

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Ana D. Stanojević

**MODELIRANJE MEHANIZMA UTICAJA
ETANOLA NA NELINEARNA
DINAMIČKA STANJA HIPOTALAMO-
HIPOFIZNO-ADRENALNOG SISTEMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Ana D. Stanojević

**MODELING THE MECHANISM OF
ETHANOL EFFECT ON NONLINEAR
DYNAMICAL STATES OF THE
HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL
SYSTEM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentori:

Dr Dragomir Stanisavljev, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Dr Željko Čupić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za katalizu i hemijsko inženjerstvo

Članovi komisije:

Dr Dragomir Stanisavljev, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Dr Željko Čupić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za katalizu i hemijsko inženjerstvo

Dr Ljiljana Kolar-Anić, profesor emeritus

Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Dr Ana Popović-Bijelić, docent

Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Dr Vladimir Marković, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Dr Danijela Vojnović Milutinović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Datum odbrane: _____

Izjave zahvalnosti

Ova doktorska disertacija je izrađena u okviru projekta br. 172015, „Dinamika nelinearnih fizičko-hemijskih i bioloških sistema sa modeliranjem i predviđanjem njihovih ponašanja pod neravnotežnim uslovima“, finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Ogromnu zahvalnost dugujem pre svega prof. dr Ljiljani Kolar-Anić bez koje verovatno nikada ne bih upoznala čari nelinearne dinamike, i koja je bila i ostala moja velika inspiracija, ne samo poslovno, već i u privatnom životu.

Svojim mentorima, dr Željku Čupiću i prof. dr Dragomiru Stanisavljevu, zahvaljujem na svim konstruktivnim usmeravanjima, savetima i podršci koju su mi pružili tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije, od ideje, razvoja modela, prvih simulacija, do konačne verzije njenog teksta.

Dr Vladimiru Markoviću mnogo hvala na svim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije, i velikoj podršci u trenucima kada stvari nisu išle baš onako kako sam planirala.

Ogromnu zahvalnost dugujem doc.dr Ani Popović-Bijelić na detaljnom čitanju moje disertacije i velikom broju izuzetno korisnih saveta i sugestija. Pored njenog naučnog doprinosa disertaciji, hvala joj i za pozitivnu energiju koju je prenosila na mene.

Veoma sam zahvalna dr Danijeli Vojnović Milutinović, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu na trudu i vremenu koje je posvetila čitanju moje doktorske disertacije. Njeni komentari i sugestije su obogatili ovu disertaciju i značajno doprineli njenom kvalitetu.

Zahvaljujem se prof. dr Vladani Vukojević sa Karolinska Instituta u Stokholmu koja je u svom pretrpanom rasporedu uvek nalazila vremena da prouči rezultate mojih numeričkih simulacija i predloži nove ideje.

Hvala i kolegama sa projekta, Ani Ivanović-Šašić, Maji Pagnacco, Jeleni Maksimović, Stevanu Maćešiću, Itani Nuši Bubanji, Branislavu Stankoviću i Kristini Stevanović na podršci i motivaciji. Naročito Stevanu, koji me je svakodnevno bodrio tokom pisanja ove disertacije.

Dušanu, prijatelju i kolegi koji me je tokom svih ovih godina našeg druženja uvek uveravao da mogu još više i još bolje.

I na kraju, mojoj porodici, roditeljima i sestri Sanji, na ljubavi i strpljenju koje su mi pružili, ne samo tokom izrade ove disertacije, već tokom celokupnog školovanja.

Modeliranje mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema

Rezime

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja etanola na dinamička stanja biohemijskih procesa koji čine hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osu (HPA, od eng. *hypothalamic-pituitary-adrenal*). HPA osa objedinjuje hipotalamus, hipofizu i koru nadbubrežnih žlezda u jednu celinu.

HPA osa je dinamički neuroendokrini sistem kojeg čine hipotalamus, hipofiza i kora nadbubrežnih žlezda. Složena mreža biohemijskih reakcija koja omogućuje funkcionisanje ovog sistema reguliše nivoe steroidnih hormona (kortizola, kortikosterona, aldosterona i drugih) i peptidnih hormona (kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH), adrenokortikotropni hormon (ACTH) i drugih) u krvotoku. HPA osa predstavlja glavni neuroendokrini sistem kod sisara koji omogućuje brzi odgovor i odbranu od stresa, gde se pod stresom podrazumeva svaka perturbacija HPA ose. Glukokortikoidni hormoni (kortizol i kortikosteron) od vitalnog su značaja za sisare jer regulišu mnoge fiziološke funkcije, uključujući metabolizme glukoze, masti i proteina. Pored toga, glukokortikoidni hormoni deluju antiinflamatorno i imunosupresivno i utiču na raspoloženje i kognitivne funkcije čoveka.

Dinamika HPA ose je veoma složena. Pod normalnim fiziološkim uslovima, tzv. bazalnim uslovima, dinamika HPA ose je okarakterisana cirkadijalnim (dnevnim) ritmom, čiji period iznosi oko 24 h; i ultradijalnim (unutardnevnim) ritmom lučenja hormona, čiji period može biti od 20 minuta do 2 sata. Dodatno, aktivnost HPA ose se povećava kada je organizam izložen stresu.

Mnoge supstance koje deluju psihoaktivno, kao što je to etanol, utiču na aktivnost HPA ose. Osnovne karakteristike uticaja etanola na aktivnost HPA ose su otkrivene sveobuhvatnim istraživanjima na osnovu kojih je utvrđeno da se primarni efekat etanola na HPA osu vrši putem oslobađanja CRH u krvne sudove koji povezuju hipotalamus i

hipofizu, što zauzvrat utiče na nivo drugih peptidnih hormona, uključujući ACTH i beta-endorfin. Međutim, posledice tih interakcija na HPA osu još uvek nisu dovoljno dobro razjašnjene, uzevši u obzir kontardiktorne eksperimentalne rezultate. Kao posledica toga, postoji potreba za rasvetljavanjem detaljnih mehanizama interakcije etanola sa neuroendokrinim sistemom.

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je nadogradnja i adaptacija postojećeg matematičkog modela HPA ose kako bi se opisao efekat etanola na njenu aktivnost. U okviru ove doktorske disertacije osnovni stehiometrijski model HPA ose je dopunjen i proširen uvođenjem novih hemijskih vrsta i novih reakcija u cilju detaljnijeg i sveobuhvatnijeg opisivanja biohemijskih procesa koji se nalaze u osnovi HPA ose. Zatim je model dodatno proširen u cilju opisivanja uticaja etanola na HPA osu. Postavljen je stehiometrijski model koji opisuje aktivnost HPA ose i kvantitativno se slaže sa eksperimentalnim/kliničkim podacima dostupnim u literaturi. Korišćenjem numeričkih simulacija i teorijskih pristupa razvijenih u oblasti nelinearne dinamike neravnotežnih procesa (teorija perturbacija – prigušivanje oscilacija malih amplitude i teorija bifurkacija), dobijen je uvid u to kako akutno i hronično konzumiranje etanola utiče na dinamiku HPA ose. Na kraju, predviđanja modela su upoređena sa objavljenim rezultatima kliničkih i eksperimentalnih studija. Naime, postoje eksperimentalne studije koje su pokazale da etanol može povećati koncentraciju kortizola u krvi. Međutim, druge studije pokazuju da etanol smanjuje koncentraciju kortizola u krvi, dok se u literaturi mogu naći i eksperimentalna istraživanja koja su pokazala da etanol nema uticaja na koncentraciju kortizola u krvi. Dobijeni rezultati numeričkih simulacija mogu da pomognu u rasvetljavanju oprečnih eksperimentalnih rezultata objavljenih u literaturi. Tako se pokazuje da modeliranje mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja HPA sistema može da doprinese boljem planiranju eksperimentalnih istraživanja i boljem razumevanju poremećaja izazvanih uzimanjem alkohola.

Modeliranje mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja HPA sistema ukazuje na to da etanol menja dinamičku regulaciju aktivnosti HPA ose tako što utiče na amplitude unutardnevnih oscilacija hormona HPA ose. Veličina amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola određuje prag osetljivosti sistema na stres. Ovi efekti su složeni.

Akutna perturbacija sistema niskim i srednjim koncentracijama etanola može da smanji, ne promeni, ili poveća amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola, zavisno od intenziteta perturbacije, kao i faze unutardnevne i dnevne oscilacije u kojoj se perturbacija odigrava. Ovakvo ponašanje nudi potencijalno objašnjenje za kontradiktorne eksperimentalne rezultate. Suprotno tome, akutne perturbacije visokim koncentracijama etanola trenutno povećavaju nivo kortizola i amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola na način na koji odgovor sistema zavisi samo od doze etanola, i utiče na aktivnost HPA ose i tokom narednog dana ili čak tokom nekoliko narednih dana. Hronično izlaganje etanolu kvalitativno menja dinamiku HPA ose, dok toksični nivoi etanola gase mehanizam dinamičke regulacije.

Naučni doprinos ove doktorske disertacije je razvijanje matematičkog modela HPA ose koji može da opiše uticaj alkohola na različita dinamička stanja HPA sistema i, na taj način, pomogne u rasvetljavanju naizgled kontradiktornih eksperimentalnih rezultata objavljenih u literaturi.

Ključne reči: Nelinearna dinamika, modeliranje dinamičkih stanja, samoorganizacija nelinearnih biohemijskih sistema, hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa (HPA), etanol, stehiometrijski model, akutne perturbacije, hronične perturbacije.

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Fizička hemija - Biofizička hemija i dinamika neravnotežnih procesa; i Fizička hemija – Hemijska kinetika.

UDK broj: 544.42

Abstract

The research topic of this doctoral thesis is to examine the influence of ethanol on the dynamical states of biochemical processes underlying the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. HPA axis incorporates the hypothalamus, pituitary and adrenal glands into one entity.

HPA axis is a dynamical neuroendocrine system, which brings together the functions of hypothalamus, pituitary and adrenal glands. A complex network of biochemical reactions, which enables functioning of the system, regulates the levels of steroid hormones (cortisol in humans, corticosterone, aldosterone, and others) and peptide hormones (corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and others) in the bloodstream. HPA axis represents the main neuroendocrine system in mammals that provides fast response and defense against stress. The glucocorticoid hormones (cortisol and corticosterone) are essential for mammals, since they regulate many physiological functions, including glucose, protein and fat metabolism. In addition, glucocorticoid hormones have anti-inflammatory and immunosuppressive role and affect mood and cognitive function in humans.

The dynamics of HPA axis is very complex. Under normal physiological conditions, the so-called basal conditions, the dynamics of HPA axis is characterized by circadian (daily) rhythm, whose period is about 24 h, and ultradian rhythms of hormone secretion, which may be a period of from 20 minutes to 2 hours. In addition, the activity of the HPA axis is increased when the body is exposed to stress.

Many substances that are psychoactive, such as ethanol, influence the activity of the HPA axis. Basic characteristics of the effects of ethanol on the activity of the HPA axis are detected in comprehensive research on the basis of which it was determined that the primary effect of ethanol on the HPA axis is done through the release of CRH in the portal blood vessels that connect the hypothalamus and the pituitary gland, which in turn affects the level of other peptide hormones, including ACTH and beta-endorphin. However, the effects of these interactions on the HPA axis are not yet sufficiently well clarified, given

the contradictory experimental results. As a result, there is a need for clarification of the detailed mechanisms of interaction of ethanol with the neuroendocrine system.

The main objective of this doctoral thesis is the upgrading and renovation of the existing mathematical model of HPA axis in order to describe the effect of ethanol on its activity. To that in mind, the stoichiometric model that faithfully mimics the activity of the HPA axis and quantitatively agrees with the experimental/clinical data available in the literature is proposed. Using numerical simulations and theoretical approaches developed in the field of nonlinear dynamics of non-equilibrium processes (perturbation theory - the damping of oscillations of small amplitude and bifurcation theory), provided insight into how acute and chronic consumption of ethanol affects the dynamics of the HPA axis. Finally, the model predictions were compared with the published results of clinical and experimental studies. Namely, there are experimental studies that have shown that ethanol can increase the concentration of cortisol in the blood. However, other studies have shown that ethanol reduces blood cortisol levels, while some experimental studies have shown that ethanol has no effect on blood cortisol levels. Numerical simulations have shown that modeling the mechanism of ethanol effect on nonlinear dynamical states of the HPA system can contribute to a better planning of the experimental research and a better understanding of disorders caused by alcohol.

Modeling the mechanism of ethanol effect on nonlinear dynamical states of the HPA system suggests that ethanol alters the dynamical regulation of the HPA axis activity by affecting the amplitude of ultradian oscillations of HPA axis hormones. The magnitude of these amplitudes defines the threshold with respect to which the response to stress is being set. These effects are complex. Low and moderate acute ethanol challenge may reduce, leave unaltered or increase the amplitude of ultradian cortisol oscillations, depending on the intensity of the perturbation and on phase of ultradian and circadian oscillation in which the perturbation occurs. This behavior offers a potential explanation as to why apparently discordant results were observed in experimental studies. In contrast, high-dose acute ethanol challenge increases instantaneous cortisol levels and the amplitude of ultradian cortisol oscillations in a dose-dependent manner, affecting the HPA axis activity also during the following day or even during the following days.

Chronic exposure to ethanol qualitatively changes the HPA axis dynamics, whereas ethanol at intoxicating levels shuts down this dynamic regulation mechanism.

The scientific contribution of this doctoral thesis is to develop a mathematical model of the HPA axis, which can describe the effect of alcohol on the different dynamical states of the HPA system and, thus, helping to clarify apparently contradictory experimental results reported in the literature.

Keywords: Nonlinear dynamics, modelling of the dynamical states, selforganization of nonlinear biochemical systems, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), ethanol, stoichiometric model, acute perturbations, chronic perturbations.

Scientific field: Physical chemistry

Scientific discipline: Physical chemistry – Biophysical chemistry and nonlinear dynamics; and Physical chemistry – Chemical kinetics.

UDC number: 544.42

Popis korišćenih skraćenica

HPA sistem = hipotalamo-hipofizno-adrenalni sistem (od engl. hypothalamic-pituitary-adrenal system)

CRH = kortikotropin-oslobađajući hormon (od engl. corticotropin-releasing hormone)

ACTH = adrenokortikotropni hormon (od engl. adrenocorticotropic hormone)

CORT = kortizol

ALDO = aldosteron

CHOL = holesterol (od engl. cholesterol)

MR = mineralokortikoidni receptori

GR = glukokortikoidni receptori

PVN = paraventrikularno jedro (od engl. paraventricular nucleus)

β -LPH = beta-lipotropin

β -MSH = melanocito stimulirajućeg hormona-beta

β -END = beta-endorfin

PNN = pregnenolon

HPNN = 17- α -hidroksipregnenolon

PGS = progesteron

HPGS = 17- α -hidroksiprogesteron

POMC = proopiomelanokortin

CTS = kortokosteron

TTS = testosteron

EtOH = etanol

AcALD = acetaldehid

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Neravnotežni sistemi, dinamička stanja, samoorganizacija i oscilatornost.....	1
1.1.1. Samoorganizacija u biološkim sistemima.....	2
1.2. Hipotalamo-hipofizno-adrenalni sistem (osa).....	5
1.2.1. Funkcije aldosterona i kortizola.....	8
1.2.2. Povratna sprega u HPA sistemu.....	9
1.2.3. Oscilatorna dinamika u HPA sistemu.....	11
1.3. Holesterol i biosinteza steroidnih hormona.....	13
1.3.1. Holesterol.....	13
1.3.2. Steroidni hormoni i njihova biosinteza.....	15
1.3.2.1. <i>Sinteza kortizola.....</i>	<i>16</i>
1.3.2.2. <i>Sinteza aldosterona.....</i>	<i>18</i>
1.4. Delovanje etanola na HPA osu	19
1.4.1. Alkohol i cirkadijalni ritam.....	23
1.5. Modeli hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema.....	25
1.5.1. Nestehiometrijski modeli HPA sistema.....	26
1.5.2. Stehiometrijski modeli HPA sistema.....	30
1.5.2.1. <i>Minimalni model</i>	<i>30</i>
1.5.2.2. <i>Varijanta minimalnog modela predložena od Markovića i saradnika.....</i>	<i>33</i>
1.5.3. Modeli HPA sistema sa holesterolom.....	33
1.5.3.1. <i>Stehiometrijski petodimenzionalni model HPA sistema sa holesetrolom.....</i>	<i>34</i>
2. CILJ DOKTORSKE DISERTACIJE	37
3. METODE	
3.1. Metode numeričke simulacije	37
3.1.1. Početni uslovi korišćeni u simulacijama koje će biti predstavljene u poglavljima 4.1. i 4.2.....	37
3.1.2. Početni uslovi korišćeni u simulacijama koje će biti predstavljene u poglavlju 4.3.....	38

3.1.3. Početni uslovi korišćeni u simulacijama koje će biti predstavljene u poglavljima 4.4, 4.5 i 4.6.....	38
4. REZULTATI.....	39
4.1. Stehiometrijski model mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja HPA sistema koji sadrži 19 reakcija i 7 dinamičkih promenljivih	39
4.2. Modeliranje perturbacija HPA ose spoljnim holesterolskim pulsevima konačnog trajanja i asimetričnog koncentracionog profila.....	50
4.3. Stehiometrijski model mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja HPA sistema koji sadrži 26 reakcija i 13 dinamičkih promenljivih.....	63
4.4. Stehiometrijski model mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja HPA sistema koji sadrži 34 reakcije i 19 dinamičkih promenljivih	74
4.4.1. Specijalna modifikacija stehiometrijskog modela koji sadrži 34 reakcije za slučaj kada postoji otežano izbacivanje etanola iz organizma	93
4.5. Interakcija cirkadijalnog ritma, HPA ose i etanola.....	101
4.6. Uticaj testosterona na odziv HPA ose na etanol.....	105
5. DISKUSIJA.....	112
6. ZAKLJUČAK.....	124
7. LITERATURA.....	126
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	146
9. PRILOZI.....	149
Prilog 1. Izjava o autorstvu.....	150
Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	151
Prilog 3. Izjava o korišćenju.....	152

1. UVOD

1.1. NERAVNOTEŽNI REAKCIONI SISTEMI, DINAMIČKA STANJA, SAMOORGANIZACIJA I OSCILATORNOST

Reakcioni sistem sačinjavaju reaktanti, produkti i intermedijeri, tj. hemijske vrste koje nastaju i nestaju tokom reakcije. Reakcioni sistem se, pod dejstvom nekog spoljnog parametra koji na njega deluje, može menjati u vremenu i tako doći u stanja koja su udaljena od ravnoteže, koja se nazivaju neravnotežna stanja. Dinamička stanja kroz koja sistem prolazi su karakteristična za date neravnotežne uslove. Ova stanja mogu biti prolazna (tranzijentna) ili ustaljena (neravnotežna stacionarna) [1].

Prolazna (tranzijentna) stanja su privremena stanja kroz koja sistem prolazi na putu do stacionarnog stanja, ili između dva stacionarna stanja. Neravnotežni reakcioni sistem je monostabilan kada za jednu vrednost parametra koji ga izvodi iz ravnotežnog stanja (kontrolnog parametra) postoji samo jedna vrednost stacionarne koncentracije intermedijera, odnosno samo jedno neravnotežno stacionarno stanje. Kada reakcioni sistem može za jednu vrednost kontrolnog parametra imati više vrednosti stacionarnih koncentracija posmatranog intermedijera, odnosno više neravnotežnih stanja, on je multistabilan sistem. Kontrolni parametri mogu biti početne koncentracije hemijskih vrsta u sistemu, konstante brzina reakcija, temperatura sistema, specifičan protok reaktanata. Skup vrednosti koncentracija intermedijera i kontrolnog parametra ili kontrolnih parametara pri kojim se javlja multistabilnost naziva se fazna oblast multistabilnosti ili samo oblast multistabilnosti. Sistem u posmatranom trenutku može biti samo u jednom stanju koje je potpuno određeno vrednostima koncentracija intermedijera. U uslovima multistabilnosti sistemi se samoorganizuju stvarajući dinamičke strukture nesvojstvene polaznom ravnotežnom stanju. Te dinamičke strukture u vremenu i prostoru, koje zavise od udaljenosti i načina udaljavanja sistema od ravnoteže, nazivaju se disipativne strukture. Neprekidan niz neravnotežnih stanja kroz koja sistem prolazi u vremenu predstavlja evoluciju sistema [1-3].

Stacionarna stanja koja odgovaraju jednoj vrednosti kontrolnog parametra mogu biti stabilna i nestabilna. Naizmenično kruženje sistema oko nestabilnog neravnotežnog stacionarnog stanja dovodi do pojave oscilacija u koncentracijama intermedijera [2].

Pored toga što se samoorganizacione pojave dešavaju samo u nekim nelinearnim sistemima u stanjima daleko od ravnoteže, neophodno je da u takvim sistemima postoji povratna sprega, odnosno da produkt ili međuproizvod neke od reakcija utiče na brzinu svog nastajanja ili nestajanja. To znači da u mehanizmu reakcije mora postojati bar jedan autokatalitički ili autoinhibitorski stupanj [1-3].

U najvećem broju hemijskih reakcija, od reaktanata ne nastaju direktno krajnji produkti reakcije, već se ovaj proces odvija preko niza intermedijernih vrsta. U toku hemijske reakcije koncentracije reaktanata monotonno opadaju sa vremenom, dok koncentracije produkata reakcije monotonno rastu sa vremenom sve do dostizanja stanja hemijske ravnoteže. Ukoliko su početne koncentracije intermedijera jednake nuli, njihove koncentracije će tokom vremena monotonno rasti, dostići maksimum, a zatim najčešće monotonno opadati [1]. Međutim, otkrića oscilatornih reakcija su pokazala da ovo nije jedini način na koji se odigravaju hemijske reakcije. Oscilatorne reakcije su one kod kojih koncentracije intermedijera periodično rastu i opadaju tokom vremena, dok se koncentracije reaktanata i produkata reakcije menjaju kaskadno odražavajući periodične promene brzina njihovih nestajanja, odnosno nastajanja [1].

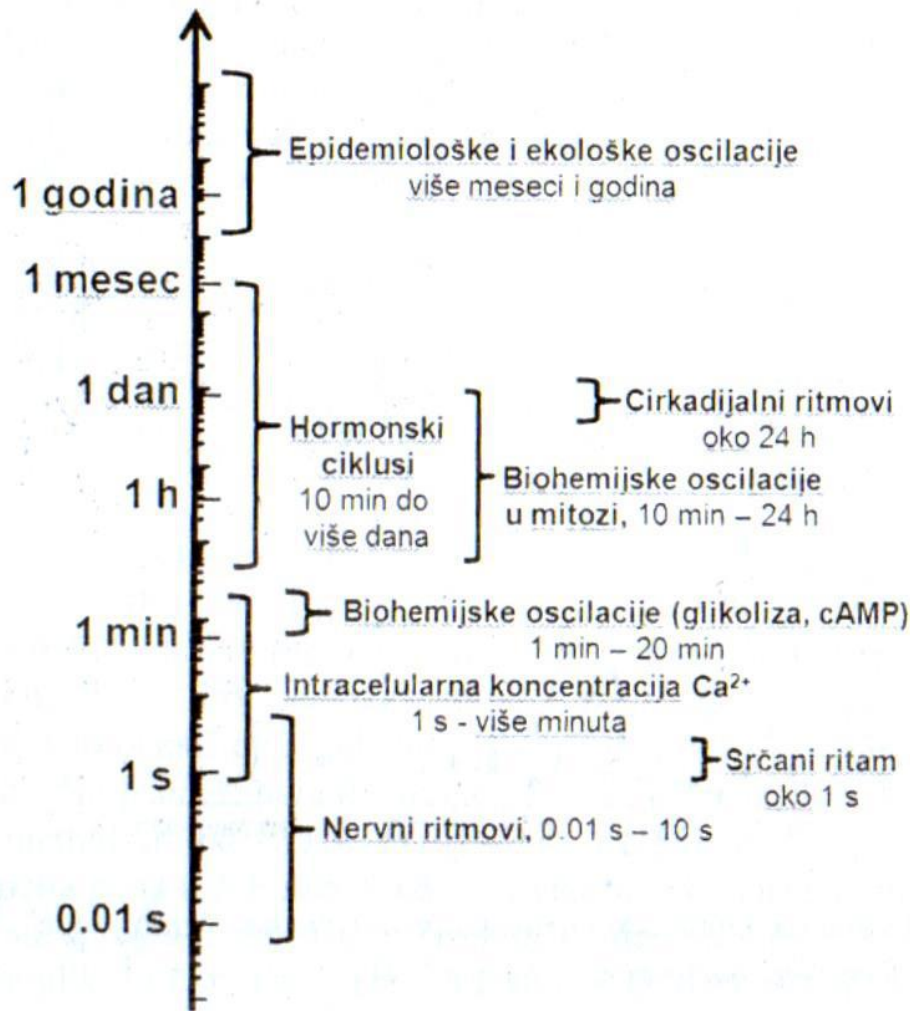
1.1.1. SAMOORGANIZACIJA U BIOLOŠKIM SISTEMIMA

U suštini, svi procesi u živim organizmima mogu pod određenim uslovima ispoljiti neku vrstu periodičnosti [1, 4]. Ovi procesi su sa jedne strane genetski predodređeni (dnevni ritam koji je pod kontrolom centralnog cirkadijalnog sata u suprahijazmatičnom jedru hipotalamusa, kao i pod kontrolom perifernih cirkadijalnih satova u tkivima), a sa druge strane, uslovljeni su i periodičnim promenama spoljnjih parametara do kojih može doći usled smene dana i noći ili usled smene godišnjih doba. Periodična promena spoljnjeg parametra nameće promene procesa u živom sistemu zbog kojih se on mora prilagoditi novim uslovima [1]. Takođe, nezavisno od dnevnih, mesečnih ili godišnjih ritmova

nametnih sistemu, mnogi biohemijski procesi postoje samo u sebi svojstvenim oscilatornim dinamičkim stanjima sa periodama manjim od 24 h [1]. Promena ovog ritma pod uticajem spoljnjih parametara, može biti kobna po posmatrani proces. Pored toga, biohemijski procesi mogu biti dovedeni u oscilatorno stanje u slučaju da iznenadna promena koncentracije nekog od učesnika reakcije dovede do naizmenične promene odnosa zastupljenosti alternativnih procesa u sistemu, odnosno drugih mogućih reakcionih puteva posmatrane složene reakcije. Može se zaključiti da, iako promena spoljnjeg parametra ne mora biti periodična, ona može izazvati periodične promene reakcionih puteva, pa tako i promenu dinamičkog stanja sistema [1].

Da bi se procesi u neživim sistemima odvijali u uslovima daleko od termodinamičke ravnoteže, potrebno je da sistem stalno razmenjuje energiju, ili energiju i masu sa okolinom. U neživim sistemima istraživač nameće spoljnju prisilu biranjem uslova pod kojima će se odigrati reakcija. Za razliku od njih, procesi u živim sistemima se odvijaju spontano kao rezultat unosa hrane, vode i svetlosti i eliminacije nepotrebnih produkata metabolizma. Živi sistemi su i nastali kao rezultat samoorganizacije sistema izvedenog iz ravnoteže pod dejstvom upravo navedenih parametara. Zbog toga, živi sistemi predstavljaju klasičan primer neravnotežnih sistema [1].

Samoorganizacija u živim sistemima se javlja na različitim nivoima organizacije [1, 4-7]. Različiti oblici vremenske samoorganizacije periodičnog karaktera, koji su svojstveni svim živim sistemima, a koji se ispoljavaju na svim nivoima organizacije biosistema, nazivaju se uopšteno biološkim ritmovima. U slučaju da se odigravaju na nivou jedne ćelije zovu se ćelijski ili celularni ritmovi. Periodi bioloških ritmova se razlikuju, odnosno imaju različite vremenske skale (slika 1.) [1]. Osim vremenske, u živim sistemima se sreću i razni oblici prostorno-vremenske samoorganizacije [8].



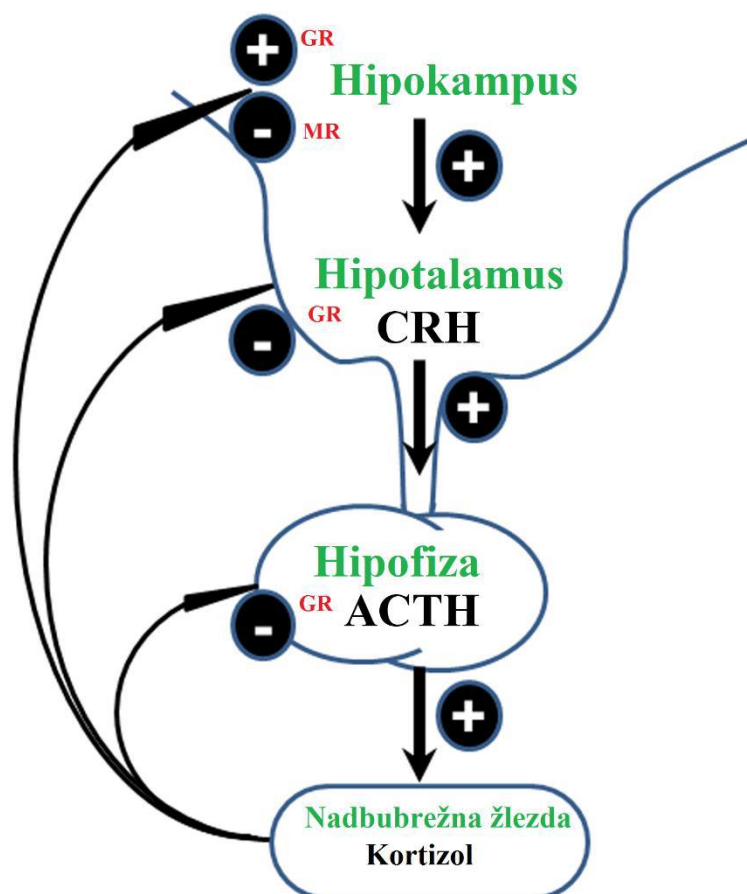
Slika 1. Vremenska skala bioritmovi. Preuzeto iz [1].

Jedan od osnovnih načina samoorganizacije biohemijskih procesa na nivou celog organizma se ostvaruje preko endokrino sistema [1]. Endokrini sistem čine epifiza, hipofiza, štitna žlezda (tireoidea), grdna žlezda (timus), nadbubrežne žlezde, pankreas i polne žlezde (jajnici i testisi). U njima se pod uticajem bilo unutrašnjih, bilo signala iz spoljne sredine, sintetišu hormoni koji se oslobađaju direktno u krv, limfu ili cerebrospinalnu (moždano-moždinsku) tečnost i na taj način dospevaju do odgovarajućih organa u organizmu. Hormoni kontrolišu razvoj muških i ženskih seksualnih odlika, fertilitnost, rast, potrošnju energije, varenje, odgovor na stres, balans tečnosti i elektrolita, održavanje odgovarajućeg krvnog pritiska itd. [9]. Mehanizam hormonske regulacije na nivou celog organizma je složen i sastoji se iz više organizacionih jedinica, odnosno podsistema [1, 9]. Svi ovi podsistemi su međusobno povezani i spregnuti, ali svaki od

njih predstavlja zasebnu funkcionalnu celinu koja obavlja dobro definisanu ulogu u organizmu. U ovom radu analiziraće se jedan podsistem, koji predstavlja spregu nervnog i endokrinog sistema i naziva se hipotalamo-hipofizno-adrenalna (HPA, od eng. *Hypothalamic–pituitary–adrenal*) osa.

1.2. HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-ADRENALNI SISTEM (OSA)

Hipotalamo-hipofizno-adrenalni (HPA) sistem (osa) je složen neuroendokrini sistem čije su glavne anatomske komponente hipotalamus, hipofiza i nadbubrežne (adrenalne) žlezde (slika 2) [9].



Slika 2. Šematski prikaz osnovnih elemenata koji čine HPA sistem [1, 10]. CRH - kortikotropin-oslobađajući hormon, ACTH - adrenokortikotropni hormon, GR – glukokortikoidni receptori, MR – mineralokortikoidni receptori. Plusevi označavaju

pozitivnu povratnu spregu kojom CRH i ACTH utiču na povećanu proizvodnju kortizola i aldosterona u kori nadbubrežne žlezde. Minusi označavaju negativnu povratnu spregu kojom kortizol deluje na GR u hipotalamusu i hipofizi, kao i na MR u hipokampusu, smanjuje sopstvenu produkciju i tako reguliše sopstveno lučenje.

Hipotalamus je deo centralnog nervnog sistema koji objedinjuje i koordinira mnoge endokrine, nervne, vegetativne i imunološke funkcije organizma. Hipotalamus prima poruke iz mnogih izvora u nervnom sistemu [11]. Kod osobe koja je izložena bolu deo bolnih signala se prenosi u hipotalamus. Kod čoveka koga obuzimaju depresivne ili uzbuđljive misli takođe se deo poruka prenosi u hipotalamus. Njušni stimuli koji su posledica ugodnih ili neugodnih mirisa prenose jak signal u hipotalamus. I koncentracije nekih hranljivih materija, elektrolita, vode i različitih hormona u krvi nadražuju ili koče različite delove hipotalamusa. Može se zaključiti da je hipotalamus središte za prikupljanje mnogih informacija koje su nužne za dobrobit ljudskog tela, a mnoge od tih informacija se koriste za kontrolu lučenja važnih hipofiznih hormona [11].

Hipotalamus kontroliše gotovo celokupno lučenje hipofize hormonskim ili nervnim porukama. Hipofiza je mala endokrina žlezda mase oko 0,6 g koja se nalazi na bazi mozga. Kada se hipofiza ukloni sa svog normalnog mesta ispod hipotalamusa i presadi na bilo koje drugo mesto u telu, lučenje različitih hormona, osim prolaktina, izrazito se smanjuje [11]. Lučenje zadnjeg reznja hipofize kontrolišu nervni signali koji nastaju u hipotalamusu i završavaju u zadnjem hipofiznom reznju. Sa druge strane, lučenje prednjeg reznja hipofize kontrolišu hormoni koji se nazivaju hipotalamusni oslobađajući ili hipotalamusni inhibicioni hormoni. Ti hormoni se luče u samom hipotalamusu, a zatim se prenose u prednji reznj hipofize malim krvnim sudovima koji se nazivaju hipotalamusno-hipofizni portni sudovi. U prednjem reznju hipofize ti oslobađajući i inhibicioni hormoni deluju na žlezdane ćelije i kontrolišu njihovo lučenje [11].

Prednji reznj hipofize luči važne hormone: hormon rasta, hormon koji stimuliše štitastu žlezdu (tireotropin), prolaktin, folikulostimulišući hormon, lutinizirajući hormon, kao i adrenokortikotropni hormon (ACTH, Adrenocorticotropic hormone) koji je od najvećeg interesa za ovaj rad.

Na isti način kao što hipotalamus kontroliše lučenje drugih hormona hipofize pomoću oslobađajućih hormona ili faktora, tako se i lučenje ACTH kontroliše preko važnog oslobađajućeg hormona koji se naziva kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH, Corticotropin-releasing hormone) [11]. CRH se luči u primarni kapilarni splet hipofiznog portnog sistema, a zatim se prenosi u prednji režanj hipofize gde podstiče lučenje ACTH. CRH je peptid koji se sastoji od 41 aminokiseline. ACTH u svom sastavu ima 39 aminokiselina.

ACTH aktivira ćelije kore nadbubrežne žlezde da proizvode kortikosteroide (pogledati i poglavlje 1.3) povećavajući količinu cikličnog adenzin-monofosfata (cAMP) koji dalje aktivira nishodne signalne puteve [11]. Pod kortikosteroidima se podrazumevaju svi hormoni koje luči kora nadbubrežne žlezde. Kortikosteroidi se mogu podeliti na glukokortikoide, mineralokortikoide i polne hormone. Mineralokortikoidi su svoje ime dobili po tome što učestvuju u balansu soli i vode u organizmu. Sa druge strane, ime glukokortikoida potiče od njihove uloge u regulaciji metabolizma glukoze. Dva kortikosteroida koje luči kora nadbubrežne žlezde su posebno važna za normalnu endokrinu funkciju organizma: aldosteron, koji je glavni predstavnik mineralokortikoida, i kortizol, koji je glavni predstavnik glukokortikoida [11].

Glavno dejstvo ACTH na ćelije kore nadbubrežne žlezde je aktivacija adenilat ciklaze enzima koji je vezan za unutrašnju površinu ćelijske membrane. To zatim podstiče stvaranje cAMP u citoplazmi, dostižući najveće dejstvo za oko tri minuta. cAMP zatim aktivira ćelijske enzime koji dovode do stvaranja hormona kore nadbubrežne žlezde. To je primer da cAMP deluje kao sekundarni glasnik hormona [11]. U krajnjoj meri ACTH kontroliše lučenje hormona u kori nadbubrežne žlezde aktivacijom enzima protein-kinaze A. Taj enzim katalizuje početno pretvaranje holesterola u pregnenolon (pogledati poglavlje 1.3), a to je upravo prvi stupanj u sintezi svih hormona kore nadbubrežne žlezde. To pokazuje zašto je ACTH neophodan za sintezu ovih hormona. Dugotrajna stimulacija kore nadbubrežne žlezde ACTH-om ne povećava samo sekretornu aktivnost, već izaziva hipertrofiju (preterano povećanje i rast) i proliferaciju (bujanje) ćelija kore, naročito u zonama sinteze kortizola i androgena [11].

Za razliku od kortizola čije lučenje skoro potpuno kontroliše ACTH, lučenje aldosterona kontrolišu, pored ACTH, i joni kalijuma, kao i angiotenzin II delujući direktno na ćelije kore nadbubrežne žlezde [11].

1.2.1. FUNKCIJE ALDOSTERONA I KORTIZOLA

Aldosteron povećava reapsorpciju natrijuma i sekreciju kalijuma u bubrežima. Zapravo, on stimuliše aktivnost natrijum-kalijum pumpe u membrani bubrežnih tubula, pri čemu dolazi do povećanog ulaska natrijuma u ćeliju i izlaska kalijuma iz ćelije. Prema tome, aldosteron izaziva zadržavanje natrijuma u telesnim tečnostima, i izlučivanje veće količine kalijuma mokraćom. Pri višku aldosterona se povećavaju zapremina vanćelijske tečnosti i arterijski pritisak, ali se samo neznatno menja koncentracija natrijuma u plazmi. Previše aldosterona uzrokuje hipokalijemiju i mišićnu slabost, dok premalo aldosterona izaziva hiperkalijemiju toksičnu za srce. Višak aldosterona povećava tubulsku sekreciju vodonikovih jona, što izaziva blagu acidozu, odnosno povećanje kiselosti. Aldosteron stimuliše prenos natrijuma i kalijuma u znojnim i pljuvačnim žlezdama, kao i crevnim epitelnim ćelijama. Takođe, aldosteron veoma podstiče apsorpciju natrijuma u crevima, posebno u debelom crevu, čime se sprečava gubitak natrijuma stolicom [11].

Kortizol stimuliše glikoneogenezu (stvaranje glukoze iz neheksoznih supstrata, kao što su aminokiseline i slobodne masne kiseline) u jetri. On umereno smanjuje i iskorišćavanje glukoze u većini ćelija organizma; smanjuje količine belančevina u ćelijama; povećava količinu proteina u jetri i plazmi; smanjuje prenos aminokiselina u mišićne ćelije, a povećava njihov prenos u krv i u ćelije jetre [11]. Kortizol podstiče mobilizaciju masnih kiselina iz masnog tkiva i time povećava koncentraciju slobodnih masnih kiselina u plazmi, kao i njihovo korišćenje za dobijanje energije. Uprkos tome, kod ljudi kod kojih je povećano lučenje kortizola se razvija poseban tip gojaznosti koju odlikuje preterano nagomilavanje masti u području abdomena. Kortizol je važan za odbranu od stresa [11]. Do povećanog oslobađanja kortizola dolazi usled skoro svake vrste trauma, infekcija, velike toplote ili hladnoće, hirurške intervencije, iscrpljujućih bolesti, primanja injekcija noradrenalina i drugih simpatikomimetičkih lekova, kao i potkožnih injekcija nekrotičnih

materija. Kortizol sprečava razvoj zapaljenja, izaziva smirivanje zapaljenja, sprečava zapaljenjski proces u alergijskim reakcijama, deluje na krvne ćelije i imunitet u zaraznim bolestima [11].

1.2.2. POV RATNA SPREGA U HPA SISTEMU

Kortikosteroidi ostvaruju fiziološke funkcije vezivanjem za svoje receptore. Postoje dve vrste kortikosteroidnih receptora: mineralokortikoidni (MR) i glukokortikoidni receptori (GR) [12, 13].

GR su prisutni u skoro svim ćelijama u telu, dok su MR nađeni u srcu, mozgu, epitelijalnim ćelijama bubrega, debelom crevu i egzokrinim žlezdama. Kada je mozak u pitanju, najviše GR ima u hipotalamusu i hipofizi, dok se najviše MR u mozgu nalazi u hipokampusu. Glukokortikoidi, kao što su kortizol i kortikosteron i, mogu da aktiviraju obe vrste receptora, GR i MR, dok mineralokortikoidi, kao što je aldosteron, aktiviraju samo MR. Pod normalnim fiziološkim uslovima, koncentracija glukokortikoida u mozgu je oko 2000 puta viša od koncentracije mineralokortikoida. Ali, pošto glukokortikoidi imaju deset puta veći afinitet prema MR nego prema GR [1, 10, 14-16], smatra se da su i MR i GR funkcionalno aktivni u mozgu. Detaljni kinetički mehanizmi kroz koje se održava dinamička ravnoteža između doprinosa MR- ili GR-dominantnih reakcionih puteva nisu poznati, ali je u nizu istraživanja pokazan pozitivan uticaj glukokortikoida na ekspresiju CRH ostvaren preko njihovog delovanja na GR u hipotalamusu [17]. Pored toga, pokazano je postojanje negativne povratne sprege na MR u hipokampusu [15].

Aktivacija receptora se odvija tako što se, nakon vezivanja liganda, GR iz citoplazme premeštaju u jedro ćelije, gde interaguju sa specifičnim delovima DNK i time aktiviraju ili inhibiraju transkripciju odgovarajućih gena [10]. Transkripcija gena predstavlja sintezu komplementarnog lanca RNK na osnovu nukleotidne sekvence molekula DNK. Nakon toga, RNK učestvuje u procesu translacije. Translacija predstavlja biosintezu proteina, odnosno prevođenje informacije sadržane u redosledu nukleotida u molekulu RNK u niz aminokiselina u polipeptidnom lancu. Ovi proteini mogu biti enzimi koji stimulišu neki

od koraka u HPA osi ili mogu obavljati neku drugu funkciju specifičnu za tkivo u kome se formiraju.

Aktivirani receptori, osim toga, putem protein-protein interakcija inhibiraju druge transkripcijske faktore, koji su pozitivni regulatori transkripcije više gena uključenih u aktivaciju i rast imunih i drugih ćelija. [9, 10, 15, 16]. Pored toga, glukokortikoidi menjaju stabilnost iRNK i time utiču na biosintezu nekoliko proteina koji reaguju na glukokortikoide, kao i na električni potencijal neurona [10, 17].

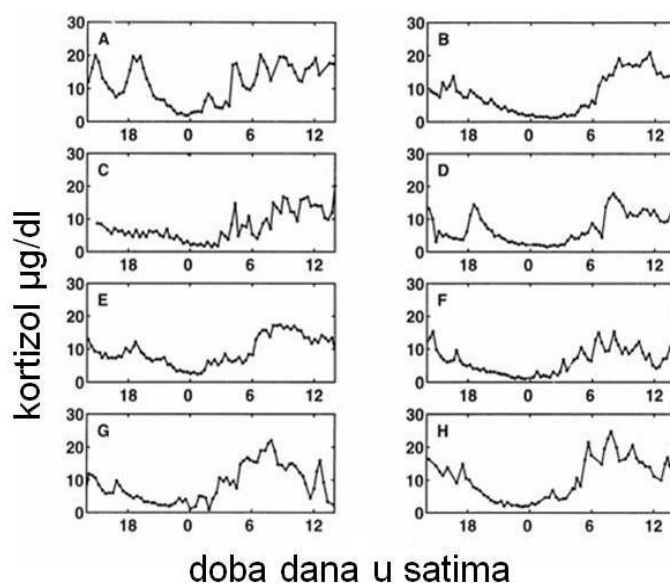
Postoji bliska veza između relativne popunjenosti receptora hormonom i relativne jačine glukokortikoidnog hormonskog odgovora, što ukazuje na to da koncentracija receptora ograničava intenzitet odgovora steroidnih hormona [10].

Samoregulacija HPA sistema se ostvaruje mehanizmima pozitivne i negativne povratne sprege [18-20]. Smatra se da kortizol u najvećoj meri reguliše aktivnost HPA sistema, odnosno svoju sopstvenu proizvodnju. Sa porastom koncentracije kortizola raste inhibicija koju on vrši na hipofizu i hipotalamus. Kada inhibicija postane dovoljno velika, koncentracija kortizola počinje da opada, što dovodi do slabljenja inhibicije, i na taj način se opet pospešuje proizvodnja kortizola [18]. Glavni put kojim se u organizmu ostvaruje negativna povratna sprega u okviru HPA sistema odvija se preko GR u hipotalamusu i hipofizi. Kortizol se vezuje za GR, formirajući kompleks kortizol-GR, koji se vezuje za DNA i reguliše transkripciju određenih gena [18]. Za regulaciju ekspresije ciljnih gena je potrebno određeno vreme, tako da kada je potrebna brza reakcija i supresija aktivnosti HPA sistema, u organizmu se može aktivirati alternativni mehanizam negativne povratne sprege [18, 21-23]. Što se tiče pozitivne povratne sprege u HPA sistemu, smatra se da je ona u stresnim uslovima izazvana porastom koncentracije ACTH, što dovodi do još bržeg porasta koncentracije kortizola [18, 24]. Detalji ovog mehanizma nisu u potpunosti poznati, ali se pretpostavlja da u ovom procesu važnu ulogu ima aktivacija GR u hipokampusu [18, 25, 26].

1.2.3. OSCILATORNA DINAMIKA U HPA SISTEMU

Negativna i pozitivna povratna sprega omogućuju da koncentracije hormona HPA sistema u krvi imaju oscilatornu dinamiku. Na primeru koncentracije kortizola u plazmi krvi može se uočiti da je dnevni ritam HPA sistema složen i sastoji se od unutardnevnih oscilacija superponiranih na dnevne oscilacije koncentracije kortizola (slika 3.) [1, 18, 27].

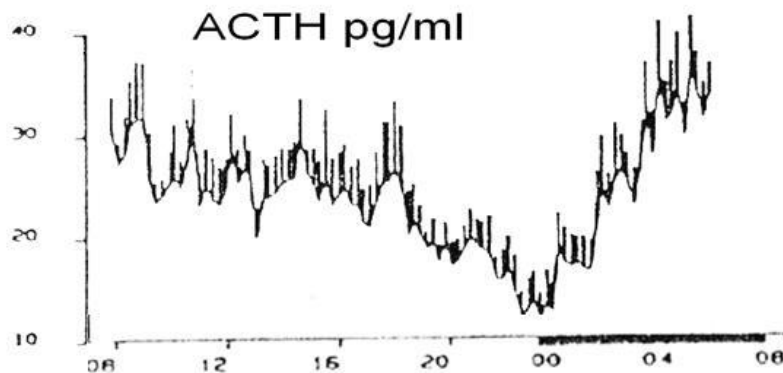
Bazalna (osnovna) aktivnost obuhvata minimum hemijskih procesa koji je dovoljan za obavljanje osnovnih životnih funkcija. Bazalnu aktivnost HPA sistema diktira unutrašnji biološki sat, koji se nalazi u suprahijazmatičnom jedru (SCN, suprachiasmatic nucleus) prednjeg dela hipotalamusa, koji generiše sve dnevne ritmove u organizmu [10, 18, 28-31]. Period dnevnih (cirkadijalnih) oscilacija iznosi približno 24 h. Kod čoveka se uzlazna faza dnevnog ritma koncentracije kortizola odvija u toku noći, a silazna faza u toku dana. U toku noći amplitude unutardnevnih (ultradijalnih) oscilacija koncentracije kortizola su najmanje. Kod većine ljudi dnevni minimum koncentracije kortizola javlja se između 22 h i 4 h ujutru [18, 32]. U toku dnevnog perioda, unutardnevne oscilacije kortizola poseduju veće amplitude, a nivo kortizola dostiže maksimalnu vrednost ujutru, i to kod većine ljudi oko 8 h ujutru [18, 33].



Slika 3. Mereni dnevni profili kortizola dobijeni uzimanjem uzoraka krvi svakih 20 minuta, kod osam zdravih muškaraca A – H) [10, 27].

Novija istraživanja su pokazala da unutarnevne oscilacije kortizola mogu postojati i kada je suprahijazmatično jedro znatno oštećeno, što ukazuje na to da su unutarnevne oscilacije u HPA sistemu samoodržive [18, 34]. One nastaju zahvaljujući mehanizmima negativne i pozitivne povratne sprege na nivou hipofize i nadbubrežnih žlezda i za njihovo odvijanje nisu neophodni ritmični signali iz hipotalamusa [34]. Kod čoveka, period unutarnevnih oscilacija koncentracije kortizola nalazi se u opsegu od 20-120 min [15, 35, 36].

Takođe, i vremenska evolucija ACTH (slika 4.), CRH i aldosterona u plazmi krvi pokazuje složenu oscilatornu dinamiku, sa spregnutim unutarnevnim i dnevnim oscilacijama [10, 18, 37-40].

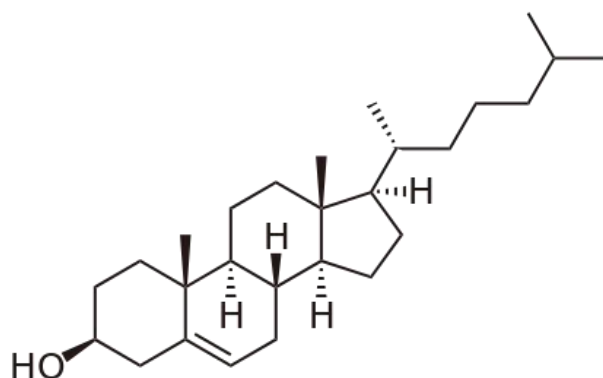


Slika 4. Dnevni ritam sekrecije ACTH [10, 41].

1.3. HOLESTEROL I BIOSINTEZA STEROIDNIH HORMONA

1.3.1. HOLESTEROL

Holesterol je najznačajniji predstavnik steroida (slika 5.). On se nalazi u ishrani svih ljudi i polako se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta u intestinalnu limfu. Vrlo je rastvorljiv u mastima, ali vrlo slabo u vodi. Sposoban je da formira estere sa masnim kiselinama. Skoro 70 % holesterola u lipoproteinima plazme nalazi se u obliku holesterolskih estara [11].



Slika 5. Holesterol.

Pored holesterola koji se svakodnevno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, takozvanog egzogenog holesterola, još veća količina holesterola se stvara u ćelijama tela, takozvani endogeni holesterol [11]. U suštini skoro sav endogeni holesterol koji cirkuliše u lipoproteinima plazme nastaje u jetri, ali isto tako, u svim ćelijama organizma nastaje makar mala količina holesterola, što je u skladu sa činjenicom da su membranske strukture ćelija izgrađene od holesterola [11].

Osnovnu građu holesterola čini sterolni nukleus. On je u potpunosti sintetisan od mnogobrojnih molekula acetil-CoA (CoA – koenzim A). U stvari, sterolni nukleus se može modifikovati nizom različitih bočnih lanaca i tako nastaju holesterol, holna kiselina, koja je osnov stvaranja žučnih kiselina u jetri, i veliki broj steroidnih hormona koje luče kora nadbubrežne žlezde, jajnici i testisi [11].

Neesterifikovani holesterol ulazi u sastav bioloških membrana gde ima važnu ulogu u održavanju odgovarajuće fluidnosti membrane. Sa povećanjem količine holesterola u membrani njena fluidnost se smanjuje i obrnuto. Upravo specifičan oblik pojedinih ćelija (npr. eritrocita) zavisi od odgovarajućeg stepena fluidnosti ćelijske membrane. Esterifikovani holesterol se nalazi u sastavu lipoproteinskih čestica i lipidnih kapljica u citosolu ćelija [42]. Najveći deo holesterola koji ne služi za izgradnju membrana u organizmu se upotrebljava za stvaranje holne kiseline u jetri. Holesterol koriste

nadbubrežne žlezde, jajnici i testisi za sintezu steroidnih hormona. Velike količine holesterola se talože u rožnatom sloju kože, gde zajedno sa ostalim lipidima čine kožu otpornom na apsorpciju supstanci rastvorljivih u vodi i smanjuju isparavanje vode kroz kožu [11].

Holesterol apsorbuju enterociti, odnosno intestinalne ćelije (ćelije tankog i debelog creva). To je ključna regulatorna tačka u metabolizmu sterola, koja određuje koliko se procenata od 1000 mg holesterola koji se dnevno sintetiše u jetri i od 300 mg holesterola iz hrane koji se dnevno resorbuje u epitelne ćelije tankog creva, na kraju apsorbuje u krv. Približno 55 % ovih intestinalnih zaliha zdravih osoba svakodnevno ulazi u krv kroz enterocite [43].

