

## EFFECTS OF LONG-TERM ANTIPSYCHOTIC TREATMENT ON ENKEPHALIN-IMMUNOREACTIVE NEURONS IN RATS PERINATALLY TREATED WITH PHENCYCLIDINE

### EFEKTI DUGOTRAJNE PRIMENE ANTIPSIHOTIKA NA ZASTUPLJENOST ENKEFALIN IMUNOREAKTIVNIH NEURONA U MOZGU PACOVA PERINATALNO TRETIRANIH FENCIKLIDINOM

Anja Kompanijec<sup>1</sup>, Bojan Korica<sup>1</sup>, Tihomir Stojković<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Beograd, Srbija

**Correspondence:** [anjakompanijec91@gmail.com](mailto:anjakompanijec91@gmail.com)

#### Abstract

**Introduction:** Schizophrenia is a chronic mental illness that affects 1% of the world's population. The phencyclidine animal model of schizophrenia is based on the glutamate theory of the development of schizophrenia. Enkephalin is a neuropeptide with a role in the development of schizophrenia symptoms via the modulatory effect of neurotransmission.

**Aim:** This study aimed to elucidate whether the long-term treatment with haloperidol and risperidone causes the difference in the appearance of enkephalin-immunoreactive neurons (EIN) in the brain of rats perinatally treated with phencyclidine (PCP).

**Material and methods:** Experimental Wistar rats were treated on postnatal days 2 (PN2), 6, 9, and 12 with either PCP (10 mg/kg) or saline. From PN35 to PN100 haloperidol (3 mg/kg) and risperidone (1 mg/kg) were administered orally in drinking water. Animals were divided into six groups. The control group received saline and drinking water, PCP group received PCP and drinking water. Hal group received saline and haloperidol, PCP-Hal group PCP and haloperidol, while Ris group and PCP-Ris received saline or PCP and risperidone. All animals were sacrificed at PN100 and the cortex, hippocampus, striatum, and septal area were used to analyze the presence of EIN by immunohistochemistry.

**Results:** In the hippocampus, the number of EIN was significantly higher in the PCP group than in the control group. Antipsychotics had a potent effect in the septal area, where both of them decreased the area covered by the EIN compared to the control group. In the striatum, only haloperidol changed the level of EIN by increasing the area covered with these neurons compared to the covered area in the control group.

**Conclusion:** Long-term administration of antipsychotics caused the region-specific change in the distribution of enkephalin-immunoreactive neurons in the brain of a rat, perinatally treated with PCP.

#### Keywords:

schizophrenia,  
phencyclidine,  
haloperidol,  
risperidone,  
enkephalin

## Sažetak

**Uvod:** Shizofrenija je hronično mentalno oboljenje koje pogađa oko 1% populacije. Fenciklidinski animalni model shizofrenije uključuje perinatalnu primenu fenciklidina (PCP) i zasnovan je na glutamatnoj teoriji o razvoju ove psihoze. U terapiji shizofrenije koriste se tipični i atipični antipsihotici. Enkefalin je neuropeptid sa modulatornim uticajem na neurotransmisiju i ulogom u ispoljavanju simptoma shizofrenije.

**Cilj:** Cilj istraživanja bio je ispitivanje efekata hronične primene haloperidola i risperidona na zastupljenost enkefalin imunoreaktivnih neurona u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom.

**Materijal i metode:** Eksperimentalni pacovi vistar (*Wistar*) soja supkutano su tretirani 3, 6, 9. i 12. postnatalnog dana (PN) PCP-om (10 mg/kg) ili natrijum-hloridom (NaCl), a od PN35. do PN100. dana dobijali su oralno haloperidol (Hal, 3 mg/kg/dan), risperidon (Ris, 1 mg/kg/dan) ili vodu za piće. Životinje su bile podeljene u šest grupa. Kontrolna grupa primala je NaCl i vodu, PCP grupa primala je PCP i vodu. Hal grupa primala je NaCl i haloperidol, dok je PCP-Hal grupa dobijala PCP i haloperidol. Grupa Ris primala je NaCl i risperidon, a grupa PCP-Ris primala je PCP i risperidon. Nakon žrtvovanja PN100. dana, u presecima korteksa, hipokampusu, strijatumu i septalne regije određivan je broj enkefalin imunoreaktivnih neurona metodom imunohistohemije.

**Rezultati:** U hipokampusu PCP grupe uočeno je značajno povećanje broja enkefalin imunoreaktivnih neurona u odnosu na kontrolnu grupu, dok antipsihotici nisu izazvali statistički značajne promene. Haloperidol je u strijatumu doveo do povećanja površine prekrivene enkefalin imunoreaktivnim neuronima u odnosu na kontrolnu grupu, dok su u septalnoj regiji i haloperidol i risperidon prouzrokovali smanjenje površine prekrivene enkefalin imunoreaktivnim neuronima u odnosu na površinu u kontrolnoj grupi.

