

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Emilija B. Glavonić

**MOLEKULSKI MEHANIZMI UČENJA I
PAMĆENJA STRAHA I NJIHOVA
MODULACIJA KETAMINOM KOD
ADOLESCENTNIH MIŠEVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Emilija B. Glavonić

**MOLEKULSKI MEHANIZMI UČENJA I
PAMĆENJA STRAHA I NJIHOVA
MODULACIJA KETAMINOM KOD
ADOLESCENTNIH MIŠEVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Emilija B. Glavonić

**MOLECULAR MECHANISMS OF FEAR
LEARNING AND MEMORY AND THEIR
MODULATION BY KETAMINE IN
ADOLESCENT MICE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori

dr Miroslav Adžić, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke Vinča – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije

dr Miloš Mitić, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke Vinča – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Sanja Ivković, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke Vinča – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Milorad Dragić, naučni saradnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Definisanje klastera molekularnih biomarkera za poboljšanje i terapiju poremećaja raspoloženja“ (III41209), a zatim i u okviru teme „Preklinička i klinička ispitivanja psihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti“ (0902008/0902108/0902208/0902308/0902408), pod rukovodstvom dr Miroslava Adžića.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Miroslavu Adžiću, na ukazanom poverenju, uloženom trudu i vremenu, nesebičnom deljenju znanja i celokupnoj pomoći pruženoj tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliko hvala prof. dr Nadeždi Nedeljković na prenetom znanju tokom mojih studija na Biološkom fakultetu, kao i na korisnim sugestijama, trudu i vremenu uloženom tokom čitanja ove doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr Milošu Mitiću na svim savetima i nesebičnoj pomoći koju mi je pružio tokom izrade ovog doktorata. Hvala i na iscrpnim diskusijama koje su doprinele mom naučnom razvoju. Kao članu komisije, hvala na pažljivom čitanju disertacije i sugestijama koje su poboljšale kvalitet njenog teksta.

Dr Miloradu Dragiću želim da se zahvalim na ekspeditivnom čitanju ove doktorske disertacije i komentarima koji su doprineli unapređenju njenog teksta. Ipak, najviše sam zahvalna za naše dugogodišnje prijateljstvo i podršku u trenucima kada stvari nisu išle onako kako sam ih zamislila.

Želela bih da se zahvalim kolegici dr Sanji Ivković na izdvojenom trudu i vremenu prilikom čitanja ove disertacije, kao i na izuzetno korisnim smernicama koje su pomogle da se tekst ovog doktorata uobliči.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojim dragim kolegicama, Ester, Minji, Zorici, Željki i Marini. Hvala vam za preneto laboratorijsko iskustvo i svu nesebičnu podršku i pomoć u izradi ove disertacije. Najviše želim da vam se zahvalim za sve izmamljene osmehe i za divno prijateljstvo koje je učinilo da rad na ovoj disertaciji bude neuporedivo lakši.

Želim da se zahvalim i svojoj kolegici dr Ivi Lukić i kolegi Milanu Jovanoviću koji su u svakom trenutku bili voljni da me saslušaju i diskutuju o različitim naučnim i nenaučnim temama.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici bez čije bezrezervne podrške, ljubavi i razumevanja bi ostvarivanje ovog cilja bilo neuporedivo teže. Hvala što ste bili uz mene i u lepim i u teškim trenucima koji su pratili izradu ovog doktorata.

Molekulski mehanizmi učenja i pamćenja straha i njihova modulacija ketaminom kod adolescentnih miševa

Sažetak

Adolescencija predstavlja ranjiv razvojni period podložan javljanju psihijatrijskih poremećaja povezanih sa strahom, pri čemu ključnu ulogu u njihovom nastanku i održavanju ima narušen proces ekstinkcije straha, karakterističan za ovu starosnu grupu. Pored toga, adolescente odlikuje i smanjena efikasnost u odgovoru na terapiju ponovljenog izlaganja stresoru (*engl. exposure therapy, ET*), koja predstavlja terapiju prvog reda za poremećaje povezane sa strahom, a zasniva se na principima ekstinkcije straha. U svetlu ovih činjenica, razumevanje molekulskih mehanizama izmenjene ekstinkcije straha kod adolescenata i ispitivanje farmakoloških agenasa koji mogu doprineti njenom poboljšanju predstavljaju bitne istraživačke teme, čiji rezultati mogu imati implikacije za primenu ET u adolescentnoj populaciji.

Kao oblik asocijativnog učenja, ekstinkcija straha se zasniva na mehanizmima sinaptičke plastičnosti, posredovanim proteinima koji deluju na nivou sinapse, poput glutamatskih NMDA i AMPA receptora, BDNF, i kinaza mTOR signalnog puta. U cilju karakterizacije molekulskih medijatora procesa ekstinkcije u adolescenciji, u ovoj disertaciji je ispitivana proteinska ekspresija različitih proteina sinaptičke plastičnosti u hipokampusu adolescentnih i adultnih miševa oba pola nakon četiri i sedam dana ekstinkcije. Takođe je ispitan potencijal ketamina da poboljša ekstinkciju straha kod adolescentnih životinja muškog pola, uz detekciju nivoa proteina sinaptičke plastičnosti u hipokampusu i prečeonoj kori, kao i analizu neuronskih korelata efekata ketamina na ovaj oblik učenja.

Dobijeni rezultati su pokazali narušenu ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka u poređenju sa adultima, pri čemu je uspešna ekstinkcija kod adolescentne grupe bila povezana sa aktivnošću NMDA-Erk-mTOR-GluA1 signalnog puta. Sa druge strane, ketamin je ubrzao proces ekstinkcije kod adolescenata muškog pola, što je bilo praćeno aktivacijom Akt-mTOR-GluA1 signalizacije. Takođe, pokazano je da su efekti ketamina na ekstinkciju povezani sa aktivacijom leve hemisfere infralimbičke kore, kao i dorzalnog i ventralnog hipokampusa, struktura ključnih za proces regulacije straha.

Sumarno, rezultati ove disertacije su po prvi put okarakterisali molekulske mehanizme koji leže u osnovi smanjene efikasnosti ekstinkcije straha kod adolescentnih životinja, dok je ketamin izdvojen kao potencijalni tretman za poboljšanje ovog procesa kod adolescenata muškog pola. Na ovaj način, dobijeni rezultati pružaju doprinos potrazi za adjuvansima koji imaju potencijal da unaprede primenu ET u adolescentnoj populaciji.

Ključne reči: ekstinkcija straha, adolescencija, ketamin, sinaptička plastičnost, glutamatni receptori, mTOR signalni put, hipokampus, prečeona kora

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

Molecular mechanisms of fear learning and memory and their modulation by ketamine in adolescent mice

Abstract

Adolescence represents a vulnerable developmental stage susceptible to the onset of fear-related psychiatric disorders, where the impaired process of fear extinction, characteristic of this age group, plays a key role in their development and maintenance. Additionally, adolescence is marked by reduced response to exposure therapy (ET), a first-line therapy for fear-related disorders that is based on the principles of fear extinction. In light of these facts, understanding the molecular mechanisms underlying altered fear extinction in adolescents and examining pharmacological agents that can contribute to its improved efficacy are important research topics, with results that may have implications for ET application in the adolescent population.

As a form of associative learning, fear extinction is based on synaptic plasticity mechanisms mediated by proteins acting at synaptic level, such as NMDA and AMPA glutamate receptors, BDNF, as well as kinases of the mTOR signaling pathway. In order to characterize molecular mediators of fear extinction in adolescence, we examined the protein expression of various synaptic plasticity proteins in the hippocampus of adolescent and adult mice of both sexes after four and seven days of extinction. We also investigated ketamine's potential for improving fear extinction in adolescent male animals, along with the detection of synaptic plasticity proteins' levels in the hippocampus and prefrontal cortex, as well as an analysis of neuronal correlates of ketamine's effects on this form of learning.

The obtained results showed impaired fear extinction in adolescent males compared to adults, with successful extinction in the adolescent group being associated with the activity of the NMDA-Erk-mTOR-GluA1 signaling pathway. On the other hand, ketamine accelerated the extinction process in adolescent males, which was accompanied by activation of Akt-mTOR-GluA1 signaling. In addition, our results showed that ketamine's effects on fear extinction were linked to the activation of the left infralimbic cortex, as well as the dorsal and ventral hippocampus, structures critical for fear regulation.

In summary, the results of this dissertation characterized, for the first time, the molecular mechanisms underlying the reduced efficiency of fear extinction in adolescent animals, while ketamine was highlighted as a potential treatment for improving this process in adolescent males. Thereby, our findings contribute to the search for ET adjuvants that have the potential to advance its clinical application in the adolescent population.

Keywords: fear extinction, adolescence, ketamine, synaptic plasticity, glutamate receptors, mTOR signaling, hippocampus, prefrontal cortex

Research area: Biology

Research field: Neurobiology

Spisak skraćenica

4E-BP1 (*engl. eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), vezujući protein 1 eukariotskog faktora inicijacije translacije 4E

ACC – *engl. anterior cingulate cortex*, anteriorna pojasna kora

Akt – protein kinaza B

AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

AUs – *engl. arbitrary units*, arbitrarne jedinice

BA – bazalna amigdala

BDNF – *engl. brain-derived neurotrophic factor*, neurotrofički faktor poreklom iz mozga

BLA – bazolateralna amigdala

BS – bezuslovni stimulus

BSA – *engl. bovine serum albumin*, goveđi serumski albumin

CA – *lat. Cornu ammonis*, Amonov rog

CAMKII(α) – *engl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (α)*, kalcijum/kalmodulin zavisna proteinska kinaza II (alfa)

CAMKIV – *engl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV*, kalcijum/kalmodulin zavisna proteinska kinaza IV

CBT – *engl. cognitive-behavioral therapy*, kognitivno-bihevioralna terapija

CC – *engl. corpus callosum*, žuljevito telo

CeA – centralna amigdala

CeL – centralna lateralna amigdala

CeM – centralna medijalna amigdala

CNS – centralni nervni sistem

CREB – *engl. cAMP-response element binding protein*, vezujući protein cAMP elementa odgovora

CTD – *engl. C-terminal domain*, C-terminus

dACC – *engl. dorsal anterior cingulate cortex*, dorzalna anteriorna pojasna kora

DAG – diacilglicerol

DAPI – *engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole*, 6-diamidino-2-fenilindolom

DCS – D-cikloserin

DG – *engl. dentate gyrus*, zubata vijuga

dHPC – dorzalni hipokampus

dmPFC – *engl. dorsomedial prefrontal cortex*, dorzomedijalna prečea kora

eEF2 – *engl. eukaryotic elongation factor 2*, eukariotski faktor elongacije 2

eEF2K – *engl. eukaryotic elongation factor 2 kinase*, kinaza eukariotskog faktora elongacije 2

eIF-4E – *engl. eukaryotic initiation factor 4E*, eukariotski faktor inicijacije 4E

ER – *engl. estrogen receptor*, receptor za estrogene

Erk – *engl. extracellular signal-regulated kinase*, ekstraćelijskim signalima-regulisana kinaza

ET – *engl. exposure therapy*, terapija ponovljenog izlaganja stresoru

GABA – *engl. γ -aminobutyric acid*, gama-aminobuterna kiselina

GluA (1-4) – glutamatske subjedinice AMPA receptora

GluN1, GluN2 (A-D) i GluN3 (A-B) – glutamatske subjedinice NMDA receptora

HPC – hipokampus

HPF – *engl. high-power field*, polje visoke rezolucije

HPRT – *engl. hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1*, hipoksantin fosforibozil-transferaza 1

HRP – *engl. horseradish peroxidase*, peroksidaza rena

ICD – *engl. International classification of diseases manual*, međunarodni priručnik za klasifikaciju bolesti

IL – infralimbička kora

IP3 – inozitol-1, 4, 5-trifosfat

ITCs – *engl. intercalated cells*, interkalirajuće ćelije

ITC-L – *engl. lateral intercalated cells*, lateralne interkalirajuće ćelije

ITC-M – *engl. medial intercalated cells*, medijalne interkalirajuće ćelije

KO – *engl. knockouts*, životinje sa deletiranim genom

LA – lateralna amigdala

LBD – *engl. ligand-binding domain*, ligand-vezujući domen;

LTD – *engl. long-term depression*, dugotrajna depresija sinaptičke aktivnosti

LTP – *engl. long-term potentiation*, dugotrajna potencijacija sinaptičke aktivnosti

MEK – mitogenima-aktivirana proteinska kinaza kinaze

mBDNF – *engl. mature brain-derived neurotrophic factor*, zreli neurotrofički faktor poreklom iz mozga

mPFC – *engl. medial prefrontal cortex*, medijalna prečea kora

mTOR – *engl. mammalian target of rapamycin*, sisarska kinaza podložna dejstvu rapamicina

NMDA – N-metil-D-aspartat

NTD – *engl. N-terminal domain*, N-terminus

OFT – *engl. open field test*, test otvorenog polja

P2 – *engl. pellet 2*, frakcija neprečišćenih sinaptozoma

P29 – postnatalni dan 29

P70 – postnatalni dan 70

P70S6K – *engl. ribosomal protein S6 kinase*, P70 ribozomalna S6 kinaza

PBS – *engl. phosphate-buffered saline*, fosfatni pufer

PCP – *engl. phencyclidine*, fenciklidin

PDK1 – *engl. phosphoinositide-dependent kinase 1*, fosfoinozidid-zavisna kinaza 1

PE – *engl. prolonged exposure*, terapija produženog izlaganja stresoru

PFC – *engl. prefrontal cortex*, prečeaona kora

PI3K – *engl. phosphatidylinositol 3-kinase*, fosfatidilinozitol 3-kinaza

PIP2 – fosfatidil-inozitol 4, 5 bifosfat

PLC γ – *engl. phospholipase C γ* , fosfolipaza C gama

PrL – prelimbička kora

PSD95 – *engl. postsynaptic density protein 95*, protein postsinaptičke gustine težine 95 kDa

PTSP – posttraumatski stresni poremećaj

PVDF – *engl. polyvinylidene fluoride*, poliviniliden fluorid

RAF – *engl. rapidly accelerated fibrosarcoma*, RAF kinaza

Ras – *engl. rat sarcoma*, Ras GTPaza

RM-ANOVA – *engl. repeated measures analyses of variance*, analiza varijanse za ponovljena merenja

ROIs – *engl. regions of interest*, regioni od interesa

RT – *engl. room temperature*, sobna temperatura

SEM – *engl. standard error of the mean*, standardna greška srednje vrednosti

SR – *engl. spontaneous recovery of fear*, spontani oporavak straha

TMD – *engl., transmembrane domain*, transmembranski domen

TRD – *engl. treatment-resistant depression*, terapo-rezistentna depresija

TrkB – *engl. tropomyosin receptor kinase B*, tropomiozinski receptor kinaze B

US – uslovni stimulus

vHPC – ventralni hipokampus

vmPFC – *engl. ventromedial prefrontal cortex*, ventromedijalna prečeaona kora

WSE – *engl. within-session extinction*, ekstinkcija unutar pojedinačne sesije

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Životinjski modeli klasičnog uslovljavanja i ekstinkcije straha	2
1.1.1 Laboratorijski miševi kao model organizmi za paradigme učenja i memorije.....	2
1.1.2 Modeli uslovljavanja straha.....	4
1.1.3 Modeli ekstinkcije straha.....	5
1.2 Faze uslovljavanja i ekstinkcije straha	7
1.3 Sinaptička plastičnost i osnovni mehanizmi uslovljavanja i ekstinkcije straha.....	8
1.4 Moždane strukture uključene u procese uslovljavanja i ekstinkcije straha	9
1.4.1 Amigdala	10
1.4.2 Prečeaona kora	11
1.4.3 Hipokampus.....	12
1.5 Uloga specifičnih moždanih struktura u regulaciji straha	13
1.5.1 Učenje i ispoljavanje straha.....	13
1.5.2 Ekstinkcija straha.....	14
1.6 Molekulski mehanizmi ekstinkcije straha	15
1.6.1 NMDA i AMPA receptori	17
1.6.1.1 NMDA receptori.....	17
1.6.1.2 AMPA receptori	18
1.6.1.3 Uloga NMDA i AMPA receptora u ekstinkciji straha.....	19
1.6.2 mTOR signalni put	20
1.6.3 BDNF	21
1.7 Razlike u ekstinkciji straha tokom razvića	22
1.8 Razlike u ekstinkciji straha između polova	23
1.9 Ekstinkcija straha, anksiozni poremećaji i poremećaji povezani sa strahom	24
1.10 Farmakološki i bihejvioralni tretmani anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom – veza sa ekstinkcijom straha	25
1.11 Ketamin	26
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJAL I METODE.....	31
3.1. Gajenje eksperimentalnih životinja	32
3.2. Eksperimentalni dizajn	32
3.2.1 Eksperiment I.....	32
3.2.2 Eksperiment II	33
3.2.2.1 Ketamin	33
3.2.2.2 Eksperimentalna postavka	33
3.3. Testovi ponašanja	34
3.3.1 Test otvorenog polja	34
3.3.1 Uslovljavanje i ekstinkcija straha.....	34

3.4. Analiza proteina.....	35
3.4.1 Izolacija neprečišćene sinaptosomalne frakcije.....	35
3.4.2 Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za imunoblot analizu proteina	37
3.4.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina.....	38
3.4.4. Imunoblot analiza proteina	38
3.5. Analiza genske ekspresije.....	39
3.5.1 Izolacija RNK.....	39
3.5.2 Reverzna transkripcija	40
3.5.3. qRT-PCR.....	40
3.6. Imunohistohemijska analiza	41
3.6.1 Priprema tkiva i sečenje na kriokatu.....	41
3.6.2 Imunohistohemijska analiza c-Fos proteina	41
3.6.3 Kvantifikacija slika.....	42
3.7. Statistička obrada rezultata.....	42
3.7.1. Eksperiment I.....	42
3.7.2. Eksperiment II	43
4. REZULTATI	44
4.1 Eksperiment I	45
4.1.1 Analiza uslovljavanja i ekstinkcije straha kod adolescentnih i adultnih miševa oba pola.....	45
4.1.2 Analiza nivoa subjedinica NMDA i AMPA receptora u hipokampusu adolescentnih i adultnih miševa oba pola	49
4.1.3 Analiza aktivnosti mTOR signalnog puta u hipokampusu adolescentnih i adultnih miševa oba pola	51
4.1.4 Analiza proteinske i genske ekspresije BDNF u hipokampusu adolescentnih i adultnih miševa oba pola	52
4.2 Eksperiment II	54
4.2.1 Analiza lokomotorne aktivnosti i ponašanja adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom.	54
4.2.1.1 Lokomotorna aktivnost.....	54
4.2.1.2 Uslovljavanje i ekstinkcija straha	54
4.2.2 Analiza nivoa subjedinica NMDA i AMPA receptora u hipokampusu i prečenoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom	56
4.2.3 Analiza aktivnosti mTOR signalnog puta u hipokampusu i prečenoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom.....	56
4.2.4 Analiza proteinske i genske ekspresije BDNF u hipokampusu i prečenoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom.....	57
4.2.5 Analiza ekspresije c-Fos i broja c-Fos ⁺ ćelija u hipokampusu i prečenoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom.....	58
5. DISKUSIJA.....	61
5.1 Ekstinkcija straha kod adolescentnih miševa je narušena na polno-specifičan način	62
5.2 Uspešna ekstinkcija straha kod adolescentnih mužjaka je asocirana sa aktivacijom NMDA-Erk-mTOR-GluA1 signalnog puta u hipokampusu	63

5.3 Subanestetska doza ketamina poboljšava ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka.....	65
5.4 Pozitivni efekti ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka su praćeni aktivacijom Akt-mTOR-GluA1 signalnog puta u hipokampusu	67
5.5 Pozitivni efekti ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka su asocirani sa pojačanom aktivacijom dHPC, vHPC i levog IL vmPFC.....	68
6. ZAKLJUČAK	70
7. LITERATURA	72
8. PRILOZI.....	99
Биографија аутора.....	100
Изјава о ауторству.....	101
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	102
Изјава о коришћењу	103

1. UVOD

Strah je u svojoj osnovi emocija koja obuhvata skup fizioloških i bihevioralnih reakcija organizama u odgovoru na opaženu opasnost. Imajući u vidu da je adekvatan odgovor na opasnost ključan za preživljavanje jedinki, strah se definiše kao evolutivna adaptacija koja omogućava organizmu neophodnu pripremu za borbu ili njeno izbegavanje („bori se ili beži” mehanizam). Stanje straha karakteriše aktivacija simpatičkog nervnog sistema, što dovodi do oslobađanja adrenalina, noradrenalina i kortizola u krvotok (S. M. Rodrigues i sar., 2009). Ovi hormoni dalje pokreću seriju fizioloških reakcija, uključujući ubrzane otkucaje srca, povišen krvni pritisak, pojačan mišićni tonus i ubrzan metabolizam glukoze. Na nivou ponašanja, strah se manifestuje na više načina, poput spremnosti na borbu i ispoljavanja agresije sa jedne strane, odnosno pojačanog opreza, izbegavanja opasnosti i traženja bezbednog utočišta sa druge strane. Međutim, u situacijama kada organizam nije u mogućnosti da se suprotstavi niti da pobjegne od pretnje, može doći do privremene paralisnosti, odnosno „zamrzavanja” od straha ¹(*engl. freezing behavior*), što često može imati i neželjene posledice po jedinku (Adolphs, 2013).

Strah ima veliki adaptivni značaj za jedinku, međutim problem nastaje u slučajevima njegovog uopštavanja i prekomernog, nekontrolisanog ispoljavanja u odsustvu realne opasnosti. Ovakve maladaptivne reakcije se nalaze u osnovi poremećaja povezanih sa strahom, kao što su fobije, panični poremećaj i posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) (Singewald i Holmes, 2019). Takođe, strah može da izazove simptome anksioznosti, poput nemira i pojačane razdražljivosti, dok se uz same anksiozne poremećaje često javlja i intenzivan i nepopustljiv osećaj straha (World Health Organization, 2022). Upravo iz ovih razloga, studije koje se bave izučavanjem mehanizama usvajanja i suzbijanja straha imaju veliki značaj kako za razumevanje etiologije ovih psihijatrijskih poremećaja, tako i za unapređivanje postojećih terapijskih pristupa u njihovom lečenju.

Strah može biti urođen i naučen, a tema ove doktorske disertacije se odnosi na poseban oblik učenja straha putem klasičnog uslovljavanja, i to specifično na proces njegovog postepenog gašenja koji se označava kao ekstinkcija (*engl. fear extinction*), odnosno razuslovljavanje straha.

1.1 Životinjski modeli klasičnog uslovljavanja i ekstinkcije straha

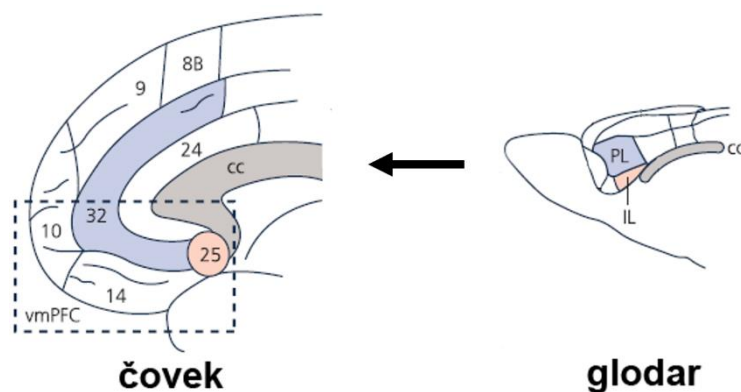
1.1.1 Laboratorijski miševi kao model organizmi za paradigme učenja i memorije

Decenijama unazad, sitni glodari poput miševa se koriste kao model organizmi u neurobiološkim istraživanjima. Ova praksa se zasniva na nekoliko ključnih prednosti, koje podrazumevaju jednostavno održavanje i kratak reproduktivni ciklus laboratorijskog miša, kao i mogućnost genetskih manipulacija i stvaranja modela za proučavanje različitih patologija nervnog sistema. Uz to, visok stepen homologije protein-kodirajućih regiona mišjeg i humanog genoma (preko 80% podudaranja) (Rozenbaum, 2022) doprinosi relevantnosti mišjih modela za izučavanje različitih (pato)fizioloških procesa kod čoveka.

Kada je u pitanju modelovanje kognitivnih procesa, poznato je da miševi ispoljavaju jasne obrasce određenih oblika učenja, poput prostornog i asocijativnog učenja (Dalkiran i sar., 2022). Ovi procesi su posredovani evolutivno očuvanim nervnim kolima, zajedničkim za glodare i primat (Clark i Squirea, 2013; LeDoux, 2012), što opravdava korišćenje glodara kao model organizama u neurobiologiji učenja i pamćenja. Ipak, treba istaći da i pored sposobnosti da uspešno uče i pamte informacije određenog stepena složenosti, kod glodara ne možemo govoriti o kogniciji i kognitivnim procesima višeg reda kao što je to slučaj kod primata. Takođe, glodari i primati se razlikuju po anatomiji i kompleksnosti veza između moždanih regiona uključenih u procese učenja i pamćenja (Bergmann i sar., 2016; Chareyron i sar., 2011; Laubach i sar., 2018), što dodatno otežava translaciju rezultata dobijenih u prekliničkim istraživanjima.

¹ U duhu srpskog jezika se često koristi izraz “ukočio se od straha”. Ipak, s obzirom da se engleski termin “freezing” u ovoj disertaciji koristi uglavnom u nesvršenom glagolskom obliku, autor se odlučio za prevod reči koji bolje odgovara ovakvoj primeni.

Razlike u moždanoj organizaciji između glodara i primata su najizraženije na nivou prečione kore (*engl. prefrontal cortex, PFC*, Slika 1.), dok su u manjoj meri prisutne i u hipokampusu (HPC) i amigdali, strukturama koje zajedno sa PFC čine nervno kolo regulacije straha (Quirk i Mueller, 2008). U poređenju sa glodarima, PFC primata karakteriše gušća populacija neurona, kao i veća debljina kore, koja obavezno uključuje granularni sloj IV (Laubach i sar., 2018). Ovaj sloj je ključan za integraciju prethodno obrađenih informacija, što omogućava primatima pojačane kognitivne kapacitete u odnosu na druge redove sisara. Pored citoarhitekture, glodari i primati se razlikuju i po samoj anatomskoj organizaciji PFC, pri čemu njihovo međusobno poređenje dodatno otežava odsustvo jasnog konsenzusa u nomenklaturi i granicama određenih delova PFC (Laubach i sar., 2018). Zbog toga je sve više prihvaćeno stanovište da se PFC kod glodara i primata posmatra kroz prizmu funkcijski analognih struktura. Sa aspekta regulacije straha, regione od interesa u okviru PFC glodara čine prelimbička (PrL) i infralimbička (IL) kora, koje kod miša predstavljaju deo ventromedijalne prečione kore (*engl. ventromedial prefrontal cortex, vmPFC*) (Alexander i sar., 2023), dok kod pacova ovi regioni pripadaju medijalnoj prečionoj kori (*engl. medial prefrontal cortex, mPFC*). Iz ovog razloga, u okviru ove disertacije, termin vmPFC će biti korišćen za predstavljanje rezultata studija na miševima, dok će u ostalim slučajevima biti korišćen termin mPFC. Humani funkcionalni analog PrL je Brodmanovo polje 32, odnosno dorzalna anteriorna pojasna kora (*engl. dorsal anterior cingulate cortex, dACC*) koja pripada i dorzomedijalnoj prečionoj kori (*engl. dorsomedial prefrontal cortex, dmPFC*) i vmPFC, dok IL odgovara Brodmanovom polju 25, tj. delu PFC koji je kod čoveka lokalizovan unutar vmPFC (Slika 1.) (Alexander i sar., 2023). Ipak, i pored navedenih anatomskih razlika, mPFC kod glodara i primata karakteriše izuzetno slična funkcijska organizacija (Schaeffer i sar., 2020), što je od velikog značaja za studije uslovljavanja i ekstinkcije straha.



Slika 1. Anatomске razlike u organizaciji prečione kore između čoveka i glodara. CC (*engl. corpus callosum*), žuljevito telo; vmPFC (*engl. ventromedial prefrontal cortex*), ventromedijalna prečiona kora; PL, prelimbička kora; IL, infralimbička kora. Preuzeto i modifikovano iz Alexander i sar., 2023.

Anatomska organizacija HPC je u velikoj meri evolutivno očuvana, dok se glavne razlike između različitih redova sisara uočavaju na nivou veza koje HPC ostvaruje sa drugim moždanim strukturama, na prvom mestu korom cerebruma. Kod glodara je ova veza jednostavnija, s obzirom da obrađeni stimulusi dolaze do HPC direktno iz senzornih zona cerebruma (Clark i Squirea, 2013). Sa druge strane, kod primata informacije nakon obrade unutar senzornih zona prolaze proces integracije sa postojećim iskustvima u okviru asocijativnih zona (Clark i Squirea, 2013), nakon čega se dopremaju do HPC, koji učestvuje u njihovom daljem pamćenju i čuvanju. Upravo korak obrade unutar asocijativnih zona, koji dovodi do obogaćivanja i usložnjavanja usvojenih informacija, omogućava primatima da pokazuju znatno kompleksnije obrasce učenja i pamćenja u odnosu na glodare.

Kada je u pitanju amigdala, između glodara i primata su zabeležene značajne razlike u njenoj strukturi, kao i broju neurona i dendritskoj arborizaciji unutar bazalnih i lateralnih jedara (Chareyron i sar., 2011) zaduženih za primanje i integraciju različitih stimulusa. Sa druge strane, centralni delovi

amigdale, ključni za ispoljavanje straha, pokazuju visok nivo homologije između različitih redova sisara (Chareyron i sar., 2011). Ovi rezultati sugerišu da je osnovna funkcija amigdale u regulaciji straha evolutivno očuvana, dok kompleksnija organizacija njenog bazolateralnog dela doprinosi pojavi složenih oblika socijalnog ponašanja i emotivnih reakcija prisutnih kod primata.

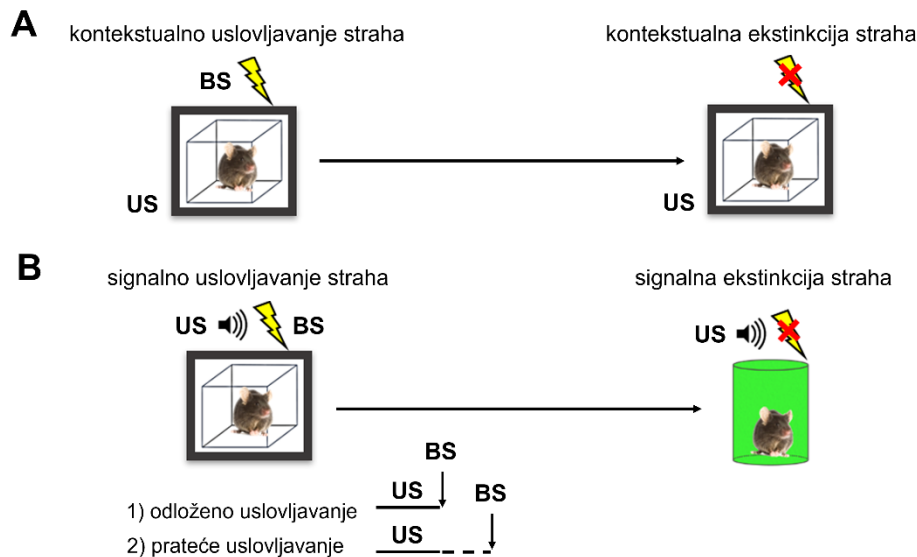
Iz svega navedenog, jasno je da zahvaljujući složenijoj organizaciji i vezi PFC sa HPC, primati imaju veći kapacitet za učenje i pamćenje u odnosu na glodare, što podrazumeva i sposobnost vršenja kognitivnih procesa višeg reda, poput rešavanja logičkih problema, prepoznavanja složenih obrazaca informacija itd. Ipak, treba imati u vidu da sam proces uslovljavanja straha predstavlja jednostavan oblik učenja koji spada u grupu evolutivno očuvanih, adaptivnih obrazaca ponašanja (Haaker i sar., 2019). Takođe, konzervisanost strukture HPC, mPFC i centralne amigdale (CeA) kod glodara i primata upućuje na uniformnost procesa regulacije straha kod ovih grupa sisara i daje validnost ispitivanju uslovljavanja i ekstinkcije straha na glodarima kao model organizmima.

1.1.2 Modeli uslovljavanja straha

Koncept klasičnog uslovljavanja datira sa kraja 19. i početka 20. veka i potiče iz istraživačkog rada ruskog fiziologa Ivana Pavlova. Pavlov je pokazao da višestruko izlaganje životinje neutralnom stimulusu (zvuk zvona) u paru sa biološki relevantnim stimulusom (hrana) koji izaziva salivaciju, dovodi do formiranja asocijacije između njih, tako da neutralni stimulus stiče sposobnost izazivanja reakcije na bezuslovni stimulus (BS) (Pavlov, 2010). Pavlovljevi pionirski eksperimenti su postavili temelje daljih istraživanja u polju asocijativnog učenja, dok današnji modeli klasičnog uslovljavanja straha, zasnovani na Pavlovljevim principima učenja, nose naziv Pavlovljevo uslovljavanje straha.

U okviru modela klasičnog uslovljavanja straha, životinje se istovremeno izlažu neutralnom, uslovnom stimulusu (US) i neprijatnom BS koji životinja doživljava kao opasnost i koji kod nje izaziva strah. Na ovaj način, formira se US-BS asocijacija, koja dovodi do toga da US sam po sebi izaziva strah kod životinje koja je prethodno naučila da ovaj stimulus predviđa prisustvo opasnosti (Curzon i sar., 2009). U zavisnosti od tipa US koji se koriste, modeli klasičnog uslovljavanja straha se mogu podeliti na kontekstualne (*engl. contextual fear conditioning*) i signalne paradigme (*engl. cued fear conditioning*) (Slika 2.). Kod kontekstualnog uslovljavanja, US čini celokupan kontekst u kom se životinja uslovljava (oblik, boja, tekstura, miris arene itd.). Sa druge strane, kod signalnog uslovljavanja, US predstavlja izolovani stimulus neutralnog karaktera, kao što su zvučna ili svetlosna draž jasno definisanih karakteristika. Dalje, signalno uslovljavanje straha se, u zavisnosti od vremena primene BS u odnosu na US deli na „prateće” (*engl. trace fear conditioning*) i „odloženo” uslovljavanje (*engl. delay fear conditioning*). Tokom pratećeg uslovljavanja straha, BS se primenjuje posle određenog vremenskog perioda nakon završetka trajanja US. U slučaju odloženog uslovljavanja, životinja se izlaže BS ili na samom kraju trajanja US ili odmah nakon njegovog prestanka (Curzon i sar., 2009).

U ovoj doktorskoj disertaciji, primenjen je model signalnog odloženog uslovljavanja straha uz primenu tona i električnog šoka kao US i BS. Životinje su ukupno tri puta bile podvrgnute uparenim US-BS stimulusima, pri čemu su primenjeni električni šokovi bili umerenog intenziteta (0.7 mA) i kratkog trajanja (po 1s). Ove karakteristike BS je jako bitno istaći, jer upravo intenzitet, dužina trajanja i broj primenjenih električnih šokova određuju šta paradigma uslovljavanja straha zapravo modeluje (Aliczki i Haller, 2015). Životinjski modeli klasičnog uslovljavanja straha se primarno koriste za istraživanje neurobioloških mehanizama učenja i pamćenja straha, što posledično dovodi i do boljeg razumevanja uzroka javljanja poremećaja povezanih sa strahom (J. J. Kim i Jung, 2006). Ipak, ukoliko su električni šokovi dovoljno jakog intenziteta i dužine trajanja tako da se mogu smatrati traumatskim stresorima (preko 1 mA, duže od 10s), paradigma uslovljavanja straha može da se koristi i kao direktan model za PTSP (Aliczki i Haller, 2015). Konačno, paradigma uslovljavanja straha predstavlja i neophodan prvi korak u istraživanjima koja se bave ispitivanjem procesa ekstinkcije straha, i upravo u tom svojstvu je i primenjena u okviru ove doktorske disertacije.



Slika 2. Shematski prikaz kontekstualnog (A) i signalnog (B) uslovljavanja i ekstinkcije straha. US, uslovni stimulus, BS, bezuslovni stimulus.