1.3.2. STEROIDNI HORMONI I NJIHOVA BIOSINTEZA

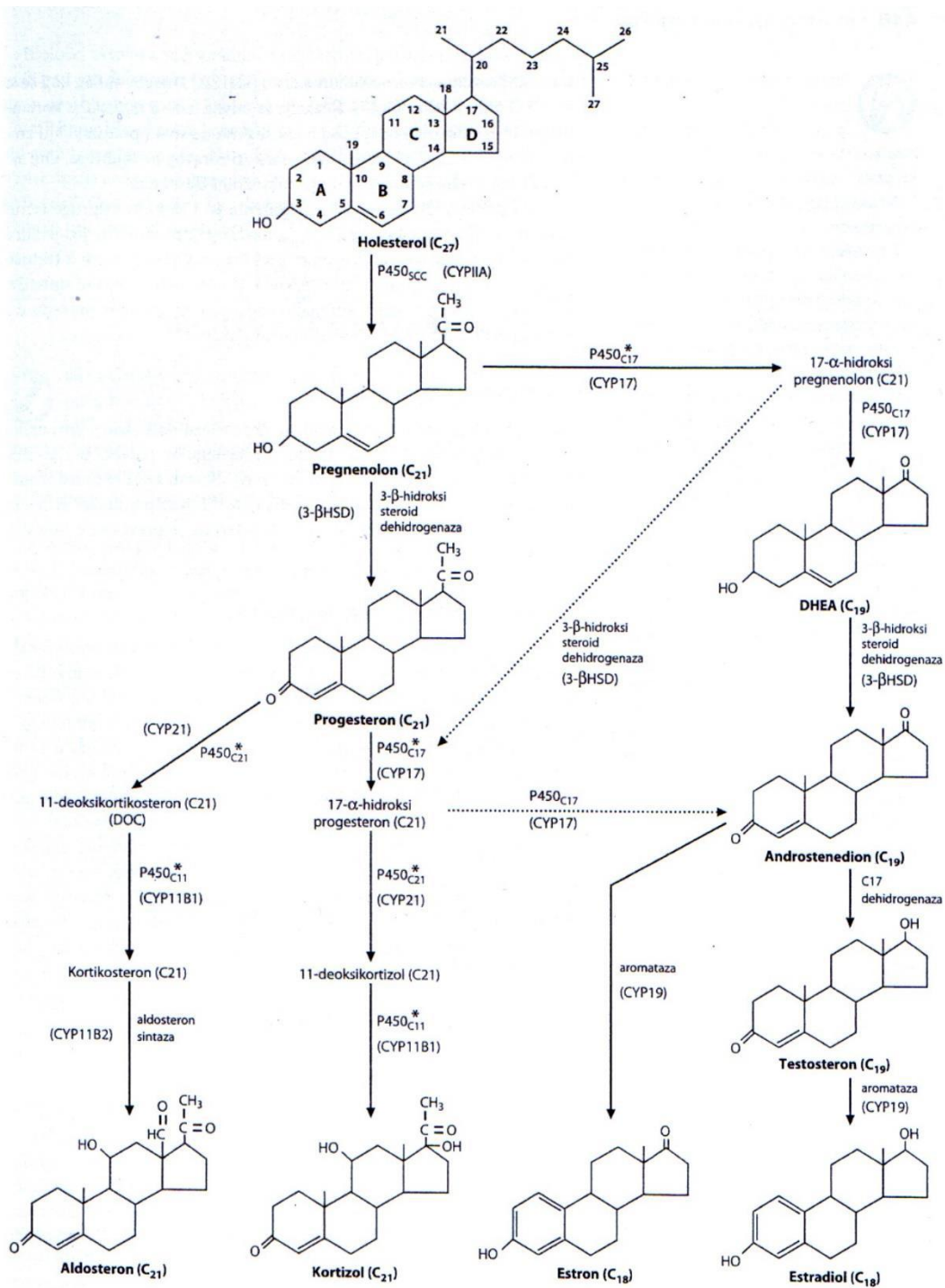
Holesterol je prekursor pet grupa steroidnih hormona: glukokortikoida, mineralokortikoida, androgena, estrogena i progestina. Ovi hormoni nastaju u kori nadbubrežnih žlezda, jajnicima i testisima. Od mesta sinteze do ciljnih organa steroidni hormoni se prenose kroz krv. Zahvaljujući lipofilnosti lako prolaze kroz ćelijske membrane i vezuju se za specifične receptore u citoplazmi ili jedru [43]. Zbog svoje hidrofobnosti steroidi moraju biti vezani za proteine seruma. Albumin iz seruma može da bude nespecifični nosač steroidnih hormona, pored njihovih specifičnih transportera. Holesterol koji se koristi za sintezu steroidnih hormona može da bude sintetisan u tkivima iz acetyl-CoA, mobilisan iz intracelularnih zaliha, ili preuzet u obliku lipoproteina koji ga sadrže. Specifična usaglašenost enzima u ćelijama organa određuje koji se hormon sintetiše u kom organu [43].

Za sintezu glukokortikoida i mineralokortikoida, koja se odvija u kori nadbubrežne žlezde, kao i za sintezu polnih hormona, koja se odvija u gonadama i kori nadbubrežne žlezde, neophodna su četiri enzima citohroma P-450. Oni učestvuju u prenosu elektrona sa NADPH na molekularni kiseonik preko proteina koji prenose elektrone. Molekularni kiseonik oksiduje niz ugljenikovih atoma u prstenovima holesterola [43].

U prva dva koraka sinteze svih steroidnih hormona holesterol se oksiduje u progesteron (slika 6.). U prvoj reakciji se uklanja šest atoma ugljenika iz bočnog niza holesterola i nastaje pregnenolon, steroidni molekul koji se sastoji od 21 C-atoma. Reakciju katalizuje citohrom P450_{sc}, enzim za raskidanje bočnog niza (side-chain cleavage, ranije nazvan holesterol dezmolaza), koji se nalazi u unutrašnjoj membrani mitohondrija [43]. U sledećem koraku pregnenolon se prevodi u progesteron uz katalitičko delovanje 3 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze. Ovaj enzim ne pripada grupi citohroma 1150. Ostali steroidni hormoni nastaju iz progesterona uz katalitičko delovanje enzima iz grupe citohroma 1150 [43].

1.3.2.1. Sinteza kortizola

Biosintetski put koji vodi stvaranju kortizola se odvija u srednjem sloju kore nadbubrežne žlezde koji se naziva zona fascikulata (*zona fasciculata*). Unutarćelijski proteinski nosač prenosi slobodni holesterol u unutrašnju membranu mitohondrija, gde se raskida bočni niz holesterola i formira pregnenolon. Pregnenolon se vraća u citosol i tu prevodi u progesteron [43].



Slika 6. Biosinteza steroidnih hormona. Isprekidanim linijama su označeni alternativni putevi. Zvezdicom su obeleženi enzimi koji mogu da budu defektni u urođenoj hiperplaziji nadbubrežne žlezde. CYP je oznaka enzima koji sadrži citohrom 1150. DHEA = dehidroepiandrosteron [43].

U membranama endoplazmatičnog retikuluma enzim P450c17 katalizuje hidroksilaciju C17 progesterona ili pregnenolona. Pored toga, ovaj enzim može da katalizuje i raskidanje veze između C17 i dvougleničnog fragmenta na njemu. Ova dvostruka uloga istog enzima omogućava da se ostali steroidi sintetišu različitim putevima: 17-hidroksilovani steroidi koji zadržavaju bočni niz predstavljaju prekursore kortizola (C21), dok su oni kod kojih je bočni niz uklonjen (C19) prekursori androgena i estrogena (muških i ženskih polnih hormona) [43].

Pri sintezi kortizola, hidroksilovanjem progesterona u položaju 17 nastaje 17 α -hidroksiprogesteron, koji se zajedno sa progesteronom prenosi u glatki endoplazmatični retikulum. Tri 11 β S21 enzima koja su vezana za membranu (21 α -hidroksilaze) katalizuju hidroksilovanje 17 α -hidroksiprogesterona u položaju 21 i nastanak 11-deoksikortizola. Katalitičkim delovanjem istih enzima progesteron se prevodi u deoksikortikosteron, prekursor mineralokortikoida aldosterona (slika 6.) [43].

U poslednjem koraku sinteze kortizola, 11-deoksikortizol se prenosi nazad u unutrašnju membranu mitohondrija, gde 11 β S11 (11 β hidroksilaza) prihvata elektrone od proteinskih nosača elektrona. Enzim pomoću kiseonika prenosi ove redukcijske ekvivalente na 11-deoksikortizol, pri čemu se hidroksiluje S11 i nastaje kortizol [43].

1.3.2.2. Sinteza aldosterona

Sinteza aldosterona se odvija u delu kore nadbubrežne žlezde koji se naziva zona glomerulosa (*zona glomerulosa*). I ovaj biosintetski put započinje prevođenjem holesterola u progesteron (slika 6.). Zatim se, uz katalitičko delovanje 11 β S21, progesteron u položaju 21 hidroksiluje i gradi 11-deoksikortikosteron. U prisustvu P450 aldosteronskog sistema kortikosteron se oksiduje u 18-hidroksikortikosteron, a dobijeni derivat naknadno oksiduje u aldosteron [43].

1.4. DELOVANJE ETANOLA NA HPA OSU

Kao odgovor HPA ose na bilo koji tip stresa, oslobađa se CRH i povećava se nivo glukokortikoida što izaziva kaskadu bioloških odgovora koji pomažu u borbi protiv narušavanja homeostaze¹. Parvocelularni neuroni u paraventricularnom jedru (PVN) hipotalamusa sintetiziraju i luče CRH u hipotalamo-hipofiznu mrežu krvnih sudova koja povezuje hipotalamus i hipofizu. U prednjem režnju hipofize CRH stimuliše sintezu i lučenje proopiomelanokortina (POMC) i njegovih derivata iz kortikotropnih ćelija. Najvažniji derivat POMC-a je ACTH. [44]

Kao deo fiziološkog odgovora na stres, POMC sintetizira opioidni peptid beta-endorfin, koji ima značajnu ulogu i u fiziološkom i u bihevioralnom odgovoru na stresne stimulacije (biheviorizam je pravac u psihologiji koji se bavi proučavanjem ponašanja). Najbolje proučeni efekat beta-endorfina je njegova mogućnost da izmeni osećaj bola, ali ovaj peptid je takođe uključen u centralnu regulaciju ACTH i CRH. Pokazano je da beta-endorfin ima ulogu u dovođenju odgovora na stres do stanja homeostaze. Kao odgovor na stres, lučenje CRH stimuliše lučenje beta-endorfina i drugih peptida derivata POMC-a od strane hipotalamusa. Oni zauzvrat inhibiraju aktivnost HPA ose. Beta-endorfin se vezuje za opioidne receptore i menja odgovor autonomnog nervnog sistema preko neurona u okviru PVN-a. Međutim, beta-endorfin koji je sintetisan iz POMC-a u hipofizi ima značajno manji uticaj na funkciju autonomnog nervnog sistema. [44, 45]

Poput stresa, akutno konzumiranje alkohola takođe aktivira HPA osu i direktno i indirektno dovodeći do povećanja nivoa glukokortikoida [46, 47]. Zapravo, alkohol i ostale psihoaktivne supstance se mogu opisati kao fiziološki stresori jer dovode do aktivacije HPA ose [48]. Međutim, u nekom trenutku prelaza od povremenog konzumiranja alkohola do zavisnosti i apstinencije dolazi do narušavanja regulacije aktivnosti HPA ose. Na primer, nađeno je da je odgovor kortizola na akutni unos alkohola slabiji kod ljudi koji često konzumiraju velike količine alkohola u odnosu na ljude koji umereno konzumiraju alkohol [49]. Ovo zapažanje može biti povezano sa generalnim procesom adaptacije koja se javlja tokom teških oblika hroničnog alkoholizma. Važno je

¹ Homeostaza predstavlja održavanje ravnotežnog stanja unutrašnje sredine organizma.

naglasiti da ispitanici u toj studiji nisu bili zavisnici od alkohola, što sugerise da promene u aktivnosti HPA ose počinju da se javljaju i pre uspostavljanja zavisnosti [46].

Sa druge strane, početak zavisnosti od alkohola je praćen povećanim nivoima kortizola u krvi (hiperkortizolemija) koji su sinhronizovani sa cikličnim ponavljanjem epizoda konzumiranja alkohola i stresa usled apstinencije [20, 51]. Ovaj prelaz ka alkoholizmu je praćen alostatičkim pomerajem u funkcionisanju HPA ose i rezultuje u abnormalno niskom odgovoru kortizola na unos etanola [52]. Pri uslovima zavisnosti od alkohola alostatičko opterećenje, kao hipotetička mera kumulativnog stresa, povećava se i opterećuje organizam prekomernim izlaganjem hormonima i peptidima stresa, kao i citokinima [53]. Povećano alostatičko opterećenje se javlja ne samo kod alkoholizma i zloupotreba drugih droga, već i pri razvoju psihijatrijskih bolesti (poput depresije), metaboličkog sindroma, i sistemske hipertenzije. U kontekstu zloupotrebe droga, alostatičko opterećenje ne samo da utiče na odgovor HPA ose na stres, već obuhvata i disregulaciju prouzrokovanu težnjom za prvobitnim zadovoljstvom. U toj situaciji, organizam stalno traži osećaj prvobitnog zadovoljstva izazvanog uzimanjem droge, dok se tolerancija na ove efekte razvija kroz ponavljanje ciklusa uzimanja droge. Ovo rezultuje poremećajem osećaja zadovoljstva nakon konzumiranja droge i neadekvatnim odgovorom na stres. Posebno, alostatički poremećaji u odgovoru kortizola mogu imati štetan efekat na centre u mozgu za nagradu i kaznu [46, 54].

Mnogobrojne studije [44, 55-57] na ljudima i životinjama su pokazale da unos alkohola utiče na aktivnost HPA ose. Akutna izloženost alkoholu aktivira HPA osu dovodeći do povećanja nivoa ACTH i glukokortikoida. Ovo povećanje zavisi od količine alkohola koja je akutno konzumirana. Kod pacova, akutni unos etanola povećava nivoe ACTH i kortikosterona u plazmi, s tim da ženke pokazuju veći odgovor od mužjaka [55]. Ovi efekti etanola se primarno ispoljavaju posredstvom povećanog oslobađanja CRH iz hipotalamusa. Neutralizacija CRH koji cirkuliše u krvi antitelima prekida stimulatorni efekat etanola na lučenje ACTH, kortizola i kortikosterona [56]. Lezije na PVN umanjuju, ali ne poništavaju stimulatorni efekat etanola na oslobađanje ACTH. Ovo sugerise da ekstra PVN regioni, i/ili drugi izvori ACTH, poput vazopresina, posreduju u stimulisanju lučenja ACTH pod dejstvom etanola. Tako je pokazano da neutralizacija endogenog

vazopresina, upotrebom antitela, smanjuje lučenje ACTH prouzrokovano etanolom i kod pacova kod kojih je uklonjeno PVN, ukazujući na to da vazopresin van PVN-a delimično posreduje u hipofizno-adrenalnom odgovoru na etanol [44, 57].

Kod ljudi, nekoliko studija [44, 58-60] je takođe pokazalo da postoji stimulatorni efekat alkohola na HPA osu. U početnim istraživanjima je pokazano da se nivoi kortizola u plazmi značajno povećavaju kod zdravih ispitanika pri konzumiranju alkohola u dozama većim od 100 mg/100 ml [58]. U kasnijim studijama je pokazano da su zdravi ispitanici koji konzumiraju alkohol imali veći nivo kortizola u urinu [58]. Takođe, pokazano je da je kod alkoholičara, inhibitorna kontrola HPA ose narušena. Studije su pokazale i da su bazalni nivo ACTH i kortizola smanjeni pri hroničnoj upotrebi alkohola [44, 59, 60].

Takođe su zapaženi smanjena ekspresija gena za CRH u PVN-u [61] i smanjen odgovor hipofize na CRH [62]. Niski nivoi CRH povezani su sa intenzivnijom težnjom ka etanolu i povećanom verovatnoćom povratka u alkoholizam nakon akutne apstinencije. Ovo sugeriše da CRH ima važnu ulogu u kontroli dugotrajnog konzumiranja alkohola i zavisnosti od njega. Kod miševa sa smanjenim nivoom CRH unos etanola je udvostručen i bihevioralni odgovor na etanol je umanjen [63]. Kod rezus makaki majmuna koji imaju genetske predispozicije za povećan odgovor na stres zahvaljujući mutaciji u promotoru gena za CRH, zapaženo je intenzivnije lučenje ACTH i kortizola nego kod zdravih rezus mamaki majmuna [64]. Takva genetska predispozicija je dovela do toga da te jedinke konzumiraju više alkohola od zdravih jedinki, sugerišući da genetske varijacije u promotoru gena za CRH koje dovode do povećanog odgovora na stres takođe dovode i do povećanog rizika od alkoholizma. Takođe je pokazano da kod miševa koji ne poseduju funkcionalni CRH1 receptor, ponavljanje stresa dovodi do povećane i progresivne konzumacije etanola koja postoji tokom čitavog njihovog života [65]. Ovaj efekat je povezan sa povećanim nivoom proteina NR2B koji predstavlja deo NMDA receptora glutaminergičkog sistema i koji je takođe ima važnu ulogu kod bolesti zavisnosti [66]. Poremećaji u CRH sistemu se razvijaju tokom vremena i pogoršavaju se sa produženom izloženošću preteranom unosu alkohola. Ovaj fenomen je primećen samo kod vrsta pacova koje su sklone konzumiranju alkohola. Kod pacova koji nisu skloni konzumiranju alkohola, CRH sistem nema značajniji uticaj na uzimanje alkohola [67, 68].

Uloga ACTH, kortizola i kortikosterona je takođe dokumentovana prilikom istraživanja konzumacije alkohola. Injekcije analoga ACTH date pacovima koji su izloženi slobodnom konzumiranju etanola (10 % etanol) dovele su do smanjenog unosa alkohola [69]. U drugoj studiji, muškim pacovima iz dve vrste, jedne koja ima sklonosti ka uzimanju alkohola (AA) i druge koja izbegava konzumiranje alkohola (ANA), uklonjena je adrenalna žlezda [70]. Zatim im je omogućen pristup 10 % etanolu ili vodi tokom dve nedelje. Ova studija je pokazala da je uklanjanje adrenalnih žlezda dovelo do smanjenog unosa etanola kod AA pacova. Sa druge strane, davanje injekcija kortikosterona ovim pacovima je ponovo povećalo unos etanola. Suprotno tome, u ANA grupi nisu primećene promene u unosu alkohola nakon uklanjanja adrenalnih žlezda, kao ni nakon davanja injekcija kortikosterona. Podaci dobijeni u tom istraživanju sugerišu da kortikosteron stimuliše konzumaciju etanola kod životinje koje i inače imaju sklonost ka alkoholu [70]. U daljim istraživanjima je pronađeno da intracerebroventrikularna infuzija kortikosterona vraća konzumiranje etanola na prethodni nivo kod životinja kojima je uklonjena adrenalna žlezda [71]. Podaci sugerišu da razlike u aktivnosti HPA ose mogu pomoći da se odredi da li se pojedinci nalaze pod visokim rizikom od alkoholizma [44].

Veza između endogenog opioidnog sistema, HPA ose i centara za nagradu i kaznu predložena je u brojnim studijama [72]. Neuron koji luče beta-endorfin u arkuatnom jedru hipotalamusa inhibiraju i lučenje CRH u PVN-u hipotalamusa [73] i istovremeno stimulišu oslobađanje dopamina u nucleus akumbensu [74]. Zbog opioida koji su uključeni u regulaciju oba ova sistema, predloženo je da deficit u opioidnoj neurotransmisiji može izazvati istovremene poremećaje u funkcionisanju oba fiziološka procesa. Znatno broj istraživanja poslednjih godina je omogućio akumuliranje dokaza da postoji promena u funkcionisanju HPA ose kod aktivnih alkoholičara [75], pri akutnoj apstinenciji, pri produženoj apstinenciji [60], kao i kod pojednaca koji nisu zavisnici od alkohola, ali koji imaju porodičnu istoriju alkoholizma [75]. Takođe, glukokortikoidi, koji se oslobađaju tokom stresnih situacija i nakon aktivacije HPA ose prouzrokovane unosom etanola, menjaju aktivnost opioidergičnog, CRH, i mezolimbicnog dopaminskog sistema [76] i pokazano je da utiču na osećaj zadovoljstva pri konzumiranju alkohola [77]. Pretpostavlja se da smanjena aktivnost opioida, koja je ili rezultat alkoholizma ili je

genetski povezana sa rizikom od alkoholizma, može da izazove hiperkortizolemiju, izmeni mezolimbicku produkciju dopamina i da dovede do pojačanog odgovora na etanol [44, 74, 78].

1.4.1. ALKOHOL I CIRKADIJALNI RITAM

Kod sisara, ali i kod većine nižih organizama, odgovor bioloških ritmova na spoljne uticaje je sinhronizovan od strane centralnog cirkadijalnog sata koji se nalazi u suprahijazmatičnom jedru (SCN) u prednjem delu hipotalamusa. Cirkadijalni ritam, generisan u SCN-u kao odgovoru na spoljne uticaje poput smene dana i noći, pretvara se u neuronski ili hormonski signal koji utiče na celokupne telesne fiziološke i metaboličke procese, optimizujući time interakciju organizma sa promenama u okolini. Cirkadijalni sat uzima u obzir i interakcije specifičnih satnih gena (clock genes), uključujući gene Period (Per1, Per2, Per3), Clock, Bmal1, i Cryptochrome (Cry1, Cry2) , u okviru dve usko isprepletene transkripcione i translacione povratne sprege koje održavaju period ćelijskih aktivnosti na 24 sata, i regulišu ekspresiju satnih gena. Ovi procesi se dešavaju ne samo u centralnom satu u suprahijazmatičnom jedru, već i u drugim delovima mozga, kao i u perifernim ćelijama u celom telu. [44, 79, 80]

Brojna istraživanja [81, 82] na ljudima i životinjama su pokazala da hronično izlaganje alkoholu dovodi do promena u aktivnosti satnih gena što dovodi do teške desinhronizacije fizioloških funkcija, kao što su san, telesna temperatura, krvni pritisak i lučenje hormona; ali važi i suprotno: satni geni utiču na unos alkohola i ponašanje koje dovodi do njegove zloupotrebe [81]. Tako je pokazano da hronična prenatalna ili postnatalna izloženost pacova etanolu je dovela do promena u cirkadijalnoj ekspresiji gena za POMC i satnih gena za rPer1, rPer2 i rPer3 u arkuatnom jedru u hipotalamusu, i nivoa gena za rPer1 i rPer2 u SCN-u tokom zrelog perioda života [82].

Cirkadijalni sat i aktivnost satnih gena ne samo da kontrolišu periode budnosti i sna, kao i periode uzimanja hrane i posta, već utiču i na lučenje hormona [82]. Funkcija neuroendokrinog sistema je pod cirkadijalnom kontrolom i poremećaji regulacije u aktivnosti satnih gena stoga mogu uticati na oscilatorne karakteristike lučenja hormona.

Istraživanja na predpubertetskim mušjacima pacova su pokazala da hronična izloženost alkoholu tokom 4 nedelje ne samo da dovodi do značajnih promena u nivou hipotalamo-hipofiznih hormona, već utiče i na njihov dvadesetčetvororočasn timer obrazac lučenja. Interakcija između cirkadijalnog sata i odgovora HPA ose na stres je dosledno povezana sa zloupotrebom alkohola i zavisnošću od njega. Stres se smatra najvećim spoljašnjim faktorom rizika i za teške oblike alkoholizma [83] i za poremećenu cirkadijalnu ritmičnost [83, 84]. Istraživanja su pokazala da varijacije PER2 gena imaju važnu ulogu i u obrascima konzumiranja alkohola i u odgovoru na stres [85]. Izloženost alkoholu povećava ekspresiju Pe10 u hipokampusu, i pokazano je da to utiče na odgovor na stres [86]. Studije na miševima su pokazale da mutacije Per2 gena mogu dovesti do povećanog unosa alkohola [87]. Takođe je pokazano da se kod miševa sa mutacijom Per2 gena tretiranih akamprozatom, lekom koji se koristi za sprečavanje povratka u alkoholizam, normalizuje unos alkohola [87]. Značajna veza između varijacija u humanom Per2 genu, PER2 SNP 10870, i regulacije konzumiranja alkohola je pronađena na kliničkom uzorku teških alkoholičara [87]. Kao dodatak ovoj interakciji između stresa i cirkadijalnog ritma, veliki broj podataka ukazuje na to da poremećaji u mehanizmu cirkadijalnog sata negativno utiču na funkciju imunog sistema i dovode do veće podložnosti organizma kanceru [88, 89]. Ukupno uzeto, ove studije ukazuju na važnu ulogu koju satni geni imaju u alkoholom izazvanom poremećaju regulacije cirkadijalnih obrazaca neuroendokrinih funkcija, kao i kod sklonosti ka alkoholu i zloupotrebi istog [44].

1.5. MODELI HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-ADRENALNOG SISTEMA

Matematičko modeliranje bioloških i biohemijskih procesa se zasniva na jednoj ili više diferencijalnih jednačina koje opisuju vremensku evoluciju sistema. Sa druge strane, modeliranje mehanizma koji leži u osnovi bioloških i biohemijskih procesa započinje postavljanjem fizičkohemijske osnove koja obuhvata reakcije između najvažnijih hemijskih vrsta u posmatranom sistemu. Tek nakon toga, iz predloženog mehanizma, proističe sistem diferencijalnih jednačina kojima se opisuje vremenska evolucija sistema.

Obične diferencijalne jednačine (eng. ordinary differential equations, ODEs) i diferencijalne jednačine sa kašnjenjem (eng. delay differential equations, DDEs) predstavljaju dva tipa diferencijalnih jednačina koji se vrlo često koriste za opisivanje dinamike biohemijskih sistema. U tom smislu, njihova rešenja se analiziraju kako bi se bolje razumelo kako su molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi tih biohemijskih sistema spregnuti u cilju davanja specifičnog biološkog odgovora. Ove jednačine mogu biti dobijene postuliranjem mehanizma hemijskih reakcija, ili uopštenijim matematičkim pristupom, u kojem se koriste jednačine sa nelinearnim članovima i vremenskim kašnjenjem kako bi se oponašalo vremensko ponašanje posmatranih sistema. Prvi pristup, koji koristi obične diferencijalne jednačine kako bi opisao kinetiku zasnovanu na zakonu o dejstvu masa, uobičajeniji je u hemiji, gde su detaljni molekularni mehanizmi uglavnom mnogo bolje poznati.

Iako deluje prigodno da se dinamika HPA ose opiše pomoću diferencijalnih jednačina sa kašnjenjem jer one kombinuju izvode promenljivih u sistemu po vremenu, sa vremenskim kašnjenjem [90-95], takvi modeli imaju jedno veliko ograničenje: oni spajaju zajedno složene biološke procese, uzimajući u obzir samo vremensko kašnjenje koje je potrebno da bi se ovi procesi odigrali, dok mehanizam koji stoji iza tog kašnjenja ostaje sakriven i ne može se analizirati kroz ove modele. Posebna poteškoća sa do sada predloženim modelima HPA ose koji se baziraju na diferencijalnim jednačinama sa kašnjenjem predstavlja dužina vremena kašnjenja (18 minuta) što ne oslikava dobro vreme koje potiče

od trenutka kada su hormoni sintetisani, do trenutka kada putem krvotoka stignu do svojih receptora [95].

Korišćenje običnih diferencijalnih jednačina i modela zasnovanog na hemijskim reakcijama je mnogo složenije u odnosu na pristup koji koristi diferencijalne jednačine sa kašnjenjem, pošto ovaj pristup zahteva bolje razumevanje kinetike koja stoji iza biohemijskih transformacija. Nažalost, usled složenosti HPA ose, ovu informaciju je često teško dobiti eksperimentalno. Uprkos tom ograničenju, pristup koji podrazumeva model sastavljen od hemijskih reakcija iz kojeg proističe sistem običnih diferencijalnih jednačina nudi nekoliko važnih poboljšanja u odnosu na pristup koji podrazumeva upotrebu diferencijalnih jednačina sa kašnjenjem:

- povratne sprege se javljaju u modelu prirodno, uzimajući u obzir izraze za brzine reakcija i konstantne brzina pojedinačnih reakcija u modelu
- model može biti sistematski optimizovan korišćenjem analize stehiometrijskih mreža
- model može biti proširen kako bi uzeo u obzir unutrašnje ili spoljne biohemijske vrste koje moduliraju glavne procese u sistemu.

Do sada je predloženo više modela HPA sistema, ali je najveći broj njih nestehiometrijski. To znači da se oni baziraju na skupu diferencijalnih jednačina za opisivanje promene koncentracija pojedinih vrsta u vremenu, sa naknadno dodatim nelinearnim članom koji tako na veštački način uvodi nelinearnost u model [1, 10]. Kod stehiometrijskih modela iz predloženog reakcionog mehanizma logično slede članovi koji formiraju sistem diferencijalnih jednačina [1, 18]. U daljem tekstu će biti navedeno nekoliko predloženih modela HPA sistema.

1.5.1. NESTEHIOMETRIJSKI MODELI HPA SISTEMA

U tabelama 1-5 je navedeno nekoliko do sada objavljenih nestehiometrijskih modela HPA sistema [10, 18, 44-59, 96].

Tabela 1. Jednodimenzionalni nestehiometrijski modeli HPA sistema.

Model	Dinamička promenljiva	Rezultati simulacija
Gonzalez-Heydrich i saradnici, 1999. [97]	Koncentracija kortizola	Simulira unutardnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola. Pokazao da ACTH više utiče na lučenje kortizola za vreme maksimuma, nego za vreme minimuma dnevnog ritma lučenja kortizola.
Chakraborty i saradnici, 1999. [98]	Koncentracija kortizola	Simulira dnevne oscilacije koncentracije kortizola.
Dokoumetzidis i saradnici, 2002. [99]	Koncentracija kortizola	Simulira unutardnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola.

Tabela 2. Dvodimenzionalni nestehiometrijski modeli HPA sistema.

Model	Dinamičke promenljive	Rezultati simulacija
Peters i saradnici, 2007. [100]	Koncentracije ACTH i kortizola	Pretpostavljeno je da MR u mozgu aktiviraju HPA sistem, a da GR imaju inhibitornu ulogu. Rezultati su ukazali da sistem može da se stabilizuje uz pomoć pozitivne povratne sprege.
Conrad i saradnici, 2009. [101]	Koncentracije ACTH i kortizola	Pretpostavljeno je da MR u mozgu aktiviraju HPA sistem, a da GR imaju inhibitornu ulogu (kao i kod modela koji su predložili Peters i saradnici). Simulirani su odgovori HPA sistema na različite perturbacije; bazalna oscilatorna dinamika nije razmatrana.

Tabela 3. Trodimenzionalni nestehiometrijski modeli HPA sistema.

Model	Dinamičke promenljive	Rezultati simulacija
Lenbury i Pacheenburawana, 1991. [102]	Koncentracije CRH, ACTH i kortizola	U zavisnosti od parametara sistema, ovaj model može da simulira periodično, ali i haotično ponašanje. Model može da simulira spregnute unutar-dnevne i dnevne oscilacije koncentracije kortizola.
Gonzalez-Heydrich i saradnici, 1994. [103]	Koncentracije CRH, ACTH i kortizola	Model je uspešno simulirao nivoe ACTH i kortizola nakon davanja ovčijeg CRH, pacijentima sa normalnim nivoima kortizola i pacijentima sa hiperkortizolemijom.
Savić i Jelić, 2005. [104, 105]	Koncentracije CRH, ACTH i kortizola	Simulira samo dnevne oscilacije koncentracije kortizola.
Bairagi i saradnici, 2008. [106]	Koncentracije CRH, ACTH i kortizola	Simulira unutar-dnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola. Simulacije su pokazale i da dejstvo stresora može da dovede i do gašenja unutar-dnevnih oscilacija kortizola.
McAuley i saradnici, 2009. [107]	Koncentracije CRH, ACTH i kortizola	Simulira dnevne oscilacije koncentracije kortizola. Na osnovu simulacija je zaključeno da hronično povećanje nivoa kortizola ima pogubniji uticaj na ćelije hipokampusu nego niz akutnih skokova u nivou kortizola.
Walker i saradnici, 2010. [108]	Koncentracije ACTH, kortizola i GR	Simulira unutar-dnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola.

Tabela 4. Četvorodimenzionalni nestehiometrijski modeli HPA sistema.

Model	Dinamičke promenljive	Rezultati simulacija
Gupta i saradnici, 2007. [109]	Koncentracije CRH, ACTH, kortizola i slobodnih GR u hipofizi	Simulira unutardnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola.
Sriram i saradnici, 2012. [110]	Koncentracije CRH, ACTH, kortizola i kompleks nastao vezivanjem kortizola za GR	Simulira dnevne oscilacije koncentracije kortizola i ostalih vrsta uključenih u mehanizam.

Tabela 5. Petodimenzionalni nestehiometrijski modeli HPA sistema.

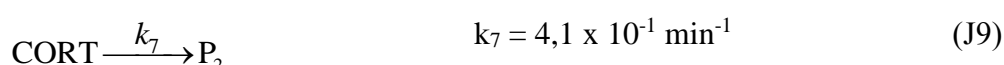
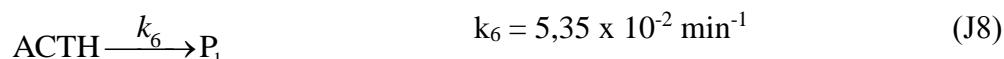
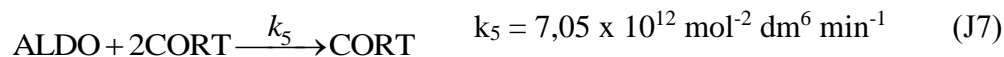
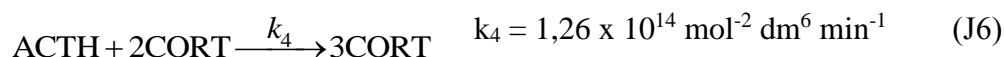
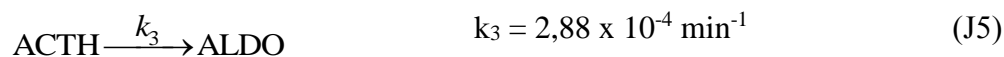
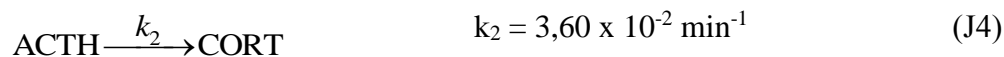
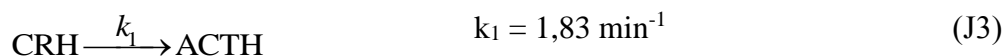
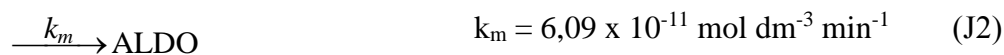
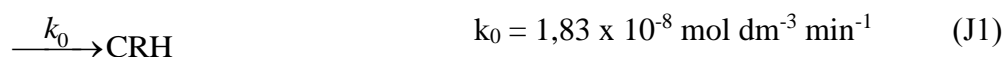
Model	Dinamičke promenljive	Rezultati simulacija
Liu i saradnici, 1999. [111]	Koncentracije CRH, ACTH, slobodnog kortizola, kortizola vezanog za albumin i kortizola vezanog za globulin.	Simulira unutardnevne oscilacije koncentracije kortizola.
Kyrylov i saradnici, 2005. [112]	Koncentracije CRH, ACTH, slobodnog kortizola, kortizola vezanog za albumin i kortizola vezanog za globulin.	Simulira unutardnevne oscilacije spregnute sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola.

1.5.2. STEHIOMETRIJSKI MODELI HPA SISTEMA

1.5.2.1. Minimalni model

Prvi strogo stehiometrijski model HPA sistema su objavili Jelić i saradnici 2005. (tabela 6.) [19].

Tabela 6. Model HPA sistema koji su predložili Jelić i saradnici (u daljem tekstu: minimalni model) [1, 19]. ALDO = aldosteron, CORT = kortizol.



Reakcije (J1) i (J2) opisuju nastajanje CRH i ALDO u delovima tela koji ne ulaze u sastav HPA sistema. Reakcija (J3) opisuje lučenje ACTH u hipofizi pod dejstvom CRH. Reakcije (J4) i (J5) opisuju lučenje ALDO i CORT u kori nadbubrežne žlezde pod dejstvom ACTH. Uloga MR i GR je u ovom modelu data indirektno, preko autokatalitičkog i autoinhibicionog koraka (J6) i (J7). Reakcije (J8) i (J9) opisuju razlaganje i odlazak u druge delove tela ACTH i CORT iz HPA sistema. Reakcije (J1) - (J9) nisu elementarne, već opisuju krajnji ishod niza složenih biohemijskih procesa. Samoorganizacija HPA sistema je rezultat uzajamnog delovanja uvedenih povratnih sprega i ostalih procesa koji su predstavljeni ovim mehanizmom [1, 19].

Rešavanjem sistema diferencijalnih jednačina koje opisuju vremenske evolucije koncentracija CRH, ACTH, ALDO i CORT:

$$\frac{d[CRH]}{dt} = k_0 - k_1[CRH]$$

$$\frac{d[ACTH]}{dt} = k_1[CRH] - k_2[ACTH] - k_3[ACTH] - k_4[ACTH][CORT]^2 - k_6[ACTH]$$

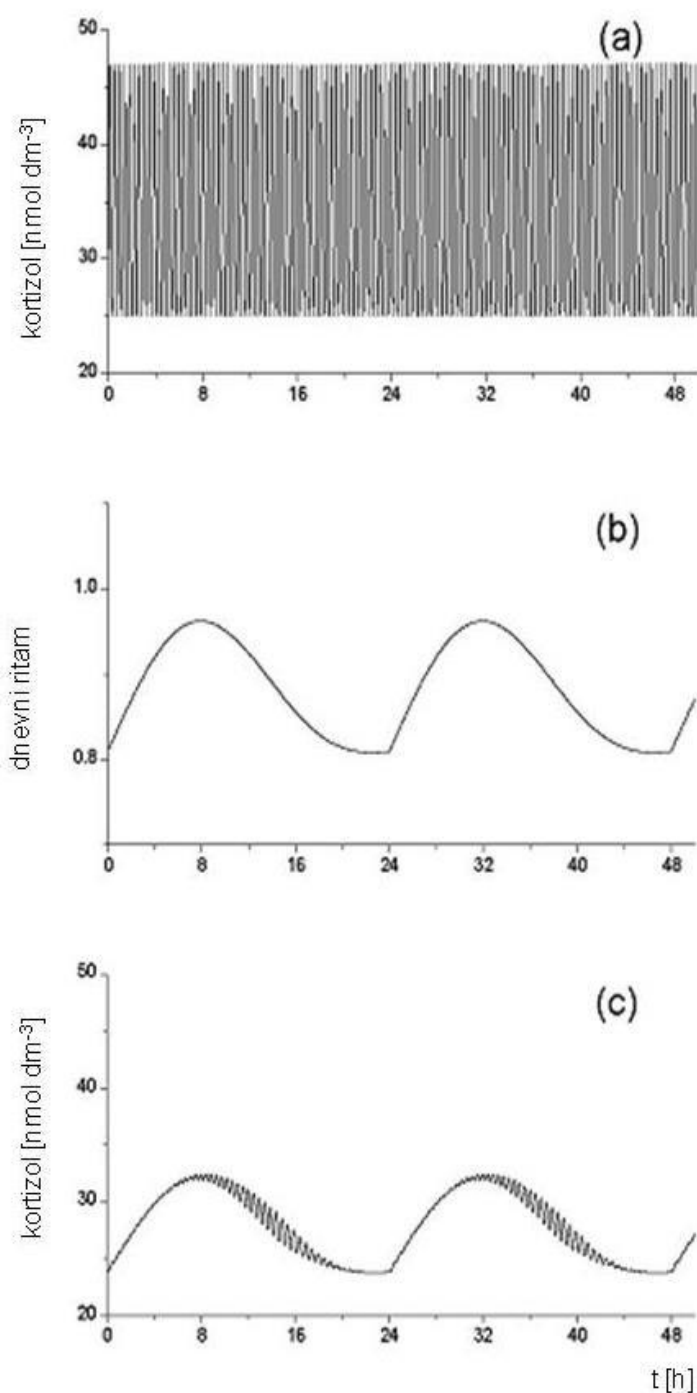
$$\frac{d[ALDO]}{dt} = k_m + k_3[ACTH] - k_5[ALDO][CORT]^2$$

$$\frac{d[CORT]}{dt} = k_2[ACTH] + k_4[ACTH][CORT]^2 - k_5[ALDO][CORT]^2 - k_7[CORT]$$

uz korišćenje odgovarajućih konstanti brzina (tabela 6.), ovaj model može simulirati unutar-dnevnu oscilatornu evoluciju HPA sistema (slika 7(a)). Da bi se opisala dnevna dinamika, model je dopunjen uvođenjem funkcije koja opisuje dnevni ritam koji je uslovljen smenom dana i noći. Dnevni ritam se kontroliše lučenjem CRH. Zato je uvedena funkcija D sledećeg oblika:

$$D = d_1 - 0,079145093 d_2 + \{0,064 \sin(2\pi t / 1440) + 0,12 \text{ abs}[\sin(\pi t / 1440)]\} d_2$$

koja menja samo brzinu ulaska CRH u sistem i transformiše k_0 u $k_D = k_0 \times D$ [1, 19, 20, 113]. Oblik ove funkcije odgovara zahtevima da koncentracija CRH mora biti pozitivna i da funkcija mora biti asimetrična kako bi na odgovarajući način opisala ritam prosečnog čoveka, koji spava oko 8 sati, počevši od oko 22 h [1, 19, 10, 113].

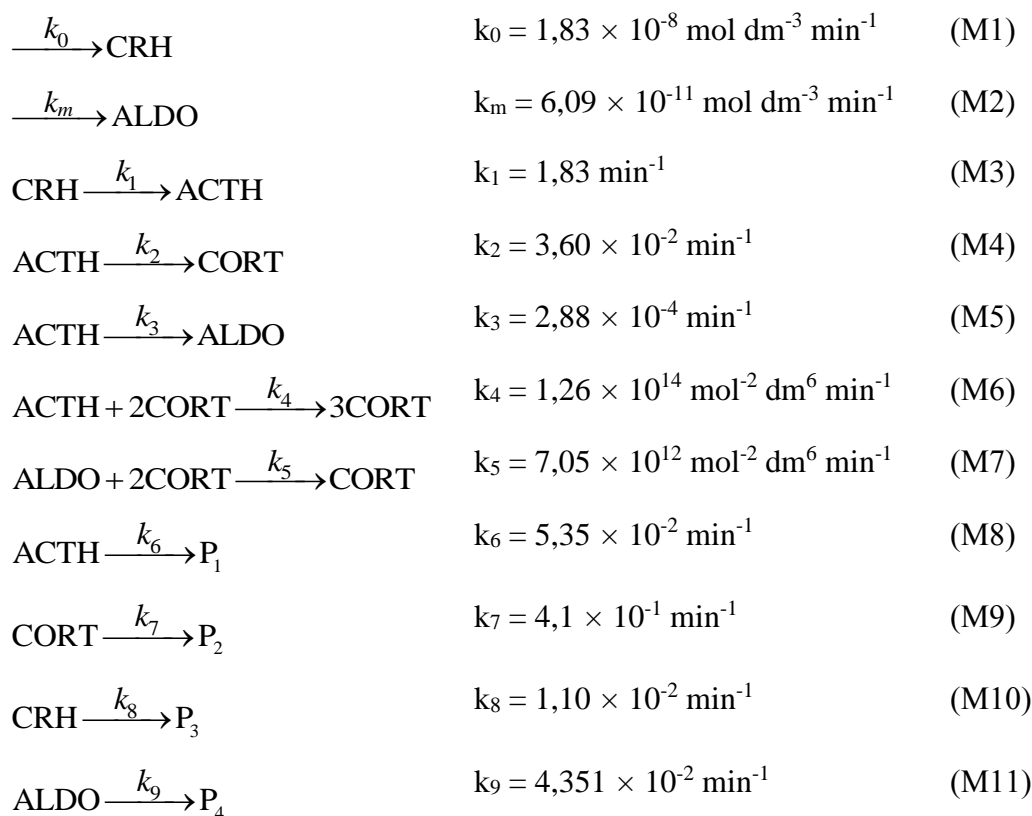


Slika 7. Numeričke simulacije vremenske evolucije kortizola. (a) Unutardnevne oscilacije koncentracije kortizola. Početne koncentracije: $[\text{CRH}]_0 = 1,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $[\text{ACTH}]_0 = 1,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $[\text{ALDO}]_0 = 9,76 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ i $[\text{CORT}]_0 = 2,76 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. Konstante brzina su date u tabeli 6. (b) Funkcija D koja opisuje dnevni ritam. (c) Simulacija unutardnevnih oscilacija spregnutih sa dnevnim oscilacijama koncentracije kortizola. Početne koncentracije: $[\text{CRH}]_0 = 8,09 \times 10^{-9} \text{ M}$, $[\text{ACTH}]_0 = 9,15 \times 10^{-8} \text{ M}$, $[\text{ALDO}]_0 = 2,03 \times 10^{-8} \text{ M}$ i $[\text{CORT}]_0 = 2,38 \times 10^{-8} \text{ M}$ [1, 10].

1.5.2.2. Varijanta minimalnog modela predložena od Markovića i saradnika

Marković i saradnici su dopunili minimalni model sa još dve reakcije (tabela 7.) [114].

Tabela 7. Model HPA sistema koji su predložili Marković i saradnici [114]. ALDO = aldosteron, CORT = kortizol.



Reakcija (M10) predstavlja proces eliminacije CRH iz sistema, a reakcija (M11) proces eliminacije aldosterona iz sistema. Ove dopune omogućavaju približavanje mehanizma modela realnom načinu funkcionisanja HPA sistema [114].

1.5.3. MODELI HPA SISTEMA SA HOLESTEROLOM

Vrlo mali broj modela HPA sistema uključuje u sebe i holesterol. Nestehiometrijski modeli ove vrste su ukratko prikazani u tabeli 8. [10, 18, 115-118].

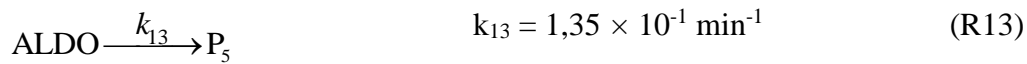
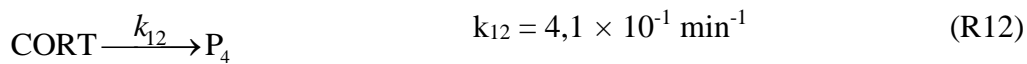
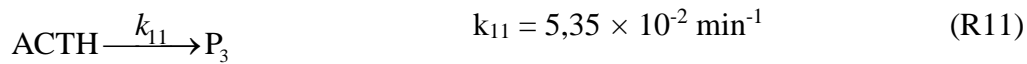
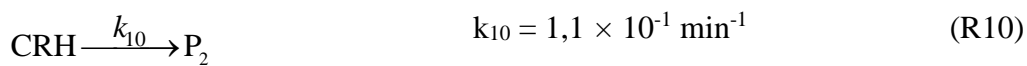
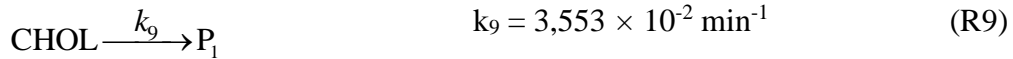
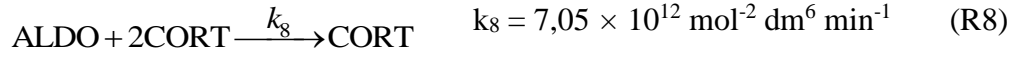
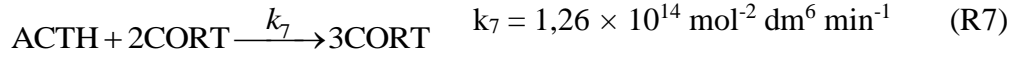
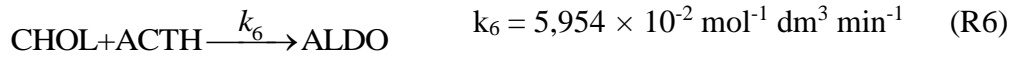
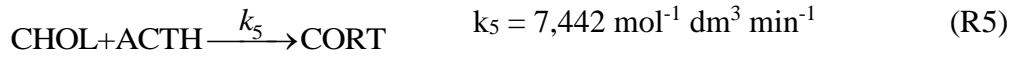
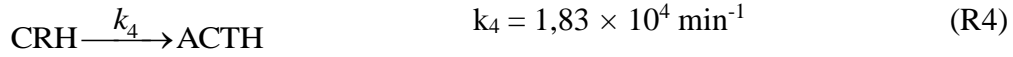
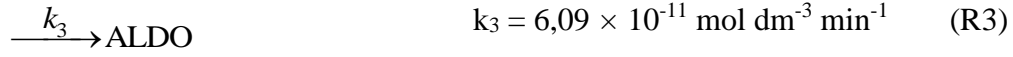
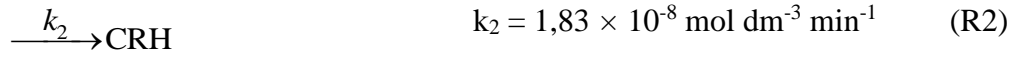
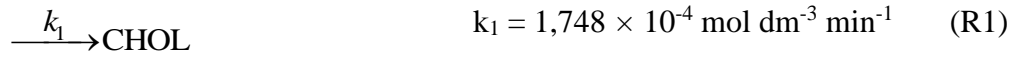
Tabela 8. Nestehiometrijski modeli HPA sistema sa holesterolom.

Model	O modelu	Rezultati simulacija
Dempsher i saradnici, 1984. [115]	Model je sastavljen od 12 diferencijalnih jednačina, sa 44 parametra, kojim je opisana biosinteza kortizola iz holesterola izazvana dejstvom ACTH. CRH nije razmatran.	Simulira dnevne oscilacije u HPA sistemu.
Meyer-Hermann i saradnici, 2009. [116]	Od vrsta važnih za HPA osu model sadrži koncentracije kortizola i holesterola kao dinamičke promenljive. Model je pokazao potencijal za objašnjenje uzajamnog dejstva HPA sistema i imunog sistema.	Simulira dnevne oscilacije u HPA sistemu.
Breen i saradnici, 2010-2011 [117, 118]	Cilj modela je određivanje kinetičkih i transportnih parametara biosinteze steroidnih hormona iz holesterola.	Ne simulira ni dnevne niti unutarodnevnoscilacije u HPA sistemu.

1.5.3.1. Stehiometrijski petodimenzionalni model HPA sistema sa holesterolom

Dinamičke promenljive u ovom modelu su koncentracije CRH, ACTH, aldosterona, kortizola i holesterola. Reakcioni mehanizam je prikazan u tabeli 9.

Tabela 9. Petodimenzionalni model HPA sistema sa holesterolom (u daljem tekstu: osnovni model) [18, 119-121]. ALDO = aldosteron, CORT = kortizol, CHOL = holesterol.



Na osnovu modela prikazanog u tabeli 9. mogu se napisati sledeće diferencijalne jednačine:

$$\frac{d[\text{CHOL}]}{dt} = k_1 - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_9[\text{CHOL}] \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_2 - (k_4 + k_{10})[\text{CRH}] \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_4[\text{CRH}] - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_{11}[\text{ACTH}] \quad (3)$$

$$\frac{d[\text{CORT}]}{dt} = k_5[\text{CHOL}][\text{ACTH}] + k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{12}[\text{CORT}] \quad (4)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_3 + k_6[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{13}[\text{ALDO}] . \quad (5)$$

Reakcije (R1), (R2) i (R3) obuhvataju sve moguće načine ulaska holesterola, CRH i aldosterona u HPA sistem. Reakcija (R4) opisuje lučenje ACTH u hipofizi pod dejstvom CRH. Reakcija (R5) opisuje biosintezu kortizola iz holesterola izazvanu dejstvom ACTH. Reakcija (R6) opisuje biosintezu aldosterona iz holesterola izazvanu dejstvom ACTH. Reakcije (R7) i (R8) predstavljaju autokatalitički, odnosno autoinhibicioni korak, redom. Reakcije (R9) - (R13) opisuju nestajanje holesterola, CRH, ACTH, kortizola i aldosterona iz HPA sistema [18].

Stehiometrijski model HPA sistema sa holesterolom je nastao daljim razvojem modela HPA sistema koje su predložili Jelić i saradnici (Tabela 6.) i Marković i saradnici (Tabela 9.) od strane iste istraživačke grupe. Dopunjen i proširen model HPA ose je proistekao kao rezultat ove doktorske disertacije.

2. CILJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Opšti naučni cilj ove disertacije je utvrđivanje efekata etanola na dinamička stanja HPA ose, zavisno od nivoa složenosti postavljenog teorijskog modela. Pored navedenog, cilj je i korelacija rezultata dobijenih matematičkim modelom sa dostupnim rezultatima kliničkih merenja. Predloženi naučni pristup podrazumeva da se primenom osnovnih zakona hemijske kinetike i matematičkog modelovanja dinamike neravnotežnih procesa, simuliraju promene u koncentraciji kortizola u krvi i poremećaji u nivou kortizola nastali usled akutnog i hroničnog konzumiranja etanola. Praktični značaj dobijenih rezultata ogleda se u tome što matematičko modelovanje omogućava:

- upotrebu modela ne samo za verodostojnu simulaciju vremenske evolucije hormona u fiziološkim uslovima, već i pri izloženosti spoljnim uticajima, poput etanola;
- korišćenje modela za proučavanje međuzavisnosti dinamike različitih biohemijskih puteva uključenih u funkcionisanje i samoregualciju HPA ose, kao i narušavanja njihove aktivnosti u neuroendokrinim bolestima i neuropsihijatrijskim poremećajim izazvanih konzumiranjem etanola.

3. METODE

3.1. METODE NUMERIČKE SIMULACIJE

Provera oscilatorne dinamike za dati izbor parametara će biti izvršena numeričkim simulacijama evolucije koncentracija svih hemijskih vrsta prisutnih u modelu. Na osnovu predloženog modela, po zakonu o dejstvu masa biće izveden odgovarajući sistem diferencijalnih jednačina koji opisuje kinetiku ispitivanog sistema. Ovako dobijeni sistem običnih diferencijalnih jednačina će biti rešavan numerički, korišćenjem Girovog (Gear) algoritma [122] za integraciju tzv. krutih sistema običnih diferencijalnih jednačina iz programskog paketa MATLAB. Proračunate vrednosti koncentracije hormona biće upoređene sa bazalnim vrednostima u krvi i odgovarajućim podacima iz literature.

Odziv HPA ose, odnosno promena koncentracije kortizola usled trenutne (akutne) perturbacije etanolom biće ispitivane perturbovanjem sistema u datom trenutku sa određenom količinom etanola. Kada se dinamika HPA ose modeluje pod normalnim fiziološkim uslovima, koncentracije etanola i acetaldehida se postavljaju na nulu, i na taj način se posmatra sistem kada etanol i njegov metabolit nisu prisutni u organizmu. Kako bismo simulirali efekat akutnih perturbacija etanolom, numerička integracija sistema diferencijalnih jednačina se zaustavlja u određenom izabranom trenutku i definišu se novi početni uslovi za nastavak integracije. U okviru novih početnih uslova je početna koncentracija etanola stavljena na određenu željenu vrednost, početna koncentracija acetaldehida je ostavljena da bude jednaka nuli, dok su koncentracije svih ostalih vrsta u modelu zadržale vrednosti koje su imale u trenutku zaustavljanja integracije.

Bifurkaciona analiza će biti izvedena kako bi se ispitale trajne posledice na dinamiku HPA ose nastale usled dugoročne (hronične) upotrebe etanola. Hronični unos etanola je modelovan tako što je koncentracija etanola držana konstantnom na određenoj željenoj vrednosti, oponašajući na taj način nivo etanola u krvi koji je uobičajen kod hroničnog konzumiranja alkohola.

3.1.1. POČETNI USLOVI KORIŠĆENI U SIMULACIJAMA KOJE ĆE BITI PREDSTAVLJENE U POGLAVLJIMA 4.1 I 4.2

Prilikom izvođenja numeričkih simulacija u poglavljima 4.1 i 4.2, početne koncentracije vrsta prisutnih u modelu su iznosile: $[\text{CHOL}]_0 = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CRH}]_0 = 1 \cdot 10^{-12} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CORT}]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ i $[\text{ALDO}]_0 = 5 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$. Konstante brzina reakcija u modelu mehanizma su date u odgovarajućim tabelama u okviru navedenih poglavlja. Parametri funkcije D su bili: $d_1 = 0,88524$ i $d_2 = 0,957$. Apsolutna i relativna tolerancija greške su iznosile $1 \cdot 10^{-20}$ i $3 \cdot 10^{-12}$, redom.

3.1.2. POČETNI USLOVI KORIŠĆENI U SIMULACIJAMA KOJE ĆE BITI PREDSTAVLJENE U POGLAVLJU 4.3

Prilikom izvođenja numeričkih simulacija u poglavlju 4.3, početne koncentracije vrsta prisutnih u modelu su iznosile: $[\text{CHOL}]_0 = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CRH}]_0 = 1 \cdot 10^{-15} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 8 \cdot 10^{-13} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CORT}]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ALDO}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{POMC}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-endorfin}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-LPH}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-MSH}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Pregnenolon}]_0 = 1 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Hidroksiprogesteron}]_0 = 4 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$. Parametri funkcije D su bili: $d_1 = 0,3025$ i $d_2 = 1$. Apsolutna i relativna tolerancija greške su iznosile $1 \cdot 10^{-20}$ i $3 \cdot 10^{-12}$, redom.

3.1.3. POČETNI USLOVI KORIŠĆENI U SIMULACIJAMA KOJE ĆE BITI PREDSTAVLJENE U POGLAVLJIMA 4.4, 4.5 i 4.6

Prilikom izvođenja numeričkih simulacija u poglavljima 4.4, 4.5 i 4.6, početne koncentracije vrsta prisutnih u modelu su iznosile: $[\text{CHOL}]_0 = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CRH}]_0 = 1 \cdot 10^{-15} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 8 \cdot 10^{-13} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CORT}]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ALDO}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{POMC}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-endorfin}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-LPH}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{-MSH}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Pregnenolon}]_0 = 1 \cdot$

$10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{MC}_2]_0 = 1,5 \cdot 10^{-15} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{MC}_2^{\text{active}}]_0 = 1,5 \cdot 10^{-15} \text{ mol dm}^{-3}$,
 $[\text{Hidroksipregnenolon}]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Progesteron}]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$,
 $[\text{Testosteron}]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Hidroksiprogesteron}]_0 = 4 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$,
 $[\text{Kortikosteron}]_0 = 4 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$. Parametri funkcije D su bili: $d_1 = 0,3025$ i $d_2 = 1$.
Apsolutna i relativna tolerancija greške su iznosile $1 \cdot 10^{-20}$ i $3 \cdot 10^{-12}$, redom.

4. REZULTATI

U ovoj doktorskoj disertaciji je predstavljeno kako se osnovni model može proširiti kako bi se uzeo u obzir i uticaj etanola na HPA osu (poglavlje 4.1), zatim su uvedeni holesterolski pulsevi asimetrične raspodele kako bi se opisao uticaj holesterola unetog putem hrane na HPA osu, a zatim je razmotreno i udruženo dejstvo etanola i holesterola unetog putem hrane na oscilatornu dinamiku HPA ose (poglavlje 4.2). Sa ciljem da koncentracija ACTH bude u referentnom fiziološkom opsegu (što nije slučaj u osnovnom modelu), model je dalje proširen uvođenjem POMC-a i njegovih derivata, kao i detaljnijeg mehanizma steroidogeneze. Onda je ispitano kakav odgovor takav model daje pod dejstvom etanola (poglavlje 4.3). Dalje, model iz poglavlja 4.3 je dodatno proširen tako da detaljno obuhvati sve najvažnije korake u procesu steroidogeneze, što je dovelo do uvođenja novih hemijskih vrsta i njihovih međusobnih veza u modelu. Zatim je ispitan uticaj etanola na taj model (poglavlje 4.4), kao i odgovor modela u slučaju otežanog ili onemogućenog izbacivanja etanola iz organizma (poglavlje 4.4.1). Nakon toga su prikazani rezultati modeliranja interakcije cirkadijalnog ritma, HPA ose i etanola (poglavlje 4.5), kao i rezultati modeliranja uticaja testosterona na odziv HPA ose na etanol (poglavlje 4.6).

4.1 STEHIOMETRIJSKI MODEL MEHANIZMA UTICAJA ETANOLA NA NELINEARNA DINAMIČKA STANJA HPA SISTEMA KOJI SADRŽI 19 REAKCIJA I 7 DINAMIČKIH PROMENLJIVIH

Da bi se opisao efekat etanola na HPA osu, za početnu tačku je izabran petodimenzioni model HPA ose opisan u uvodnom delu (poglavlje 1.5.3.1). Ovaj model, nazvan osnovni model, je proširen uvođenjem reakcija koje sažeto opisuju uticaj etanola na HPA osu. I ovde su interakcije između hemijskih vrsta u sistemu prikazane u formi stehiometrijskih relacija (Tabela 10). Reakcije (R1), (R2) i (R3) obuhvataju sve moguće načine ulaska holesterola, CRH i aldosterona u HPA sistem. Reakcija (R4) opisuje lučenje ACTH u hipofizi pod dejstvom CRH. Reakcija (R5) opisuje biosintezu kortizola iz holesterola

izazvanu dejstvom ACTH. Reakcija (R6) opisuje biosintezu aldosterona iz holesterola izazvanu dejstvom ACTH. Reakcije (R7) i (R8) predstavljaju autokatalitički, odnosno antoinhibicioni korak, respektivno. Reakcije (R9) - (R13) opisuju nestajanje holesterola, CRH, ACTH, kortizola i aldosterona iz HPA sistema [123, 124]. Reakcija (R14) opisuje dodatno oslobađanje CRH izazvano od strane etanola (EtOH), dok reakcija (R15) opisuje metabolizam etanola do acetaldehida (AcALD) u jetri. Reakcije (R16) i (R17) prikazuju direktan uticaj acetaldehida na nadbubrežnu žlezdu koji dovodi do smanjenja adrenalnog holesterola i do pojačanog lučenja steroidnih hormona, kao što su kortizol i aldosteron.

Važno je naglasiti da reakcije (R1) - (R19) nisu elementarne reakcije, već sažeti ishodi složenih bioloških reakcionih puteva koji su zapisani u obliku stehiometrijskih relacija, isto onako kako je to bilo i u prethodnim manjim modelima (poglavlja 1.5.2.1, 1.5.2.2 i 1.5.3.1).

Tabela 10. Sedmodimenzioni stehiometrijski model uticaja etanola na HPA osu

$\xrightarrow{k_1} \text{CHOL}$	$k_1 = 1.748 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R1)
$\xrightarrow{k_2 \times D} \text{CRH}$	$k_2 = 1.83 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R2)
$\xrightarrow{k_3} \text{ALDO}$	$k_3 = 6.09 \times 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R3)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_4} \text{ACTH}$	$k_4 = 1.83 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$	(R4)
$\text{CHOL} + \text{ACTH} \xrightarrow{k_5} \text{CORT}$	$k_5 = 7.422 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	(R5)
$\text{CHOL} + \text{ACTH} \xrightarrow{k_6} \text{ALDO}$	$k_6 = 5.954 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	(R6)
$\text{ACTH} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_7} 3\text{CORT}$	$k_7 = 1.26 \times 10^{14} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ min}^{-1}$	(R7)
$\text{ALDO} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_8} \text{CORT}$	$k_8 = 7.05 \times 10^{12} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ min}^{-1}$	(R8)
$\text{CHOL} \xrightarrow{k_9} \text{P}_1$	$k_9 = 3.553 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R9)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_{10}} \text{P}_2$	$k_{10} = 1.1 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R10)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_{11}} \text{P}_3$	$k_{11} = 5.35 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R11)
$\text{CORT} \xrightarrow{k_{12}} \text{P}_4$	$k_{12} = 4.1 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R12)
$\text{ALDO} \xrightarrow{k_{13}} \text{P}_5$	$k_{13} = 1.35 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R13)
$\text{EtOH} \xrightarrow{k_{14}} \text{CRH}$	$k_{14} = 5.0 \times 10^{-8} \text{ min}^{-1}$	(R14)
$\text{EtOH} \xrightarrow{k_{15}} \text{AcALD}$	$k_{15} = 1.25 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$	(R15)
$\text{CHOL} + \text{AcALD} \xrightarrow{k_{16}} \text{CORT}$	$k_{16} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	(R16)
$\text{CHOL} + \text{AcALD} \xrightarrow{k_{17}} \text{ALDO}$	$k_{17} = 4.00 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	(R17)
$\text{AcALD} \xrightarrow{k_{18}} \text{P}_6$	$k_{18} = 1.0 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R18)
$\text{EtOH} \xrightarrow{k_{19}} \text{P}_7$	$k_{19} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R19)

Na osnovu predloženog modela, možemo sastaviti sistem diferencijalnih jednačina (Tabela 11).

Tabela 11. Sistem diferencijalnih jednačina koji proističe iz modela u Tabeli 10.

$$\frac{d[\text{CHOL}]}{dt} = k_1 - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_9[\text{CHOL}] - (k_{16} + k_{17})[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_2 - (k_4 + k_{10})[\text{CRH}] + k_{14}[\text{EtOH}] \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_4[\text{CRH}] - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_{11}[\text{ACTH}] \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{CORT}]}{dt} = & k_5[\text{CHOL}][\text{ACTH}] + k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 \\ & - k_{12}[\text{CORT}] + k_{16}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = & k_3 + k_6[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{13}[\text{ALDO}] \\ & + k_{17}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \end{aligned} \quad (5)$$

$$\frac{d[\text{EtOH}]}{dt} = -k_{14}[\text{EtOH}] - k_{15}[\text{EtOH}] - k_{19}[\text{EtOH}] \quad (6)$$

$$\frac{d[\text{AcALD}]}{dt} = k_{15}[\text{EtOH}] + (k_{16} + k_{17})[\text{CHOL}][\text{AcALD}] - k_{18}[\text{AcALD}] \quad (7)$$

Kako bi se uzela u obzir cirkadijalna (dnevna) regulacija lučenja CRH, koja je pod kontrolom centralnog cirkadijalnog sata u suprahijzmatičnom jedru hipotalamusa, uvedena je, isto kao i u prethodnim manjim modelima (poglavlja 1.5.2.1, 1.5.2.2 i 1.5.3.1), spoljna periodična funkcija D koja je predložena tako da prikladno opisuje asimetriju dvadesetčetvoročasovnog ritma kod ljudi, sa noćnom fazom koja traje 8 sati [140, 125, 126]:

$$D = d_1 - 0,079145093 \times d_2 + \{(0,064 \times \sin(2\pi t/1440) + 0,12 \times \text{abs}[\sin(\pi t/1440)]\} \times d_2,$$

gde t predstavlja vreme u minutima, a 1440 u brojiocu argumenta trigonometrijske funkcije predstavlja broj minuta u jednom danu, odnosno period cirkadijalnih oscilacija. Dnevna funkcija D , spregnuta sa modelom preko reakcije koja opisuje biosintezu CRH (R2), transformiše konstantu brzine k_2 u periodičnu funkciju $k_2 \times D$, menjajući vrednost k_2 na takav način da joj se pripisuju različite vrednosti u različitim delovima dana.

Prilikom izvođenja numeričkih simulacija, početne koncentracije vrsta prisutnih u modelu su iznosile: $[\text{CHOL}]_0 = 3.4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CRH}]_0 = 1 \times 10^{-12} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ACTH}]_0 = 8 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{CORT}]_0 = 4 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ i $[\text{ALDO}]_0 = 5 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$. Konstante brzina reakcija u modelu mehanizma su date u tabeli 10. Parametri funkcije D su bili: $d_1 = 0,88524$ i $d_2 = 0,957$.

Kada se dinamika HPA ose modeluje pod normalnim fiziološkim uslovima, koncentracije etanola i acetaldehida se postavljaju na nulu, i na taj način se posmatra sistem kada etanol i njegov metabolit nisu prisutni u organizmu. Da bi se simulirao efekat akutnih perturbacija etanolom, numerička integracija sistema diferencijalnih jednačina se zaustavlja u određenom izabranom trenutku i definišu se novi početni uslovi za nastavak integracije. U okviru novih početnih uslova je početna koncentracija etanola stavljena na određenu željenu vrednost, početna koncentracija acetaldehida je ostavljena da bude jednaka nuli, dok su koncentracije svih ostalih vrsta u modelu zadržale vrednosti koje su imale u trenutku zaustavljanja integracije. „Standardna čaša“, tj. 30 ml jakog (40%) alkoholnog pića dovodi do uspostavljanja nivoa alkohola u krvi od 5,2 mM kod žene od 60 kg, odnosno od 3,5 mM kod muškarca od 85 kg (<http://celtickane.com/projects/blood-alcohol-content-bac-calculator>). Ista količina alkohola dovodi do uspostavljanja višeg nivoa alkohola u krvi kod žene nego kod muškarca ne samo zbog razlike u telesnoj masi, već i zbog toga što žene u proseku imaju manji procenat vode (a sa druge strane veći procenat masti) u organizmu od muškaraca usled čega teže razblažuju alkohol. Izuzento je važno imati u vidu i da žene imaju nižu koncentraciju enzima dehidrogenaze koji učestvuje u metabolizmu etanola. Koncentracija alkohola u krvi od 21,7 mM je ekvivalentna sadržaju alkohola u krvi od 0.1 zapreminskih procentata, odnosno od 0,022 masenih procentata (<http://celtickane.com/projects/blood-alcohol-content-bac-calculator>) Hronični unos etanola je modelovan tako što je koncentracija etanola držana konstantnom na određenoj željenoj vrednosti, oponašajući na taj način nivo etanola u krvi koji je uobičajen kod hroničnog konzumiranja alkohola.

Sprezanje dnevne funkcije sa sistemom diferencijalnih jednačina omogućava uspešnu simulaciju i ultradijalnih (unutradnevni) i cirkadijalnih (dnevni) oscilacija, oponašajući

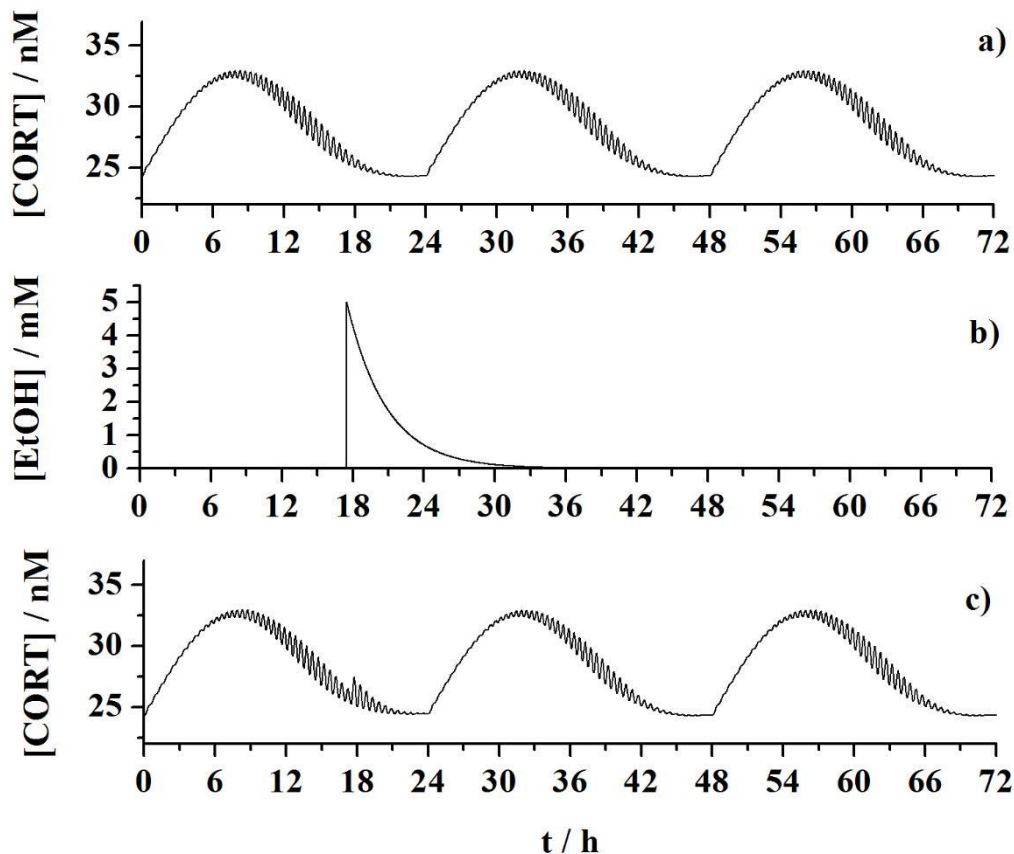
na taj način dnevne varijacije u koncentraciji hormona HPA ose. Pored toga, koncentracije hormona dobijene u ovom modelu odgovaraju referentnim fiziološkim vrednostima, osim kod ACTH čija je koncentracija prema predviđanjima modela viša od referentnih fizioloških vrednosti (Tabela 12).

Tabela 12. Srednji dnevni nivoi hormona HPA ose predviđeni na osnovu modela prikazanog u Tabeli 10, u poređenju sa referentnim fiziološkim vrednostima ovih hormona u humanoj krvi merenih *in vivo* [123 i odgovarajuće reference tamo]. M = mol dm⁻³.

Hormon	Koncentracija predviđena modelom (Tabela 10) / M	Referentna fiziološka vrednost * / M
Holesterol	$3,07 \cdot 10^{-3}$	$3,10 \cdot 10^{-3} - 5,20 \cdot 10^{-3}$
CRH	$8,85 \cdot 10^{-13}$	$7,70 \cdot 10^{-13} - 2,50 \cdot 10^{-12}$
ACTH	$8,38 \cdot 10^{-8}$	$2,20 \cdot 10^{-12} - 1,33 \cdot 10^{-11}$
CORT	$2,86 \cdot 10^{-8}$	$5,52 \cdot 10^{-8} - 6,90 \cdot 10^{-7}$
Aldosteron	$6,07 \cdot 10^{-10}$	$4,70 \cdot 10^{-10} - 4,27 \cdot 10^{-9}$

* Mayo Medical Laboratories

Složene dnevne varijacije nivoa kortizola u krvi dobijene numeričkim simulacijama za normalnu fiziologiju, tj. bez prisustva etanola, prikazane su na slici 8a. Akutna perturbacija etanolom (vertikalna linija na slici 8b) praćena je metaboličkom degradacijom tokom koje koncentracija etanola postepeno opada (Slika 8b). Prateći trenutnu promenu koncentracije etanola, nivoi svih hemijskih vrsta se prilagođavaju menjajući svoje nivoe, što je ilustrovano na primeru vremenske evolucije kortizola na slici 8c.



Slika 8. a) Numerička simulacija promene koncentracije kortizola tokom dana koja pokazuje složenu dinamiku sa unutardnevnim oscilacijama superponiranim na dnevne oscilacije. Period unutardnevnih oscilacija je oko 30 minuta, dok je period dnevnih oscilacija 24 h.

b) Akutna perturbacija etanolom je simulirana u modelu kao jedan puls etanola (vertikalna linija); koncentracija etanola primenjena prilikom perturbacije iznosi 5 mM, a trenutak perturbacije je 17.30 h (17 h i 30 min). Perturbacija etanolom je praćena monotonim opadanjem koncentracije etanola usled metaboličke degradacije.

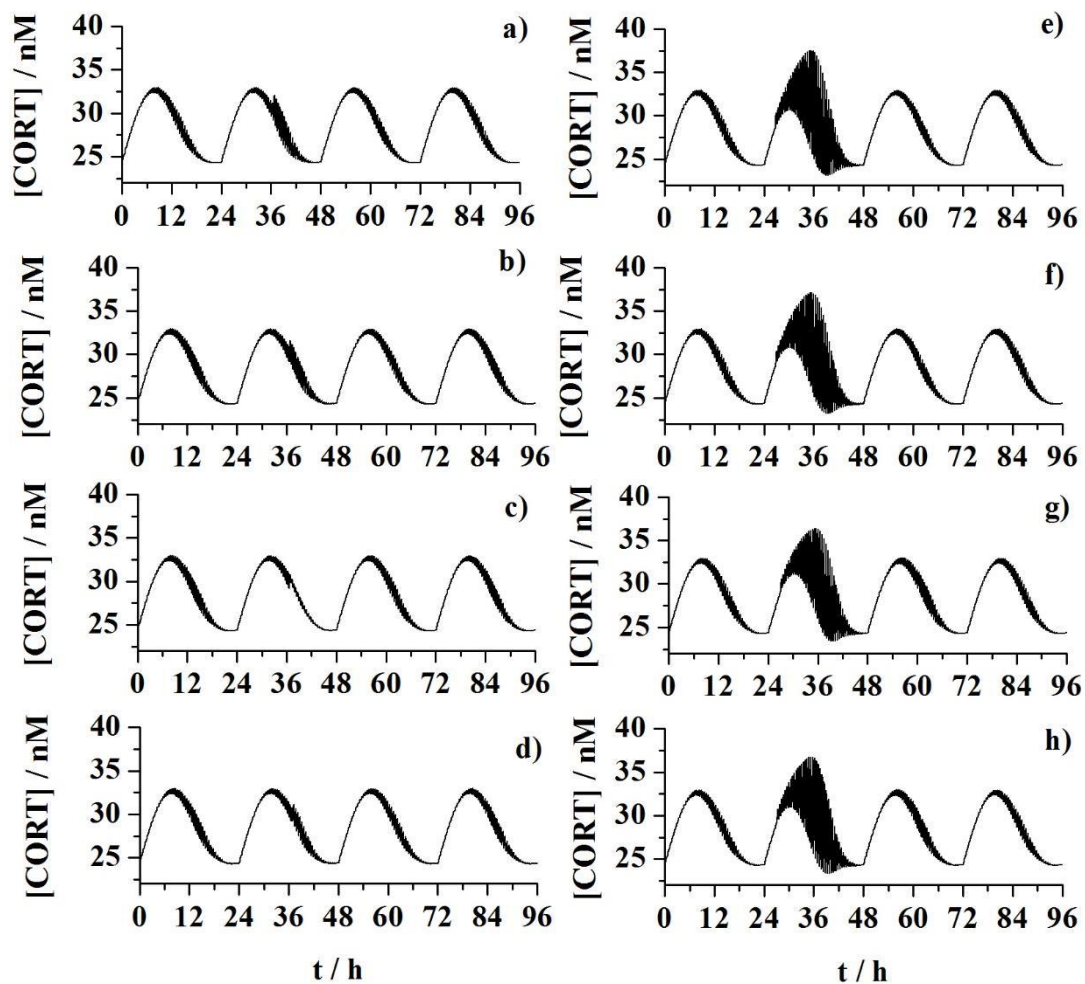
c) Uticaj akutne perturbacije intenziteta 5 mM etanola na dinamiku kortizola. Primenjena perturbacija etanolom zapravo odgovara onoj prikazanoj pod b).

Vreme koje je potrebno HPA osi da se vrati na svoju prvobitnu dinamiku je u saglasnosti sa eksperimentalnim merenjima (de Waele i Gianoulakis 1993). Pored toga, predviđanja modela su u skladu sa eksperimentalno opaženim oštrim porastom etanola nakon perturbacije (slika 8b).

Odgovor HPA ose na akutne perturbacije etanolom je složen i veoma zavisi od stanja u kom se HPA osa nalazi u trenutku perturbacije, tj. od faze unutardnevne i dnevne oscilacije; kao i od intenziteta perturbacije (Slika 9). Amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola tokom obdanice (aktivne faze kod ljudi) i noći (faze odmora kod ljudi) su različite (Slika 8a), i daće različiti odgovor HPA ose na perturbacije etanolom istog intenziteta u zavisnosti od toga da li je perturbacija primenjena tokom obdanice (Slike 9a-d) ili tokom noći (Slike 9e-h).

Kada se sistem perturbuje etanolom, odgovor HPA ose će izrazito zavisi od faze unutardnevne oscilacije (Slika 9a-d). Kada se ista količina etanola unese u različitim fazama unutardnevne oscilacije, može doći ili do gašenja (slika 9c), ili do povećanja (Slike 9a) unutardnevnih oscilacija, ili do toga da amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola ostane praktično nepromenjena (Slika 9d).

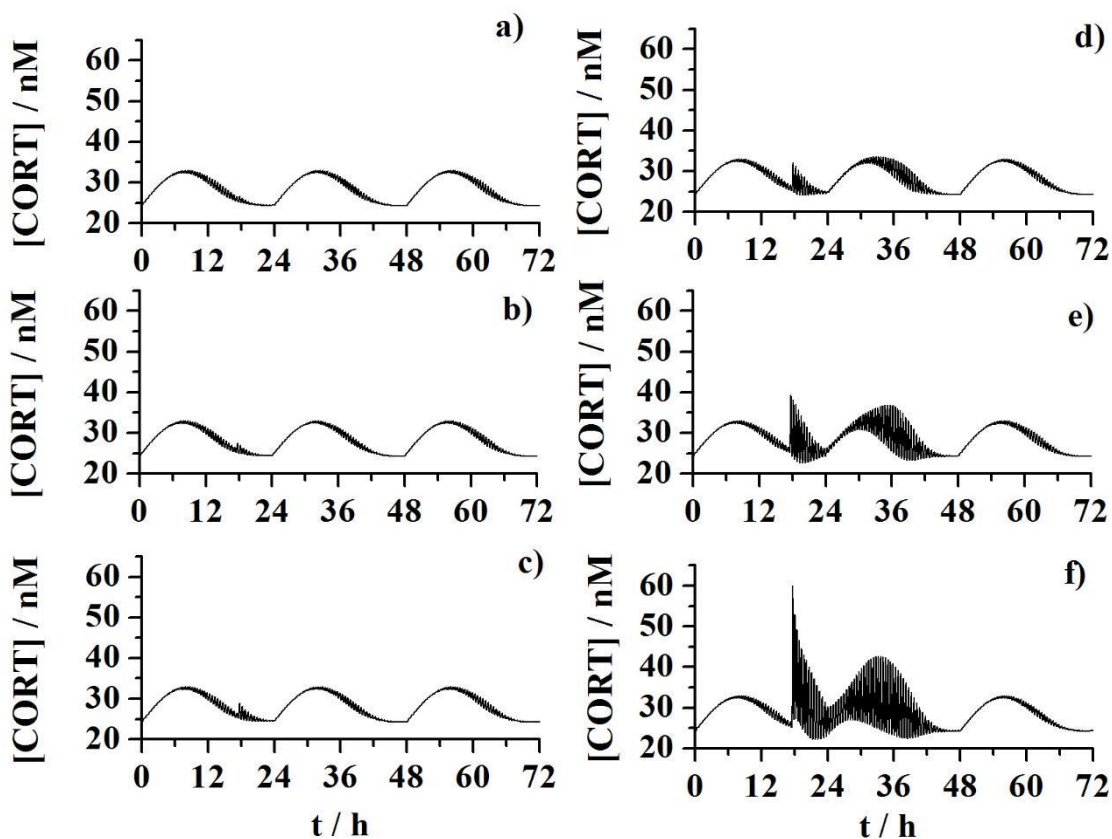
U slučaju da se sistem perturbuje istom koncentracijom etanola tokom noći, amplitude unutardnevnih oscilacija sledećeg dana će se povećati bez obzira na fazu unutardnevne oscilacije u kojoj se sistem nalazio u trenutku perturbacije (Slike 9e-h). Ovakvo ponašanje se javlja jer je amplituda unutardnevnih oscilacija mala tokom noći. Stoga, doza etanola koja jedva da utiče na unutardnevne oscilacije tokom obdanice izaziva izuzetno veliki efekat u slučaju kada se primeni tokom noći. Ukoliko bismo dozu etanola koju primenjujemo tokom noći smanjili toliko da ona bude prilagođena amplitudi unutardnevnih oscilacija tokom noć, dobili bismo isti složeni odgovor tokom noći, kao i tokom dana (Slike 9a-d).



Slika 9. Složeni odgovor HPA ose na perturbaciju istog intenziteta, 4,25 mM etanola, primenjenu u različitim fazama unutardnevne oscilacije kortizola. a) Porast amplitude unutardnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u uzlaznoj prevojnoj tački unutardnevne oscilacije tokom obdanice. b) Malo povećanje amplitude unutardnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u maksimumu unutardnevne oscilacije tokom obdanice. c) Gašenje unutardnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije u silaznoj prevojnoj tački unutardnevne oscilacije tokom obdanice. d) Neznatno povećanje unutardnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije u minimumu unutardnevne oscilacije tokom obdanice. Sada zapravo dolazi do promena smera odgovora kortizola na perturbacije etanolom, od smanjivanja unutardnevne amplitude, ka njenom ponovnom povećanju. e-h) Perturbacija istog intenziteta je primenjena u različitim fazama unutardnevne oscilacije tokom noći (uzlazna prevojna tačka, maksimum, silazna prevojna

tačka i minimum, redom). Uočeno je da u sva četiri slučaja dolazi do povećanja amplitude unutar dnevnih oscilacija kortizola tokom naredne obdanice.

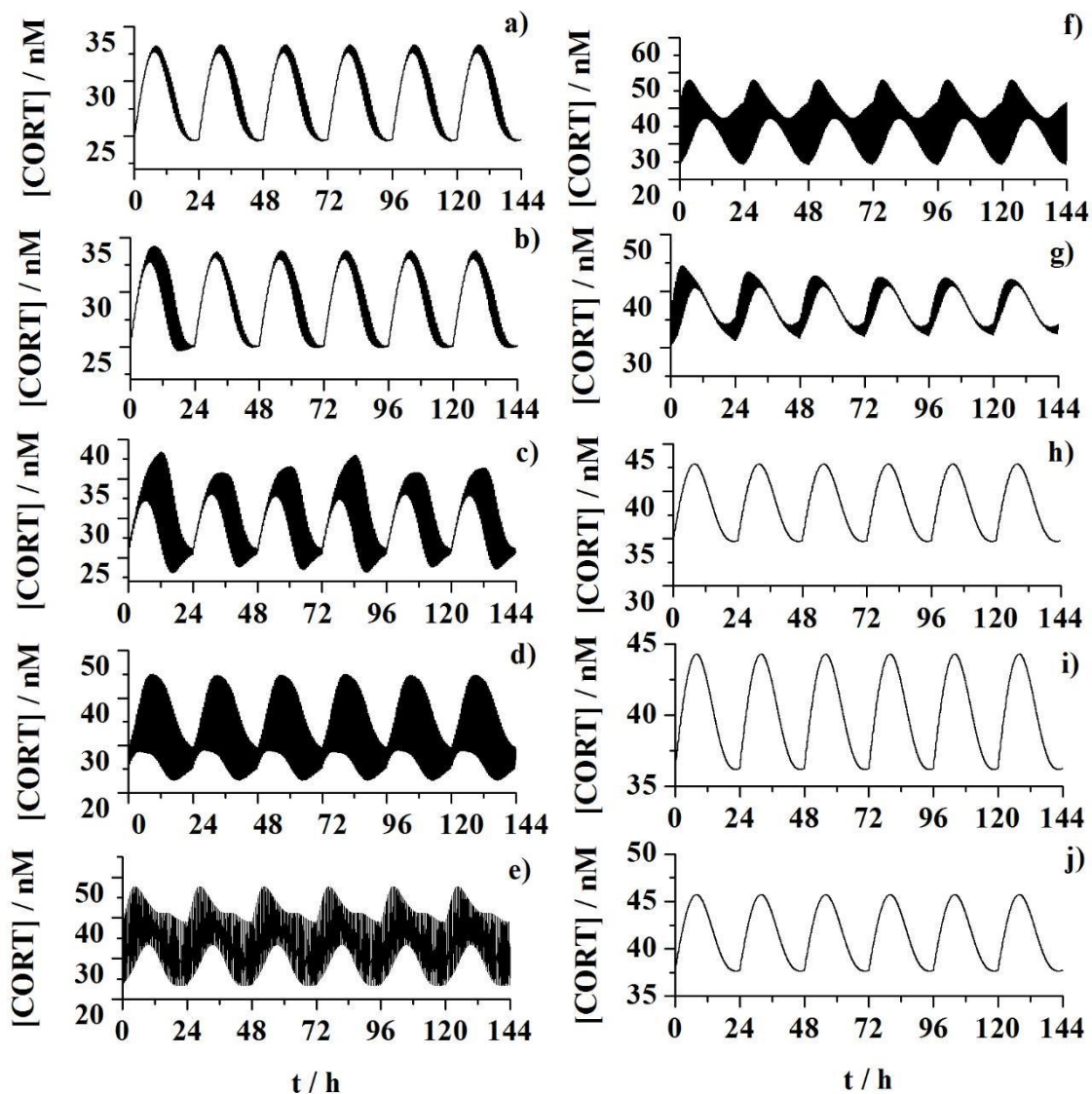
Akutne perturbacije etanolom različitog intenziteta (2-100 mM) primenjene uvek u isto vreme, 17.30 h (uobičajeno vreme u kojem mnogi ljudi u zapadnoj Evropi i Severnoj Americi nakon posla konzumiraju alkohol), pokazuju da je odgovor HPA ose proporcionalan primenjenoj dozi etanola (Slika 10). Takođe, postoji korelacija između doze etanola i vremena koje je potrebno HPA osi da se vrati na svoju prvobitnu dinamiku (Slika 10).



Slika 10. Efekat akutnih perturbacije etanolom na dinamiku HPA ose. Perturbacije etanolom su uvek primenjene u isto vreme, u 17.30 h. Koncentracije etanola je iznosila: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, i f) 100 mM.

Hronična izloženost etanolu dovodi do složenih transformacija dinamike HPA ose (Slika 11). Male koncentracije etanola, $[EtOH] \leq 2$ mM neznatno povećavaju amplitudu unutar dnevnih oscilacija kortizola, ali ne utiču na globalnu dinamiku HPA ose (Slika

11a). Kako se koncentracije etanola povećavaju, amplituda unutardnevni oscilacija nastavlja da raste (Slika 11b) dovodeći do pojave neperiodičnih oscilacija velikih amplituda (Slika 11c).



Slika 11. Hronična izloženost etanolu menja dinamiku HPA ose. U numeričkim simulacijama koncentracija etanola je držana konstantnom na sledećim vrednostima: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, f) 50 mM, g) 60 mM, h) 70 mM, i) 80 mM, j) 90 mM.

Dalje povećanje nivoa hroničnog etanola dovodi do pojave oscilacija velikih amplituda i tokom noći (Slike 11d i e). Ukoliko se nivo hroničnog etanola još više povećava, amplitude unutar dnevnih oscilacija počinju da se smanjuju, ali srednji dnevni nivo koncentracije kortizola i frekvencija unutar dnevnih oscilacija kortizola nastavljaju da rastu (Slika 11f). Kada je $[EtOH] = 60 \text{ mM}$, unutar dnevna regulacija je potpuno narušena i cirkadijalna regulacija je izvrnuta - amplitude unutar dnevnih oscilacija su veće tokom noći nego tokom obdanice. Kao posledica toga, cirkadijalne oscilacije kortizola dostižu maksimum oko ponoći, na početku faze odmora (Slika 11g) umesto ujutru, kao što je to slučaj kod normalnog fiziološkog stanja (Slika 8a). Ukoliko bi se nastavilo sa povećanjem nivoa hroničnog etanola (iznad letalne, tj. smrtonosne doze), došlo bi do potpunog gašenja unutar dnevnih oscilacija i do daljeg porasta srednjeg dnevnog nivoa kortizola (Slika 11h-j).

4.2 MODELIRANJE PERTURBACIJA HPA OSE SPOLJNIM HOLESTEROLSKIM PULSEVIMA KONAČNOG TRAJANJA I ASIMETRIČNOG KONCENTRACIONOG PROFILA

U ovom poglavlju je analizaran uticaj dugotrajnih perturbacija koje simuliraju promene u koncentraciji holesterola u krvi nekoliko sati nakon unosa holesterola putem hrane. Mnogobrojna istraživanja su pokazala da svakih 100 mg holesterola unetih putem hrane u jednom danu dovode do povećanja ukupnog holesterola u krvi za 2,2 – 2,5 mg/dl [127-131]. Međutim, precizni mehanizmi putem kojih HPA osa reaguje na unos holesterola iz hrane su i dalje nepoznati [157, 132, 133].

Kako bismo pomoću matematičkog modeliranja pokušali da damo novi osvrt na ovu problematiku, umesto trenutnih perturbacija, generisani su široki holesterolski pulsevi definisane raspodele. Kao osnova za matematičko modeliranje, iskorišćen je model prikazan u Tabeli 10, ali bez reakcija (R14) – (R19), tj. bez prisustva etanola. Posmatrani model je zatim proširen sa dve nove reakcije i dve nove hemijske vrste (Tabela 13). Ovakav model je zadržao sve osobine modela prikazanog u Tabeli 10, ali je dodatno

omogućio simuliranje ulaska holesterola iz hrane u krv, što se odigrava kroz seriju biohemijjskih procesa u digestivnom traktu i jetri, i može trajati nekoliko sati [134].

Reakcija (R1a) opisuje unos holesterola iz spoljnih izvora, kao što je hrana. Dinamička promenljiva A predstavlja spoljne izvore holesterola. Reakcija (R1b) opisuje eliminaciju holesterola karakterisanu kinetikom drugog reda. Dinamička promenljiva B predstavlja vrste koje posreduju u eliminaciji holesterola iz globalne cirkulacije, kao što su npr. lipoproteini visoke gustine (HDL, engl. high-density lipoprotein), ili statini, odnosno lekovi kojima se uklanja višak holesterola. Preciznija podela holesterola nije uzimana u obzir u ovom modelu.

Tabela 13. Model HPA ose koji omogućava simulaciju spoljnih holesterolskih pulseva konačnog trajanja i asimetričnog koncentracionog profila [127]

$\xrightarrow{k_1} \text{CHOL}$	$k_1 = 1.748 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R1)
$A \xrightarrow{k_{1a}} \text{CHOL}$	$k_{1a} = 1.748 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R1a)
$B + \text{CHOL} \xrightarrow{k_{1b}} P$	$k_{1b} = 3.496 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$	(R1b)
$\xrightarrow{k_2 \times D} \text{CRH}$	$k_2 = 1.83 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R2)
$\xrightarrow{k_3} \text{ALDO}$	$k_3 = 6.09 \times 10^{-11} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R3)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_4} \text{ACTH}$	$k_4 = 1.83 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$	(R4)
$\text{CHOL} + \text{ACTH} \xrightarrow{k_5} \text{CORT}$	$k_5 = 7.422 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	(R5)
$\text{CHOL} + \text{ACTH} \xrightarrow{k_6} \text{ALDO}$	$k_6 = 5.954 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	(R6)
$\text{ACTH} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_7} 3\text{CORT}$	$k_7 = 1.26 \times 10^{14} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ min}^{-1}$	(R7)
$\text{ALDO} + 2\text{CORT} \xrightarrow{k_8} \text{CORT}$	$k_8 = 7.05 \times 10^{12} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ min}^{-1}$	(R8)
$\text{CHOL} \xrightarrow{k_9} P_1$	$k_9 = 3.553 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R9)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_{10}} P_2$	$k_{10} = 1.1 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R10)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_{11}} P_3$	$k_{11} = 5.35 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R11)
$\text{CORT} \xrightarrow{k_{12}} P_4$	$k_{12} = 4.1 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R12)
$\text{ALDO} \xrightarrow{k_{13}} P_5$	$k_{13} = 1.35 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R13)

Vremenska evolucija koncentracije svih vrsta u modelu određena je sistemom diferencijalnih jednačina izvedenih iz reakcija (R1) – (R13) u Tabeli 13, uz poštovanje zakona o dejstvu masa (Tabela 14).

Tabela 14. Sistem diferencijalnih jednačina koji proističe iz modela u Tabeli 13.

$$\frac{d[\text{CHOL}]}{dt} = k_1 + k_{1a}[A] - k_{1b}[B][\text{CHOL}] - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_9[\text{CHOL}] \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_2 - (k_4 + k_{10})[\text{CRH}] \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_4[\text{CRH}] - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_{11}[\text{ACTH}] \quad (3)$$

$$\frac{d[\text{CORT}]}{dt} = k_5[\text{CHOL}][\text{ACTH}] + k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{12}[\text{CORT}] \quad (4)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_3 + k_6[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{13}[\text{ALDO}] \quad (5)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{1a}[A] \quad (6)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_{1b}[B][\text{CHOL}]$$

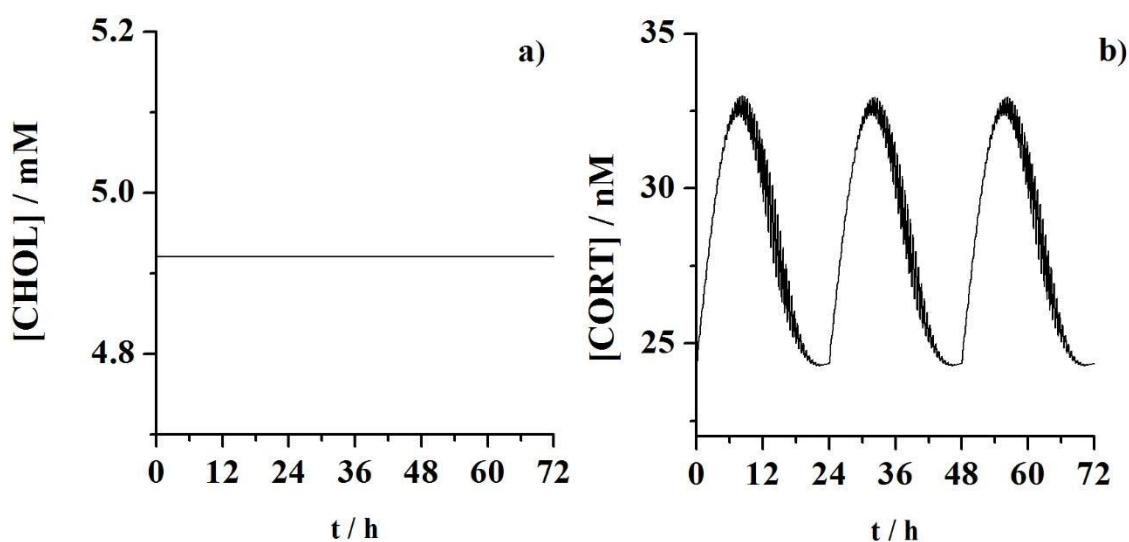
(7)

Rešavanjem ovog sistema diferencijalnih jednačina dobijamo unutarodnevnu dinamiku HPA ose. Kako bi se uzela u obzir i cirkadijalna (dnevna) regulacija lučenja CRH, ponovo ćemo koristiti spoljnu periodičnu funkciju D koja je detaljno objašnjena u poglavlju 3.1:

$$D = d_1 - 0,079145093 \times d_2 + \{(0,064 \times \sin(2\pi t/1440) + 0,12 \times \text{abs}[\sin(\pi t/1440)]\} \times d_2$$

Kao i ranije, sprezanje dnevne funkcije sa sistemom diferencijalnih jednačina omogućava uspešnu simulaciju i unutarodnevni (ultradijalni) i dnevni (cirkadijalni) oscilacija, oponašajući na taj način dnevne varijacije u koncentraciji hormona HPA ose. Koncentracije hormona HPA ose dobijene na bazi modela u Tabeli 13 su iste kao one dobijene na bazi modela u Tabeli 10 i prikazane su u Tabeli 12. Takav rezultat je i očekivan, jer srž modela nije pretrpela nikakve izmene.

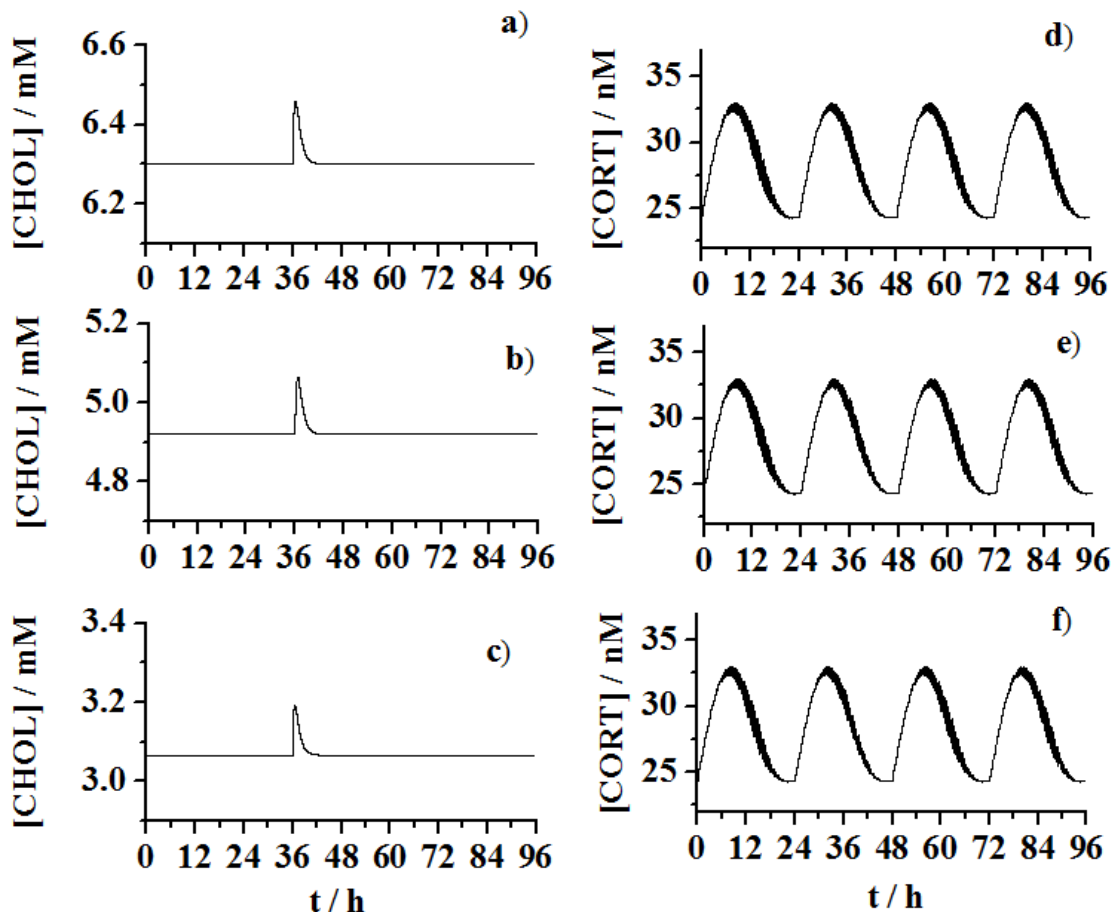
Kada je dinamika HPA ose modelovana pod normalnim fiziološkim uslovima, koncentracije vrsta A i B su postavljene na nulu. Kao posledica toga, brzine reakcije (R1a) i (R1b) su bile jednake nuli. Vremenska evolucija koncentracije holesterola koja odgovara normalnim fiziološkim uslovima, kada A i B nisu prisutni u modelu (pošto su njihove koncentracije jednake nuli) data je na Slici 12a. Vremenska evolucija koncentracije kortizola koja odgovara normalnim fiziološkim uslovima, kada A i B nisu prisutni u modelu data je na Slici 12b. Kako bismo simulirali efekat perturbacija holesterolom, numerička integracija sistema diferencijalnih jednačina je zaustavljena u određenom izabranom trenutku i definisani su novi početni uslovi za nastavak integracije. U okviru novih početnih uslova su početne koncentracije A i B stavljene na određene željene vrednosti, dok su koncentracije svih ostalih vrsta u modelu zadržale vrednosti koje su imale u trenutku zaustavljanja integracije.



Slika 12. Neperturbovana vremenska evolucija koncnetracije a) holesterola, b) kortizola. $[A]_0 = 0$, $[B]_0 = 0$.

Perturbacija sistema sa A i B dovodi do formiranja holesterolskih pulseva asimetričnog koncentracionog profila (Slike 13a-c i 14a-c). Holesterolski puls je okarakterisan širinom (u minutima) na polovini visine maksimuma pulsa i intenzitetom pulsa. Širina na polovini visine maksimuma pulsa (poluširina pulsa) predstavlja merilo trajanja perturbacije, dok koncentracija holesetrola u maksimumu pulsa predstavlja kvantitativnu meru intenziteta

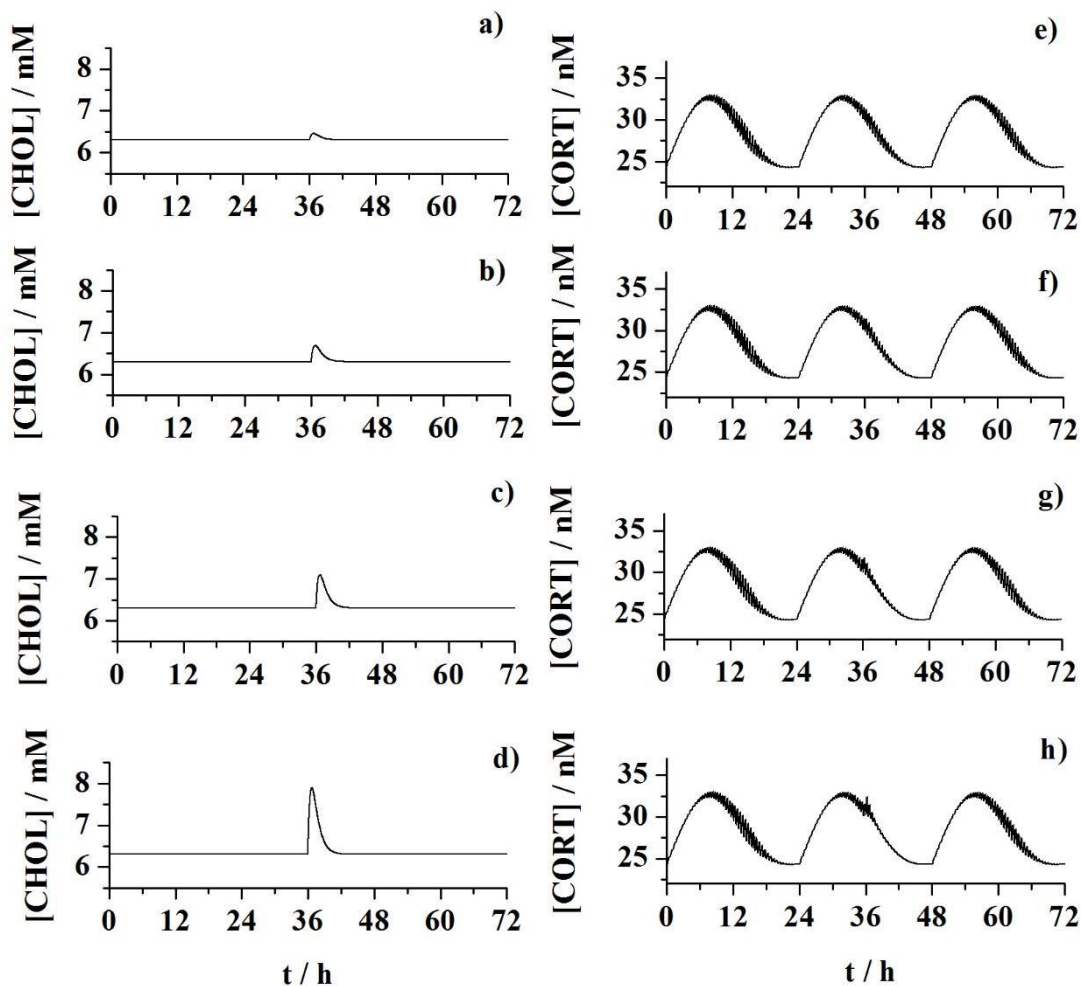
pulsa. Poluširina pulsa u slučajevima razmatranim u ovom radu iznosi između dva i tri sata.