**Zaključak:** Dugotrajna primena antipsihotika dovela je do promena specifičnih regiona u zastupljenosti enkefalin imunoreaktivnih neurona u mozgu pacova perinatalno tretiranih PCP-om.

### Ključne reči:

shizofrenija,  
fenciklidin,  
haloperidol,  
risperidon,  
enkefalin

## Uvod

U širokom spektru psihotičnih poremećaja, shizofrenija zbog svoje značajne prevalencije, ali i zbog svoje multifaktorske i još uvek ne sasvim poznate etiopatogeneze, predstavlja predmet brojnih bazičnih i kliničkih istraživanja (1). Danas se smatra da interakcija između genetske predispozicije i ranih (prenatalnih i perinatalnih) štetnih uticaja faktora sredine utiče na nastanak neurorazvojnih abnormalnosti (2). Brojni dokazi ukazuju na postojanje kako strukturnih promena u određenim delovima mozga, tako i na promenu u funkcionisanju samih neurona i sinapsi (3). Simptomi koji se zapažaju kod obolelih od shizofrenije mogu se podeliti u tri grupe: pozitivne (halucinacije i poremećaji mišljenja po sadržaju), negativne (emocionalna tupost, sniženi voljno-nagonski dinamizmi) i kognitivne simptome (poremećaji pažnje, radne memorije i drugih egzekutivnih funkcija) (4).

Postoje brojne teorije o mehanizmu nastanka shizofrenije, bazirane na promenama u neurotransmiterskim sistemima. Za sada su opšteprihvaćene dopaminska i glutamatna hipoteza shizofrenije, mada se određena uloga u razvoju shizofrenije pripisuje i drugim neuropeptidima. Dopaminska hipoteza shizofrenije pretpostavlja da je povećana aktivnost dopaminergičkog sistema preko D2 receptora u mezolimbickom sistemu (prvenstveno u strijatumu) odgovorna za nastanak pozitivnih simptoma shizofrenije, a smanjena dopaminergička aktivnost u mezokortikalnom području preko D1 dopaminskih receptora za nastanak

kognitivnih simptoma shizofrenije (5). Glutamatna hipoteza pokazala je važnu ulogu ovog sveprisutnog ekscitatornog neurotransmitera u shizofreniji. Najvažniji dokazi o ulozi glutamata u razvoju shizofrenije dobijeni su prvenstveno iz farmakoloških i kliničkih istraživanja kojima je ustanovljeno da vezivanje nekompetitivnih antagonista, poput fenciklidina (PCP), ketamina i dizocilpina za N-metil-D-aspartatni (NMDA) receptor dovodi do nastanka pozitivnih i negativnih simptoma shizofrenije kod zdravih osoba, dok njihova primena kod obolelih od shizofrenije pogoršava ove simptome (6).

Utemeljen na glutamatnoj hipotezi o blokiranju NMDA receptora, ali i na neurorazvojnoj teoriji shizofrenije, prema kojoj dejstvo ranih potencijalno štetnih faktora sredine (npr. virusne infekcije) tokom perioda razvoja mozga dovodi do promena koje su odgovorne za ispoljavanje shizofrenije u odrasloj dobi, fenciklidinski animalni model shizofrenije danas je široko prihvaćen u istraživanjima ovog psihotičnog poremećaja (7).

Farmakološka terapija, kao jedan od tretmana u sklopu integrativnog pristupa u lečenju shizofrenije, bazirana je na upotrebi tipičnih i atipičnih antipsihotika. Dejstvo tipičnih antipsihotika, čiji je predstavnik haloperidol, zasniva se na blokadi D2 receptora u predelu strijatumu (8). Zbog velikog broja neželjenih dejstava tipičnih antipsihotika (razvoj ekstrapiramidalnog sindroma, tardivne diskinezije, hiperprolaktinemije i posledično galaktoreje) izazvanih blokadom D2 receptora i u drugim delovima mozga, danas su sve više u upotrebi atipični antipsihotici poput risperidona,

koji deluju na manji broj dopaminskih receptora, ali i na serotonininske i norepinefrinske receptore, čime prouzrokuju pojavu manjeg broja neželjenih dejstava (9).

Enkefalini su opioidni peptidi iz grupe endorfina. Transkripcijom i traslacijom gena za proopiomelanokortin (POMC) i njegovom daljom obradom nastaju tri familije opioidnih peptida: enkefalini,  $\beta$ -endorfin i dinorfin. U devetnaestom veku su otkrivene dve forme enkefalina: met-enkefalin (koji u svom sastavu ima metionin) i leu-enkefalin (koji u svom sastavu ima leucin). Enkefalini su ligandi za opioidne receptore, sa nešto većim afinitetom prema  $\mu$  (MOPr) i  $\delta$  (DOPr) (10).