1.1.3 Modeli ekstinkcije straha

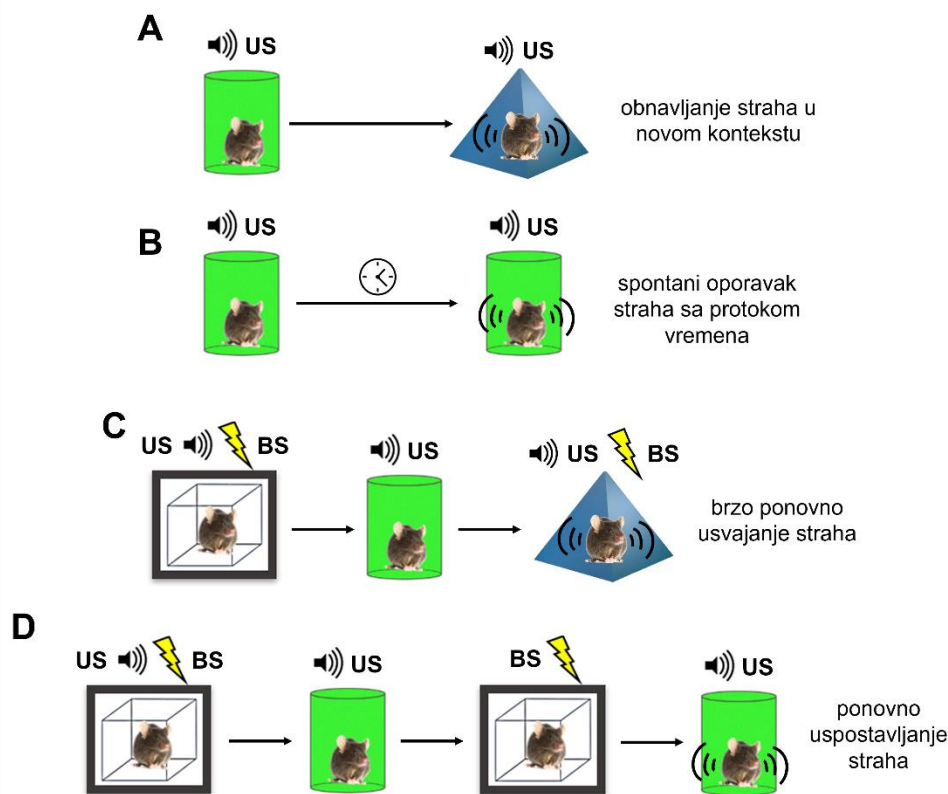
Ekstinkcija straha predstavlja proces inhibitornog asocijativnog učenja, tokom kog životinja uči da postepeno suzbija prethodno uslovljene reakcije straha. Kao što je već istaknuto, paradigme ekstinkcije se nadovezuju na ranije sprovedeno uslovljavanje straha, pri čemu odabrani model uslovljavanja diktira dalje uslove pod kojima se ekstinkcija odvija. Tokom ekstinkcije straha, životinja se izlaže US u odsustvu BS, prilikom čega se formira nova asocijacija između dva stimulusa, tzv. US-bez BS asocijacija (Myers i Davis, 2007). Na ovaj način, dolazi do narušavanja prethodno uspostavljenog odnosa zavisnosti između dva stimulusa, s obzirom da US više ne predviđa podvrgavanje životinje opasnom stimulusu koji će kod nje izazvati strah. Kod kontekstualnih paradigmi, životinje se u ekstinkciji izlažu kontekstu identičnom onom u kom su bile uslovljene, ali u odsustvu BS (Lu i sar., 2019). Sa druge strane, u okviru signalne ekstinkcije straha, životinje se u odsustvu BS izlažu US korišćenom tokom uslovljavanja, ali u drugačijem kontekstu u odnosu na onaj u kome se odigralo uslovljavanje (Pattwell i sar., 2012). Na ovaj način se izbegava uticaj konteksta uslovljavanja, odnosno omogućeno je praćenje reakcije straha izazvane isključivo specifičnim US. Bez obzira o kom modelu ekstinkcije straha se radi, nakon višestruko ponovljenih izlaganja US bez BS, dolazi do suzbijanja straha u odgovoru na US. Ovakva promena u ponašanju je izazvana istovremenim jačanjem US-bez BS asocijacije i slabljenjem inicijalne US-BS asocijacije (Myers i Davis, 2007). Ipak, ovde treba istaći da ekstinkcija nije pasivan proces zaboravljanja naučenog straha, što se ogleda kroz nekoliko fenomena koji opisuju povratak uslovljenog straha nakon uspešno sprovedene ekstinkcije (Bouton, 2004).

Ekstinkciji straha su svojstvena četiri dobro okarakterisana bihevioralna fenomena (Slika 3.):

- obnavljanje straha u novom kontekstu (*engl. fear renewal*)
- spontani oporavak straha sa protokom vremena (*engl. spontaneous recovery of fear*)
- brzo ponovno usvajanje straha (*engl. rapid reacquisition*)
- ponovno uspostavljanje straha (*engl. reinstatement*)

Obnavljanje straha u novom kontekstu se dešava kada se životinja nakon uspešno sprovedene ekstinkcije nađe u drugačijem kontekstu, u kome dolazi do vraćanja reakcija straha prilikom ponovnog izlaganja razuslovljenom US. Ovaj fenomen svedoči o činjenici da je proces ekstinkcije straha izuzetno zavistan od specifičnog konteksta u kom se odvija. Spontani oporavak straha sa protokom vremena označava pasivan proces tokom kog se strah postepeno vraća na svoj prvobitni nivo, ili nivo blizak prvobitnom, čak i nakon uspešne ekstinkcije (Bouton, 2004). Brzo ponovno

usvajanje straha ukazuje na sposobnost životinje da nakon ekstinkcije ubrzano usvoji strah kada se ponovo izloži identičnim US i BS korišćenim tokom prvobitnog uslovljavanja, čak i kada se sam kontekst uslovljavanja promeni. S obzirom da životinji treba manje vremena za usvajanje straha nego kada bi se ponovno uslovljavanje sprovodilo sa nepoznatim stimulusima, jasno je da prvobitno formirana US-BS asocijacija ostaje sačuvana i nakon procesa ekstinkcije straha. Konačno, do ponovnog uspostavljanja straha nakon ekstinkcije dolazi kada životinja ponovo doživi US u kontekstu uslovljavanja, što onda dovodi do ispoljavanja pojačane reakcije straha na novo izlaganje prethodno ugašenom BS, i to u kontekstu ekstinkcije (Bouton, 2004).



Slika 3. Shematski prikaz bihevioralnih fenomena vezanih za ekstinkciju straha. Obnavljanje straha u novom kontekstu (A), spontani oporavak straha sa protokom vremena (B), brzo ponovno usvajanje straha (C) i ponovno uspostavljanje straha (D). US, uslovni stimulus, BS, bezuslovni stimulus.

Pored toga što su karakteristični za proces ekstinkcije straha, opisani fenomeni se takođe primećuju kod kognitivno-bihevioralne terapije (*engl. cognitive-behavioral therapy, CBT*) ponovljenog izlaganja stresoru (*engl. exposure therapy, ET*) (Neumann i Kitlertsirivatana, 2010; Vasey i sar., 2012). Tokom ovog terapijskog pristupa, pojedinac se kroz vođene sesije u sigurnom okruženju postepeno izlaže stimulusu koji kod njega izaziva strah. Budući da se ET zasniva na principima ekstinkcije straha, sa kojom deli i mnogobrojne bihevioralne karakteristike, paradigma ekstinkcije straha se smatra validnim pretkliničkim modelom kako za samu ET, tako i za evaluaciju različitih farmakoloških tretmana koji bi mogli da poboljšaju njenu efikasnost (Craske i sar., 2018). Uz to, poznato je da narušenost procesa ekstinkcije straha leži u osnovi anksioznih poremećaja (Milad i sar., 2006) i poremećaja povezanih sa strahom, na prvom mestu PTSP (Paredes i Morilak, 2019). Samim tim, ekstinkcija straha predstavlja i adekvatan model za ispitivanje nastanka i razvoja ovih psihijatrijskih poremećaja.

Ključna tema za razmatranje prilikom analize bilo kog životinjskog modela je pitanje njegove validnosti, odnosno translacionog potencijala. Ukupna validnost se odnosi na sposobnost modela da verno oponaša određenu bolest ili terapijski pristup, i to tako da se zaključci izvedeni iz eksperimenata

na modelu mogu primeniti u kliničkoj praksi. Prema Vilnerovoj klasifikaciji iz 1984. godine (Willner, 1984) koja se, sa određenim izmenama i dopunama, koristi i danas (Belzung i Lemoine, 2011), validnost životinjskog modela se procenjuje na osnovu 3 glavna kriterijuma:

- validnost sličnosti fenotipa (*engl. face validity*) – sličnost bihevioralnih parametara i simptoma bolesti između modela i čoveka
- validnost konstrukta (*engl. construct validity*) – podudarnost mehanizama koji dovode do ispoljavanja određenog fenotipa u modelu i kod čoveka
- prediktivna validnost (*engl. predictive validity*) – sposobnost modela da pouzdano predvidi određeni ishod kod eksperimentalne životinje i čoveka (najčešće sličnost odgovora na primenjeni tretman)

Model ekstinkcije straha ispunjava sva tri osnovna kriterijuma validnosti za modelovanje ET (Scheveneels i sar., 2016), što se ogleda u nekoliko ključnih činjenica. Tokom ET kod ljudi, suzbijanje straha se odvija na sličan način kao i kod životinja tokom procesa ekstinkcije (Fucich i sar., 2016; Paredes & Morilak, 2019), dok su fenomeni obnavljanja straha prisutni i u ekstinkciji i kod ET (Culver i sar., 2011; de Jong i sar., 2019). Dalje, fMRI studije su pokazale promene u aktivnosti onih moždanih struktura tokom ET kod ljudi koje su ključne za proces ekstinkcije straha kod životinja (Ball i sar., 2017; Schienle i sar., 2007). Konkretno, nakon primene ET kod osoba sa anksioznim poremećajima i arahnofobijom, zabeležena je smanjena reaktivnost amigdale, dok je u regionima ekvivalentnim mPFC kod glodara uočena povišena moždana aktivnost (Ball i sar., 2017; Schienle i sar., 2007). Ipak, ovde treba napomenuti da ET pored komponente inhibitorynog učenja obuhvata i druge, psihološke mehanizme koji nisu obuhvaćeni paradigmom ekstinkcije straha (Cooper i sar., 2017), što otežava direktnu ekstrapolaciju rezultata sa životinjskog modela na ljude. Konačno, između životinjskih modela i kliničke primene ET prisutna je i sličnost u reakciji na farmakološke tretmane, što je za sada najuočljivije na primeru parcijalnog agoniste N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, D-cikloserina (DCS) (Norberg i sar., 2008). Niz studija na životinjskim modelima je pokazao da DCS ostvaruje pozitivne efekte na proces ekstinkcije straha (Ledgerwood i sar., 2005; McCallum i sar., 2010; Norberg i sar., 2008), dok je u kliničkoj praksi ovaj tretman u manjoj ili većoj meri poboljšao efikasnost psihoterapije za agorafobiju (Ressler i sar., 2004) i anksiozne poremećaje (Mataix-Cols i sar., 2017; H. Rodrigues i sar., 2014).

Sa druge strane, kada razmatramo paradigmu ekstinkcije straha u kontekstu anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom, jasno je da ne možemo govoriti o opštoj validnosti modela, s obzirom da model ne obuhvata sve aspekte opisanih poremećaja. Ipak, ovde treba istaći da su noviji pristupi postavljanju životinjskih modela uglavnom fokusirani na modelovanje specifičnih aspekata nekog poremećaja (van den Berg, 2022). U ovom slučaju, paradigma ekstinkcije straha direktno modeluje mehanizam asocijativnog učenja koji je narušen prilikom nastanka anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom, i sa te tačke gledišta poseduje validnost konstrukta za ispitivanje njihove etiologije.

1.2 Faze uslovljavanja i ekstinkcije straha

Uopšteno govoreći, učenje i pamćenje su složeni procesi koji omogućavaju jedinki da prilagodi svoje fiziološke reakcije i ponašanje datoj situaciji na osnovu prethodnih iskustava. Dok učenje podrazumeva usvajanje novih informacija, pamćenje predstavlja proces njihovog skladištenja tako da im se kasnije može svesno pristupiti. Proces klasičnog uslovljavanja i ekstinkcije straha predstavljaju oblike asocijativnog učenja koji pored nastanka asocijacije između opaženih stimulusa podrazumevaju i njeno dugoročno pamćenje. U skladu sa time, i uslovljavanje i ekstinkcija straha uključuju sledeće faze (Izquierdo i sar., 2016; Quirk i Mueller, 2008):

- učenje straha/ekstinkcija straha
- formiranje kratkoročne memorije
- konsolidacija (prevođenje) kratkoročne u dugoročnu memoriju
- skladištenje dugoročne memorije

- pristupanje dugoročnoj memoriji.

U osnovi učenja i pamćenja straha/ekstinkcije straha se nalazi sposobnost mozga da se strukturno i funkcionalno menja tokom vremena u odgovoru na nova iskustva. Ovakve promene se ogledaju i na nivou sinapsi, i to kroz proces sinaptičke plastičnosti, odnosno promene efikasnosti sinapsi u zavisnosti od njihove aktivnosti u prethodnom periodu (Bear i sar., 2015).

Tokom učenja, dolazi do stimulacije i aktivacije odgovarajućih, već postojećih sinapsi, čime se formira kratkoročna memorija u okviru koje se privremeno skladište usvojene informacije. Ove informacije se zatim obrađuju, nakon čega se ili odbacuju ili konsoliduju, i to u zavisnosti od njihovog značaja za jedinku (McDermott i Roediger, 2024). U skladu sa tim, do konsolidacije memorije dolazi kada su sinapse dovoljno jako stimulisane, bilo da se radi o stimulusu jačeg intenziteta ili o ponovljenim stimulusima slabijeg intenziteta. S obzirom na to da omogućava nastanak dugoročne memorije koja se trajno skladišti, proces konsolidacije zahteva brojne biohemijske i morfološke promene u okviru sinapsi, uključujući intenzivnu sintezu proteina, aktivaciju kinaza, dendritsko grananje, sinaptogenezu itd (Johansen i sar., 2011). Konačno, očuvana dugoročna memorija ostaje dostupna za ponovno pristupanje, i to kroz aktivaciju sinapsi koje su bile aktivne tokom njenog formiranja i učvršćene u procesu konsolidacije. Kada se dugoročna memorija ponovo aktivira, ona može biti obogaćena novim informacijama ili dodatno učvršćena, što dovodi do dalje stabilizacije pobuđenih sinapsi i posledičnog jačanja memorije (Quirk i Mueller, 2008).

Proces ekstinkcije straha obuhvata sve prethodno navedene faze, pri čemu je ovde neophodno definisati i dva specifična termina koja bliže opisuju ovaj oblik učenja. Prvi termin se označava kao ekstinkcija unutar pojedinačne sesije (*engl. within-session extinction, WSE*), i govori o samom učenju i formiranju kratkoročne memorije ekstinkcije straha. Sa druge strane, ekstinkcija između pojedinačnih sesija (*engl. between-session extinction*) predstavlja parametar koji svedoči o konsolidaciji i nastanku dugoročne memorije ekstinkcije straha (Quirk i Mueller, 2008).

1.3 Sinaptička plastičnost i osnovni mehanizmi uslovljavanja i ekstinkcije straha

Proces sinaptičke plastičnosti podrazumeva promenu efikasnosti sinaptičkih veza između neurona u zavisnosti od njihove prethodne aktivnosti. Promena sinaptičke efikasnosti ili sinaptička plastičnosti ima dve osnovne forme: dugotrajno povećanje sinaptičke efikasnosti – dugotrajna potencijacija (*engl. long-term potentiation, LTP*) i dugotrajno smanjenje sinaptičke efikasnosti – dugotrajna depresija (*engl. long-term depression, LTD*) (Martin i sar., 2000). LTP i LTD su prvobitno opisani u HPC i malom mozgu, a kasnija istraživanja su pokazala prisustvo ovih obrazaca neuronske aktivnosti i u drugim delovima mozga, uključujući amigdal i PFC (Herry & Garcia, 2002; Müller i sar., 2009; Takita i sar., 1999), strukture ključne za regulaciju straha. U skladu sa tim, ne iznenađuje činjenica da se LTP i LTD nalaze u osnovi procesa uslovljavanja i ekstinkcije straha, o čemu će biti nešto više reči u daljem tekstu.

Uslovljavanje straha je oblik asocijativnog učenja koji podrazumeva formiranje US-BS asocijacije. U slučaju paradigme signalnog uslovljavanja straha, do nastanka asocijacije dolazi zahvaljujući konvergenciji senzornih puteva koji nose informaciju o zvuku (US) i električnom šoku (BS) na istu subpopulaciju postsinaptičkih neurona u okviru amigdale (Johansen i sar., 2011). Mehanizam koji leži u osnovi novonastale asocijacije obuhvata generisanje LTP po principu Hebove sinaptičke plastičnosti (Johansen i sar., 2011). Ova teorija podrazumeva da istovremena aktivacija presinaptičke i postsinaptičke ćelije dovodi najpre do uspostavljanja, a sa ponovljenim izlaganjem i jačanja njihove međusobne sinaptičke veze, odnosno nastanka LTP (Bear i sar., 2015). U kontekstu uslovljavanja straha, jaki BS „inputi” dovode do depolarizacije postsinaptičkog neurona sa kojim sinaptičku vezu ostvaruju i neuroni auditornog puta koji prenosi informaciju o US. Zahvaljujući vremenskoj povezanosti ova dva stimulusa, dolazi do jačanja sinapsi između US „inputa” i depolarizovanih postsinaptičkih neurona, čime US stiče sposobnost da nadalje samostalno aktivira ove ćelije (Johansen i sar., 2011), dovodeći do ispoljavanja straha.

Sa druge strane, prema Hebovoj teoriji, odsustvo simultane aktivacije dva neurona dovodi do slabljenja njihovih sinapsi, odnosno do formiranja LTD. Ovde treba napomenuti da iako LTD podrazumeva snižen nivo neuronske aktivnosti, ovaj vid sinaptičke plastičnosti ravnopravno učestvuje u procesima učenja i pamćenja. Konkretno, tokom ekstinkcije straha dolazi do slabljenja originalne US-BS asocijacije, i to zahvaljujući nastanku LTD u prethodno aktivnim sinapsama US „inputa”, koje u odsustvu pomoći od strane BS u izazivanju depolarizacije ciljnih postsinaptičkih neurona gube na efikasnosti (Pape i Pare, 2010).

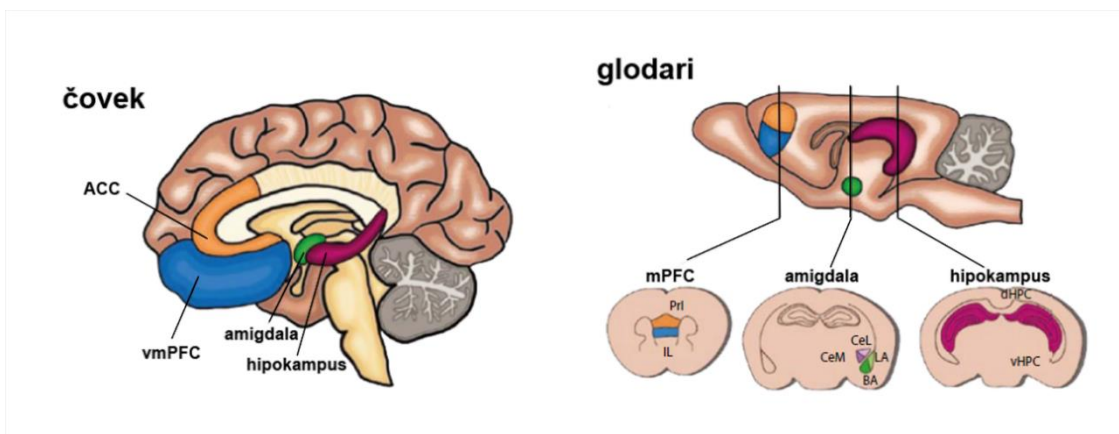
Na molekulskom nivou, ključnu ulogu u nastanku LTP i LTD igraju NMDA i receptori α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (AMPA) (Martin i sar., 2000). Za aktivaciju NMDA receptora je neophodno vezivanje glutamata i njegovog ko-agoniste glicina za odgovarajuća ligand-vezujuća mesta na samom receptoru, dok je njegova jonska provodljivost voltažno-zavisna i direktno uslovljena blokadom pore kanala jonima Mg^{2+} . Depolarizacija postsinaptičke membrane izmešta jone Mg^{2+} sa pozicije u kojoj blokiraju protok struje kroz NMDA receptore, čime je dalje omogućen influks Ca^{2+} u postsinaptičku ćeliju (Lüscher i Malenka, 2012). Kako su NMDA receptori i ligand-zavisni i voltažno-osetljivi, ostvarivanje njihove funkcije zavisi od koordinisane aktivnosti presinaptičkog i postsinaptičkog neurona, što predstavlja i neophodan preduslov za nastanak LTP. Naime, snažan influks Ca^{2+} u postsinaptičku ćeliju pokreće različite biohemijske mehanizme koji dovode do jačanja sinapse, od kojih su najznačajniji fosforilacija AMPA receptora i njegovo umetanje u postsinaptičku membranu (Lüscher i Malenka, 2012) (Bear i sar., 2015). Nasuprot tome, niska stopa influksa Ca^{2+} kroz NMDAR indikativna za slabo podudaranje u aktivnosti presinaptičke i postsinaptičke ćelije dovodi do pokretanja drugačijih unutarćelijskih signalnih kaskada. Njihov krajnji efekat uključuje defosforilaciju i internalizaciju AMPA receptora, što posledično dovodi do slabljenja ovakvih sinapsi, odnosno generisanja LTD (Lüscher i Malenka, 2012) (Bear i sar., 2015).

1.4 Moždane strukture uključene u procese uslovljavanja i ekstinkcije straha

Sa aspekta evolucije, nervno kolo regulacije straha kod sisara je izuzetno očuvano (LeDoux, 2012). Ova činjenica je od velikog značaja za istraživanja u oblasti učenja i ekstinkcije straha, s obzirom na to da se moždane strukture uključene u regulaciju straha kod glodara, kao najčešće korišćenih model organizama, i čoveka podudaraju. Nervno kolo regulacije straha čine tri strukture, od kojih svaka ima ulogu i u uslovljavanju i u ekstinkciji straha (Slika 4.) (Quirk i Mueller, 2008):

- amigdala – usvajanje straha/ekstinkcije straha; čuvanje memorije straha/ekstinkcije straha
- medijalna prečeaona kora (*engl. medial prefrontal cortex, mPFC*) – konsolidacija i pristupanje memoriji straha/ekstinkcije straha
- hipokampus (*engl. hippocampus, HPC*) – prepoznavanje konteksta uslovljavanja straha/ekstinkcije straha

Pored navedenih, u regulaciju straha kod sisara su uključene i strukture koje kontrolišu fiziološke i bihevioralne aspekte straha, hipotalamus i periakvaduktalna siva masa. Dalje, u proces je uključen i talamus, koji predstavlja glavnog „prenosioca” senzornih informacija koje dospevaju do amigdale, kao i anteriorna pojasna kora (*lat. cingulum*), koja ima ulogu u kontroli emocija (Johansen i sar., 2011; J. Tang i sar., 2005).



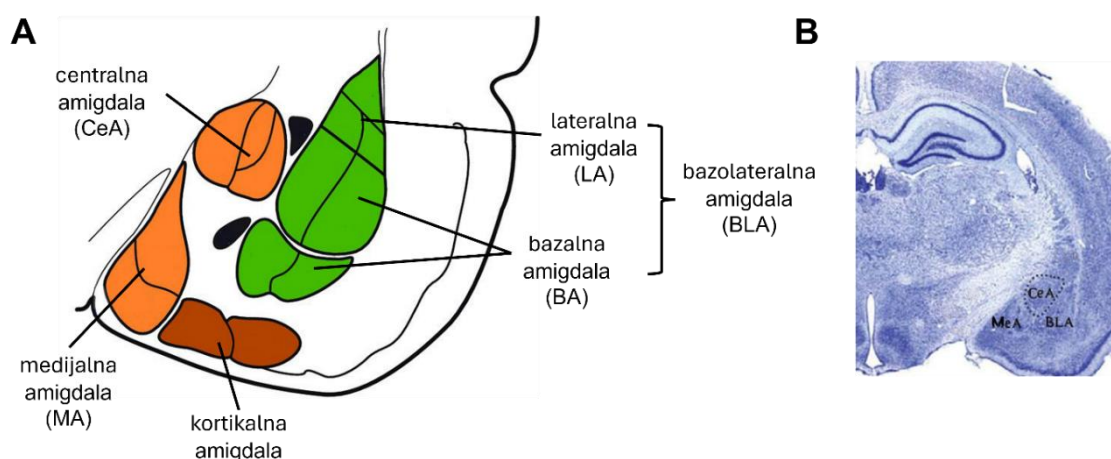
Slika 4. Shematski prikaz moždanih struktura uključenih u procese uslovljavanja i ekstinkcije straha. ACC (engl. *anterior cingulate cortex*), anteriorna pojasna kora; (v)mPFC (engl. *(ventro)medial prefrontal cortex*), (ventro)medijalna prečelna kora; PrL, prelimbička kora; IL, infralimbička kora; CeM, centralna medijalna amigdala; CeL, centralna lateralna amigdala; BA, bazalna amigdala; LA, lateralna amigdala; dHPC, dorzalni hipokampus; vHPC, ventralni hipokampus. Preuzeto i modificirano iz Wotjak i Pape, 2013.

1.4.1 Amigdala

Amigdala je parna moždana struktura bademastog oblika, sastavljena od grupe jedara smeštenih u temporalnom režnju, u blizini HPC. Amigdalu čine tri anatomske jasno definisane podstrukture (Knapska i sar., 2007; Pape i Pare, 2010), između kojih se nalazi umetnuta grupa specijalizovanih, interkalirajućih ćelija (engl. *intercalated cells*, ITCs) (Slika 5.):

- bazolateralna amigdala (BLA)
- centromedijalna amigdala, koju čine centralna (CeA) i medijalna amigdala
- kortikalna grupa jedara
- interkalirajuće ćelije (engl. *intercalated cells*, ITCs)

S obzirom na ključnu ulogu koju igraju u procesima uslovljavanja i ekstinkcije straha, u daljem tekstu će detaljnije biti opisana struktura i funkcija BLA, CeA i ITCs.



Slika 5. Shematski (A) i mikroskopski (B) prikaz strukture amigdale. CeA, centralna amigdala; BLA, bazolateralna amigdala; MeA, medijalna amigdala; LA, lateralna amigdala; BA, bazalna amigdala. Slike preuzete i modificirane iz (A) Knapska i sar., 2007 i (B) Margatho i sar., 2009.

BLA uključuje lateralnu amigdalnu (LA) i bazalni kompleks jedara, koji čine bazomedijalno i bazolateralno jedro. U okviru ove strukture postoje dva tipa neurona: ekscitatorni piramidni neuroni, koji čine oko 80% neuronske populacije BLA, i inhibitorni interneuroni, koji čine preostalih 20% (Pape i Pare, 2010). Piramidni, glutamatski neuroni mogu uspostavljati lokalne sinapse unutar BLA ili se pružati do drugih struktura sa kojima je BLA povezana i formirati sinaptičke veze sa njima. Sa

druge strane, GABA (*engl. γ -aminobutyric acid*) interneuroni su uključeni isključivo u održavanje lokalnih inhibitornih kola u okviru BLA (Pape i Pare, 2010). BLA, odnosno preciznije LA, predstavlja mesto integracije zvučnog US i somatosenzornog BS, što joj omogućava ostvarivanje uloge u usvajanju i skladištenju memorije straha. Osim toga, BLA učestvuje i u formiranju tzv. US-bez BS asocijacije, što omogućava odvijanje procesa usvajanja i čuvanja memorije ekstinkcije unutar ove strukture (Pape i Pare, 2010).

CeA se deli na lateralni (*engl. central lateral amygdala, CeL*), medijalni (*engl. central medial amygdala, CeM*) i kapsularni deo. Od najvećeg značaja za diskusiju o regulaciji straha jeste CeM, deo amigdale čija aktivnost je neophodna za ispoljavanje straha. CeM je povezana sa hipotalamusom, koji je odgovoran za fiziološke reakcije straha, uključujući aktivaciju simpatičkog nervnog sistema i indirektnu regulaciju oslobađanja adrenalina i kortizola (Bear i sar., 2015). CeM takođe ostvaruje vezu i sa periakvaduktalnom sivom masom srednjeg mozga, regionom uključenim u ispoljavanje bihejvioralnih reakcija straha (borba, beg ili „zamrzavanje” od straha) (Bear i sar., 2015). CeA je dominantno sačinjena od inhibitornih GABA neurona, koji uz formiranje lokalnih inhibitornih kola takođe šalju signale i do drugih moždanih struktura (Pape i Pare, 2010).

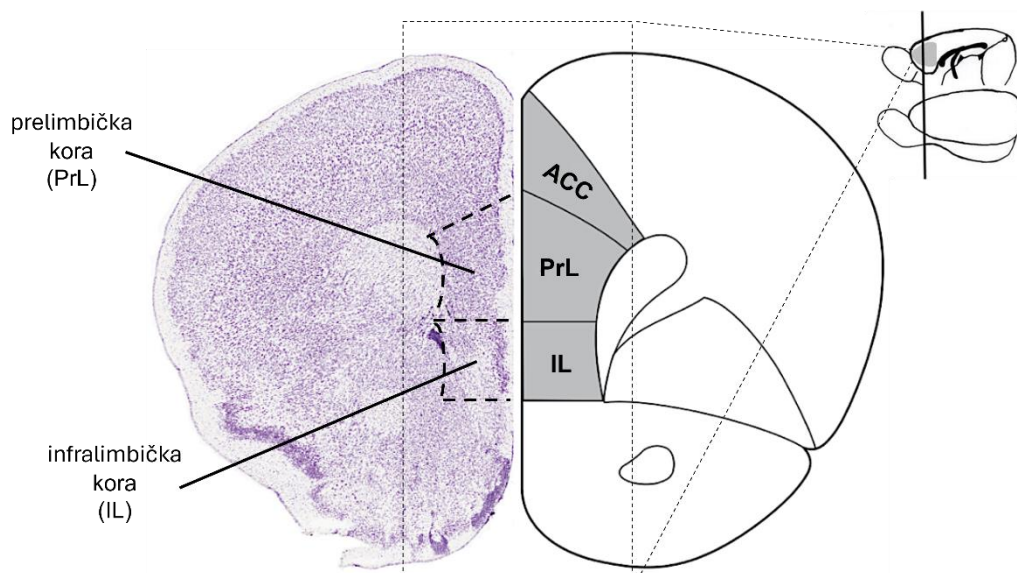
ITCs čine masu primarno GABA neurona, i nalaze se na više mesta unutar amigdale. Ove ćelije sačinjavaju spoljašnju kapsulu koja lateralno ograničava BLA (ITC-L), zatim intermedijernu kapsulu koja odvaja BLA od CeA (ITC-M), dok je najveća grupacija ovih ćelija smeštena ventralno od CeA. Funkcionalno gledano, ITCs primaju signale iz BLA i drugih moždanih struktura (kao što je mPFC) i regulišu protok informacija do CeA, igrajući ključnu ulogu u modulaciji njene aktivnosti (Pape i Pare, 2010).

1.4.2 Prečeaona kora

PFC je moždani region koji zauzima prednji deo čeonog režnja, ispred premotorne kore, i koji predstavlja asocijativnu zonu sa ulogom u obavljanju viših kognitivnih funkcija, ispoljavanju složenih oblika ponašanja, kao i regulaciji i obradi emocija, procesima za koje se naročito vezuje njegov medijalni deo (Nakao i sar., 2009). mPFC čini nekoliko regiona značajnih za procese regulacije straha (Slika 6.) (Giustino i Maren, 2015):

- prelimbička (PrL) kora – ispoljavanje straha
- infralimbička (IL) kora – ekstinkcija straha
- anteriorna pojasna kora (*engl. anterior cingulate cortex, ACC*) – usvajanje i ispoljavanje kontekstualnog straha (de Lima i sar., 2022)

PrL i IL predstavljaju dva anatomske bliska regiona mPFC, pri čemu se PrL nalazi dorzalno u odnosu na IL. Funkcionalno gledano, aktivnost PrL je povezana sa ispoljavanjem straha, dok je aktivnost IL vezana za njegovu ekstinkciju (Corcoran i Quirk, 2007; Knapska i Maren, 2009). mPFC je jako dobro povezan sa amigdalom, pri čemu se PrL i IL regioni projektuju na različite subpopulacije ćelija u okviru BLA (Arruda-Carvalho i Clem, 2015; Pape i Pare, 2010), dok je IL povezana i sa ITCs (Pape i Pare, 2010).



Slika 6. Mikroskopski (levo) i šematski (desno) prikaz strukture ventromedijalne prečeeone kore. ACC (*engl. anterior cingulate cortex*), anteriorna pojasna kora; PrL, prelimbička kora; IL, infralimbička kora. Slika preuzeta i modifikovana iz Blazon, 2018 i Bizon i sar., 2012.

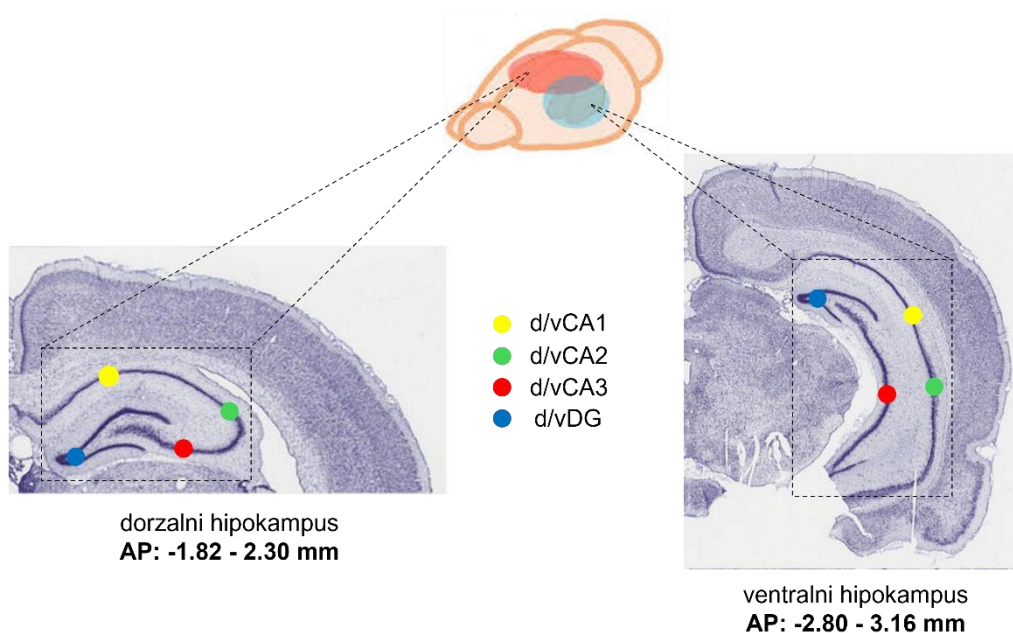
1.4.3 Hipokampus

HPC je moždana struktura pozicionirana duboko unutar medijalnog slepoočnog režnja. Predstavlja ključnu strukturu za procese učenja, formiranja i skladištenja različitih tipova memorije, kao i za mapiranje i snalaženje u prostoru i regulaciju emocija. Anatomski, HPC se deli na dorzalni i ventralni region, koji se razlikuju po svojoj funkciji (Fanselow i Dong, 2010). Dorzalni hipokampus (*engl. dorsal hippocampus*, dHPC) je uključen u prostorno učenje i snalaženje u prostoru, dok je ventralni hipokampus (*engl. ventral hippocampus*, vHPC) odgovoran za regulaciju emocija (Fanselow i Dong, 2010). I dorzalni i ventralni region se dalje dele na nekoliko podregiona (Slika 7.), od kojih svaki ima specifičnu ulogu:

- Amonov rog (*lat. Cornu ammonis*, CA) – podeljen na CA1, CA2 i CA3 podregion; obrada informacija, formiranje, konsolidacija i pristupanje različitim tipovima memorije
- subikulum – glavni izlazni deo HPC, integracija informacija iz CA regiona i njihovo slanje dalje ka drugim moždanim strukturama sa kojima je HPC dobro povezan

Uz njih, ovde takođe treba spomenuti i zubatu vijugu (*engl. dentate gyrus*, DG), koja zajedno sa HPC čini hipokampusnu formaciju. Ovaj region predstavlja glavni ulazni deo HPC, koji ima ulogu u razlikovanju opaženih stimulusa (Anand i Dhikav, 2012).

Tokom procesa uslovljavanja i ekstinkcije straha, HPC je prvenstveno zadužen za prepoznavanje konteksta, a obrađene informacije dalje šalje amigdali i mPFC, regionima sa kojima je naročito dobro povezan vHPC (Ishikawa i Nakamura, 2006). Na ovaj način, HPC utiče na ponašanje životinja, usmeravajući ga u smeru ispoljavanja ili inhibicije straha u zavisnosti od prepoznatog konteksta.



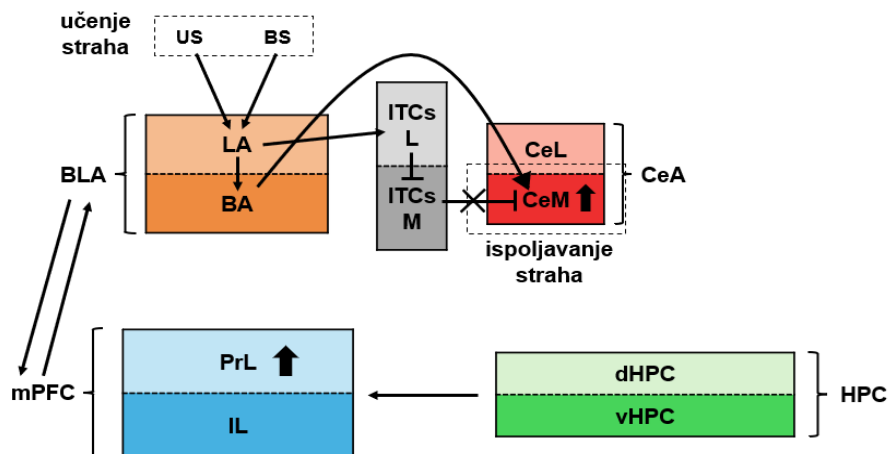
Slika 7. Mikroskopski i šematski prikaz strukture dorzalnog i ventralnog hipokampusa. d/vCA1, dorzalni/ventralni CA1 region; d/vCA2, dorzalni/ventralni CA2 region; d/vCA3, dorzalni/ventralni CA3 region; d/vDG, dorzalna/ventralna zubata vijuga; AP, anteroposteriorno. Slika preuzeta i modificovana iz Hong i Kaang, 2022 i Kirby i sar., 2013.

