ulaska Ca^{2+} jona, do njihove degeneracije i smrti ćelije. Pokazano je da se kortikalna apoptoza uzrokovana fenciklidinom može sprečiti primenom superoksid-dizmutaznog mimetika M_{40403} što upućuje na prooksidativni mehanizam oštećenja ćelija. Na već pomenutom eksperimentalnom modelu, iz moždanih struktura pacova, 63 dana života je izdvajana neprečišćena mitohondrijalna frakcija. Metodom Hesse i Popa određivana je specifična aktivnost citohrom C oksidaze u odnosu na sadržaj proteina u uzorku, koja je proporcionalna smanjenju ekstinkcije na 550nm u toku 3-5 min, koje nastaje zbog prelaska ferocitohroma c u ferocitohroma c pod uticaje citohrom C oksidaze iz uzorka. Rezultati pokazuju da perinatalna primena fenciklidina dovodi do povećanja aktivnosti citohrom C oksidaze u odnosu na kontrolnu grupu u periodu adolescencije životinja i to u korteksu (razlika je statistički značajna) i u

ABSTRACT

The neurons of the central nervous system and glia are especially susceptible to the effects of free radicals. High contents of lipids, lack of neurons to replicate and replace damaged DNA, high activity of SOD in relation to the activity of catalase and glutathione peroxidase, the enzymes from peroxide metabolism they all contribute to cell damaging, leading to the functional loss of mitochondrial and microsomal membranes and the disruption of the transmitting role of cell membrane, the role related to membrane signal mechanisms conducted via receptors and synaptic transmission. A hypothesis of the neuro-based development of schizophrenia was established, and the experiment was conducted on rats that subcutaneously received phencyclidine in perinatal period that blocks NMDA receptors, while the changes in the activities of cytochrome C oxidase, in relation to the control group, were monitored in the period of the animals adolescence. At people, phencyclidine causes symptoms similar to schizophrenia. NMDA receptor hypofunction (NRH), which assumes the disruption of GABA neurons receptors or their loss, leads to the disruption of tonic inhibitory control over multiple excitatory ways which stimulate the neurons of front cingulum and retrosplenial cortex. Higher glutamatergic input on pyramid neurons leads to excitotoxicity through a higher intake of Ca^{2+} ion, and eventually to their degeneration and cell death. It has been shown that cortical apoptosis, caused by phencyclidine, can be prevented by applying superoxide-dismutase mimetic M_{40403} , which points out to the pro-oxidative mechanism of cell damaging. In the mentioned experiment, unpurified mitochondrial fraction was being taken out from the rats brain structure in the period of 63 days. Using Hesse and Pope method, specific activity of cytochrome C oxidase was established in relation to the amount of proteins in the sample. It was proportional to the decrease of extinction to 550nm in the period of 3-5 min, caused by the transformation of ferocytocrome C into ferocytocrome C under the influence of cytochrome C oxidase from the sample. The results have shown that perinatal application of phencyclidine has led to the increase of the activity of cytochrome C oxidase in relation to the control group in the

talamusu (razlika je visoko statistički značajna). Toksični efekti fenciklidina na moždanim strukturama mogu se dovesti u vezu sa stvaranjem superoksidnog anjona i prooksidativnim oštećenjem nervne ćelije.

Ključne reči: shizofrenija, NRH, citohrom C oksidaza, superoksidni anjon, Ca^{2+} jon.