Rasprostranjenost enkefalina i njihovih receptora izuzetno je velika i obuhvata nervni sistem, endokrine žlezde (pankreas i srž nadbubrega), ali i jetru, pluća, kosti i kožu. Neuroni koji sintetišu enkefaline, kao i njihovi receptori, prvenstveno su prisutni u hipotalamusu, hipokampusu, strijatumu, amigdaloidnom kompleksu i prefrontalnom korteksu. Zbog svoje široke neuroanatomske rasprostranjenosti, pre svega u limbičkom sistemu, enkefalini kao neuropeptidi zaslužni su za emocionalno ponašanje (osećaj straha, anksioznosti), za način reagovanja na stresne događaje, ali i za modulaciju aktivnosti sistema za nagradu i kaznu. Aktivacijom opioidnih receptora centralnog nervnog sistema primarno nastaje analgezija (aktivacija MOPr kod akutnog bola, a DOPr kod hroničnog bola), ali i sedacija, euforija, sniženje krvnog pritiska i hipoventilacija (11). Brojne studije su pokazale korelaciju između nivoa endogenih opioida i pojave negativnih simptoma shizofrenije (12).

Cilj istraživanja je bio da se ispita efekat hronične primene haloperidola i risperidona na zastupljenost enkefalin imunoreaktivnih neurona u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom.

## Materijal i metode

### Ekperimentalne životinje

U istraživanju su korišćeni pacovi (lat. *Rattus norvegicus*) vistar (*Wistar*) soja. Pacovi su čuvani u transparentnim kavezima od pleksiglasa, obloženim šuškom, sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo, pod standardnim uslovima sredine. Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja) i voda bili su dostupni *ad libitum*. Svi eksperimenti su vršeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije.

### Protokol eksperimenta

Skotne ženke pacova uzete su 14. dana graviditeta i čuvane pojedinačno do okota. Dan okota mladunaca računat je kao nulti postnatalni dan (PN0). Mladunci su tretirani PCP-om u isto vreme tokom PN3, PN6, PN9 i PN12. Fenciklidin (Sigma, SAD) je rastvoren (0,001 g/mL) u fiziološkom rastvoru (0,9% rastvor NaCl u destilovanoj sterilizovanoj vodi) i ubrizgavan je supkutano u zapremini koja odgovara dozi od 10 mg/kg telesne mase. Kao kontrolne životinje korišćeni su mladunci kojima je ubrizgavan fiziološki rastvor u istoj zapremini, u isto vreme

i na isti način kao PCP. Mladunci su bili zadržani u leglima sa majkom do PN30, kada su odvojeni i razvrstani po polu. U daljem eksperimentu korišćeni su samo mužjaci.

Ekperimentalne životinje bile su dalje podeljene u 6 grupa sa po 6 jedinki:

- 1. grupa (kontrola) – pacovi kojima je perinatalno ubrizgavan fiziološki rastvor; od PN35 do PN100 dobijali su kao vodu za piće rastvor sirćetne kiseline (0,1 mol/L u destilovanoj vodi), koja je korišćena kao rastvarač za lekove, razblažen pijaćom vodom (1:100);

- 2. grupa (PCP) – pacovi kojima je perinatalno ubrizgavan PCP; od PN35 do PN100 dobijali su vodu za piće u koju je bio dodat rastvor sirćetne kiseline (0,1 mol/L u destilovanoj vodi) u odnosu 1:100;

- 3. grupa (Hal) – pacovi kojima je perinatalno ubrizgavan fiziološki rastvor; od PN35 do PN100 bili su tretirani oralno haloperidolom (Krka, Slovenija) u dozi od 3 mg/kg t.m. svakodnevno, koji je aplikovan preko vode za piće. Čist haloperidol rastvaran je u odgovarajućoj koncentraciji u sirćetnoj kiselini (0,1 mol/L u destilovanoj vodi), a zatim je pravljeno razblaženje sa pijaćom vodom (1:100) za primenu leka. Doziranje je vršeno u skladu sa podacima o prosečnoj dnevnoj potrošnji vode i telesnoj masi jedinki;

- 4. grupa (PCP-Hal) – pacovi kojima je perinatalno ubrizgavan PCP; od PN35 do PN100 tretirani su oralno haloperidolom po istom principu kao Hal grupa;

- 5. grupa (Ris) – pacovi kojima je perinatalno ubrizgavan fiziološki rastvor; od PN35 do PN100 bili su tretirani oralno risperidonom (Alkaloid, Makedonija) u dozi od 1 mg/kg t.m. svakodnevno, koji im je bio aplikovan preko vode za piće. Čist risperidon rastvoren je u odgovarajućoj koncentraciji u sirćetnoj kiselini (0,1 mol/L u destilovanoj vodi), a zatim je napravljeno razblaženje sa pijaćom vodom (1:100) za primenu leka. Doziranje je vršeno u skladu sa podacima o prosečnoj dnevnoj potrošnji vode i telesnoj masi jedinki;

- 6. grupa (PCP-Ris) – pacovi kojima je perinatalno ubrizgavan PCP; od PN35 do PN100 tretirani su oralno risperidonom po istom principu kao Ris grupa.