1.5 Uloga specifičnih moždanih struktura u regulaciji straha

1.5.1 Učenje i ispoljavanje straha

Kao što je prethodno navedeno, amigdala predstavlja glavnu strukturu uključenu u procese učenja i ispoljavanja straha. U lateralnom jedru BLA dolazi do formiranja asocijacije između US i BS, što omogućava učenje i skladištenje memorije straha. Sa druge strane, da bi se strah ispoljio, neophodna je pojačana aktivnost CeM, pri čemu je tokom uslovljavanja straha BLA ta koja reguliše aktivnost CeM (Pape i Pare, 2010).

U okviru paradigme signalnog uslovljavanja straha, u lateralnom jedru BLA dolazi do konvergencije auditornih (US) i somatosenzornih (BS) puteva, koji se „kopčaju” na istu subpopulaciju amigdalinih neurona (Johansen i sar., 2011), čime je omogućeno formiranje US-BS asocijacije. Mehanizam koji leži u osnovi stvaranja ove asocijacije je generisanje NMDA-zavisnog LTP po principu Hebove sinaptičke plastičnosti (Johansen i sar., 2011), pri čemu je krajnji rezultat aktivacija piramidnih LA neurona. Informacija se od ove subpopulacije ćelija dalje prenosi ka CeM, čija aktivacija dovodi do ispoljavanja straha u odgovoru na BS. U bazalnim uslovima, aktivnost LA je regulisana preko lokalnih inhibitornih kola (Pape i Pare, 2010). Tokom uslovljavanja straha, neophodno je da dođe do smanjenja njihove aktivnosti (Johansen i sar., 2011), čime se skida inhibicija sa piramidnih neurona LA, koji sada mogu da aktiviraju CeM. LA indirektno aktivira CeM na dva načina. Prvi način podrazumeva da LA ostvaruje ekscitatornu vezu sa BA, koja zatim šalje ekscitatorne projekcije do CeM. Drugi način aktivacije CeM uključuje mehanizam disinhibicije, s obzirom da se LA ekscitatorno projektuje na ITC-L, koje zatim inhibiraju ITC-M, čime se skida inhibicija sa CeM (Pape i Pare, 2010) (Slika 8.).



Slika 8. Shematski prikaz učenja i ispoljavanja straha. BLA, bazolateralna amigdala; US, uslovni stimulus; BS, bezuslovni stimulus; LA, lateralna amigdala; BA, bazalna amigdala; ITCs-L, lateralna grupacija interkalirajućih ćelija; ITCs-M, medijalna grupacija interkalirajućih ćelija; CeL, lateralni deo centralne amigdale; CeM, medijalni deo centralne amigdale; CeA, centralna amigdala; mPFC, medijalna prečiona kora; PrL, prelimbički region; IL, infralimbički region; dHPC, dorzalni hipokampus; vHPC, ventralni hipokampus; HPC, hipokampus.

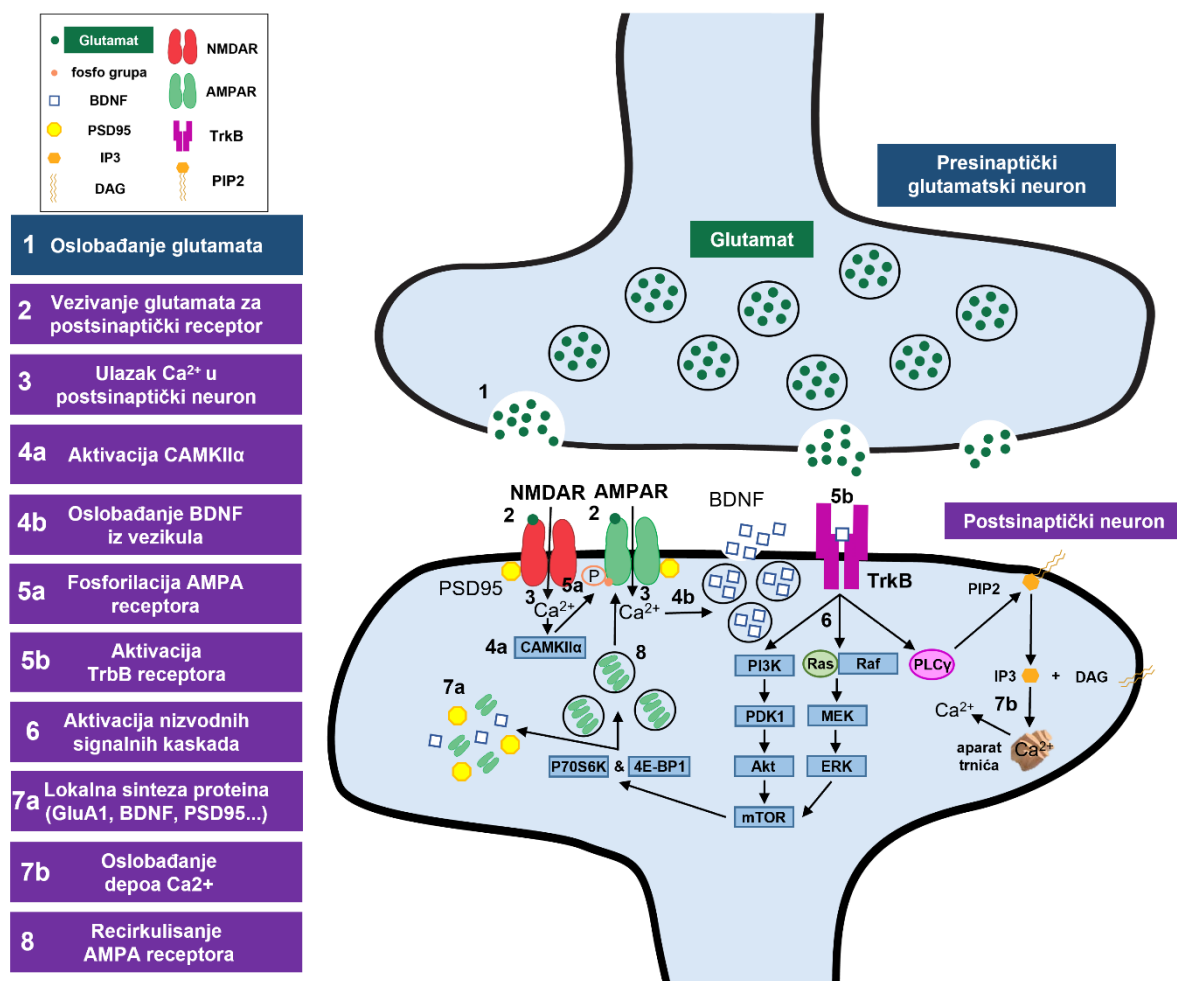
Pored veze BLA sa CeM, ključnu ulogu u usvajanju i daljoj konsolidaciji memorije straha igraju i recipročne projekcije između BLA i mPFC. BLA prenosi informacije o prepoznatim stimulusima do mPFC, koji ih integriše sa kontekstualnim informacijama koje dolaze iz HPC (Quirk & Mueller, 2008). Ovde treba istaći da su, iako se dugo smatralo da je aktivnost HPC specifično vezana za kontekstualno uslovljavanje i ekstinkciju straha, kasnija istraživanja pokazala da ova struktura igra značajnu ulogu i u signalnim paradigmatima učenja straha (Maren, 2008). Na osnovu prirode prepoznatih stimulusa (US^+/US^-), aktivira se tačno određeni podregion mPFC, što zatim putem projekcija do različitih delova amigdale rezultuje usmeravanjem ponašanja životinja u pravcu ispoljavanja ili inhibicije straha (Izquierdo i sar., 2016) (Slika 8.). Tokom uslovljavanja straha, pojačana je frekvencija okidanja neurona u okviru PrL regiona mPFC (Izquierdo i sar., 2016), pri čemu projekcije koje potiču iz ovog regiona dalje pobuđuju glutamatske BLA neurone koji se „kopčaju” na CeM (Pape i Pare, 2010).

1.5.2 Ekstinkcija straha

Ekstinkcija straha zahteva koordinisanu aktivnost sve tri strukture u okviru nervnog kola zaduženog za regulaciju straha. Proces učenja i skladištenja memorije ekstinkcije straha je prevashodno povezan sa funkcijom amigdale, dok IL region mPFC predstavlja glavno mesto konsolidacije i pristupanja memoriji ekstinkcije. HPC, s druge strane, učestvuje u modulaciji procesa ekstinkcije u zavisnosti od konteksta u kojem se životinja nalazi (Quirk i Mueller, 2008).

Ekstinkcija straha podrazumeva formiranje nove US-bez BS asocijacije i istovremeno slabljenje originalne US-BS asocijacije. Ovi procesi se odvijaju unutar BLA, i povezani su sa aktivnošću dve različite subpopulacije ekscitatornih neurona: „neurona straha” i „neurona ekstinkcije” (Herry i sar., 2008). „Neuroni straha” imaju pojačanu frekvenciju okidanja akcionih potencijala na zvučni stimulus uparen sa električnim šokom (US^+) tokom i neposredno nakon uslovljavanja straha. Tokom procesa ekstinkcije, ova povećana aktivnost se vraća na bazalni nivo, pri čemu „neuroni straha” postaju inhibirani nakon izlaganja samostalnom US (US^-). Suprotno tome, „neuroni ekstinkcije” pokazuju pojačanu aktivnost tokom procesa ekstinkcije straha, odnosno u odgovoru na ponovljene US^- (Slika 9.). Posledično, do promene u ponašanju životinja u smeru suzbijanja straha dolazi kada aktivnost „neurona ekstinkcije” nadmaši aktivnost „neurona straha”. Razlike u funkciji između ovih neurona se mogu dovesti u vezu sa njihovom različitom povezanošću sa mPFC i HPC (Herry i sar., 2008). Ipak, nije poznato na koji način ove subpopulacije neurona ostvaruju veze kako unutar BLA, tako i sa CeM.

adapterske proteine, čime je omogućeno umetanje novih AMPA receptora u postsinaptičku membranu (Diering i Huganir, 2018).



Slika 10. Shematski prikaz molekularnih mehanizama ekstinkcije straha. NMDAR, N-metil-D-aspartat receptor; AMPAR, receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline; BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), neurotrofički faktor poreklom iz mozga; TrkB (engl. *tropomyosin receptor kinase B*), tropomiozinski receptor kinaze B; PSD95 (engl. *postsynaptic density protein 95*), protein postsinaptičke gustine težine 95 kDa; PIP2, fosfatidil-inozitol 4, 5 bifosfat; CAMKII α (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α), kalcijum-kalmodulin zavisna proteinska kinaza II α ; P70S6K (engl. *ribosomal protein S6 kinase*), P70 ribozomalna S6 kinaza; 4E-BP1 (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), vezujući protein 1 eukariotskog faktora inicijacije translacije 4E; PI3K (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*), fosfatidilinozitol 3-kinaza; PDK1 (engl. *phosphoinositide-dependent kinase 1*), fosfoinozitolid-zavisna kinaza 1; Akt, protein kinaza B; mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*), sisarska kinaza podložna dejstvu rapamicina; Ras (engl. *rat sarcoma*), Ras GTPaza; RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*), RAF kinaza; MEK, mitogenima-aktivirana proteinska kinaza kinaze; ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*), ekstraćelijskim signalima-regulisana kinaza; PLC γ (engl. *phospholipase C γ*), fosfolipaza C gama; IP3, inozitol-1, 4, 5-trifosfat; DAG, diacilglicerol.

Pored aktivacije CAMKII, snažan influks Ca^{2+} dovodi i do oslobađanja BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*) iz ćelijskih vezikula u prostor sinaptičke pukotine (Kojima i Mizui, 2017). Oslobodeni BDNF se veže za svoj receptor visokog afiniteta, TrkB (engl. *tropomyosin receptor kinase B*) (Kowiański i sar., 2018). BDNF-posredovana aktivacija TrkB receptora dalje pokreće tri signalna puta: PI3K (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K)/protein kinaza B (Akt), Erk (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) i PLC γ (engl. *phospholipase C γ*) (Kowiański i sar., 2018). PI3K-Akt put aktivira mTOR kinazu (engl. *mammalian target of rapamycin*, mTOR), koja deluje kao senzor za različite signale i igra ključnu ulogu u koordinaciji ćelijskog odgovora (Hoeffler

i Klann, 2010), čime oblikuje i reakciju neurona na stimulaciju. mTOR signalni put je takođe indirektno regulisan i aktivnošću Erk kinaze (Winter i sar., 2011). Sa druge strane, PLC γ katalizuje razlaganje fosfatidil-inozitol 4, 5 bifosfata (PIP2) do inozitol-1, 4, 5-trifosfata (IP3) i diacilglicerol (DAG), pri čemu je IP3 sekundarni glasnik koji dovodi do oslobađanja kalcijuma iz aparata dendritskih trnica, strukture koja predstavlja depo ovih jona unutar dendrita (Rosado i sar., 2022) (Slika 10.).

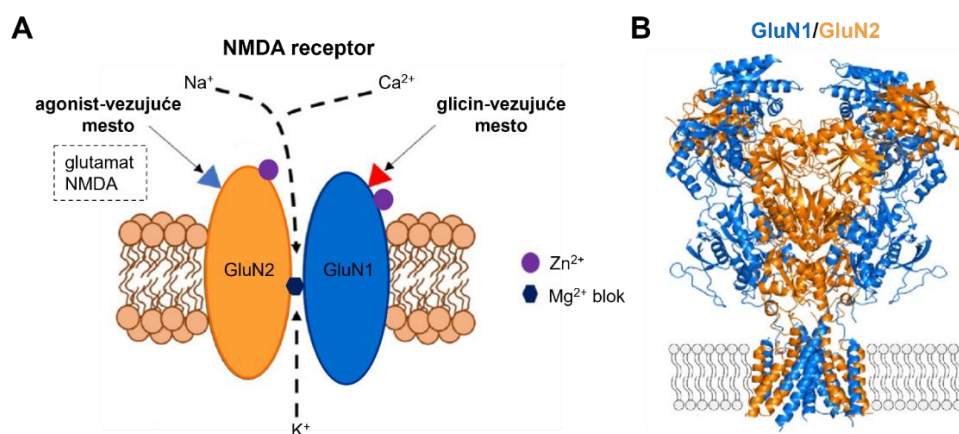
Pored navedenih brzih efekata, ulazak jona kalcijuma posredovan aktivacijom glutamatskih receptora takođe dovodi i do genomskih efekata. Mehanizmom koji podrazumeva transport Ca²⁺/kalmodulinskog kompleksa od postsinapse do jedra, kao i njegovu translokaciju u nukleus (Ma i sar., 2014), Ca²⁺ doprinosi aktivaciji jedarne CAMKIV (*engl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV*). Ova kinaza fosforiliše CREB (*engl. cAMP-response element binding protein*), transkripcioni faktor koji između ostalog reguliše ekspresiju gena ranog ćelijskog odgovora poput cFos, kao i najzastupljenijeg trofičkog faktora u mozgu, BDNF (Nair i Vaidya, 2006). čime se ostvaruje efekat na sinaptičku plastičnost.

1.6.1 NMDA i AMPA receptori

1.6.1.1 NMDA receptori

NMDA receptori su ligand-zavisni jonotropni receptori koji učestvuju u regulaciji brojnih procesa u centralnom nervnom sistemu (CNS). Ovi receptori utiču kako na formiranje i sazrevanje sinapsi tokom razvića, tako i na ostvarivanje sinaptičke plastičnosti u vidu LTP i LTD tokom čitavog života jedinke (Ewald i Cline, 2009). Međutim, treba istaći i da prekomerna aktivacija NMDA receptora dovodi do pojave ekscitotoksičnosti, odnosno odumiranja neurona usled preteranog influksa Ca²⁺ koji uzrokuje oštećenje ćelija (Dong i sar., 2009).

NMDA receptore odlikuje nekoliko jedinstvenih svojstava po kojima se razlikuju od drugih glutamatskih receptora. Ova svojstva uključuju osetljivost na promenu membranskog potencijala, visoku propustljivost za Ca²⁺ i obavezno vezivanje dva liganda, glutamata i glicina, kako bi receptor bio aktiviran (Hansen i sar., 2018) (Slika 11.).



Slika 11. Struktura NMDA receptora. Shematski prikaz strukture NMDA receptora (A) i trodimenzionalni prikaz modela GluN1/GluN2 receptorskog kompleksa (B). Preuzeto i modifikovano iz Hansen i sar., 2018 i Soda i sar., 2023.

Strukturno gledano, NMDA receptori su heterotetrameri sastavljeni od subjedinica koje pripadaju GluN1, GluN2 (GluN2A-GluN2D) i GluN3 (GluN3A-GluN3B) grupi (Baez i sar., 2018). U sastav funkcionalnog NMDA receptora obavezno ulaze dve konstitutivne GluN1 subjedinice, dok preostale dve subjedinice pripadaju GluN2 (Slika 11.), ili ređe GluN3 grupi, pri čemu receptori mogu imati diheteromernu ili triheteromernu organizaciju (Baez i sar., 2018). Subjedinice NMDA receptora se različito eksprimiraju tokom razvića i imaju tkivno-specifičnu distribuciju (Cull-Candy i Leszkiewicz, 2004), a njihov sastav direktno određuje biofizička i farmakološka svojstva receptora (Paoletti i sar., 2013). Takođe, različite NMDA subjedinice ostvaruju interakcije sa različitim

unutarćelijskim proteinima i pokreću različite signalne kaskade, što predstavlja ključni faktor koji doprinosi njihovoj funkcijskoj raznovrsnosti.

Kada govorimo o subjedinicama NMDA receptora, najviše pažnje privlače GluN2A i GluN2B subjedinica, čije su razlike, naročito u kinetičkim svojstvima, jako dobro okarakterisane. Iako kanalski kompleksi koji sadrže obe subjedinice provode Ca^{2+} i osetljivi su na Mg^{2+} blok (Paoletti i sar., 2013), receptori koji sadrže GluN2A imaju bržu aktivaciju i deaktivaciju u poređenju sa onima koji sadrže GluN2B (Shipton i Paulsen, 2014). Posledično, receptorski kompleks koji sadrži GluN2A subjedinice karakteriše brza, visoko-frekventna aktivnost, dok se receptori koji sadrže GluN2B subjedinice odlikuju postojanijom, nisko-frekventnom aktivnošću. Ove razlike u kinetici subjedinica utiču na količinu Ca^{2+} jona koji ulaze u ćeliju i na aktivaciju signalnih puteva nizvodno od receptora, što oblikuje njihovu funkciju. Postsinaptički NMDA receptori su ti koji igraju ključnu ulogu u ostvarivanju sinaptičke plastičnosti, a pretežno sadrže GluN2A subjedinice, uz određeni udeo GluN2B (Zhu i Paoletti, 2015). Sa druge strane, ekstrasinaptički NMDA receptori su dominantno sačinjeni od GluN2B subjedinica koje omogućavaju pokretanje signalnih kaskada ćelijske smrti, a osnovna funkcija im je održavanje sinaptičke homeostaze (Zhu i Paoletti, 2015).

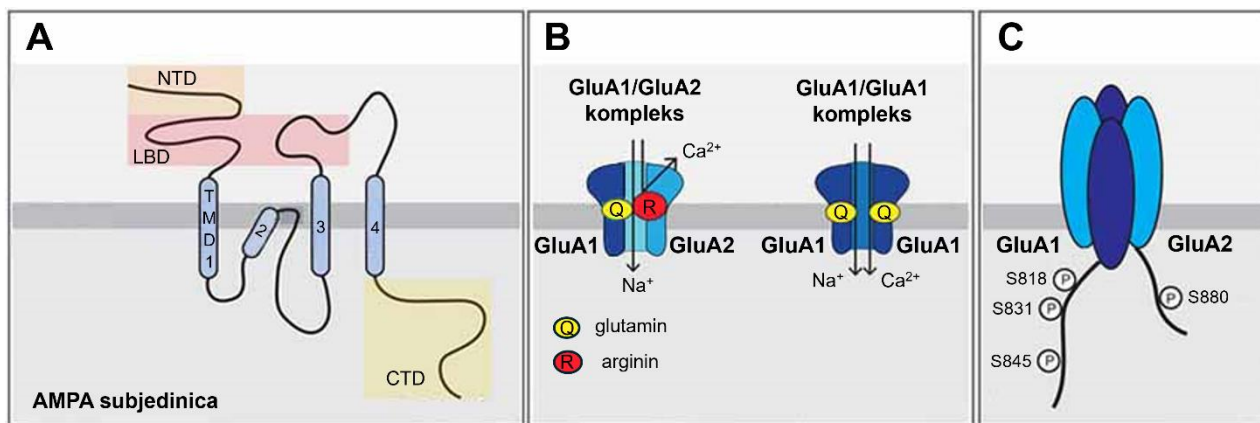
Nivo ekspresije GluN2A i GluN2B subjedinica se takođe menja tokom razvika. U ranom postnatalnom periodu dominantna je GluN2B subjedinica, dok GluN2A vremenom postaje sve zastupljenija, što dovodi do povećanja odnosa GluN2A/GluN2B unutar ukupne populacije NMDA receptora (X.-M. Zhang i Luo, 2013). U adultnom mozgu, GluN2A i GluN2B subjedinice predstavljaju primarno zastupljene subjedinice NMDA receptora u moždanoj kori i HPC (X.-M. Zhang i Luo, 2013), a treba istaći da se ekspimiraju i u amigdali (Dalton i sar., 2012). U skladu sa tim, ne iznenađuje činjenica da GluN2A i GluN2B subjedinice igraju bitnu ulogu u procesu ekstinkcije straha.

1.6.1.2 AMPA receptori

Slično NMDA receptorima, i AMPA receptori predstavljaju ligand-zavisne jonske kanale, odnosno glutamatske jonotropne receptore koji utiču na sinaptičku plastičnost, tj. generisanje LTP i LTD. Ovi receptori prvi reaguju na prisustvo glutamata u sinaptičkoj pukotini, što dovodi do njihove aktivacije, ulazne struje Na^{+} i Ca^{2+} i depolarizacije postsinaptičkog neurona, čime se dalje omogućava aktivacija NMDA receptora (Bear i sar., 2015). U skladu sa tim, možemo reći da AMPA receptori usmeravaju inicijalni postsinaptički odgovor neurona.

U poređenju sa NMDA receptorima, AMPA receptori se odlikuju bržom kinetikom i sinaptičkom transmisijom. Oni nisu osetljivi na promene membranskog potencijala, za njihovu aktivaciju je dovoljno vezivanje glutamata za ligand-vezujuće mesto, dok njihova propustljivost za jone Ca^{2+} varira u zavisnosti od subjedinичnog sastava (Bear i sar., 2015). AMPA receptore karakteriše i izuzetna „pokretljivost“, odnosno sposobnost umetanja i uklanjanja iz postsinaptičke membrane (Malinow i Malenka, 2002), pri čemu stopa odvijanja ovih procesa zavisi od subjedinичnog sastava receptora i različitih post-translacionih modifikacija kojima te subjedinice podležu (Diering i Hugarir, 2018).

AMPA receptori su tetrameri sastavljeni od četiri subjedinice, GluA1-GluA4, koje se međusobno kombinuju na različite načine, što određuje kinetiku i biofizičke osobine receptora, kao i njegove interakcije sa različitim unutarćelijskim proteinima (Baranovic, 2021). Svaka subjedinica ima zajedničku osnovnu strukturu, koja se sastoji od N-terminusa, ligand-vezujućeg domena, transmembranskih regiona i C-terminusa (Slika 12.). Iako svaka od subjedinica može da formira homotetramer, većina AMPA receptora su diheteromeri, sastavljeni od dve GluA2 subjedinice u kombinaciji sa dve GluA1 ili dve GluA3 subjedinice (Diering i Hugarir, 2018). Zastupljenost različitih subjedinica AMPA receptora varira tokom razvika, pri čemu se GluA4 subjedinica primarno ekspimirira u ranim fazama života, dok su GluA1, GluA2 i GluA3 podjednako prisutne u adultnom mozgu (Baranovic, 2021). Ipak, njihova distribucija varira od strukture do strukture, gde treba istaći da su sve tri subjedinice prisutne u okviru PFC, HPC i amigdale (Coutinho i Vincent, 2014).



Slika 12. Struktura AMPA receptora. Shematski prikaz strukture i domenske organizacije AMPA receptora (A), GluA1/GluA2 i GluA1/GluA1 receptorskog kompleksa (B) i postranslacionih modifikacija na C-terminusu GluA1/GluA2 heterodimera (C). NTD (*engl. N-terminal domain*), N-terminus; LBD (*engl. ligand-binding domain*), ligand-vezujući domen; CTD (*engl. C-terminal domain*), C-terminus; TMD (*engl. transmembrane domain*), transmembranski domen. Preuzeto i modifikovano iz Purkey i Dell'Acqua, 2020.

Što se tiče međusobnih varijacija, GluA2 se razlikuju od ostalih subjedinica po tome što receptori koji ih sadrže nisu propustljivi za jone Ca^{2+} (Diering i Hugarir, 2018) (Slika 12.). Pored toga, subjedinice AMPA receptora poseduju drugačije citoplazmatske C-terminuse (karboksilne repove), domene koji podležu raznovrsnim post-translacionim modifikacijama, što utiče na njihovu funkciju. Na osnovu dužine C-terminusa, AMPA subjedinice se dele na subjedinice dugog (GluA1 i GluA4) i kratkog repa (GluA2 i GluA3) (Diering i Hugarir, 2018). Pretpostavlja se da se subjedinice dugog repa regrutuju u sinapsu pod uticajem prethodne sinaptičke aktivnosti, dok subjedinice kratkog repa učestvuju u konstitutivnom recirkulisanju AMPA receptora (S. Shi i sar., 2001). Shodno tome, možemo zaključiti da zastupljenost različitih AMPA subjedinica u okviru postsinaptičke membrane zavisi od aktuelnog obrasca sinaptičke aktivnosti.

Većina literature podržava stanovište da GluA1 subjedinica ima dominantnu ulogu u ostvarivanju LTP (uz određeni uticaj GluA2 i GluA3), dok je za generisanje LTD primarno zadužena GluA2 (Diering i Hugarir, 2018). Smatra se da GluA1 subjedinica ostvaruje specifične interakcije sa unutarćelijskim „pomoćnim” proteinima i podleže takvim fosforilacijama koje joj, u slučaju prethodne aktivacije sinapse, omogućavaju umetanje u postsinaptičku membranu (Diering i Hugarir, 2018). Sa druge strane, proteinske interakcije i fosforilacije karakteristične za GluA2 subjedinicu doprinose destabilizaciji njene membranske ukotvljenosti i posledičnoj internalizaciji (Diering i Hugarir, 2018). Shodno tome, jasno je da i GluA1 i GluA2 subjedinica imaju značajan uticaj na proces sinaptičke plastičnosti. Ipak, budući da aktivnost mTOR signalnog puta, jednog od ključnih medijatora ekstinkcije straha, primarno reguliše translaciju GluA1 subjedinice AMPA receptora (N. Li i sar., 2010), o ovoj subjedinici specifično će biti nešto više reči u daljem tekstu.

1.6.1.3 Uloga NMDA i AMPA receptora u ekstinkciji straha

U poslednjih nekoliko decenija, mnogobrojna istraživanja na životinjskim modelima su se bavila ulogom NMDA, i nešto ređe, AMPA receptora u procesima ekstinkcije straha. Veći broj studija je pokazao da sistemska primena MK-801, antagonist NMDA receptora, pre i nakon sesija ekstinkcije negativno utiče kako na usvajanje US-bez BS asocijacije (J. D. Baker i Azorlosa, 1996; Chan i McNally, 2009; Langton i sar., 2007), tako i na njenu konsolidaciju i dugoročno očuvanje (J.-L. Liu i sar., 2009). Što se tiče AMPA receptora, sistemska primena njegovog selektivnog antagonist, NBQX, je dovela do delimičnog narušavanja farmakološki-potpomognute ekstinkcije straha (Girgenti i sar., 2017). Ukoliko se spustimo na nivo moždanih struktura uključenih u regulaciju straha, inhibicija aktivnosti NMDA receptora u amigdali (Falls i sar., 1992) i prečeonj kori (Burgos-Robles i sar., 2007), kao i blokada NMDA i AMPA receptora u HPC (Trent i sar., 2017; B. Zhang i sar., 2017) se dosledno dovodi u vezu sa narušenošću procesa ekstinkcije straha. Sa druge strane,

stimulacija NMDA i AMPA receptora, kako sistemska (Bouton i sar., 2008; Ledgerwood i sar., 2003, 2005; D. Yamada i sar., 2009, 2011; Zushida i sar., 2007), tako i strukturno-specifična (Gomes i sar., 2010; Walker i sar., 2002; Zushida i sar., 2007), pospešuje odvijanje ovog procesa, što sveukupno nedvosmisleno ukazuje na ključnu ulogu jonotropnih glutamatskih receptora u ekstinkciji straha.

Kada je u pitanju doprinos pojedinačnih subjedinica procesu ekstinkcije, pokazano je da nivo GluN2A, GluN2B i GluA1 subjedinica (uključujući i fosforilisane forme) u amigdali, PFC i HPC pozitivno koreliše sa efikasnošću ekstinkcije straha (Fujita i sar., 2012; Gourley i sar., 2009; S. C. Gupta i sar., 2013; Popova i sar., 2014; Y.-W. Shi i sar., 2017; Xue i sar., 2014). Međutim, za razliku od GluN2A subjedinice, čija prekomerna ekspresija u prednjem mozgu narušava proces ekstinkcije (J. Wang i sar., 2021), čak i višestruko povišen nivo GluN2B pozitivno utiče na ovaj vid učenja (Y. P. Tang i sar., 1999). U skladu sa tim, mehanicistička studija Sotres-Bayon i saradnika jasno ukazuje na poseban značaj GluN2B subjedinice u procesima ekstinkcije straha, i to na tkivno-specifičan način. Formiranje US-noBS asocijacije zahteva aktivaciju GluN2B u LA (Sotres-Bayon i sar., 2007), dok je njena aktivnost u mPFC neophodna za konsolidaciju memorije ekstinkcije (Sotres-Bayon i sar., 2009). Sa druge strane, do sada nema mehanicističkih studija koje su se bavile ulogom GluN2A i GluA1 subjedinica u kontekstu ekstinkcije straha, što ukazuje da bi ovakav pravac istraživanja trebalo sprovesti u budućnosti.

1.6.2 mTOR signalni put

mTOR signalni put predstavlja jedan od glavnih mehanizama regulacije procesa u ćeliji, koji na prvom mestu uključuju ćelijski metabolizam, rast i proliferaciju (Graber i sar., 2013; Switon i sar., 2017). U neuronima, ova signalna kaskada pored navedenih funkcija učestvuje u ostvarivanju sinaptičke plastičnosti, i to putem regulacije lokalne, dendritske sinteze sinaptičkih proteina (Hoeffler i Klann, 2010), što predstavlja neophodan preduslov za formiranje dugoročne memorije (Jarome i Helmstetter, 2014). Uz to, mTOR indukuje i morfološke promene na nivou sinapse, stimulišući dendritsko grananje, čime doprinosi posledičnom ostvarivanju novih sinaptičkih kontakata (Urbanska i sar., 2012).

mTOR integriše unutarćelijske i vanćelijske signale, koji između ostalog obuhvataju trofičke faktore i različite neurotransmitere (Santini i sar., 2014). Na ovaj način, mTOR dobija informacije sa aktivnih sinapsi, što podstiče njegovu kinaznu aktivnost i posledičnu sintezu proteina uključenih u remodelovanje i jačanje sinaptičkih veza. Takođe je važno istaći da mTOR negativno utiče na proces degradacije proteina (Switon i sar., 2017), čime je dodatno osigurano prisustvo dovoljne količine sinaptičkih proteina tokom intenzivne aktivnosti sinapse.

Po svojoj strukturi, mTOR je multidomenski protein koji pripada porodici serin/treonin kinaza i formira dva multiproteinska kompleksa, mTORC1 i mTORC2 (Santini i sar., 2014). Ovi kompleksi se razlikuju po svom sastavu, lokalizaciji unutar ćelije, kao i ciljnim proteinima čiju aktivnost regulišu (Santini i sar., 2014). mTORC1 je mnogo bolje okarakterisan od mTORC2, pri čemu je njegova uloga u procesima učenja i formiranja dugoročne memorije dokumentovana u brojnim studijama. Shodno tome, termin mTOR će se u daljem tekstu ove doktorske disertacije koristiti za opisivanje kinaze iz mTORC1.

Enzimska aktivnost mTOR u nervnom sistemu je regulisana velikim brojem uzvodnih molekulskih medijatora, od kojih su među najznačajnijima za procese učenja i memorije Erk i Akt kinaza. Aktivnost ovih kinaza zavisi od influksa jona Ca^{2+} u ćeliju i vezivanja BDNF za TrkB receptor (Ivanov i sar., 2006; Perkinson i sar., 1999; Yoshii i Constantine-Paton, 2010). Erk i Akt funkcionišu tako što fosforilišu specifičnu komponentu mTOR kompleksa koja održava mTOR kinazu u neaktivnom obliku, nakon čega se ona odvaja od kompleksa, ostavljajući prostor za aktivaciju mTOR (Dwyer i Duman, 2013).

Aktivirana mTOR kinaza dalje stimuliše translaciju na pretežno dva načina: fosforilacijom i posledičnom aktivacijom P70S6K (*engl. ribosomal protein S6 kinase*) i fosforilacijom 4E-BP1 (*engl.*

eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) (Switon i sar., 2017). P70S6K fosforiliše ribozomalni S6 protein, komponentu 40S subjedinice ribozoma koja učestvuje u regulaciji translacije proteina (Ruvinsky i Meyuhass, 2006). Takođe, P70S6K inhibira eEF2K (*engl. eukaryotic elongation factor 2 kinase*), čime je omogućeno učešće elongacionog faktora eEF2 (*engl. eukaryotic elongation factor 2*) u elongaciji translacije (Ruvinsky i Meyuhass, 2006). Sa druge strane, fosforilacija 4E-BP1 dovodi do njegovog odvajanja od inicijacionog faktora eIF-4E (*engl. eukaryotic initiation factor 4E*), što omogućava inicijaciju translacije (Santini i sar., 2014). Pokretanjem lokalne translacione mašinerije u dendritima, mTOR pospešuje translaciju proteina sinaptičke plastičnosti, od kojih su neki od najznačajnijih CAMKII, sinapsin, GluN1, GluA1, GluA2 i PSD95 (*engl. post-synaptic density protein 95*) (N. Li i sar., 2010; Switon i sar., 2017).

U skladu sa svojom regulatornom ulogom u translaciji sinaptičkih proteina, mTOR je ključan medijator sinaptičke plastičnosti i procesa učenja i memorije, o čemu svedoči niz studija koje su pokazale da inhibicija mTOR signalnog puta rapamicinom blokira formiranje dugoročne memorije različitih oblika učenja (Bekinschtein i sar., 2007; Blundell i sar., 2008; Dash i sar., 2006; Deli i sar., 2012; Gafford i sar., 2011; Jobim i sar., 2012; Parsons i sar., 2006; Rosa i sar., 2023). Efekti rapamicina su najviše ispitivani u paradigmatama uslovljavanja straha. Ovde je pokazano da je proces učenja straha asociran sa aktivacijom mTOR u amigdali i HPC, dok njegova blokada u ovim strukturama i mPFC ostvaruje negativan efekat na formiranje i očuvanje dugoročne memorije straha (Bekinschtein i sar., 2007; Gafford i sar., 2011; Jobim i sar., 2012; Parsons i sar., 2006; Sui i sar., 2008). Kada je u pitanju sama ekstinkcija straha, nekoliko istraživanja mehanicističke prirode je demonstriralo da je za poboljšanje efikasnosti ekstinkcije bilo putem fizičke aktivnosti bilo farmakološkim tretmanom neophodna aktivacija mTOR signalnog puta (Girgenti i sar., 2017; Iafrati i sar., 2014; Moya i sar., 2020), što upućuje na uzročno-posledičnu vezu između mTOR aktivnosti i procesa ekstinkcije.

1.6.3 BDNF

BDNF pripada porodici neurotrofina (Kowiański i sar., 2018) i jedan je od najvažnijih markera sinaptičke plastičnosti u mozgu. Prisutan je u gotovo svim moždanim regionima, sa visokim nivoima ekspresije detektovanim u HPC, moždanoj kori i amigdali (Yan i sar., 1997). BDNF utiče i na strukturne i na funkcionalne aspekte sinaptičke plastičnosti, i to kako tokom razvika nervnog sistema, tako i u razvijenom mozgu (Kowiański i sar., 2018). Konkretno, ovaj neurotrofički faktor podstiče aksonalni rast i dendritsko grananje, čime doprinosi formiranju novih i remodelovanju postojećih sinapsi zavisno od njihove prethodne aktivnosti. Ovim mehanizmima, BDNF ostvaruje kako kratkoročne, tako i dugoročne efekte na procese učenja i formiranja memorije (Edelmann i sar., 2014).