UVOD

Respiratorni lanac, citohrom C oksidaza i oksidativni stres

Citohrom C oksidaza je veliki enzim respiratornog lanca koji se sastoji od 13 subjedinica. Tri su katalitičke i kodirane mitohondrijalnim genomom, a 10 su regulatorne i kodirane nuklearnim genomom. Pretstavljaju IV kompleks respiratornog niza. Citohrom C koji je slabo, elektrostatički vezan za spoljašnju stranu unutrašnje mitohondrijalne membrane i spada u slobodne nosioce elektrona, prenosi redukcione ekvivalente sa III na IV kompleks respiratornog niza. Za hem-a₃, koji pripada II subjedinici enzima, je vezan molekularni kiseonik. Tokom ovog procesa nastaju nestabilni kiseonični produkti, koji su stabilizovani i čvrsto vezani za Fe i Cu enzima: H₂O₂ (vodonič peroksid) i OH-(hidroksi radikal). Prilikom premeštanja u respiratornom nizu elektroni ponekad nekontrolisano prelaze direktno na kiseonik odnosno "cure" iz respiratornog lanca. Tako se dešavaju univalentne oksidacije pri čemu nastaje superoksidni anjon (1). Superoksidni anjon se efikasno konvertuje u H₂O₂ pomoću mitohondrijalne superoksid dizmutaze, metaloproteina koji sadrži Mn. 60% aktivnosti SOD se nalazi u mitohondrijama, što je uslovljeno dvostruko većom produkcijom superoksid radikala u odnosu na citosol (2). Vodonič peroksid je snažan oksidans i potencijalni izvor slobodnih radikala kao što je OH- u prisustvu superoksidnog anjona (Haber-Vajsova reakcija) i metala sa promenljivom valencom (Fe) u Fentonovoj reakciji. Enzimski antioksidansi koji učestvuju u eliminaciji H₂O₂ su glutation peroksidaza i katalaza. Glutation peroksidaza ima veliki afinitet za H₂O₂ i dominantno je prisutna u citosolu a u mitohondrijama se nalazi u niskoj koncentraciji (3). Katalazna aktivnost se uglavnom registruje u mitohondrijama, lizozomima i peroksidomima (4). Neuron centralnog nervnog sistema i glija su posebno osetljivi na dejstvo slobodnih radikala, zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina i lipida kao i nemogućnosti zrelih neurona da se repliciraju i zamene oštećenu DNK. Visoka SOD aktivnost u odnosu na nivo katalaze i glutation peroksidaze može doprineti oštećenju nervnih ćelija (5). Oksidativna oštećenja membranskih ćelijskih proteina i DNK dovode do funkcionalnog gubitka mitohondrijalnih i mikro-

period of the animals adolescence both in cortex (the difference is statistically significant) and in thalamus (the difference is statistically considerably significant). Toxic effects of phencyclidine on the brain structures can be brought into correlation with the establishment of superoxide anion and prooxidative damage of nerve cell.

Key words: schizophrenia, NHR, cytochrome C oxidase, superoxide anion, Ca^{2+} ion.

zomalnih membrana, remećenja transportne uloge membrane ćelije, uloge u membranskim signalnim mehanizmima koji se sprovode preko receptora i sinaptičke transmisije. U mozgu je viši parcijalni pritisak kiseonika nego u drugim tkivima. 90% O₂ je terminalni akceptor elektrona u procesu stvaranja visokoenergetskih veza u ATP-u što dovodi do stvaranja slobodnih radikala i prooksidativnog oštećenja unutrašnjih membrana mitohondrija. Oštećenju su podložne i mitohondrijalna DNK zbog odsustva ili slabo izraženih reparacionih mehanizama. Broj mitohondrija u ćeliji zavisi od energetske potrebe i one se umnožavaju, kao autonomne jedinice, nezavisno od deobe ćelije. Tako se značajno može povećati broj mitohondrija sa oštećenom mtDNK sa svim posledicama. Intenzivnu biogenezu mitohondrija prati povećanje potrošnje O₂ pri čemu se povećava sinteza citohrom C oksidaze koja bi mogla biti mera oksidativne foforilacije u ćelijama (6, 7).

Shizofrenija

Shizofrenija je teško mentalno oboljenje koje dovodi do izrazitog pustošenja ličnosti. Klinički postoje dva sindroma: pozitivni i negativni. Pozitivni sindrom odražava prekomernost i distorziju normalne funkcije i to su: deluzije (sumanute ideje), halucinacije, poremećaj govora, mišljenja, premećaj ponašanja, emocionalna neadekvatnost, depersonalizacija, deralizacija, somatska preokupacija. Negativni sindrom nastaje usled smanjenja ili gubitka normalne funkcije i obuhvata afektivno zaravnjivanje, apatiju, alogiju i gubitak volje (8). Shizofrenija se javlja između 16. i 25. godine (9), pa se postavlja pitanje, da li normalne promene koje se dešavaju u mozgu za vreme rane mladosti i kasne adolescencije mogu predstavljati permisivnu sredinu za nastajanje bolesti. Pretpostavljen je model "pogrešnog povezivanja" (10) u sloju II prednjeg cingulatnog korteksa u kome je izrazito povećan glutamatergički ekscitatorni input na distalnim delovima dendrita piramidnih ćelija korteksa, dok je inhibitorni input GABA interneurona redukovano. Glutamatergička transmisija u korteksu podržava procese modifikacije u cilju formiranja funkcionalnih struktura u skladu sa iskustvom tzv. neuroplasticitet a uključena je u procese pamćenja.