Korišćene doze haloperidola i risperidona u skladu su sa prethodnim studijama koje su se bavile ispitivanjem nivoa antipsihotika u krvi pacova (13) i istraživanjima u kojima je ispitivana okupiranost D2 receptora (*in vivo*) pri različitim dozama antipsihotika (14).

Po završetku tretmana antipsihoticima (PN100) životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom. Tkivo mozga prebačeno je u rastvor saharoze rastućeg gradijenta koncentracije (10%, 20%, 30%), a zatim je trenutno zamrzavano uranjanjem u rashlađeni 2-metilbutan. Zamrznuti mozgovi sečeni su na kriokatu (*Leica Instruments*, Nemačka), a debljina isečaka iznosila je 30  $\mu$ m. Za dalju analizu, putem imunohistohemijske metode, odabrani su preseki prefrontalnog korteksa, hipokampus, strijatuma i septalnog područja.

### Imunohistohemijsko bojenje

Na izdvojenim presecima mozga izvršeno je demaskiranje antigena u mikrotalasnoj pećnici u citratnom

puferu (pH = 6) tokom 21 minuta na 800 W. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je 3% rastvorom vodonik-peroksida, nakon čega su uzorci inkubirani sat vremena u kozjem serumu na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja preseki su inkubirani 24h na +4 °C primarnim antienkefalin antitelom (1:200, mišje monoklonsko, *Abcam*, SAD), koji ima afinitet za obe izoforme enkefalina (met-enkefalin, leu-enkefalin), a zatim odgovarajućim sekundarnim antitelom tokom sat vremena, potom i ABC kompleksom u istom vremenskom intervalu 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 se vezan enzim peroksidaza rena (HRP). Potom je usledila inkubacija 3,3'-diaminobenzidinom (DAB), koji je homogeni supstrat za HRP. Tokom ove reakcije došlo je 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 posmatrani pod *Leica DM4000 B LED* mikroskopom sa *Olympus C5060-ADU* digitalnom kamerom *Leica DFC295*, uz korišćenje *Leica Application Suite* (LAS, v4.4.0) softverskog sistema. Kvantifikacija imunohistohemijskog bojenja je rađena pomoću softvera *ImageJ*, tako što je izračunavan broj enkefalin pozitivnih neurona po mm<sup>2</sup> površine u hipokampusu i procenat površine preseka na uveličanju 1:100, pokriven signalom poreklom od enkefalina.

### Statistička analiza

Dobijeni podaci obrađeni su metodama deskriptivne i analitičke statistike. Rezultati su prikazani grafički, stubičastim dijagramima. Aritmetička sredina korišćena je kao mera centralne tendencije, a standardna greška (SEM) kao mera varijabiliteta. Za poređenje među grupama korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), praćena Bonferonijevim (*Bonferroni*) *post hoc* testom. Vrednost  $p < 0,05$  je smatrana za statistički značajnu, a vrednost  $p < 0,01$  za statistički visoko značajnu. Za statističku obradu podataka korišćen je program *OriginPro 8.5*.

## Rezultati

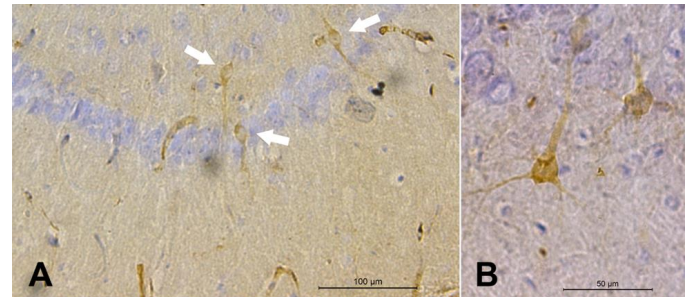
U prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja nisu uočeni enkefalin imunoreaktivni elementi porekla nervnog tkiva.

U hipokampusu su zapaženi enkefalin imunoreaktivni neuroni, prvenstveno u CA1 regiji i *gyrus dentatus*-u (**slika 1**).