Gen za BDNF kod glodara se sastoji od osam nekodirajućih egzona (jedanaest kod čoveka), koji se alternativno splajsuju na konstitutivni egzon IX koji kodira za prekursorsku formu BDNF proteina, čime nastaje osam različitih BDNF transkripata (Aid i sar., 2007; You & Lu, 2023). Uz to, egzon IX može da se eksprimira i nezavisno od preostalih osam egzona (Aid i sar., 2007), formirajući zaseban protein-kodirajući transkript. Različiti egzoni BDNF utiču na ćelijsku lokalizaciju i stabilnost transkripata (Cunha i sar., 2010), što određuje njihove specifične uloge u sinaptičkim procesima. Za nas su od posebnog značaja egzoni I i IV, koji učestvuju u formiranju dugoročne memorije (Mizuno i sar., 2012).

Sinteza BDNF je višestepeni proces koji uključuje nastanak nekoliko prekursorskih izoformi proteina. Prvo se u endoplazminom retikulumu sintetiše pre-pro-BDNF, koji se zatim u Goldžijevom aparatu obrađuje do pro-BDNF, nakon čega se ova izoforma iseca do zrelog BDNF (*engl. mature BDNF*, mBDNF) (Kowiański i sar., 2018). Tokom ranog postnatalnog perioda beleže se visoke koncentracije pro-BDNF, dok u odrasloj dobi preovlađuje mBDNF (J. Yang i sar., 2009), pri čemu ove dve izoforme ostvaruju suprotne biološke efekte (Kojima & Mizui, 2017). Pro-BDNF ima negativan uticaj na remodelovanje neurona i podstiče njihovo eliminisanje putem apoptoze (Teng i sar., 2005; J. Yang i sar., 2014), dok mBDNF ostvaruje pozitivan efekat na sinaptičku plastičnost i

pospešuje preživljavanje neurona (Edelmann i sar., 2014). S obzirom da pro-BDNF prevazilazi istraživačke okvire ove doktorske disertacije, termin BDNF će se u daljem tekstu koristiti da opiše isključivo mBDNF.

BDNF ostvaruje svoje efekte kako na presinaptičkom, tako i na postsinaptičkom nivou, i to nakon oslobađanja u prostor sinaptičke pukotine i vezivanja za odgovarajući receptor (Christie i sar., 2008). Oslobađanje BDNF iz vezikula može biti konstitutivno ili se odvijati pod uticajem prethodne sinaptičke aktivnosti ćelije (Kojima i Mizui, 2017), pri čemu sam BDNF doprinosi daljem jačanju sinapse putem nekoliko različitih mehanizama. Na presinaptičkom nivou, BDNF reguliše vezikularno oslobađanje neurotransmitera u sinaptičku pukotinu (Edelmann i sar., 2014), čime ostvaruje brze, kratkoročne efekte na sinaptičku plastičnost. Na nivou postsinapse, BDNF se vezuje za svoj receptor visokog afiniteta TrkB, što pokreće fosforilaciju subjedinica NMDA i AMPA receptora (Caldeira i sar., 2007; Suen i sar., 1997), čime se dodatno postižu brzi, ne-genomski efekti BDNF. Takođe, vezivanje BDNF za TrkB aktivira nekoliko unutarćelijskih signalnih puteva, od kojih su za temu ove disertacije najznačajniji PI3K-Akt i MAPK put (Kowiański i sar., 2018).

PI3K-Akt-mTOR signalni put reguliše lokalnu sintezu sinaptičkih proteina, čime BDNF ostvaruje dugoročne efekte na sinaptičku plastičnost, utičući između ostalog na nivo ekspresije postsinaptičkih NMDA i AMPA receptora (Caldeira i sar., 2007; Small i sar., 1998), regulatora sinaptičke plastičnosti Arc (Yin i sar., 2002) i signalnog molekula CAMKII α (N. Takei i sar., 2004). Sa druge strane, MAPK signalni put je ključan za aktivaciju Erk 1, 2 kinaze, koja pored mTOR fosforiliše i CREB (Impey i sar., 1998), transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju BDNF (Tao i sar., 1998). Pored toga, CREB utiče i na ekspresiju tzv. gena ranog odgovora (*engl. early response genes*), u koje spada i c-Fos, protein koji se smatra pouzdanim markerom neuronske aktivnosti (Bullitt, 1990) i koji je u tom svojstvu ispitivan u okviru ove doktorske disertacije.

O ključnoj ulozi BDNF u sinaptičkoj plastičnosti svedoče i brojne mehanicističke studije na životinjama sa deletiranim genom (*engl. knockouts*, KO) za ovaj protein. Dok homozigotni BDNF KO ne preživljavaju do stadijuma adultne jedinke (Linnarsson i sar., 1997), heterozigotni KO pokazuju deficite u različitim paradigmama učenja i memorije, što je naročito izraženo kod starijih adultnih životinja (Endres i Lessmann, 2012; Linnarsson i sar., 1997; Meis i sar., 2018; Petzold i sar., 2015; Psotta i sar., 2013). Pretpostavlja se da su ovakve promene na nivou ponašanja asocirane sa smanjenom stopom LTP karakterističnom za BDNF (+/-) životinje (Korte i sar., 1995; Meis i sar., 2018; Pozzo-Miller i sar., 1999).

Kada su u pitanju paradigme učenja i pamćenja straha, istraživanja su pokazala da BDNF^{+/-} miševi imaju narušenu sposobnost ekstinkcije straha (Heldt i sar., 2007; Psotta i sar., 2013), što je u skladu sa ulogom BDNF u regulaciji emocionalnih oblika učenja (Andero i Ressler, 2012). BDNF-posredovana aktivacija TrkB receptora u amigdali je neophodna za uspešnu konsolidaciju memorije ekstinkcije (Chhatwal i sar., 2006), dok je prisustvo BDNF u IL regionu mPFC i vHPC takođe ključno za uspešnu ekstinkciju straha (Rosas-Vidal i sar., 2014). U skladu sa tim, efikasnost ekstinkcije straha pozitivno koreliše sa ekspresijom BDNF u amigdali, prečenoj kori i HPC (Karpova i sar., 2011; Peters i sar., 2010; Psotta i sar., 2013), što dodatno potvrđuje ulogu BDNF kao jednog od molekulskih medijatora ovog procesa.

1.7 Razlike u ekstinkciji straha tokom razvića

Tokom razvića jedinke od rođenja do odrasle dobi, mozak prolazi kroz proces sazrevanja, pri čemu se period adolescencije naročito ističe dinamičnim strukturnim i funkcijskim promenama u okviru nervnog kola zaduženog za regulaciju straha (Pattwell i sar., 2013). Ove promene prate specifične ontogenetske zahteve sa kojima se jedinka susreće tokom adolescencije. Ovaj period odlikuje napuštanje „roditeljskog gnezda” i postizanje samostalnosti, uz brojne psihološke i biološko-reproduktivne izazove na koje jedinka mora da odgovori (Pattwell i sar., 2013). U skladu sa tim, adolescencija predstavlja period razvića kada je adaptivno korisno za jedinku da bude u stanju pojačanog opreza.

Adolescencija se u literaturi često opisuje kao ranjiv period razvića tokom kojeg se prvi put javljaju različiti psihijatrijski poremećaji, od kojih su najučestaliji anksiozni poremećaji (Beesdo i sar., 2009; Siegel i Dickstein, 2012). Uz to, procenjeno je da je oko 75% odraslih osoba sa poremećajima povezanim sa strahom ispunjavalo dijagnostičke kriterijume već tokom kasnog detinjstva i adolescencije (Kim-Cohen i sar., 2003). Mnoge promene koje se uočavaju kod anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom se mogu pripisati disregulaciji procesa usvajanja i ekstinkcije straha (Pitman i sar., 2012). S tim u vezi, nije iznenađujuće da su brojne pretkliničke i kliničke studije pokazale da adolescenciju karakteriše narušena ekstinkcija straha, i to prevashodno narušena konsolidacija i pristupanje memoriji ekstinkcije (K. D. Baker i Richardson, 2015; Haddad i sar., 2011; J. H. Kim i sar., 2011; Lu i sar., 2019; McCallum i sar., 2010; Pattwell i sar., 2012). Ovaj fenomen se ogleda i u manje efikasnom odgovoru adolescenata na terapiju (ET), odnosno u većoj verovatnoći relapsa simptoma bolesti nakon terapije (DiMauro i sar., 2013; Ginsburg i sar., 2014).

Izmenjena ekstinkcija straha karakteristična za adolescente se dovodi u vezu sa promenama aktivnosti i međusobne povezanosti struktura koje čine nervno kolo regulacije straha. U ovom kontekstu, treba izdvojiti kasno sazrevanje funkcionalne veze između vHPC i mPFC (Zimmermann i sar., 2019), kao i produženo sazrevanje lokalnih inhibitornih kola unutar vHPC (Caballero i sar., 2013). Takođe, adolescenciju karakteriše i nedovoljno razvijena regulacija aktivnosti amigdale od strane mPFC (Casey i sar., 2010), što se ogleda u njenoj pojačanoj reaktivnosti (Hare i sar., 2008). U skladu sa tim, Pattwell i saradnici su utvrdili da su odsustvo aktivnosti i sinaptičke plastičnosti unutar mPFC kod adolescenata povezani sa narušenom ekstinkcijom straha kod ove starosne grupe (Pattwell i sar., 2012). Konkretno, pokazano je da se kod adolescenata tokom uslovljavanja straha ne aktivira PrL region, dok nakon njegove ekstinkcije ne dolazi do promene u aktivnosti IL mPFC. Ovakvo stanje unutar mPFC je povezano sa odsustvom promena na nivou glutamatske transmisije, odnosno aktivnosti NMDA i AMPA receptora (Pattwell i sar., 2012). S obzirom na nesmetano uslovljavanje straha kod adolescenata (Pattwell i sar., 2012), ovi rezultati sugerišu da aktivnost PrL mPFC nije ključna za ispoljavanje straha, dok je sa druge strane za njegovu ekstinkciju neophodna aktivnost IL mPFC, koji potom nizvodno reguliše aktivnost amigdale.

1.8 Razlike u ekstinkciji straha između polova

Razlike u ekstinkciji straha nisu prisutne samo među različitim starosnim grupama, već se javljaju i između polova, pri čemu se na prvom mestu vezuju za uticaj polnih hormona, pre svega estradiola. Milad i saradnici (2009) su pokazali da ženke koje prolaze trening ekstinkcije straha u proestrusu (visok nivo estradiola i progesterona) postižu sličan uspeh u ekstinkciji straha kao i mužjaci. Suprotno tome, ukoliko se trening sesija ekstinkcije odvija tokom metestrusa (nizak nivo estradiola i progesterona), ženke pokazuju značajno smanjenu efikasnost ekstinkcije straha u poređenju sa mužjacima, ali i sa proestrusnim ženkama (Milad, Iggoe, i sar., 2009). Ovi rezultati dodatno dobijaju na značaju kada se uzme u obzir da su isti zaključci potvrđeni i u kliničkim istraživanjima (Graham i Milad, 2013; Milad i sar., 2010; Zeidan i sar., 2011).

Moždane strukture uključene u regulaciju straha eksprimiraju receptore za estrogene (*engl. estrogen receptor, ER*) poput estradiola (Almey i sar., 2015), što ih čini osetljivim na modulatorne efekte ovog hormona. Estradiol deluje putem ER α i ER β , pri čemu je za procese učenja i pamćenja ekstinkcije straha ključan ER β (Cover i sar., 2014). Istraživanja su pokazala da nivo polnih hormona utiče na stepen aktivnosti amigdale, sa tendencijom smanjene reaktivnosti pri visokim nivoima cirkulišućeg estradiola, odnosno hiperaktivacije pri niskim nivoima (Gingnell i sar., 2012; Goldstein i sar., 2005; Jacobs i sar., 2015). Dalje, ženke koje su prošle trening ekstinkcije straha tokom faze niskog nivoa estradiola pod određenim uslovima pokazuju hipoaktivaciju IL (Gruene i sar., 2014), dok se visok nivo estradiola dovodi u vezu sa sinaptičkom potencijacijom ovog regiona (Galvin i Ninan, 2014). Konačno, estradiol ostvaruje pozitivan uticaj i na HPC, povećavajući broj dendritskih trnčica unutar CA1 regiona (C. Li i sar., 2004).

Nivo cirkulišućeg estradiola kod žena pokazuje značajnu korelaciju i sa intenzitetom simptoma anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom, pri čemu je snižen nivo

estradiola u krvi povezan sa pogoršanjem simptoma različitih anksioznih poremećaja i PTSP (Green i Graham, 2022). Takođe, koncentracija estradiola u serumu se može koristiti i kao marker za predviđanje odgovora na CBT za poremećaje straha, kao što je slučaj sa arahnofobijom (Graham i sar., 2018). Ovi rezultati upućuju na jedan od mogućih načina prilagođavanja terapije ženskom polu, a posebno su značajni kada se uzme u obzir dvostruko veća učestalost javljanja anksioznih poremećaja i PTSP kod žena (Catuzzi i Beck, 2014; Haskell i sar., 2010).

Pored estradiola, zapaženi su određeni efekti progesterona i testosterona na ekstinkciju straha, ali su zbog mešovitenih rezultata većeg broja istraživanja oni dosta slabije okarakterisani (Velasco i sar., 2019). Istraživanje uloge testosterona u ovom procesu je posebno važno, s obzirom da mušjaci pokazuju sličan stepen ekstinkcije straha kao ženke sa visokim nivoom cirkulišućeg estradiola. Ovde treba napomenuti da se testosteron lako pretvara u estradiol delovanjem aromataze, što može predstavljati jedan od mehanizama preko kojih polni hormoni utiču na ekstinkciju straha kod muškog pola (Graham i Milad, 2014).

1.9 Ekstinkcija straha, anksiozni poremećaji i poremećaji povezani sa strahom

Ekstinkcija straha je neraskidivo vezana za različite psihijatrijske bolesti, s obzirom da narušenost ovog procesa dovodi do pojave preteranih reakcija straha svojstvenih anksioznim poremećajima i poremećajima povezanim sa strahom, uključujući PTSP. Pored intenzivnog straha, ove poremećaje karakterišu i prekomerna anksioznost, fizička nelagodnost, kao i povezane bihejvioralne promene, pri čemu su simptomi takvog intenziteta da izazivaju klinički značajan distres i ometaju svakodnevno funkcionisanje.

Prema Međunarodnom priručniku za klasifikaciju bolesti (engl. *International classification of diseases manual*, ICD), poremećaji povezani sa strahom se svrstavaju u zasebnu potkategoriju mentalnih poremećaja, grupisanu zajedno sa anksioznim poremećajima (World Health Organization, 2022). Sa druge strane, PTSP se svrstava u poremećaje povezane sa stresom, s obzirom da doživljaj traume ili stresnog događaja predstavlja osnovni i neophodan preduslov za javljanje PTSP. Ipak, s obzirom da snažan, nepopustljiv strah predstavlja primarnog pokretača mnogih simptoma PTSP, u ovoj doktorskoj disertaciji će ovaj poremećaj biti diskutovan kao poremećaj povezan sa strahom. U nastavku teksta je istaknut pojednostavljen prikaz aktuelne klasifikacije psihijatrijskih poremećaja od značaja za ovu doktorsku disertaciju prema aktuelnom ICD-11 priručniku (World Health Organization, 2022):

- poremećaji anksioznosti i poremećaji povezani sa strahom
 - poremećaji anksioznosti
 - generalizovani anksiozni poremećaj
 - socijalni anksiozni poremećaj
 - ostali anksiozni poremećaji
 - poremećaji straha
 - panični poremećaj
 - specifične fobije
 - agorafobija
- poremećaji povezani sa stresom
 - PTSP
 - složeni PTSP
 - ostali poremećaji povezani sa stresom

Kada su u pitanju klinička ispitivanja ekstinkcije straha u psihijatrijskim bolestima, u mnogim studijama je opisano pojačano reagovanje na uslovne, neutralne stimuluse tokom testiranja ekstinkcije straha kod osoba sa navedenim poremećajima, ukazujući na narušenost ekstinkcije kod tih pacijenata. Nekoliko meta-analiza je pokazalo da osobe sa anksioznim poremećajima imaju usporenu ekstinkciju straha u poređenju sa kontrolnim subjektima (Duits i sar., 2015; Lissek i sar., 2005). Takođe, nivo efikasnosti ekstinkcije straha negativno koreliše sa stepenom anksioznosti kod

ovih pacijenata (Duits i sar., 2016). Shodno tome, ne iznenađuje činjenica da je uspješnija ekstinkcija straha povezana sa boljim ishodima ET kod osoba sa anksioznim poremećajima (Adolph i sar., 2023). Smanjena efikasnost ekstinkcije straha je prisutna i kod ratnih veterana i civila sa dijagnozom PTSP (Jovanovic i sar., 2009, 2010), dok potencijalni mehanizam uključuje narušeno pristupanje memoriji ekstinkcije (Milad i sar., 2008; Milad, Pitman, i sar., 2009). Konačno, narušenost procesa ekstinkcije straha se uočava i kod pacijenata sa dijagnostikovanom fobijom (Hermann i sar., 2002) ili paničnim poremećajem (Michael i sar., 2007), pri čemu kod pacijenata sa arahnofobijom efikasnost ekstinkcije straha može da predvidi ishod primenjene ET (Lange i sar., 2020).

Disfunkcija ekstinkcije straha se odražava u izmenjenoj aktivnosti moždanih struktura uključenih u regulaciju straha, koja je prisutna i kod anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom. Model koji su 2006. godine postavili Rauch i saradnici (S. L. Rauch i sar., 2006) predlaže da PTSP karakterišu hiperreaktivnost amigdale i njena nedovoljno efikasna regulacija od strane mPFC, uz deficite u funkciji HPC. Studije su pokazale da pacijenti sa PTSP imaju pojačanu reaktivnost amigdale koja koreliše sa ozbiljnošću ispoljenih simptoma (Shin i sar., 2005, 2006), uz smanjenu aktivnost mPFC (Shin i sar., 2005, 2006) i HPC (Kitayama i sar., 2005; Shin i sar., 2006). Sa druge strane, smanjenje aktivnosti amigdale uz pojačanu aktivnost mPFC se dovodi u vezu sa poboljšanjem simptoma PTSP nakon ET (Felmington i sar., 2007), što potvrđuje izložen model i ističe značaj amigdale i mPFC za patofiziologiju PTSP. Sličan obrazac aktivacije amigdale i mPFC je primećen i tokom ispoljavanja fobičnih reakcija (Garcia, 2017; Münsterkötter i sar., 2015), dok kod anksioznih poremećaja snaga funkcionalne veze između amigdale i mPFC negativno koreliše sa intenzitetom ispoljenih simptoma (M. J. Kim i sar., 2011; M. J. Kim & Whalen, 2009). Ovi rezultati ukazuju da disfunkcija veze između mPFC i amigdale može biti faktor koji doprinosi razvoju anksioznih poremećaja (Graham i Milad, 2011), što ukazuje na ključnu ulogu moždanih struktura ekstinkcije straha i u ovim psihijatrijskim poremećajima.

1.10 Farmakološki i bihejvioralni tretmani anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom – veza sa ekstinkcijom straha

Tretmani prvog reda za lečenje anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom, uključujući PTSP, obuhvataju različite vidove CBT i farmakoterapije. Takođe, u poslednje vreme se sve više koristi kombinovana terapija koja podrazumeva primenu tradicionalno korišćenih lekova zajedno sa CBT (Bandelow i sar., 2015; Penninx i sar., 2021; Pratchett i sar., 2011), a prevashodno se primenjuje kod osoba koje ne reaguju na dostupne terapije prvog reda.

Farmakoterapija za lečenje anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom obuhvata različite klase antidepresiva (Penninx i sar., 2021), kao i anksiolitika poput benzodiazepina (Gomez i sar., 2018; Ziffra, 2021), koji zbog ograničenog akutnog dejstva i potencijala za izazivanje zavisnosti imaju suženu kliničku primenu (Penninx i sar., 2021). Sa druge strane, psihoterapijski pristup ima manje neželjenih efekata, često je efikasniji i ne zavisi od prekida primene lekova (Ehret, 2019; Schrader & Ross, 2021). Shodno tome, psihoterapija se preporučuje kao primarni oblik lečenja anksioznih poremećaja i poremećaja povezanih sa strahom (Eaton i sar., 2018; Schrader i Ross, 2021).

Najčešće primenjivan oblik psihoterapije za lečenje navedenih psihijatrijskih poremećaja je ET, terapija koja se zasniva na mehanizmima ekstinkcije straha. ET se deli na veći broj različitih terapija, a njenim najefikasnijim oblikom se smatra terapija produženog izlaganja stresoru (*engl. prolonged exposure, PE*), koja se koristi isključivo za tretman PTSP. PE podrazumeva veći broj seansi dužeg trajanja u poređenju sa standardnom ET, pri čemu se klinički podaci o uspešnosti PE (Kaysen i sar., 2019; Popiel i sar., 2015) poklapaju sa pretkliničkim studijama koje su pokazale da dupliranje broja sesija ekstinkcije straha poboljšava ovaj proces jednako uspešno kao i efikasan farmakološki tretman (McCallum i sar., 2010).

Postojeće terapije prvog reda su pokazale ograničenu efikasnost u ublažavanju simptoma bolesti i održavanju dugoročnih poboljšanja kod pacijenata sa anksioznim poremećajem ili poremećajem povezanim sa strahom. Trećina pacijenata sa PTSP ne reaguje adekvatno na PE (Popiel

i sar., 2015) i zadržava dijagnozu i nakon terapije (Foa i sar., 1999; Zoellner i sar., 2019), dok je za anksiozne poremećaje, fobije i panični poremećaj procenjeno da svega 50-67% pacijenata ostvaruje klinički značajno poboljšanje simptoma nakon završetka terapijskog protokola (Domschke i sar., 2024). U svetlu ovih izazova, istraživači su usmerili pažnju na razvoj novih farmakoloških i bihejvioralnih tretmana, kao i na kombinaciju ovih pristupa za primenu kod pacijenata sa skromnim odgovorom na terapiju. Ipak, kombinacija CBT sa tradicionalnim lekovima poput antidepresiva se pokazala minimalno efikasnijom u poređenju sa pojedinačnim tretmanima, kako za PTSP, tako i za anksiozne poremećaje (Bandelow i sar., 2015; Hetrick i sar., 2010; Popiel i sar., 2015; S. A. M. Rauch i sar., 2019), ukazujući na potrebu za ispitivanjem alternativnih adjuvanata psihoterapiji.

Jednu od grupa farmakoloških agenasa sa potencijalom za poboljšanje efikasnosti CBT čine „kognitivni pojačivači” (*engl. cognitive enhancers*) ekstinkcije straha. Parcijalni agonista NMDA receptora, DCS, se pokazao veoma uspešnim u poboljšanju ekstinkcije straha u životinjskim modelima (Ledgerwood i sar., 2005; McCallum i sar., 2010; Norberg i sar., 2008), dok je u kliničkoj praksi DCS pozitivno uticao na efikasnost psihoterapije za agorafobiju (Ressler i sar., 2004) i anksiozne poremećaje, uz različite stepene ostvarenog efekta (Mataix-Cols i sar., 2017; H. Rodrigues i sar., 2014). Ovi rezultati ukazuju da ispitivanje „kognitivnih pojačivača” ekstinkcije straha u pretkliničkim modelima može otvoriti put za razvoj i primenu novih tretmana za anksiozne poremećaje i poremećaje povezane sa strahom u kliničkoj praksi, naročito za pacijente koji ne reaguju na postojeće terapije.

Ketamin je disocijativni anestetik koji se u poslednjoj deceniji nalazi u fokusu zbog pokazanih brzih i potentnih akutnih antidepresivnih efekata (Zanos i Gould, 2018). Kao antagonista NMDA receptora, ketamin deluje na glutamatsku transmisiju i procese sinaptičke plastičnosti, pri čemu ostvaruje efekte na moždane strukture uključene u regulaciju straha (Browne i Lucki, 2013; Zanos i Gould, 2018). Shodno tome, ketamin se može razmatrati kao potencijalni „kognitivni pojačivač” ekstinkcije straha, i u sklopu ove doktorske teze je ispitivan njegov uticaj na ekstinkciju straha kod adolescentne populacije.

1.11 Ketamin

Ketamin je neselektivni antagonista NMDA receptora, koji po svojoj hemijskoj strukturi predstavlja derivat fenciklidina (*engl. phencyclidine, PCP*), disocijativnog anestetika sa halucinogenim svojstvima. U kliničkoj praksi, ketamin se koristi za postizanje opšte anestezije, dok se u nižim dozama pokazao kao efikasan agens u terapiji bola. U poslednje vreme, sve više pažnje dobija zbog svog doprinosa u ublažavanju simptoma terapo-rezistentne depresije (*engl. treatment-resistant depression, TRD*) (Zarate i sar., 2006), dok novija klinička istraživanja ističu njegov potencijal u lečenju PTSP i anksioznih poremećaja (Albott i sar., 2018; Feder i sar., 2014, 2021; Taylor i sar., 2018; Tully i sar., 2022). Ipak, i pored toga što je nedavno odobren za korišćenje kod pacijenata sa TRD (FDA, 2019), klinička primena ketamina je još uvek prilično ograničena. Razlog tome leži u nuspojavama povezanim sa njegovom kontinuiranom upotrebom (Hottat i Hantson, 2023; Strous i sar., 2022), kao i potencijalom za rekreativnu zloupotrebu koji ketamin duguje svojim halucinogenim svojstvima. U skladu sa tim, njegova terapijska primena je strogo regulisana aktom kontrolisanog unosa supstanci (*engl. controlled substance act*), koji ketamin svrstava u agense sa niskim do umerenim potencijalom za fizičku i psihološku zavisnost (Grupa III) (DEA, 2018).

Komercijalno dostupan ketamin predstavlja racemsku smešu R- i S-stereoizomera, koji imaju različite afinitete vezivanja za NMDA receptor (Jelen i sar., 2021). I dok ovi stereoizomeri imaju različitu efikasnost u ostvarivanju antidepresivnih efekata (Jelen i sar., 2021), dosadašnje studije u animalnim modelima ekstinkcije straha su primenjivale samo racemsku smešu ketamina. Shodno tome, termin ketamin će u daljem tekstu označavati isključivo R, S-ketamin.

Sa aspekta farmakokinetike, ketamin ima izuzetno kratko vreme poluživota u krvi, zahvaljujući brzom tkivnoj distribuciji i intenzivnom metabolizmu u jetri, koja aktivnošću primarno CYP3A4 citohrom P450 oksigenaze prevodi ketamin do njegovog manje potentnog metabolita,

norketamina (Portmann i sar., 2010). Vreme poluživota ketamina u cirkulatornom sistemu zavisi od načina primene leka (intravenski, intranazalno, intramuskularno, itd.) (Zanos i sar., 2018). Kod čoveka, sistemska distribucija intravenski datog ketamina iz krvotoka do tkiva traje svega desetak minuta (Wieber i sar., 1975), dok se iz organizma potpuno uklanja kroz nekoliko sati (Wieber i sar., 1975). Sa druge strane, kod glodara je ovaj proces zbog bržeg metabolizma još intenzivniji, pa tako vreme poluživota ketamina kod C57BL/6 soja miševa (i.p. injekcija) iznosi 15 do 25 min (Ganguly i sar., 2018; X. Li i sar., 2015). Takođe, treba istaći da je ketamin, zahvaljujući hemijskoj strukturi koja uključuje alkilne grupe i benzenov prsten, lipofilan molekul koji lako prolazi krvno-moždanu barijeru (Moaddel i sar., 2023), što mu i omogućava ostvarivanje efekata u okviru CNS. Pored NMDA receptora, ketamin interaguje i sa dopaminskim (Kapur i Seeman, 2002), serotoninским (Kapur i Seeman, 2002), opioidnim (A. Gupta i sar., 2011) i acetilholinskim receptorima (Durieux, 1995), ali sa manjim afinitetom u odnosu na NMDA receptore kao dominantne medijatore njegovih efekata (Zanos i sar., 2018).

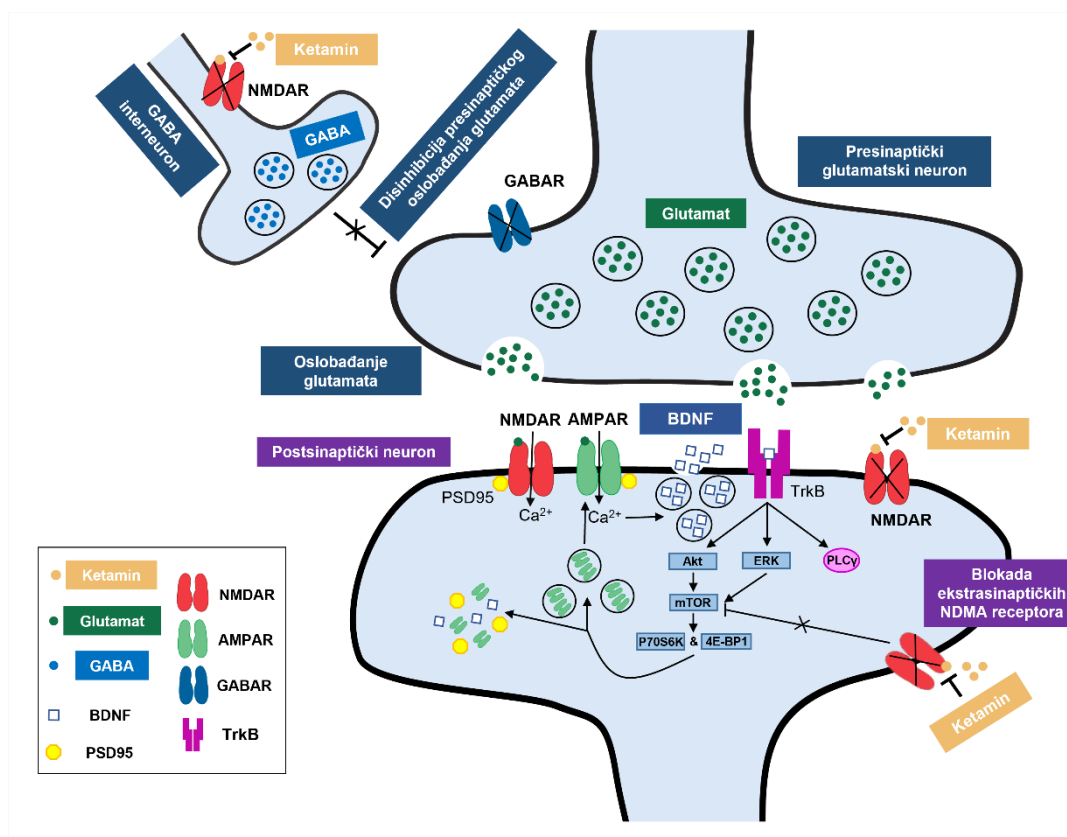
Pored već spomenutih anestetskih, analgetskih i antidepresivnih efekata, ketamin deluje i na kogniciju (Araújo-de-Freitas i sar., 2021; Gill i sar., 2021), i to zahvaljujući uticaju na sinaptičku plastičnost unutar moždanih struktura uključenih u procese učenja i pamćenja (Browne i Lucki, 2013; Zanos i Gould, 2018). Ketamin se vezuje za PCP ligand-vezujuće mesto NMDA receptora, i to isključivo kada je on u otvorenoj konformaciji, čime efikasno blokira poru kanala i sprečava protok jona kroz njega (Zanos i Gould, 2018; Zorumski i sar., 2016). Ipak, s obzirom da NMDA-posredovan ulazak Ca^{2+} pokreće različite mehanizme koji doprinose promenama na nivou sinapse, opravdano se postavlja pitanje na koji način ketamin, kao antagonista NMDA receptora, pozitivno utiče na sinaptičku plastičnost i procese učenja i pamćenja, uključujući i ekstinkciju straha (Girgenti i sar., 2017; Ju i sar., 2017; Sala i sar., 2022; Wei i sar., 2020).

Nekoliko studija je pokazalo da se pozitivni efekti ketamina na ekstinkciju straha uočavaju kod primene subanestetskih doza (Behrooz i sar., 2024; C. Wu i sar., 2020), pri kojima je inhibiran samo deo eksprimiranih NMDA receptora u mozgu (Zorumski i sar., 2016), dok ostatak ostaje dostupan za dalju aktivaciju. Uz to, ketamin ima sklonost ka vezivanju za tačno određene subpopulacije NMDA receptora, što za posledicu ima pojačano oslobađanje glutamata u sinaptičku pukotinu i intenzivnu sintezu sinaptičkih proteina (Zanos i Gould, 2018) (Slika 13.). Glavni mehanizam delovanja ketamina se objašnjava tzv. „hipotezom disinhibicije”, koja pretpostavlja da se ketamin primarno vezuje za NMDA receptore na GABA interneuronima HPC i PFC (Widman i McMahon, 2018; Zanos i Gould, 2018). Na ovaj način, ketamin blokira njihovu aktivnost i posledičnu inhibiciju piramidnih presinaptičkih neurona, što dovodi do pojačanog oslobađanja glutamata (Abdallah i sar., 2018; Chowdhury i sar., 2017) i njegovog daljeg vezivanja za postsinaptičke AMPA receptore (Autry i sar., 2011; Nosyreva i sar., 2013) (Slika 13.). Ovakav mehanizam dejstva ketamina je prvenstveno moguć zahvaljujući visokofrekventnom obrascu aktivnosti GABA interneurona. On podrazumeva česte depolarizacije i uklanjanje NMDA magnezijumskog bloka, čime NMDA receptori učestalo postaju dostupni za vezivanje ketamina (Neske i sar., 2015). Sa druge strane, zahvaljujući jačem afinitetu za GluN2B u odnosu na druge subjedinice NMDA receptora (Dravid i sar., 2007), ketamin takođe direktno inhibira ekstrasinaptičke GluN2B-bogate NMDA receptore (Zanos i Gould, 2018) (Slika 13.). Kao što je prethodno istaknuto, osnovna uloga ekstrasinaptičkih NMDA receptora leži u održavanju sinaptičke homeostaze. U fiziološkim uslovima, ovi receptori su hronično stimulisani niskim nivoima glutamata uvek prisutnim u vanćelijskom prostoru (Guo i sar., 2003; Rothstein i sar., 1996), a posledica njihove aktivacije je, između ostalog, suprimiranje mTOR-zavisne sinteze proteina (Zanos i Gould, 2018), čime se reguliše jačina sinapse. U skladu sa tim, ketamin blokadom ekstrasinaptičkih NMDA receptora sprečava inhibiranje sinteze sinaptičkih proteina, čime indirektno doprinosi sinaptičkoj plastičnosti.

Bez obzira na tip NMDA receptora na koje deluje, efekti ketamina se zadržavaju dugo nakon njegove eliminacije iz mozga (Zanos i Gould, 2018), što ukazuje na prisustvo postojanih, morfoloških promena na nivou sinapse. U skladu sa tim, pokazano je da ketamin u HPC i PFC utiče na morfologiju i gustinu dendritskih trnica (Phoumthippavong i sar., 2016; Pryazhnikov i sar., 2018; M. Wu i sar.,

2021), pri čemu pored spinogeneze stimuliše i samu sinaptogenezu (N. Li i sar., 2010; Pryazhnikov i sar., 2018). Ove efekte ketamin postiže prvenstveno aktivacijom BDNF i mTOR signalnog puta, čime podstiče ekspresiju različitih sinaptičkih proteina (PSD95, GluA1, sinapsin 1) i ostvaruje različite efekte na sinaptičku plastičnost (N. Li i sar., 2010; Zhou i sar., 2014).

Pozitivno dejstvo ketamina na različite aspekte sinaptičke plastičnosti, i to u okviru nervnog kola regulacije straha (Browne i Lucki, 2013; Zanos i Gould, 2018), kao i njegovi stimulativni efekti na proces ekstinkcije straha (Girgenti i sar., 2017; Ju i sar., 2017; Sala i sar., 2022; Wei i sar., 2020) podržavaju ideju o potencijalnoj primeni ketamina zajedno sa ET u tretmanu poremećaja povezanih sa strahom. U skladu sa tim, preliminarni rezultati kliničkih ispitivanja sugerišu da kombinacija ketamina i ET ublažava simptome ovih poremećaja kod odraslih osoba (Shiroma i sar., 2020). Ipak, buduća istraživanja tek treba da utvrde efikasnost ovakvog terapijskog pristupa kod adolescentne populacije. Pored kliničkih ispitivanja, ovaj korak zahteva i paralelne prekliničke studije na polju bihejvioralnih i molekulskih efekata ketamina na proces ekstinkcije straha kod adolescenata, a istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju jedan od prvih pomaka u tom smeru.