Povećan inhibitorni input dopaminergičnih vlakana na GABA interneurone redukuje njihovu inhibitornu modulaciju na piramidnim neuronima korteksa što posebno dolazi do izražaja u uslovima stresa kada oslobađanje dopamina može biti povećano. Dopamin je uključen u procesovanje informacija od mnoštva prispelih i njihovu registraciju. Neuronima ovog dela korteksa svoju aktivnost regulišu preko rekurentnih kolaterala koje inhibiciju ostvaruju preko NMDA receptora na GABA-ergičkim interneuronima. Abnormalnosti ovih procesa su markeri za shizofreniju. Ova transmisija se odigrava preko nekoliko jonotropnih receptora AMPA, NMDA, kainatskih i jednog metabotropnog. Rasprostranjeni su u CNS upravo najviše u onim strukturama za koje je pokazana citometrijska i volumetrijska abnormalnost kod shizofrenije: prefrontalni korteks, limbički sistem i talamus (11). Glutamat preko AMPA i NMDA receptora deluje na GABA-ergičke i noradrenergičke neurone.

Neurorazvojnu teoriju o nastanku ove bolesti mogla bi objasniti NMDA receptorska hipofunkcija (NRH), stanje koje može biti indukovano u toku razvoja i koje dovodi do oštećenja funkcionalnog statusa NMDA receptora na GABA neuronima ili nedostatka GABA-ergičkih interneurona (12). Ovo oštećenje dozvoljava nedomuliranu stimulatornu aktivnost odgovarajućih kortikolimbickih regiona mozga, a drugi proces bi se odvijao u ranoj mladosti i bazirao bi se na samooštećenju koje može biti progresivan proces i koji ako se ne suprimira uzrokuje poremećaje kognicije u toku godina (13). Glutamat preko AMPA receptora dovodi do ulaska Na^+ u ćelije i depolarizacije membrane koja kada je dovoljnog inteziteta i dužine trajanja pomera Mg^{2+} jon sa kalcijumovih kanala u NMDA receptorima i dok je još glutamat vezan za receptore dolazi do ulaska Ca^{2+} jona i sledstvenih metaboličkih promena u neuronima koje su dužeg trajanja (neuroplasticitet). U toku embrionalnog razvoja neuroni koji ne uspostave odgovarajuće sinaptičke veze umiru tako što se u njima aktivira proces ćelijske smrti (14, 15). Proces apoptoze je uključen u normalan razvoj mozga. U nekim delovima mozga biva uklonjeno i preko 50% prvobitno nastalih neurona. Tretiranje pacova fenciklidinom perinatalno a detektovanje promena kod odraslih jedinki predstavlja eksperimentalni model shizofrenije. PCP ili fenciklidin pripada arilcikloheksaminima. Blokator je NMDA receptora nekompetitivnog tipa i kod odraslih izaziva simptome slične shizofreniji. Označavan je kao disocijativni anestetik (16), a danas je poznato da se zloupotrebljava kao halucinogen (*angel dust*) Biohemijske analize mozga pacova tretiranih PCP-om ukazuju na povećanje koncentracije DNK fragmenata i Bax proteina i sniženje Bcl-2 proteina u

frontalom i olfaktornom korteksu, neposredno (17). Bcl-2 ima ključnu ulogu u zaštiti zdrave ćelije od programirane smrti. Povećana ekspresija p53 je uslovljena DNK oštećenjem i pri tome dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa na prelazu iz G1 u S fazu svih ćelija sa greškom, dok reparacioni mehanizmi ne odigraju svoju ulogu ili se ćelije uvode u apoptozu. Blokada NMDA receptora možda dovodi i do povećanja oslobađanja glutamata koji je ekscitotoksičan (18) može da usmrti neurone, ili uzrokuje *up* regulaciju NR1 subjedinice receptora i posledično povećava glutamatergičnu transmisiju (19).