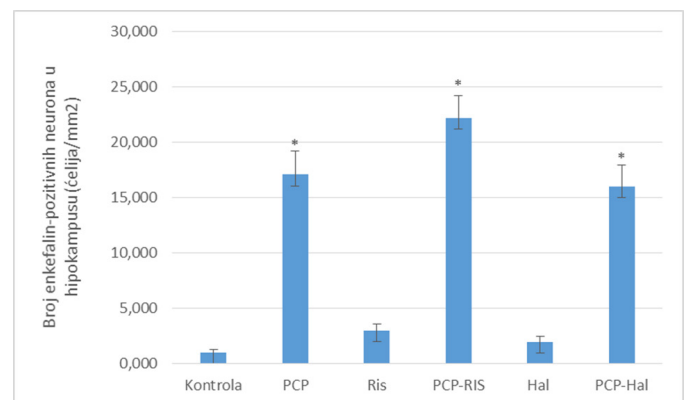
Analizom broja enkefalin imunopozitivnih ćelija u hipokampusu pokazana je statistički visoko značajna razlika među eksperimentalnim grupama ( $F(35,5) = 38,844$ ;  $p < 0,001$ ). Povećanje broja ćelija zapaženo je u PCP, PCP-Ris i PCP-Hal grupi u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,05$ ) (**grafikon 1**).

U strijatumu je zapažena gusta mreža enkefalin pozitivnih vlakana sa varikozitetima jačeg

ili slabijeg intenziteta (**slika 2**). Analizom površine prekrivene enkefalin imunoreaktivnim elementima pokazana je statistički visoko značajna razlika među eksperimentalnim grupama ( $F(35,5) = 30,778$ ;  $p < 0,001$ ). *Post hoc* statističkom obradom pokazana je veća površina zahvaćena signalom u Hal i PCP-Hal grupi u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,05$ ) (**grafikon 2**).

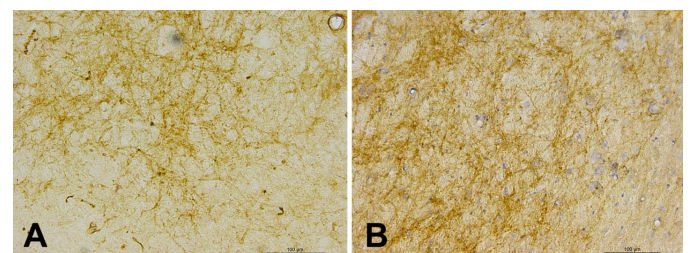


**Slika 1.** Reprzentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja enkefalin pozitivnih neurona (streljica) u hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP). (A) *gyrus dentatus*, uveličanje 100 x; (B) *gyrus dentatus*, uveličanje 200 x.

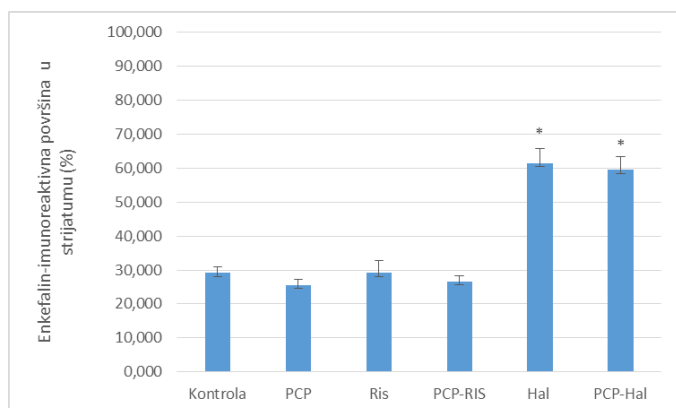


**Grafikon 1.** Broj enkefalin pozitivnih neurona u hipokampusu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± SEM za 6 eksperimentalnih životinja po grupi.

\* –  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu.

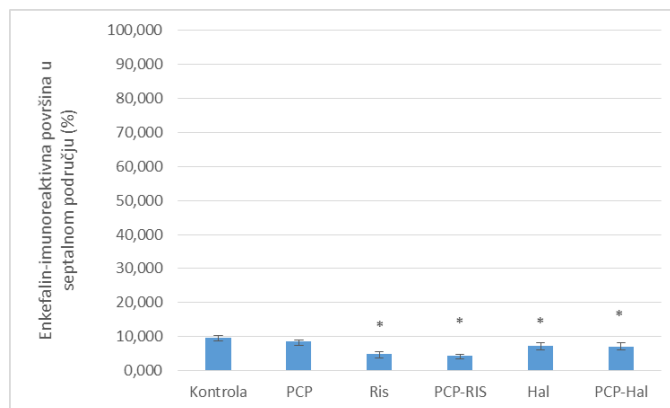


**Slika 2.** Reprzentativni prikaz imunohistohemijskog bojenja enkefalin imunoreaktivnih vlakana u strijatumu pacova u kontrolnoj grupi (A) i nakon primene haloperidola (B).