Slika 13. Vremenska evolucija koncentracije kortizola (d-f) za različite nivoe bazalnog (osnovnog fiziološkog) holesterola u krvi a) povišen nivo holesterola u krvi – hiperholesterolemija, b) normalan nivo holesterola u krvi, c) snižen nivo holesterola u krvi – hipoholesterolemija; i za primenjen identičan holesterolni puls u sva tri slučaja. U svim slučajevima je $[A]_0 = 6 \cdot 10^{-4}$ M i $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ M.

U cilju ispitivanja perturbacija HPA ose holesterolom, razmatrana su tri slučaja: jedan sa normalnim nivoom holesterola u krvi (Slika 13b), jedan sa povišenim nivoom holesterola u krvi – hiperholesterolemijom (Slika 13a), i jedan sa sniženim nivoom holesterola u krvi – hipoholesterolemijom (Slika 13c). Ista količina holesterola unetog putem hrane je primenjena na sva tri slučaja, kao i njegova eliminacija reakcijom R1b. To znači da su početne koncentracije A i B bile iste u sve tri numeričke simulacije. Numeričke simulacije

bazirane na našem modelu su pokazale da nivo holesterola u krvi ne utiče na odgovor kortizola na holesetrol unešen putem hrane (Slika 13).



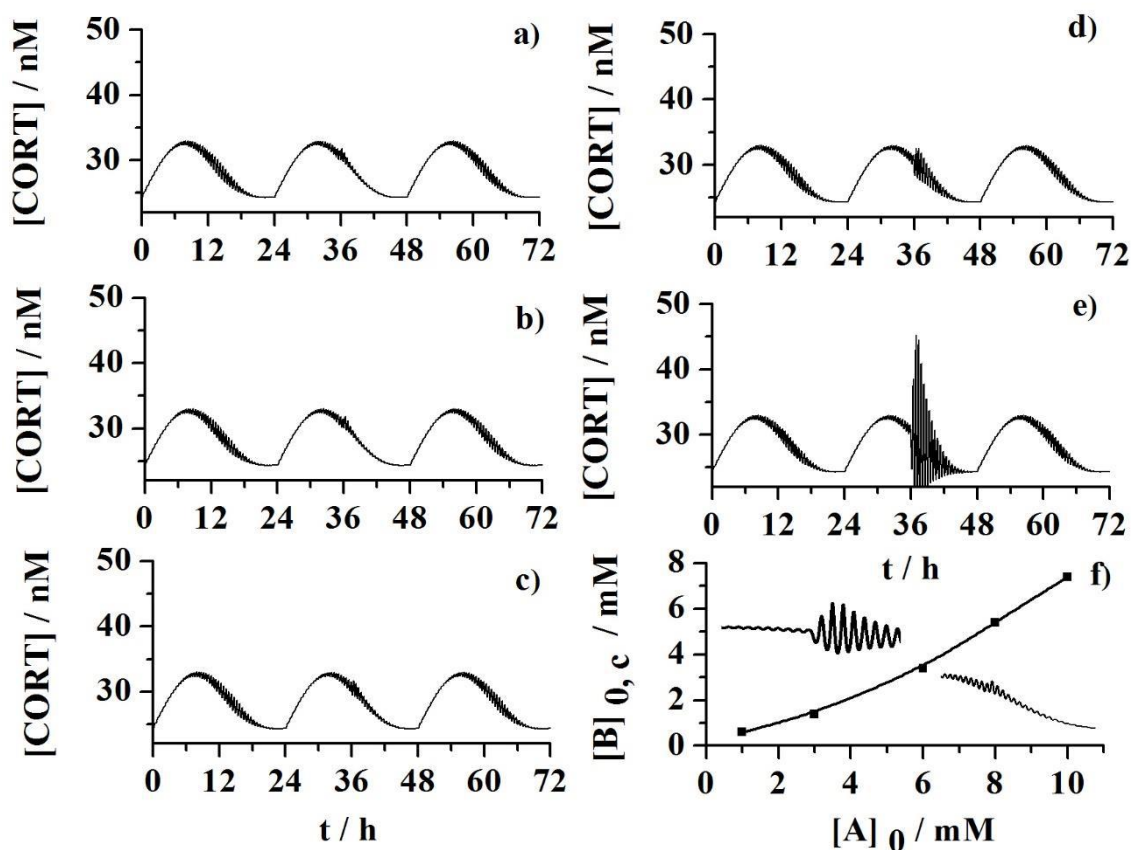
Slika 14. Vremenska evolucija koncentracije kortizola za normalne bazalne vrednosti holesterola i za različite početne koncentracije vrste A:

a) i e) $[A]_0 = 6 \cdot 10^{-4}$ M, b) i f) $[A]_0 = 1.5 \cdot 10^{-3}$ M, c) i g) $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-3}$ M, d) i h) $[A]_0 = 6 \cdot 10^{-3}$ M. a) – h) $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ M.

Međutim, početna koncentracija dodatog holesetrola ($[A]_0$) utiče na odgovor kortizola na unos holesetrola putem hrane (Slika 14). Kada je bazalni nivo holesetrola u krvi u referentnom fiziološkom opsegu, viša početna koncentracija A dovodi do smanjenja amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola. Dalje povećanje početne koncentracije A dovodi do potpunog gašenja unutardnevnih oscilacija (Slika 14h). Bazalni nivo

holesterola u krvi koji je viši ili niži od referentnih fizioloških vrednosti ne utiče na odgovor kortizola na različito $[A]_0$.

Početna koncentracija vrste B utiče na odgovor kortizola na holesterol unet putem hrane (Slika 15). Kada je bazalni nivo holesterola u krvi u referentnom fiziološkom opsegu, više početne koncentracije B dovode do smanjenja amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola. Dalje povećanje početne koncentracije B dovodi do gašenja unutardnevnih oscilacija. Međutim, ako nastavimo da i dalje povećavamo početnu koncentraciju B, to će dovesti do ponovnog uspostavljanja unutardnevnih oscilacija i do povećanja njihove amplitude (Slika 15). Ovi rezultati ukazuju na to da postoji nelinearna promena u odgovoru kortizola na holesterolske pulseve, u zavisnosti od različitih početnih koncentracija vrste B, tj. vrste koja uklanja holesterol. Međutim, do ovakve nelinearne promene ne dolazi sa povećanjem početne koncentracije A. Možemo smatrati da se amplituda unutardnevnih oscilacija znatno menja tek na određenoj kritičnoj početnoj koncentraciji B, tj. na $B_{0,c}$. Ova kritična vrednost zavisi od početne koncentracije A, tj. od $[A]_0$. Na Slici 15f je prikazan bifurkacioni dijagram zavisnosti $[B]_{0,c}$ od bifurkacionog parametra $[A]_0$.



Slika 15. Vremenska evolucija koncentracije kortizola za normalne bazalne vrednosti holesetrola i za različite početne koncentracije vrste B:

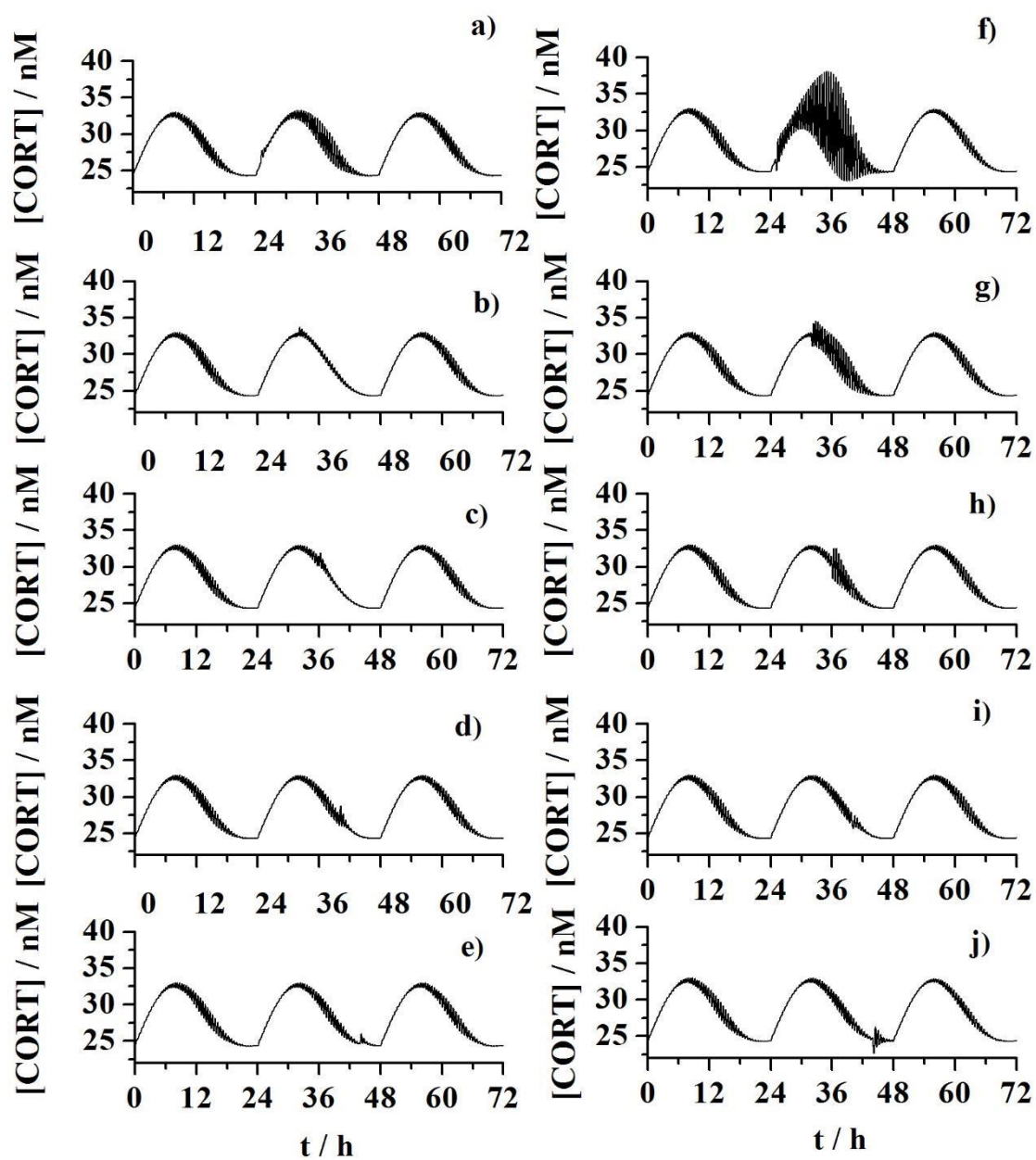
a) $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, b) $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, c) $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, d) $[B]_0 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, e) $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. a) – e) $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

f) Bifurkacioni dijagram koji pokazuje zavisnost kritične vrednosti početne koncentracije vrste B, $[B]_{0,c}$, u funkciji početne koncentracije vrste A, $[A]_0$, kao bifurkacionog parametra. Za datu vrednost $[A]_0$, $[B]_{0,c}$ predstavlja kritičnu vrednost početne koncentracije B za koju dolazi do važnog preokreta u ponašanju sistema nakon perturbacija: od unutardnevnih oscilacija kortizola malih amplituda (oscilogram sa desne strane bifurkacionog dijagrama) dobijenih za niže vrednosti $[B]_0$, ka unutardnevnim oscilacijama velikih amplituda (oscilogram sa leve strane bifurkacionog dijagrama) dobijenih za više vrednosti $[B]_0$.

Odgovor kortizola na unos holesterola putem hrane zavisi i od faze cirkadijalnog ritma u kojoj je holesterol unet u organizam (Slika 16). Takođe, odgovor sistema na unos

holesterola, u određeno doba dana, zavisi od vrednosti početne koncentracije B. Ova razlika je uvek vidljiva, a naročito rano ujutru i tokom prepodneva (uporediti Slike 16b i g, kao i 16c i h), kada manji puls holesterola sa manjom početnom koncentracijom B gasi unutarnevne oscilacije kortizola (slike 16b i c), dok puls sa većom početnom koncentracijom B povećava amplitudu unutarnevni oscilacija kortizola (Slike 16g i h).

Numeričke simulacije bazirane na prikazanom modelu pokazuju da noćni unos holesterola može da poremeti cirkadijalnu regulaciju oscilacija kortizola, i može da značajno poveća amplitude unutarnevni oscilacija kortizola (Slike 16a i f) u poređenju sa jutarnjim i podnevnim unosom holesterola (Slike 16b i g, kao i 16c i h) koji blago povećavaju amplitude unutarnevni oscilacija kortizola. Blago povećanje amplituda unutarnevni oscilacija kortizola omogućuje HPA osi bolju adaptaciju na stres.



Slika 16. Vremenska evolucija koncentracije kortizola nakon perturbacija holesterolskim pulsevima primenjenim u različitim trenucima tokom dana:

a) i f) 25 h, b) i g) 32 h, c) i h) 36 h, d) i i) 40 h, e) i j) 44 h.

a) – e) $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ M.

f) – j) $[B]_0 = 2 \cdot 10^{-3}$ M.

U svim slučajevima je $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-3}$ M.

Konačno, u svetlu Slike 16, može se videti farmakološki uticaj supstanci koje snižavaju nivo holesterola u krvi, poput statina [127, 135] na dinamiku kortizola. U tom smislu, statini mogu imati ulogu supstance B. Snižavanje početne koncentracije B može biti plodonosno, ali to takođe može smanjiti amplitude unutar dnevnih oscilacija kortizola, i posledično smanjiti sposobnost pacijenta da se bori sa stresom.

Sada se može postaviti pitanje kako će holesterol unet putem hrane i etanol udruženo delovati na HPA osu. Da bismo to simulirali, modelu prikazanom u Tabeli 13 ćemo dodati reakcije (21) – (26) modela prikazanog u Tabeli 10. Sada zapravo imamo model koji u sebi objedinjuje oba ta modela (Tabela 15).

Vremenska evolucija koncentracije svih vrsta u modelu određena je sistemom diferencijalnih jednačina izvedenih iz reakcija (R1) – (R19) u Tabeli 15, uz poštovanje zakona o dejstvu masa:

$$\frac{d[\text{CHOL}]}{dt} = k_1 + k_{1a}[A] - k_{1b}[B][\text{CHOL}] - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_9[\text{CHOL}] - (k_{16} + k_{17})[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_2 - (k_4 + k_{10})[\text{CRH}] + k_{14}[\text{EtOH}] \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_4[\text{CRH}] - (k_5 + k_6)[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_{11}[\text{ACTH}] \quad (3)$$

$$\frac{d[\text{CORT}]}{dt} = k_5[\text{CHOL}][\text{ACTH}] + k_7[\text{ACTH}][\text{CORT}]^2 - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{12}[\text{CORT}] + k_{16}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (4)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_3 + k_6[\text{CHOL}][\text{ACTH}] - k_8[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{13}[\text{ALDO}] + k_{17}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (5)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{1a}[A] \quad (6)$$

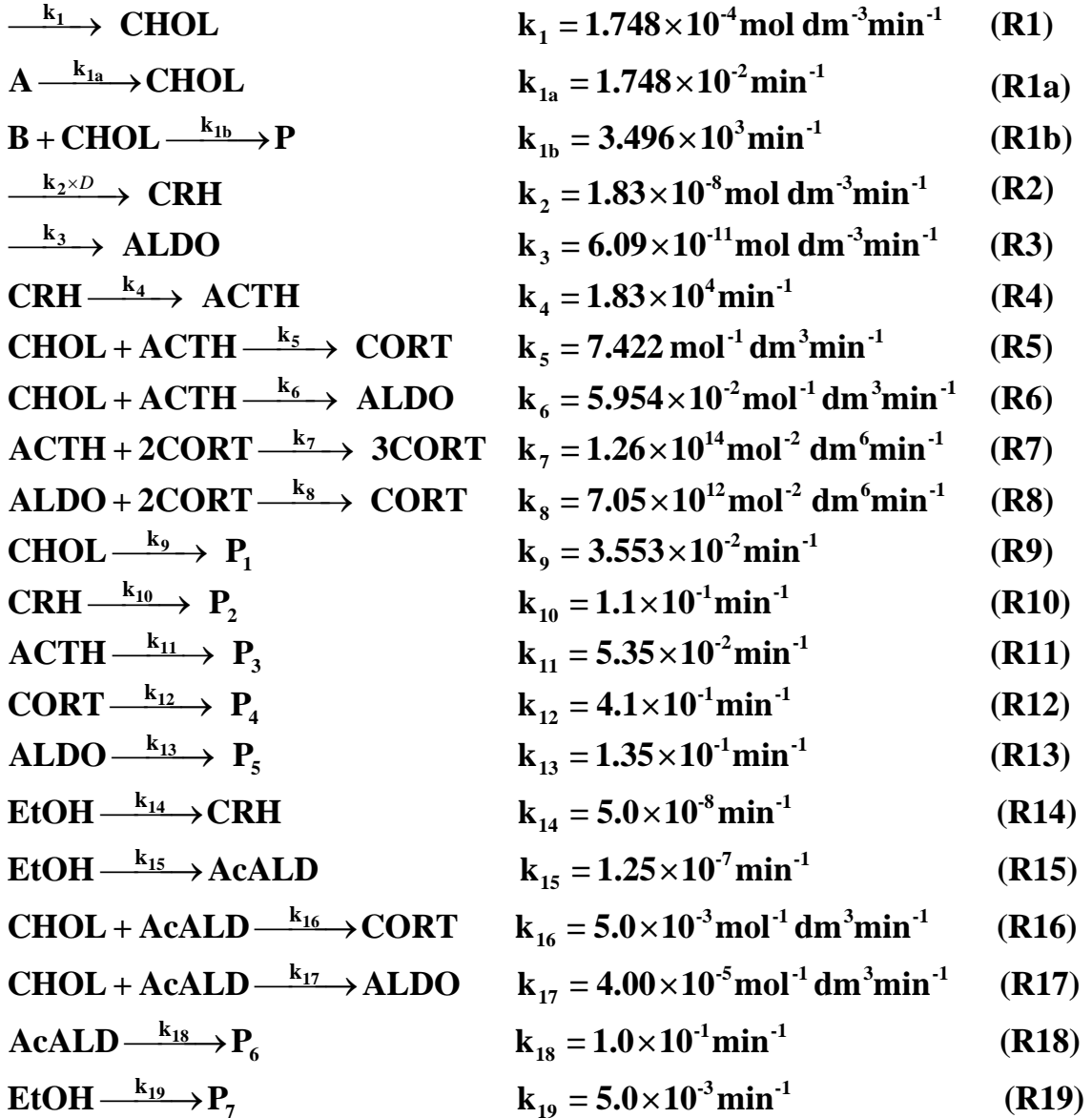
$$\frac{d[B]}{dt} = -k_{1b}[B][\text{CHOL}]$$

(7)

$$\frac{d[\text{EtOH}]}{dt} = -k_{14}[\text{EtOH}] - k_{15}[\text{EtOH}] - k_{19}[\text{EtOH}] \quad (8)$$

$$\frac{d[\text{AcALD}]}{dt} = k_{15}[\text{EtOH}] + (k_{16} + k_{17})[\text{CHOL}][\text{AcALD}] - k_{18}[\text{AcALD}] \quad (9)$$

Tabela 15. Devetodimenzioni model HPA ose koji omogućava i simulaciju spoljnih holesterolskih pulseva konačnog trajanja i asimetričnog koncentracionog profila, kao i simulaciju uticaja etanola na HPA osu

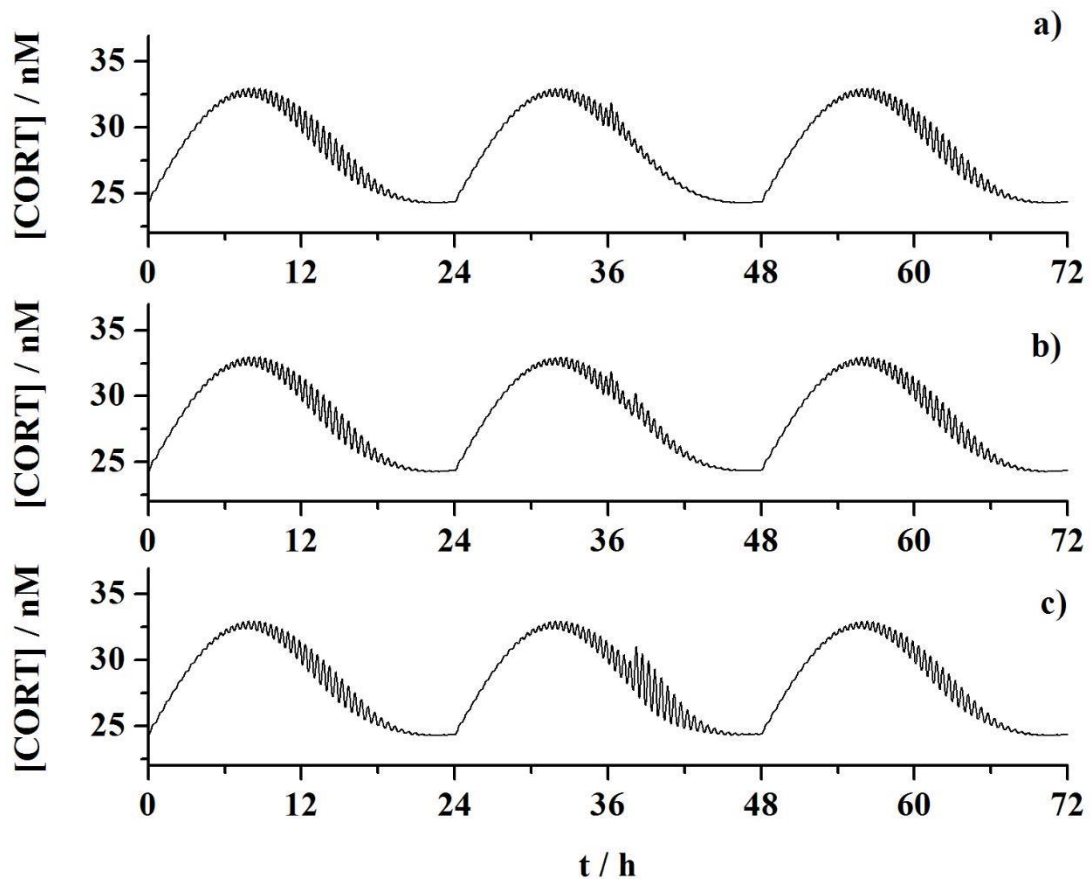


Rešavanjem ovog sistema diferencijalnih jednačina dobijamo unutarnevnu dinamiku HPA ose. Kako bi se uzela u obzir i cirkadijalna (dnevna) regulacija lučenja CRH, ponovo ćemo koristiti spoljnu periodičnu funkciju D koja je detaljno objašnjena u poglavlju 3.1:

$$D = d_1 - 0,079145093 \times d_2 + \{(0,064 \times \sin(2\pi t/1440) + 0,12 \times \text{abs}[\sin(\pi t/1440)]\} \times d_2$$

Koncentracije hormona HPA ose dobijene na bazi modela u Tabeli 15 su iste kao one dobijene na bazi modela u Tabeli 10 i prikazane su u Tabeli 12. Pošto srž modela nije pretrpela nikakve izmene, očekivano je da nema promene u dinamici i koncentracijima vrsta, što su numeričke simulacije i potvrdile.

Udruženo dejstvo holesterolskih pulseva i etanola je prikazano na Slici 17b. Kada je uporedimo sa Slikom 17a, evidentno je da etanol poništava smanjenje amplitude unutardnevnih oscilacija izazvano holesterolom, i vraća sistem bliže prvobitnoj dinamici koja je postojala pre perturbacija. Sa druge strane, unos holesterola pre perturbacije etanolom (Slika 17b) ima povoljniji efekat na HPA osu nego unos samo etanola (Slika 17c) jer dovodi do manjeg povećanja amplitude unutardnevne oscilacije etanola.



Slika 17. Vremenska evolucija koncentracije kortizola nakon perturbacija:

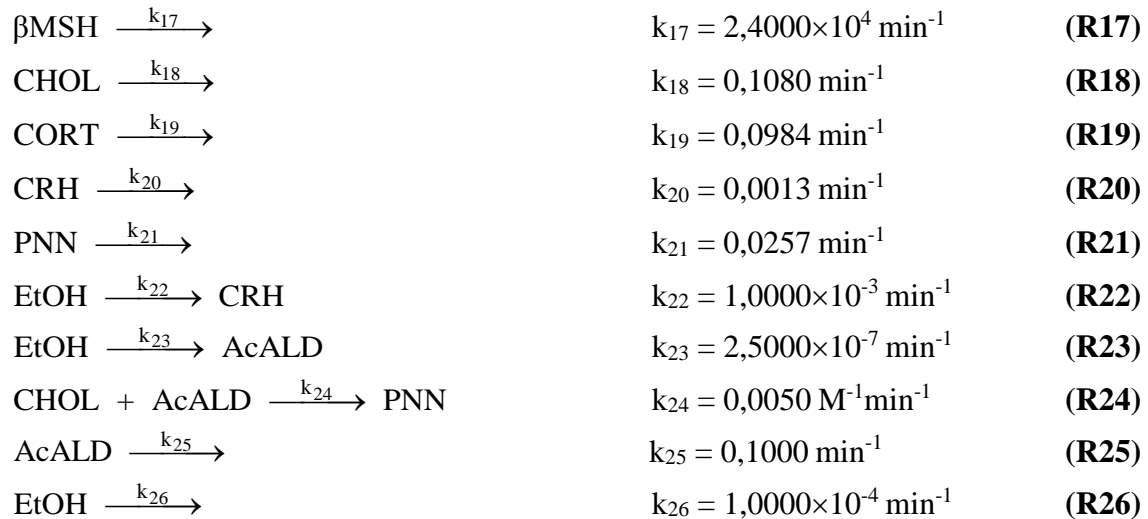
- a) holesterolskim pulsem koji počinju u 35 h. $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.
- b) prvo holesterolskim pulsem ($[A]_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[B]_0 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) koji počinje u 36 h, a zatim etanolom u 38 h. $[\text{EtOH}]_0 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.
- c) akutnom perturbacijom etanolom u 38 h. $[\text{EtOH}]_0 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

4.3 STEHIOMETRIJSKI MODEL MEHANIZMA UTICAJA ETANOLA NA NELINEARNA DINAMIČKA STANJA HPA SISTEMA KOJI SADRŽI 26 REAKCIJA I 13 DINAMIČKIH PROMENLJIVIH

Kao što je spomenuto, mana modela prikazanog u poglavljima 4.1 i 4.2 je to što je koncentracija ACTH tri reda veličine viša od referentnih vrednosti. U cilju prevazilaženja tog problema, proširili smo taj model tako da obuhvata i ključne derivate POMC, ali i detaljnije zalazi u mehanizam steroidogeneze, uvođenjem pregnenolona (PNN) i 17- α -hidroksiprogesterona (HPGS) u model. Kako bismo proširili stehiometrijski model, korišćeni su eksperimentalni rezultati dostupni u literaturi [91-96, 125, 126, 140, 136-163]. Ovako formiran model predstavljen je u Tabeli 16.

Tabela 16. Stehiometrijski model koji opisuje samoregulaciju hormona HPA ose kod ljudi i uticaj etanola na dinamiku HPA ose. Model sadrži 26 reakcija i 13 vrsta.

$\xrightarrow{k_1}$ CHOL	$k_1 = 3,3120 \times 10^{-4} \text{ Mmin}^{-1}$	(R1)
$\xrightarrow{k_2 \times D}$ CRH	$k_2 = 8,7840 \times 10^{-8} \text{ Mmin}^{-1}$	(R2)
$\xrightarrow{k_3}$ ALDO	$k_3 = 1,4616 \times 10^{-10} \text{ Mmin}^{-1}$	(R3)
CRH $\xrightarrow{k_4}$ POMC	$k_4 = 2,1960 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$	(R4)
POMC $\xrightarrow{k_5}$ ACTH + β LPH	$k_5 = 240,0000 \text{ min}^{-1}$	(R5)
β LPH $\xrightarrow{k_6}$ β MSH + β END	$k_6 = 240,0000 \text{ min}^{-1}$	(R6)
ACTH + CHOL $\xrightarrow{k_7}$ PNN	$k_7 = 1,9022 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$	(R7)
PNN $\xrightarrow{k_8}$ HPGS	$k_8 = 15,4742 \text{ min}^{-1}$	(R8)
HPGS $\xrightarrow{k_9}$ CORT	$k_9 = 0,0232 \text{ min}^{-1}$	(R9)
PNN $\xrightarrow{k_{10}}$ ALDO	$k_{10} = 2,5 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R10)
HPGS + 2 CORT $\xrightarrow{k_{11}}$ 3 CORT	$k_{11} = 3,0240 \times 10^{12} \text{ M}^{-2}\text{min}^{-1}$	(R11)
ALDO + 2 CORT $\xrightarrow{k_{12}}$ CORT	$k_{12} = 1,6920 \times 10^{13} \text{ M}^{-2}\text{min}^{-1}$	(R12)
CRH + CORT $\xrightarrow{k_{13}}$	$k_{13} = 7,2000 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$	(R13)
ACTH $\xrightarrow{k_{14}}$	$k_{14} = 1,2840 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$	(R14)
ALDO $\xrightarrow{k_{15}}$	$k_{15} = 0,8100 \text{ min}^{-1}$	(R15)
β END $\xrightarrow{k_{16}}$	$k_{16} = 2,4000 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$	(R16)



Kao i u prethodnim modelima (osnovnom modelu, i modelu predstavljenom u poglavljima 3.1 i 3.2) reakcije (R1), (R2) i (R3) (Tabela 19) opisuju biosintezu holesterola, CRH i aldosterona, redom.

Kako bi se uzela u obzir cirkadijalna (dnevna) regulacija lučenja CRH, koja je pod kontrolom centralnog cirkadijalnog sata u suprahijazmatičnom jedru hipotalamusa, ponovo koristimo spoljnu periodičnu funkciju D koja je predložena tako da prikladno opisuje asimetriju dvadesetčetvoročasovnog ritma kod ljudi, sa noćnom fazom koja traje 8 sati [125, 126, 140]:

$$D = d_1 - 0,079145093 \times d_2 + \{(0,064 \times \sin(2\pi t/1440) + 0,12 \times \text{abs}[\sin(\pi t/1440)]\} \times d_2.$$

Dnevna funkcija D, spregnuta sa modelom preko reakcije koja opisuje biosintezu CRH (R2), transformiše konstantu brzine k_2 u periodičnu funkciju $k_2 \cdot D$.

Reakcije (R4) - (R6) opisuju lučenje POMC-a u hipofizi pod dejstvom CRH (R4), kao i dalju sintezu peptida koji su derivati POMC-a, poput ACTH, beta-lipotropina, (β -LPH), melanocito stimulirajućeg hormona-beta (β -MSH) i beta-endorfina (β -END) u središnjem režnju hipofize ((R5) i (R6)) [139-141].

Reakcije (R7) - (R10) sažeto opisuju biosintezu steroidnih hormona u kori adrenalne žlezde i njihovu sekreciju u sistemsku cirkulaciju [142-144].

Relacije (R11) - (R13) opisuju složenu dinamičku regulaciju HPA ose kontrolisanu od strane glukokortikoida u različitim moždanim strukturama. Reakcija (R11) opisuje pozitivnu povratnu spregu kortizola, dok reakcija (R12) opisuje negativnu povratnu spregu kortizola kojom on samoreguliše sopstvenu sintezu i sekreciju [148-150]. Pozitivna (R11) i negativna (R12) povratna sprega kortizola koje se odvijaju preko GR-a i MR-a su opisane u obliku autokatalize (R11) i autoinhibicije (R12), i osnovni su deo minimalnog (poglavlje 1.5.2.1 i referenca [19]) i osnovnog modela (poglavlje 1.5.3.1 i referenca [123]) za opisivanje dinamike HPA ose. Koncentracije GR-a i MR-a su implicitno uključene u konstante brzina i ne pojavljuju se kao nezavisne reakcione vrste u modelu. Reakcija (R13) opisuje negativnu povratnu spregu kortizola na nekoliko moždanih regiona sa ciljem smanjenja daljeg lučenja CRH [149-152].

Reakcije (R14) - (R21) opisuju eliminaciju reakcionih vrsta brzinom koja je proporcionalna njihovim koncentracijama.

Isto kao i u modelu (poglavlje 3.1) gde se razmatra uticaj etanola na HPA osu, reakcija (R32) opisuje lučenje CRH izazvano dejstvom etanola [154-157], dok (R23) opisuje konverziju etanola do acetaldehida (AcALD) u jetri [158-160]. Reakcija (R24), koja predstavlja direktan uticaj acetaldehida na adrenalnu žlezdu dovodi do smanjenja sadržaja holesterola u adrenalnoj žlezdi i posledično do povećanja lučenja glukokortikoida [161], modelirana je kao ubrzanje prvog koraka steroidogeneze. Reakcija (R25) predstavlja eliminaciju AcALD iz organizma. Reakcija (R26) opisuje eliminaciju etanola iz organizma.

Kao i kod modela u poglavljima 3.1, 3.2, mora se naglasiti da reakcije (R1) - (R26) nisu elementarne reakcije, već sažeti ishodi složenih bioloških reakcionih puteva koji su koncizno zapisani u obliku stehiometrijskih relacija. Zahvaljujući tome možemo da kreiramo set diferencijalnih jednačina kako bismo opisali vremenske promene (evolucije) koncentracija svih reakcionih vrsta razmatranih u modelu (Tabela 17).

Tabela 17. Sistem diferencijalnih jednačina koji proističe iz modela u Tabeli 16.

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_5[\text{POMC}] - k_{14}[\text{ACTH}] \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_3 + k_{10}[\text{PNN}] - k_{12}[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{15}[\text{ALDO}] \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{CHOL}]}{dt} = k_1 - k_7[\text{ACTH}][\text{CHOL}] - k_{18}[\text{CHOL}] - k_{24}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{CORT}]}{dt} = & k_9[\text{HPGS}] + k_{11}[\text{HPGS}][\text{CORT}]^2 - k_{12}[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 \\ & - k_{13}[\text{CRH}][\text{CORT}] - k_{19}[\text{CORT}] \end{aligned} \quad (4)$$

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_2 \times D - (k_4 + k_{13}[\text{CORT}] + k_{20})[\text{CRH}] + k_{22}[\text{EtOH}] \quad (5)$$

$$\frac{d[\text{POMC}]}{dt} = k_4[\text{CRH}] - k_5[\text{POMC}] \quad (6)$$

$$\frac{d[\beta\text{END}]}{dt} = k_6[\beta\text{LPH}] - k_{16}[\beta\text{END}] \quad (7)$$

$$\frac{d[\beta\text{LPH}]}{dt} = k_5[\text{POMC}] - k_6[\beta\text{LPH}] \quad (8)$$

$$\frac{d[\beta\text{MSH}]}{dt} = k_6[\beta\text{LPH}] - k_{17}[\beta\text{MSH}] \quad (9)$$

$$\frac{d[\text{PNN}]}{dt} = k_7[\text{ACTH}][\text{CHOL}] - (k_8 + k_{10} + k_{21})[\text{PNN}] + k_{24}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (10)$$

$$\frac{d[\text{HPGS}]}{dt} = k_8[\text{PNN}] - (k_9 + k_{11}[\text{CORT}]^2)[\text{HPGS}] \quad (11)$$

$$\frac{d[\text{EtOH}]}{dt} = -k_{22}[\text{EtOH}] - k_{23}[\text{EtOH}] - k_{26}[\text{EtOH}] \quad (12)$$

$$\frac{d[\text{AcALD}]}{dt} = k_{23}[\text{EtOH}] - k_{24}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] - k_{25}[\text{AcALD}] \quad (13)$$

Sprezanje dnevne funkcije sa sistemom diferencijalnih jednačina omogućava uspešnu simulaciju i ultradijalnih (unutardnevnih) i cirkadijalnih (dnevnih) oscilacija, oponašajući na taj način dnevne varijacije u koncentraciji hormona HPA ose. Parametri su podešeni tako da period unutardevnih oscilacija iznosi oko 70 minuta, što je u skladu sa eksperimentalnim predviđanjima (od 20 do 120 minuta, [15, 35, 36]), dok je period cirkadijalnog ritma 24 h. Pored toga, koncentracije hormona dobijene u ovom modelu odgovaraju referentnim fiziološkim vrednostima (Tabela 18).

Tabela 18. Srednji dnevni nivoi hormona HPA ose predviđeni na osnovu modela prikazanog u Tabeli 16, u poređenju sa referentnim fiziološkim vrednostima ovih hormona u humanoj krvi merenih *in vivo*. M = mol dm⁻³. [165]

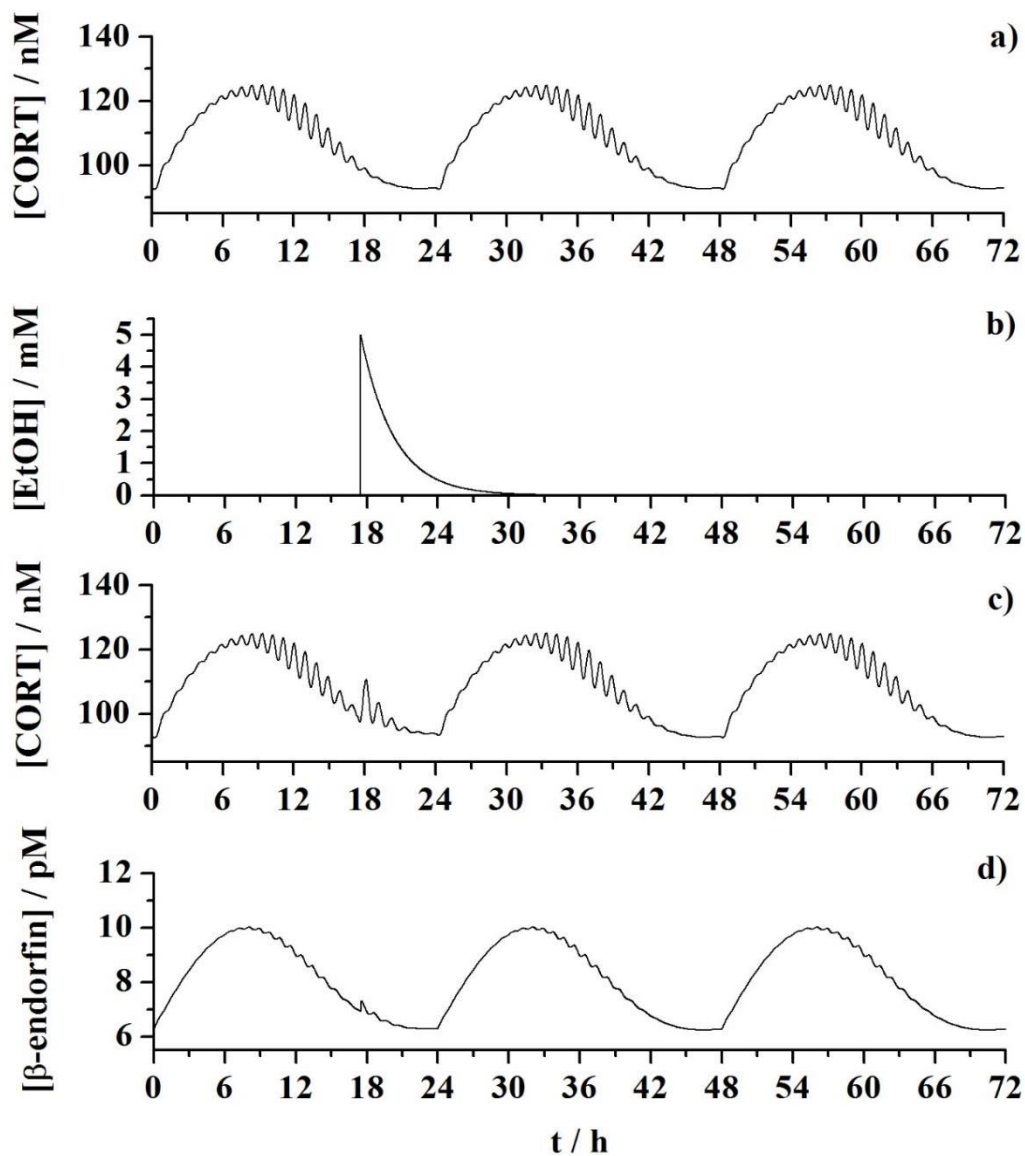
Hemijska vrsta	Referenta vrednost** / M	Model (Tabela 16) / M
Holesterol	$< 5 \times 10^{-3}$ (preporučena)	$3,07 \times 10^{-3}$
CRH	1×10^{-12}	$(0,7 - 1,1) \times 10^{-12}$
ACTH	$(4,5 - 20) \times 10^{-12}$	$(0,6 - 1,1) \times 10^{-12}$
Kortizol	$(0,8 - 7,0) \times 10^{-7}$	$(0,9 - 1,3) \times 10^{-7}$
Aldosteron	$(2 - 10) \times 10^{-10}$	$(3,7 - 4,5) \times 10^{-10}$
Pregnenolon	$1,5 \times 10^{-9}$	$(0,9 - 1,4) \times 10^{-9}$
17α-hidorksiprogesteron	$(1,8 - 90) \times 10^{-7}$	$(2,8 - 3,2) \times 10^{-7}$
β-endorfin	$1,4 \times 10^{-11}$	$(0,6 - 1) \times 10^{-11}$
POMC	2×10^{-10}	$(0,6 - 1) \times 10^{-10}$

** Mayo Medical Laboratories

Dinamika HPA ose pod normalnim fiziološkim uslovima, pri dejstvu akutnog unosa etanola, kao i pri dejstvu hroničnog unosa etanola modelovana je na isti način kao što je

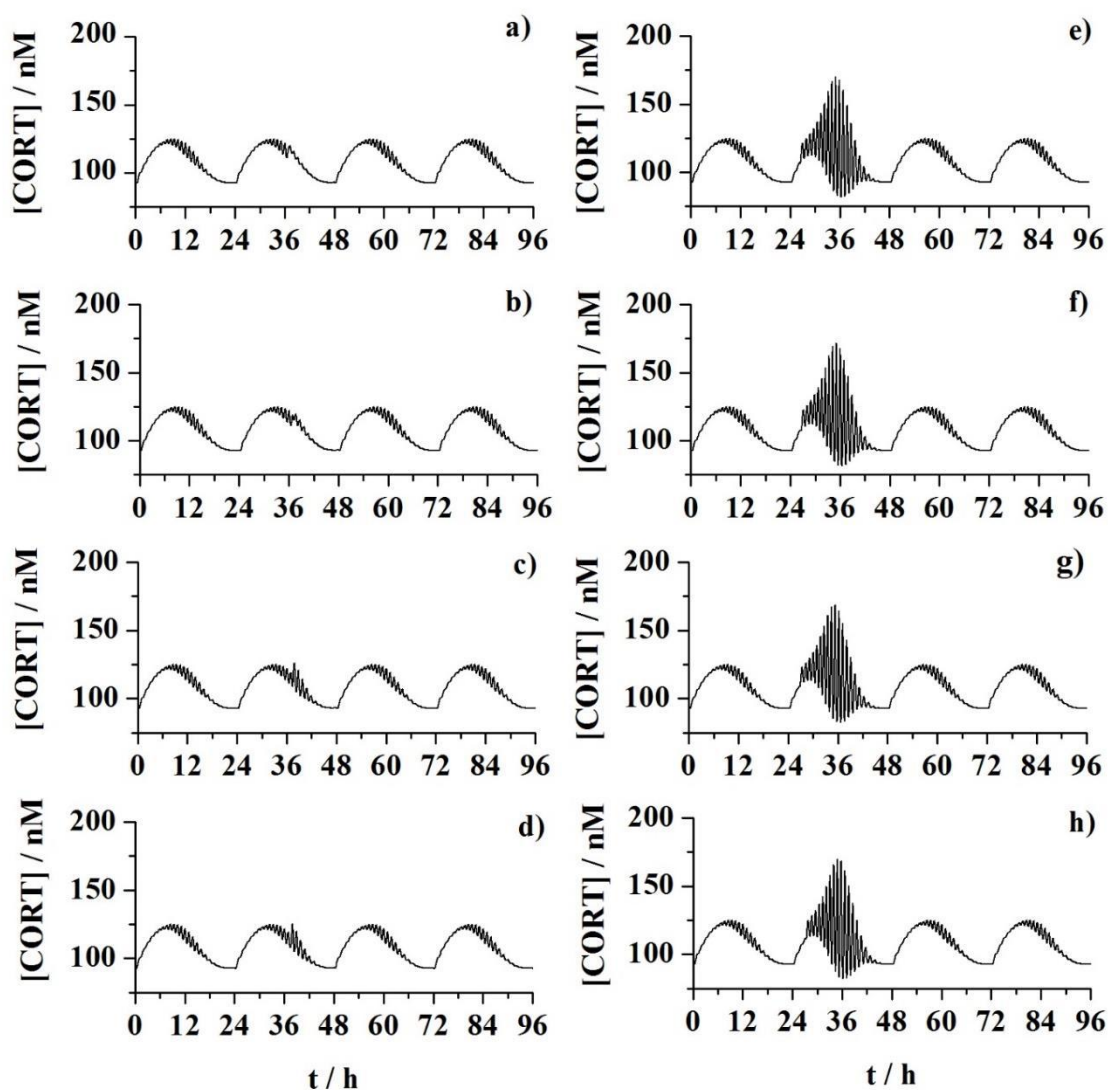
to opisano u poglavlju 3.1. Međutim, treba primetiti da je period unutar dnevnih oscilacija sada 70 minuta, dok je u slučaju modela sa 19 reakcija i 7 dinamičkih promenljivih period iznosio 30 minuta. Do ove promene je došlo kao posledica prilagođavanja vrednosti konstanti brzina nakon povećanja broja reakcija i hemijskih vrsta u modelu. Važno je naglasiti da se u oba slučaja periodi unutar dnevnih oscilacija nalaze u fiziološkom opsegu (od 20 do 120 minuta).

Dnevne varijacije nivoa kortizola u krvi dobijene numeričkim simulacijama za normalnu fiziologiju, tj. bez prisustva etanola, prikazane su na slici 18a. Akutna perturbacija etanolom (vertikalna linija na slici 18b) je praćena metaboličkom degradacijom tokom koje koncentracija etanola postepeno opada (Slika 18b). Prateći trenutnu promenu koncentracije etanola, nivoi svih hemijskih vrsta se prilagođavaju menjajući svoje nivoe, što je ilustrovano na primeru vremenske evolucije kortizola na Slici 18c, kao i na primeru vremenske evolucije β -endorfina na Slici 18d.



Slika 18. a) Numerička simulacija promene koncentracije kortizola tokom dana koja pokazuje složenu dinamiku sa unutardnevnim oscilacijama superponiranim na dnevne oscilacije. Period unutardnevnih oscilacija je oko 70 minuta, dok je period dnevnih oscilacija 24 h. b) Akutna perturbacija etanolom je simulirana u modelu kao jedan puls etanola (vertikalna linija); primenjena koncentracija iznosi 5 mM, a trenutak perturbacije je 17.30 h. Perturbacija etanolom je praćena monotonim opadanjem koncentracije etanola usled metaboličke degradacije. c) Uticaj akutne perturbacije intenziteta 5 mM etanola na dinamiku kortizola. Primenjena perturbacija etanolom zapravo odgovara onoj prikazanoj pod b). d) Uticaj akutne perturbacije intenziteta 5 mM etanola na dinamiku β -endorfina. I ovde primenjena perturbacija etanolom zapravo odgovara onoj prikazanoj pod b).

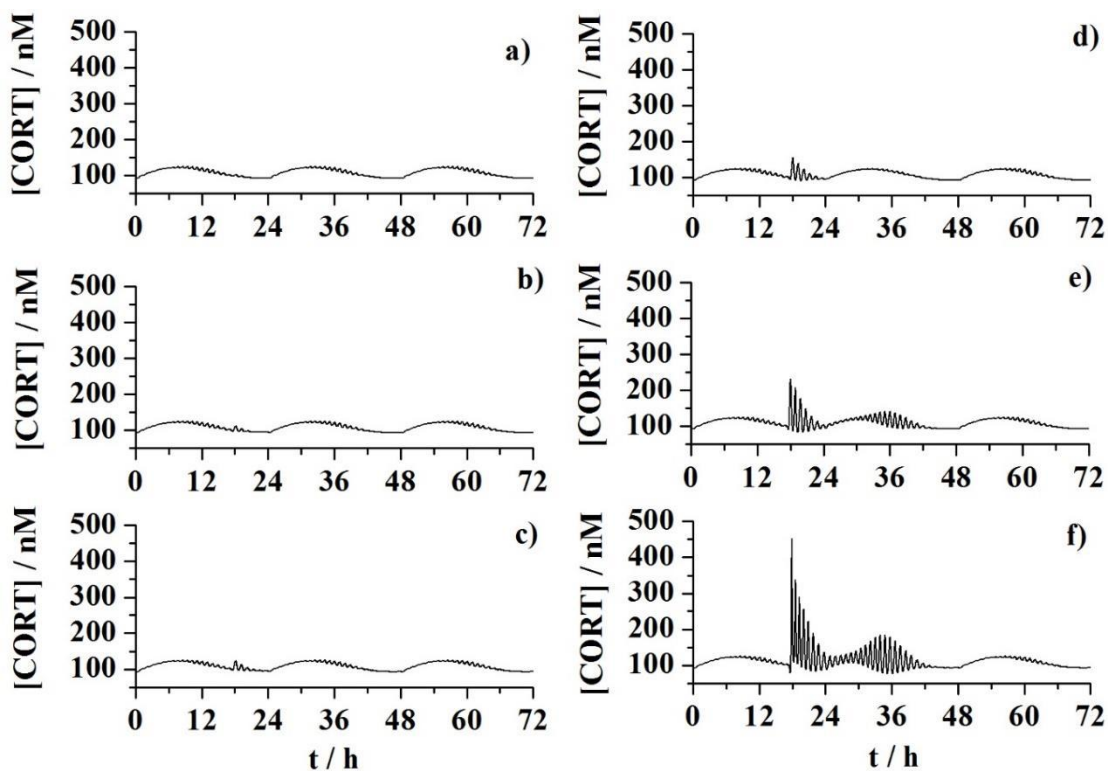
I ovde, kao i kod svih manjih modela, odgovor HPA ose na akutne perturbacije etanolom je složen i veoma zavisi od stanja u kome se HPA osa nalazi u trenutku perturbacije, tj. od faze unutardnevne i dnevne oscilacije, kao i od intenziteta perturbacije (Slika 19). Ukoliko je perturbacija primenjena tokom obdanice, odgovor sistema će zavisiti od faze unutardnevne oscilacije u kojoj se sistem nalazi u trenutku perturbacije (Slika 19a-e). Međutim, ukoliko se akutna perturbacija istog intenziteta primeni tokom noći, odgovor sistema neće zavisiti od faze unutardnevne oscilacije u kojoj se sistem nalazi u trenutku perturbacije (Slika 19f-i), za koncentraciju etanola i početne uslove koji su ovde korišćeni.