Povećanje ekscitacije NMDA receptora bi dovela do porasta koncentracije kalcijuma u ćelijama i njegovog premeštanja, odnosno deponovanja iz citoplazme u endoplazmatični retikulum i mitohondrije a energiju za ovaj proces obezbeđuje transmembranski potencijal nastao izbacivanjem protona pri prelasku elektrona kroz respiratorni lanac. Pri transportu Ca^{2+} membranski potencijal mitohondrija pada proporcionalno količini transportovanog katjona. To znači da postoji kompeticija za energiju između transportnog sistema za Ca^{2+} i sinteze ATP-a (20). Pri tom dolazi do smanjenog stvaranja ATP- a uz njegovu povećanu potrošnju. Kalcijum je veoma bitan za aktivnost mnogih enzima kao što su proteaze, protein kinaze i fosfolipaze, kalmodulin zavisnu sintetazu azot monoksida (NO) (21). Neurotoksičnost se bar delimično sprovodi preko reaktivnih vrsta kiseonika i azota koji se proizvode u postsinaptičkoj kaskadi (22). Prooksidativni uslovi nisu neophodni, ali oksidansi indukuju apoptozu i doprinose ćelijskoj smrti kad god nastanu u procesu apoptoze. Pokazano je da se nuklearni kB i p53 koji indukuju Bax, osetljivi na oksidativno stanje ćelija (23), što je potkrepljeno time da se apoptoza izazvana PCP-om može prevenirati upotrebom M40403, SOD mimetika (24).

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Rezultati dosadašnjeg ispitivanja su pokazali da ponovljena primena fenciklidina u perinatalnom periodu uzrokuje apoptozu ćelija centralnog nervnog sistema, neposredno nakon aplikacije, ali i pojavu deficita u senzomotornom sprovođenju koja se ispoljava u periodu puberteta i adolescencije pacova i koji odgovara promenama zapaženim u pacijenata obolelih od shizofrenije (25). Pokazano je takođe da se pojava kortikalne apoptoze i deficita u prepulsnoj inhibiciji akustičnog nadražaja može sprečiti primenom superoksid dizmutaznog mimetika M_{40403} (17).

U fiziološkim uslovima se oko 1% elektrona, koji prolaze kroz respiratorni lanac direktno prebacuje na molekularni kiseonik i stvara superoksidni anjon, tako da se promene u sistemu za transport elektrona u

mitohondrijama dramatično odražavaju na produkciju ovog slobodnog radikala. Kod pacijenata obolelih od shizofrenije pokazano je prisustvo poremećaja oksidativne fosforilacije (26), pa je cilj rada bio da se ispita uticaj perinatalne primene PCP, a na aktivnost citohrom C oksidaze u neprečišćenju mitohondrijalnoj frakciji pojedinih struktura mozga pacova starosti koja odgovara peridu adolescencije.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu su korišćeni mladunci pacova odgajani u standardnim laboratorijskim uslovima na konstantnoj temperaturi prostorije i slobodnim pristupom hrani i vodi. Drugog, šestog, devetog, i jedanaestog dana po rođenju životinjama je subkutano aplikovan fenciklidin 10mg/kg telesne težine. Kontrolnoj grupi je na isti način aplikovan 0,9% NaCl. Životinje su žrtvovane u periodu puberteta, 63. dana života. Po dekapitaciji glave su zamrzavane, a zatim su moždane strukture kora, talamus, hipokampus i kaudatus izdvajani na ledu brzim postupkom i odmah homogenizovane u staklenom homogenizatoru sa teflonskim tučkom u 1,5 ml saharoznog medijuma. Postupkom višestrukog centrifugiranja izdvajana je neprečišćena mitohondrijalna frakcija i čuvana na -80°C do određivanja enzimske aktivnosti. U uzorcima je određivan sadržaj proteina spektrofotometrijski modifikovanom metodom po Lowry-ju (27). Aktivnost citohrom C oksidaze je određivana po metodi *Hessa and Pope* (1953). Citohrom C oksidaza oksiduje ferocitohrom C do fericitohroma C. Pad koncentracije ferocitohroma C proporcionalan je smanjivanju ekstinkcije u toku 3-5 min, mereno na 550nm. Na

početku postupka se dobijeni fericitohrom C mora redukovati 1mM rastvorom natrijum ditionata, u ferocitohrom i dalje koristiti u metodi. Uzorak smo pripremili u fosfatnom puferu na pH=7.1 i sa deoksiholatom koji služi da oslobodi citohrom C oksidazu iz membranskih struktura mitohondrija. Inkubacija rastvora ferocitohroma se vrši u vodenom kupatilu na 37°C a po dodavanju u pripremljen uzorak, energično se meša da bi se obezbedila dovoljna količina O₂ za reakciju. Na spektrofotometru je merena promena apsorbance na 550nm. Prilikom izračunavanja specifične aktivnosti citohrom C oksidaze na mg proteina uzimano je u obzir i stvaranje oksidovanog citohroma C i njegov molarni apsorpcioni koeficijent na 550nm. Korišćene su hemikalije i reagensi visokog stepena čistoće proizvođača Merck i Sigma. Svi navedeni rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom.