**Grafikon 2.** Enkefalin imunoreaktivna površina u strijatumu pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao procenat površina pokrivenih signalom koji potiče od enkefalina i kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM za 6 eksperimentalnih životinja po grupi.

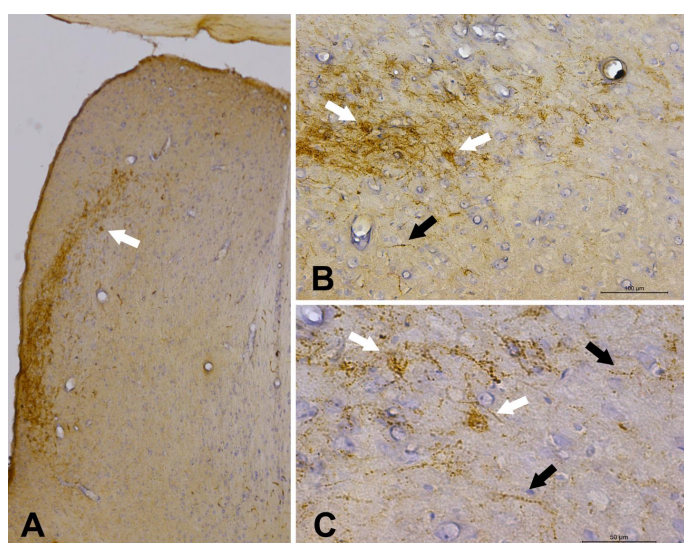
\* –  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu.



**Grafikon 3.** Enkefalin imunoreaktivna površina u septalnoj regiji pacova nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom (PCP) i dugotrajne primene haloperidola (Hal) i risperidona (Ris). Rezultati su prikazani kao procenat površina pokrivenih signalom koji potiče od enkefalina kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM za 6 eksperimentalnih životinja po grupi.

\* –  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu.

Prisustvo značajne enkefalin imunoreaktivnosti zapaženo je u septalnom području u mozgu svih eksperimentalnih životinja. Uočena je mreža enkefalin pozitivnih vlakana sa tačkastim varikozitetima i pojedinačni enkefalin pozitivni perikarioni, dominantno u *nc. septalis lateralis pars intermedia* (slika 3). Analizom površine prekrivene enkefalin imunoreaktivnim elementima pokazana je statistički visoko značajna razlika među eksperimentalnim grupama ( $F(35,5) = 7,480$ ;  $p < 0,001$ ). Dalja analiza pokazala je značajno smanjenje enkefalin imunoreaktivne površine u Ris, PCP-Ris, Hal i PCP-Hal grupama u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,05$ ) (grafikon 3).



**Slika 3.** Reprezentativni prikaz enkefalin imunoreaktivnih vlakana (crna strelica) i perikariona (bela strelica) u septalnoj regiji pacova pri uveličanju 40 x (A), 100 x (B) i 200 x (C).

## Diskusija

Na osnovu rezultata brojnih istraživanja u kojima je kod obolelih od shizofrenije utvrđena disfunkcija neuronoskog kola sastavljenog od glutamatnog neurona, GABAergičkog inhibitornog interneurona i dopaminergičkog neurona, može se izvesti zaključak da se u osnovi ovog poremećaja nalazi neurotransmiterski disbalans, kako u mezolimbickom, tako i u mezokortikalnom sistemu, kao dopaminergičkim putevima centralnog nervnog sistema (15, 16).

Brojnim studijama pokazano je da aktivacija MOPr, koji se predominantno nalaze u predelu prefrontalnog korteksa, dovodi do presinaptičke supresije oslobađanja  $\gamma$ -aminobuterne kiseline (GABA) (17). U želji da ispitamo da li je upravo smanjena aktivnost enkefalin pozitivnih neurona razlog dopaminske hipofunkcije u prefrontalnom korteksu i, posledično, razlog disfunkcije brojnih egzekutivnih funkcija, ispitivali smo nivo imunoreaktivnosti enkefalinskih neurona. Naši rezultati nisu pokazali prisustvo enkefalin pozitivnih neurona u prefrontalnom korteksu ni u jednoj od ispitivanih grupa. Treba, međutim, istaći da su pojedine studije iznele dokaze o povećanoj transkripciji iRNK za MOPr u predelu prefrontalnog korteksa kod životinja obolelih od shizofrenije (18). Uprkos dosadašnjim studijama o uticaju enkefalina na razvoj i tok shizofrenije, ne može se izvući jednostavan zaključak o njegovom dejstvu u predelu prefrontalnog korteksa, čime se ostavlja prostor i za dalja istraživanja u ovom domenu.