Slika 19. Složeni odgovor HPA ose na perturbaciju istog intenziteta, 4,25 mM etanola, primenjenu u različitim fazama unutardnevne oscilacije kortiziola. a) Smanjenje

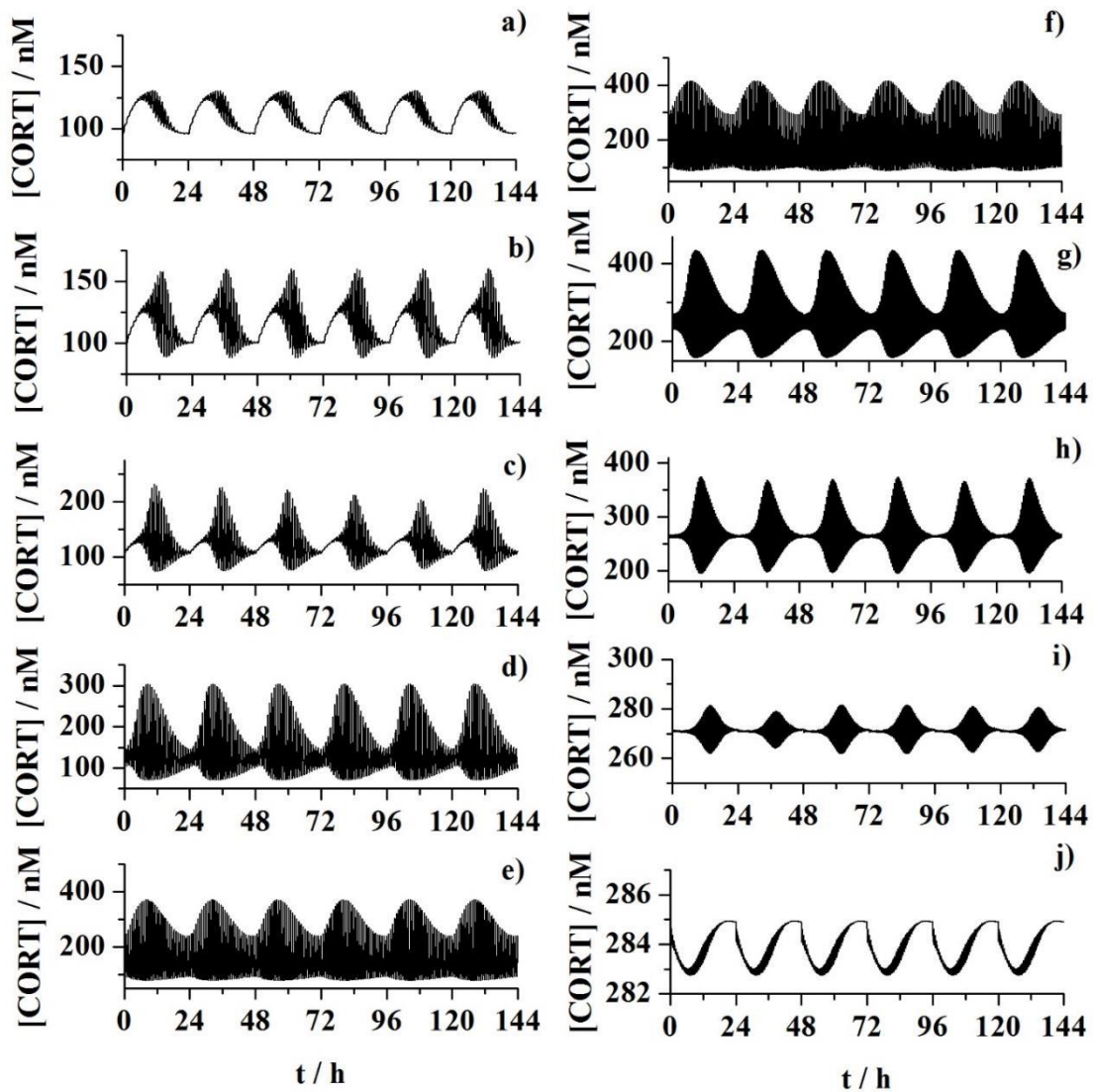
amplitude unutardnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u uzlaznoj prevojnoj tački unutardnevne oscilacije tokom obdanice. b) Smanjenje amplitude unutardnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u maksimumu unutardnevne oscilacije tokom obdanice. c) Povećanje unutardnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije u silaznoj prevojnoj tački unutardnevne oscilacije tokom obdanice. d) Povećanje unutardnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije u minimumu unutardnevne oscilacije tokom obdanice. Sada zapravo dolazi do promena smera odgovora kortizola na perturbacije etanolom, od smanjivanja unutardnevne amplitude, ka njenom ponovnom povećanju. e-h) Perturbacija istog intenziteta je primenjena u različitim fazama unutardnevne oscilacije tokom noći (uzlazna prevojna tačka, maksimum, silzana prevojna tačka i minimum, respektvno). Uočeno je da u sva četiri slučaja dolazi do povećanja amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola tokom naredne obdanice.

Akutne perturbacije etanolom različitog intenziteta (2-100 mM) primenjene uvek u isto vreme, 17.30 h, pokazuju da je odgovor HPA ose raste sa porastom primenjene doze etanola (Slika 20), što je u skladu sa rezultatima dobijenim primenom sedmodimenzionog stehiometrijskog modela (poglavlje 3.1). Nakon intenzivne perturbacije etanolom, sistemu je potrebno oko dva dana da se vrati u prvobitno stanje (Slika 20f).



Slika 20. Efekat akutnih perturbacija etanolom na dinamiku HPA ose. Perturbacije etanolom su uvek primenjene u isto vreme, u 17.30 h (17 h i 30 min). Koncentracija etanola je iznosila: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, i f) 100 mM.

Hronična izloženost etanolu i u slučaju ovog modela dovodi do složenih transformacija dinamike HPA ose (Slika 21). Kako raste hronična koncentracija etanola u krvi, tako se menja i odgovor sistema: od neznatnog uvećanja amplituda unutardnevnih oscilacija (Slika 21a), preko daljeg rasta amplituda unutardnevnih oscilacija (Slika 21b), pojave neperiodičnih oscilacija velikih amplituda (Slika 21c), zatim javljanja oscilacija velikih amplituda i tokom noći (Slike 21d i e), do smanjenja amplitude unutardnevnih oscilacija, ali uz istovremeno povećavanje srednjeg dnevnog nivoa koncentracije kortizola i frekvencije unutardnevnih oscilacija kortizola (Slika 21f-i), pa sve do situacije u kojoj je unutardnevna regulacija potpuno narušena i cirkadijalna regulacija je izvrnuta (Slika 21j).



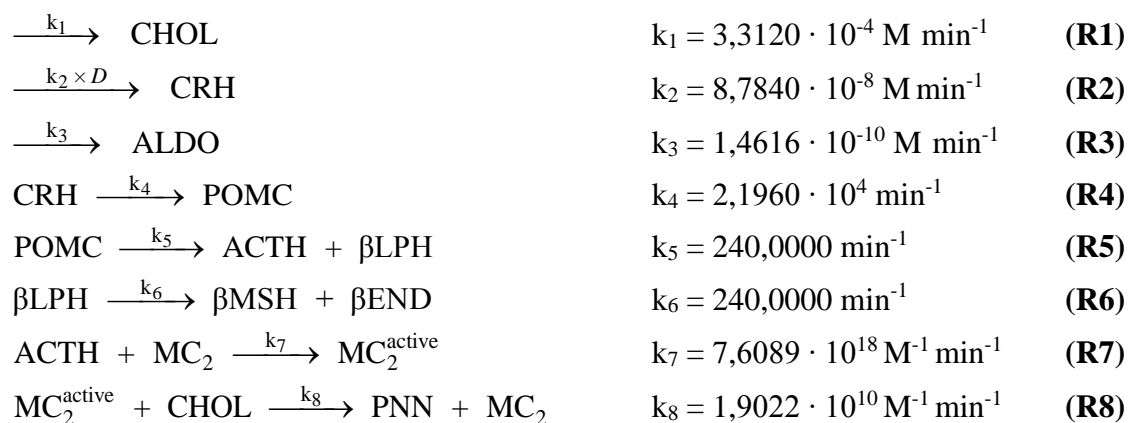
Slika 21. Hronična izloženost etanolu menja dinamiku HPA ose. U numeričkim simulacijama koncentracija etanola je držana konstantnom na sledećim vrednostima: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, f) 60 mM, g) 150 mM, h) 170 mM, i) 180 mM, j) 200 mM.

4.4 STEHIOMETRIJSKI MODEL MEHANIZMA UTICAJA ETANOLA NA NELINEARNA DINAMIČKA STANJA HPA SISTEMA KOJI SADRŽI 34 REAKCIJE I 19 DINAMIČKIH PROMENLJIVIH

Modeli prikazani u poglavljima 4.1, 4.2 i 4.3 predstavljaju odličnu polaznu osnovu za dalje razvijanje, proširivanje i prilagođavanje različitim upotrebama u cilju ispitivanja delovanja spoljnih i unutrašnjih stimulansa na HPA osu.

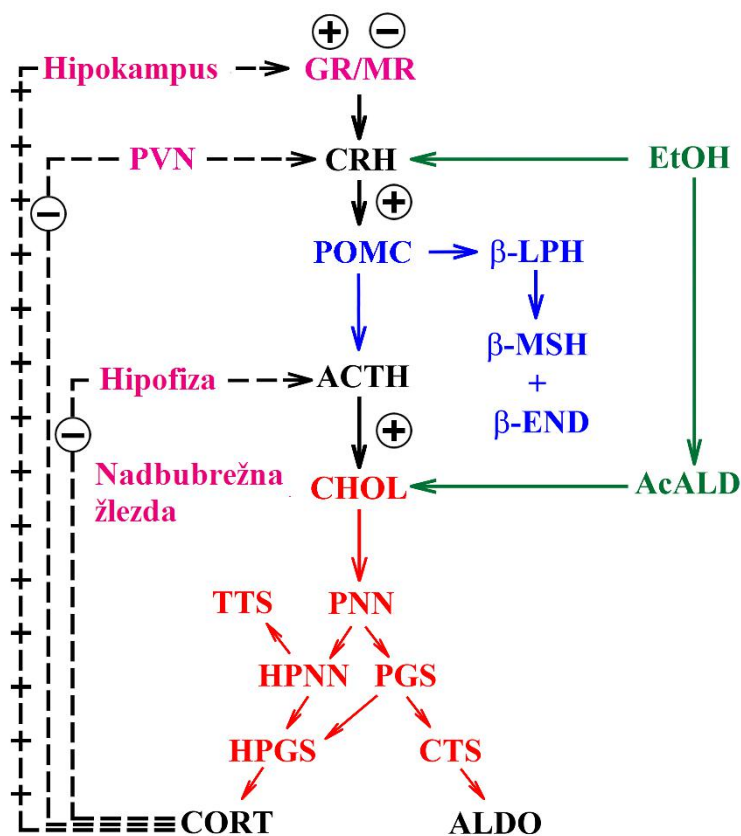
Da bismo proširili model, korišćeni su eksperimentalni rezultati dostupni u literaturi [91-96, 125, 126, 140, 136-163] kako bi se izgradila stehiometrijska mreža. Polazni model je proširen tako da obuhvati i ključne derivate proopiomelanokortina, detaljnu adrenalnu steroidogenezu, i naravno, uticaj etanola na HPA osu. U modelu (Tabela 19) su složeni biohemijski reakcioni putevi sažeto predstavljeni stehiometrijskim relacijama (R1) – (R34). U ovom načinu predstavljanja sumarnih reakcije, supstance koje iniciraju sumarnu reakciju se ponašaju poput reaktanata, a supstance koje nastaju u toj sumarnoj reakciji se ponašaju poput produkata reakcije. Brzine nastajanja produkata su proporcionalne koncentraciji reaktanata. Na taj način, razvijen je matematički okvir za opisivanje hemijske i kinetičke osnove biohemijskih puteva koji ulaze u sastav HPA ose. Sažeti grafički prikaz reakcija u modelu je prikazan na Slici 22.

Tabela 19. Stehiometrijski model koji opisuje samoregulaciju hormona HPA ose kod ljudi i uticaj etanola na dinamiku HPA ose. Model sadrži 34 reakcije i 19 vrsta. [165]



$\text{PNN} \xrightarrow{k_9} \text{HPNN}$	$k_9 = 15,4742 \text{ min}^{-1}$	(R9)
$\text{HPNN} \xrightarrow{k_{10}} \text{HPGS}$	$k_{10} = 7,7000 \text{ min}^{-1}$	(R10)
$\text{HPNN} \xrightarrow{k_{11}} \text{TTS}$	$k_{11} = 0,0371 \text{ min}^{-1}$	(R11)
$\text{HPGS} \xrightarrow{k_{12}} \text{CORT}$	$k_{12} = 0,0232 \text{ min}^{-1}$	(R12)
$\text{PNN} \xrightarrow{k_{13}} \text{PGS}$	$k_{13} = 0,2476 \text{ min}^{-1}$	(R13)
$\text{PGS} \xrightarrow{k_{14}} \text{CTS}$	$k_{14} = 0,2476 \text{ min}^{-1}$	(R14)
$\text{CTS} \xrightarrow{k_{15}} \text{ALDO}$	$k_{15} = 0,2352 \text{ min}^{-1}$	(R15)
$\text{PGS} \xrightarrow{k_{16}} \text{HPGS}$	$k_{16} = 1,0000 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	(R16)
$\text{HPGS} + 2 \text{ CORT} \xrightarrow{k_{17}} 3 \text{ CORT}$	$k_{17} = 3,0240 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R17)
$\text{ALDO} + 2 \text{ CORT} \xrightarrow{k_{18}} \text{CORT}$	$k_{18} = 1,6920 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-2} \text{ min}^{-1}$	(R18)
$\text{CRH} + \text{CORT} \xrightarrow{k_{19}}$	$k_{19} = 7,2000 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R19)
$\text{ACTH} + \text{CORT} \xrightarrow{k_{20}}$	$k_{20} = 6,0000 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R20)
$\text{ACTH} \xrightarrow{k_{21}}$	$k_{21} = 1,2840 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$	(R21)
$\text{ALDO} \xrightarrow{k_{22}}$	$k_{22} = 0,8100 \text{ min}^{-1}$	(R22)
$\beta\text{END} \xrightarrow{k_{23}}$	$k_{23} = 2,4000 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$	(R23)
$\beta\text{MSH} \xrightarrow{k_{24}}$	$k_{24} = 2,4000 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1}$	(R24)
$\text{CHOL} \xrightarrow{k_{25}}$	$k_{25} = 0,1080 \text{ min}^{-1}$	(R25)
$\text{CORT} \xrightarrow{k_{26}}$	$k_{26} = 0,0984 \text{ min}^{-1}$	(R26)
$\text{CRH} \xrightarrow{k_{27}}$	$k_{27} = 0,0013 \text{ min}^{-1}$	(R27)
$\text{PNN} \xrightarrow{k_{28}}$	$k_{28} = 0,0257 \text{ min}^{-1}$	(R28)
$\text{TTS} \xrightarrow{k_{29}}$	$k_{29} = 12,0000 \text{ min}^{-1}$	(R29)
$\text{EtOH} \xrightarrow{k_{30}} \text{CRH}$	$k_{30} = 1,0000 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R30)
$\text{EtOH} \xrightarrow{k_{31}} \text{AcALD}$	$k_{31} = 2,5000 \cdot 10^{-7} \text{ min}^{-1}$	(R31)
$\text{CHOL} + \text{AcALD} \xrightarrow{k_{32}} \text{PNN}$	$k_{32} = 0,0050 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	(R32)
$\text{AcALD} \xrightarrow{k_{33}}$	$k_{33} = 0,1000 \text{ min}^{-1}$	(R33)
$\text{EtOH} \xrightarrow{k_{34}}$	$k_{34} = 5,0000 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	(R34)

Isto kao i u prethodnim modelima (osnovnom modelu, i modelima predstavljanim u poglavljima 3.1 i 3.2) reakcije (R1), (R2) i (R3) (Tabela 19) opisuju biosintezu holesterola, CRH i aldosterona, redom. Reakcija (R1) predstavlja biosintezu holesterola u jetri i gastrointestinalnom traktu [136-138]. Lučenje CRH iz PVN hipotalamusa je prikazano reakcijom (R2), dok je proizvodnja aldosterona pod kontrolom renin-angiotenzin sistema opisana reakcijom (R3).



Slika 22. Sažeti šematski prikaz biokemijskih interakcija razmatranih u modelu uticaja etanola na HPA osu prikazanom u Tabeli 16. Interakcije između PVN hipotalamusa, prednjeg režnja hipofize i kore adrenalne žlezde opisane preko delovanja CRH, ACTH, kortizola i aldosterona na odgovarajuće receptore, čini osnovu modela HPA ose (ružičasto i crno na slici). U cilju modelovanja uticaja etanola na fundamentalne biokemijske transformacije, osnovni model je proširen tako da uključi neuropeptide izvedene iz POMC (plavo), holesterol i produkte adrenalne steroidogeneze (crvene), kao i etanol i njegov metabolit acetaldehid (zeleno). Pozitivni (+) i negativni (-) povratni uticaj kortizola su predstavljeni punim i isprekidanim linijama, redom. Dvostruki, pozitivni i negativni povratni uticaj kortizola na hipokampus, putem dejstva kortizola na MR i GR, prikazan je +/- crnom linijom. [188]

Isto kao i u prethodnim modelima, kako bi se uzela u obzir cirkadijalna (dnevna) regulacija lučenja CRH, koja je pod kontrolom centralnog cirkadijalnog sata u

suprahijzmatičnom jedru hipotalamusa, uvedena je spoljna periodična funkcija D koja je predložena tako da prikladno opisuje asimetriju dvadesetčetvoročasovnog ritma kod ljudi, sa noćnom fazom koja traje 8 sati [125, 126, 140]:

$$D = d_1 - 0,079145093 \times d_2 + \{(0,064 \times \sin(2\pi t/1440) + 0,12 \times \text{abs}[\sin(\pi t/1440)]\} \times d_2.$$

U dnevnoj funkciji, t predstavlja vreme u minutima, a 1440 u brojiocu argumenta trigonometrijske funkcije predstavlja broj minuta u jednom danu, odnosno period cirkadijalnih oscilacija.

Dnevna funkcija D, spregnuta sa modelom preko reakcije koja opisuje biosintezu CRH (R2), transformiše konstantu brzine k_2 u periodičnu funkciju $k_2 \cdot D$, menjajući vrednost k_2 na takav način da joj se pripisuju različite vrednosti u različitim delovima dana.

Reakcije (R4) - (R6) opisuju lučenje POMC-a u hipofizi pod dejstvom CRH (R4), kao i dalju sintezu peptida koji su derivati POMC-a, poput ACTH, beta-lipotropina, (β -LPH), melanocito stimulirajućeg hormona-beta (β -MSH) i beta-endorfina (β -END) u središnjem režnju hipofize ((R5) i (R6)) [139-141].

Reakcije (R7) - (R16) koncizno opisuju biosintezu steroidnih hormona u kori adrenalne žlezde i njihovu sekreciju u sistemsku cirkulaciju [142-144]. Ovaj proces započinje vezivanjem ACTH za melanokortin receptor tipa 2 (MC2) u srednjem sloju kore adrenalne žlezde ((*zona fasciculata*; (R7)) [114]. Aktivacija MC2 receptora (MC2active) je prvi korak u složenoj kaskadi reakcija koje sačinjavaju steroidogenezu [146]. Neposredni odgovor na aktivaciju MC2 je mobilizacija holesterola iz ćelijskih rezervi do unutrašnjosti mitohondrijalne membrane gde holesterolov citohrom P450 (P45011A1) vrši konverziju holesterola, prekursora svih steroidnih hormona, do pregnenolona (PNN; (R8)). Ovaj neposredni odgovor je praćen regulacijom transkripcije gena koji kodiraju enzime koji učestvuju u steroidogenezi. Ova regulacija je omogućena posredstvom ACTH. Dakle, enzimska aktivnost 17- α -hidroksilaze (CYP17A1) se povećava u ćelijama koje obuhvataju najdublji sloj kore adrenalne žlezde (*zona reticularis*) i srednji sloj adrenalne žlezde (*zona fasciculata*) dovodeći do proizvodnje steroida 17- α -hidroksipregnenolona ((HPNN; (R9)), od kojeg kasnije nastaju 17- α -hidroksiprogesteron

(HPGS; (R10)) i testosteron ((TTS; (R11)), i konačno kortizol (R12). U ćelijama koje obuhvataju krajnji spoljni sloj kore adrenalne žlezde (*zona glomerulosa*), enzim aldosteron sintetaza (CYP11B2) katalizuje nastajanje progesterona (PGS), kortikosterona (CTS) i mineralokortikoida aldosterona ((R13)-(R15)). Ovaj proces se odigrava pod kontrolom renin-angiotenzin sistema, ali njegova uloga nije eksplicitno razmatrana u modelu. Relacija (R16) opisuje konverziju PGS do HPGS u kori nadbubrežne žlezde, a pod kontrolom 17- α -hidrolaze.

Relacije (R17) - (R20) opisuju složenu dinamičku regulaciju HPA ose kontrolisanu od strane glukokortikoida u različitim moždanim strukturama. Reakcija (R17) opisuje pozitivnu povratnu spregu kortizola, odnosno njegov uticaj na povećanu ekspresiju gena koji regulišu lučenje CRH, koja se ostvaruje preko GR-a u hipokampusu. Kao posledica, dolazi do povećanja lučenja ACTH i samog kortizola putem steroidogeneze. Reakcija (R18) opisuje negativnu povratnu spregu kortizola koju on vrši na MR-u u hipokampusu gde se takmiči sa aldosteronom za iste receptore, kao i negativnu povratnu spregu kortizola koju on vrši na GR-u u hipotalamusu i hipofizi [148-150]. Pozitivna (R17) i negativna (R18) povratna sprega kortizola koje se odvijaju preko GR-a i MR-a su opisane u obliku autokatalize (R17) i autoinhibicije (R18), i osnovni su deo svih prethodnih modela od minimalnog (poglavlje 1.5.2.1 i referenca [19]) i osnovnog modela (poglavlje 1.5.3.1 i referenca [123]), za opisivanje dinamike HPA ose, pa do ovog koji se razmatra ovde. Koncentracije GR-a i MR-a su implicitno uključene u konstante brzina i ne pojavljuju se kao nezavisne reakcione vrste u modelu. Reakcije (R19) i (R20) opisuju inhibicioni uticaj kortizola na lučenje CRH i ACTH, redom. Reakcija (R19) opisuje negativnu povratnu spregu kortizola na nekoliko moždanih regiona sa ciljem smanjenja daljeg lučenja CRH [149-152], dok (R20) predstavlja mehanizam kojim kortizol ispoljava inhibicioni efekat na lučenje ACTH [153].

Reakcije (R21) - (R29) opisuju eliminaciju reakcionih vrsta brzinom koja je proporcionalna njihovim koncentracijama. Eliminacija je eksplicitno razmatrana samo za one vrste za koje koncentracija u modelu na drugi način nije mogla biti u fiziološkom opsegu. Produkti biokonverzije i/ili eliminacije ne učestvuju kao reaktanti ni u jednoj od reakcija u modelu i stoga nisu naznačeni u modelu.

Isto kao i u modelu (poglavlje 3.1) gde se razmatra uticaj alkohola na HPA osu, reakcija (R30) opisuje lučenje CRH izazvano dejstvom etanola [154-157], dok (R31) opisuje konverziju etanola do acetlaldehida (AcALD) u jetri [158-160]. Reakcija (R32), koja predstavlja direktan uticaj acetlaldehida na adrenalnu žlezdu dovodi do smanjenja sadržaja holesterola u adrenalnoj žlezdi i posledično do povećanja lučenja kortizola [161], modelirana je kao ubrzanje prvog koraka steroidogeneze. Reakcija (R33) predstavlja eliminaciju AcALD iz organizma. Reakcija (R34) opisuje eliminaciju etanola iz organizma.

Kao i kod modela u poglavljima 3.1, 3.2 i 3.3, važno je naglasiti da reakcije (R1) - (R34) nisu elementarne reakcije, već sažeti ishodi složenih bioloških reakcionih puteva koji su koncizno zapisani u obliku stehiometrijskih relacija. To nam omogućava da kreiramo set diferencijalnih jednačina kako bismo opisali vremenske promene (evolucije) koncentracija svih reakcionih vrsta razmatranih u modelu (Tabela 20).

Tabela 20. Sistem diferencijalnih jednačina koji proističe iz modela u Tabeli 19.

$$\frac{d[\text{ACTH}]}{dt} = k_5[\text{POMC}] - (k_7[\text{MC}_2] + k_{20}[\text{CORT}] + k_{21})[\text{ACTH}] \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{ALDO}]}{dt} = k_3 + k_{15}[\text{CTS}] - k_{18}[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 - k_{22}[\text{ALDO}] \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{CHOL}]}{dt} = k_1 - k_8[\text{MC}_2^{\text{active}}][\text{CHOL}] - k_{25}[\text{CHOL}] - k_{32}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{CORT}]}{dt} = & k_{12}[\text{HPGS}] + k_{17}[\text{HPGS}][\text{CORT}]^2 - k_{18}[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 \\ & - k_{19}[\text{CRH}][\text{CORT}] - k_{20}[\text{ACTH}][\text{CORT}] - k_{26}[\text{CORT}] \end{aligned} \quad (4)$$

$$\frac{d[\text{CRH}]}{dt} = k_2 \times D - (k_4 + k_{19}[\text{CORT}] + k_{27})[\text{CRH}] + k_{30}[\text{EtOH}] \quad (5)$$

$$\frac{d[\text{POMC}]}{dt} = k_4[\text{CRH}] - k_5[\text{POMC}] \quad (6)$$

$$\frac{d[\beta\text{END}]}{dt} = k_6[\beta\text{LPH}] - k_{23}[\beta\text{END}] \quad (7)$$

$$\frac{d[\beta\text{LPH}]}{dt} = k_5[\text{POMC}] - k_6[\beta\text{LPH}] \quad (8)$$

$$\frac{d[\beta\text{MSH}]}{dt} = k_6[\beta\text{LPH}] - k_{24}[\beta\text{MSH}] \quad (9)$$

$$\frac{d[\text{PNN}]}{dt} = k_8[\text{MC}_2^{\text{active}}][\text{CHOL}] - (k_9 + k_{13} + k_{28})[\text{PNN}] + k_{32}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] \quad (10)$$

$$\frac{d[\text{MC}_2]}{dt} = k_8[\text{CHOL}][\text{MC}_2^{\text{active}}] - k_7[\text{ACTH}][\text{MC}_2] \quad (11)$$

$$\frac{d[\text{MC}_2^{\text{active}}]}{dt} = k_7[\text{ACTH}][\text{MC}_2] - k_8[\text{CHOL}][\text{MC}_2^{\text{active}}] \quad (12)$$

$$\frac{d[\text{PGS}]}{dt} = k_{13}[\text{PNN}] - (k_{14} + k_{16})[\text{PGS}] \quad (13)$$

$$\frac{d[\text{TTS}]}{dt} = k_{11}[\text{HPNN}] - k_{29}[\text{TTS}] \quad (14)$$

$$\frac{d[\text{HPGS}]}{dt} = k_{10}[\text{HPNN}] - (k_{12} + k_{17}[\text{CORT}]^2)[\text{HPGS}] + k_{16}[\text{PGS}] \quad (15)$$

$$\frac{d[\text{CTS}]}{dt} = k_{14}[\text{PGS}] - k_{15}[\text{CTS}] \quad (16)$$

$$\frac{d[\text{EtOH}]}{dt} = -k_{30}[\text{EtOH}] - k_{31}[\text{EtOH}] - k_{34}[\text{EtOH}] \quad (17)$$

$$\frac{d[\text{AcALD}]}{dt} = k_{31}[\text{EtOH}] - k_{32}[\text{CHOL}][\text{AcALD}] - k_{33}[\text{AcALD}] \quad (18)$$

Sprezanje dnevne funkcije sa sistemom diferencijalnih jednačina omogućava uspešnu simulaciju i ultradijalnih (unutardnevnih) i cirkadijalnih (dnevnih) oscilacija, oponašajući na taj način dnevne varijacije u koncentraciji hormona HPA ose. Parametri su podešeni tako da period unutardevnih oscilacija iznosi oko 70 minuta, što je u skladu sa eksperimentalnim predviđanjima (od 20 do 120 minuta, [15, 35, 36]), dok je period cirkadijalnog ritma 24 h. Pored toga, koncentracije hormona dobijene u ovom modelu odgovaraju referentnim fizioloških vrednostima (Tabela 21). Takođe, model uspešno

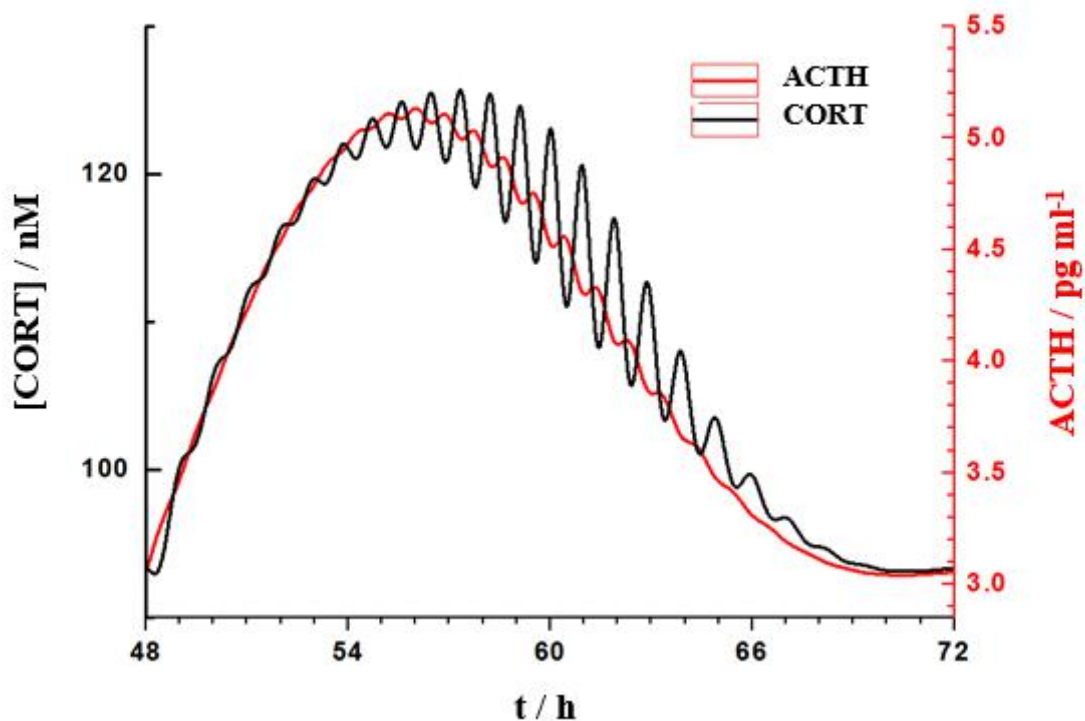
simulira fazni pomak između ACTH i kortizola (Slika 23), kao i „obrnut U odgovor“ HPA ose na glukokortikoide, pokazujući da visoke i niske koncentracije glukokortikoida imaju suprotne fiziološke efekte u odnosu na srednje koncentracije (Slika 24). Odnosno, kada je koncentracija kortizola iznad ili ispod fiziološki referentnog opsega, unutarodnevnoscilacije kortizola iščezavaju.

Tabela 21. Srednji dnevni nivoi hormona HPA ose predviđeni na osnovu modela prikazanog u Tabeli 19, u poređenju sa referentnim fiziološkim vrednostima ovih hormona u humanoj krvi merenih *in vivo*. M = mol dm⁻³. [165]

Hemijska vrsta	Referenta vrednost** / M	Model (Tabela 16) / M
Holesterol	$< 5 \times 10^{-3}$ (preporučena)	$3,07 \times 10^{-3}$
CRH	1×10^{-12}	$(0,7 - 1,1) \times 10^{-12}$
ACTH	$(4,5 - 20) \times 10^{-12}$	$(0,6 - 1,1) \times 10^{-12}$
Kortizol	$(0,8 - 7,0) \times 10^{-7}$	$(0,9 - 1,3) \times 10^{-7}$
Aldosteron	$(2 - 10) \times 10^{-10}$	$(3,7 - 4,5) \times 10^{-10}$
Pregnenolon	$1,5 \times 10^{-9}$	$(0,9 - 1,4) \times 10^{-9}$
Progesteron	$3,2 \times 10^{-10} - 5,6 \times 10^{-8}$	$(0,9 - 1,4) \times 10^{-9}$
Testosteron***	$(0,7 - 3) \times 10^{-9}$ (Žene) $(6 - 45) \times 10^{-9}$ (Muškarci)	$(5,5 - 9,0) \times 10^{-12}$
17α-hidroksipregnenolon	$(1 - 90) \times 10^{-9}$	$(1,8 - 2,8) \times 10^{-9}$
17α-hidorksiprogesteron	$(1,8 - 90) \times 10^{-7}$	$(2,8 - 3,2) \times 10^{-7}$
β-endorfin	$1,4 \times 10^{-11}$	$(0,6 - 1) \times 10^{-11}$
POMC	2×10^{-10}	$(0,6 - 1) \times 10^{-10}$
Kortikosteron	$(0,14 - 20) \times 10^{-9}$	$(0,8 - 1,4) \times 10^{-9}$

** Mayo Medical Laboratories

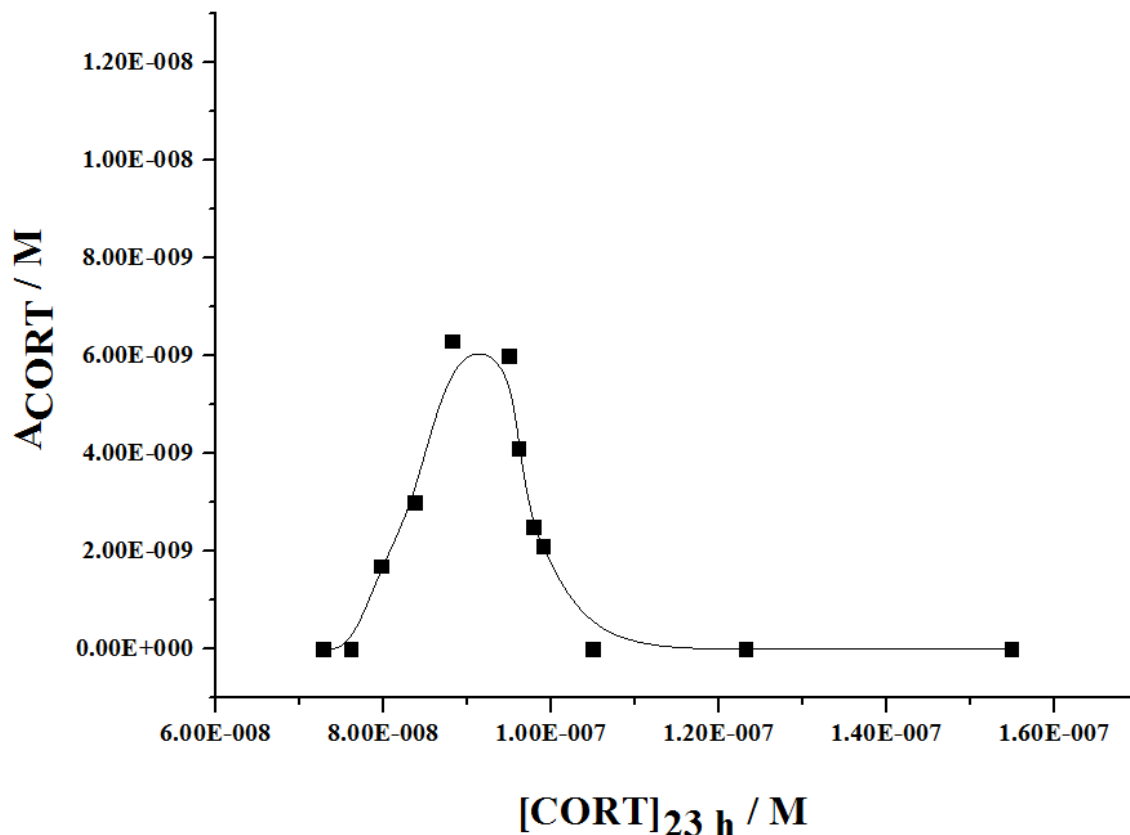
*** Testosteron luče Lajdigove ćelije, koje proizvode više od 95% hormona koji cirkuliše u organizmu, dok kora adrenalne žlezde doprinosi ovoj proizvodnji samo u određenoj meri (<5%). Nivo testosterona u krvi pacijenata nakon hirurške kastracije opada do nivoa nižih od 7×10^{-10} M, što predstavlja limit detekcije trenutno dostupnih eksperimentalnih metoda [162].



Slika 23. Kašnjenje kortizola u odnosu na ACTH. Fazni pomak oscilacija ACTH (crveno) i kortizola (crno) predviđen na osnovu stehiometrijskog modela prikazanog u Tabeli 19.

Kada je dinamika HPA ose modelovana pod normalnim fiziološkim uslovima, koncentracije etanola i acetaldehida su postavljene na nulu, i na taj način je naznačeno da etanol i njegov metabolit nisu prisutni u organizmu. Isto kao i u slučajevima prikazanim u poglavljima 3.1, 3.2 i 3.3, kako bismo simulirali efekat akutnih perturbacija etanolom, numerička integracija sistema diferencijalnih jednačina je zaustavljena u određenom izabranom trenutku i definisani su novi početni uslovi za nastavak integracije. U okviru novih početnih uslova je početna koncentracija etanola stavljena na određenu željenu vrednost, početna koncentracija acetaldehida je ostavljena da bude jednaka nuli, dok su koncentracije svih ostalih vrsta u modelu zadržale vrednosti koje su imale u trenutku

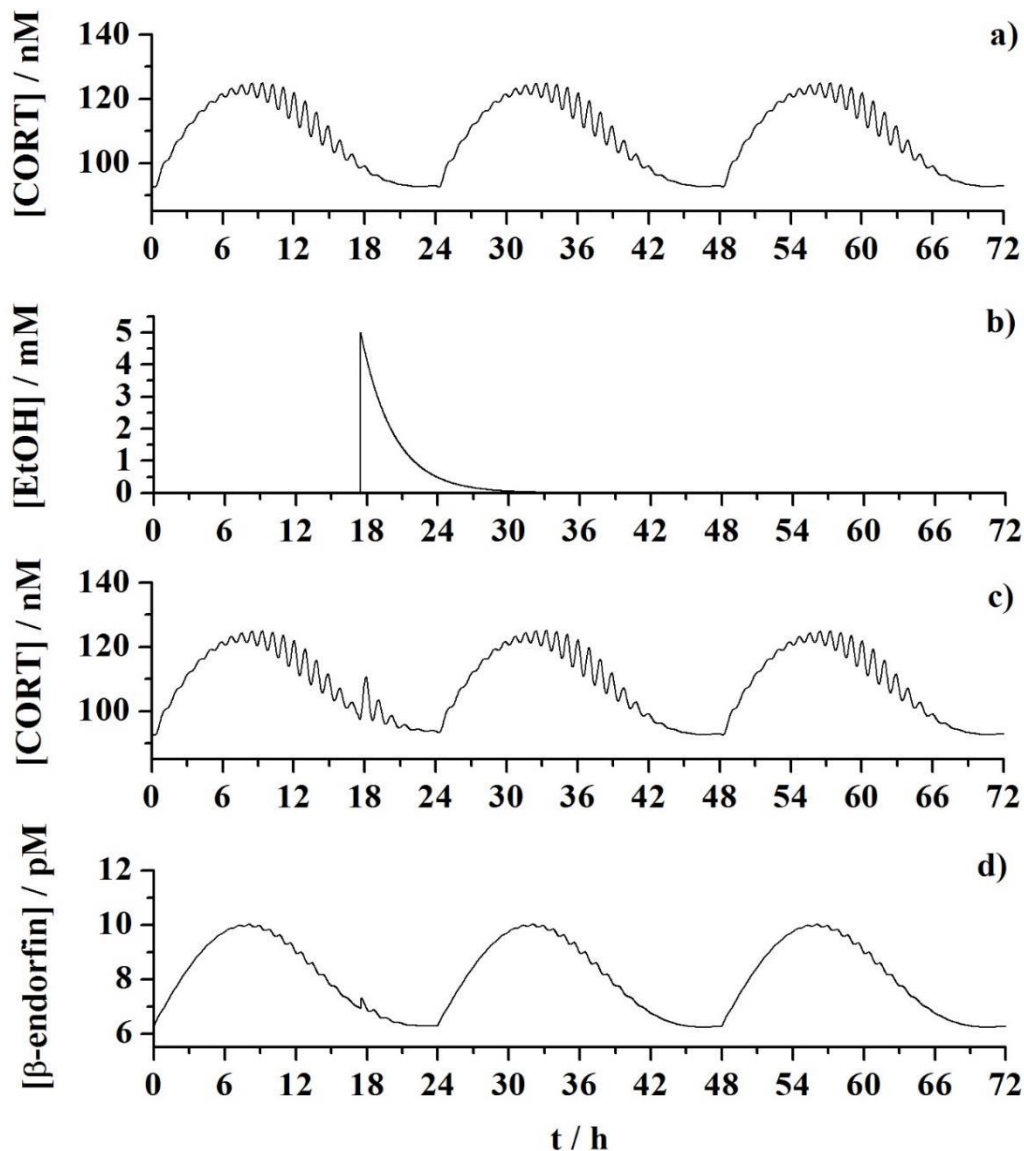
zaustavljanja integracije. Hronični unos etanola je modelovan tako što je koncentracija etanola držana konstantnom na određenoj željenoj vrednosti, oponašajući na taj način nivo etanola u krvi koji je uobičajen kod hroničnog konzumiranja alkohola.



Slika 24. „Obrnut U odgovor“ HPA ose na glukokortikoide. Aktivnost HPA ose, predstavljena amplitudom unutardnevnih oscilacija kortizola (A_{CORT}) u određenom trenutku (podne) kao funkcija koncentracije kortizola u drugom izabranom trenutku (minimum dnevne funkcije u 23 h; $[CORT]_{23h}$). Kada je koncentracija kortizola iznad ili ispod fiziološki referentnog opsega, unutardnevne oscilacije kortizola iščezavaju, tj. u tim slučajevima će njihove amplitude biti jednake nuli.

Složene dnevne varijacije nivoa kortizola u krvi dobijene numeričkim simulacijama za normalnu fiziologiju, tj. bez prisustva etanola, prikazane su na slici 25a. Akutna perturbacija etanolom (vertikalna linija na slici 25b) je praćena metaboličkom degradacijom tokom koje koncentracija etanola postepeno opada (Slika 25b). Prateći

trenutnu promenu koncentracije etanola, nivoi svih hemijskih vrsta se prilagođavaju menjajući svoje nivoe, što je ilustrovano na primeru vremenske evolucije kortizola na Slici 25c, kao i na primeru vremenske evolucije β -endorfina na Slici 25d.

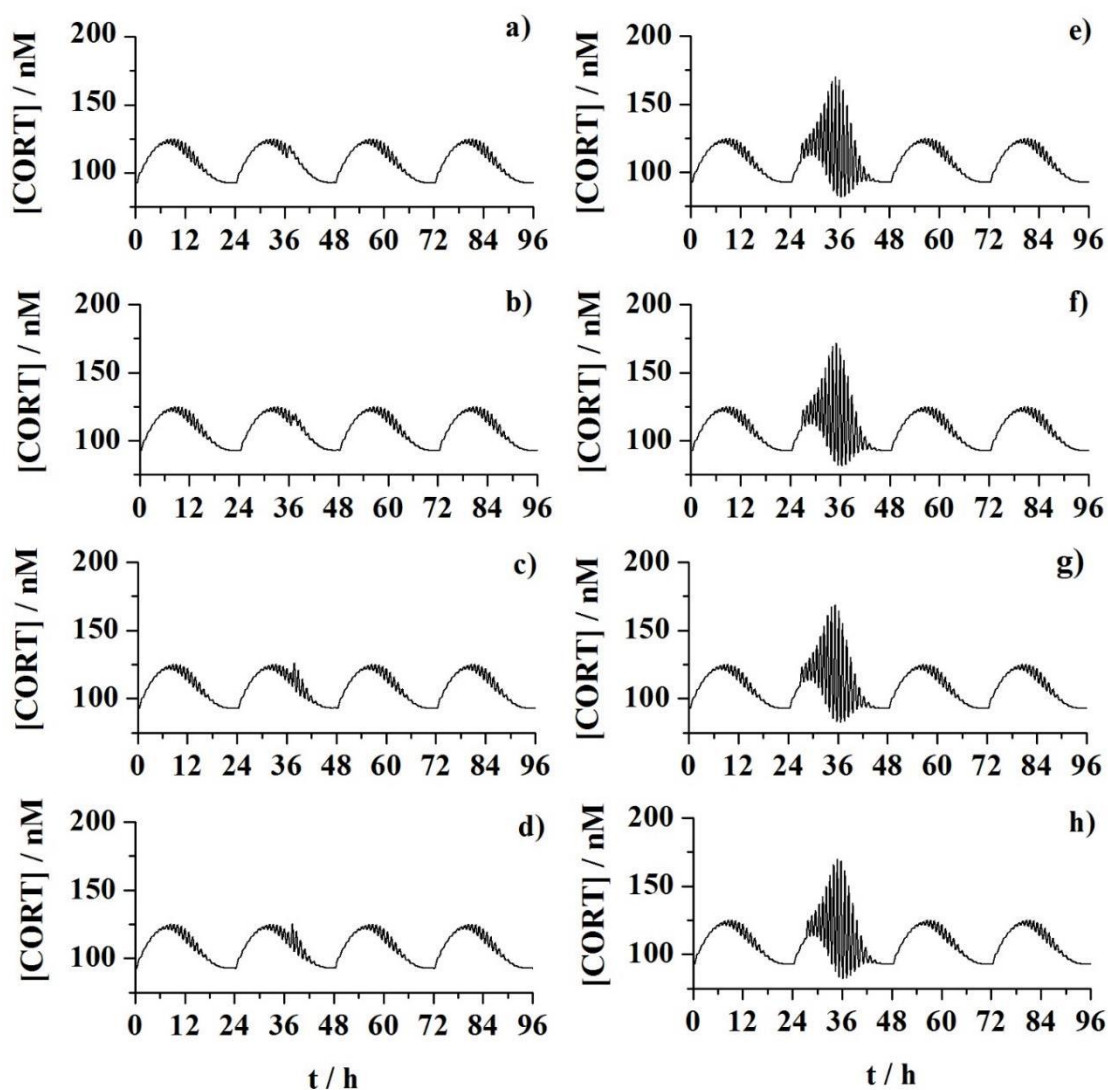


Slika 25. a) Numerička simulacija promene koncentracije kortizola tokom dana koja pokazuje složenu dinamiku sa unutardnevnim oscilacijama superponiranim na dnevne oscilacije. Period unutardnevnih oscilacija je oko 70 minuta, dok je period dnevnih oscilacija 24 h. b) Akutna perturbacija etanolom je simulirana u modelu kao jedan puls etanola (vertikalna linija); primenjena koncentracija iznosi 5 mM, a trenutak perturbacije je 17.30 h (17 h i 30 min). Perturbacija etanolom je praćena monotonim opadanjem koncentracije etanola usled metaboličke degradacije. c) Uticaj akutne perturbacije intenziteta 5 mM etanola na dinamiku kortizola. Primenjena perturbacija etanolom

zapravo odgovara onoj prikazanoj pod b). d) Uticaj akutne perturbacije intenziteta 5 mM etanola na dinamiku β -endorfina. Primenjena perturbacija etanolom zapravo odgovara onoj prikazanoj pod b).

Vreme koje je potrebno HPA osi da se vrati na svoju prvobitnu dinamiku je u saglasnosti sa eksperimentalnim merenjima (de Waele i Gianoulakis 1993). Pored toga, predviđanja modela su u skladu sa eksperimentalno opaženim oštrim porastom etanola nakon perturbacije (silka 25b).

Odgovor HPA ose na akutne perturbacije etanolom je složen i veoma zavisi od stanja u kome se HPA osa nalazi u trenutku perturbacije, tj. od faze unutardnevne i dnevne oscilacije, kao i od intenziteta perturbacije (Slika 26). Amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola tokom obdanice (aktivne faze kod ljudi) i noći (faze odmora kod ljudi) su različite (Slika 25a), i daju različiti odgovor HPA ose na perturbacije etanolom istog intenziteta u zavisnosti od toga da li je perturbacija primenjena tokom obdanice (Slike 26a-d) ili tokom noći (Slike 26e-h).



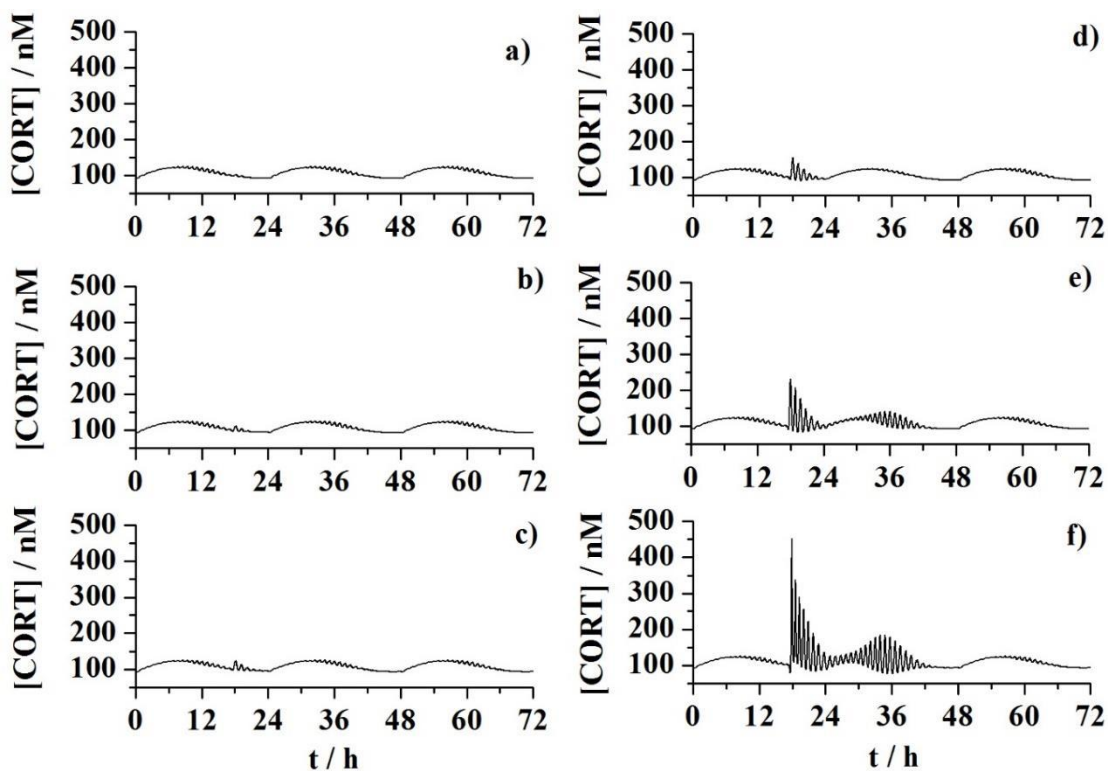
Slika 26. Složeni odgovor HPA ose na perturbaciju istog intenziteta, 4,25 mM etanola, primenjenu u različitim fazama unutar-dnevne oscilacije kortizola. a) Smanjenje amplitude unutar-dnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u uzlaznoj prevojnoj tački unutar-dnevne oscilacije tokom obdanice. b) Smanjenje amplitude unutar-dnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u maksimumu unutar-dnevne oscilacije tokom obdanice. c) Povećanje unutar-dnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u silaznoj prevojnoj tački unutar-dnevne oscilacije tokom obdanice. d) Povećanje unutar-dnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u minimumu unutar-dnevne oscilacije tokom obdanice. Sada zapravo dolazi do promena smera odgovora kortizola na perturbacije etanolom, od smanjivanja unutar-dnevne amplitude, ka njenom ponovnom povećanju. e-h) Perturbacija istog intenziteta je primenjena u različitim fazama unutar-dnevne oscilacije tokom noći

(uzlazna prevojna tačka, maksimum, silzana prevojna tačka i minimum, respektvno). Uočeno je da u sva četiri slučaja dolazi do povećanja amplitude unutar dnevnih oscilacija kortizola tokom naredne obdanice.

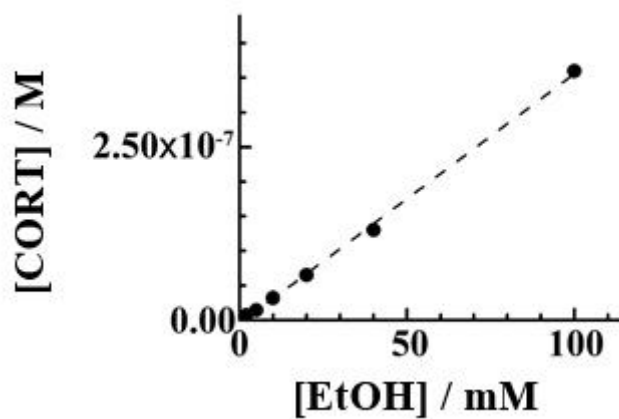
Kada se sistem perturbuje etanolom tokom obdanice, pri koncentraciji etanola i početnim uslovima koje koristimo u ovoj disertaciji, odgovor HPA ose će izrazito zavisiti od faze unutar dnevnih oscilacija (Slika 26a-d). Kada se ista količina etanola unese u različitim fazama unutar dnevnih oscilacija, može doći ili do gašenja (slika 26c), ili do povećanja (Slike 26a) unutar dnevnih oscilacija, ili do toga da amplitude unutar dnevnih oscilacija kortizola ostane praktično nepromenjena (Slika 26d), za koncentraciju etanola i početne uslove koje koristimo.