Statistička obrada podataka urađena je studentovim t testom, Vilkoksonovim testom sume rangova i medijan testom tačne verovatnoće (Fišerovim testom). Ukoliko je verovatnoća nulte hipoteze bila jednaka ili manja od 5% razlika je smatrana statistički značajnom, a ukoliko je bila manja ili jednaka, 1% razlika je smatrana visoko statistički značajnom. Rezultati su prikazivani stubičastim dijagramom.

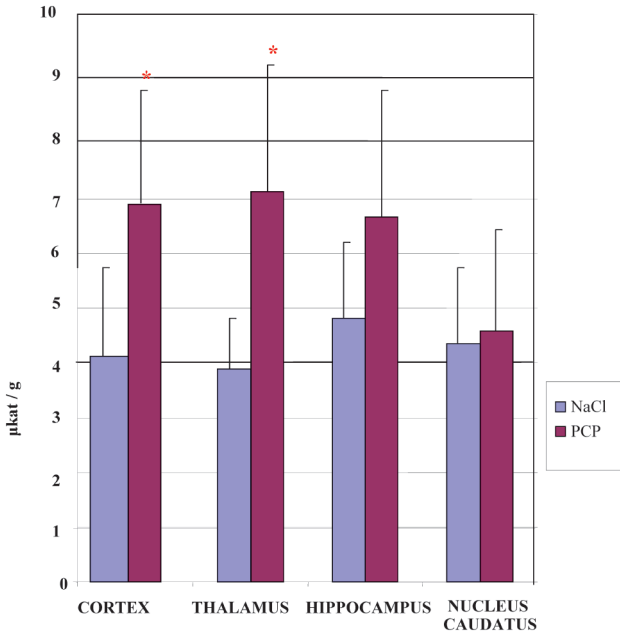
REZULTATI

Specifična aktivnost citohrom C oksidaze u kori mozga životinja perinatalno tretiranih PCP-om iznosila je $6,82 \pm 1,87$ kat/g i bila je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu (166% specifične aktivnosti izmerene u kontrolnoj grupi).

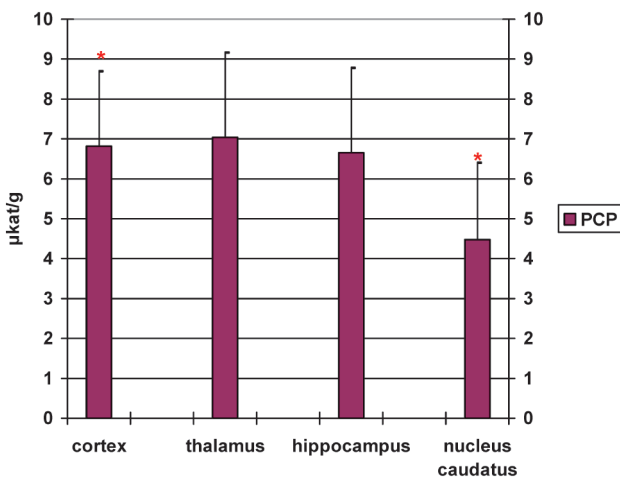
| N | CORTEX | | THALAMUS | | HIPPOCAMPUS | | NUCLEUS CAUDATUS | |
|--------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | NaCl | PCP | NaCl | PCP | NaCl | PCP | NaCl | PCP |
| \bar{X} | 4,0997 | 6,8228 | 3,7256 | 7,0350 | 4,6914 | 6,6514 | 4,3497 | 4,4833 |
| sd | 1,6800 | 1,8717 | 1,1106 | 2,1267 | 1,6247 | 2,1214 | 1,3289 | 1,9183 |
| cv | 41% | 27,43% | 29,81% | 30,23% | 34,63% | 31,89% | 30,55% | 42,79% |
| statistička obrada | We=44 | W _{t_{0,01}} =43 W _{t_{0,05}} =49 | t _e =3,650 | DF=14 t _{0,01} =2,977 | We=50 | W _{t_{0,05}} =49 | We=65 | W _{t_{0,05}} =49 |
| | We < W _{t_{0,05}} | | t _e > t _{0,01} | | We > W _{t_{0,05}} P=0,061>0,05 | | We > W _{t_{0,05}} | |

Tabela 1: Specifična aktivnost citohrom C oksidaze u pojedinim strukturama mozga pacova starosti 63 dana koji su perinatalno tretirani PCP-om ili 0,9% NaCl-om.