Nekoliko grupa autora dokazalo je da su bihevi-oralne promene kod obolelih u shizofreniji rezultat neurotransmiterskih promena u mezolimbickom sistemu (19). Imunohistohemijskom metodom, rađenom u našoj studiji, pokazana je statistički značajno povećana enkefalinska imunoreaktivnost aksonalnih projekcija ovog puta u PCP grupi, dok u ostalim grupama nije uočena značajna

imunoreaktivnost. Dodatne dokaze koji govore o značaju enkefalina u shizofreniji iznale su i brojne studije u kojima je pokazano da *nc. septalis lateralis*, bogat opioidnim, ali i GABAergičkim, D2 i AMPA receptorima (20), igra važnu ulogu u modulaciji ekscitatornih i inhibitornih impulsa pristiglih iz bazalnih ganglija, hipokampusa i ventralnog tegmentnog područja (VTP). Obrađene impulse *nc. accumbens* projektuje u ventralni palidum, talamus, prefrontalni korteks i VTP, gde doprinosi funkciji sistema za nagradu, motivaciju, kogniciju i adikciju (21).

U literaturi se mogu naći podaci o prisutnosti DOPr u hipokampusu, amigdali, *nucleusu accumbensu*, *caudatusu*, putamenu (22). Aktivacija DOPr dovodi do povećane sinteze neurotrofnog moždanog faktora (BDNF) (23). Pretpostavke o povezanosti BDNF i shizofrenije datiraju iz brojnih istraživanja u kojima je potvrđen pozitivan uticaj BDNF na sinaptogenezu, na aktivnost NMDA (utiče na fosforilaciju subjedinica receptora) i AMPA receptore (utiče na njihov položaj i ekspresiju u sinaptičkoj pukotini), kao i negativan uticaj BDNF na GABAergičku transmisiju (24,25). Kada je reč o aktivnosti enkefalina u hipokampusu, naše istraživanje, izvršeno metodom imunohistohemije, pokazalo je statistički značajno povećanje ekspresije enkefalina u predelu hipokampusa kod pacova tretiranih PCP u odnosu na kontrolnu grupu, dok haloperidol i risperidon nisu izazvali promenu u aktivnosti enkefalina kod ispitivanih životinja. Slični rezultati dobijeni su i u studijama koje su ispitivale ekspresiju enkefalina u hipokampusu nakon izlaganja eksperimentalnih životinja stresnim činiocima spoljašnje sredine. Kod obolelih od shizofrenije putem brojnih studija zapažena je smanjena glutametrička neurotransmisija, pa se postojanje razlike u ekspresiji enkefalina moglo smatrati pokušajem organizma da se putem dejstva enkefalina na DOPr uspostavi ushodna regulacija NMDA receptora (26).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su potentni efekat antipsihotika na enkefalinske neurone u predelu lateralnog septalnog jedra. Naime, risperidon, kao predstavnik atipičnih antipsihotika, statistički je značajno snizio nivo imunoreaktivnosti ovih neurona, dok je haloperidol, kao predstavnik tipične grupe antipsihotika, imao manje potentan efekat. Prema podacima koji se mogu naći u dostupnoj literaturi, septalna regija bogata je prvenstveno nocioceptivim enkefalinskim receptorima (NOR) (27). Aktivacijom ovih receptora nastaju indirektna inhibicija MOPr, otvaranje kalijumskih kanala, kao i inhibicija kalcijumskih kanala. Kako je prema glutamatnoj teoriji shizofrenije razvoj alogije, apatije, ahedonije i socijalnog povlačenja uslovljen smanjenom funkcijom NMDA receptora, onda se dobijeni rezultati o efektima risperidona i haloperidola mogu smatrati još jednim mehanizmom kojim antipsihotici povoljno deluju na negativne simptome shizofrenije.

## Zaključak

Naše istraživanje pokazalo je značajan efekat perinatalnog tretmana fenciklidinom i hroničnom oralnom terapijom antipsihoticima na zastupljenost enkefalin

pozitivnih neurona u mozgu pacova. Fenciklidinski tretman izazvao je povećanje zastupljenosti ovih neurona u predelu hipokampusa u odnosu na kontrolnu grupu. Antipsihotici u hipokampusu nisu ispoljili nikakav efekat, dok su u predelu septalne regije uzrokovali smanjenje površine pod enkefalin pozitivnim neuronima u odnosu na jedinke koje nisu bile pod dugotrajnom terapijom antipsihoticima. Nasuprot tome, tipični antipsihotik, haloperidol, doveo je do povećanja površine pod enkefalin pozitivnim neuronima u strijatumu, kako u Hal, tako i u PCP-Hal grupi.