Slika 13. Shematski prikaz molekulskih mehanizama delovanja ketamina. NMDAR, N-metil-D-aspartat receptor; GABA (engl. *γ-aminobutyric acid*), *γ*-aminobuterna kiselina; GABAR (engl. *γ-aminobutyric acid receptor*), receptor *γ*-aminobuterne kiseline; PSD95 (engl. *postsynaptic density protein 95*), protein postsinaptičke gustine težine 95 kDa; AMPAR, receptor *α*-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline; BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), neurotrofički faktor poreklom iz mozga; TrkB (engl. *tropomyosin receptor kinase B*), tropomiozinski receptor kinaze B; Akt, protein kinaza B; mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*), sisarska kinaza podložna dejstvu rapamicina; P70S6K (engl. *ribosomal protein S6 kinase*), P70 ribozomalna S6 kinaza; 4E-BP1 (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), vezujući protein 1 eukariotskog faktora inicijacije translacije 4E; ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*), ekstraćelijskim signalima-regulisana kinaza; PLC γ (engl. *phospholipase C gamma*), fosfolipaza C gama.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Sinaptička plastičnost posredovana glutamatskim receptorima, BDNF i mTOR signalnim putem predstavlja jedan od centralnih mehanizama ekstinkcije straha. I dok je ovaj proces kod adultne populacije molekulski dobro okarakterisan, mehanizmi koji doprinose narušenoj ekstinkciji straha kod adolescenata su još uvek prilično nerazjašnjeni. Uz to, farmakološki agensi sa potencijalom za poboljšanje efikasnosti ekstinkcije straha su do sada prevashodno testirani u adultnoj populaciji. S tim u vezi, **glavni cilj** ove doktorske disertacije bio je utvrđivanje molekulskih mehanizama sinaptičke plastičnosti uključenih u izmenjenu ekstinkciju straha kod adolescentnih miševa. Takođe, pristupljeno je i testiranju uticaja ketamina na ekstinkciju straha kod adolescenata, uz karakterizaciju neuronskih korelata i ispitivanje promena u molekulskim medijatorima sinaptičke plastičnosti uključenim u njegove efekte. U sklopu sprovedenih eksperimenata, prvo je praćena ekstinkcija straha kod adolescentnih i adultnih C57BL/6J miševa oba pola tokom četiri i sedam dana, dok je u okviru drugog dela istraživanja ketamin primenjivan tokom četiri dana trajanja ekstinkcije, i to samo kod adolescentnih miševa muškog pola.

U skladu sa glavnim ciljem ove doktorske disertacije, formulisani su sledeći **specifični ciljevi**:

1. okarakterisati promene u ponašanju adolescentnih i adultnih miševa oba pola tokom četiri i sedam dana ekstinkcije straha;
2. ispitati razlike između adolescentnih i adultnih miševa oba pola u:
 - proteinskoj ekspresiji subjedinica NMDA (GluN2A i GluN2B) i AMPA receptora (GluA1)
 - aktivnosti mTOR signalnog puta preko nivoa fosforilisanih i ukupnih formi uzvodnih regulatora (Erk 1,2 i Akt) i efektoru mTOR aktivnosti (mTOR i P70S6K)
 - proteinskoj i genskoj ekspresiji BDNF (egzoni IV i IX)

u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC nakon četiri i sedam dana ekstinkcije straha;

3. okarakterisati efekte ketamina na ponašanje adolescentnih miševa muškog pola tokom četiri dana ekstinkcije straha;
4. ispitati efekat ketamina na:
 - proteinsku ekspresiju subjedinica NMDA (GluN2A i GluN2B) i AMPA receptora (GluA1)
 - aktivnost mTOR signalnog puta preko nivoa fosforilisanih i ukupnih formi uzvodnih regulatora mTOR aktivnosti (Erk 1,2 i Akt) i same mTOR kinaze
 - proteinsku i gensku ekspresiju BDNF (egzoni IV i IX)

u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC i PFC adolescentnih miševa muškog pola nakon četiri dana ekstinkcije straha;

5. ispitati efekat ketamina na aktivaciju HPC i PFC adolescentnih miševa muškog pola nakon četiri dana ekstinkcije straha praćenjem intenziteta fluorescence c-Fos.

3. MATERIJA I METODE

3.1. Gajenje eksperimentalnih životinja

U ovoj doktorskoj disertaciji, eksperimenti su izvođeni na adolescentnim i adultnim mužjacima i ženka C57BL/6J divljeg soja miševa. C57BL/6J miševi su dopremljeni u vivarijum Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju instituta „Vinča” iz Džekson laboratorije, SAD, nakon čega je uspostavljena priplodna kolonija čijim daljim razmnožavanjem su nastale životinje korišćene u ovim istraživanjima. Nakon rođenja, mladunci starosti 16-18 dana su obeležavani bušenjem ušiju prema prethodno uspostavljenom sistemu brojeva. Dalje, miševi starosti 21 dan su odvajani od svojih majki u standardizovane kaveze od pleksiglasa (veličine 340x150x140 mm) tako da svaki kavez broji maksimalno 4 životinje. U cilju izbegavanja potencijalnog uticaja faktora legla na rezultate istraživanja, sve eksperimentalne grupe su formirane nasumičnim odabirom životinja iz svih dostupnih okota.

Na početku ogleda, adolescentni miševi su bili stari 29 dana (postnatalni dan 29, P29), dok su adultne jedinke puštene da dostignu starost od 70 dana (postnatalni dan 70, P70) po uzoru na dizajn opisan u studiji Pattwell i saradnika (Pattwell i sar., 2012). Sve vreme tokom odgajanja i izvođenja eksperimenata, životinje su držane u standardizovanim i kontrolisanim uslovima. Ovi uslovi podrazumevaju 12-časovno izlaganje svetlu (od 08:00 do 20:00 h), temperaturu od 20 ± 2 °C i vlažnost vazduha od 45 do 55 %. Pristup vodi i hrani (komercijalne granule, Veterinarski zavod Subotica) je bio neograničen. Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Etičke komisije Instituta za nuklearne nauke „Vinča” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, kao i Etičke komisije Uprave za veterinu Republike Srbije (Rešenja pod brojem 323–07–00275/2020–05 i 323–07–04156/2023–05). Svi ogledi na životinjama su sprovedeni u skladu sa Direktivom Evropske Unije 2010/63/EU o dobrobiti oglednih životinja.

3.2. Eksperimentalni dizajn

U sklopu ove doktorske disertacije, urađena su 2 eksperimenta.

3.2.1 Eksperiment I

U okviru ovog eksperimenta, u odabranom životinjskom modelu uslovljavanja i ekstinkcije straha, analizirani su ponašanje životinja i prateće molekulske promene u 3 različite vremenske tačke. Ove tačke podrazumevaju životinje koje su prošle samo uslovljavanje straha (US grupa), životinje koje su nakon uslovljavanja bile izložene ekstinkciji straha tokom 4 uzastopna dana (E4 grupa) i životinje koje su nakon uslovljavanja bile izložene ekstinkciji straha tokom 7 uzastopnih dana (E7 grupa). Svaka od 3 vremenske tačke je sadržala po 4 eksperimentalne grupe: P29 mužjake, P70 mužjake, P29 ženke i P70 ženke. Pojedinačne eksperimentalne grupe su bile sačinjene od 12-15 miševa, tako da ukupan broj životinja za 12 grupa korišćenih u ovom eksperimentu iznosi 159.

Prema ustanovljenom eksperimentalnom protokolu, životinje prvo prolaze uslovljavanje straha. Deo životinja predodređen za US grupu će nakon ovog koraka biti lišen života, dok preostale eksperimentalne životinje prolaze 4 (E4 grupa), odnosno 7 dana ekstinkcije straha (E7 grupa) (Slika 14.). Vremenski period između svakog testa ponašanja je iznosio 24 časa, dok je eutanazija životinja uz izolaciju moždanih struktura za dalje analize (imunoblot i qPCR) izvršena 1 čas nakon poslednjeg testa ponašanja za svaku od navedenih grupa.

Ovde takođe treba napomenuti da je svaka od tri vremenske tačke izabrana na osnovu određenog kriterijuma. US tačka predstavlja kontrolnu tačku koja omogućava proveru ujednačenosti uslovljavanja straha između ciljnih grupa životinja, kao i ispitivanje potencijalnih razlika u početnim nivoima njihovih molekulskih parametara. E4 tačka je odabrana na osnovu literaturnih podataka (Pattwell i sar., 2012), a u cilju praćenja ekstinkcije straha kroz nekoliko uzastopnih dana, što omogućava sticanje kompletnije slike o ponašanju životinja u odnosu na kraće paradigme (J. H. Kim i sar., 2011; Lu i sar., 2019). Takođe, na osnovu istraživanja Patel i saradnika (Pattwell i sar., 2012), bilo je očekivano da adolescentne životinje nakon 4 dana testiranja pokažu narušenu ekstinkciju straha. U skladu sa tim, kako bi se ispratilo kada adolescentne životinje počinju da obaraju nivoe

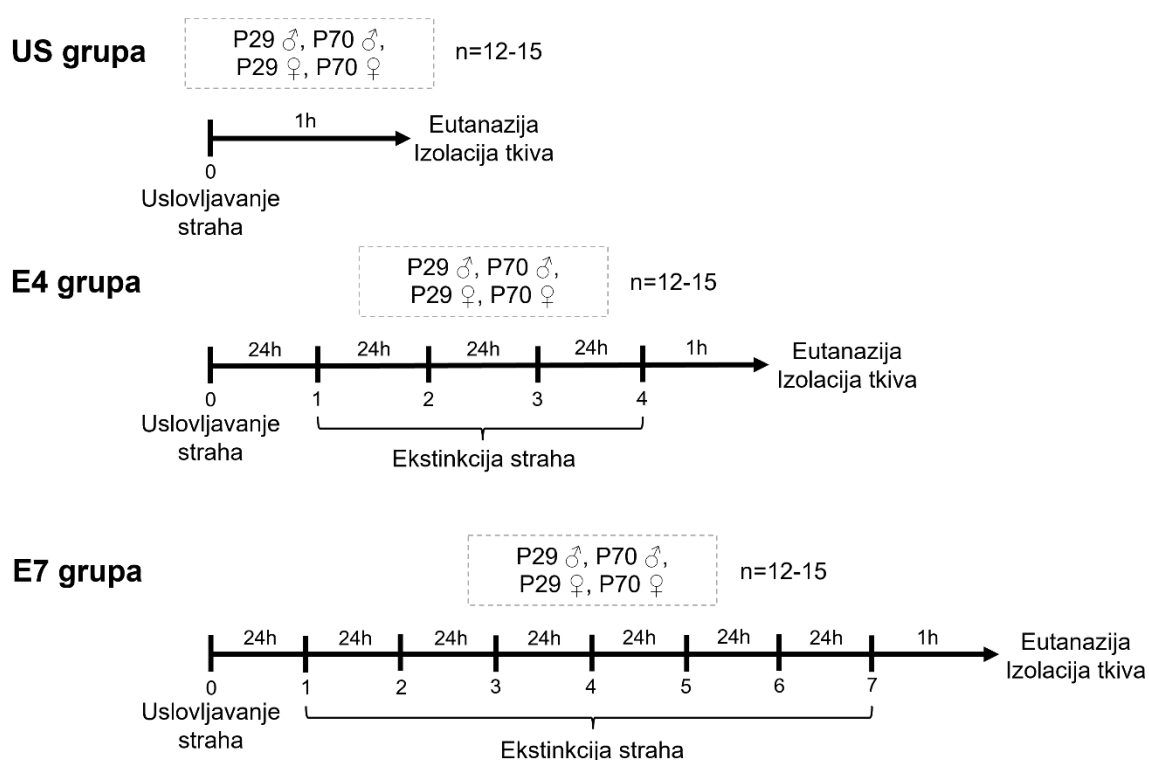
„zamrzavanja” i suzbijaju strah, određena je E7 tačka eksperimenta. Pored opsežnog praćenja ponašanja životinja, definisanjem dve vremenske tačke je omogućeno i praćenje promena u molekulskim parametrima kroz različite faze ekstinkcije straha.

3.2.2 Eksperiment II

U okviru ovog eksperimenta, primenjen je farmakološki pristup poboljšanju ekstinkcije straha kod adolescentnih miševa muškog pola, i to upotrebom ketamina.

3.2.2.1 Ketamin

Ketamin hidrohlorid (100 mg/ml, Richter Pharma), je razblažen u fiziološkom rastvoru do radne koncentracije od 1 mg/ml. Na osnovu prethodno pokazane efikasnosti u poboljšanju ekstinkcije straha kod adolescentnih C57BL/6J miševa (Wei i sar., 2020), za potrebe ovog eksperimenta je odabrana doza ketamina od 10 mg/kg. Životinje su ketaminom, odnosno fiziološkim rastvorom u slučaju kontrolne grupe, tretirane intraperitonealno (i.p.) u zapremini od 10 ml/kg (prosečno 160 μ l po životinji).

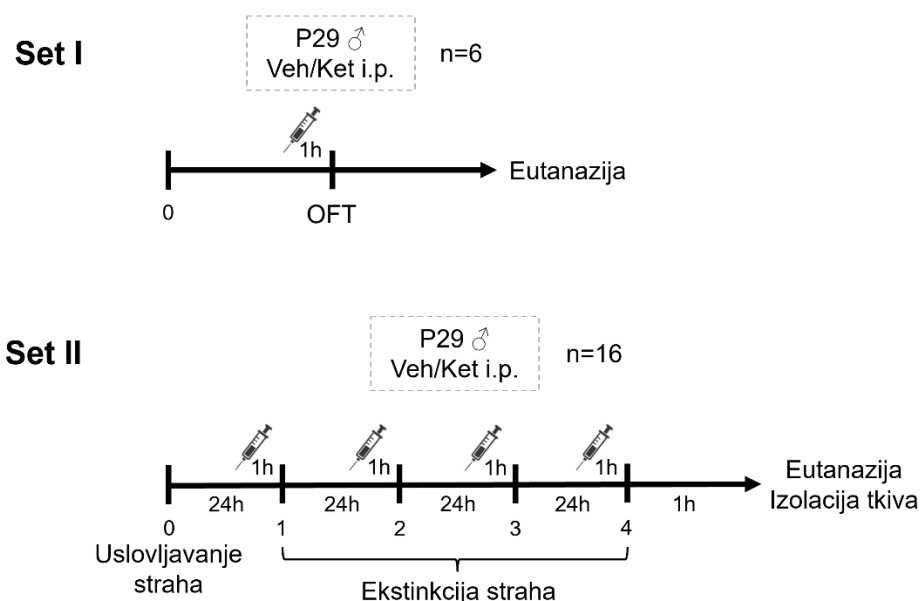


Slika 14. Eksperimentalna postavka eksperimenta I. US, uslovljavanje straha; E4, ekstinkcija 4 dana; E7, ekstinkcija 7 dana; P29, postnatalni dan 29 (adolescentne životinje); P70, postnatalni dan 70 (adultne životinje).

3.2.2.2 Eksperimentalna postavka

Za potrebe ovog eksperimenta su korišćena 2 odvojena seta životinja. Imajući u vidu da je ketamin na prvom mestu anestetik, on može da izazove blagu sedaciju čak i u subanestetskim dozama (Kurdi i sar., 2014). S obzirom da ovo svojstvo ketamina može uticati na rezultate eksperimenata koji prate ekstinkciju straha, na prvom setu životinja je ispitano dejstvo ketamina na lokomotornu aktivnost u testu otvorenog polja (*engl. Open Field Test, OFT*). Kako bi se ispoštovala vremenska dinamika davanja tretmana u daljim eksperimentima, životinje su tretirane i.p. jednom dozom ketamina ili fiziološkog rastvora 1h pre testa ponašanja (Slika 15.). Ukupan broj životinja u okviru prvog seta iznosi 12 (n=6 po grupi), a nakon završetka eksperimenta, ove životinje su eutanazirane i njihova tkiva nisu izolovana za dalje analize.

Drugi set životinja je korišćen za ispitivanje uticaja ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih miševa muškog pola. Nakon uslovljavanja straha, životinje su bile izložene njegovoj ekstinkciji tokom 4 uzastopna dana, pri čemu su ketamin (10 mg/kg) ili fiziološki rastvor ubrizgavani 1h pred svaku od ukupno 4 sesije ekstinkcije (Slika 15.). Ovakav eksperimentalni dizajn se nadovezuje na postavku iz I eksperimenta i odabran je na osnovu postojeće literature (Wei i sar., 2020). Vremenski period između pojedinačnih testova ponašanja je iznosio 24 časa, dok je eutanazija životinja uz izolaciju celih mozgova (imunohistohemija) i pojedinačnih moždanih struktura (imunoblot i qPCR) izvršena 1 čas nakon poslednje sesije ekstinkcije. Za potrebe ovog dela eksperimenta II je korišćeno 16 životinja po grupi, odnosno ukupno 32 životinje za 2 eksperimentalne grupe.



Slika 15. Eksperimentalna postavka eksperimenta II. OFT, test otvorenog polja; P29, postnatalni dan 29 (adolescentne životinje); Veh (engl. vehicle), fiziološki rastvor; Ket, ketamin.

3.3. Testovi ponašanja

3.3.1 Test otvorenog polja

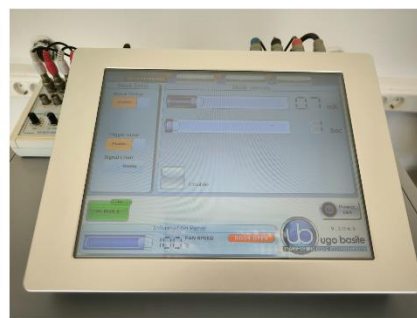
Horizontalna i vertikalna aktivnost životinja su merene u testu otvorenog polja 1h nakon i.p. tretmana ketaminom, odnosno fiziološkim rastvorom. U okviru ovog testa, životinje su stavljane u čošak arene oblika kvadrata i dimenzija $52.5 \times 52.5 \times 30$ cm. Test arena je bila podeljena na 9 jednakih kvadratnih regiona u odgovarajućem kompjuterskom programu. Miševi su ostavljeni da istražuju arenu u periodu od 10 min, tokom kojih je njihova aktivnost softverski merena i analizirana preko TSE VIDEOMOT 2 softvera (TSE Systems, Bad Homburg, Germany). Uticaj ketamina na lokomotornu aktivnost miševa je procenjivana analizom 3 parametra: ukupnog pređenog puta i prosečne brzine kretanja kao mera horizontalne aktivnosti, odnosno broja propinjanja kao mere vertikalne aktivnosti. Između svake životinje, test arena je bila čišćena 70% rastvorom alkohola.

3.3.1 Uslovljavanje i ekstinkcija straha

U okviru ove doktorske disertacije korišćen je model signalnog uslovljavanja straha i njegove kasnije ekstinkcije. Sve eksperimentalne procedure vezane za uslovljavanje i ekstinkciju straha su prilagođene na osnovu protokola ustanovljenog od strane Pattwell i saradnika (Pattwell i sar., 2012).

Uslovljavanje straha se odvijalo u specijalizovanoj komori izolovanoj od spoljašnje buke (Ugo Basile S.R.L., Gemonio, Italy) i naprskanoj 0.1% ekstraktom pepermintu rastvorenog u 70% alkoholu (Slika 16.). Životinje su u njoj primale električne šokove kroz svoje šape preko tankih

metalnih šipki koje su sačinjavale pod komore. Tokom paradigme uslovljavanja straha, miševi su pušteni prva 2 min da se naviknu na uslove u komori. Nakon toga, svaka životinja je bila izložena ukupno 3 puta uparenim stimulusima, pri čemu se ton dužine 30 s (frekvencije 5 kHz i jačine 70 dB) u poslednjoj sekundi svog trajanja preklapao sa električnim šokom jačine 0.7 mA. Interval između pojedinačnih podvrgavanja uparenim stimulusima je iznosio 30 s, a nakon poslednjeg para stimulusa, životinje su ostavljene u komori 1 min u cilju kratkog oporavka pre vraćanja u matične kaveze. Između svake životinje, komora je temeljno čišćena alkoholom sa mirisom pepermint.



Slika 16. Sistem za uspostavljanje straha (levo) sa konzolom za kontrolu eksperimentalnih parametara (desno)

Nakon uslovljavanja straha, životinje su prošle kroz proces njegove ekstinkcije, i to u novoj areni, kako bi se eliminisao uticaj konteksta u kom su životinje uslovljavane na samu ekstinkciju straha. Ovo je standardna praksa kod primene modela signalnog uslovljavanja i ekstinkcije straha (K. D. Baker i Richardson, 2015; J. H. Kim i sar., 2011; McCallum i sar., 2010; Pattwell i sar., 2012), a njom se postiže praćenje reakcije životinje specifično na zvuk kao diskretan US. Nova arena je bila drugačije boje, oblika i mirisa (zelena cilindrična komora naprskana 0.1% ekstraktom limuna rastvorenog u 70% alkoholu) u odnosu na komoru za uslovljavanje. Tokom trajanja ekstinkcije straha, životinje su prvo ostavljene 2 min da se naviknu na uslove testa, nakon čega im je pušteno ukupno 5 tonova (frekvencije 5 kHz i jačine 70 dB), svaki u trajanju od 30 s. Kako bi se postiglo razuslovljavanje straha kod životinja, tonovi su puštani u odsustvu električnih šokova. Interval između pojedinačnih tonova je iznosio 30 s, dok su nakon poslednjeg tona miševi ostavljeni u areni 1 min pre nego što su bili vraćeni u vivarijum. Arena je čišćena alkoholom sa mirisom limuna između svakog miša.

Svi testovi ponašanja u okviru praćenja straha kod životinja su sprovedeni upotrebom Noldusovog (Wageningen, the Netherlands) EthoVision XT softvera za merenje i analizu ponašanja. Miševi su tokom testova snimani video kamerom, kako bi istraživači bez prethodnog znanja o tome koju eksperimentalnu grupu posmatraju mogli da kvantifikuju njihovu reakciju straha. Za species-specifičnu meru reakcije straha kod miševa je uzeto „zamrzavanje“ životinje od straha, definisano kao odsustvo vidljivih mišićnih pokreta izuzev onih neophodnih za nesmetano disanje (Pattwell i sar., 2012). Procenat vremena koji životinja provede zamrznuta od straha je računat deljenjem broja sekundi provedenih u „zamrznutom“ stanju sa dužinom trajanja uslovnog stimulusa (30 s).

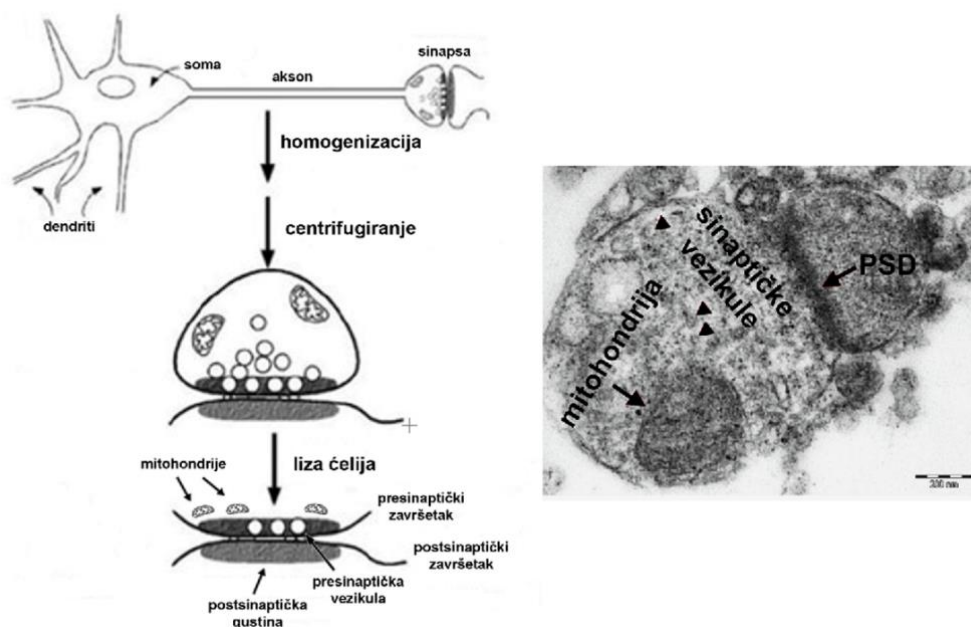
3.4. Analiza proteina

3.4.1 Izolacija neprečišćene sinaptosomalne frakcije

Za merenje nivoa svih proteina analiziranih u sklopu ove doktorske disertacije korišćena je neprečišćena frakcija sinaptosoma (*engl. crude synaptosomal fraction*). Sinaptosome čine presinaptički završeci sa sinaptičkim vezikulama i mitohondrijama i postsinaptička membrana sa

pridruženom postsinaptičkom gustinom bogatom receptorima, signalnim molekulima i proteinima citoskeleta (Bai i Witzmann, 2007) (Slika 17. levo). Kako neuroni ne mogu da ostanu intaktni nakon homogenizacije tkiva, njihovi nervni završeci se u izotoničnoj sredini otkidaju od aksona, i zajedno sa membranama onih dendritskih trnića sa kojima uspostavljaju sinapse se zatvaraju formirajući sinaptozom (Slika 17. desno). Ovaj ćelijski odeljak omogućava analizu molekulskih promena na nivou sinapse i odabran je u skladu sa činjenicom da se učenje i pamćenje straha zasnivaju na procesima sinaptičke plastičnosti.

Sinaptozomalna frakcija je pripremljena prema protokolu uspostavljenom u laboratoriji Ronalda Dumana (N. Li i sar., 2010), iz prethodno izolovanih tkiva HPC i PFC. Nakon pažljivog vađenja iz lobanje, mozak je svojom dorzalnom polovinom položen na Petri šolju, nakon čega su identifikovani i odstranjeni olfaktorni bulbusi. Mozak je zatim okrenut na ventralnu stranu, i napravljen je poprečni rez skalpelom udaljen ~ 2 mm u kaudalnom smeru. U isečenom, rostralnom delu tkiva je zatim identifikovan i odstranjen strijatum, a ostatak tkiva koje sada većinski sadrži „očišćen” PFC je spakovan u ependorfice i zamrznut na -80 °C. Sa druge strane, iz kaudalnog dela tkiva su, nakon otvaranja površinskog sloja kore cerebruma, identifikovani i izolovani levi i desni HPC, koji su takođe zamrznuti na -80 °C do dalje upotrebe. U cilju izolacije sinaptozomalne frakcije, zamrznuta tkiva su izmerena i ručno homogenizovana sa 20-25 pokreta u Potter-Elvehjem stakleno-teflonskom homogenizeru. Odnos tkiva i odgovarajućeg homogenizacionog pufera (sastav pufera prikazan u Tabeli 1.) je iznosio 1:10. Dobijeni homogenat je centrifugiran na 2800 RPM (centrifuga Beckman, rotor JA-20, Nemačka, r=108 mm) u trajanju od 10 min, nakon čega je supernatant sakupljen staklenim Pasterovim pipetama i dalje centrifugiran 10 min na 12 000 RPM (centrifuga Beckman, rotor JA-20, Nemačka, r=108 mm). U ovom koraku se izdvojio talog sa neprečišćenim sinaptozomima (*engl. pellet 2, P2*), koji je nakon pažljivog odlivanja supernatanta rastvaran u RIPA puferu za lizu ćelija. Za tkivo jednog HPC ili PFC dodavano je u proseku 100 µl pufera, čiji sastav se nalazi u Tabeli 1. Ovakvi uzorci su narednih sat vremena inkubirani na ledu uz snažno ljuljanje i vorteksovanje na svakih 15 min. Dobijena sinaptozomalna P2 frakcija je bila spremna za određivanje koncentracije proteina i pripremu za dalju analizu proteina imunoblot metodom. Tokom čitave procedure, rastvori i izolati su držani na 4 °C.



Slika 17. Shema izolacije P2 frakcije sa shematskom građom sinaptozoma (levo) i elektronska mikrofotografija sinaptozoma (desno). Preuzeto i prilagođeno Smalla i sar., 2004 i Ahmad i Liu, 2020.

Tabela 1. Sastav homogenizacionog i RIPA pufera uz komponente koktela inhibitora

Homogenizacioni pufer	Koncentracija	Proteazni inhibitori	Koncentracija
Saharoza	0.32 M	DTT	2 mM
HEPES (pH 7.3)	20 mM	PMSF	0.1 mM
Na ₃ VO ₄ (aktiviran)	1 mM	Na ₂ MoO ₄	20 mM
NaF	1.25 mM	Antipain	5 µg/µl
EDTA	1 mM	Leupeptin	5 µg/µl
RIPA pufer	Koncentracija	Aprotinin	5 µg/µl
Tris- HCl (pH 7.4)	50 mM	Tripsin	10 µg/µl
NaCl	150 mM	Benzamidin	3 mM
Na ₃ VO ₄ (aktiviran)	1 mM	Fosfatazni inhibitori	Koncentracija
NaF	10mM	β-glicerofosfat	20 mM
Triton x100	1%	Na-pirofosfat	5 mM
SDS	0.1%		

3.4.2 Određivanje koncentracije proteina i priprema uzoraka za imunoblot analizu proteina

Koncentracija proteina je određivana spektrofotometrijskom metodom po Markvelu (Markwell i sar., 1978). Ova metoda predstavlja modifikaciju standardne Larijeve metode, a koristi se za određivanje koncentracije proteina u uzorcima bogatim lipidima, kao i uzorcima koji sadrže veću količinu saharoze i EDTA, reagenasa koji se koriste u izolaciji P2 frakcije (Markwell i sar., 1978).

Za proteinski standard je korišćen albumin iz goveđeg seruma (*engl. bovine serum albumin, BSA*) od koga je napravljena serija razblaženja poznate koncentracije (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 i 10 µg/ml) iskorišćena za konstruisanje standardne krive. Po 10 µl standarda ili uzorka nepoznate koncentracije je pipetirano u epruvetu sa 890 µl dejonizovane i demineralizovane (*milliQ*) vode, pri čemu su i standardi i uzorci rađeni u duplikatu. Slepa proba (blank) je sadržala 890 µl *milliQ* vode i 10 µl RIPA pufera. Nakon dodavanja 100 µl 1M NaOH u sve epruvete, reakciona smeša je stajala 10 min na sobnoj temperaturi (*engl. room temperature, RT*), posle čega je dodavano 100 µl reagensa C. Lista i sastav reagenasa korišćenih za određivanje koncentracije proteina su izloženi u Tabeli 2. Rastvor je pušten da odstoji 15 min na RT, i u poslednjem koraku je dodavano 300 µl Folin-Ciocalteu reagensa. Kako bi se odigrala hemijska reakcija i razvila boja, standardi i uzorci su ostavljeni da stoje 45 min na RT.

Tabela 2. Reagensi korišćeni prilikom određivanja koncentracije proteina po Markvelu.

Reagens A - 2% Na ₂ CO ₃ + 0,4% NaOH + 0,16% Na-tartarat + 1% SDS
Reagens B - 4% CuSO ₄ x 5H ₂ O
Reagens C - Reagens A : Reagens B = 100:1
Folin Ciocalteu reagens razblažen MilliQ vodom u odnosu 1:1

Apsorbanca uzoraka (mera količine apsorbovane svetlosti određene talasne dužine) je očitavana na 750 nm na odgovarajućem spektrofotometru (S30 Boeco, Germany). Nepoznata koncentracija proteina u uzorcima je zatim određivana preko jednačine standardne krive dobijene merenjem apsorbanci standarda poznatih koncentracija.

Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorci su inkubirani 5 min na 100 °C u denaturišućem puferu prema Lemliju (Laemmli, 1970) u odnosu 1:1. Ovaj korak obezbeđuje denaturaciju proteina, neophodnu za njihov pravilan prolazak kroz poliakrilamidni gel kao i za vezivanje antitela za proteinske epitope u daljim analizama. Sastav Lemlijevog pufera je bio sledeći: 1M Tris-HCl (pH 6.8), glicerol, 10% SDS, 1% boja (Bromofenol plavo) i β-merkaptetanol. Nakon kuvanja, uzorci su zamrzavani na – 20 °C do izvođenja imunoblot analize.

3.4.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Po 40 µg ukupnih proteina svakog uzorka je nanošeno na 7.5%, 10% ili 15% poliakrilamidne gelove pravljene na osnovu modifikovanog Lemlijevog protokola (Tabela 3.). Proteini su razdvajani na gelu prema svojoj molekulskoj masi u standardnom sistemu za elektroforezu pri konstantnom naponu od 100 V i u prisustvu odgovarajućeg pufera. Sastav pufera za elektroforezu (pH 8.3) je bio sledeći: 25 mM Tris, 192 mM glicin i 0.1% SDS. Uz eksperimentalne uzorke, na svaki gel je nalivan standard sa obeleženim proteinima poznatih molekulskih masa (PageRuler, ThermoFisher Scientific), koji je služio kao referentni marker za određivanje visine na kojoj se protein(i) od interesa nalaze nakon prebacivanja na membranu za imunoblot.

Tabela 3. Sastav gelova za koncentrovanje i razdvajanje uzoraka.

Gel za koncentrovanje	Gel za razdvajanje
5% akrilamid/bisakrilamid (30:1)	7.5%, 10%, 15% akrilamid/bisakrilamid (30:1)
375 mM Tris-HCl pH 8.95	125 mM Tris-HCl pH 6.95
2 mM EDTA	2 mM EDTA
0.1% SDS	0.1% SDS
0.06% amonijum persulfat	0.1% amonijum persulfat
0.06% TEMED	0.1% TEMED

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su prebačeni sa gela na poliviniliden fluorid membranu (*engl. polyvinylidene fluoride, PVDF*, Immobilon-P membrane, Millipore) upotrebom standardnog blot sistema za mokri transfer proteina (mini Transblot, BioRad) uz konstantno hlađenje sistema. PVDF membrana je u blot sistemu bila orijentisana tako da zaustavlja i vezuje negativno naelektrisane proteine koji se posredstvom transfer pufera kreću u smeru pozitivno naelektrisane elektrode. Korišćeni štok transfer pufera (10xTP, pH 8.3) je bio sledećeg sastava: 25 mM Tris, 192 mM glicin i 20% SDS. Od ovog štoka je pravljeno radno razblaženje TP (1xTP) i to u odnosu 100 ml 10xTP, 200 ml metanola i 700 ml destilovane vode. Transfer je pušten preko noći pod konstantnim naponom od 30 V za proteine molekulskih težina preko 100 kDa ili je trajao 2h pod konstantnom strujom od 400 mA za proteine do 100 kDa.

3.4.4. Imunoblot analiza proteina

Membrane su posle transfera potopljene u Ponceau S boju koja se vezuje za proteine, čime se postiže vizuelna potvrda uspešnosti prenosa proteina na membranu. Nakon bojenja, membrane su ispirane 3 puta po 10 min u PBST (*engl. phosphate-buffered saline*, PBS, sa dodatkom 0.1% Tween 20 deterdženta). U narednom koraku, membrane su blokirane 1h na RT u 5% nemasnom mleku rastvorenom u fosfatnom puferu kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela za membranu.

Nakon blokiranja, membrane su inkubirane u primarnim antitelima odgovarajućih razblaženja preko noći na 4 °C, pri čemu je za kontrolu količine nalivenih proteina korišćen β-aktin. Razblaženja antitela su pravljena u 2.5% nemasnom mleku rastvorenom u PBST. Dalje, membrane su ispirane 3 puta po 10 min u PBST, nakon čega su inkubirane 2h na RT u odgovarajućim sekundarnim antitelima spregnutim sa peroksidazom rena (*engl. horseradish peroxidase, HRP*). Tabela svih primarnih i sekundarnih antitela sa primenjenim razblaženjima i kataloškim brojevima je prikazana u nastavku teksta (Tabela 4.). Posle inkubacije u sekundarnim antitelima, membrane su ponovo ispirane 3 puta po 10 min u PBST, nakon čega su bile spremne za detekciju ciljnih proteina.

Proteini od interesa su detektovani metodom hemiluminiscence. Membrane su prelivane hemiluminiscentnim supstratom koji čine luminol i vodonik peroksid, što dovodi do toga da peroksidaza rena (poreklom iz sekundarnog antitela) katalizuje oksidaciju luminola vodonik peroksidom. U ovoj reakciji nastaje nestabilno jedinjenje koje se brzo razgrađuje, pri čemu se oslobađa energija u vidu fotona svetlosti. Emisija fotona svetlosti je detektovana na fotografskom filmu (Fuji Photofilm, Bedfordshire UK ili Amersham Hyperfilm ECL) u formi traka ispitivanih proteina, čiji intenzitet je proporcionalan količini ciljnih proteina u datom uzorku. Kako bi se dobila

dovoljna količina uzorka za analizu svih proteina od interesa, treba istaći da svaki uzorak predstavlja lizat dobijen iz tkiva svih životinja koje su ušle u eksperiment (sa izuzetkom 4 životinje po grupi u Eksperimentu II, čiji mozgovi su iskorišćeni za imunohistohemijska ispitivanja). U skladu sa tim, svaki uzorak je pušten na gel barem 4 puta (tehnički replikat), a za kvantifikaciju signala sa jednog gela su birana po 3 reprezentativna filma. Dobijeni signali su analizirani metodom denzitometrije, koja podrazumeva merenje optičke gustine pojedinačnih proteinskih traka korišćenjem ImageJ softvera. Količina ciljnih proteina u svakom uzorku je normalizovana u odnosu na detektovan nivo β -aktina u tom uzorku sa iste membrane, a nivoi proteina u svim uzorcima su izražavani relativno u odnosu na kontrolne uzorke (100% na graficima). Zbog prirode eksperimenta, u I delu istraživanja za kontrole su arbitrarno određeni FC P29 mužjaci, odnosno FC P29 ženke, dok je u eksperimentu II kontrola predstavljala adolescentne mužjake tretirane fiziološkim rastvorom (P29 VEH). Srednje vrednosti za nivo svakog detektovanog proteina su računate na osnovu 4 pojedinačne elektroforeze, pri čemu je u statističku obradu rezultata ušla po jedna vrednost po elektroforezi.

Tabela 4. Razblaženja i kataloški brojevi antitela korišćenih u imonoblot analizi proteina.