Specifična aktivnost ispitivanog enzima u talamusu životinja perinatalno tretiranih PCP-om iznosila je $7,04 \pm 2,13 \mu\text{kat/g}$, a u kontrolnoj grupi životinja $3,73 \pm 1,11 \text{ kat/g}$. Razlika je visoko statistički značajna a u procentima to je 189% aktivnosti enzima u talamusu kontrolne gupe.



Specifična aktivnost enzima je izražena u $\mu\text{kat/g}$
Dijagram 1. Aktivnosti citohrom c oksidaze u pojedinim strukturama mozga pacova starosti 63 dana koje su perinatalno tretirane PCP-om ($n=8$) ili NaCl-om ($n=8$). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.
* $p < 0.05$



Dijagram 2. Aktivnost citohrom C oksidaze u eprečišćenoj mitohondrijalnoj frakciji različitih struktura mozga pacova starih 63 dana koji su perinatalno zlagani dejstvu PCP-a ($n=8$ za svaku strukturu mozga).

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost standardna devijacija
* $p < 0.05$

Aktivnost citohrom C oksidaze u hipokampusu životinja tretiranih fenciklidinom izražena relativnim brojem iznosila je 142% aktivnosti u kontrolnoj gupi koja je primala NaCl, ali razlika nije statistički značajna. I za nukleus kaudatus statistička analiza nije pokazala značajnu razliku među grupama.

Interesantno je istaći da značajna razlika u aktivnosti ispitivanog enzima u grupi pacova izlaganih dejstvu PCP-a perinatalno, koja je merena u adolescenciji životinja jedino postoji između uzoraka korteksa i nukleusa kadatusa. Teoretska vrednost testa sume rangova za ovu veličinu uzorka je $W_t 0,05$ i $W_t 0,001$ jednaka i iznosi 49. Empirijska vrednost dobijena pri poređenju vednosti ispitivanog enzima za strukture korteksa i nukleusa kaudausa $W_e = 49$. Za strukture talamusa i nukleusa kudatusa, $W_e = 53$ i za strukture hipokampusa i nukleusa kaudatusa $W_e = 51$, vece su od empirijske.

DISKUSIJA

Dugotrajna primena fenciklidina uzrokuje redukciju protoka krvi i korišćenja glukoze u životinja (28), što odgovara nalazu smanjenog iskorišćavanja glukoze (29) i sniženog metabolizma neurona u osoba obolelih od shizofrenije (30). Jedan od endogenih pokazatelja ćelijskog energetskog metabolizma u vremenu je aktivnost citohrom C oksidaze koja je regulisana energetskim potrebama. Nalaz značajnog povećanja aktivnosti citohrom C oksidaze u kori mozga i talamusu pacova starosti 63 dana, koji su perinatalno tretirani fenciklidinom, dobijen u našem istraživanju, ukazuje na prisustvo dugotrajnih efekata PCP-a i u skladu je sa neurorazvojnou hipotezom prema kojoj se bar u nekim oblicima shizofrenije primarno oštećenje javlja pre ili perinatalno (31), a funkcionalne posledice ispoljavaju tek u periodu posle puberteta. Zapaženo povećanje aktivnosti citohrom C oksidaze ukazuje na povećanu aktivnost neurona u ovim strukturama. Upravo za promene u funkcijama koje kontroliše korteks ili limbički sistem vezani su mnogi znaci shizofrenije. S obzirom na to da i u fiziološkim uslovima oko 1% elektrona koji prolaze kroz respiratorni lanac vodi stvaranju supeksidnog anjona (32), povećan protok elektrona može uzrokovati povećano stvaranje ovog slobodnog radikala. Superoksidni anjon koji može reagovati sa gvožđe-sumpor centrima brojnih enzima, se brzo unutar ćelije konvertuje u vodonik peroksid pod uticajem superoksid dizmutaze. Značaj SOD u prevenciji promena pokrenutih fenciklidinom je pokazan eksperimentima sa mimetikom superoksid dizmutaze M_{40403} , čija je primena sprečila pojavu fenciklidinom indukovane kortikalne apoptoze i deficita u prepulsnoj inhibiciji akustičnog nadražaja u

životinje (17). Dalje, studija Wei i sar. 2003. (33) na PC12 (feohromocitom pacova) ćelijskoj liniji je pokazala da atipični neuroleptik olanzapin povećava SOD aktivnost i sprečava smanjenje vijabilnosti ćelija i smanjenje nivoa iRNK za SOD-1 koje uzrokuje tretman ovih ćelija vodonik peroksidom.