## Literatura

1. Jablensky A. Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2000; 250:274-85.
2. Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*. 1999; 122(4):593-624.
3. Osimo EF, Beck K, Reis Marques T, Howes OD. Synaptic loss in schizophrenia: a meta-analysis and systematic review of synaptic protein and mRNA measures. *Mol Psychiatry*. 2019; 24(4):549-61.
4. Lakić A, Munjiza M, Timotijević I. Shizofrenija. U: Gašić Jašović M, Toševski Lečić D. Urednici. Psihijatrija, udžbenik za studente medicine. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2014. p.112-28.
5. Bubeniková-Valesová V, Horáček J, Vrajová M, Höschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32:1014-23.
6. Morris BJ, Cochran SM, Pratt JA. PCP: from pharmacology modeling schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5(1):101-6.
7. Grayson B, Barnes SA, Markou A, Piercy C, Podda G, Neill JC. Postnatal Phencyclidine (PCP) as a Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia Pathophysiology and Symptomatology: A Review. In: Kostrzewa RM, Archer T. Editors. Neurotoxin Modeling of Brain Disorders—Life-long Outcomes in Behavioral Teratology. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Vol 29. Cham: Springer. 2015; p.403-28.
8. Agarwal SM, Hahn MK, Taylor VH, Kowalchuk C, Costadookhan KA, Remington GJ, et al. Antipsychotics, Metabolic Adverse Effects, and Cognitive Function in Schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2018; 9:1-12.
9. Crossley NA, Constante M, McGuire P, Power P. Efficacy of atypical v. typical antipsychotics in the treatment of early psychosis: Meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2010; 196(6):434-9.
10. Takahashi A. Enkephalin. In: Ando H, Kazuyoshi U, Shinji N. Editors. *Handbook of hormones: comparative endocrinology for basic and clinical research*. 1st ed. Cambridge: Academic Press. 2016. p. 91-4.
11. Henry MS, Gendron L, Tremblay ME, Drolet G. Enkephalins: Endogenous Analgesics with an Emerging Role in Stress Resilience. *Review. Neural Plast*. 2017:1546125.
12. Trezza V, Damsteegt R, Achterberg EM, Vanderschuren L. Nucleus accumbens  $\mu$ -opioid receptors mediate social reward. *J Neurosci*. 2011; 31(17):6362-70.
13. Terry AV Jr, Hill WD, Parikh V, Evans DR, Waller JL, Mahadik SP. Differential effects of chronic haloperidol and olanzapine exposure on brain cholinergic markers and spatial learning in rats. *Psychopharmacol*. 2002; 164:360-8.
14. Kapur S, VanderSpek SC, Brownlee BA, Nobrega JN. Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(2):625-31.
15. Javitt DC. Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine-Glutamate Interactions. *Int Rev Neurobiol*. 2007; 78(6):69-108.
16. Hanania T, Johnson KM. Regulation of

- NMDA-stimulated [14C] GABA and [3H] acetylcholine release by striatal glutamate and dopamine receptors. *Brain Res.* 1999; 844(1-2):106-17.
17. Liao D, Lin H, Law PY, Loh HH. Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(5):1725-30.
18. Börner C, Kraus J, Schröder H, Ammer H, Höllt V. Transcriptional regulation of the human  $\mu$ -opioid receptor gene by interleukin-6. *Mol Pharmacol.* 2004; 66(6):1719-26.
19. Lidsky TI. Reevaluation of the mesolimbic hypothesis of antipsychotic drug action. *Schizophr Bull.* 1995; 21(1):67-74.
20. Prensa L, Giménez-Amaya JM, Parent A. Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum. *J Comp Neurol.* 1999; 413(4):603-18.
21. Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM, Ferguson SM. The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. *Neuroscience.* 2015; 301:529-41.
22. Broom DC, Jutkiewicz EM, Rice KC, Traynor JR, Woods JH. Behavioral effects of delta-opioid receptor agonists: potential antidepressants? *Japanese J Clin Pharmacol Ther.* 2002; 90(1):1-6.
23. Torregrossa MM, Jutkiewicz EM, Mosberg HI, Balboni G, Watson SJ, Woods JH. Peptidic delta opioid receptor agonists produce antidepressant-like effects in the forced swim test and regulate BDNF mRNA expression in rats. *Brain Res.* 2006; 1069(1):172-81.
24. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:677-736.
25. Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho R, Correia SS, Backos DS et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2007; 282(17):12619-28.
26. Slack SE, Pezet S, McMahon SB, Thompson SW, Maccangio M. Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 2004; 20(7):1769-78.
27. Connor M, Vaughan CW, Chieng B, Christie MJ. Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurons in vitro. *Br J Pharmacol.* 1996; 119(8):1614-8.