Protein	Razblaženje	Proizvođač	Kataloški br.
GluA1	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-55509
GluA4	1:500	Cell Signaling Technology	#8070
GLUN2A	1:3000	Millipore	#07-632
GLUN2B	1:1000	Millipore	MAB5782
psaNCAM	1:1000	Millipore	MAB5324
NCAM	1:2000	Millipore	AB5032
pErk1/2 (Thr202/Tyr204)	1:1000	Cell Signaling Technology	#9101
Erk1/2	1:1000	Cell Signaling Technology	#9102
pAkt (Ser 473)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-7985-R
Akt	1:1000	Cell Signaling	#9272S
pmTOR (Ser 2448)	1:1000	Cell Signaling	#2971
mTOR	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-517464
pP70S6K (Thr389)	1:1000	Cell Signaling Technology	#9205
P70S6K	1:1000	Cell Signaling Technology	#9202
BDNF	1:2000	Abcam	ab108319
β-Actin	1:4000	Abcam	ab8227

Kako bi se sa iste membrane analiziralo više od jednog proteina, nakon detekcije signala za željeni protein, membrane su stripovane. Ukoliko je bilo neophodno uklanjanje kompleksa primarno-sekundarno antitelo, korišćen je pufer za „agresivno” stripovanje membrana, dok je za skidanje samo sekundarnog antitela korišćen pufer za blago stripovanje. „Agresivno” stripovanje podrazumeva inkubaciju membrana na 50 °C 20-30 min u puferu koji sadrži 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS (w/v) i 100 mM β -merkaptotanol. Sa druge strane, tokom blagog stripovanja, membrane se ispiraju u puferu pH vrednosti 2.2 koji sadrži 7.5% glicin (w/v), 0.1% (w/v) SDS i 9 mM Tween 20. U oba slučaja, nakon ispiranja pufera za stripovanje, membrane se blokiraju u nemasnom mleku, nakon čega prolaze kroz sve prethodno opisane korake imunoblotovanja.

3.5. Analiza genske ekspresije

3.5.1 Izolacija RNK

Ukupna RNK iz tkiva HPC i PFC je izolovana Rotizol reagensom (Carl Roth, Germany). Zamrznuto tkivo je izmereno i ručno homogenizovano u Potter-Elvehjem stakleno-teflonskom homogenizeru, pri čemu je na 100 mg tkiva dodavan po 1 ml Rotizola. Homogenati tkiva su zatim inkubirani 5 min na 30 °C kako bi se omogućilo razbijanje kompleksa nukleinskih kiselina i pratećih proteina. U narednom koraku je dodavano po 0.2 ml hloroforma (na 100 mg tkiva), i ependorfice su nakon intenzivnog mućkanja inkubirane 3 min na 30 °C. Uzorci su zatim centrifugirani 15 min na 12 000 x g u hladnoj centrifugi (4 °C), prilikom čega su se izdvojile 3 faze. Donja, organska faza zadržava fenol, hloroform, kao i većinski procenat DNK i proteina, interfaza sadrži ćelijski debris i ostatke DNK i proteina, dok se u gornjoj, vodenoj fazi nalazi RNK. Supernatant sa RNK se prebacuje

u nove ependorifice u koje se dodaje 0.5 ml izopropanola (na 100 mg tkiva), koji će omogućiti precipitaciju RNK. Nakon inkubacije 10 min na 30 °C, uzorci se centrifugiraju 10 min na 12 000 x g (4 °C), prilikom čega se izdvaja talog koji sadrži RNK. Nakon odlivanja nastalog supernatanta, talozi se resuspenduju u 1 ml (na 100 mg tkiva) 75% etanola i pristupa se novom centrifugiranju u trajanju od 5 min na 7 500 x g (4 °C). Korak „pranja” taloga u 75% etanolu se ponavlja još jedanput, nakon čega se talog suši na sobnoj temperaturi i u zavisnosti od veličine rastvara u 50-100 µl vode tretirane 0.1% dietilpirokarbonatom (*engl. diethylpyrocarbonate, DEPC*). Kako bi se pospešilo rastvaranje RNK u DEPC vodi, uzorci prolaze kroz finalnu inkubaciju na 60 °C u trajanju od 5 min. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, određuju se koncentracija i čistoća RNK, dok se uzorci dalje čuvaju na -80 °C do predviđenih analiza.

Koncentracija RNK je određivana merenjem apsorbance uzorka na 260 nm na NanoDrop spektrofotometru (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), dok je čistoća procenjivana na osnovu apsorbanci uzoraka izmerenih za talasne dužine od 230, 260 i 280 nm. Odnos apsorbanci na 260 i 230 nm (A_{260}/A_{230}) predstavlja pokazatelj kontaminacije organskim rastvaračima, pri čemu se uzorak može smatrati adekvatno prečišćenim za $A_{260}/A_{230}=2.0-2.2$. Sa druge strane, odnos apsorbanci na 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) se koristi za procenu kontaminacije proteinima iz uzorka i za „čist” uzorak iznosi $A_{260}/A_{280}\sim 2.0$. Integritet RNK je proveren nalivanjem 2 µg ukupne RNK na 1.5 % agarozni gel i puštanjem elektroforeze u trajanju od 45 min pri konstantnom naponu od 100V. Integritet je potvrđen prisustvom 2 jasno odvojene trake na gelu koje predstavljaju 28S i 18S ribozomalnu RNK.

3.5.2 Reverzna transkripcija

Pre ulaska u reakciju reverzne transkripcije, svi uzorci su prošli kroz tretman DNazom, kako bi se uklonili ostaci genomske DNK zaostale iz RNK izolacije. 2 µg ukupne RNK je inkubirano 30 min na 37 °C sa 1 µl DNaze u prisustvu 1 µl reakcionog pufera (sadrži $MgCl_2$) u ukupnoj zapremini od 9 µl. Nakon toga je dodavan po 1 µl EDTA i uzorci su dalje inkubirani 10 min na 65 °C. EDTA je helator jona koji vezuje jone neophodne za aktivnost DNaze, koja se potom termički inaktivira, kako bi se sprečilo kasnije degradovanje prepisane cDNK. Nakon hlađenja na RT, uzorci prečišćene RNK su bili spremni za korak reverzne transkripcije.

Za sintezu cDNK je korišćen High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). 2 µg ukupne RNK je inkubirano sa 1 µl reverzne transkriptaze (MultiScribe™, 50 U/µl) u prisustvu 2 µl reakcionog pufera, 0.8 µl 100 mM dNTP-a, 2 µl randomizovanih prajmera, 0.5 µl ribonukleaznog inhibitora (RiboLock RNase inhibitor, 40 U/µl, ThermoFisher Scientific) u ukupnoj zapremini od 20 µl. Program za reverznu transkripciju je obuhvatio 3 koraka: vezivanje prajmera (10 min, 25 °C), DNK polimerizaciju (120 min, 37 °C) i deaktivaciju enzima (5 min, 85 °C). Dobijeni uzorci cDNK su čuvani na -20 °C do daljih analiza.

3.5.3. qRT-PCR

Geni od interesa su amplifikovani korišćenjem Power SYBR Green PCR Master Mix kita (Applied Biosystems) u 7500 Real-time PCR sistemu (Applied Biosystems). U skladu sa njegovom ulogom u procesima sinaptičke plastičnosti, detektovani su nivoi iRNK za BDNF, i to egzone IV i IX. Za endogenu kontrolu količine ukupne RNK u uzorku je uzet konstitutivno eksprimirani gen za enzim zadužen za recikliranje purinskih nukleotida, hipoksantin fosforibozil-transferaza 1 (*engl. hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1, HPRT*). Sekvence prajmera za analizirane gene se nalaze u Tabeli 5.

Tabela 5. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju gena od interesa u qRT-PCR

Gen	Sekvence prajmera
HPRT	F: 5'-TCC TCC TCA GAC CGC TTT T-3' R: 5'-CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC-3'
BDNF Egzon IV	F: 5'-CAG AGC AGC TGC CTT GAT GTT-3' R: 5'-GCC TTG TCC GTG GAC GTT TA-3'
BDNF Egzon VI	F: 5'-ACA ATG TGA CTC CAC TGC CGG-3' R: 5'-CGC CTT CAT GCA ACC GAA GTA T-3'
BDNF Egzon IX	F: 5'-TGC AGG GGC ATA GAC AAA AG-3' R: 5'-TGA ATC GCC AGC CAA TTC TC-3'

Ulazna količina cDNK od 10 ng je dalje amplifikovana kroz sledeće faze: početna denaturacija cDNK (95 °C/10 min), 40 ciklusa denaturacije cDNK (95 °C/15 s) uz prateće vezivanje i ekstenziju prajmera (60 °C/1 min) i konačna elongacija produkata (72 °C/5 min), koja omogućava kompletiranje sinteze nedovršenih amplikona. Kako bi se potvrdilo formiranje jedinstvenog PCR produkta, nakon svake PCR reakcije su analizirane osobine krivi topljenja za svaki gen od interesa. Za određivanje relativne količine transkripata eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolne (1x na grafiku) je primenjena $\Delta\Delta$ Ct metoda (Livak i Schmittgen, 2001), pri čemu su apsolutne Ct vrednosti svih uzoraka prethodno normalizovane uz pomoć izmerenih Ct vrednosti endogene kontrole. U I eksperimentu, rezultati su prikazivani na nivou pojedinačnih vremenskih tačaka, a za kontrolu su arbitrarno određene odgovarajuće grupe adolescentnih mužjaka (FC P29, E4 P29 i E7 P29). U eksperimentu II, rezultati su prikazani u odnosu na adolescentne mužjake tretirane fiziološkim rastvorom (P29 VEH). Ovde treba napomenuti da, kao i u slučaju imunoblota, uzorak svake eksperimentalne grupe predstavlja lizat dobijen iz združenih tkiva svih životinja koje su ušle u eksperiment (sa izuzetkom 4 životinje po grupi u Eksperimentu II, čiji mozgovi su iskorišćeni za imunohistohemijska ispitivanja). Za svaku eksperimentalnu grupu, uzorak je prepisan minimum dva puta, a qRT-PCR je za svaki od prepisa pušten po dva puta u triplicatu (tehnički replikati kojima je određivana srednja Ct vrednost svakog prepisa). Srednje vrednosti za nivo svakog analiziranog gena su računate na osnovu dva puštanja svakog pojedinačnog prepisa, tako da su u statističku obradu rezultata ušle po dve vrednosti po prepisu.

3.6. Imunohistohemijska analiza

3.6.1 Priprema tkiva i sečenje na kriokatu

Mozgovi za imunohistohemijske analize su pažljivo izolovani na ledu i prebačeni u falkon sa 4% paraformaldehidom, u kome su se fiksirali naredna 24 sata na 4 °C. U sledećim koracima, mozgovi su kriozaštićeni dehidratacijom u rastućem gradijentu saharoze (10, 20 i 30% saharoza rastvorena u 0.2M fosfatnom puferu, pH 7.4) na 4 °C. Mozgovi su proveli po 24 sata u 10 i 20% saharozi, dok je rastvor 30% saharoze menjan na svakih par dana, sve dok mozgovi ne padnu na dno falkona odmah nakon zamene 30% saharoze. Koronalni preseći (debljine 20 µm) PFC i HPC su isečeni na kriokatu (Leica CM 1860 UV, Germany), pušteni da se osuše nekoliko sati na RT i čuvani na -20 °C do dalje upotrebe. Preseći PFC su načinjeni sekvencijalno 1.98-1.54 mm anteriorno od bregme, kako bi obuhvatili PrL i IL region. Sa druge strane, preseći HPC su sadržali kako dHPC (CA1 i CA3 region), tako i vHPC (CA1 i CA3 region), i sečeni su u opsegu 1.82-3.16 mm posteriorno od bregme.

3.6.2 Imunohistohemijska analiza c-Fos proteina

Nakon temperiranja na RT u trajanju od 30 min, pločice su potopljene u PBS 2 puta po 5 min kako bi se preseći rehidratirali. U narednom koraku, preseći su sat vremena inkubirani na RT u 5% normalnom serumu magarca (Abcam, UK, # 7475) razblaženom u PBS kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela za presek. c-Fos primarno antitelo (Abcam, UK, ab190289) je nanošeno u razblaženju 1:200 (pravljenom u 1% serumu magarca u PBS), pri čemu su preseći preko noći inkubirani sa antitelom u vlažnoj komori na 4 °C. Sledećeg dana, preseći su ispirani 3 puta po 5

min u PBS i inkubirani sa fluorescentnim anti-zečjim sekundarnim antitelom (AlexaFluor 568, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) u razblaženju 1:400 (pravljenom u 1% serumu magarca u PBS) 2 sata na RT u vlažnoj, zamračenj komori. Nakon ispiranja 3 puta po 5 min u PBS, preseki su obojeni 4', 6-diamidino-2-fenilindolom (*engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI*, Sigma Aldrich, USA). S obzirom da se DAPI vezuje za dvolančanu DNK, on boji jedra ćelija i omogućava vizuelizaciju ćelijskih slojeva u okviru isečenog tkiva. DAPI je ispran potapanjem u PBS 2 puta po 5 min, nakon čega je na preseke nanešen Mowiol (Calbiochem, La Jolla, California, USA) i stavljena su pokrovna stakla.

Preseci su analizirani na konfokalnom laser-skenirajućem mikroskopu (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) upotrebom helijum-neonskog (543 nm) lasera, 40× DIC objektiva sa imerzionim uljem i monohromatske AxioCam ICm1 kamere (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany). Sa druge strane, DAPI je vizuelizovan uz pomoć epifluorescentne lampe. Ovom prilikom, snimljene su slike u .lsm formatu, koje su dalje obrađivane i kvantifikovane u ImageJ softveru.

3.6.3 Kvantifikacija slika

Za potrebe kvantifikacije c-Fos⁺ signala, slike preseka HPC i PFC su snimljene u polju visoke rezolucije (*engl. high-power field, HPF*; HPF=0,054 mm², 1024x1024 piksela, 1 μm=4.42 piksela) objektivom uveličanja 40x. U zavisnosti od veličine posmatranog regiona, slikane su jedna do dve slike po hemisferi za svaki region, i to na minimalno 2 preseka po životinji. Prva slika je uvek obuhvatala medijalni deo tkiva neposredno do međuhemisferne brazde, dok je drugom slikom zahvaćeno tkivo koje se nalazi dublje (lateralnije) u regionu od interesa. Za kvantifikaciju intenziteta fluorescence, sa neobrađenih mikrografija je upotrebom ImageJ softvera (NIH, Bethesda, MD) izmeren intenzitet integrisane fluorescence izražen u arbitrarnim jedinicama (*engl. arbitrary units, AUs*) za svaki od 6 prethodno definisanih regiona od interesa (*engl. regions of interest, ROIs*). Dodatno, u ispitanim ROIs su izbrojane i sve c-Fos⁺ ćelije.

3.7. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza podataka je rađena u IBM SPSS Statistics 20, STATISTICA 7 i GraphPad Prism 8 programima. Za I eksperiment, svi statistički testovi su poredili razlike između grupa unutar svakog pola, dok su poređenja u okviru II eksperimenta vršena između kontrole i grupe adolescentnih mužjaka tretirane ketaminom. Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (*engl. standard error of the mean, SEM*), dok je statistička značajnost prihvaćena za $p < 0,05$.

3.7.1. Eksperiment I

Za analizu ponašanja životinja tokom uslovljavanja straha, kao i u toku svakog dana njegove ekstinkcije, korišćena je dvofaktorska analiza varijanse za ponovljena merenja (*engl. two-way repeated measures analyses of variance, two-way RM ANOVA*), uz Bonferoni korekciju za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost životinja i ponovljeno izlaganje odgovarajućim stimulusima u toku testa (ton/šok par vs. samostalni ton). Takođe, na nivou ponašanja je analizirano nekoliko parametara koji ne mogu međusobno da se porede između različitih vremenskih tačaka (US vs. E4 vs. E7), tako da su ovi podaci analizirani u okviru svake tačke ponaosob primenom t-testa za nezavisne uzorke. Sa druge strane, rezultati imunoblot analiza su obrađeni primenom dvofaktorske ANOVA, uz primenu Tukey *post hoc* testa za procenu razlika između eksperimentalnih grupa. Na ovaj način je određen uticaj starosti životinja i vremenske tačke, kao i njihove međusobne interakcije na nivoe ispitivanih proteina kod oba pola. Za kontrole su arbitrarno određene grupe adolescentnih mužjaka i ženki koje su prošle uslovljavanje straha (US grupe). Konačno, rezultati genske ekspresije su obrađeni primenom dvofaktorske ANOVA (Tukey *post hoc* test), pri čemu su u ovom slučaju faktori analize bili starost i pol. Ovakvom analizom je određen uticaj starosti i pola životinja, kao i njihove međusobne interakcije na nivoe ispitivanih proteina u okviru svake pojedinačne vremenske tačke. Za kontrolnu grupu u okviru svake tačke su arbitrarno određeni adolescentni mužjaci (P29 US, P29 E4 i P29 E7).

3.7.2. Eksperiment II

Kao i u eksperimentu I, za analizu ponašanja životinja tokom uslovljavanja i ekstinkcije straha korišćena je dvofaktorska RM ANOVA, uz Bonferoni korekciju za *post hoc* analizu. Dodatni parametri ponašanja životinja su analizirani t-testom za nezavisne uzorke. Takođe, t-test za nezavisne uzorke je primenjen za procenu uticaja ketamina na imunoreaktivnost c-Fos i broj c-Fos⁺ ćelija u okviru 6 ispitivanih ROIs, kao i za analizu efekata ketamina na gensku i proteinsku ekspresiju ciljnih molekula u okviru HPC i PFC.

4. REZULTATI

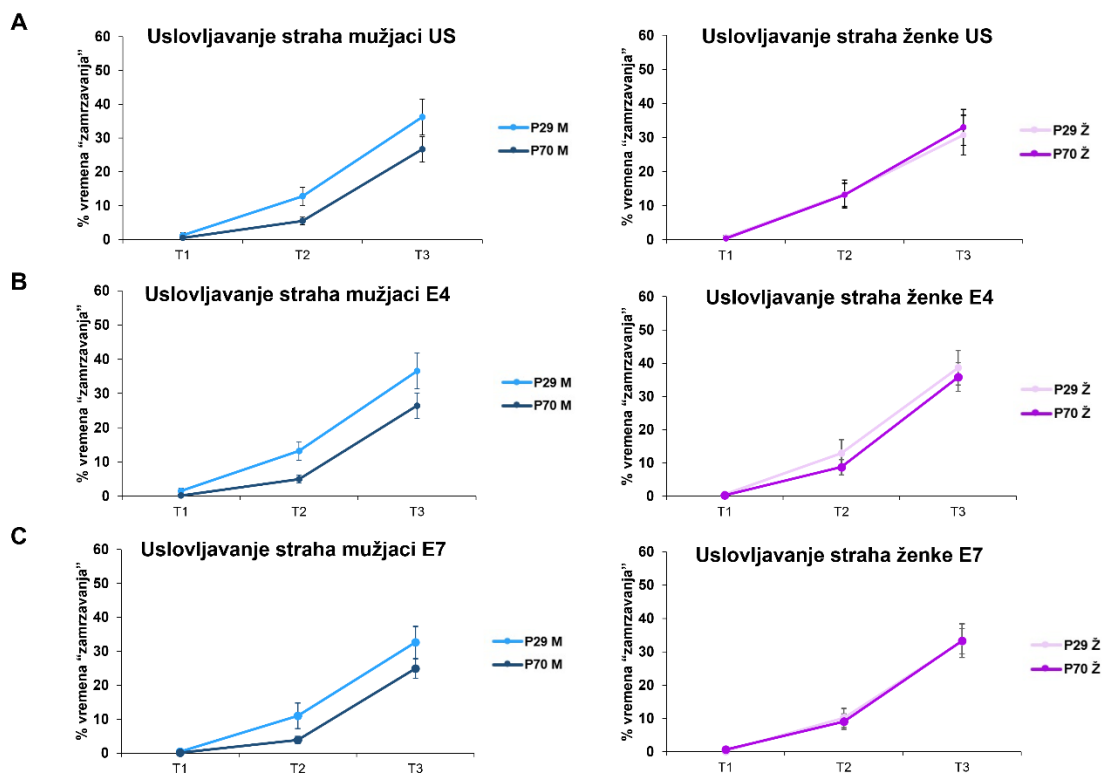
4.1 Eksperiment I

4.1.1 Analiza uslovljavanja i ekstinkcije straha kod adolescentnih i adultnih miševa oba pola

U okviru prvog dela ove doktorske disertacije, detaljno je ispitivano ponašanje adolescentnih i adultnih C57BL/6J miševa oba pola tokom uslovljavanja i ekstinkcije straha. Ovom prilikom, praćeno je „zamrzavanje” životinja od straha, na osnovu čega su preračunati različiti parametri ponašanja koji svedoče o uspešnosti usvajanja straha, kao i efikasnosti kratkoročne i dugoročne ekstinkcije straha.

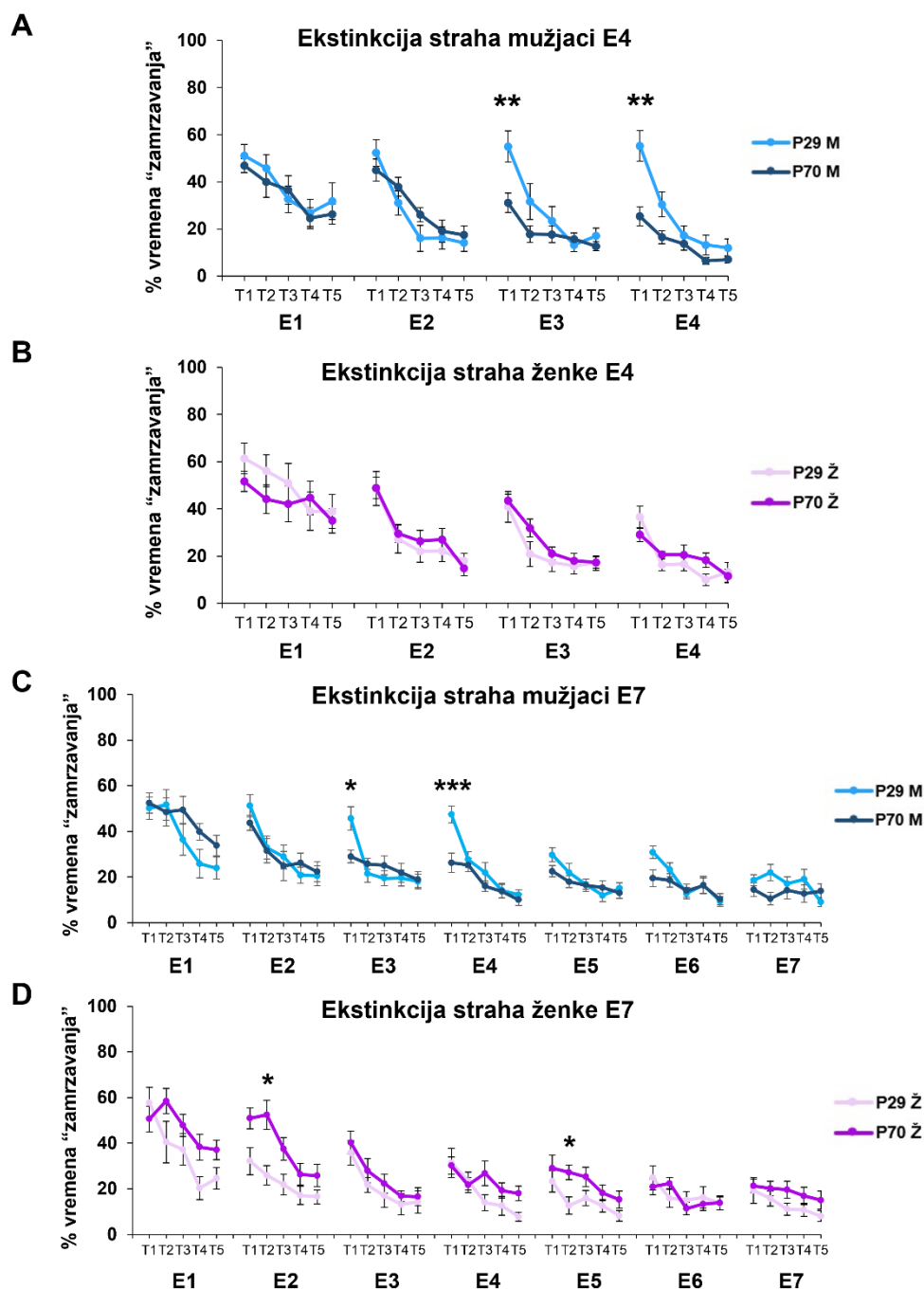
Kako bi se utvrdilo da li mužjaci i ženke obe starosne grupe jednako uspešno razvijaju reakciju straha na primenjeni stimulus, njihovo ponašanje je prvo posmatrano tokom tri bloka izlaganja US i BS. S obzirom da eksperimentalne grupe u okviru sve 3 vremenske tačke (US, E4 i E7) prolaze kroz uslovljavanje straha, rezultati su prikazani za svih 12 eksperimentalnih grupa (Slika 18.). Uočeno je da tokom paradigme uslovljavanja, adolescentni mužjaci pokazuju nešto više nivo „zamrzavanja” od straha u odnosu na adulte (Slika 18. A, B, C levo). Međutim, statistički testovi nisu otkrili prisustvo značajnih razlika između P29 i P70 grupa ni kod jednog pola (Slika 18. A, B, C).

Nakon uslovljavanja, kod E4 i E7 grupa je dalje praćeno ponašanje životinja tokom 4, odnosno 7 dana ekstinkcije straha. I kod E4 i kod E7 grupa mužjaka, RM ANOVA je pokazala značajan efekat interakcije starosti i tona na nivo „zamrzavanja” životinja od straha tokom trećeg (E4: $F_{(4,100)}=3.41$, $p<0,05$; Slika 19. A i E7: $F_{(4,92)}=4.05$, $p<0,05$; Slika 19. C) i četvrtog dana razuslovljavanja (E4: $F_{(4,100)}=5.15$, $p<0,05$; Slika 19. A i E7: $F_{(4,92)}=4.44$, $p<0,05$; Slika 19. C). *Post hoc* testovi su dalje otkrili da i E4 i E7 adolescenti provedu procentualno više vremena „zamrznuti” od straha u poređenju sa adultnim mužjacima tokom prvog tona trećeg i četvrtog dana. Sa druge strane, kada se zajedno sagledaju E4 i E7 grupe ženki, nisu uočljive dosledne razlike u ponašanju između adolescentnih i adultnih životinja. Dok kod E4 grupa nisu primećene nikakve razlike u ponašanju (Slika 19. B), RM ANOVA je kod E7 grupa pokazala značajan efekat starosti na nivo „zamrzavanja” od straha tokom drugog ($F_{(1,22)}=14.27$, $p<0,05$; Slika 19. D) i petog dana razuslovljavanja ($F_{(1,22)}=4.37$, $p<0,05$; Slika 19. D). *Post hoc* testovi su dalje otkrili da adultne ženke prikazuju viši nivo „zamrzavanja” od straha u poređenju sa adolescentima tokom drugog tona drugog i petog dana.

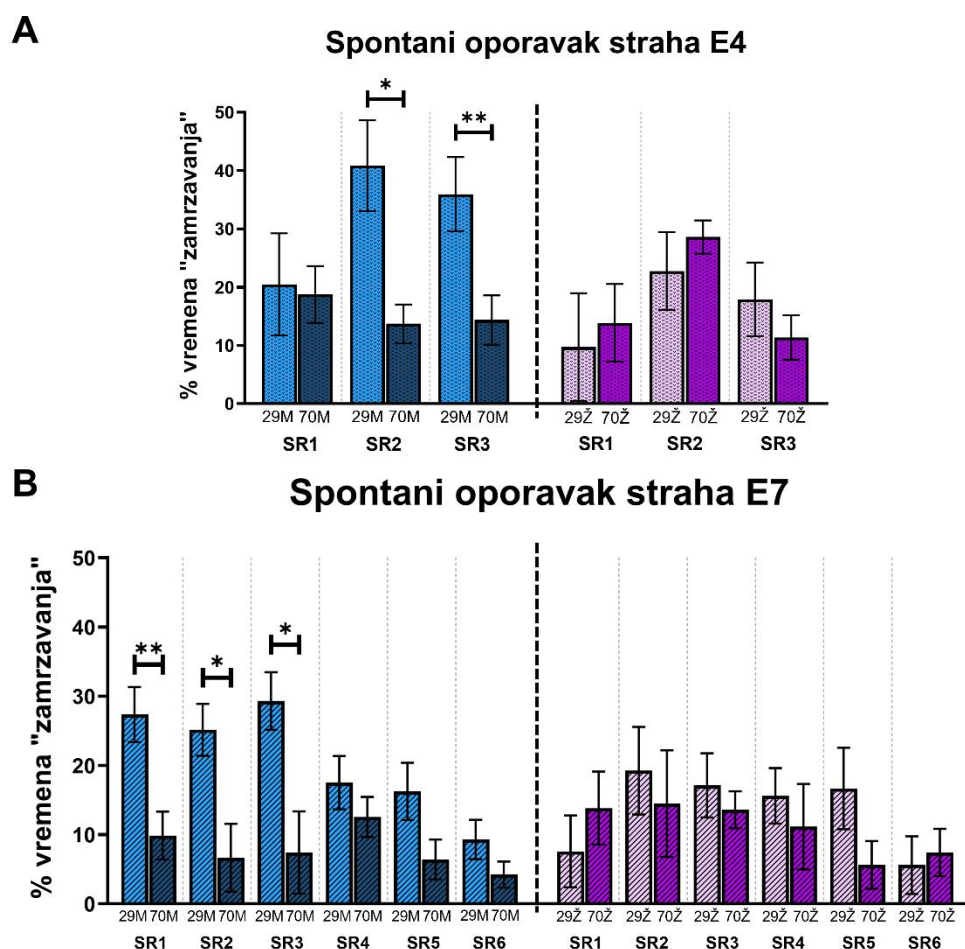


Slika 18. Uslovljavanje straha kod adolescentnih i adultnih miševa oba pola. (A, B, C levo) Prikaz „zamrzavanja“ od straha tokom uslovljavanja straha kod mužjaka US (gore), E4 (sredina) i E7 grupa (dole). (A, B, C desno). Prikaz „zamrzavanja“ od straha tokom uslovljavanja straha kod ženki US (gore), E4 (sredina) i E7 grupa (dole). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su dvofaktorskom RM ANOVA u okviru svakog pola, uz Bonferoni korekciju za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost i ponovljeno izlaganje uparenim stimulusima (ton/šok par). Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$. T1-T3, ton 1-3. P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke.

Pored kontinuiranog praćenja ponašanja životinja kroz 4, odnosno 7 dana ekstinkcije, preračunati su parametri koji bliže opisuju dugoročnu i kratkoročnu ekstinkciju straha. O dugotrajnoj ekstinkciji govori spontani oporavak straha, parametar koji pokazuje stepen vraćanja straha na inicijalni nivo nakon sprovedene ekstinkcije. U skladu sa tim, on u stvari odražava sposobnost životinja da konsoliduju memoriju ekstinkcije i kasnije joj po potrebi pristupe. Matematički, ovaj parametar se računa kao razlika u procentu „zamrzavanja“ između poslednjeg tona prethodnog dana i prvog tona narednog dana, a što su vrednosti ovog parametra veće, to životinje slabije uče da treba da suzbiju strah pri narednim izlaganjima uslovnom stimulusu. Statistički testovi su pokazali da adolescentni mužjaci E4 grupe imaju značajno izraženiji spontani oporavak straha u odnosu na adulte između drugog i trećeg ($t_{(25)} = 3.11$, $p < 0,05$; Slika 20. A), kao i trećeg i četvrtog dana ekstinkcije ($t_{(25)} = 3.52$, $p < 0,05$; Slika 20. A). Ovaj rezultat je ponovljen i kod E7 grupa, pri čemu su E7 adolescenti pokazali povišen stepen spontanog oporavka straha između prvog i drugog ($t_{(23)} = 3.32$, $p < 0,05$; Slika 20. B), drugog i trećeg ($t_{(23)} = 2.95$, $p < 0,05$; Slika 20. B) i trećeg i četvrtog dana ekstinkcije ($t_{(23)} = 2.97$, $p < 0,05$; Slika 20. B). Za razliku od mužjaka, kod ženki nisu uočene razlike u spontanom oporavku straha ni za jedan od ispitivanih dana, bilo za E4 ili E7 grupe.

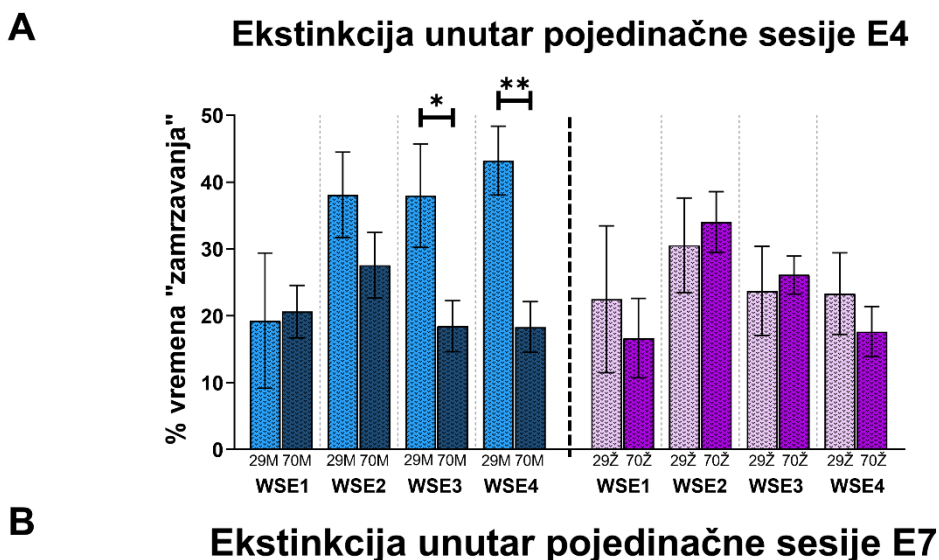


Slika 19. Ekstinkcija straha kod adolescentnih i adultnih miševa oba pola. (A i C) Prikaz „zamrzavanja” od straha tokom 4, odnosno 7 dana ekstinkcije straha kod mužjaka E4 (A) i E7 grupa (C). (B i D). Prikaz „zamrzavanja” od straha tokom 4, odnosno 7 dana ekstinkcije straha kod ženki E4 (B) i E7 grupa (D). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su dvofaktorskom RM ANOVA u okviru svakog pola, uz Bonferoni korekciju za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost i ponovljeno izlaganje uslovnim stimulusima (samostalni tonovi). Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za adolescentne u odnosu na adultne životinje. E1-E7, Ekstinkcija 1-7; T1-T5, ton 1-5. P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke.



Slika 20. Spontani oporavak straha kod adolescentnih i adultnih miševa oba pola. Spontani oporavak straha kod E4 (A) i E7 grupa (B), računat na sledeći način SR1 = E2T1-E1T5 ([Ekstinkcija 2, Ton 1] - [Ekstinkcija 1, Ton 5]); SR2 = E3T1-E2T5 ([Ekstinkcija 3, Ton 1] - [Ekstinkcija 2, Ton 5]); SR3 = E4T1-E3T5 ([Ekstinkcija 4, Ton 1] - [Ekstinkcija 3, Ton 5]); SR4 = E5T1-E4T5 ([Ekstinkcija 5, Ton 1] - [Ekstinkcija 4, Ton 5]); SR5 = E6T1-E5T5 ([Ekstinkcija 6, Ton 1] - [Ekstinkcija 5, Ton 5]); SR6 = E7T1-E6T5 ([Ekstinkcija 7, Ton 1] - [Ekstinkcija 6, Ton 5]). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke za svaki pojedinačni parametar u okviru svakog pola. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za adolescentne u odnosu na adultne životinje. P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke. SR1-SR6, spontani oporavak 1-6.

Konačno, za opisivanje kratkoročne ekstinkcije straha se koristi parametar učenja unutar pojedinačne sesije, WSE, koji se računa kao razlika u procentu „zamrzavanja” između prvog i poslednjeg tona u okviru svake sesije za bilo koji od 4, odnosno 7 dana sprovođenja ekstinkcije straha. U slučaju ovog parametra, što je veća njegova vrednost, životinje uspešnije suzbijaju strah unutar pojedinačne sesije razuslovljavanja. Kod adolescentnih mužjaka E4 grupe, zabeležena je veća vrednost WSE parametra u poređenju sa adultima za treći ($t_{(25)} = 2.21$, $p < 0,05$; Slika 21. A) i četvrti dan razuslovljavanja straha ($t_{(25)} = 3.84$, $p < 0,05$; Slika 21. A). U okviru E7 grupa, ovaj parametar je bio povišen kod adolescenata u odnosu na adultne mužjake za treći ($t_{(23)} = 2.53$, $p < 0,05$; Slika 21. B), četvrti ($t_{(23)} = 3.31$, $p < 0,05$; Slika 21. B), šesti ($t_{(23)} = 2.15$, $p < 0,05$; Slika 21. B) i sedmi ($t_{(23)} = 2.25$, $p < 0,05$; Slika 21. B) dan. Kod ženki nisu uočene statistički značajne razlike u WSE između adolescentnih i adultnih životinji ni u E4 ni u E7 grupama.