Prince i saradnici (1997) su pokazali da aplikacija fenciklidina pacovima u toku 28 dana dovodi do smanjenja aktivnosti citohrom C oksidaze u mozgu (34) i da ovi efekti mogu biti značajno ublaženi primenom atipičnih neuroleptika. U ovom eksperimentu su međutim praćeni neposredni efekti subkutane aplikacije fenciklidina odraslim pacovima. U raznim stadijumima na uzorcima *post mortem* uzetim od pacijenata obolelih od shizofrenije a lečenih antipsihoticima pokazana je snižena aktivnost citohrom C oksidaze u različitim moždanim strukturama (26). Pokazano je i smanjenje ekspresije gena koji kodiraju proteine uključene u oksidativni energetski metabolizam u mitohondrijama hipokampusa (35) i povećane iRNA za pojedine subjedinice citohrom C oksidaze u frontalnom korteksu (36). Naši rezultati su u saglasnosti sa pretpostavkom da neurotoksičnost fenciklidina na ovom eksperimentalnom modelu može biti posledica povećanog stvaranja superoksidnog anjona i njegovog delovanja na proteine uključene u regulaciju procesa apoptoze (17). Na istom modelu je određivana koncentracija lipidnih peroksida i pokazano je njihovo statistički značajno povećanje u strukturama hipokampusa (37). Neophodna su dalja istraživanja molekularnih i ćelijskih mehanizama kojima fenciklidin uzrokuje neurotoksične efekte. Sagledavanje uloge promena na nivou respiratornog lanca, kao i uloge oksidativnog stresa u patogenetskom mehanizmu shizofrenije bi moglo dovesti do novih protokola za lečenje, a možda i prevenciju razvoja shizofrenije u osoba sa visokim rizikom za pojavu ovog oboljenja.

ZAKLJUČCI

1. Perinatalna aplikacija fenciklidina pacovima ispoljava dugotrajne i odložane efekte na aktivnost citohrom C oksidaze u mozgu pacova. Ovo zapažanje je u skladu sa neurorazvojnou hipotezom prema kojoj se bar u nekim oblicima shizofrenije primarno oštećenje javlja pre ili perinatalno, dok se funkcionalne posledice ispoljavaju tek u periodu posle puberteta

2. Aktivnost enzima citohrom C oksidaze, koja je pokazatelj inteziteta procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijama statistički je značajno povećana u korteksu i talamusu pacova starih 63 dana koji su u prvih 12 dana života tretirani PCP-om. U hipokampusu i nukleusu kaudatusu u ovih životinja na dolazi do statistički značajne promene aktivnosti citohrom C oksidaze.

3. Naši rezultati su u saglasnosti sa pretpostavkom da neurotoksičnost fenciklidina na ovom eksperimentalnom modelu može biti posledica povećanog stvaranja superoksidnog anjona.

LITERATURA

1. Peter A. Mayes: Biološke oksidacije. U:Harperov pregled biohemije.Prevod XX izdanja Savrem. admin. Beograd 1989;148-168
2. Fisher A. B.: Intracellular production of oxygen-derived free radicals. In: Hallivel B.(Ed.), Free radicals and Tissue Injury. Proc. Upjohn Sympo. FASEB press Rockville, Bethesda, MD. pp 1998; 34-42.
3. Brannan T. S., Maker H. S. Weiss C. and Cohen G.: Regional distribution of glutathione peroxidase in the adult rat brain. J. Neurochem. 1980; 35: 10013-1014.
4. Vitorica J., Machado A. and Satrustegui J.: Age-dependent variations in peroxide- utilizing enzymes form rat brain mitochondria and cytoplasm. J. Neurochem. 1984; 42: 351-356.
5. Gorner Y., Elroy- Stein O., Avraham K. B., Yaron Y., Shikler M., Knobler H. and Rotman G.;Down syndrome clinical symptoms are manifestd in transfected cells and transgenik mice overexpressing the human Cu/Zn- superoksid dismutase gene. J. Physiol. 1990;84: 53-77.
6. Shoffner JM, Wallace DC. Oxydative phosphorylation diseases. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors.The Metabolic and Moekular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill, 1995; 1535-1610.
7. Chinnery PF, Howell N, Andrews RM, Turnbull DM. Clinical mitochondrial genetics. J Med Genet 1999; 36:425-436.
8. Crow T.J.Brain changens and negative symptoms in schizofrenia.Psychopatology 1995; 28: 18-21
9. Kraeplin E.: Dementia Praecox and Paraphrenia: E. and S. Livingston, Edinburgh. 1919.
10. Bens F. M: Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. Brain Res. Rew. 2000; 251-269.
11. Harrison P.J.: The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretacion. Brain 1999; 122: 593-624
12. Olney W. J. Nuri B. and Farber M.D. : Glutamate receotor dysfunction and schiyopfrenia. Arch. Gen. Psychiatry 1995; 52: 998-1007.