U slučaju da se sistem perturbuje etanolom tokom noći, amplitude unutar dnevnih oscilacija sledećeg dana će se povećati bez obzira na fazu unutar dnevnih oscilacija u kojoj se sistem nalazio u trenutku perturbacije (Slike 26e-h), za koncentraciju etanola i početne uslove koje koristimo ovde. Ovakvo ponašanje se javlja jer su amplitude unutar dnevnih oscilacija male tokom noći. Stoga, doza etanola koja jedva da utiče na unutar dnevnih oscilacija tokom obdanice izaziva izuzetno veliki efekat u slučaju kada se primeni tokom noći. Ukoliko bismo dozu etanola koju primenjujemo tokom noći smanjili toliko da ona bude prilagođena amplitudi unutar dnevnih oscilacija tokom noći, dobili bismo isti složeni odgovor tokom noći, kao i tokom dana (Slike 26a-d).

Akutne perturbacije etanolom različitog intenziteta (2-100 mM) primenjene uvek u isto vreme, 17.30 h (uobičajeno vreme u kojem mnogi ljudi u zapadnoj Evropi i Severnoj Americi nakon posla konzumiraju alkohol) (Slika 27), pokazuju da je odgovor HPA ose linearno proporcionalan primenjenoj dozi etanola (Slika 28). Takođe, postoji korelacija između doze etanola i vremena koje je potrebno HPA osi da se vrati na svoju prvobitnu dinamiku. Nakon intenzivne perturbacije etanolom, sistemu je potrebno oko dva dana da se vrati u prvobitno stanje (Slika 27f).

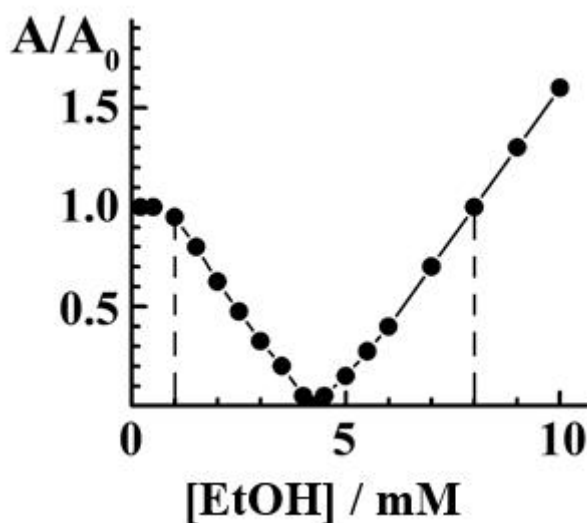


Slika 27. Efekat akutnih perturbacija etanolom na dinamiku HPA ose. Perturbacije etanolom su uvek primenjene u isto vreme, u 17.30 h. Koncentracija etanola je iznosila: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, i f) 100 mM.



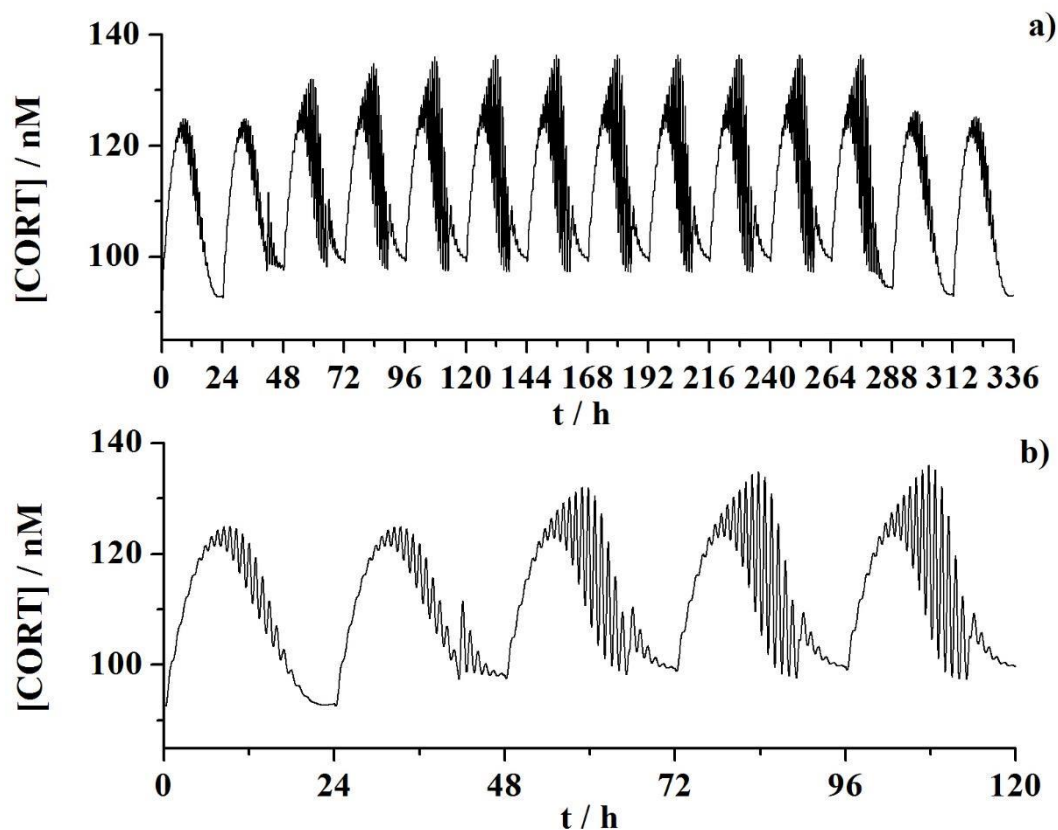
Slika 28. Povećanje koncentracije kortizola prouzrokovano jednom perturbacijom etanolom je linearno proporcionalno koncentraciji etanola, u okviru raspona koncentracija etanola od 0 do 100 mM.

Ukoliko bismo posmatrali samo koncentracije etanola niže od 10 mM i kroz koje promene dinamičkih stanja sistem prolazi pri dejstvu različitih koncentracija etanola, dobili bismo dijagram prikazan na Slici 29.



Slika 29. Perturbacije etanolom različitog intenziteta, primenjene uvek u isto vreme, 12.50 h, izazivaju različite odgovore HPA ose. Simulacije su rađene u maksimumu unutarodnevnih oscilacija kortizola. Postoje faze unutarodnevnih oscilacija u kojima je ovaj efekat uži, a i da postoje faze u kojima se ovaj efekat ne može dobiti. Efekat perturbacija je meren kao odnos amplituda unutarodnevnih oscilacija kortizola neposredno nakon (A) i pre perturbacije (A_0).

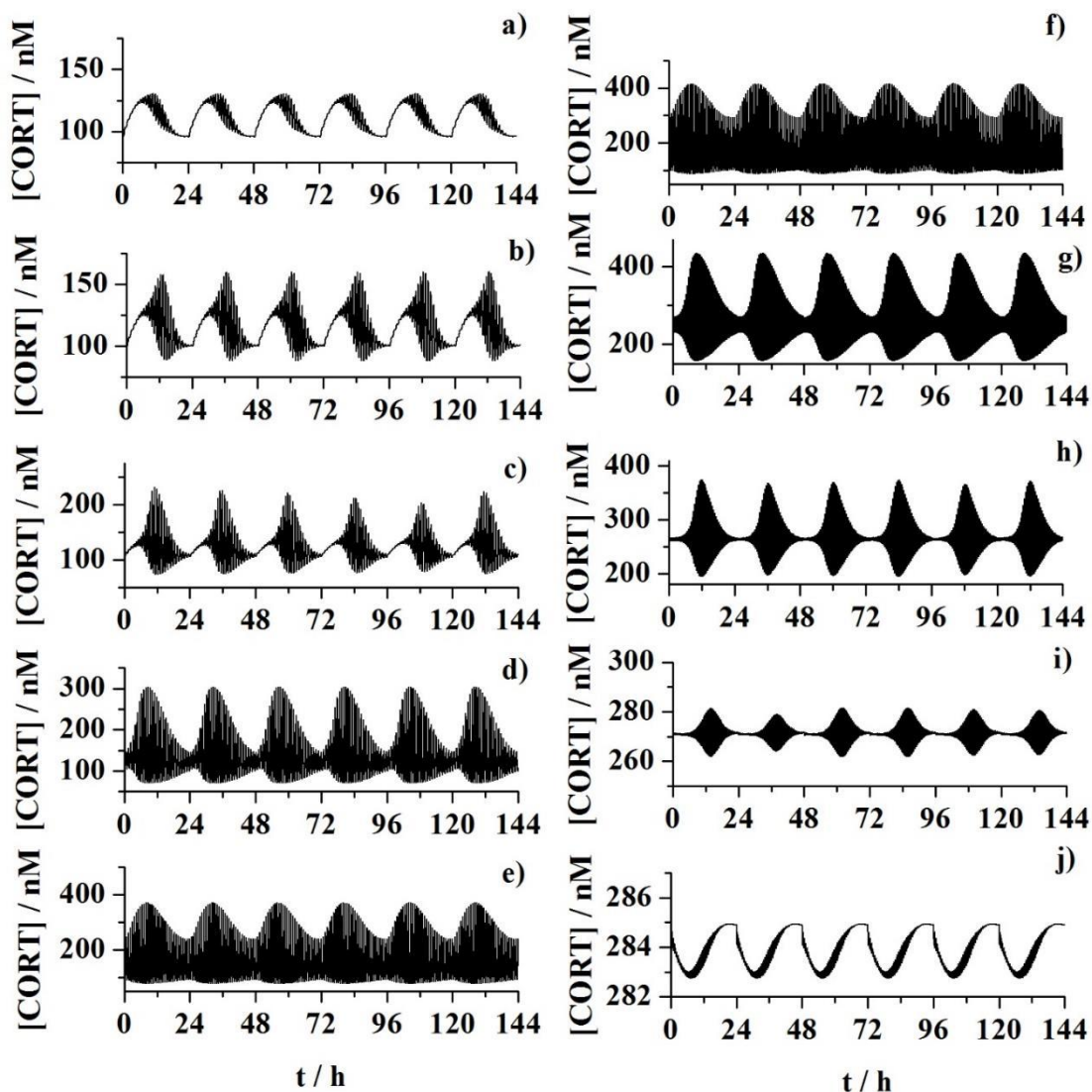
Uzastopne perturbacije etanolom, modelovane kao serija akutnih perturbacija koje se primenjuju jednom dnevno tokom 10 dana, pokazuju da su efekti etanola kumulativni kada je vreme između dve uzastopne perturbacije kraće od vremena koje je potrebno HPA osi da se vrati svojoj bazalnoj ritmičnosti (Slika 30). Štaviše, trenutni odgovor HPA ose na drugu perturbaciju etanolom je manji u odnosu na efekat koji je izazvala prva perturbacija, odnosno nivo kortizola i amplituda unutarodnevnih oscilacija kortizola manje rastu nakon druge perturbacije, nego što je to bio slučaj nakon prve perturbacije etanolom (Slika 30).



Slika 30. Odgovor HPA ose na ponovljene perturbacije etanolom koje su primenjene u vremenskom interval koji je kraći od vremena oporavka HPA ose. Perturbacije etanolom su uvek bile istog intenziteta, 5 mM, i uvek su primenjivane u isto vreme, 17.30 h. a) Amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola i srednja koncentracija kortizola postepeno rastu tokom 10 dana perturbacija. b) Uvećani deo slike a), odnosno prvih pet dana. Kada je vreme između dve uzastopne perturbacije etanolom (24 sata) kraće od vremena koje je potrebno da se HPA ose vrati svojoj prvobitnoj dinamici (oko dva dana), neposredan odgovor koji je prouzrokovan narednom perturbacijom etanolom je manji nego efekat koji je prouzrokovan prethodnom.

Hronična izloženost etanolu dovodi do složenih transformacija dinamike HPA ose (Slika 31). Male koncentracije etanola, $[EtOH] \leq 2$ mM (30 ml 40% alkoholnog pića odgovara koncentraciji etanola u krvi od oko 4,25 mM) neznatno povećavaju amplitudu unutardnevnih oscilacija kortizola, ali ne utiču na globalnu dinamiku HPA ose (Slika 31a). Kako se koncentracije etanola povećavaju, amplituda unutardnevnih

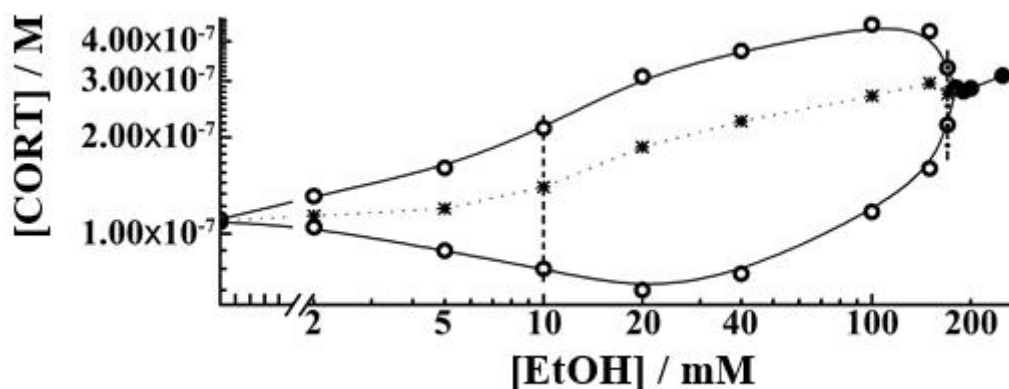
oscilacija nastavlja da raste (Slika 31b) dovodeći do pojave neperiodičnih oscilacija velikih amplituda (Slika 31c).



Slika 31. Hronična izloženost etanolu menja dinamiku HPA ose. U numeričkim simulacijama koncentracija etanola je držana konstantnom na sledećim vrednostima: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, f) 60 mM, g) 150 mM, h) 170 mM, i) 180 mM, j) 200 mM.

Dalje povećanje nivoa hroničnog etanola dovodi do pojave oscilacija velikih amplituda i tokom noći (Slike 31d i e). Ukoliko se nivo hroničnog etanola još više povećava, amplitude unutardnevnih oscilacija počinju da se smanjuju, ali srednji dnevni nivo koncentracije kortizola i frekvencija unutardnevnih oscilacija kortizola nastavljaju da

rastu (Slika 31f-i). Kada je $[\text{EtOH}] = 200 \text{ mM}$, unutarodnevna regulacija je potpuno narušena i cirkadijalna regulacija je izvrnuta. Kao posledica toga, cirkadijalne oscilacije kortizola dostižu maksimum oko ponoći, na početku faze odmora (Slika 31j) umesto ujutru, kao što je to slučaj kod normalnog fiziološkog stanja (Slika 31a). U cilju preglednijeg uočavanja promena dinamike kroz koje prolazi HPA osa pri izloženosti hroničnom etanolu, nacrtan je bifurkacioni dijagram (Slika 32).



Slika 32. Bifurkacioni dijagram koji prikazuje kako se minimalne i maksimalne vrednosti (kružići) najveće unutarodnevne oscilacije kortizola menjaju sa porastom koncentracije hroničnog etanola. Zvezdice i isprekidane linije pokazuju srednji nivo kortizola, prezentovan kao srednja tačka između maksimuma i minimuma amplitude najveće unutarodnevne oscilacije. Stanja u kojima je uočeno haotično ponašanje stanja sa malim i velikim amplitudama (Slike 31c i i) su prikazana isprekidanim vertikalnim linijama sa tačkicama i crta-tačka, redom.

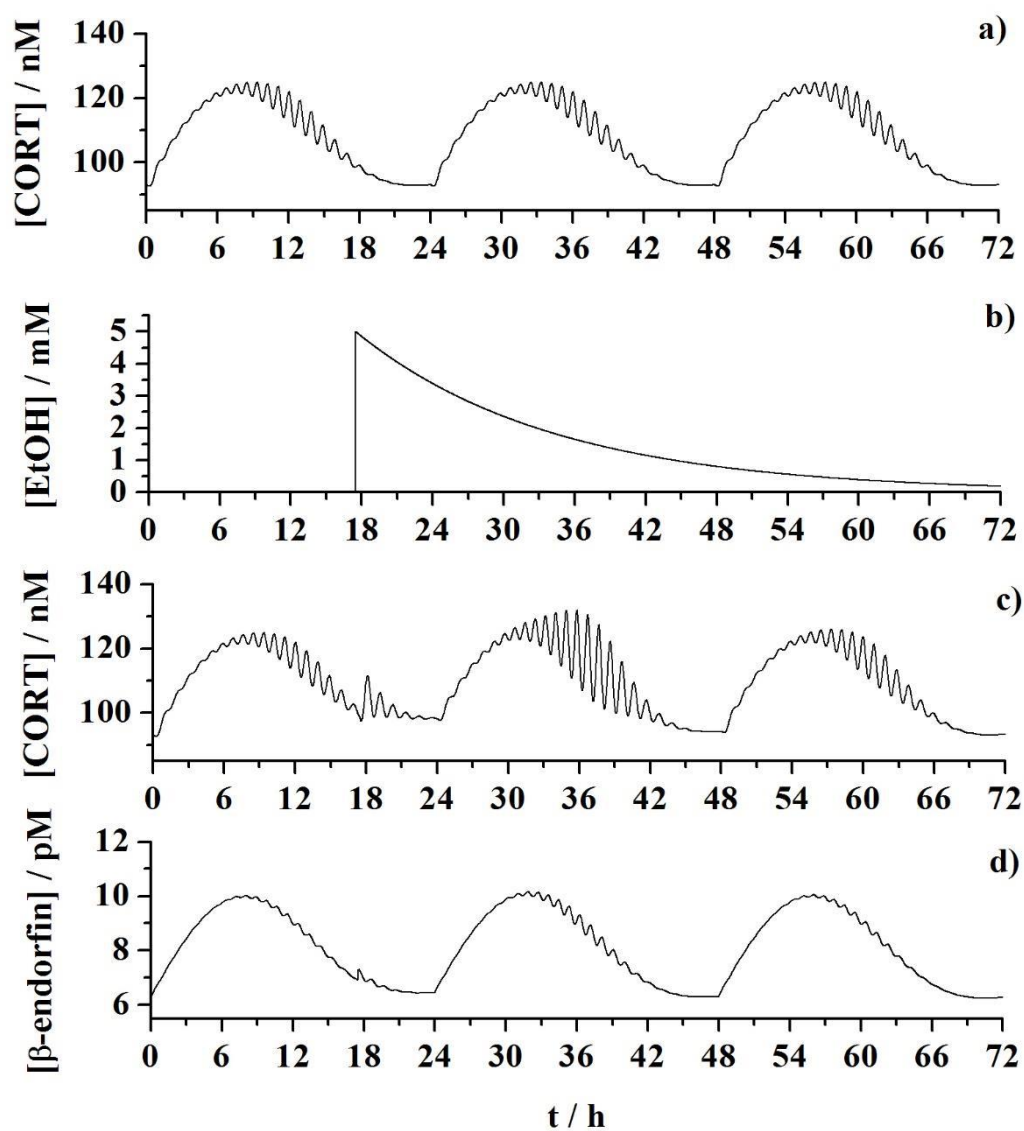
4.4.1 SPECIJALNA MODIFIKACIJA STEHIOMETRIJSKOG MODELA KOJI SADRŽI 34 REAKCIJE ZA SLUČAJ KADA POSTOJI OTEŽANO IZBACIVANJE ETANOLA IZ ORGANIZMA

Na brzinu eliminacije alkohola iz organizma mogu uticati različiti faktori, kao što su pol, telesna konstitucija, zapremina jetre, način ishrane. Međutim, vrlo važnu ulogu u brzini eliminacije etanola mogu igrati mutacije gena odgovornih za sintezu enzima koji metabolišu etanol, kao što su alkohol dehidrogenaza i aldehid dehidrogenaza. [164]

Kako bismo ispitali kako se model predstavljen u Tabeli 19. ponaša u slučaju onemogućene eliminacije etanola, možemo izabrati da je konstanta brzine (R34) jednaka nuli.

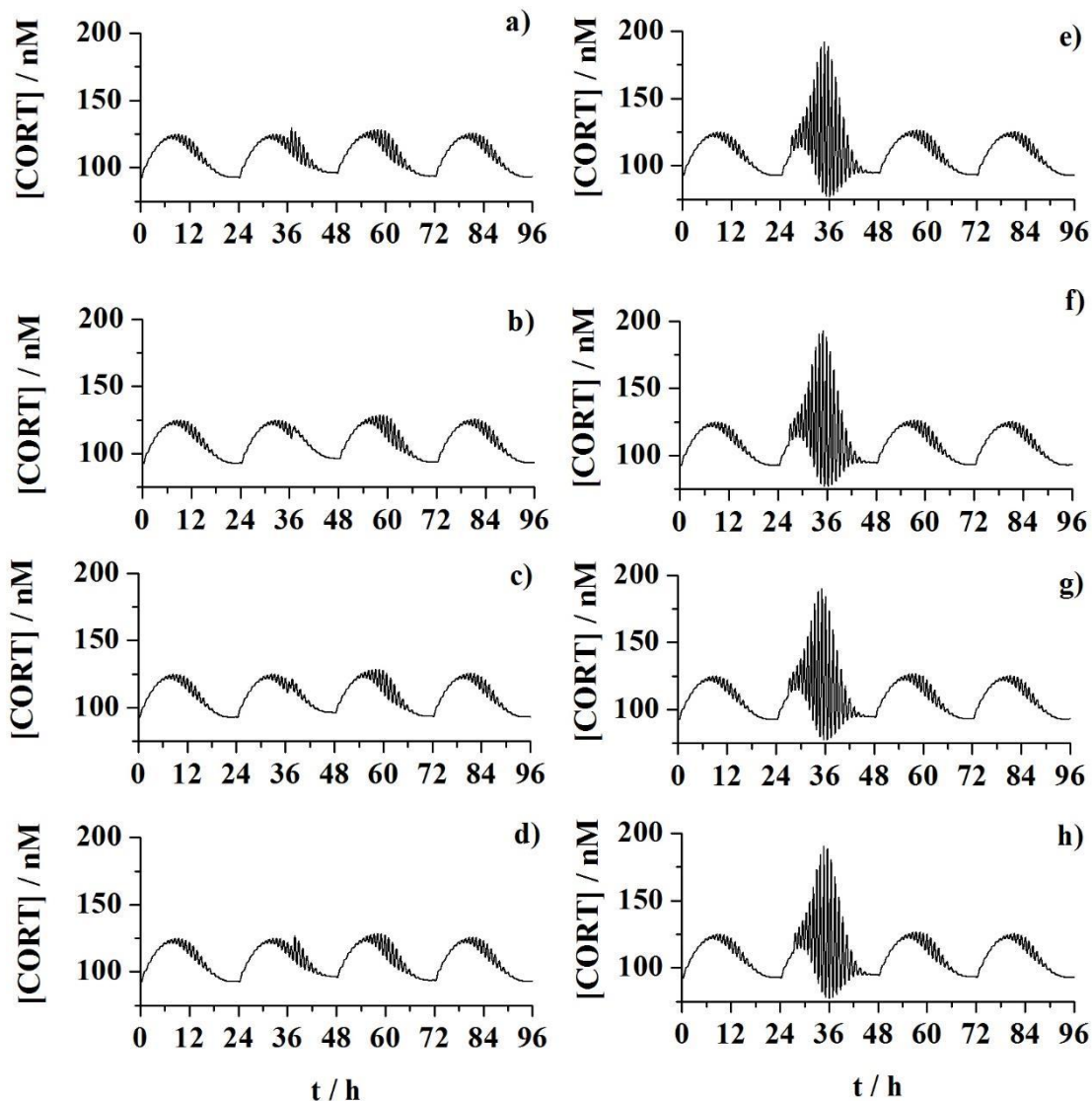
U ovom slučaju, složene dnevne varijacije nivoa kortizola u krvi dobijene numeričkim simulacijama za normalnu fiziologiju, tj. bez prisustva etanola, prikazane su na slici 33a. Akutna perturbacija etanolom (vertikalna linija na Slici 33b) je praćena metaboličkom degradacijom tokom koje koncentracija etanola postepeno opada (Slika 33b). Može se primetiti da je vreme eliminacije etanola iz organizma povećano u odnosu na Sliku 25b. Prateći trenutnu promenu koncentracije etanola, nivoi svih hemijskih vrsta se prilagođavaju menjajući svoje nivoe, što je ilustrovano na primeru vremenske evolucije kortizola na Slici 33c, kao i na primeru vremenske evolucije β -endorfina na Slici 33d.

Vreme koje je potrebno HPA osi da se vrati na svoju prvobitnu dinamiku je takođe duže nego u slučaju prikazanom na Slici 25c.



Slika 33. a) Numerička simulacija promene koncentracije kortizola tokom dana koja pokazuje složenu dinamiku sa unutardnevnim oscilacijama superponiranim na dnevne oscilacije. Period unutardnevnih oscilacija je oko 70 minuta, dok je period dnevnih oscilacija 24 h. b) Akutna perturbacija etanolom je simulirana u modelu kao jedan puls etanola (vertikalna linija); primenjena koncentracija iznosi 5 mM, a trenutak perturbacije je 17.30 h. Perturbacija etanolom je praćena monotonim opadanjem koncentracije etanola usled metaboličke degradacije. c) Uticaj akutne perturbacije intenziteta 5 mM etanola na dinamiku kortizola. Primenjena perturbacija etanolom zapravo odgovara onoj prikazanoj pod b). d) Uticaj akutne perturbacije intenziteta 5 mM etanola na dinamiku β -endorfina. Primenjena perturbacija etanolom zapravo odgovara onoj prikazanoj pod b).

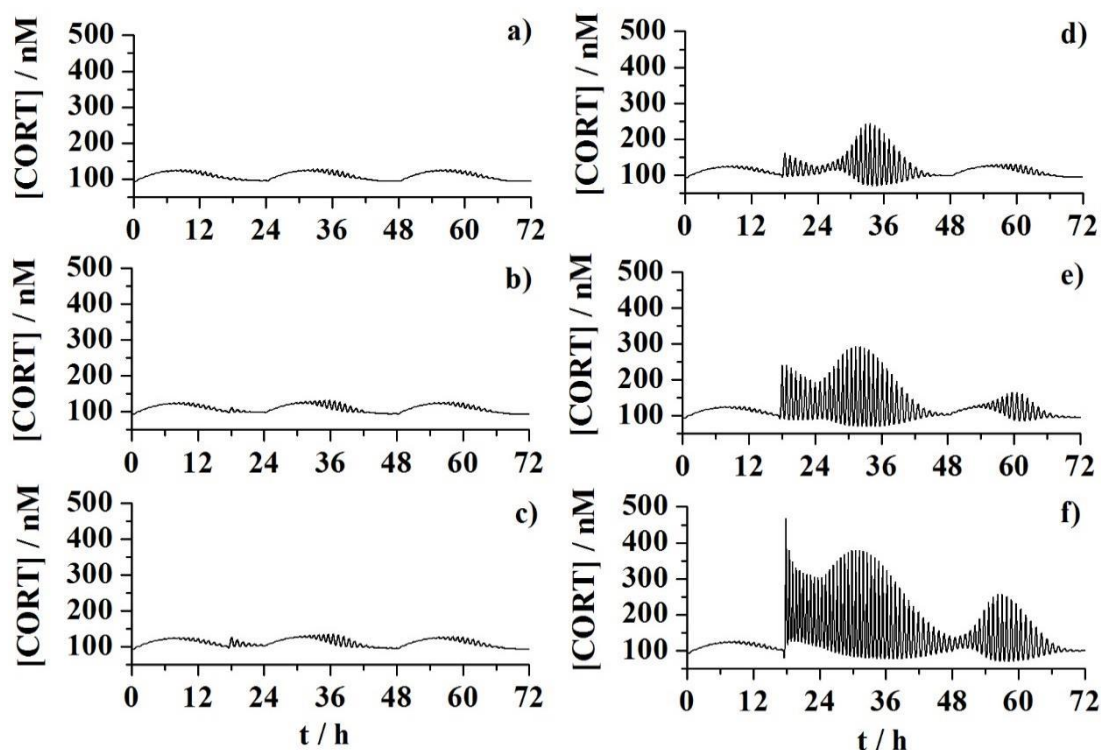
Kao i u slučaju kada je prisutna eliminacija etanola, odgovor HPA ose na akutne perturbacije etanolom je složen i veoma zavisi od stanja u kome se HPA osa nalazi u trenutku perturbacije, tj. od faze unutardnevne i dnevne oscilacije (Slika 34).



Slika 34. Složeni odgovor HPA ose na perturbaciju istog intenziteta, 4,25 mM etanola, primenjenu u različitim fazama unutardnevne oscilacije kortizola. a) Porast amplitude unutardnevne oscilacije kortizola nakon perturbacije u uzlaznoj prevojnoj tački unutardnevne oscilacije tokom obdanice. b) Gašenje unutardnevnih oscilacije kortizola nakon perturbacije u maksimumu unutardnevne oscilacije tokom obdanice. c) Smanjenje amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije u silaznoj prevojnoj tački unutardnevne oscilacije tokom obdanice. d) Neznatno povećanje unutardnevnih oscilacija

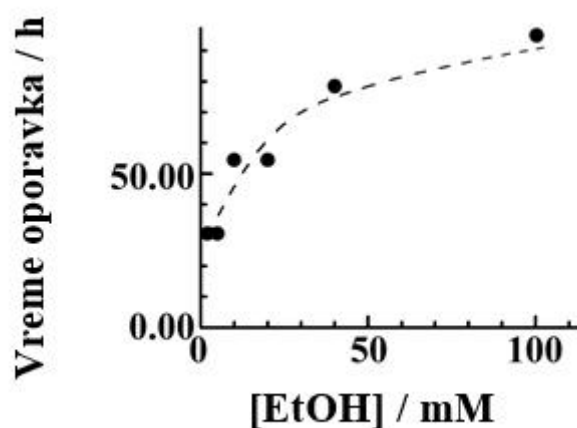
kortizola nakon perturbacije u minimumu unutardnevne oscilacije tokom obdanice. Sada zapravo dolazi do promena smera odgovora kortizola na perturbacije etanolom, od smanjivanja unutardnevne amplitude, ka njenom ponovnom povećanju. e-h) Perturbacija istog intenziteta je primenjena u različitim fazama unutardnevne oscilacije tokom noći (uzlazna prevojna tačka, maksimum, silazna prevojna tačka i minimum, respektvno). Uočeno je da u sva četiri slučaja dolazi do povećanja amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola tokom naredne obdanice.

Akutne perturbacije etanolom različitog intenziteta (2-100 mM) primenjene uvek u isto vreme, 17.30 h (17 h i 30 min) pokazuju da je odgovor HPA ose proporcionalan primenjenoj dozi etanola i u slučaju kada je eliminacija etanola otežana ili onemogućena (Slika 35). Takođe, postoji korelacija između doze etanola i vremena koje je potrebno HPA osi da se vrati na svoju prvobitnu dinamiku (Slika 36).



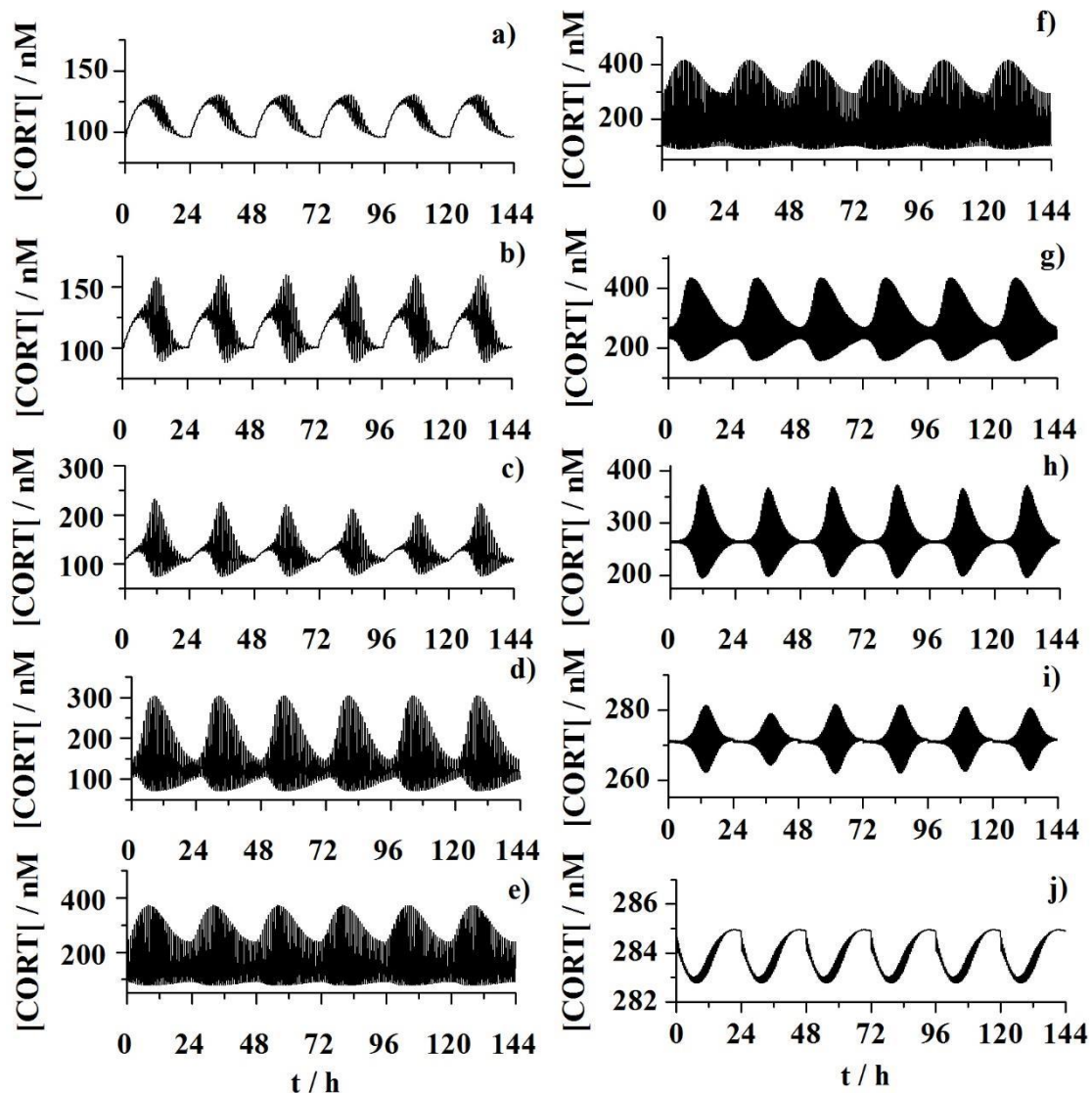
Slika 35. Efekat akutnih perturbacija etanolom na dinamiku HPA ose u slučaju kada je eliminacija etanola otežana ili onemogućena. Perturbacije etanolom su uvek primenjene u isto vreme, u 17.30 h. Koncentracija etanola je iznosila: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, i f) 100 mM.

Međutim, poređenjem Slika 27. i 35. može se primetiti da je u slučaju onemogućene eliminacije etanola, vreme koje je potrebno da bi se HPA osa vratila na svoju prvobitnu dinamiku produženo i može, u zavisnosti od koncentracije etanola kojom je vršena perturbacija iznositi i do četiri dana (Slika 36.)



Slika 36. Vreme potrebno HPA osi da se vrati svojoj prvobitnoj dinamici, takozvano vreme oporavka, je proporcionalno intenzitetu primenjene perturbacije etanolom, ali za dovoljno velike koncentracije etanola prestaje da raste, pokazujući da najduže vreme koje je potrebno HPA osi da se oporavi iznosi oko 4-5 dana (za koncentracije etanola koje su fiziološki relevantne).

Onemogućavanje eliminacije etanola ne utiče na odgovor kortizola na hronične perturbacije etanolom (uporediti Slike 31 i 37). Male koncentracije etanola, $[EtOH] \leq 2$ mM neznatno povećavaju amplitudu unutardnevnih oscilacija kortizola, ali ne utiču na globalnu dinamiku HPA ose (Slika 37a). Kako se koncentracije etanola povećavaju, amplituda unutardnevnih oscilacija nastavlja da raste (Slika 37b) dovodeći do pojave neperiodičnih oscilacija velikih amplituda (Slika 37c).

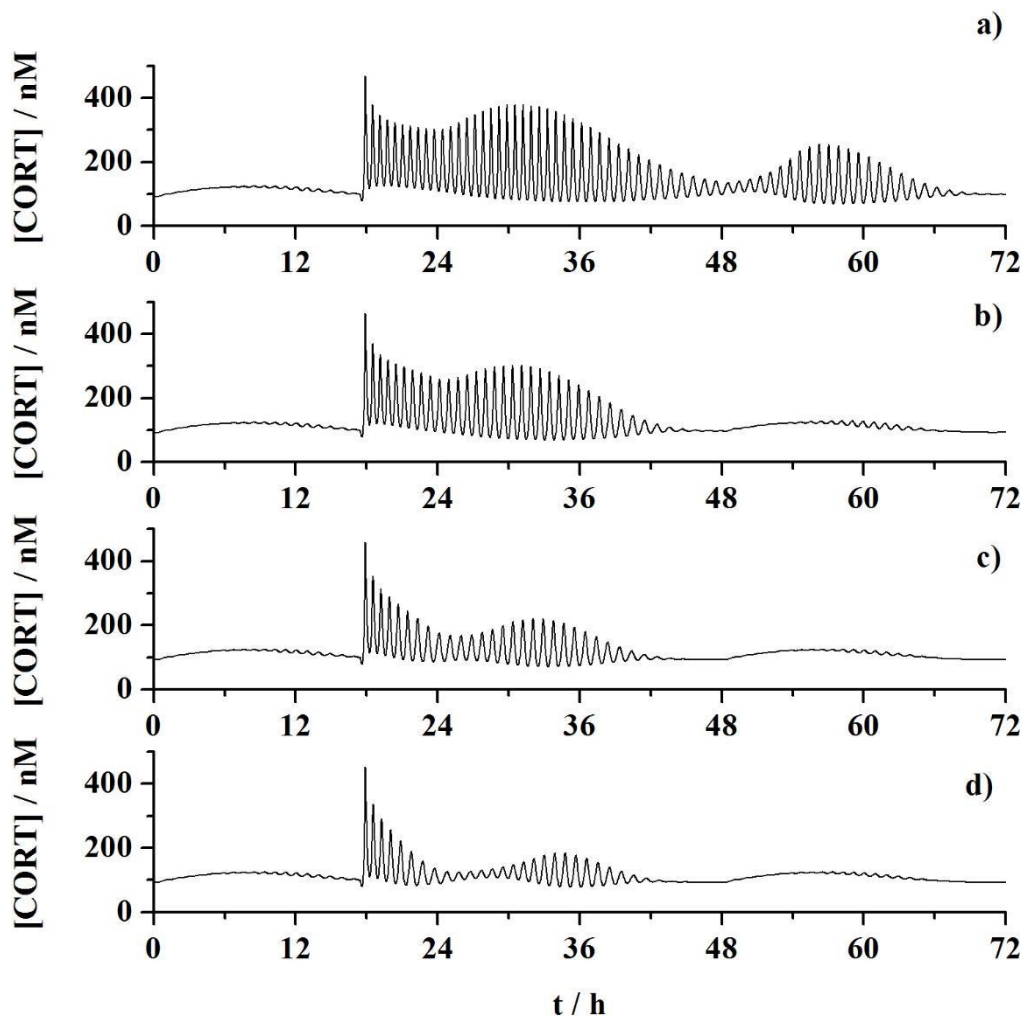


Slika 37. Hronična izloženost etanolu menja dinamiku HPA ose. U numeričkim simulacijama koncentracija etanola je držana konstantnom na sledećim vrednostima koncentracija: a) 2 mM, b) 5 mM, c) 10 mM, d) 20 mM, e) 40 mM, f) 60 mM, g) 150 mM, h) 170 mM, i) 180 mM, j) 200 mM.

Dalje povećanje nivoa hroničnog etanola u krvi dovodi do pojave oscilacija velikih amplituda i tokom noći (Slike 37d i e). Ukoliko se nivo hroničnog etanola u krvi još više povećava, amplitude unutardnevnih oscilacija počinju da se smanjuju, ali srednji dnevni nivo koncentracije kortizola i frekvencija unutardnevnih oscilacija kortizola nastavljaju da rastu (Slika 37f-i). Kada je $[EtOH] = 200$ mM, unutardnevna regulacija je potpuno narušena i cirkadijalna regulacija je izvrnuta. Kao posledica toga, cirkadijalne oscilacije

kortizola dostižu maksimum oko ponoći, na počeku faze odmora (Slika 37j) umesto ujutru, kao što je to slučaj kod normalnog fiziološkog stanja (Slika 37a).

Kako bismo još bolje uočili značaj reakcije (R34), možemo ispitati kako će se vremenska evolucija kortizola menjati nakon perturbacije etanolom, a u zavisnosti od vrednosti konstante brzine k_{34} , tj. konstante brzine eliminacije etanola (Slika 38.)



Slika 38. Vremenska evolucija koncentracije kortizola nakon akutne perturbacije sa 100 mM etanolom, izvedene uvek u 17.30 h, ali za različite vrednosti konstante brzine k_{34} : a) $k_{34} = 0 \text{ min}^{-1}$, b) $k_{34} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, c) $k_{34} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, d) $k_{34} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

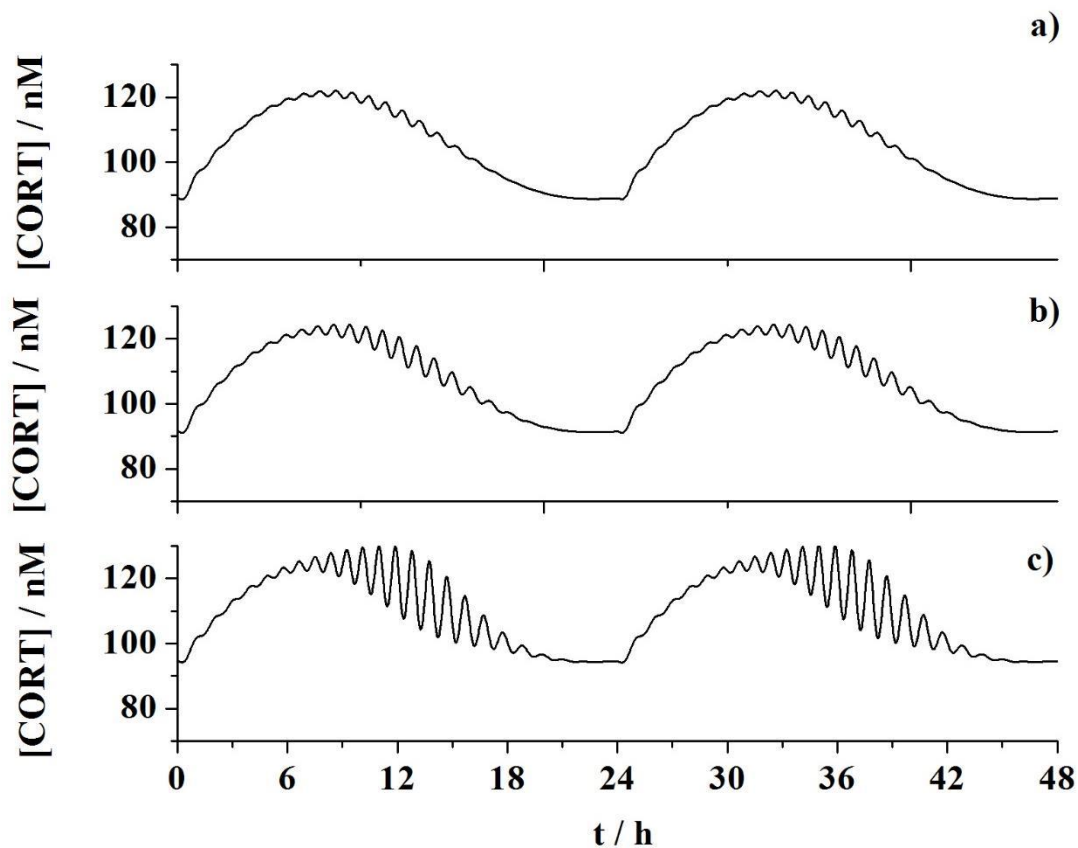
Na Slici 38. se jasno uočava da što je manja vrednost konstante brzine eliminacije etanola, to će doći do većeg porasta amplitude unutar dnevnih oscilacija kortizola nakon akutne perturbacije etanolom. Takođe, što je manja vrednost konstante brzine eliminacije etanola, to će sistemu biti potrebno duže vreme da se vrati svojoj prvobitnoj dinamici.

4.5 INTERAKCIJA CIRKADIJALNOG RITMA, HPA OSE I ETANOLA

Kao što smo više puta naglasili, u modelima prikazanim u ovom doktoratu, cirkadijalna regulacija proizvodnje CRH, koja je pod kontrolom cirkadijalnog sata u suprahijzmatičnom jedru u hipotalamusu, opisana je preko periodične funkcije D :

$$D = d_1 - 0,079145093 \times d_2 + \{(0,064 \times \sin(2\pi t/1440) + 0,12 \times \text{abs}[\sin(\pi t/1440)]\} \times d_2.$$

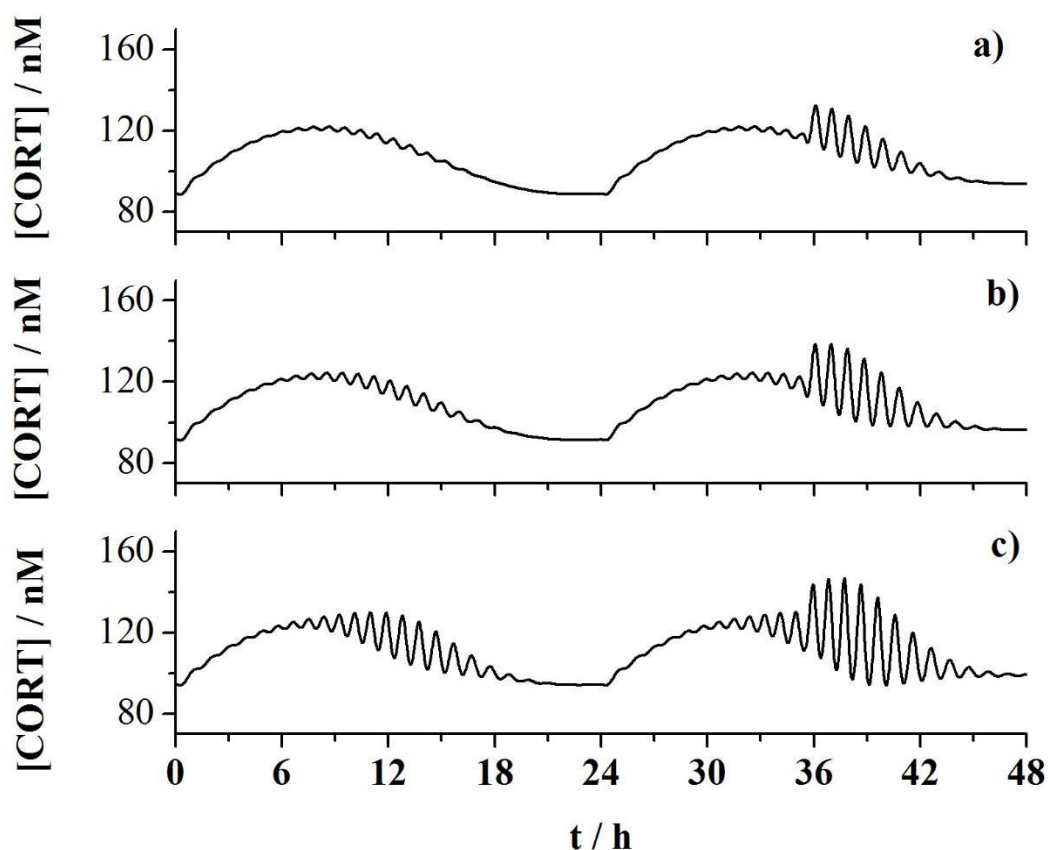
Matematičko modeliranje je pokazalo da sprezanje između spoljne funkcije koja oponaša dinamiku centralnog cirkadijalnog sata, i unutar dnevnih oscilacija hormona HPA ose omogućuje uspešno simuliranje oscilacija nivoa hormona sa dva karakteristična perioda – cirkadijalnim i ultradijalnim. (Slika 39a). Kontrolni parametar d_1 , koji određuje intenzitet sprezanja između centralnog cirkadijalnog sata i HPA ose, ponaša se kao bifurkacioni parametar i njegova veličina određuje udaljenost od superkritične Andronov-Hopfove bifurkacije. Stoga, što je vrednost parametra d_1 veća, to je sistem udaljeniji od bifurkacione tačke i amplituda unutar dnevnih oscilacija kortizola se povećava (Slika 39). U ovim numeričkim simulacijama je korišćen model prikazan u Tabeli 19.



Slika 39. Vremenska evolucija koncentracije kortizola u slučajevima kada parametar d_1 ima različite vrednosti: a) $d_1 = 0,28$, b) $d_1 = 0,29$ i c) $d_1 = 0,3025$.

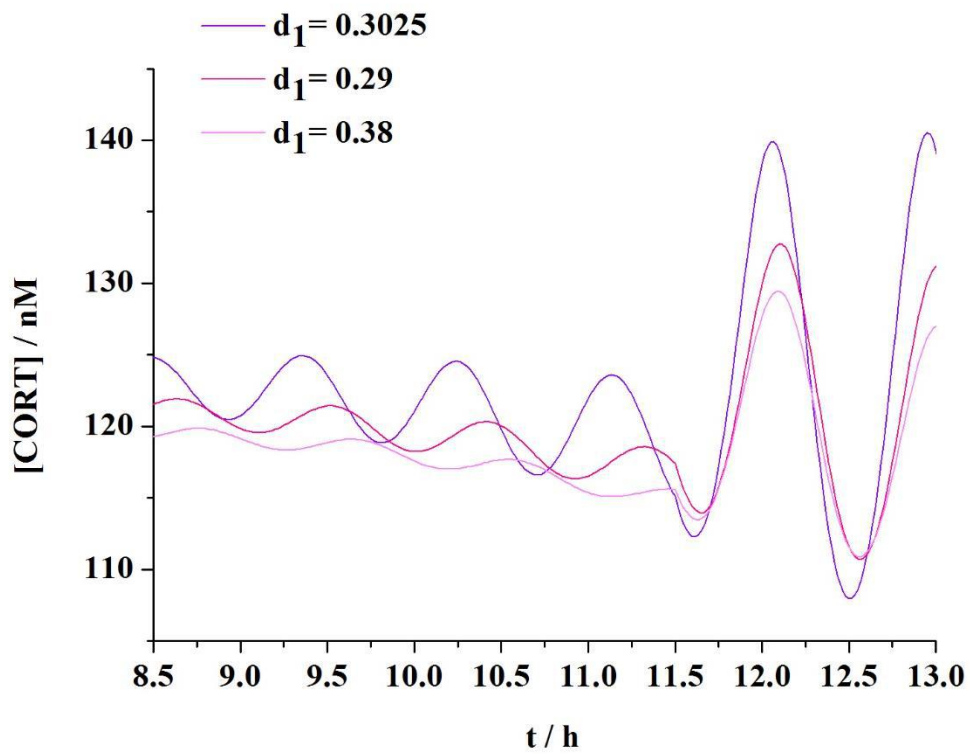
Akutne perturbacije etanolom istog intenziteta (6.3 mM) primenjene u isto vreme, 11.30 h, pokazuju da je uticaj etanola na povećanje nivoa kortizola drugačiji kada parametar d_1 ima različite vrednosti (Slika 40). Očiglednija razlika u vremenskim evolucijama koncentracije kortizola za različite vrednosti parametra d_1 nakon akutne perturbacije etanolom može se videti na Slici 41 (uvećano sa Slike 40).

Matematičko modeliranje pokazuje i da vreme oporavka sistema nakon akutnih perturbacija etanolom različitog intenziteta zavisi od vrednosti parametra d_1 (Slika 42).