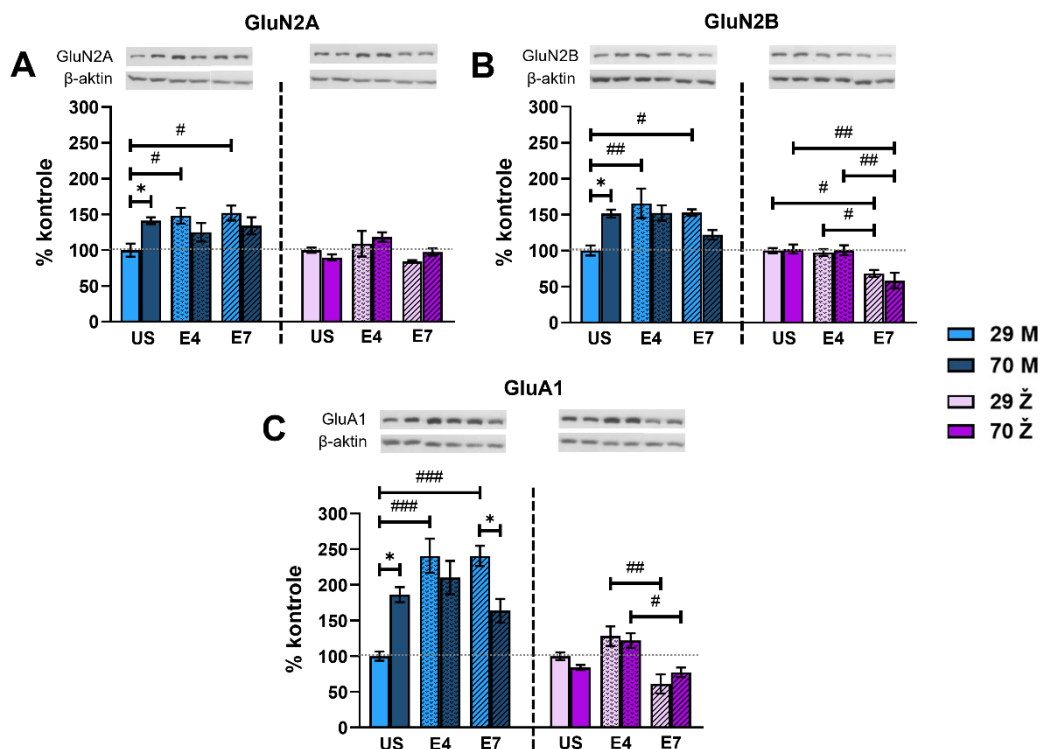
Slika 21. Ekstinkcija unutar pojedinačne sesije kod adolescentnih i adultnih miševa oba pola. Ekstinkcija unutar pojedinačne sesije kod E4 (A) i E7 grupa (B), računata na sledeći način: WSE1 = E1T1-E1T5 ([Ekstinkcija 1, Ton 1] - [Ekstinkcija 1, Ton 5]); WSE2 = E2T1-E2T5 ([Ekstinkcija 2, Ton 1] - [Ekstinkcija 2, Ton 5]); WSE3 = E3T1-E3T5 ([Ekstinkcija 3, Ton 1] - [Ekstinkcija 3, Ton 5]); WSE4 = E4T1-E4T5 ([Ekstinkcija 4, Ton 1] - [Ekstinkcija 4, Ton 5]); WSE5 = E5T1-E5T5 ([Ekstinkcija 5, Ton 1] - [Ekstinkcija 5, Ton 5]); WSE6 = E6T1-E6T5 ([Ekstinkcija 6, Ton 1] - [Ekstinkcija 6, Ton 5]); WSE7 = E7T1-E7T5 ([Ekstinkcija 7, Ton 1] - [Ekstinkcija 7, Ton 5]). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke za svaki pojedinačni parametar u okviru svakog pola. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za adolescentne u odnosu na adultne životinje. P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke. WSE1-WSE7, ekstinkcija unutar pojedinačne sesije 1-7.

4.1.2 Analiza nivoa subjedinica NMDA i AMPA receptora u hipokampusu adolescentnih i adultnih miševa oba pola

U cilju razlučivanja molekularskih mehanizama koji se nalaze u osnovi procesa ekstinkcije straha kod adolescentnih i adultnih životinja oba pola, sprovedena je imunoblot analiza različitih proteina uključenih u ostvarivanje sinaptičke plastičnosti. Nivoi ciljnih proteina su ispitivani u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC, a dobijene vrednosti u okviru svakog pola su predstavljene relativno u odnosu na kontrolni uzorak (US P29 mužjaci i US P29 ženke).

Kada su u pitanju nivoi subjedinica NMDA receptora, kod mužjaka je uočen značajan efekat interakcije starosti i vremenske tačke na nivo GluN2A subjedinice ($F_{(2,16)}=7.53$, $p < 0,05$; Slika 22. A), dok je za GluN2B ANOVA pokazala značajan efekat vremenske tačke ($F_{(2,17)}=4.93$, $p < 0,05$; Slika 22. B), kao i interakcije starosti i vremenske tačke ($F_{(2,17)}=7.81$, $p < 0,05$; Slika 22. B). *Post hoc* testovi su dalje pokazali povišen nivo GluN2A i GluN2B kod adultnih US životinja u odnosu na

adolescente, kao i kod E4 i E7 adolescenata u poređenju sa US adolescentnim mužjacima. Što se tiče ženki, nisu zapažene promene u nivou GluN2A subjedinice za bilo koju od ispitivanih eksperimentalnih grupa. Sa druge strane, uočen je efekat vremenske tačke na nivo GluN2B subjedinice ($F_{(2,16)}=21.86$, $p<0,05$; Slika 22. B), pri čemu je *post hoc* test pokazao da su i adolescentne i adultne E7 ženke imali niži nivo GluN2B od odgovarajućih US i E4 grupa.



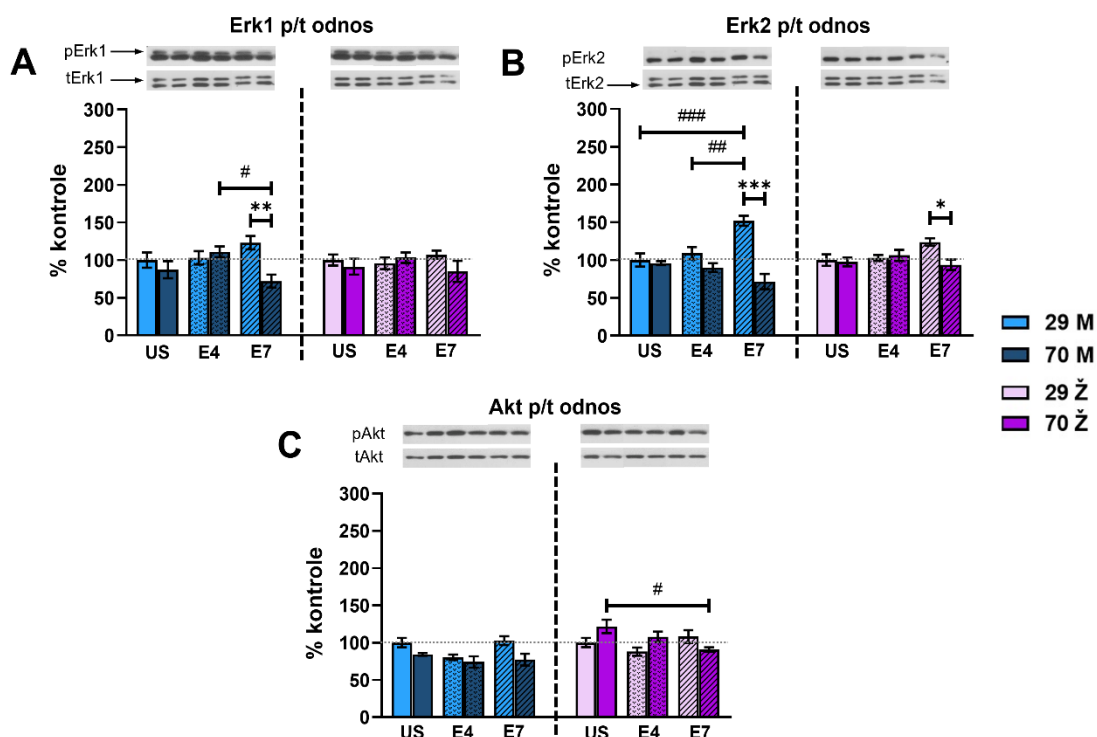
Slika 22. Efekti starosti i vremenskih tačaka na nivoe subjedinica NMDA i AMPA receptora u hipokampusu (HPC) miševa oba pola. Nivo proteina GluN2A (A) i GluN2B (B) subjedinice NMDA receptora, odnosno GluA1 (C) subjedinice AMPA receptora u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC kod razuslovljenih adolescentnih i adultnih mužjaka i ženki u različitim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su dvofaktorskom ANOVA za nezavisne uzorke u okviru svakog pola, uz Tukey test za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost i vremenska tačka. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p<0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje adolescenata u odnosu na adulte (P29 vs. P70) i # za međusobno poređenje između vremenskih tačaka (US vs. E4 vs. E7). US, uslovljavanje straha; E4, ekstinkcija 4 dana; E7, ekstinkcija 7 dana; P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke.

U pogledu AMPA receptora, kod mužjaka je uočen značajan efekat vremenske tačke ($F_{(2,18)}=12.62$, $p<0,05$; Slika 22. C), kao i interakcije starosti i vremenske tačke ($F_{(2,18)}=12.40$, $p<0,05$; Slika 22. C) na nivo GluA1 u HPC. Dalja *post hoc* analiza je pokazala povišen nivo GluA1 kod adultnih miševa US grupe u poređenju sa adolescentima, kao i kod E4 i E7 adolescenata u poređenju sa US grupom. Takođe, u okviru E7 grupe mužjaka je primećen porast GluA1 kod adolescenata u odnosu na adultne životinje. Kada je reč o ženkama, uočen je efekat vremenske tačke na GluA1 nivoe kod ispitivanih eksperimentalnih grupa ($F_{(2,18)}=17.41$, $p<0,05$; Slika 22. C). *Post hoc* test je pokazao niže nivoe GluA1 kod adolescentnih i adultnih E7 ženki u poređenju sa odgovarajućim E4 grupama.

4.1.3 Analiza aktivnosti mTOR signalnog puta u hipokampusu adolescentnih i adultnih miševa oba pola

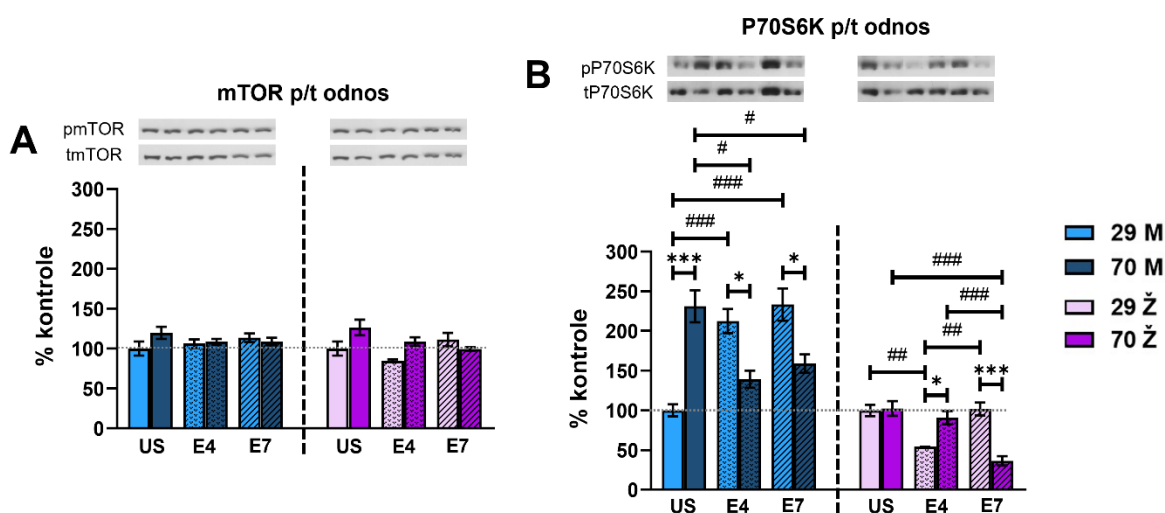
U okviru ovih eksperimenata, ispitivano je i kako se menja aktivnost različitih kinaza mTOR signalnog puta u HPC nakon uslovljavanja i ekstinkcije straha kod adolescentnih i adultnih životinja oba pola. S obzirom da se za meru aktivnosti kinaze uzima odnos njene fosforilisane i total forme, svi dobijeni rezultati su prikazani na ovaj način.

Kada govorimo o uzvodnim kinazama mTOR kaskade, analizirani su Erk 1, Erk 2 i Akt. Kod mužjaka, uočeni su značajni efekti starosti ($F_{(1,18)} = 7.59$, $p < 0,05$; Slika 23. A) i interakcije starosti i vremenske tačke na Erk 1 ($F_{(2,18)} = 6.56$, $p < 0,05$; Slika 23. A). *Post hoc* analiza je dalje pokazala da adultni mužjaci E7 grupe imaju smanjenu aktivnost Erk 1 u odnosu na E7 adolescente, kao i na adulte E4 grupe. Efekti starosti ($F_{(1,18)} = 42.80$, $p < 0,05$; Slika 23. B) i interakcije starosti i vremenske tačke ($F_{(2,18)} = 19.65$, $p < 0,05$; Slika 23. B) kod mužjaka su primećeni i za Erk 2. *Post hoc* testom je utvrđeno da adolescenti E7 grupe imaju pojačanu aktivnost Erk 2 u odnosu na E7 adulte, ali i na adolescentne životinje US i E4 grupe. Što se tiče Akt, kod mužjaka nisu zapažene bilo kakve statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa (Slika 23. C). Sa druge strane, kod ženki nisu primećene razlike u aktivnosti Erk 1, ali je uočen značajan efekat interakcije starosti i vremenske tačke ($F_{(2,18)} = 5.62$, $p < 0,05$; Slika 23. B) na stepen aktivnost Erk 2. Daljom *post hoc* analizom je pokazano da adolescentne ženke E7 grupe imaju povećan nivo aktivnost Erk 2 u poređenju sa adultnim životinjama. Kada je u pitanju Akt, kod ženki je zapažen značajan efekat interakcije starosti i vremenske tačke ($F_{(2,18)} = 5.19$, $p < 0,05$; Slika 23. C), a *post hoc* testom je utvrđeno da adultne E7 životinje imaju snižen nivo u poređenju sa US grupom adulta.



Slika 23. Efekti starosti i vremenskih tačaka na aktivnost uzvodnih kinaza mTOR signalnog puta u hipokampusu (HPC) miševa oba pola. Nivo aktivnosti Erk 1 (A), Erk 2 (B) i Akt (C) u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC kod razuslovljenih adolescentnih i adultnih mužjaka i ženki u različitim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su dvofaktorskom ANOVA za nezavisne uzorke u okviru svakog pola, uz Tukey test za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost i vremenska tačka. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje adolescenata u odnosu na adulte (P29 vs. P70) i # za međusobno poređenje između vremenskih tačaka (US vs. E4 vs. E7). US, uslovljavanje straha; E4, ekstinkcija 4 dana; E7, ekstinkcija 7 dana; P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke.

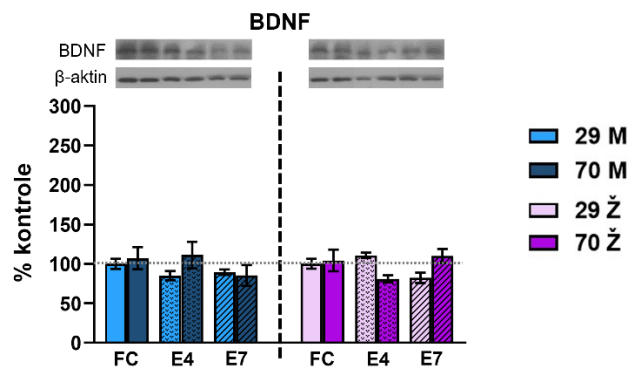
U pogledu aktivnosti same mTOR kinaze, ni kod jednog pola nisu uočene razlike između eksperimentalnih grupa (Slika 24. A). Ipak, i kod mužjaka i kod ženki su primećene promene u nivou aktivnosti P70S6K, nizvodne efektorne kinaze mTOR signalnog puta. Kod mužjaka je uočen značajan efekat interakcije starosti i vremenske tačke ($F_{(2,16)}=31.48$, $p<0,05$; Slika 24. B). *Post hoc* analizom je utvrđeno da adolescentni mužjaci US grupe imaju sniženu aktivnost P70S6K u poređenju sa adultnim životinjama, kao i sa adolescentima E4 i E7 grupe. Adolescenti E4 i E7 grupe su takođe imali viši stepen aktivnosti P70S6K u odnosu na odgovarajuće grupe adultnih životinja. Uz to, adulti US grupe su eksprimirali viši nivo P70S6K aktivnosti od E4 i E7 grupa adultnih mužjaka. Kada su u pitanju ženke, kod ovih kohorti je zabeležen značajan efekat vremenske tačke ($F_{(2,16)}=13.99$, $p<0,05$; Slika 24. B) i interakcije starosti i vremenske tačke ($F_{(2,16)}=27.54$, $p<0,05$; Slika 24. B) na nivo aktivnosti P70S6K. *Post hoc* test je pokazao da adolescenti E4 grupe imaju sniženu aktivnost P70S6K u odnosu na US i E7 adolescente, kao i adulte E4 grupe. Sličan obrazac aktivnosti je primećen i kod E7 adultne grupe životinja, uz niži stepen aktivnosti P70S6K u poređenju sa US i E4 adultima, ali i E7 grupom adolescentnih životinja.



Slika 24. Efekti starosti i vremenskih tačaka na aktivnost mTOR i njegovog nizvodnog efektor P70S6K u hipokampusu (HPC) miševa oba pola. Nivo aktivnosti mTOR (A) i P70S6K (B) u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC kod razuslovljenih adolescentnih i adultnih mužjaka i ženki u različitim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su dvofaktorskom ANOVA za nezavisne uzorke u okviru svakog pola, uz Tukey test za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost i vremenska tačka. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p<0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje adolescenata u odnosu na adulte (P29 vs. P70) i # za međusobno poređenje između vremenskih tačaka (US vs. E4 vs. E7). US, uslovljavanje straha; E4, ekstinkcija 4 dana; E7, ekstinkcija 7 dana; P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke.

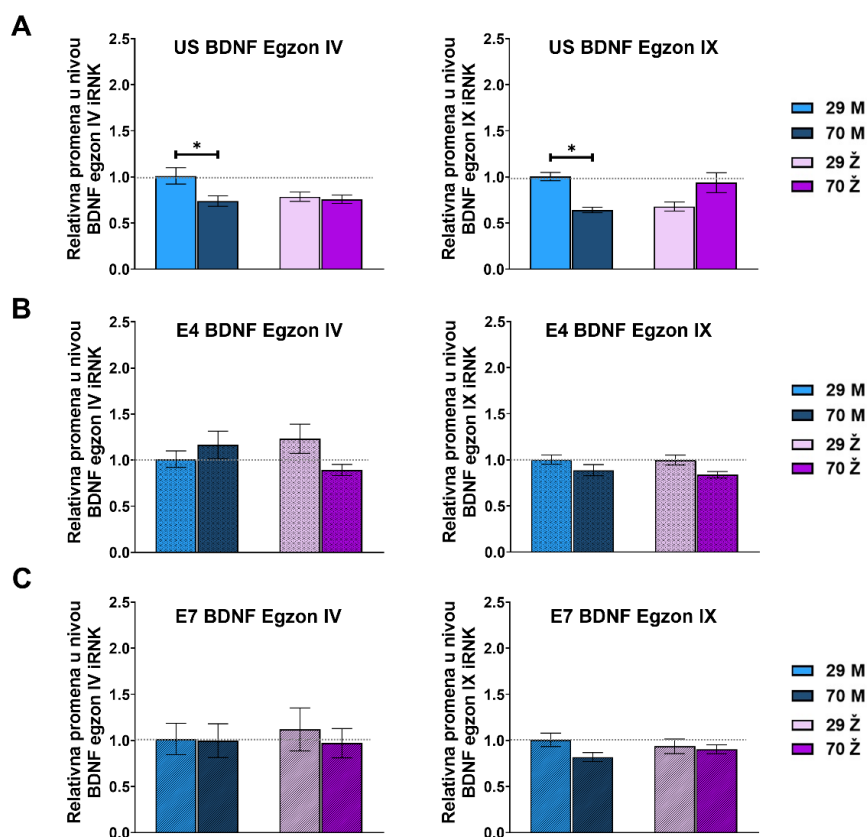
4.1.4 Analiza proteinske i genske ekspresije BDNF u hipokampusu adolescentnih i adultnih miševa oba pola

Konačno, u HPC eksperimentalnih životinja je analizirana proteinska i genska ekspresija BDNF, kao najzastupljenijeg markera sinaptičke plastičnosti u mozgu. Kada je u pitanju zrela forma BDNF proteina, ni kod jednog pola nisu uočene razlike između adolescentnih i adultnih životinja (Slika 25.).



Slika 25. Efekti starosti i vremenskih tačaka na nivo BDNF u hipokampusu (HPC) miševa oba pola. Nivo proteina BDNF u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC kod razuslovljenih adolescentnih i adultnih mužjaka i ženki u različitim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su dvofaktorskom ANOVA za nezavisne uzorke u okviru svakog pola, uz Tukey test za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost i vremenska tačka. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$. US, uslovljavanje straha; E4, ekstinkcija 4 dana; E7, ekstinkcija 7 dana; P29 M, adolescentni mužjaci; P70 M, adultni mužjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke.

Sa druge strane, rezultati genske ekspresije (statistički obrađeni tako da su unutar svake vremenske tačke ispitivane razlike kako između starosti, tako i između polova) su pokazali razlike u ekspresiji egzona IV i IX BDNF u okviru US grupe. Kod egzona IV, uočen je značajan efekat pola ($F_{(1,12)}=5.74$, $p < 0,05$; Slika 26. A levo), dok je za egzon IX primećen efekat interakcije starosti i pola ($F_{(1,12)}=11.09$, $p < 0,05$; Slika 26. A desno). *Post hoc* testom je dalje pokazano da adolescentni mužjaci imaju povišenu ekspresiju egzona IV i egzona IX u odnosu na adultne mužjake (Slika 26. A levo i desno).



Slika 26. Efekti starosti i pola na nivo BDNF u hipokampusu (HPC). Nivo BDNF egzona IV (A, B, C levo) i IX (A, B, C desno) u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC kod razuslovljenih adolescentnih i adultnih mužjaka i ženki u različitim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i

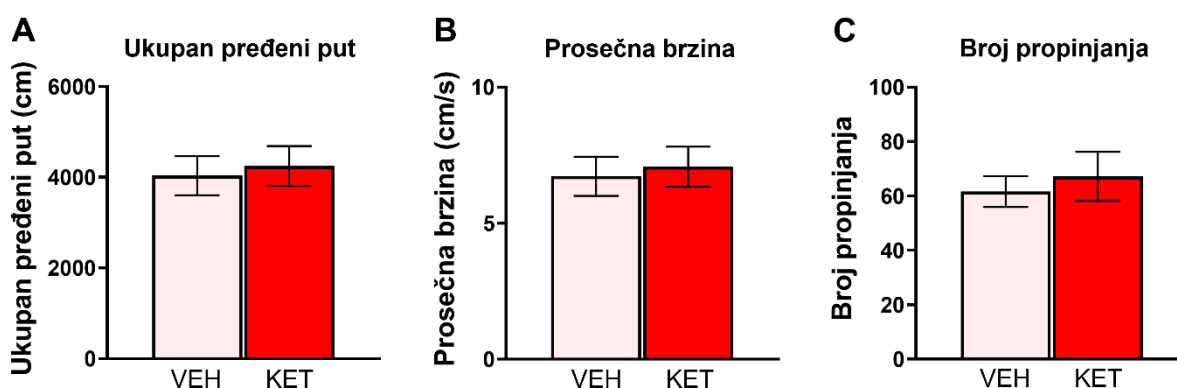
obrađeni su dvofaktorskom ANOVA za nezavisne uzorke u okviru svake vremenske tačke, uz Tukey test za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili starost i pol. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje adolescenata u odnosu na adulte (P29 vs. P70). US, uslovljavanje straha; E4, ekstinkcija 4 dana; E7, ekstinkcija 7 dana; P29 M, adolescentni mušjaci; P70 M, adultni mušjaci; P29 Ž, adolescentne ženke; P70 Ž, adultne ženke.

4.2 Eksperiment II

4.2.1 Analiza lokomotorne aktivnosti i ponašanja adolescentnih mušjaka nakon tretmana ketaminom

4.2.1.1 Lokomotorna aktivnost

Ketamin je anestetik koji može da izazove blagu sedaciju i u subanestetskim dozama (Kurdi i sar., 2014), tako da je prvo ispitan njegov uticaj na lokomotornu aktivnost životinja u OFT. Analizirani su parametri kako horizontalne (ukupni pređeni put i prosečna brzina kretanja), tako i vertikalne aktivnosti (broj propinjanja), pri čemu nije uočen efekat ketamina ni na jedan od izmerenih parametara (Slika 27.).



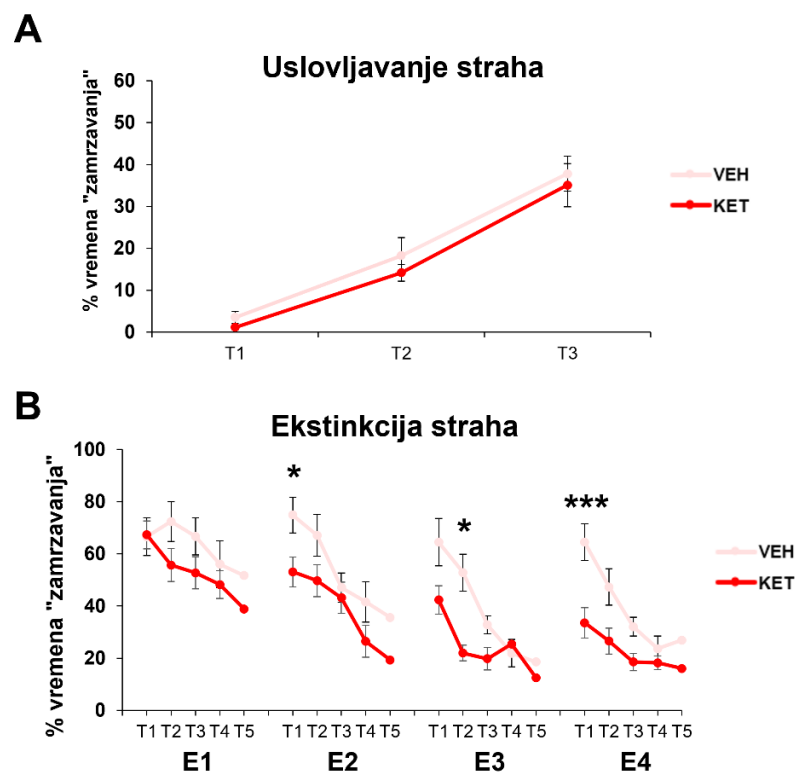
Slika 27. Efekat ketamina na horizontalnu i vertikalnu lokomotornu aktivnost adolescentnih miševa. Ukupan pređeni put (A), prosečna brzina kretanja (B) i broj propinjanja kod adolescentnih miševa tretiranih ketaminom (KET) u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke. Nisu uočene statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa za bilo koji od analiziranih parametara.

4.2.1.2 Uslovljavanje i ekstinkcija straha

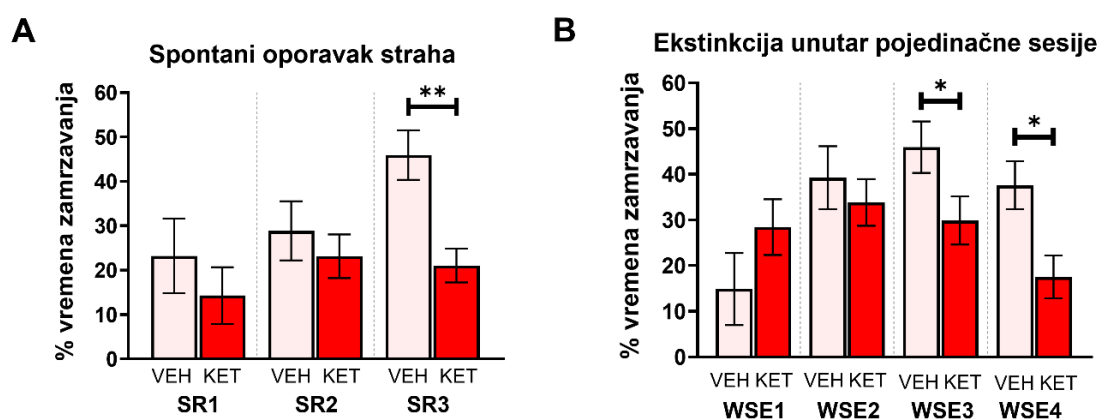
Nakon analize efekata ketamina na lokomociju adolescentnih mušjaka, na odvojenom setu životinja je ispitan njegov uticaj na proces ekstinkcije straha. U ovom delu eksperimenta, životinje su prvo prošle kroz uslovljavanje straha, koje se nije odvijalo pod uticajem tretmana, pri čemu nisu uočene statistički značajne razlike u ponašanju životinja tokom bilo kog od 3 izlaganja uparenim stimulusima (Slika 28. A).

Dalje, praćeno je kako ketamin utiče na ekstinkciju straha tokom 4 uzastopna dana njenog sprovođenja. U okviru ovih analiza, uočen je značajan efekat tretmana na ponašanje životinja u okviru drugog ($F_{(1,30)}=5.03$, $p < 0,05$; Slika 28. B), trećeg ($F_{(1,30)}=5.69$, $p < 0,05$; Slika 28. B) i četvrtog dana ekstinkcije ($F_{(1,30)}=11.21$, $p < 0,05$; Slika 28. B). *Post hoc* analizom je dalje ustanovljeno da je ketamin uspešno smanjio „zamrzavanje” životinja od straha tokom trajanja prvog tona u okviru drugog i četvrtog dana, odnosno drugog tona u okviru trećeg dana ekstinkcije.

Kao i u prethodnom eksperimentu, i ovde je pristupljeno preračunavanju parametara dugoročne i kratkoročne ekstinkcije. Dobijeni rezultati su pokazali da je ketamin uspešno umanjio nivo spontanog oporavka straha kod adolescentnih mušjaka u poređenju sa kontrolnim životinjama, i to između trećeg i četvrtog dana ekstinkcije ($t_{(30)}=3.69$, $p < 0,05$; Slika 29. A). Sa druge strane, kontrolne životinje su imale povećanu vrednost WSE parametra za treći ($t_{(30)}=2.08$, $p < 0,05$, Slika 29. B) i četvrti dan ($t_{(30)}=2.86$, $p < 0,05$; Slika 29. B) u poređenju sa ketaminskom grupom, dok za prva dva dana ekstinkcije nisu uočene bilo kakve razlike.



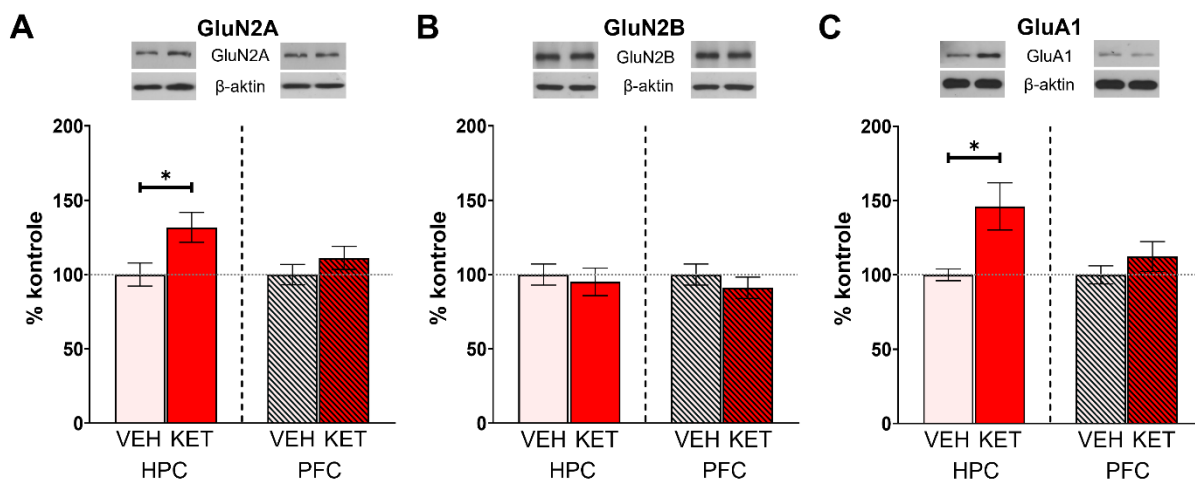
Slika 28. Uslovljavanje i ekstinkcija straha kod adolescentnih mužjaka tretiranih ketaminom. (A) Prikaz „zamrzavanja” od straha tokom uslovljavanja straha. (B) Prikaz „zamrzavanja” od straha tokom 4 dana trajanja paradigme ekstinkcije straha. Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su dvofaktorskom RM ANOVA, uz Holm Sidak korekciju za *post hoc* analizu. Faktori analize su bili tretman i ponovljeno izlaganje odgovarajućim stimulusima u toku testa (ton/šok par vs. samostalni ton). Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za životinje tretirane ketaminom (KET) u odnosu na kontrolnu grupu (VEH). E1-E4, Ekstinkcija 1-4; T1-T5, ton 1-5.



Slika 29. Parametri ekstinkcije straha kod adolescentnih mužjaka tretiranih ketaminom. (A) Spontani oporavak straha, računat na sledeći način: SR1 = E2T1-E1T5 ([Ekstinkcija 2, Ton 1] - [Ekstinkcija 1, Ton 5]); SR2 = E3T1-E2T5 ([Ekstinkcija 3, Ton 1] - [Ekstinkcija 2, Ton 5]); SR3 = E4T1-E3T5 ([Ekstinkcija 4, Ton 1] - [Ekstinkcija 3, Ton 5]); (B) Ekstinkcija unutar pojedinačne sesije, računata na sledeći način: WSE1 = E1T1-E1T5 ([Ekstinkcija 1, Ton 1] - [Ekstinkcija 1, Ton 5]); WSE2 = E2T1-E2T5 ([Ekstinkcija 2, Ton 1] - [Ekstinkcija 2, Ton 5]); WSE3 = E3T1-E3T5 ([Ekstinkcija 3, Ton 1] - [Ekstinkcija 3, Ton 5]); WSE4 = E4T1-E4T5 ([Ekstinkcija 4, Ton 1] - [Ekstinkcija 4, Ton 5]). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke u okviru svakog pojedinačnog dana ekstinkcije. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za životinje tretirane ketaminom (KET) u odnosu na kontrolnu grupu (VEH). T1-T5, ton 1-5. SR1-SR3, spontani oporavak 1-3; WSE 1-4, ekstinkcija unutar pojedinačne sesije 1-4.

4.2.2 Analiza nivoa subjedinica NMDA i AMPA receptora u hipokampusu i prečenoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom

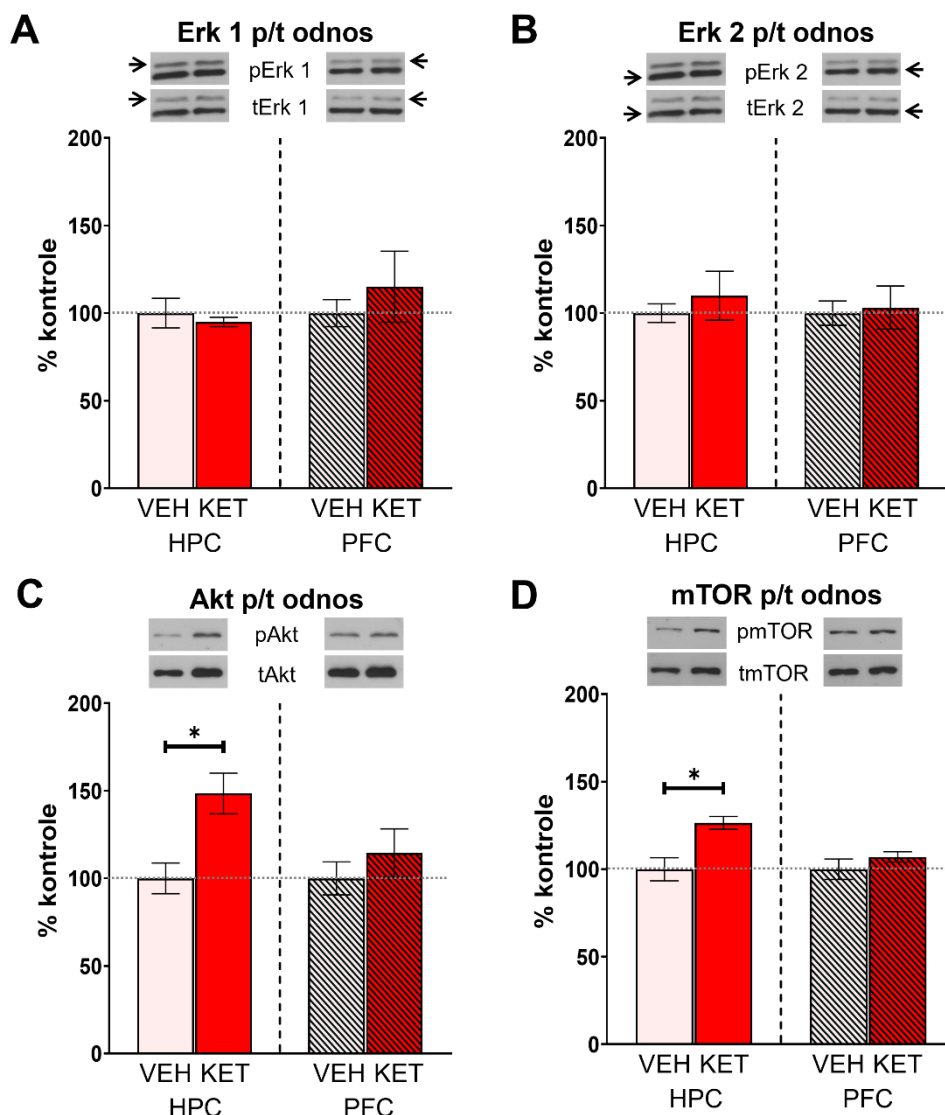
Kao antagonista NMDA receptora, ketamin značajno utiče na glutamatsku neurotransmisiju posredovanu kako NMDA, tako i AMPA receptorima. U skladu sa tim, statistička analiza dobijenih rezultata je pokazala povišen nivo GluN2A subjedinice NMDA receptora ($t_{(6)}=2.50$, $p < 0,05$; Slika 30. A), kao i GluA1 subjedinice AMPA receptora ($t_{(6)}=2.56$, $p < 0,05$; Slika 30. C) u HPC razuslovljenih životinja tretiranih ketaminom u poređenju sa kontrolama. Sa druge strane, nije uočen efekat tretmana na nivo ovih subjedinica u PFC. Što se tiče GluN2B subjedinice, nisu uočene promene u njenoj proteinskoj ekspresiji ni u jednom od dva analizirana tkiva (Slika 30. B).