13. Petronijević D.N., Paunović R.V. :Neuropatologija shizofrenije. U: Vladimir R. Paunović: Shizofrenija na razmeđu mijenijuma. Med.fekultet Univerzitet u Beogradu, Beograd 2004; 116-121
14. Pellier, V. and Astic, L.: Cell death in the developing olfaktory epithelium of rat embryos. *Dev Brain Res* 1994;79: 307-315
15. Henderson, C.E.: Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 1996; 17:579-585.
16. Varagić V. Milošević M.: Farmakologija XX preadeno i dopunjeno izdanje.Elit medika Beograd 2004;71-72
17. Wang C, McInnis J, West B. et al.: Blocade of phencyclidine-induced cortical apoptosis and deficits in prepulse inhibition by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *J Pharm Exp Ther* 2003; 304: 266-272.
18. Moghaddam et al. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine.*J Neurosci* 1997; 17: 2921-2927
19. Wang C. McInnis J, Ross-Sanchez M. et al.: Long-term behavioral and neuro-degenerative efekts of perinatal phencyclidine administration: implications for shizoprenia. *Neuroscience* 2001; 107:535-550
20. Gunter, T.E. and Pfeiffer, D. R.: Mechanismus by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 1990; 258: C755-C786
21. Vladimir Bumbaširević, Bogdan Đuričić: Molekulske osnova oštećenja, reparacije i smrti ćelije;Med. akademija Srpskog lekarskog društva 1998.
22. Smythes J.: Redoz mechanismus at the glutamate synapse and their significance: a review. *Euro J. Pharmacol.*1999; 370: 1-7
23. Uberti et al.: Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendrologia orgin. *Mol Brain Res* 1999;65: 167-175
24. McInnis et al: The role of superoxide and nuklear factor- kB signaling in NMDA- induce necrosis and apaptosis. *J Pharrmacol Exp Ther* 2002; 301: 478-487
25. Wang et al.: Long-term behavioral and neuro-degenerative effects of perinatal PCP administration: implications for schizopphrenia. *Neuroscience* 2001; 107:535-550
26. Maurer I, Zierz S, Moller H.: Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains form patients With schizoprenia. *Schizophr Res.*2001; 48: 125-136.
27. Lowry,Rosebrough, Farr and Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275
28. Hertzmann C, Reba RC and Kotylarov E.V.: Single photon emission computerized tomography in phencyclidine and related drug abuse. *Am J Psychiatry* 1990; 147: 255-256
29. Jessen F. Scheef L. Germeshausen L. Et al: Reduced hippocampal activation during encoding and recognition of the prefrontal cortex of rat J. *Comp. Neurol.* 2003; 269: 58-72
30. Fannon D. Simmons A. Tennakoon L. et al: Selektive defisit of hippocampal N-acetylaspartate in antypsichotic-naive patients with schizoprenia. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 587-598
31. Goldman-Rakic P. and Selemon I. : Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizoprenia. *Schizophr Bull*,1997; 23:437-457
32. Klein J.A. and Ackerman S.L.: Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin Invest* 2003; 111: 785-793
33. Wai Z. Bai O. Richardson J. S. et al.: Olanzapin protects PC12 cells form oxidative stress induced by hydrogen perokside. *J Neurosci Res* 2003; 73: 364-368
34. Prince J.A. Yassin M.S. Orland L.: Normalization of cytochrome C oxidase activity in the rat brain by neuroleptics after chronic treatment with PCP or methamphetamin. *Neuropharmacology.*1997; 36: 1665-1678
35. Altar C. A. Jurata L.W. Charles V. : Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial Genes in multiple schizoprenia cohorts. *Biol Psychiatri* 2005; 58: 85-96
36. Whatley S. A. Curti D. Marchbanks R. M.: Mitochondrial involvement in schizo-phrenia and other functional psychoses. *Neurochem Res* 1996; 21: 995-1004.
37. Perić S. Uticaj perinatalne primene fenciklidina na koncetraciju lipidnih peroksida u mozgu pacova. *Medicinski podmladak*, 2006; 57(2-3) 25-29