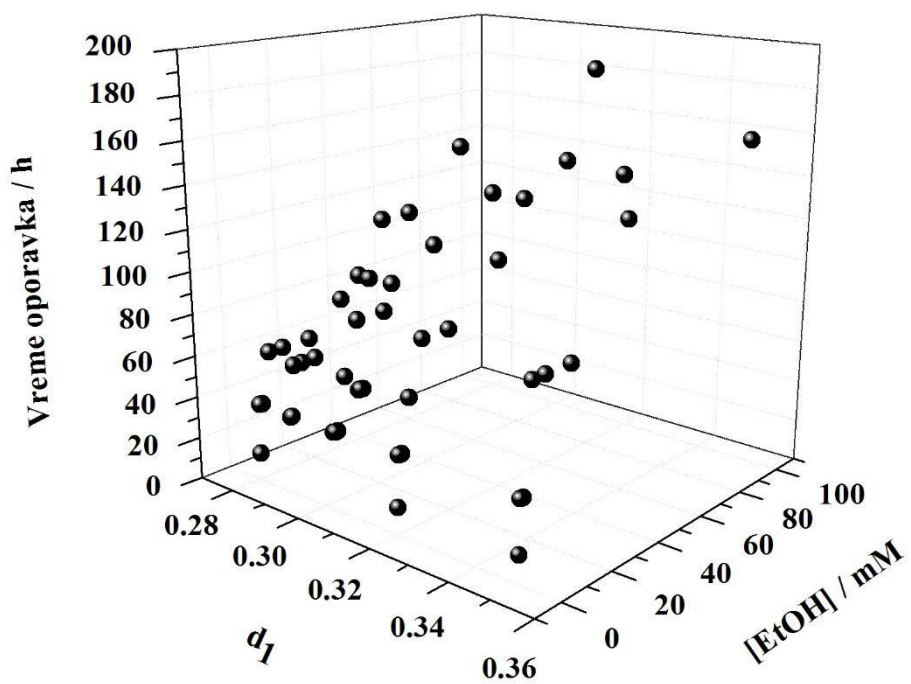


Slika 40. Odgovor HPA ose na akutnu perturbaciju etanolom istog intenziteta (6,3 mM) primenjenu uvek u isto vreme, 11.30 h, ali za različite vrednosti parametra d_1 : a) $d_1 = 0,28$, b) $d_1 = 0,29$ i c) $d_1 = 0,3025$.

Rezultati numeričkih simulacija pokazuju da je sprezanje između centralnog cirkadijalnog sata i HPA ose važan parameter koji definiše ne samo aktivnost HPA ose (Slika 39), već i njen odgovor na etanol (Slika 40). Ovi zaključci sugerišu da su bolesti kod kojih je intenzitet sprezanja cirkadijalnog sistema i HPA ose izmenjen, kao što su šizofrenija, depresija i Alchajmerova bolest [166], mogu biti povezane sa promenama u osetljivosti pojedinca na alkohol. To je u skladu i sa empirijskim zapažanjima, ali su mehanizmi koji stoje iza toga još uvek nepoznati. Naše modeliranje pokazuje da se složene interakcije između vitalnih ritmičnih regulatornih sistema, koje su teške za eksperimentalnu karakterizaciju, mogu potencijalno proučavati korišćenjem matematičkog modeliranja i teorije dinamičkih sistema.



Slika 41. Poređenje vremenskih evolucija koncentracije kortizola za različite vrednosti parametra d_1 nakon akutne perturbacije etanolom (uvećano sa Slike 40).



Slika 42. Vreme oporavka sistema za različite intenzitete akutne perturbacije etanolom i za različite vrednosti d_1 .

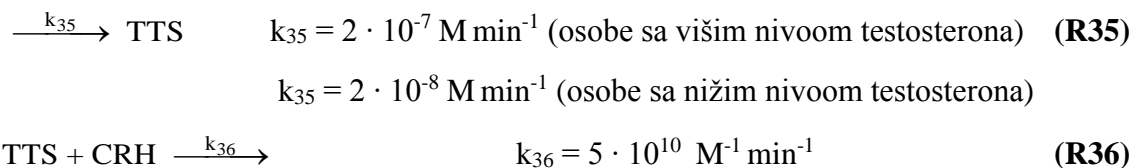
4.6 UTICAJ TESTOSTERONA NA ODZIV HPA OSE NA ETANOL

Polne razlike u aktivnosti HPA ose su samo delimično razjašnjene na molekularnom nivou i u literaturi se mogu naći nekonzistentni rezultati [167, 168]. Razumevanje polnih razlika u aktivnosti HPA ose, je međutim, od izuzetnog značaja za razvoj polno-specifičnih farmakoloških pristupa za lečenje uobičajenih neuropsihijatrijskih bolesti [169, 170]. Eksperimentalna istraživanja su pokazala da je uticaj alkohola na promenu nivoa hormona HPA ose veći kod ženki pacova nego kod mužjaka [169, 170].

Međutim, žene, iako imaju niže koncentracije testosterona u krvi od muškaraca, one imaju više koncentracije estrogena u krvi od muškaraca. Zbog toga se u ovom poglavlju nećemo strogo držati termina „žena“ i „muškarac“, već ćemo se ograničiti na to da su u pitanju razlike između osoba sa nižim i osoba sa višim nivoom testosterona u krvi.

U ovoj doktorskoj disertaciji su polne razlike predstavljene samo preko razlike u koncentraciji testosterona (TTS). Da bismo ispitali uticaj polnih hormona na odziv HPA ose na alkohol, modelu prikazanom u Tabeli 19 dodate su još dve reakcije (Tabela 22). Reakcija (R35) opisuje biosintezu testosterona od strane hipotalamo-hipofizno-gonadne (HPG) ose, njegovo oslobađanje u sistemsku cirkulaciju, i posledično, dolazak do HPA ose. Važno je naglasiti da se vrednosti konstante brzine reakcije (R35) razlikuju u slučaju da model opisuje osobe sa višim nivoom testosterona u krvi i u slučaju da model opisuje osobe sa nižim nivoom testosterona u krvi (Tabela 22). Reakcija (R36) opisuje inhibitorni efekat testosterona na lučenje CRH.

Tabela 22. Reakcije koje su dodate modelu HPA ose od 34 reakcije (Tabela 19) u cilju uključivanja razlika u nivou testosterona u krvi u model.



Uvođenje novih reakcija u model će dovesti do promena u diferencijalnim jednačinama koje opisuju vremenske evolucije kortizola i testosterona u Tabeli 20. One će sada glasiti:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{CORT}]}{dt} = & k_{12}[\text{HPGS}] + k_{17}[\text{HPGS}][\text{CORT}]^2 - k_{18}[\text{ALDO}][\text{CORT}]^2 \\ & - k_{19}[\text{CRH}][\text{CORT}] - k_{20}[\text{ACTH}][\text{CORT}] - k_{26}[\text{CORT}] \\ & - k_{36}\text{TTS}[\text{CORT}] \end{aligned} \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{TTS}]}{dt} = k_{11}[\text{HPNN}] - k_{29}[\text{TTS}] + k_{35}[\text{TTS}] - k_{36}[\text{TTS}][\text{CORT}] \quad (2)$$

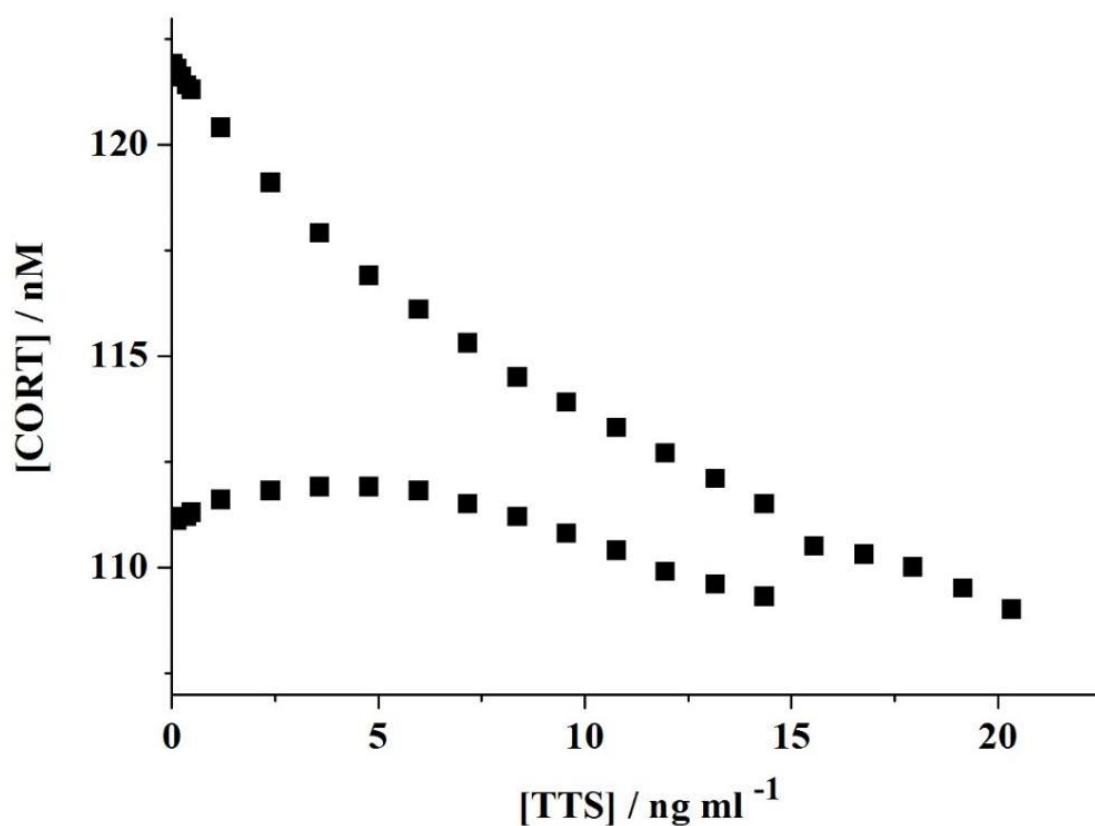
Diferencijalne jednačine koje opisuju vremensku evoluciju koncentracija svih ostalih vrsta u modelu će ostati iste kao u Tabeli 21. Poređenje referentnih fizioloških vrednosti koncentracije ukupnog testosterona u krvi kod muškaraca i žena sa predviđanjima modela opisanog u ovom poglavlju dato je u Tabeli 23. Na osnovu podataka u tabeli, jasno se uočava da su predviđanja modela u skladu sa empirijskim rezultatima.

Tabela 23. Referentne fiziološke vrednosti koncentracije ukupnog testosterona u krvi i vrednosti dobijene numeričkim simulacijama.

Pol	Referentne fiziološke vrednosti testosterona* / ng ml ⁻¹	Koncentracija testosterona dobijena simulacijama / ng ml ⁻¹
Ženski (osobe sa nižim nivoom testosterona u krvi)	0,1 – 1,2	0,48
Muški (osobe sa višim nivoom testosterona u krvi)	2,4 - 12	4,78
Faktor konverzije: 1 ng ml ⁻¹ = 3,47 nmol dm ⁻³		

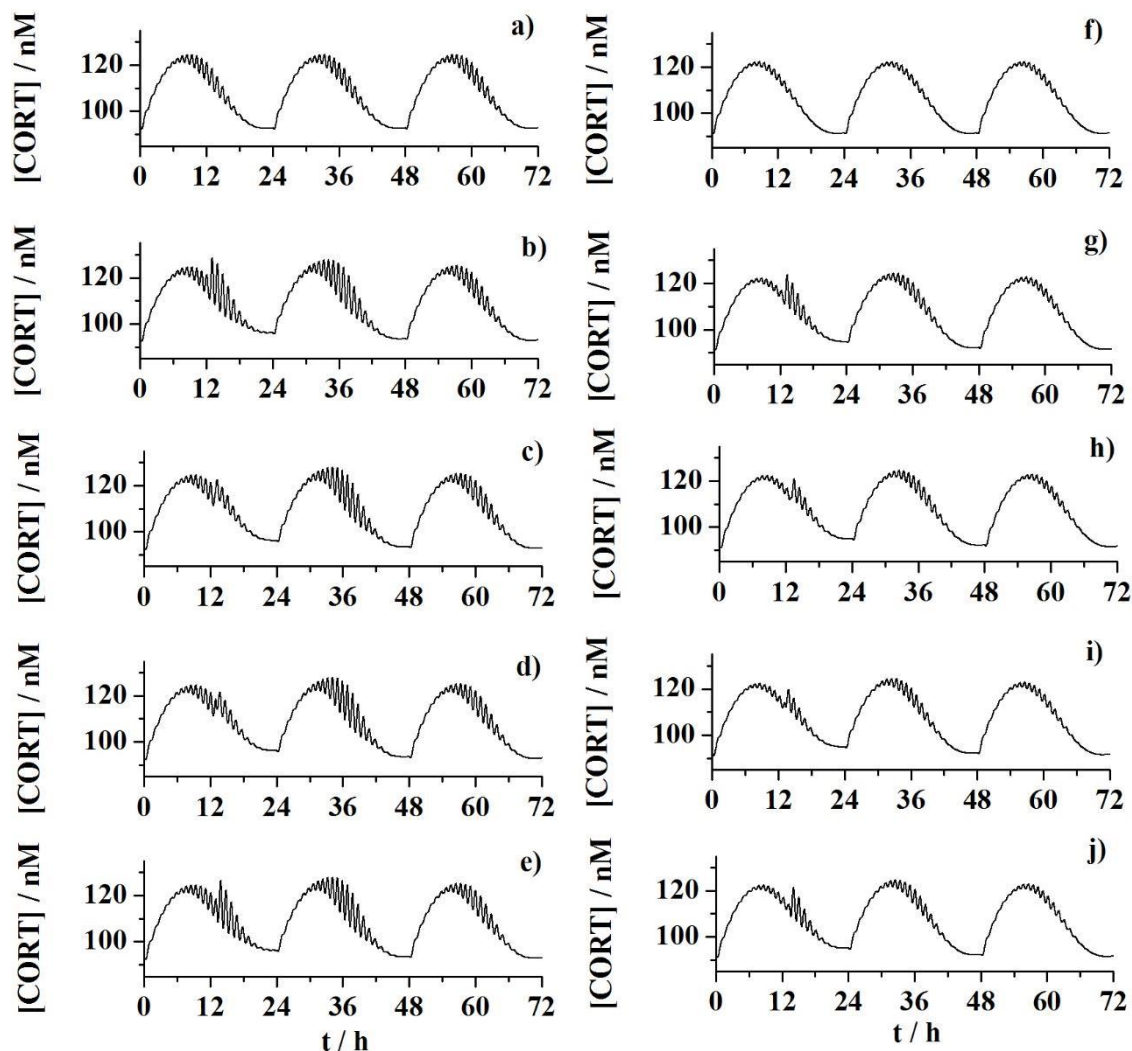
* Mayo Medical Laboratories

Matematičko modeliranje je pokazalo da razlike u nivou testosterona uslovljavaju pojavu razlika u amplitudi unutardnevnih oscilacija glukokortikoidnih hormona (Slika 43).



Slika 43. Bifurkacioni dijagram koji pokazuje kako se minimalne i maksimalne vrednosti najveće unutarnevne amplitude kortizola menjaju sa porastom koncentracije testosterona (TTS) u modelu.

Matematičko modeliranje pokazuje da akutne perturbacije etanolom istog intenziteta, u ovom slučaju 4,25 mM, primenjene u različitim fazama unutarnevne oscilacije kortizola mogu izazvati različite odgovore HPA ose kod osoba sa manjom i vecom koncentracijom testosterona (Slika 44).



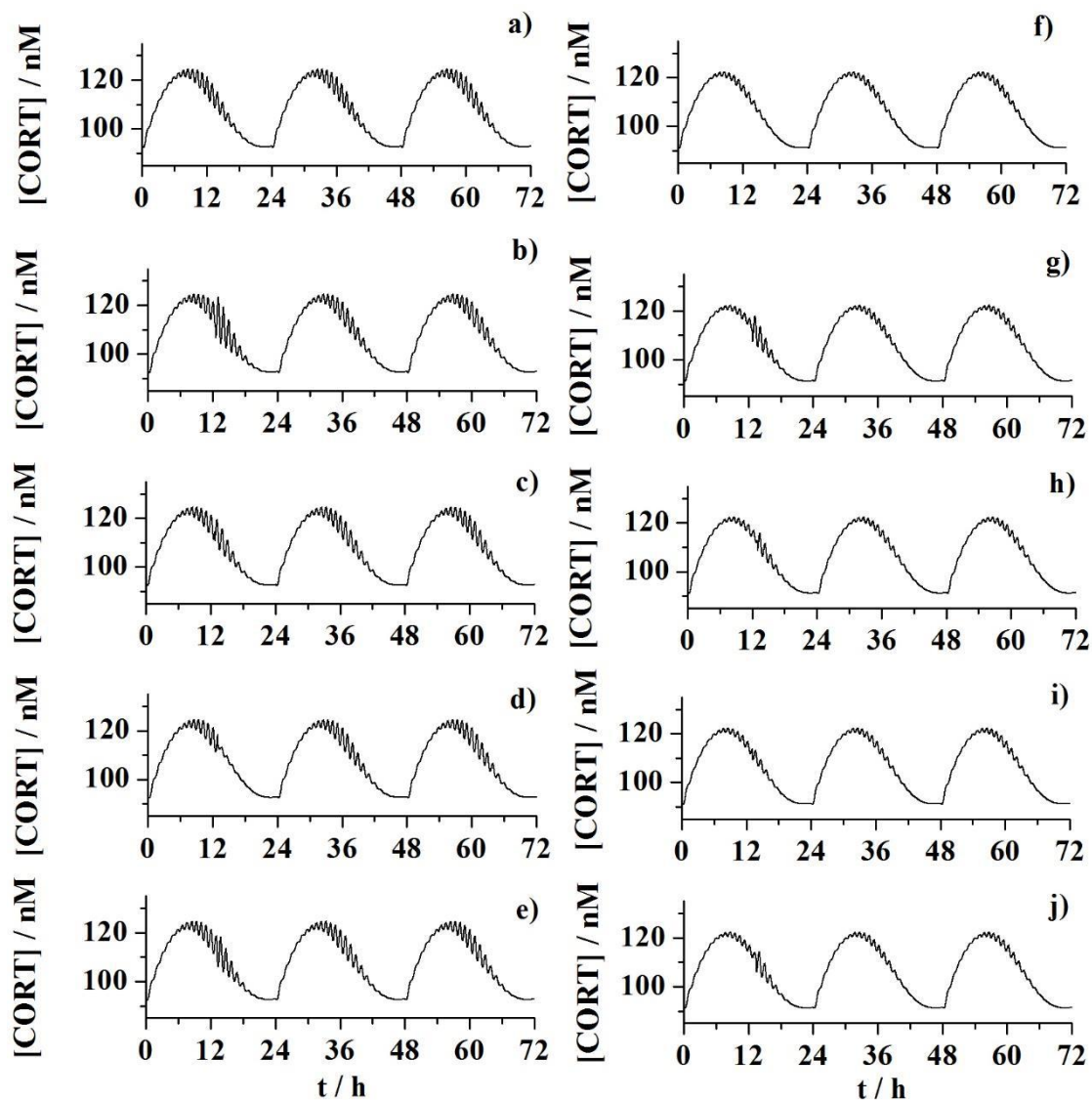
Slika 44. Vremenska evolucija koncentracije kortizola prema predviđanjima modela.

Slike a)-e) se odnose na osobe sa nižim nivoom testosterona, a f)-j) na osobe sa višim nivoom testosterona. a) za osobe sa nižim nivoom testosterona u bazalnom fiziološkom stanju, f) za osobe sa višim nivoom testosterona u bazalnom fiziološkom stanju.

Nakon akutne perturbacije etanolom istog intenziteta, ali u različitim fazama unutarodnevnih oscilacija kortizola:

b) i g) u minimumu; c) i h) u uzlaznoj prevojnoj tački; d) i i) u maksimumu; e) i j) u silaznoj prevojnoj tački.

Pored toga, matematičko modeliranje pokazuje da stres, modeliran kao akutna perturbacija sa CRH [140], primenjena u različitim fazama unutarodnevnih oscilacija kortizola može izazvati različite odgovore HPA ose kod osobe sa nižim nivoom testosterona i kod osobe sa višim nivoom testosterona (Slika 45).

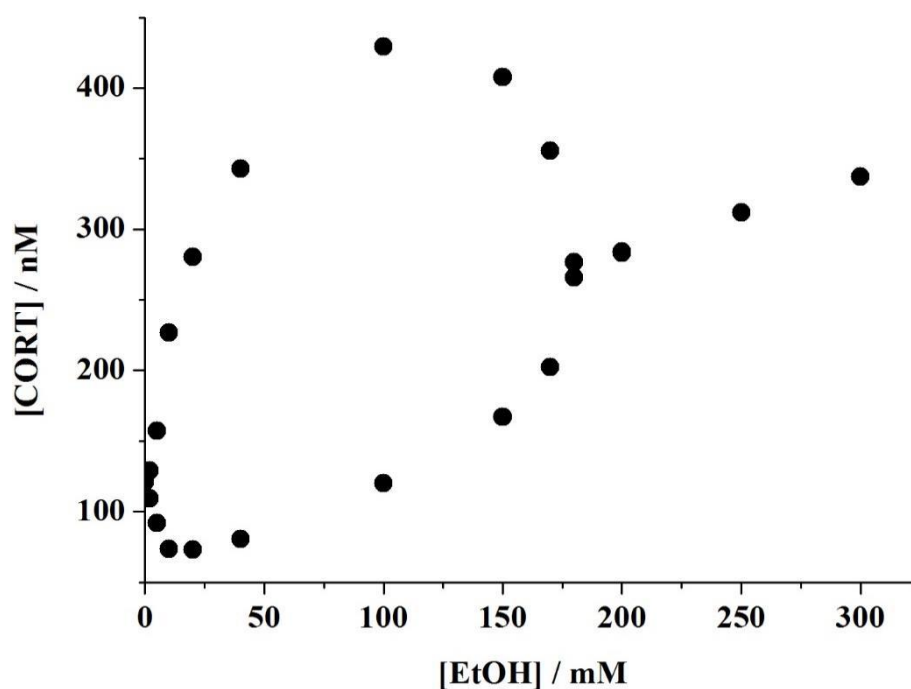


Slika 45. Vremenska evolucija koncentracije kortizola prema predviđanjima modela. Slike a)-e) se odnose na osobe sa nižim nivoom testosterona, a f)-j) na osobe sa višim nivoom testosterona. a) za osobe sa nižim nivoom testosterona u bazalnom fiziološkom stanju, f) za osobe sa višim nivoom testosterona u bazalnom fiziološkom stanju. Nakon akutne perturbacije CRH istog intenziteta, 15 nM, ali u različitim fazama unutarodnevnih oscilacija kortizola:

b) i g) u minimum; c) i h) u uzlaznoj prevojnoj tački; d) i i) u maksimumu; e) i j) u silaznoj prevojnoj tački.

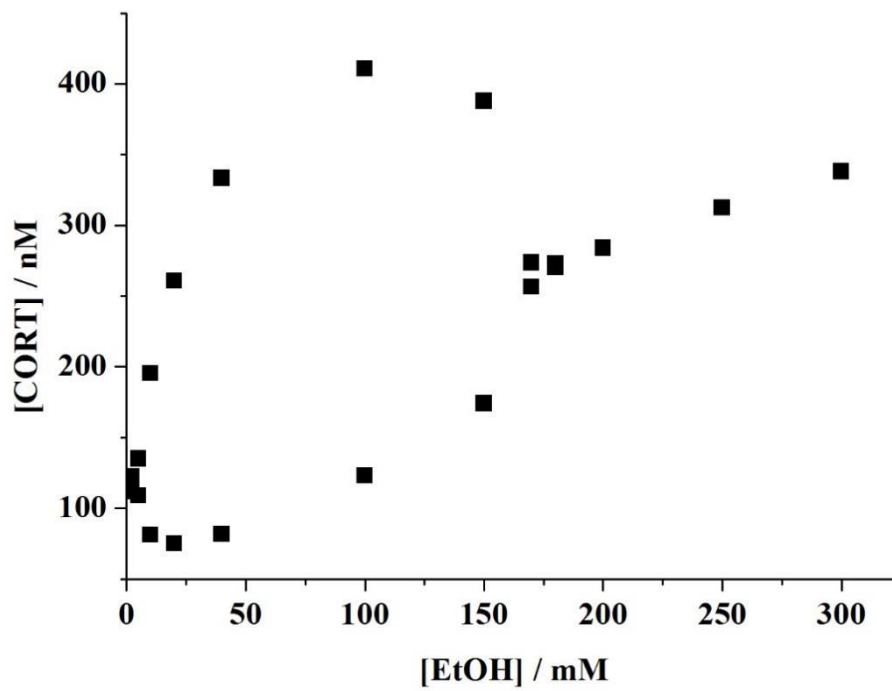
Bifurkacioni dijagrami koji prikazuju kako se minimalne i maksimalne vrednosti najveće unutarodnevnih oscilacija kortizola menjaju sa porastom koncentracije etanola kod žena i

muškaraca, prikazani su na Slikama 46 i 47, redom. Ovi bifurkacioni dijagrami su kvalitativno isti, ali su uočljive kvantitativne razlike na osnovu kojih se može zaključiti da matematičko modeliranje predviđa da je uticaj alkohola na promenu nivoa hormona HPA ose veći kod osoba sa nižim nivoom testosterona nego kod osoba sa višim nivoom testosterona, što je u skladu sa eksperimentalnim istraživanjima dostupnim u literaturi za žene i muškarce [169, 170].



Slika 46. Bifurkacioni dijagram koji pokazuje kako se minimalne i maksimalne vrednosti najveće unutarodnevnih oscilacija kortizola menjaju sa porastom koncentracije etanola kod osoba sa nižim nivoom testosterona u krvi.

Ukupno gledano, rezultati matematičkog modeliranja i numeričkih simulacija prikazani u ovom poglavlju su u skladu sa eksperimentalnim rezultatima koji pokazuju da nivo testosterona utiče na modulaciju odziva HPA ose na stres i perturbacije etanolom.



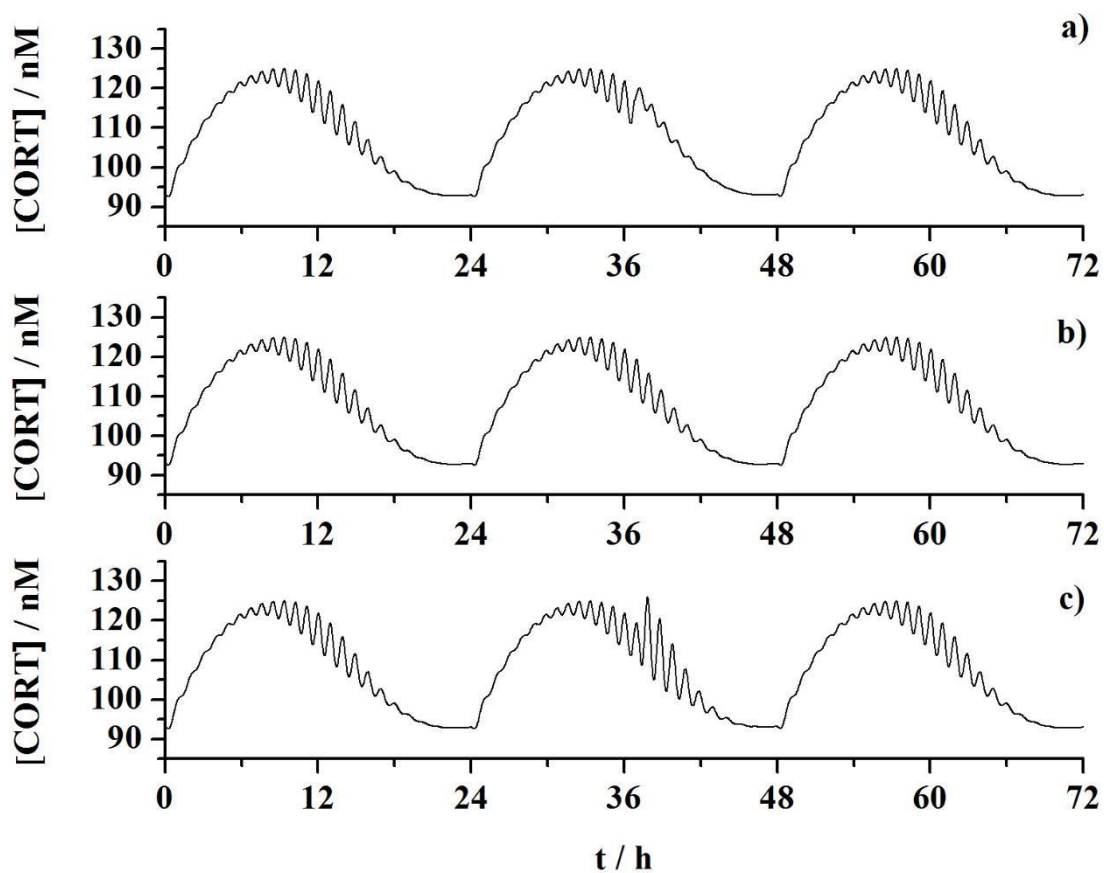
Slika 47. Bifurkacioni dijagram koji pokazuje kako se minimalne i maksimalne vrednosti najveće unutar-dnevne oscilacije kortizola menjaju sa porastom koncentracije etanola kod osoba sa višim nivoom testosterona u krvi.

5. DISKUSIJA

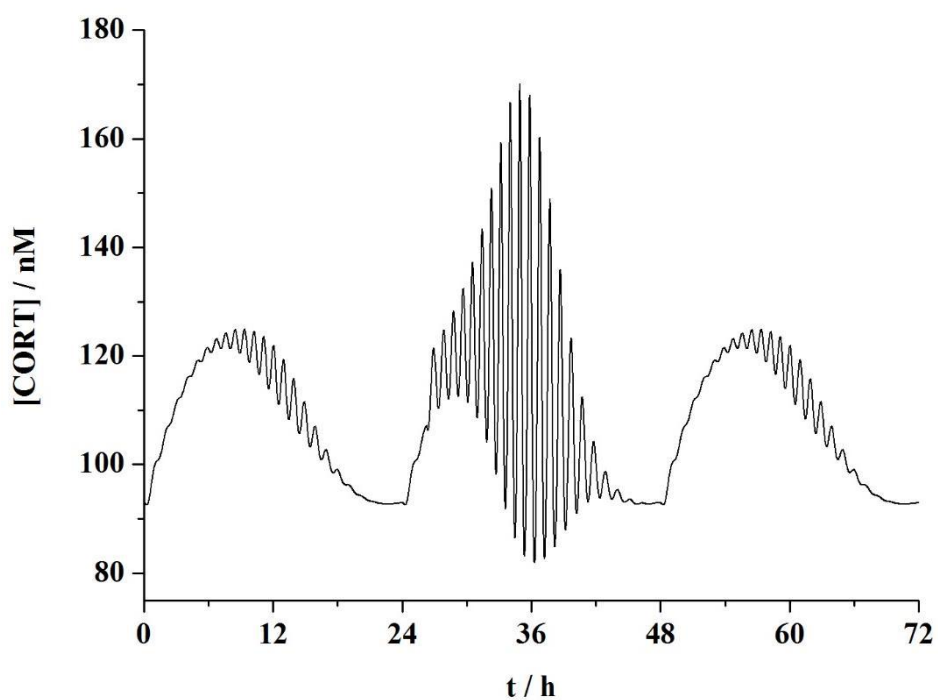
U ovoj doktorskoj disertaciji je modelovan mehanizam uticaja etanola na dinamička stanja HPA sistema. Polazeći od iste osnove, razvijena su tri stehiometrijska modela koja opisuju taj mehanizam, pri čemu svaki naredni predstavlja proširenu i adaptiranu verziju prethodnog modela. Razmatran je uticaj etanola, holesterola i testosterona na dinamiku HPA ose.

Numeričke simulacije bazirane na predloženim modelima osvetljavaju veoma složeni uticaj etanola na HPA osu. Ono pokazuje da akutni unos etanola drugačije deluje na HPA osu u zavisnosti od količine etanola koja je uneta, kao i od trenutka u kojem je uneta (Slike 48-50)². Odgovor HPA ose na etanol je složen, i mogu biti uočeni različiti odgovori HPA ose mogu biti uočeni za niske, srednje i visoke koncentracije etanola. Pod niskim koncentracijama etanola se podrazumevaju one koje ne utiču na veličinu amplitude kortizola. Pod srednjim koncentracijama etanola se podrazumevaju one koje mogu izazvati prigušenje ili povećanje unutardnevnih oscilacija kortizola u zavisnosti od faze unutardnevne oscilacije u kojoj je perturbacija primenjena. Visokim koncentracijama kortizola se smatraju one koje uvek izazivaju povećanje amplituda unutardnevnih oscilacija kortizola.

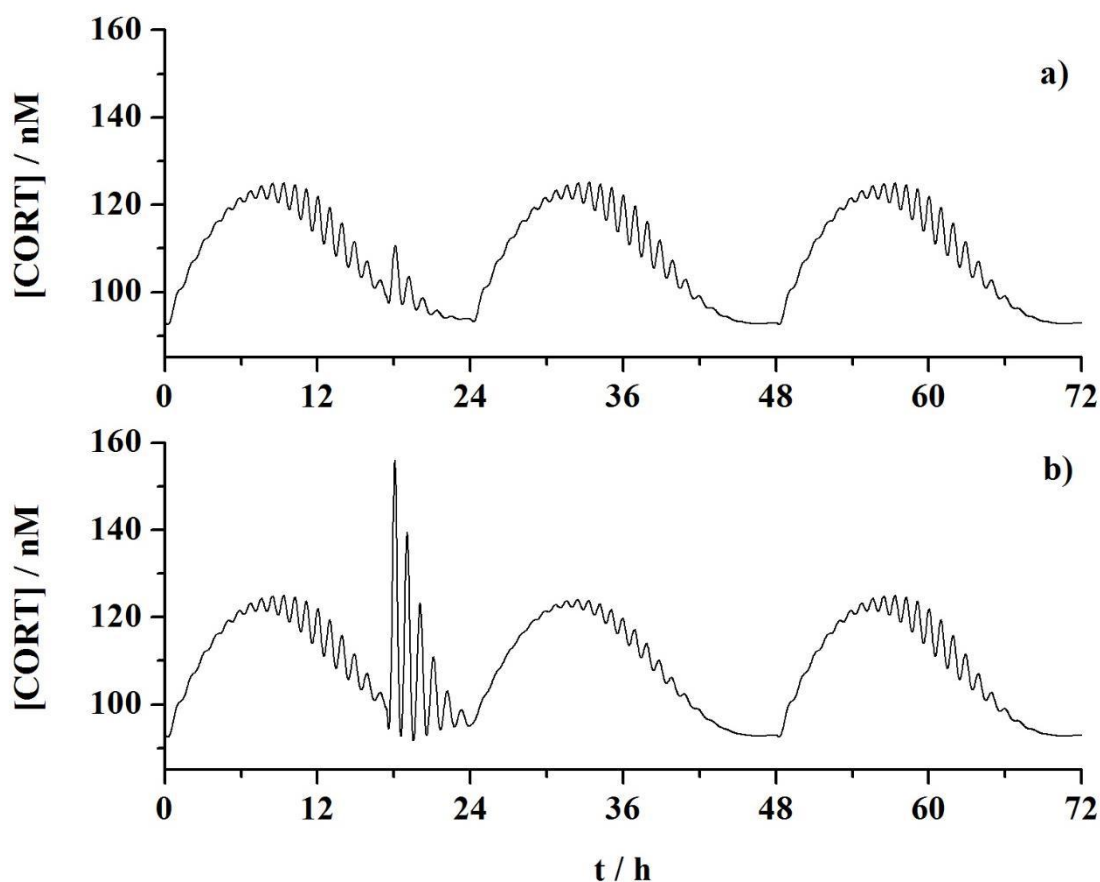
² Slike u ovom poglavlju ne predstavljaju nove rezultate, već samo uporedni prikaz rezultata koji su ranije predstavljani u okviru poglavlja *Rezultati*, i date su u cilju lakšeg i preglednijeg izvođenja zaključaka.



Slika 48. Složeni odgovor HPA ose na perturbaciju istog intenziteta, 4,25 mM etanola, primenjenu u različitim fazama unutarodnevnih oscilacija kortizola. a) Prigušenje unutarodnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije u silaznoj prevojnoj tački unutarodnevnih oscilacija tokom obdanice. b) Nepromenjenost amplitude unutarodnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije unutarodnevnih oscilacija tokom obdanice. c) Porast amplitude unutarodnevnih oscilacija kortizola nakon perturbacije u uzlaznoj prevojnoj tački unutarodnevnih oscilacija tokom obdanice. Numeričke simulacije su rađene na stehiometrijskom modelu koji sadži 34 reakcije.



Slika 49. Složeni odgovor HPA ose na perturbaciju istog intenziteta, 4,25 mM etanola koja je primenjena tokom noći uz promenu amplitude unutar dnevnih oscilacija kortizola tokom naredne obdаницe. Numeričke simulacije su rađene na stehiometrijskom modelu koji sadrži 34 reakcije.



Slika 50. Efekat akutnih perturbacija etanolom na dinamiku HPA ose. Perturbacije etanolom su uvek primenjene u isto vreme, u 17.30 h. Koncentracija etanola je iznosila: a) 5 mM, b) 20 mM. Numeričke simulacije su rađene na stehiometrijskom modelu koji sardži 34 reakcije.

Kako bi eksperimentalno bio proučen mehanizam delovanja etanola na HPA osu, neophodno je da dinamika HPA ose bude praćena sa vremenskom rezolucijom koja je dovoljno velika da se mogu uočiti unutar-dnevne oscilacije. U eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima se nivoi kortizola obično mere jednom ili svega nekoliko puta tokom dana. Unutar-dnevne oscilacije kortizola se ne prate rutinski jer bi to zahtevalo uzimanje uzoraka na svakih desetak minuta, što je stresno za pacijente i/ili za eksperimentalne životinje. Stoga, postoji svega nekoliko eksperimentalnih istraživanja u kojima su unutar-dnevne oscilacije koncentracije hormona HPA ose sistematski praćene sa visokom vremenskom rezolucijom [171-178]. Nedavni napredak u razvoju metode

koja će omogućiti brzo uzorkovanje i brzu kvantitativnu analizu hormona HPA ose u budućnosti će omogućiti detaljnu karakterizaciju dinamike HPA ose [178]. U ovom trenutku, možemo se osloniti na empirijske studije u kojima je nedvosmisleno uočen kontradiktorni odgovor HPA ose na etanol: povećanje nivoa kortizola kod nealkoholičara sa niskim nivoom alkohola u krvi [180], ali i neodgovaranje HPA ose na etanol [181]. Ovi rezultati su samo na prvi pogled protivrečni. Zapravo, oni zaista ukazuju na složen odgovor HPA ose na etanol. Kratko gubljenje unutardnevnih oscilacija kortizola odražava trenutni, ali kratkotrajni gubitak unutardnevne regulacije (Slika 48). Kod modela predstavljenih u ovom doktoratu, ova pojava je konzistentna sa privremeno pogoršanim odgovorom HPA ose na stres: pošto amplituda unutardnevnih oscilacija postane mala do iščezavanja, prag tolerancije na stres je pomeren ka manjim vrednostima, i stres koji bi u fiziološkim uslovima izazvao zanemarljivu promenu u dinamici HPA ose, sada će izazvati znatno izraženiji efekat. Obrnuto, povećanje unutardnevnih amplituda dovodi do niže osetljivosti na spoljne stimulanse.

Iako nije lako povezati rezultate numeričkih simulacija sa bihejvioralnim istraživanjima (istraživanja bazirana na posmatranju ponašanja ispitanika), postoje studije tog tipa u kojima je proučavana složena veza između alkohola i stresa. Pregledni prikazi ovih studija mogu se naći u revijskim radovima objavljenim u poslednjih deset godina [46, 182, 183], i one prikazuju naizgled nekonzistentne rezultate. Uočeno je da alkohol može da smanjuje, povećava, ili da uopšte ne utiče na odgovor organizma na stres. U svetlu numeričkih rezultata prikazanih na Slikama 48. i 49. uočavanje ovako različitog ponašanja nije uopšte iznenađujuće.

Kada se etanol konzumira tokom noći, uključujući tu i rane jutarnje sate (pre 6 h), čak i male količine etanola će povisiti amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola tokom obdanice nastupajućeg dana (Slika 49). U modelima predstavljenim u ovom doktoratu, povećanje unutardnevnih oscilacija je povezano sa manjom osetljivošću na spoljne stimulanse. To može zauzvrat objasniti zašto mnogim ljudima prija mala količina alkohola uneta ujutru, pošto malo povećanje amplitude unutardnevnih oscilacija tokom nastupajuće obdanice može poboljšati sposobnost pojedinca da se bori sa stresom. Iako se još jednom mora podvući da se predviđanja matematičkog modela ne mogu lako

povezati sa promenama u ponašanju, važno je naglasiti vezu koja postoji između dinamike HPA ose i mogućih osobina u ponašanju koje mogu biti uočene na nivou organizma.

Numeričke simulacije bazirane na predloženim modelima ukazuju da se složen odgovor HPA ose na etanol javlja kao posledica nelinearnosti biohemijskih interakcija. Na prvi pogled, ovo složeno ponašanje prkosi intuiciji. Međutim, u modelima prikazanim u ovom doktoratu, dinamika HPA ose je definisana determinističkim mehanizmom i ona odražava specifične osobine nelinearnih dinamičkih sistema koje se mogu naći u blizini superkritične Hopfove bifurkacione tačke [113, 146]. Blizina superkritičke Hopfove bifurkacione tačke ima važne fiziološke posledice. U njenoj blizini su dinamički prelazi „meki” i reverzibilni, dajući HPA osi sposobnost da prilagodi svoju dinamiku kao odgovor na spoljnje stimulanse, i da se nakon toga vrati u svoje prvobitno stanje, što zapravo predstavlja i suštinu homeostaze. Do sada nije eksperimentalno ispitivana zavisnost odgovora HPA ose na etanol u zavisnosti od faze unutardnevne oscilacije u kojoj se sistem nalazi u trenutku perturbacije. Međutim, eksperimentalno je uočeno da odgovor HPA ose na stres zavisi od faze unutardnevne oscilacije u kojoj se sistem nalazi [176].

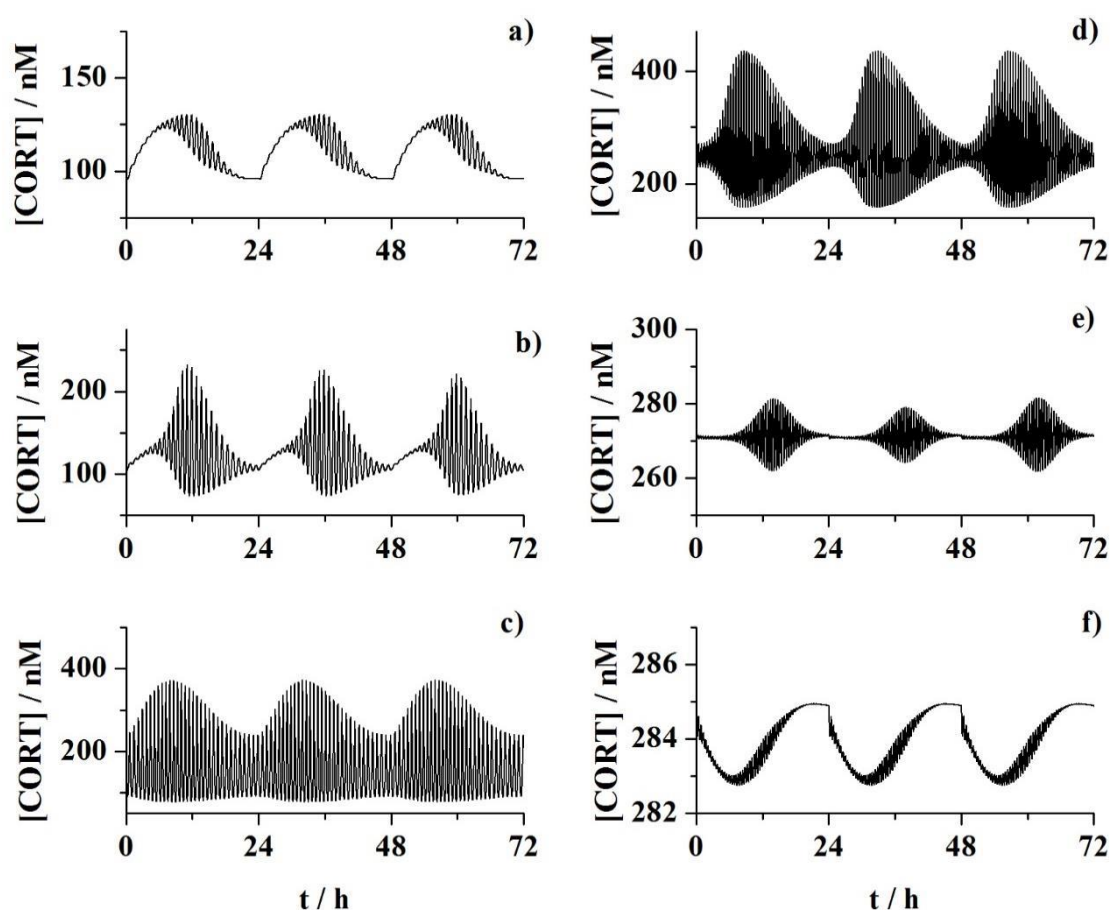
Numeričke simulacije bazirane na predloženim modelima jasno pokazuju da je odgovor HPA ose na akutne perturbacije sistema nižim koncentracijama etanola različit od njenog odgovora na visoke koncentracije etanola (Slika 50). Razlika u odgovoru HPA ose na niske i visoke koncentracije akutno unetog etanola javlja se kao posledica kinetike i specijalnih osobina koje sistem ispoljava u blizini Hopfove bifurkacione tačke. Kada se sistem perturbuje niskom koncentracijom etanola, to podstiče oslobađanje malih dodatnih količina CRH, što posledično dovodi do sinteze malih dodatnih količina kortizola. Ako je količina ovako proizvedenog kortizola manja od amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola i ako je HPA osa u fazi u kojoj preovlađuju reakcioni putevi u kojima nastaje kortizol, amplituda unutardnevnih oscilacija kortizola će se još više povećati u prisustvu etanola, u poređenju sa situacijom u kojoj etanol nije prisutan. Stoga će se uočiti povećanje unutardnevne amplitude kortizola. Sa druge strane, ako je mala dodatna količina kortizola proizvedena tokom faze u kojoj preovlađuju reakcioni putevi u kojima

se kortizol metaboliše ili elimiše iz sistema, ta dodatna količina kortizola će biti eliminisana i unutardnevne oscilacije kortizola u prisustvu etanola neće dostići onaj nivo koji su imale u situaciji u kojoj etanol nije prisutan. Stoga će biti uočeno smanjenje amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola. Nasuprot ovome, kada se kao posledica akutnih perturbacija HPA ose velikim koncentracijama etanola proizvedu velike dodatne količine kortizola, nivo kortizola će se u značajnoj meri povećati i razlike koje potiču od faze u kojoj se sistem nalazi u trenutku perturbacije će postati zanemarljive. Veliki višak kortizola treba da bude potrošen kako bi se ponovo uspostavio dinamički kontrolni mehanizam koji postoji u blizini superkritične Hopfove bifurkacione tačke. Zbog toga će vreme potrebno da se potroši višak kortizola biti direktno proporcionalno količini etanola koja je uneta u sistem, tj. količini dodatno proizvedenog kortizola, i fazna zavisnost odgovora HPA ose na akutne perturbacije velikim koncentracijama etanola neće biti uočena.

Prema tome, delovanje akutnih perturbacija HPA ose visokim koncentracijama etanola zavisi od količine unetog etanola i vremena koje je potrebno da se HPA osa vrati u prvobitno fiziološko stanje (Slike 38 i 50). Modeli razvijeni u ovom doktoratu predviđaju da oporavak HPA ose može trajati i nekoliko dana od trenutka uzimanja visokih doza etanola (Slika 38), što je u saglasnosti sa kliničkim istraživanjima koja su pokazala da se nivo kortozola nakon teškog opijanja vraća u normalu nakon približno nedelju dana apstinencije [185].

Matematičko modeliranje pokazuje da je povećanje nivoa kortizola odmah nakon druge doze etanola uporedivo manje od povećanja kortizola nakon prve doze etanola (Slika 30), što je konzistentno sa eksperimentalnim zapažanjima da izlaganje etanolu smanjuje sposobnost HPA ose da odgovori na sledeće uzimanje etanola [47, 49, 186]. Ovaj fenomen, poznat kao zaravnjen odgovor HPA ose, smatra se karakteristikom neuroendokrine tolerancije [187]. Matematičko modeliranje sugerise da se ovo odigrava na sledeći način: kad prva doza etanola poveća amplitudu unutardevnih oscilacija (Slika 30), osetljivost HPA ose na sledeće perturbacije se smanjuje. Zbog toga, perturbacija istog intenziteta ne može više da aktivira HPA osu u istoj meri u kojoj je to mogla prva, i kao posledica toga se može uočiti zaravnjen odgovor (Slika 30).

Matematičko modeliranje pokazuje da je globalna dinamika HPA ose različita u stanjima hronične alkoholisanosti različitog stepena (Slika 51). Pri normalnoj fiziologiji, u odsustvu alkohola, amplituda unutardnevnih oscilacija kortizola je uglavnom manja od amplitude cirkadijalnih oscilacija nivoa kortizola (Slika 25a), iako su uočena individualna odstupanja [178]. U stanjima hronične alkoholisanosti, kada je nivo etanola u krvi nizak (2 mM), amplituda unutardnevnih oscilacija je nešto veća nego u odsustvu alkohola, ali je još uvek manja od amplitude cirkadijalnih oscilacija (Slika 51).



Slika 51. Hronična izloženost etanolu menja dinamiku HPA ose. U numeričkim simulacijama koncentracija etanola je držana konstantnom na sledećim vrednostima: a) 2 mM, b) 10 mM, c) 40 mM, d) 150 mM, e) 180 mM, f) 200 mM. Numeričke simulacije su rađene na stehiometrijskom modelu koji sardži 34 reakcije.

Zbog toga što je jedinka otpornija na stres kada amplituda unutardnevnih oscilacija nije manja od fizioloških amplituda, i pošto etanol povećava amplitudu unutardnevnih oscilacija, ovo može biti razlog zbog čega se funkcionalni alkoholičari (osobe koje su zavisne od alkohola i redovno piju, ali to ne utiče na njihov svakodnevni život i izvršavanje obaveza) osećaju rasterećenije i funkcionišu bolje kada su konstantno pod uticajem niskih doza alkohola.

Kako se nivo hroničnog etanola povećava amplitude unutardnevnih oscilacija kortizola postaju mnogo veće, veće čak i od amplituda cirkadijalnih oscilacija (Slika 51). Međutim, ovo više nema zaštitnu ulogu jer je prag odgovora na stres sada previsok i odbrambeni mehanizmi neće biti aktivirani od strane stimulansa koji ih u uobičajenom slučaju aktiviraju. Dinamička stanja u slučajevima u kojima je prag za aktivaciju HPA ose previsok mogu biti povezana sa nesmotrenim ponašanjem, neodgovarajućom percepcijom opasnosti, što su tipične osobine uočene u ponašanju pijanih osoba [188].

Dalje povećanje nivoa hroničnog etanola (10 mM) dovodi do pojave haotičnih dinamičkih stanja, karakterisanih složenim promenama u amplitudama unutardnevnih oscilacija kortizola i, posledično, do očigledno nasumičnih promena u visini praga odgovora na stres od trenutka do trenutka (Slika 51). Iako ne postoje eksperimentalni dokazi, na osnovu rezultata numeričkih simulacija se može predložiti da haotična dinamička stanja, kada se amplituda unutardnevnih oscilacija nasumično menja, mogu biti povezana sa ponašanjem koje je od strane okoline primećeno kao nepredvidivo, ćudljivo, lakoumno ili nelogično [189].

Sa daljim povećanjem nivoa hroničnog etanola ($10 \text{ mM} < [\text{EtOH}] \leq 40 \text{ mM}$), amplituda unutardnevnih oscilacija kortizola još više raste, i unutardnevne oscilacije kortizola čija je amplituda uvećana su uočene tokom čitavog dana, čak i tokom noći (Slika 51). Još veće povećanje nivoa hroničnog etanola ($40 \text{ mM} < [\text{EtOH}] \leq 180 \text{ mM}$), dovodi do preokretanja promena veličine amplitude unutardnevnih oscilacija. One se sada smanjuju i cirkadijalni ritam je nadjačan (Slika 51). Ovakva dinamika HPA ose je u skladu sa simptomima kao što su iritabilnost, poremećaji spavanja, a koji su tipični za teške alkoholičare [188-190]. Koncentracije etanola veće od 150 mM su smrtonosne za većinu ljudi [190].

Konačno, dolazi do gubitka unutarnevne i cirkadijalne regulacije (Slika 51). Unutarnevne oscilacije više ne postoje, dok je maksimum cirkadijalne oscilacije oko ponoći, a minimum rano ujutru, što je upravo suprotno u odnosu na normalnu fiziologiju bez prisustva etanola. Kapacitet HPA ose da brzo i precizno prilagodi nivoe svojih hormona kao odgovor na spoljne stimulanse više ne postoji. Kvalitativne promene u dinamici HPA ose su uočene u modelima na koncentracijama etanola koje odgovaraju letalnim (smrtonosnim) dozama etanola (za većinu ljudi to su koncentracije etanola u krvi veće od 150 mM) [190].

Bifurkacioni dijagram (Slika 32) daje sažet prikaz kako se nivo kortizola menja pri hroničnom izlaganju etanolu, i u skladu je sa eksperimentalnim zapažanjima [191]. On pokazuje da visoki nivoi hroničnog etanola pomeraju sistem daleko od superkritične Hopfove bifurkacione tačke, i pokazuje da se dinamička stanja HPA ose menjaju sa porastom koncentracije hroničnog etanola. Ova dinamička stanja predstavljaju alosterična stanja, definisana kao stanja hroničnog odstupanja regulatornog sistema od njegovog normalnog (homeostatskog) nivoa [52, 192].

Na kraju, možemo napraviti uporedni prikaz osobina stehiometrijskih modela mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema koji su prikazani u ovoj disertaciji (Tabela 24).

Tabela 24. Usporedni prikaz najznačajnijih osobina, sličnosti i razlika modela mehanizma uticaja etanola na nelinearna dinamička stanja hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema koji su prikazani u ovoj disertaciji

	Stehiometrijski model sa 19 reakcija	Stehiometrijski model sa 26 reakcija	Stehiometrijski model sa 34 reakcije
Broj hemijskih vrsta u modelu	7	13	19
Uključuje proopiomelanokortin i njegove derivate	Ne	Da	Da
Steroidogeneza	Osnovni stupnjevi sinteze kortizola i aldosterona	Proširena uvođenjem pregnenolona i hidoksidpregnenolona i veza između njih i ostalih vrsta u modelu	Detaljno prikazana
Koncentracije svih hemijskih vrsta su u referentnom fiziološkom opsegu	Da, osim koncentracije ACTH koja je u modelu veća za tri reda veličine	Da	Da
Odgovor na akutne perturbacije etanolom tokom dana	Zavisi od faze unutardnevne oscilacije kortizola u kojoj se sistem nalazi u trenutku perturbacije	Isto	Isto

	Stehiometrijski model sa 19 reakcija	Stehiometrijski model sa 26 reakcija	Stehiometrijski model sa 34 reakcije
Odgovor na akutne perturbacije etanolom tokom noći	Za koncentracije etanola i početne uslove koje smo koristili ne zavisi od faze unutarodnevnne oscilacije kortizola u kojoj se sistem nalazi u trenutku perturbacije	Isto	Isto
Odgovor na hronične perturbacije etanolom	Sa povećanjem koncnetracije etanola kojom se sistem perturbuje, povećavaju se srednja koncentracija kortizola tokom dana, i frekvencija unutar dnevnih oscilacija kortizola	Isto	Isto
Postojanje testosterona u modelu (važno za ispitavanje uticaja testosterona na odziv HPA ose na etanol)	Ne	Ne	Da

	Stehiometrijski model sa 19 reakcija	Stehiometrijski model sa 26 reakcija	Stehiometrijski model sa 34 reakcije
Postojanje kortikosterona u modelu (važno za buduću upotrebu modela u smislu njegovog prilagođavanja za primenu na životinjama, u prvom redu glodarima) [193]	Ne	Ne	Da

Na ovom mestu, neophodno bi bilo i osvrnuti se na ograničenja matematičkog modeliranja dinamičkih biohemijskih sistema uopšte, kao i konkretno u slučaju modela predstavljenog u disertaciji. HPA osa je izuzetno složen nelinearan dinamički sistem. Sastoji se od velikog broja različitih konstituenata, različitih vrsta molekula (pre svega peptida (npr. peptidni hormoni CRH i ACTH), lipida (npr. holesterol i steroidni hormoni kortizol i aldosteron) i njihovih odgovarajućih proteinskih receptora) i različitih tipova ćelija (npr. različite vrste nervnih ćelija, epitelijalne i sekretorne ćelije.) koji međusobno interaguju i grade veoma složenu prostorno i vremenski isprepletenu dinamičku mrežu. U toj složenoj mreži procesa, molekuli proizvedeni od strane jedne vrste ćelija (npr. peptidni hormon CRH proizveden od strane neurona u hipotalamusu) se lokalnim krvnim sistemom transportuje do udaljenih delova mozga (npr. neurona u hipofizi) kako bi na njih izvršili uticaj i stimulisali ih da luče nove supstance (npr. peptidni hormon ACTH) koji se transportuje do drugih ćelija (npr. sekretornih ćelija u kori nadbubrežnih žlezda) i stimulišu ih da luče nove supstance (npr. steroidni hormon kortizol) koje regulišu brzinu nastajanja CRH. Na taj način se stvaraju zatvorene „petlje” interakcija ili „reakcioni putevi” kojima se ubrzavaju (pozitivna povratna sprega) ili usporavaju (negativna povratna sprega) procesi koji čine petlju i na taj način regulišu brzine kojima se odvijaju

biohemijski procesi unutar HPA ose. Na trenutnom nivou razvoja modela HPA ose prikazanog u ovoj disertaciji, razmatrano je samo linearno ili kvadratno povećavanje brzine reakcije sa povećanjem koncentracije reaktanata. U realnosti, brzine biohemijskih procesa su ograničene (bilo da se radi o enzimski kontrolisanim reakcijama ili o reakcijama izlučivanja koje zavise od stepena zaposednutosti receptora na površini ćelija koje proizvode određenu supstancu) što znači da će u određenom trenutku doći do postizanja maksimalne moguće brzine kojom se određeni procesi odvijaju.

Kao posledica formiranja mreže interakcija, HPA osa stiče kolektivne osobine, kao što je sposobnost samoorganizacije odnosno samoprilagođavanje njenih osnovnih dinamičkih promenljivih kako bi odgovorila na unutrašnje i spoljašnje signale u cilju ostajanja u okviru prihvatljivih granica sopstvene dinamičke strukture. Ovo svojstvo nije karakteristično za pojedinačne reakcione puteve, već je svojstveno celokupnom sistemu, i ne može se okarakterisati proučavanjem pojedinih delova sistema. Prilikom izrade matematičkih modela, ovu veliku kompleksnost zamenjujemo setom matematičkih jednačina koje mogu oponašati složene dinamičke osobine. Zato su svi matematički modeli kompleksnih biohemijskih sistema pojednostavljeni prikaz pravog sistema i stoga su ograničeni. Ovo takođe važi i za model prikazan u okviru ove disertacije, u kojem nije razmatran uticaj nekih molekula koji su važni za aktivnost HPA ose, kao što su arginin-vazopresin, angiotenzin II, adrenalin, dopamin, serotonin, itd. Osim toga, biosinteza CRH je ovde modelirana upotrebom kontinualne funkcije, sa brzinom koja se menja sa cirkadijalnim ritmom koji je predstavljen periodičnom funkcijom D , dok se u stvarnosti CRH neprekidno oslobađa, ali u diskretnim pulsevima nekoliko desetina puta tokom dana. Dok kontinualni deterministički modeli hemijske kinetike mogu dati rešenja koja se razlikuju od onih dobijenih modelima koji uzimaju u obzir inherentne fluktuacije koncentracije reaktanata, ta razlika postaje važna u uslovima koji uključuju nizak broj molekula (npr. $<1 \times 10^4$ molekula) ili u blizini bifurkacionih tačaka. Pod drugim uslovima, greške uzrokovane pretpostavljanjem kontinualnog raspona mogućih koncentracija su obično vrlo male, a i kontinualni i diskretni pristup daju ista makroskopska rešenja za stacionarna stanja. Dakle, kontinualni ulaz CRH, što je svakako pojednostavljenje, nije neutemeljen sve dok je prosečna koncentracija CRH u pulsirajućem CRH režimu ista kao u režimu kontinualnog protoka.

Još jedno važno ograničenje modela prikazanog u ovoj disertaciji je što se u jednom reakcionom koraku kombinuju mnogi složeni procesi. Ova sažetost, koja je nužni prvi korak pri proučavanju globalnog ponašanja HPA ose, mora bit razložena u slučajevima kada je potrebno detaljnije ispitati ulogu određenih procesa, kao što su uloga transkripcije i translacije gena, sinteza proteina, posttranslacijska modifikacija, međucelijska komunikacija, aktivan transport kroz plazmamembranu odgovarajućim prenosnicima, vezivanje za receptore itd. Konačno, važno je naglasiti da su sve reakcione vrste u ovom modelu tretirane kao da su prostorno homogene, što očigledno nije slučaj. Ovo pojednostavljenje je opravdano u prvoj aproksimaciji za trenutnu primenu modela, ali će biti potrebno uzeti u obzir diskretizaciju u prostoru ukoliko se npr. bude ispitivao doprinos različitih regija delova mozga na aktivnost HPA ose.

6. ZAKLJUČAK

Modeliranje mehanizma bioloških procesa je korisno oruđe za razumevanje i predviđanje ponašanja složenih bioloških sistema. U ovom doktoratu, korišćen je stehiometrijski pristup modeliranju kako bi se sažeto prikazali biološki procesi koji se nalaze u osnovi HPA ose i kako bi se predvideo odgovor HPA ose na etanol. Predloženi naučni pristup podrazumeva da su primenom osnovnih zakona hemijske kinetike i dinamike neravnotežnih procesa simulirane promene u koncentraciji kortizola u krvi i poremećaji u nivou kortizola nastali usled akutnog i hroničnog konzumiranja etanola. Predviđanja modela su upoređena sa empirijskim rezultatima dostupnim u literaturi kako bi se osiguralo da model kvalitativno replicira osobine realnog sistema. Naročito je važno to što ovi modeli predviđaju složene dnevne oscilacije holesterola, peptidnih i steroidnih hormona u krvi; simuliraju fazni pomak između ACTH i kortizola; oponašaju dvojako dejstvo kortizola koje se bazira na tome da kortizol može imati i stimulišući i inhibirajući efekat na sopstvenu proizvodnju. Takođe, ovi modeli omogućuju predviđanje odgovora HPA ose na neposrednu perturbaciju etanolom, kao i vreme oporavka nakon opijanja. Rezultati izloženi u ovom doktoratu pokazuju i da kada postoji dobra baza, odnosno dobar osnovni model koji opisuje biohemijske interakcije u nekom sistemu, on se može relativno lako proširiti i prilagoditi određenoj svrsi i na taj način opisati odgovor posmatranog sistema na spoljne i unutrašnje stimulacije.

Iako je postignuto kvantitativno slaganje sa eksperimentima, ne treba zanemariti činjenicu da predviđanja modela mehanizma uticaja etanola na HPA osu reflektuju osobine modela, a ne obavezno osobine realnog sistema. Uprkos ovim ograničenjima, koja su urođena i svim matematičkim modelima i modelima mehanizama, stehiometrijski pristup modeliranju predstavlja važan korak napred ka razumevanju celokupnog odgovora HPA ose na stimulaciju etanolom. Uzevši u obzir visoki stepen slaganja između predviđanja modela i realnih eksperimenata koji je postignut, stehiometrijski modeli mogu biti koristan alat za kreiranje eksperimentalnih protokola, verifikaciju eksperimentalnih rezultata i za ispitivanje obrnutog prelaska (prelaska iz alkoholizma u apstinenciju) kako bi se ispitala dinamika HPA ose tokom alkoholne apstinencije.

Model HPA ose koji je razvijen i ispitivan u ovoj disertaciji, kao i matematički modeli bilo kog dinamičkog biohemijskog sistema, neminovno je aproksimacija realnog sistema. Matematički modeli se uvek temelje na našem trenutnom razumevanju problema i postojećim eksperimentalnim podacima. Međutim, nove tehnologije s poboljšanom osetljivošću, mogu pružiti dragocene nove podatke. Kada se dobiju nove eksperimentalne činjenice, potrebno je ponovno ispitati može li postojeći matematički model uspešno objasniti nova zapažanja ili ne, i na osnovu ishoda, odlučiti da li model treba poboljšati ili odbaciti. U tom smislu, matematičko modeliranje treba smatrati iterativnim procesom koji se naizmenično kreće od eksperimentalnih merenja ka numeričkim simulacijama i nazad.

7. LITERATURA

1. Kolar-Anić Lj, Čupić Ž, Vukojević V, Anić S. Dinamika nelinearnih procesa. Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd. 2011.
2. Anić S, Stanisavljev D, Vukelić N. Izabrana poglavlja fizičke hemije. Fakultet za fizičku hemiju; 2007.
3. Kolar-Anić Lj, Anić S, Čupić Ž, Ivanović-Šašić A, Pejić N, Blagojević S, Vukojević V. Oscillating Reactions, in Encyclopedia of Physical Organic Chemistry. Zerong Wang (Editor), Uta Wille (Associate Editor), Eusebio Juaristi (Associate Editor). Volume 2, Part 2 Organic Reactions and Mechanisms. 2017: 1127-1222.
4. Chance B, Estabrook RW, Ghosh A. Damped sinusoidal oscillations of cytoplasmic reduced pyridine nucleotide in yeast cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1964 Jun 1;51(6):1244-51.
5. Sinjuhin M, Penčić M. Elektrofiziološka karakteristika reakcije biljne ćelije na materije visoke biološke aktivnosti. Zemljište i biljka. 1964. 4:99.
6. Кольс ОР, Максимов ГВ, Раденович ЧН. Биофизика ритмического возбуждения, Издательство Московского университета. Москва. 1993.
7. Goldbeter A. Biochemical oscillations and cellular rhythms. Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms, by Albert Goldbeter, Foreword by MJ Berridge, Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997.
8. Čupić ŽD. Modeliranje mehanizma oscilatornih katalitičkih procesa, sa primenom na reakciju razlaganja vodonikperoksida. Doktorska teza, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1998.
9. Felig P, Frohman LA. Endocrinology and metabolism (4th edn.). McGraw-Hill, New York, 2001.
10. Jelić SŽ. Modelovanje uticaja stresa na dinamiku hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema. Doktorska teza, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2012.
11. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija, 11. izdanje. Savremena administracija, Beograd, 2008.
12. Baker ME. Co-evolution of steroidogenic and steroid-inactivating enzymes and adrenal and sex steroid receptors. Molecular and cellular endocrinology. 2004 Feb 27;215(1):55-62.

13. Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004 Mar 31;217(1):203-12.
14. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease 1. *Endocrine reviews*. 1998 Jun 1;19(3):269-301.
15. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*. 2002 Oct 31;53(4):865-71.
16. Vojnović Milutinović D. Analiza funkcije i ekspresije glukokortikoidnog receptora kod žena obolelih od sindroma policističnih jajnika. Doktorska teza, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2010.
17. DeRijk RH, Schaaf M, De Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2002 Jun 30;81(2):103-22.
18. Marković VM. Modeliranje dinamičkih stanja hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema i koncentracije kortizola. Doktorska teza, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2013.
19. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj. Mathematical modeling of the hypothalamic–pituitary–adrenal system activity. *Mathematical biosciences*. 2005 Oct 31;197(2):173-87.
20. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj. Modelling of the hypothalamic–pituitary–adrenal system activity based on the stoichiometric analysis. *New Research on Neurosecretory Systems*. 2008:225-45.
21. Russell GM, Henley DE, Leendertz J, Douthwaite JA, Wood SA, Stevens A, Woltersdorf WW, Peeters BW, Ruigt GS, White A, Veldhuis JD. Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic–pituitary–adrenal ultradian activity in healthy males. *Journal of Neuroscience*. 2010 Apr 28;30(17):6106-15.
22. Fehm HL, Voigt KH, Kummer G, Lang R, Pfeiffer EF. Differential and integral corticosteroid feedback effects on ACTH secretion in hypoadrenocorticism. *Journal of Clinical Investigation*. 1979 Feb;63(2):247.
23. Dallman MF. Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2005 Dec 31;26(3):103-8.
24. Papaikonomou E. Rat adrenocortical dynamics. *The Journal of Physiology*. 1977 Feb;265(1):119.

25. Schulkin J, Gold PW, McEwen BS. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology*. 1998 Apr 30;23(3):219-43.
26. Kellendonk C, Gass P, Kretz O, Schütz G, Tronche F. Corticosteroid receptors in the brain: gene targeting studies. *Brain research bulletin*. 2002 Jan 1;57(1):73-83.
27. Sekula LK, Lucke JF, Heist EK, Czambel RK, Rubin RT. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression XV: mathematical modeling of nocturnal melatonin secretion in major depressives and normal controls. *Psychiatry research*. 1997 Mar 24;69(2):143-53.
28. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 2000 Sep 29;289(5488):2344-7.
29. Dijk DJ, Lockley SW. Invited Review: Integration of human sleep-wake regulation and circadian rhythmicity. *Journal of applied physiology*. 2002 Feb 1;92(2):852-62.
30. Cermakian N, Boivin DB. A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. *Brain Research Reviews*. 2003 Jun 30;42(3):204-20.
31. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *Journal of Endocrinology*. 2009 Jan 1;200(1):3-22.
32. Nicolson NA. Measurement of cortisol. *Handbook of physiological research methods in health psychology*. 2008;1:37-74.
33. Miller WL, Chrousos GP. The Adrenal Cortex. *Endocrinology & Metabolism* (Felig P, Frohman L, eds), McGraw-Hill, New York. 2001; 387-524.
34. Waite EJ, McKenna M, Kershaw Y, Walker JJ, Cho K, Piggins HD, Lightman SL. Ultradian corticosterone secretion is maintained in the absence of circadian cues. *European Journal of Neuroscience*. 2012 Oct 1;36(8):3142-50.
35. Hartmann A, Veldhuis JD, Deuschle M, Standhardt H, Heuser I. Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiology of aging*. 1997 Jun 30;18(3):285-9.
36. Gavrilu A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003 Jun 1;88(6):2838-43.

37. Henley DE, Leendertz JA, Russell GM, Wood SA, Taheri S, Woltersdorf WW, Lightman SL. Development of an automated blood sampling system for use in humans. *Journal of medical engineering & technology*. 2009 Jan 1;33(3):199-208.
38. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Johnson ML, Lizarralde G. Amplitude, but not frequency, modulation of adrenocorticotropin secretory bursts gives rise to the nyctohemeral rhythm of the corticotropic axis in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1990 Aug;71(2):452-63.
39. Engler D, Pham TH, Fullerton MJ, Ooi G, Funder JW, Clarke IJ. Studies of the secretion of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. *Neuroendocrinology*. 1989 Jul 1;49(4):367-81.
40. Calogero AE, Norton JA, Sheppard BC, Listwak SJ, Cromack DT, Wall R, Jensen RT, Chrousos GP. Pulsatile activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during major surgery. *Metabolism*. 1992 Aug 31;41(8):839-45.
41. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 2000 Sep 29;289(5488):2344-7.
42. Marković I, Isaković A. Energetski metabolizam. Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu. Beograd. 2008.
43. Lieberman M, Marks AD, Smith C. Marksove osnove medicinske biohemije: Klinički pristup. Data status. Beograd. 2008.
44. Rachdaoui N, Sarkar DK. Effects of alcohol on the endocrine system. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2013 Sep 30;42(3):593-615.
45. Wynne O, Sarkar DK. Stress and Neuroendocrine–Immune Interaction: A Therapeutic Role for β -endorphin. *The Wiley-Blackwell handbook of psychoneuroimmunology*. 2013:198-211.
46. Stephens MA, Wand G. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Research-Current Reviews*. 2012 Dec 22;34(4):468.
47. Richardson HN, Lee SY, O'Dell LE, Koob GF, Rivier CL. Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. *European Journal of Neuroscience*. 2008 Oct 1;28(8):1641-53.

48. Waltman C, Blevins Jr LS, Boyd G, Wand GS. The effects of mild ethanol intoxication on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in nonalcoholic men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1993 Aug;77(2):518-22.
49. King A, Munisamy G, de Wit H, Lin S. Attenuated cortisol response to alcohol in heavy social drinkers. *International journal of psychophysiology*. 2006 Mar 31;59(3):203-9.
50. Adinoff B, Iranmanesh A, Veldhuis J, Fisher L. Disturbances of the stress response: The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during alcohol withdrawal and abstinence. *Alcohol Research and Health*. 1998 Jan 1;22(1):67.
51. Wand GS, Dobs AS. Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in actively drinking alcoholics. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1991 Jun;72(6):1290-5.
52. Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Feb 1;24(2):97-129.
53. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*. 2007 Jul 1;87(3):873-904.
54. Wand G. The influence of stress on the transition from drug use to addiction. *Alcohol Research & Health*. 2008 Mar 22;31(2):119-37.
55. Rivier C, Lee S. Acute alcohol administration stimulates the activity of hypothalamic neurons that express corticotropin-releasing factor and vasopressin. *Brain research*. 1996 Jul 8;726(1):1-0.
56. Rivier CA, Bruhn TH, Vale WY. Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1984 Apr 1;229(1):127-31.
57. Ogilvie KM, Lee S, Rivier C. Role of arginine vasopressin and corticotropin-releasing factor in mediating alcohol-induced adrenocorticotropin and vasopressin secretion in male rats bearing lesions of the paraventricular nuclei. *Brain research*. 1997 Jan 2;744(1):83-95.
58. Jenkins JS, Connolly J. Adrenocortical response to ethanol in man. *British medical journal*. 1968 Jun 29;2(5608):804.
59. Thayer JF, Hall M, Sollers JJ, Fischer JE. Alcohol use, urinary cortisol, and heart rate variability in apparently healthy men: Evidence for impaired inhibitory control of the HPA axis in heavy drinkers. *International Journal of Psychophysiology*. 2006 Mar 31;59(3):244-50.

60. Richardson HN, Lee SY, O'Dell LE, Koob GF, Rivier CL. Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. *European Journal of Neuroscience*. 2008 Oct 1;28(8):1641-53.
61. Rasmussen DD, Boldt BM, Bryant CA, Mitton DR, Larsen SA, Wilkinson CW. Chronic Daily Ethanol and Withdrawal: 1. Long-Term Changes in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2000 Dec 1;24(12):1836-49.
62. Sarnyai Z, Shaham Y, Heinrichs SC. The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacological reviews*. 2001 Jun 1;53(2):209-44.
63. Olive FM, Mehmert KK, Koenig HN, Camarini R, Kim JA, Nannini MA, Ou CJ, Hodge CW. A role for corticotropin releasing factor (CRF) in ethanol consumption, sensitivity, and reward as revealed by CRF-deficient mice. *Psychopharmacology*. 2003 Jan 18;165(2):181-7.
64. Barr CS, Dvoskin RL, Gupte M, Sommer W, Sun H, Schwandt ML, Lindell SG, Kasckow JW, Suomi SJ, Goldman D, Higley JD. Functional CRH variation increases stress-induced alcohol consumption in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Aug 25;106(34):14593-8.
65. Sillaber I, Rammes G, Zimmermann S, Mahal B, Zieglgänsberger W, Wurst W, Holsboer F, Spanagel R. Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. *Science*. 2002 May 3;296(5569):931-3.
66. Hölter SM, Danysz W, Spanagel R. Novel Uncompetitive N-Methyl-d-Aspartate (NMDA)-Receptor Antagonist MRZ 2/579 Suppresses Ethanol Intake in Long-Term Ethanol-Experienced Rats and Generalizes to Ethanol Cue in Drug Discrimination Procedure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000 Feb 1;292(2):545-52.
67. Koob GF. Brain stress systems in the amygdala and addiction. *Brain research*. 2009 Oct 1;1293:61-75.
68. Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 1997 Oct 3;278(5335):52-8.
69. Krishnan S, Maickel RP. The effect of Hoe-427 (an ACTH 4–9 analog) on free-choice ethanol consumption in male and female rats. *Life sciences*. 1991 Dec 31;49(26):2005-11.

70. Fahlke C, Eriksson CP. Effect of adrenalectomy and exposure to corticosterone on alcohol intake in alcohol-preferring and alcohol-avoiding rat lines. *Alcohol and Alcoholism*. 2000 Mar 1;35(2):139-44.
71. Fahlke C, Hansen S. Effect of local intracerebral corticosterone implants on alcohol intake in the rat. *Alcohol and Alcoholism*. 1999 Nov 1;34(6):851-61.
72. Oswald LM, Wand GS. Opioids and alcoholism. *Physiology & behavior*. 2004 Apr 30;81(2):339-58.
73. Calogero AE. Neurotransmitter Regulation of the Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone Neuron. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995 Dec 1;771(1):31-40.
74. Wand GS, Mangold D, Ali M, Giggey P. Adrenocortical responses and family history of alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1999 Jul 1;23(7):1185-90.
75. Schuckit MA. Subjective responses to alcohol in sons of alcoholics and control subjects. *Archives of General Psychiatry*. 1984 Sep 1;41(9):879-84.
76. Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikström AC, Gustafsson JÅ, Fuxe K. Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1994 Oct 31;62(3):843-97.
77. Fahlke C, Hård E, Thomasson R, Engel JA, Hansen S. Metyrapone-induced suppression of corticosterone synthesis reduces ethanol consumption in high-preferring rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1994 Aug 31;48(4):977-81.
78. Gianoulakis C. Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *Journal of psychiatry & neuroscience*. 2001 Sep.
79. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics*. 2006 Oct 15;15(suppl 2):R271-7.
80. Sarkar DK. Circadian genes, the stress axis, and alcoholism. *Alcohol Research-Current Reviews*. 2011 Dec;34(3):362.
81. Perreau-Lenz S, Zghoul T, Spanagel R. Clock genes running amok. *EMBO reports*. 2007 Jul 2;8(1S):S20-3.
82. Chen CP, Kuhn P, Advis JP, Sarkar DK. Chronic ethanol consumption impairs the circadian rhythm of pro-opiomelanocortin and period genes mRNA

- expression in the hypothalamus of the male rat. *Journal of neurochemistry*. 2004 Mar 1;88(6):1547-54.
83. Brady KT, Sonne SC. The role of stress in alcohol use, alcoholism treatment, and relapse. *Alcohol Research & Health*. 1999 Dec 22;23(4):263-.
84. Young ME. Anticipating anticipation: pursuing identification of cardiomyocyte circadian clock function. *Journal of Applied Physiology*. 2009 Oct 1;107(4):1339-47.
85. Blomeyer D, Buchmann AF, Lascorz J, Zimmermann US, Esser G, Desrivieres S, Schmidt MH, Banaschewski T, Schumann G, Laucht M. Association of PER2 genotype and stressful life events with alcohol drinking in young adults. *PloS one*. 2013 Mar 22;8(3):e59136.
86. Wang X, Mozhui K, Li Z, Mulligan MK, Ingels JF, Zhou X, Hori RT, Chen H, Cook MN, Williams RW, Lu L. A promoter polymorphism in the Per3 gene is associated with alcohol and stress response. *Translational psychiatry*. 2012 Jan 1;2(1):e73.
87. Spanagel R, Pendyala G, Abarca C, Zghoul T, Sanchis-Segura C, Magnone MC, Lascorz J, Depner M, Holzberg D, Soyka M, Schreiber S. The clock gene Per2 influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nature medicine*. 2005 Jan 1;11(1):35-42.
88. Logan RW, Sarkar DK. Circadian nature of immune function. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012 Feb 5;349(1):82-90.
89. Logan RW, Zhang C, Murugan S, O'Connell S, Levitt D, Rosenwasser AM, Sarkar DK. Chronic shift-lag alters the circadian clock of NK cells and promotes lung cancer growth in rats. *The Journal of Immunology*. 2012 Mar 15;188(6):2583-91.
90. Bairagi N, Chatterjee S, Chattopadhyay J. Variability in the secretion of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and cortisol and understandability of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis dynamics—a mathematical study based on clinical evidence. *Mathematical Medicine and Biology*. 2008 Mar 14.
91. Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2010 Jun 7;277(1688):1627-33.

92. Vinther F, Andersen M, Ottesen JT. The minimal model of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Journal of mathematical biology*. 2011 Oct 1;63(4):663-90.
93. Andersen M, Vinther F, Ottesen JT. Mathematical modeling of the hypothalamic–pituitary–adrenal gland (HPA) axis, including hippocampal mechanisms. *Mathematical Biosciences*. 2013 Nov 30;246(1):122-38.
94. Postnova S, Fulcher R, Braun HA, Robinson PA. A minimal physiologically based model of the HPA axis under influence of the sleep-wake cycles. *Pharmacopsychiatry*. 2013 May;46(S 01):S36-43.
95. Gudmand-Hoeyer J, Timmermann S, Ottesen JT. Patient-specific modeling of the neuroendocrine HPA-axis and its relation to depression: Ultradian and circadian oscillations. *Mathematical biosciences*. 2014 Nov 30;257:23-32.
96. Stanojević A. Promene dinamičkih stanja nelinearnog hipotalamo-hipofizno-adrenalnog sistema izazvane promenama koncentracije holesterola: matematičko modeliranje i numeričke simulacije. Master rad, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2014.
97. Gonzalez-Heydrich J, Steingard RJ, Putnam F, Beardslee W, Kohane IS. Using ‘off the shelf’, computer programs to mine additional insights from published data: diurnal variation in potency of ACTH stimulation of cortisol secretion revealed. *Computer methods and programs in biomedicine*. 1999 Mar 31;58(3):227-38.
98. Chakraborty A, Krzyzanski W, Jusko WJ. Mathematical modeling of circadian cortisol concentrations using indirect response models: comparison of several methods. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 1999 Feb 1;27(1):23-43.
99. Dokoumetzidis A, Iliadis A, Macheras P. Nonlinear dynamics in clinical pharmacology: the paradigm of cortisol secretion and suppression. *British journal of clinical pharmacology*. 2002 Jul 1;54(1):21-9.
100. Peters A, Conrad M, Hubold C, Schweiger U, Fischer B, Fehm HL. The principle of homeostasis in the hypothalamus-pituitary-adrenal system: new insight from positive feedback. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007 Jul 1;293(1):R83-98.
101. Conrad M, Hubold C, Fischer B, Peters A. Modeling the hypothalamus–pituitary–adrenal system: homeostasis by interacting positive and negative feedback. *Journal of biological physics*. 2009 May 1;35(2):149-62.

102. Lenbury Y, Pacheenburawana P. Modelling fluctuation phenomena in the plasma cortisol secretion system in normal man. *Biosystems*. 1991 Jan 1;26(2):117-25.
103. Gonzalez-Heydrich J, Steingard RJ, Kohane I. A computer simulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Eighteenth Annual Proceedings of the Symposium for Computer Applications in Medical Care (SCAMC)*. 1994; 1010.
104. Savić D, Jelić S. A mathematical model of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system and its stability analysis. *Chaos, Solitons & Fractals*. 2005 Oct 31;26(2):427-36.
105. Savić D, Jelić S. A Theoretical Study of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis Dynamics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005 Jun 1;1048(1):430-2.
106. Bairagi N, Chatterjee S, Chattopadhyay J. Variability in the secretion of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin hormone and cortisol and understandability of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis dynamics—a mathematical study based on clinical evidence. *Mathematical Medicine and Biology*. 2008 Mar 14.
107. McAuley MT, Kenny RA, Kirkwood TB, Wilkinson DJ, Jones JJ, Miller VM. A mathematical model of aging-related and cortisol induced hippocampal dysfunction. *BMC neuroscience*. 2009 Mar 25;10(1):26.
108. Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2010 Jun 7;277(1688):1627-33.
109. Gupta S, Aslakson E, Gurbaxani BM, Vernon SD. Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals bistability. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 2007 Feb 14;4(1):8.
110. Sriram K, Rodriguez-Fernandez M, Doyle III FJ. Modeling cortisol dynamics in the neuro-endocrine axis distinguishes normal, depression, and post-traumatic stress disorder (PTSD) in humans. *PLoS Comput Biol*. 2012 Feb 16;8(2):e1002379.
111. Yi-Wei L, Zhi-Hong H, Peng JH, Liu BZ. A dynamical model for the pulsatile secretion of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Mathematical and computer modelling*. 1999 Feb 1;29(4):103-10.
112. Kyrlyov V, Severyanova LA, Vieira A. Modeling robust oscillatory behavior of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *IEEE transactions on biomedical engineering*. 2005 Dec;52(12):1977-83.

113. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj, Vukojević V. Predictive Modeling of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Function. Dynamic Systems Theory Approach by Stoichiometric Network Analysis and Quenching Small Amplitude Oscillations. *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation*. 2009 Nov 1;10(11-12):1451-72.
114. Marković VM, Čupić Ž, Ivanović A, Kolar-Anić L. The stability of the extended model of hypothalamic-pituitary-adrenal axis examined by stoichiometric network analysis. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2011 Dec 1;85(13):2327-35.
115. Dempsher DP, Gann DS, Phair RD. A mechanistic model of ACTH-stimulated cortisol secretion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1984 Apr 1;246(4):R587-96.
116. Meyer-Hermann M, Figge MT, Straub RH. Mathematical modeling of the circadian rhythm of key neuroendocrine-immune system players in rheumatoid arthritis: A systems biology approach. *Arthritis & Rheumatism*. 2009 Sep 1;60(9):2585-94.
117. Breen MS, Breen M, Terasaki N, Yamazaki M, Conolly RB. Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: model development for metyrapone. *Environmental health perspectives*. 2010 Feb 1;118(2):265.
118. Breen M, Breen MS, Terasaki N, Yamazaki M, Lloyd AL, Conolly RB. Mechanistic computational model of steroidogenesis in H295R cells: role of oxysterols and cell proliferation to improve predictability of biochemical response to endocrine active chemical-metyrapone. *Toxicological Sciences*. 2011 Jul 1; 123:80-93.
119. Marković, VM, Maćešić S, Damjanović S, Kolar-Anić Lj. Inclusion of cholesterol in hypothalamic-pituitary-adrenal axis stoichiometric model. In *Physical Chemistry* (Anić S, Čupić Ž. eds), Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade. 2012; 264-266.
120. Marković V, Stanojević A, Čupić Ž, Vukojević V, Kolar-Anić Lj. Dynamic states of cortisol in function of cholesterol concentration. 4th International Congress of Serbian Society of Mechanics, Vrnjačka Banja, Serbia, The Book of Abstracts. 2013; 889-894.
121. Stanojević A, Marković VM, Maćešić S, Vukojević V, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj. Bifurcation analysis of HPA axis dynamic states under cholesterol regulation,

- Theoretical Approaches to BioInformation Systems - TABIS 2013, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts. 2013; 30.
122. Gear CW. Numerical initial value problems in ordinary differential equations. Prentice Hall PTR; 1971 Aug 1.
 123. Marković VM, Čupić Ž, Maćešić S, Stanojević A, Vukojević V, Kolar-Anić Lj. Modelling cholesterol effects on the dynamics of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Mathematical Medicine and Biology*. 2016; 33: 1-28.
 124. Čupić Ž, Marković VM, Maćešić S, Stanojević A, Damjanović S, Vukojević V, Kolar-Anić Lj. Dynamic transitions in a model of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*. 2016 Mar;26(3):033111.
 125. Jelić S, Čupić Ž, Kolar-Anić Lj. Modelling of the hypothalamic–pituitary–adrenal system activity based on the stoichiometric analysis. *New Research on Neurosecretory Systems*. 2008:225-45.
 126. Marković VM, Čupić Z, Vukojević V, Kolar-Anić Lj. Predictive modeling of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis response to acute and chronic stress. *Endocrine journal*. 2011;58(10):889-904.
 127. Stanojević A, Marković VM, Čupić Ž, Vukojević V, Kolar-Anić Lj. Modelling of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations by externally induced cholesterol pulses of finite duration and with asymmetrically distributed concentration profile. *Russian Journal of Physical Chemistry A* (2017), 91(13), 112–119. DOI: 10.1134/S0036024417130027.
 128. Djoussé L, Gaziano JM. Dietary cholesterol and coronary artery disease: a systematic review. *Current atherosclerosis reports*. 2009 Nov 1;11(6):418.
 129. Clarke R, Frost C, Collins R, Appleby P, Peto R. Dietary lipids and blood cholesterol: quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. *Bmj*. 1997 Jan 11;314(7074):112.
 130. Howell WH, McNamara DJ, Tosca MA, Smith BT, Gaines JA. Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 1997 Jun 1;65(6):1747-64.
 131. McNamara DJ. The impact of egg limitations on coronary heart disease risk: do the numbers add up?. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000 Oct 1;19(sup5):540S-8S.
 132. Seimon RV, Hostland N, Silveira SL, Gibson AA, Sainsbury A. Effects of energy restriction on activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in obese humans

- and rodents: implications for diet-induced changes in body composition. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2013 Sep 1;15(2):71-80.
133. Alphonse PA, Jones PJ. Revisiting human cholesterol synthesis and absorption: the reciprocity paradigm and its key regulators. *Lipids*. 2016 May 1;51(5):519-36.
 134. Morgan AE, Mooney KM, Wilkinson SJ, Pickles NA, Mc Auley MT. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing research reviews*. 2016 May 31;27:108-24.
 135. Davies JT, Delfino SF, Feinberg CE, Johnson MF, Nappi VL, Olinger JT, Schwab AP, Swanson HI. Current and Emerging Uses of Statins in Clinical Therapeutics: A Review. *Lipid insights*. 2016;9:13.
 136. DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell research*. 2008 Jun 1;18(6):609-21.
 137. Lu K, Lee MH, Patel SB. Dietary cholesterol absorption; more than just bile. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2001 Sep 1;12(7):314-20.
 138. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & metabolism*. 2010 Jun 1;7(1):47.
 139. Rouillé Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G, Oliva AA, Chan SJ, Steiner DF. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in neuroendocrinology*. 1995 Oct 31;16(4):322-61.
 140. Pritchard LE, Turnbull AV, White A. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *Journal of Endocrinology*. 2002 Mar 1;172(3):411-21.
 141. Watson SJ, Kelsey JE, Lopez JF, Akil H. Neuropeptide biology: Basic and clinical lessons from the opioids. In *American Psychiatric Association Annual Review* 1985 Feb 1 (Vol. 4, pp. 83-96). American Psychiatric Press Washington, DC.
 142. Gallo-Payet N, Payet MD. Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microscopy research and technique*. 2003 Jun 15;61(3):275-87.
 143. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*. 2010 Nov 4;32(1):81-151.
 144. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013 Oct 15;379(1):62-73.

145. Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *European Journal of Endocrinology*. 2001 Mar 1;144(3):199-206.
146. Sewer MB, Waterman MR. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microscopy research and technique*. 2003 Jun 15;61(3):300-7.
147. Schulkin J, Gold PW, McEwen BS. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology*. 1998 Apr 30;23(3):219-43.
148. Makino S, Hashimoto K, Gold PW. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002 Aug 31;73(1):147-58.
149. Kellendonk C, Gass P, Kretz O, Schütz G, Tronche F. Corticosteroid receptors in the brain: gene targeting studies. *Brain research bulletin*. 2002 Jan 1;57(1):73-83.
150. Felig P, Baxter JD, Frohman LA. *Endocrinology and Metabolism*. New York: McGraw-Hill. 1995.
151. Dallman MF, Yates FE. Dynamic asymmetries in the corticosteroid feedback path and distribution-metabolism-binding elements of the adrenocortical system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1969 Apr 1;156(2):696-721.
152. Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine reviews*. 1984 Jan;5(1):1-24.
153. Castro M, Moreira AC. Regulation of corticotropin-releasing hormone secretion by ACTH at different times after adrenalectomy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...*[et al.]. 1996 Nov;29(11):1573-8.
154. Rivier CA, Bruhn TH, Vale WY. Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1984 Apr 1;229(1):127-31.
155. De Waele JP, Gianoulakis C. Effects of single and repeated exposures to ethanol on hypothalamic β -endorphin and CRH release by the C57BL/6 and DBA/2 strains of mice. *Neuroendocrinology*. 1993 Jul 1;57(4):700-9.
156. Rivier C. Alcohol stimulates ACTH secretion in the rat: mechanisms of action and interactions with other stimuli. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1996 Apr 1;20(2):240-54.

157. Frias J, Torres JM, Miranda MT, Ruiz E, Ortega E. Effects of acute alcohol intoxication on pituitary–gonadal axis hormones, pituitary–adrenal axis hormones, β -endorphin and prolactin in human adults of both sexes. *Alcohol and Alcoholism*. 2002 Mar 1;37(2):169-73.
158. Salaspuro MP, Lieber CS. Non-uniformity of blood ethanol elimination: its exaggeration after chronic consumption. *Annals of clinical research*. 1978 Oct;10(5):294-7.
159. Rangno RE, Kreeft JH, Sitar DS. Ethanol ‘dose-dependent’ elimination: Michaelis-Menten v classical kinetic analysis. *British journal of clinical pharmacology*. 1981 Nov 1;12(5):667-73.
160. Lands WE. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*. 1998 Feb 28;15(2):147-60.
161. Cobb CF, Thiel DH. Mechanism of Ethanol-Induced Adrenal Stimulation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1982 Mar 1;6(2):202-6.
162. Nishiyama T. Serum testosterone levels after medical or surgical androgen deprivation: a comprehensive review of the literature. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2014 Jan 31 (Vol. 32, No. 1, pp. 38-e17). Elsevier.
163. Hassard BD, Kazarinoff ND, Wan YH. Theory and applications of Hopf bifurcation. *CUP Archive*; 1981 Feb 27.
164. Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK. Research advances in ethanol metabolism. *Pathologie Biologie*. 2001 Jan 1;49(9):676-82.
165. Čupić Ž, Stanojević A, Marković VM, Kolar-Anić L, Terenius L, Vukojević V. The HPA axis and ethanol: a synthesis of mathematical modelling and experimental observations. *Addiction biology*. 2016 Jan 1. doi:10.1111/adb.12409.
166. Kassi EN, Chrousos GP. The central CLOCK system and the stress axis in health and disease. *Hormones*. 2013 Apr 1;12:172-91.
167. Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biological psychology*. 2005 Apr 30;69(1):113-32.
168. Goel N, Workman JL, Lee TT, Innala L, Viau V. Sex differences in the HPA axis. *Comprehensive Physiology*. 2014 Jul 1.
169. Davis S, Wakley AA, Yap P, Pham C, Kiester C, Selvage DJ. Sex differences in alcohol-induced HPA activation following systemic vs icv administration in rats:

- Neuronal activation studies. *The FASEB Journal*. 2016 Apr 1;30(1 Supplement):1265-4.
170. Wakley A, Davis S, Yap P, Pham C, Selvage DJ. Sex differences in alcohol-induced HPA activation following systemic vs icv administration in rats: Gene expression studies. *The FASEB Journal*. 2016 Apr 1;30(1 Supplement):704-3.
 171. Carnes M, Kalin NH, Lent SJ, Barksdale CM, Brownfield MS. Pulsatile ACTH secretion: variation with time of day and relationship to cortisol. *Peptides*. 1988 Apr 30;9(2):325-31.
 172. Gronfier C, Brandenberger G. Ultradian rhythms in pituitary and adrenal hormones: their relations to sleep. *Sleep medicine reviews*. 1998 Feb 28;2(1):17-29.
 173. Charloux A, Gronfier C, Lonsdorfer-Wolf E, Piquard F, Brandenberger G. Aldosterone release during the sleep-wake cycle in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1999 Jan 1;276(1):E43-9.
 174. Schulz P, Curtin F, Steimer T. Individuality and stability of nocturnal secretion patterns for eight hormones in healthy young men. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2007 Sep;9(3):343.
 175. Beaven CM, Ingram JR, Gill ND, Hopkins WG. Ultradian rhythmicity and induced changes in salivary testosterone. *European journal of applied physiology*. 2010 Sep 1;110(2):405-13.
 176. Lightman SL, Conway-Campbell BL. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2010 Oct 1;11(10):710-8.
 177. Conway-Campbell BL, Pooley JR, Hager GL, Lightman SL. Molecular dynamics of ultradian glucocorticoid receptor action. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012 Jan 30;348(2):383-93.
 178. Bhake RC, Leendertz JA, Linthorst AC, Lightman SL. Automated 24-hours sampling of subcutaneous tissue free cortisol in humans. *Journal of medical engineering & technology*. 2013 Apr 1;37(3):180-4.
 179. Tahara Y, Huang Z, Kiritoshi T, Onodera T, Toko K. Development of indirect competitive immuno-assay method using SPR detection for rapid and highly sensitive measurement of salivary cortisol levels. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2014;2.
 180. Jenkins JS, Connolly J. Adrenocortical response to ethanol in man. *British medical journal*. 1968 Jun 29;2(5608):804.

181. Inder WJ, Joyce PR, Wells JE, Evans MJ, Ellis MJ, Mattioli L, Donald RA. The acute effects of oral ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in normal human subjects. *Clinical endocrinology*. 1995 Jan 1;42(1):65-71.
182. Kudielka BM, Hellhammer DH, Wüst S. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Jan 31;34(1):2-18.
183. Spanagel R, Noori HR, Heilig M. Stress and alcohol interactions: animal studies and clinical significance. *Trends in neurosciences*. 2014 Apr 30;37(4):219-27.
184. Zhou Y, Kreek MJ. Alcohol: a stimulant activating brain stress responsive systems with persistent neuroadaptation. *Neuropharmacology*. 2014 Dec 31;87:51-8.
185. Ravitz B, Nutt J. Disturbances of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Functioning During Ethanol Withdrawal in Six Men. *Am J Psychiatry*. 1991 Aug 8;148(8):1023.
186. Lee S, Rivier C. An initial, three-day-long treatment with alcohol induces a long-lasting phenomenon of selective tolerance in the activity of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroscience*. 1997 Nov 15;17(22):8856-66.
187. Ogilvie K, Lee S, Rivier C. Effect of Three Different Modes of Alcohol Administration on the Activity of the Rat Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1997 May 1;21(3):467-76.
188. Escobar-Córdoba F, Ávila-Cadavid JD, Cote-Menendez M. Complaints of insomnia in hospitalized alcoholics. *Revista brasileira de psiquiatria*. 2009 Sep;31(3):261-4.
189. Seggio JA, Fixaris MC, Reed JD, Logan RW, Rosenwasser AM. Chronic ethanol intake alters circadian phase shifting and free-running period in mice. *Journal of Biological Rhythms*. 2009 Aug 1;24(4):304-12.
190. Wallen GR, Brooks MA, Whiting MB, Clark R, Krumlauf MM, Yang L, Schwandt ML, George DT, Ramchandani VA. The prevalence of sleep disturbance in alcoholics admitted for treatment: a target for chronic disease management. *Family & community health*. 2014 Oct;37(4):288.
191. Gianoulakis C, Dai X, Brown T. Effect of Chronic Alcohol Consumption on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Pituitary β -Endorphin as a Function of Alcohol Intake, Age, and Gender. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2003 Mar 1;27(3):410-23.

192. Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF. Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2014 Apr 30;35(2):234-44.
193. Abulseoud OA, Ho MC, Choi DS, Stanojević A, Čupić Ž, Kolar-Anić L, Vukojević V. Corticosterone oscillations during mania induction in the lateral hypothalamic kindled rat—Experimental observations and mathematical modeling. *PLOS ONE*. 2017 May 18;12(5):e0177551.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Ana Stanojević je rođena 1990. u Pančevu.

Školske 2009/2010. upisala je osnovne akademske studije na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2013. sa srednjom ocenom 9,97 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Master studije na Fakultetu za fizičku hemiju završila je 2014. sa srednjom ocenom 10 i ocenom 10 na odbrani master rada. Doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju upisala je 2014. i položila sve ispite predviđene planom i programom sa srednjom ocenom 10.

Zaposlena je na Fakultetu za fizičku hemiju od 15.1.2015. godine, prvo kao istraživač-pripravnik, zatim kao istraživač-saradnik, a od 1.7. 2015. kao asistent.

Oblasti njenog naučnog interesovanja su dinamika nelinearnih procesa; modeliranje složenih procesa u biologiji, medicini i hemiji; oscilatorni procesi u hemijskim, fizičko-hemijskim i biološkim sistemima. Objavila je pet radova u međunarodnim časopisima, kao i 19 saopštenja na međunarodnim konferencijama.

Tokom leta 2017. stručno se usavršavala na Karolinska Institutu u Stokholmu, Švedska, u okviru Erasmus+ programa razmene. Februara 2015. pohađala je International Wilhelm and Else Heraeus Physics School on "Model systems for understanding biological processes", u Bad Honefu u Nemačkoj. 2014. je učestvovala u programu mentorstva „Srbija na vezi” u organizaciji udruženja „iSerbia.

Bila je stipendista Fonda za mlade talente „Dositeja” Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Dobitnica je nagrade za najbolji stručni i naučnoistraživački studentski rad 2013. godine, diplome „Pavle Savić” Društva fizikohemičara Srbije, nagrade Fondacije „Sestre Bulajić“ za najbolje diplomske radove, specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva, nagrade Hemofarm fondacije za najbolje studente prirodnih nauka, nagrade Kluba SUPERSTE Erste Banke.

Radovi i saopštenja proistekli iz ovog doktorata:

Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti- M21a

1. Ž. Čupić, **A. Stanojević**, V. M. Marković, Lj. Kolar-Anić, L. Terenius, V. Vukojević, The HPA axis and ethanol: a synthesis of mathematical modelling and experimental observations, *Addiction Biology* (2016), doi:10.1111/adb.12409
2. Ž. Čupić, V. M. Marković, S. Mačešić, **A. Stanojević**, S. Damjanović, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić. Dynamic transitions in a model of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Chaos* (2016) 26, 033111, doi: 10.1063/1.4944040.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu - M21

1. Abulseoud OA, Ho MC, Choi DS, **Stanojević A**, Čupić Ž, Kolar-Anić L, Vukojević V. Corticosterone oscillations during mania induction in the lateral hypothalamic kindled rat—Experimental observations and mathematical modeling. *PLOS ONE*. 2017 May 18;12(5):e0177551.

Rad u međunarodnom časopisu - M23

2. **A. Stanojević**, V.M. Marković, Ž. Čupić, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić. Modelling of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations by externally induced cholesterol pulses of finite duration and with asymmetrically distributed concentration profile. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. (2017), 91(13), 112–119. DOI: 10.1134/S0036024417130027.

Saopštenja na skupovima od međunarodnog značaja štampana u celini - M33

1. **A. Stanojević**, V. M. Marković, Ž. Čupić, V. Vukojević, Mathematical modeling of interleukin 6 effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Physical Chemistry 2016, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, The Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, Proceedings, Volume I, (2016) p. 323-326.
2. **A. Stanojević**, V. M. Marković, Lj. Kolar-Anić, V. Vukojević, Mathematical modeling of interactions between the central circadian clock, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and alcohol, *Physical Chemistry 2016, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, The Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, Proceedings, Volume I, (2016) p. 351-354.
3. **A. Stanojević**, Ž. Čupić, Lj. Kolar-Anić, V. Vukojević, Mathematical modelling of ethanol effects on the dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) system, *The 5th International Congress of Serbian Society of Mechanics*, Arandjelovac, Serbia, Proceedings, (2015) M3a (four pages).
4. **A. Stanojević**, Lj. Kolar-Anić, Ž. Čupić, V. M. Marković, V. Vukojević, Effects of gradual cholesterol pulses with normally distributed intensity profiles on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dynamics, *Physical Chemistry 2014, 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, The Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, Proceedings, Volume I, (2014) p. 340-343.

Саопштења на скуповима од међународног значаја штампана у изводу - М34

1. **A. D. Stanojević**, V. M. Marković, Ž. D. Čupić, Lj. Z. Kolar-Anić, V. B. Vukojević, Mathematical modeling of testosterone-related differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to ethanol, 70 years of the Mathematical Institute of Serbian Academy of Sciences and Arts, Mini-symposium “Biomechanics and Modelling of Biological Systems”, Belgrade, Serbia (2016) p. 34-35.
2. **A. Stanojević**, Ž. Čupić, V. M. Marković, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić, Modelling the effects of the cholesterol-rich food intake on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dynamics, *ECMTB - SMB 2016 - the joint meeting of the European Society for Mathematical and Theoretical Biology and the Society for Mathematical Biology*, Nottingham, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland (2016) CT-14-AM-06 (one page).
3. **A. Stanojević**, V. Marković, Ž. Čupić, S. Macešić, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić, Mathematical Modeling of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dynamics in Rats, *Belgrade Bioinformatics Conference (BelBi) 2016*, Belgrade, Serbia, (2016) pp. 99.
4. **A. Stanojević**, Ž. Čupić, V. M. Marković, S. Macešić, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić, Modeling the effects of stress on adrenal progesterone dynamics, *2nd International Symposium on Advances in PCOS and Women's Health*, Belgrade, Serbia, (2016) pp. 47.
5. **A. Stanojević**, Ž. Čupić, V. M. Marković, S. Maćešić, Lj. Kolar-Anić, V. Vukojević, Modelling Ethanol Influence on the Dynamics of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis, *EMBO / EMBL Symposium: Biological Oscillators: Design, Mechanism, Function*, Heidelberg, Germany, (2015) pp. 106.
6. **A. Stanojević**, S. Maćešić, Ž. Čupić, V. M. Marković, V. Vukojević, Lj. Kolar-Anić, Modelling perturbations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with cholesterol pulses in the form of a normal distribution, *International WE-Heraeus Physics School on "Model systems for understanding biological processes"*, Bad Honnef, Germany, (2015) P27 (one page).
7. **A. Stanojević**, Lj. Kolar-Anić, Ž. Čupić, V. M. Marković, V. Vukojević, Mathematical modelling of the influence of distribution of cholesterol concentration on the perturbations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *3rd Congress of physiological sciences of Serbia with international participation - Molecular, Cellular and Integrative Basis of Health and Disease: Transdisciplinary Approach*, Serbian Physiological Society, Belgrade, Serbia, Abstract Book, (2014) p. 192.

9. PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Станојевић

број индекса 2014/0302

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Моделирање механизма утицаја етанола на нелинеарна динамичка стања
хипоталамо-хипофизно-адреналног система

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Ана Станојевић

Број индекса 2014/0302

Студијски програм докторске академске студије физичке хемије

Наслов рада Моделирање механизма утицаја етанола на нелинеарна
динамичка стања хипоталамо-хипофизно-адrenalног система

Ментор проф. др Драгомир Станисављевић и др Жељко Чупић

Потписани/а Ана Станојевић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Моделирање механизма утицаја етанола на нелинеарна динамичка стања хипоталамо-хипофизно-адреналног система

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.