Slika 30. Efekti ketamina na nivoe subjedinica NMDA i AMPA receptora u hipokampusu (HPC) i prečenoj kori (PFC). Nivo proteina GluN2A (A) i GluN2B (B) subjedinice NMDA receptora, odnosno GluA1 (C) subjedinice AMPA receptora u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC i PFC kod razuslovljenih adolescentnih mužjaka tretiranih ketaminom (KET) u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke u okviru svakog tkiva. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje VEH u odnosu na KET.

4.2.3 Analiza aktivnosti mTOR signalnog puta u hipokampusu i prečenoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom

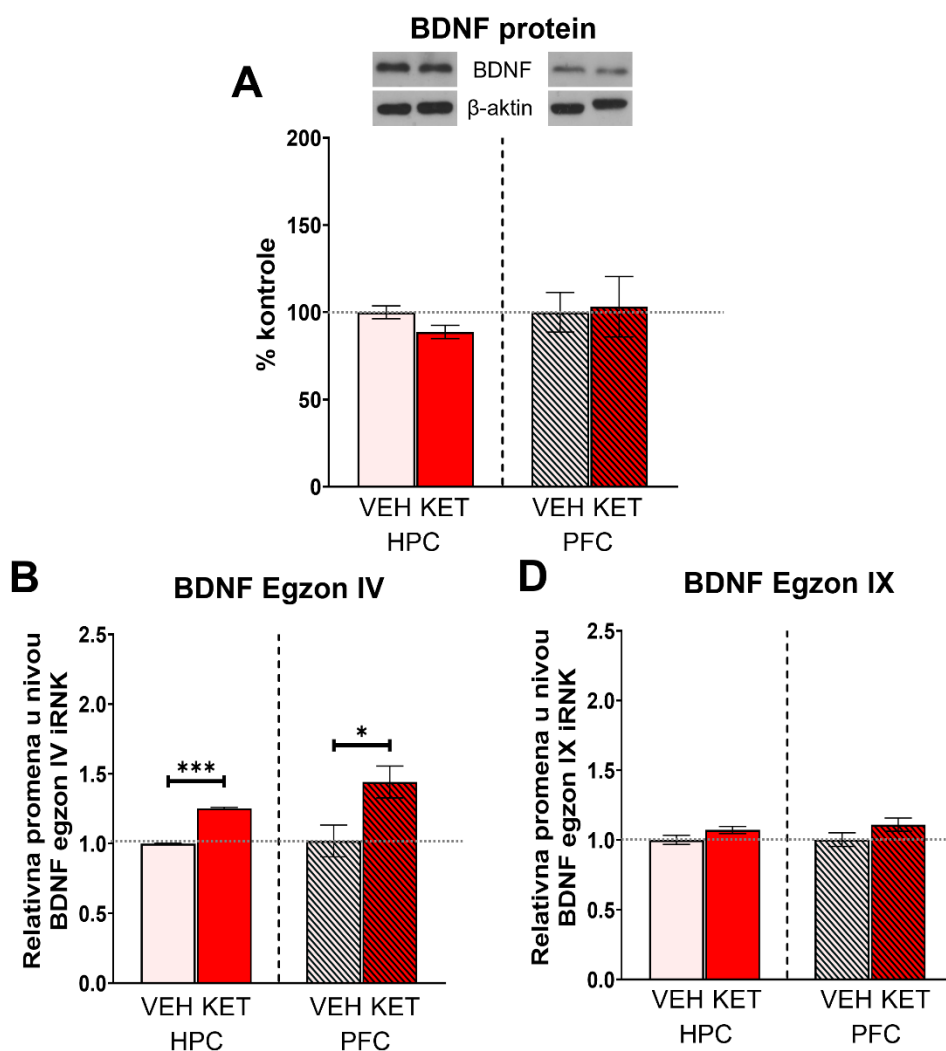
Što se tiče uticaja na nizvodnu unutarćelijsku molekulska signalizaciju, poznato je da ketamin ostvaruje svoje efekte preko aktivacije mTOR signalnog puta. U našem eksperimentalnom modelu, tretman ketaminom nije uticao na aktivnost Erk 1 i Erk 2 kinaze ni u jednom od ispitivanih tkiva (Slika 31. A i Slika 31. B). Ipak, ketamin je doveo do porasta aktivnosti Akt ($t_{(6)} = 3.33$, $p < 0,05$; Slika 31. C) i mTOR kinaze ($t_{(6)} = 3.51$, $p < 0,05$; Slika 31. D) u HPC razuslovljenih miševa u odnosu na kontrole, dok u PFC nisu uočene nikakve promene (Slika 31. C i Slika 31. D).



Slika 31. Efekti ketamina na aktivnost mTOR signalnog puta u hipokampusu (HPC) i prečenoj kori (PFC). Nivo aktivnosti Erk 1 (A), Erk 2 (B), Akt (C) i mTOR (D) kinaze u sinaptoneurozomalnoj frakciji HPC i PFC kod razuslovljenih adolescentnih mužjaka tretiranih ketaminom (KET) u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke u okviru svakog tkiva. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje VEH u odnosu na KET.

4.2.4 Analiza proteinske i genske ekspresije BDNF u hipokampusu i prečenoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom

Konačno, ispitivan je i uticaj ketamina na proteinsku i gensku ekspresiju BDNF. Statističkom analizom rezultata nisu pronađene razlike u nivou BDNF proteina između ispitivanih grupa ni u HPC ni u PFC (Slika 32. A). Sa druge strane, tretman ketaminom je doveo do porasta ekspresije BDNF egzona IV u poređenju sa kontrolama kako u HPC ($t_6 = 26.8$, $p < 0.05$; Slika 32. B), tako i u PFC (PFC: $t_6 = 2.62$, $p < 0.05$; Slika 32. B), pri čemu je ekspresija egzona IX u oba tkiva ostala nepromenjena (Slika 32. C).



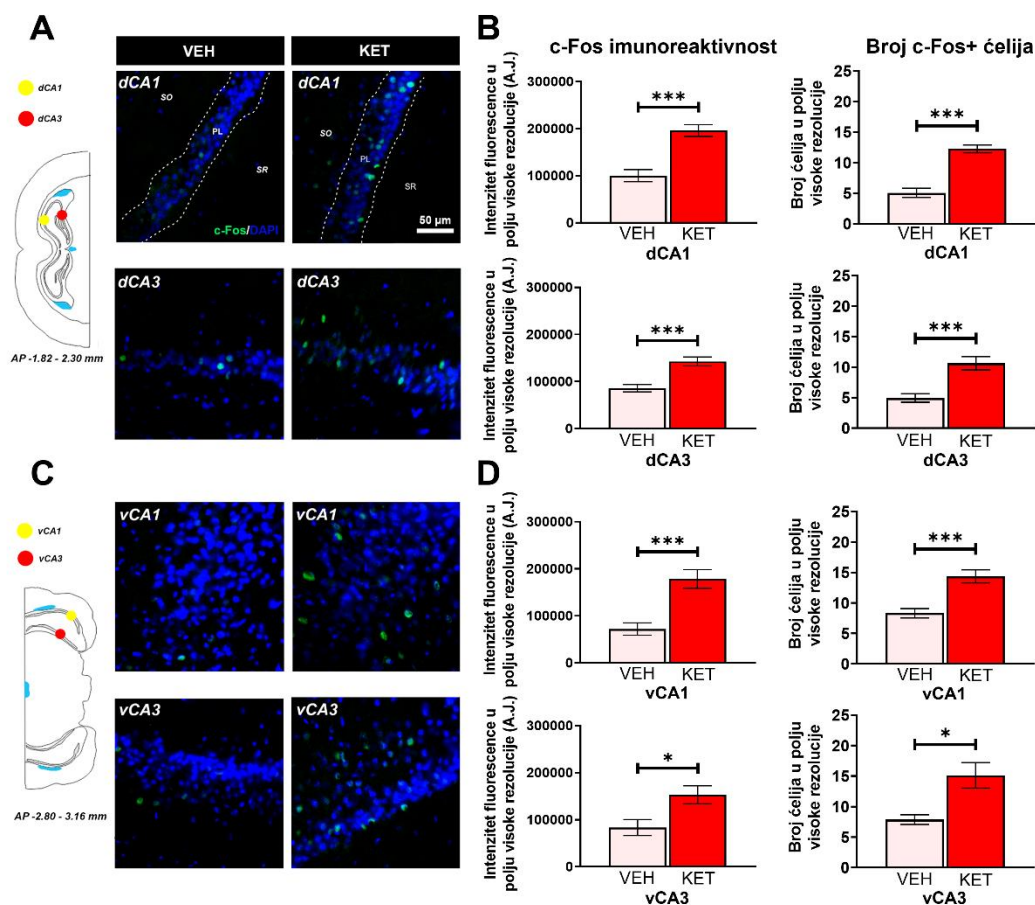
Slika 32. Efekti ketamina na proteinsku i gensku ekspresiju BDNF u hipokampusu (HPC) i prečeojoj kori (PFC). Nivo BDNF proteina (A) u sinaptoneurozomalnoj frakciji, odnosno BDNF egzon IV (B) i egzon IX (C) iRNK u ukupnom ćelijskom ekstraktu HPC i PFC kod razuslovljenih adolescentnih mužjaka tretiranih ketaminom (KET) u poređenju sa kontrolama (VEH). Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke u okviru svakog tkiva. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje VEH u odnosu na KET. $p < 0,05$, *; $p < 0.001$, ***.

4.2.5 Analiza ekspresije c-Fos i broja c-Fos⁺ ćelija u hipokampusu i prečeojoj kori kod adolescentnih mužjaka nakon tretmana ketaminom

U cilju boljeg razumevanja efekata ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih miševa muškog pola, ispitana je ekspresija c-Fos proteina kao markera neuronalne aktivnosti u prethodno definisanim regionima HPC i PFC. Kao dodatna potvrda dobijenih rezultata, u ovim regionima je izmeren i broj c-Fos⁺ pozitivnih ćelija.

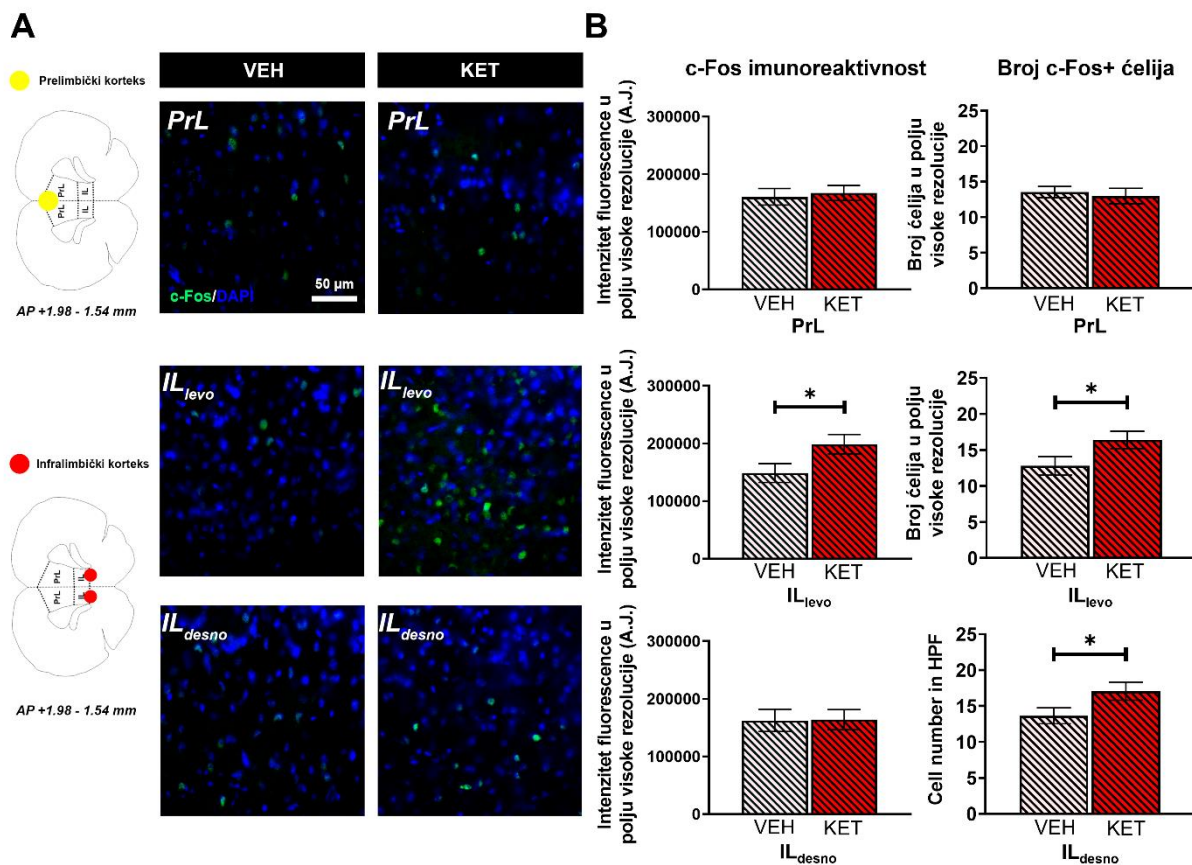
Kada je u pitanju HPC, analizirani su CA1 i CA3 regioni dorzalnog i ventralnog HPC (Slika 33. A i Slika 33. C), a kako ni kod jedne eksperimentalne grupe nisu uočene razlike između leve i desne hemisfere, rezultati su zbirno predstavljeni za cele ROIs. Dobijeni rezultati su pokazali da kod adolescentnih miševa razuslovljenih od straha, ketamin pozitivno utiče na ekspresiju c-Fos proteina u CA1 i CA3 regionima dHPC (dHPC CA1: $t_{(62)} = 5.34$, $p < 0,05$, Slika 33. B levo gore; dHPC CA3: $t_{(29)} = 4.61$, $p < 0,05$, Slika 33. B levo dole) i vHPC (vHPC CA1: $t_{(28)} = 4.52$, $p < 0,05$, Slika 33. D levo gore; vHPC CA3: $t_{(14)} = 2.72$, $p < 0,05$, Slika 33. D levo dole). Takođe, ketamin je u istim ovim regionima doveo i do porasta broja c-Fos⁺ ćelija u odnosu na kontrolne jedinice (dHPC CA1: $t_{(62)} = 7.27$, $p < 0,05$, Slika 33. B desno gore; dHPC CA3: $t_{(30)} = 4.39$, $p < 0,05$, Slika 33. B desno dole;

vHPC CA1: $t_{(30)} = 4.61$, $p < 0,05$, Slika 33. D desno gore; vHPC CA3: $t_{(14)} = 3.25$, $p < 0,05$, Slika 33. D desno dole).



Slika 33. Efekti ketamina na ekspresiju c-Fos i broj c-Fos⁺ ćelija u hipokampusu. Preklopljeno fluorescentno bojenje c-Fos (zelena) i DAPI (plava) u CA1 i CA3 regionima dorzalnog i ventralnog hipokampusa kod razuslovljenih adolescentnih miševa tretiranih fiziološkim rastvorom (A i C, levi panel) i ketaminom (A i C, desni panel). Grafici koji označavaju c-Fos imunoreaktivnost (B i D, levi panel) i broj c-Fos⁺ ćelija (B i D, desni panel) su predstavljeni kao srednja vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke u okviru svakog pojedinačnog regiona. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje VEH u odnosu na KET. $p < 0,05$, *; $p < 0.001$, ***.

Što se tiče PFC, na osnovu uloge u procesima uslovljavanja i ekstinkcije straha, analizirani su njegov PrL i IL region (Slika 34. A). Unutar PrL, nisu uočene razlike u ekspresiji c-Fos, kao ni u broju c-Fos⁺ ćelija između kontrolnih životinja i životinja tretiranih ketaminom. Nasuprot tome, ketamin je podstakao ekspresiju c-Fos u okviru leve hemisfere IL kore ($t_{(30)} = 2.12$, $p < 0,05$, Slika 34. B, levi panel, sredina), dok je povećanje broja ćelija pod dejstvom ketamina primećeno kako u levoj ($t_{(30)} = 2.10$, $p < 0,05$, Slika 34. B, desni panel, sredina), tako i u desnoj hemisferi IL regiona ($t_{(30)} = 2.04$, $p = 0,05$ Slika 34. B, desni panel, dole).



Slika 34. Efekti ketamina na ekspresiju c-Fos i broj c-Fos⁺ ćelija u prečenoj kori. Preklopljeno fluorescentno bojenje c-Fos (zelena) i DAPI (plava) u prelimbičkom (PrL) i infralimbičkom regionu (IL) prečeeone kore kod razuslovljenih adolescentnih miševa tretiranih fiziološkim rastvorom (A, levi panel) i ketaminom (A, desni panel). Grafici koji označavaju c-Fos imunoreaktivnost (B, levi panel) i broj c-Fos⁺ ćelija (B, desni panel) su predstavljeni kao srednja vrednost merenja $\pm$ SEM i obrađeni su t-testom za nezavisne uzorke u okviru svakog pojedinačnog regiona. Statistički značajne razlike su uzimane za vrednosti $p < 0,05$ i predstavljene su kao * za poređenje VEH u odnosu na KET.

5. DISKUSIJA

Adolescenciju karakteriše niža efikasnost ekstinkcije straha u poređenju sa odraslim jedinkama (K. D. Baker i Richardson, 2015; J. H. Kim i sar., 2011; Lu i sar., 2019; McCallum i sar., 2010; Pattwell i sar., 2012), što doprinosi povišenoj incidenci javljanja poremećaja povezanih sa strahom u ovoj starosnoj grupi (Beesdo i sar., 2009; Siegel i Dickstein, 2012). Pored toga, ET, terapijski pristup lečenju ovih poremećaja koji se zasniva na principima ekstinkcije straha, je manje efikasan kod adolescenata (DiMauro i sar., 2013; Ginsburg i sar., 2014). U svetlu ovih činjenica, ispitivanje farmakoloških agenasa koji mogu da poboljšaju ekstinkciju straha kod adolescenata i na taj način unaprede njihove ishode u ET predstavlja ključni istraživački imperativ. Ipak, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi starosnih razlika u ekstinkciji straha, a čije poznavanje bi moglo doprineti iznalaženju efikasnije terapije za adolescente, su još uvek nedovoljno istraženi. U skladu sa tim, u ovoj doktorskoj disertaciji su po prvi put okarakterisane promene u ekspresiji različitih subjedinica glutamatskih receptora i BDNF, kao i aktivnosti kinaza mTOR signalnog puta u HPC adolescentnih i adultnih miševa oba pola nakon ekstinkcije straha. Takođe je ispitan uticaj ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka, grupe sa smanjenom efikasnošću ovog oblika učenja. Ovom prilikom je prvi put izvršeno ispitivanje neuronskih korelata efekata ketamina na proces ekstinkcije kod adolescenata, uz analizu ekspresije i aktivnosti prethodno navedenih molekularnih medijatora u HPC i PFC.

5.1 Ekstinkcija straha kod adolescentnih miševa je narušena na polno-specifičan način

Adolescencija je razvojni period koji predstavlja prekretnicu u životu sisara na više načina. Tokom adolescencije, jedinke se suočavaju sa različitim evolutivnim izazovima, i to u vidu polnog sazrevanja i sticanja sposobnosti reprodukcije, što kod mnogih vrsta sisara podrazumeva osamostaljivanje i prelazak sa zavisnosti od roditeljskog staranja na potpunu samostalnost (Spear, 2004). U skladu sa tim, pojačana stopa opreza i ispoljavanja straha u dodiru sa novim stimulusima i okruženjima predstavlja evolutivno poželjan oblik ponašanja za adolescente. Međutim, ovakav obrazac ponašanja postaje maladaptivan kada počinje da se ispoljava u odsustvu stvarne opasnosti. Na ovaj način dolazi do pojave poremećaja povezanih sa strahom, koji se pored pojačanog usvajanja straha temelje i na njegovoj narušenoj ekstinkciji (Pitman i sar., 2012).

Analizom nekoliko parametara kratkoročne i dugoročne ekstinkcije straha, ustanovljeno je da adolescentni miševi muškog pola imaju narušen proces ekstinkcije u poređenju sa adultnim životinjama. S obzirom da su najizraženije promene uočene na nivou spontanog oporavka straha, parametra dugoročne ekstinkcije (Quirk i Mueller, 2008), naši rezultati upućuju na sniženu stopu konsolidacije, očuvanja i/ili pristupanja dugoročnoj memoriji ekstinkcije straha kod adolescentnih mužjaka. Ovakav zaključak je u saglasnosti sa nizom studija u kojima je zabeležena viša stopa oporavka straha i narušena dugoročna memorija ekstinkcije kod adolescentnih mužjaka pacova (K. D. Baker i Richardson, 2015; J. H. Kim i sar., 2011; McCallum i sar., 2010). Takođe, on je dodatno potkrepljen i učinkom testiranih adolescentnih mužjaka unutar pojedinačnih sesija ekstinkcije, koji ukazuje na očuvanost samog procesa učenja i formiranja kratkoročne memorije ekstinkcije (Quirk i Mueller, 2008).

U okviru interpretacije dobijenih rezultata, treba razmotriti i mogućnost da izmenjen proces ekstinkcije kod adolescentnih mužjaka može biti posledica formiranja snažnije memorije straha u odnosu na adultne životinje. U tom slučaju, intenzivno sećanje na uslovljavanje straha, koje za životinju ima veći značaj u kontekstu preživljavanja, bi kod adolescenata „nadačavalo” novonastalu memoriju ekstinkcije i dovelo do pojačanog ispoljavanja straha. Ipak, kako bi adolescentne životinje prolazile kroz ponovljene sesije ekstinkcije straha, memorija ekstinkcije bi vremenom postala dominantna, vodeći ka konačnom suzbijanju straha kod adolescenata, uz sporiju dinamiku procesa u odnosu na adulte. Ovakvo tumačenje je podržano činjenicom da adolescentne životinje mogu da očuvaju memoriju straha tokom izuzetno dugog perioda, i do 30 dana nakon procesa uslovljavanja (Samifanni i sar., 2021). Takođe, adolescentima je svojstvena i intenzivna reaktivnost na stresore (Spear, 2009), u koje generalno spada i električni šok primenjen tokom uslovljavanja (Bali i Jaggi, 2015), pri čemu je poznato da stres indukuje pojačanu konsolidaciju i dugoročno održavanje

memorije straha (Aubry i sar., 2016; Martijena i Molina, 2012). Sa druge strane, u našim istraživanjima nisu uočene razlike u ispoljenim nivoima straha između adolescentnih i adultnih životinja ni tokom uslovljavanja, ni tokom ranih faza ekstinkcije straha. Posmatrani zajedno, ovi rezultati upućuju na zaključak da životinje obe starosti podjednako uspešno usvajaju strah, formirajući memoriju straha ujednačenog intenziteta, dok su uočene promene u ponašanju adolescenata specifično vezane za proces ekstinkcije straha.

S obzirom na značajnu ulogu koju narušenost ekstinkcije straha igra u etiopatogenezi različitih psihijatrijskih poremećaja, nalaženje načina za njeno poboljšanje zauzima značajno mesto u neurobiološkim istraživanjima. Naši eksperimenti su pokazali da je smanjena efikasnost ekstinkcije straha kod adolescentnih mužjaka uspešno prevaziđena povećanjem broja sesija ekstinkcije. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa pretkliničkom studijom koja ukazuje da dupliranje broja sesija poboljšava ekstinkciju straha kod adolescenata (McCallum i sar., 2010). O efikasnosti ovakvog bihevioralnog pristupa svedoči i činjenica da je njegovom implementacijom osvaren podjednako snažan efekat na proces ekstinkcije kao i primenom DCS kao farmakološkog tretmana (McCallum i sar., 2010). Uvođenje većeg broja sesija ekstinkcije predstavlja pretklinički ekvivalent PE terapiji koja se koristi za tretman PTSP. U tom kontekstu, naši rezultati sugerišu da bi PE mogla biti efikasan terapijski pristup lečenju poremećaja povezanih sa strahom kod adolescenata muškog pola. Ovu ideju dodatno potkrepljuju aktuelna klinička istraživanja koja svedoče o benefitima primene PE u lečenju PTSP kod adolescenata ženske populacije (Brown i sar., 2020; Rossouw i sar., 2018, 2022; Zandberg i sar., 2016).

Kada je u pitanju proces ekstinkcije straha kod ženki, dobijeni rezultati ukazuju da adolescentne životinje suzbijaju strah jednako efikasno kao i adultne. Kao što je prethodno već navedeno, estradiol pozitivno utiče na učenje i formiranje memorije ekstinkcije straha (Lebron-Milad i Milad, 2012). Kada prolaze kroz sesije ekstinkcije sa visokim nivoom estradiola u krvi, ženke inhibiraju strah jednako uspešno kao i mužjaci (Milad, Igoe, i sar., 2009), iako treba istaći da su zabeleženi i drugačiji rezultati (Perry i sar., 2020). Sa druge strane, nizak nivo estradiola u krvi je kod ženki asociran sa smanjenom efikasnošću ekstinkcije straha (Milad, Igoe, i sar., 2009). Ipak, treba napomenuti da se ovi rezultati odnose na adultne životinje (Milad, Igoe, i sar., 2009), kao i da ženke tokom adolescencije tek počinju da sintetišu značajne količine polnih hormona (Bell, 2018), što sugerise da je neki drugi mehanizam prvenstveno zaslužan za zabeleženo odsustvo starosnih razlika u ekstinkciji straha.

5.2 Uspešna ekstinkcija straha kod adolescentnih mužjaka je asocirana sa aktivacijom NMDA-Erk-mTOR-GluA1 signalnog puta u hipokampusu

Osnovnu ulogu HPC u modelima uslovljavanja i ekstinkcije straha predstavlja prepoznavanje konteksta u kom se životinja nalazi. U skladu sa tim, doprinos ove strukture kontekstualnoj ekstinkciji straha je izuzetno detaljno literaturno opisan (Phillips i LeDoux, 1992), dok je njen značaj za paradigme signalne ekstinkcije još uvek nedovoljno razjašnjen.

Signalna ekstinkcija straha je proces koji izuzetno zavisi od konteksta u kome se odvija, što se ogleda u fenomenu ponovnog ispoljavanja straha u slučaju da se životinja nakon uspešno sprovedene ekstinkcije u jednom kontekstu izloži US u novom kontekstu (Bouton, 2004). Shodno tome, prepoznavanje i diskriminacija između različitih konteksta čine izuzetno bitne elemente ovog modela učenja (Bergstrom, 2020). U paradigmatima signalnog uslovljavanja straha, životinje se izlažu uparenim US-BS stimulusima u jednom kontekstu, dok se proces njegove ekstinkcije odvija u drugom. Tokom ekstinkcije straha, BS koji više ne signalizira opasnost postaje asociran sa novim kontekstom, koji počinje da predstavlja neku vrstu „signala bezbednosti” (*engl. safety cue*) za životinju (Dibbets i sar., 2008). Na osnovu toga možemo da pretpostavimo da pojačana aktivacija HPC i bolje prepoznavanje i pamćenje novog konteksta doprinose efikasnijem razuslovljavanju straha na diskretan BS. U prilog ovoj hipotezi govori nekoliko studija u kojima je pokazano da su promene u ekspresiji sinaptičkih proteina u HPC asocirane sa promenama u efikasnosti signalne ekstinkcije straha (Psotta i sar., 2013; Q. Wang i sar., 2018). Dodatno, nezaobilaznu ulogu HPC u

ovom obliku učenja potkrepljuje i podatak da bilateralna infuzija NMDA blokatora u HPC dovodi do potpunog narušavanja procesa formiranja i konsolidacije memorije signalne ekstinkcije straha (B. Zhang i sar., 2017).

U skladu sa ciljevima ove doktorske disertacije, kod miševa oba pola ispitan je uticaj starosti na ekspresiju i aktivnost različitih molekulskih medijatora sinaptičke plastičnosti u HPC, i to u modelu signalne ekstinkcije straha. Nivo i aktivnost ciljnih proteina su detektovani u tri vremenske tačke, od kojih je prva tačka vezana za uslovljavanje straha, dok se preostale dve odnose na proces njegove ekstinkcije. Ovde treba napomenuti da su sve molekulske analize sprovedene jedan sat nakon testova ponašanja, što predstavlja kratak vremenski period za *de novo* sintezu veće količine proteina (Santini i sar., 2014). Shodno tome, promene detektovane u prvoj vremenskoj tački nisu posledica efekta uslovljavanja straha na ispitivane molekulske parametre, već predstavljaju njihov inicijalni nivo unutar svake eksperimentalne grupe. Nasuprot tome, promene zabeležene nakon četiri, odnosno sedam dana ekstinkcije straha, predstavljaju odraz učenja životinja u do tada sprovedenim sesijama ekstinkcije.

Rezultati naše studije su pokazali da adolescenti muškog pola imaju inicijalno niži nivo GluN2A, GluN2B i GluA1 subjedinice, kao i sniženu aktivnost P70S6K u poređenju sa adultima. Uzimajući u obzir ulogu glutamatskih receptora i mTOR signalnog puta u ekstinkciji straha (Girgenti i sar., 2017; Myers i sar., 2011), ovakav molekularni obrazac izgledno doprinosi kasnijim razlikama u efikasnosti ekstinkcije između adolescentnih i adultnih mužjaka. Kako adolescentne životinje počinju da se uspešno razuslovljavaju kroz ponovljene sesije ekstinkcije, nivo njihovih GluN2A, GluN2B i GluA1 subjedinica raste, uz porast aktivnosti Erk 2 i P70S6K kinaze. Ipak, promene na nivou ponašanja „kaskaju” u odnosu na molekulske promene, što govori u prilog činjenici da je neophodno da protekne određeno vreme pre nego što se pokretanje odgovarajućih molekulskih mehanizama odrazi na ponašanje životinja. Takođe, ovaj rezultat sugerise i da bi glutamatski receptori i mTOR signalni put mogli biti uključeni u konsolidaciju memorije ekstinkcije kod adolescenata. Konsolidacija memorije podrazumeva brojne biohemijske promene na nivou sinapse, uključujući aktivaciju različitih unutarćelijskih kaskada i intenzivnu sintezu proteina (Johansen i sar., 2011). mTOR signalni put igra ključnu ulogu u regulaciji lokalne, dendritske sinteze različitih sinaptičkih proteina, a jedan od mehanizama njegovog pokretanja, i to indirektnim uticajem na fosforilaciju Erk kinaze, obuhvata aktivaciju GluN2A- i GluN2B-bogatih NMDA receptora (El Gaamouch i sar., 2012; Jin i Feig, 2010; M. J. Kim i sar., 2005; Sun i sar., 2018). U skladu sa tim, možemo reći da mTOR kupluje NMDA-zavisnu aktivaciju sinapse sa sintezom proteina u dendritima (Gong i sar., 2006), što sugerise da NMDA-mTOR interakcija igra ključnu ulogu u ostvarivanju jednog od glavnih mehanizama konsolidacije memorije. U prilog ovoj tvrdnji svedoče i studije koje ističu doprinos glutamatskih receptora i mTOR signalnog puta procesu konsolidacije u različitim paradigmatima asocijativnog učenja, uključujući uslovljavanje i ekstinkciju straha (Burgos-Robles i sar., 2007; Cammarota i sar., 2004; J. H. Kim i sar., 2011; Radiske i sar., 2021; Santini i sar., 2001; Schafe i sar., 1999). I dok je većina ovih rezultata zabeležena kod adultnih životinja, Kim i saradnici su pokazali da je fosforilacija Erk u PFC neophodna za konsolidaciju memorije ekstinkcije kod adolescenata (J. H. Kim i sar., 2011), što podržava našu hipotezu o ulozi mTOR signalizacije u ovom procesu kod adolescentnih mužjaka.

Kao što je u uvodnom delu već istaknuto, konsolidacija memorije označava proces prevođenja kratkoročne u dugoročnu memoriju, koja se dalje ili aktivno održava ili dolazi do njenog postepenog slabljenja. Naši rezultati su takođe pokazali da adolescentni mužjaci nakon sedmog dana ekstinkcije imaju pojačanu aktivaciju Erk 1, Erk 2 i P70S6K kinaze, kao i povišen nivo GluA1 subjedinice u poređenju sa adultima. Ovde treba istaći da su ove promene zabeležene nakon uspešnog suzbijanja straha od strane adolescenata tokom poslednja tri dana trajanja ekstinkcije. Shodno tome, one mogu predstavljati molekularni potpis održavanja prethodno konsolidovane memorije ekstinkcije, što dodatno potvrđuje centralnu ulogu mTOR signalizacije u procesima dugoročne ekstinkcije straha kod adolescentnih mužjaka. Ipak, interesantno je da i pored pojačane aktivacije njenog uzvodnog regulatora (Erk) i nizvodnog efektor (P70S6K), u našoj studiji nisu primećene razlike između

adolescentnih i adultnih mužjaka u nivou aktivnosti same mTOR kinaze, što može biti rezultat dinamike aktivacije mTOR. Prethodno je pokazano da oblik asocijativnog učenja motivisan strahom prati veoma brza (15 min) i prolazna fosforilacija mTOR u HPC (Bekinschtein i sar., 2007), dok je u amigdali zabeleženo odsustvo promene u mTOR aktivnosti 40 min nakon uslovljavanja straha (Florido i sar., 2021). Ipak, odsustvo promena u fosforilaciji mTOR kinaze ne znači nužno da ona ne učestvuje u procesu ekstinkcije straha. Girgenti i saradnici su primenom mTOR inhibitora ustanovili da efikasnija ekstinkcija straha pod dejstvom ketamina u potpunosti zavisi od aktivacije mTOR signalnog puta (Girgenti i sar., 2017). I pored toga, u ovoj studiji nisu uočene promene u fosforilaciji mTOR nakon ekstinkcije straha, iako je pokazana pojačana aktivacija njegove uzvodne (Erk) i nizvodne kinaze (P70S6K), što se poklapa sa rezultatima naših istraživanja. Dodatno, u našoj studiji je pokazano i podudaranje aktivacije P70S6K sa povišenom ekspresijom jednog od glavnih efektor mTOR signalnog puta, GluA1 subjedinicom AMPA receptora (N. Li i sar., 2010), što opravdava našu hipotezu o aktivnosti mTOR signalnog puta tokom razuslovljavanja straha kod adolescenata.

Sveukupno, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je uspešna ekstinkcija straha kod adolescentnih mužjaka povezana sa aktivacijom NMDA-Erk-mTOR-GluA1 signalnog puta u HPC, što naglašava ključnu ulogu interakcije između glutamatskih receptora i mTOR signalizacije u modulaciji procesa ekstinkcije kod adolescenata muškog pola.

Za razliku od mužjaka, kod ženki nisu uočene starosne razlike u ekstinkciji straha, što objašnjava i odsustvo značajnih promena u ekspresiji i aktivnosti ispitivanih medijatora sinaptičke plastičnosti kod ovog pola. Ipak, treba napomenuti da su kod adolescentnih i adultnih ženki uočeni slični obrasci ekspresije GluA1 i GluN2B subjedinice, koji ukazuju na njihov doprinos procesu ekstinkcije straha u početnim fazama učenja. Sa druge strane, kako životinje prolaze kroz nekoliko poslednjih sesija ekstinkcije, njihov nivo opada, što može biti posledica homeostatskog smanjenja jačine prethodno aktivnih sinapsi (Pérez-Otaño i Ehlers, 2005; G. Wang i sar., 2012). Ovi rezultati, zajedno sa odsustvom razlika između adolescentnih i adultnih ženki u drugim molekulskim parametrima, sugerišu da se u osnovi uspešne ekstinkcije straha kod ženki obe starosti nalaze slični mehanizmi.

Konačno, u okviru primenjenog modela signalne ekstinkcije straha, kod miševa oba pola ispitan je i uticaj starosti na gensku i proteinsku ekspresiju BDNF u HPC. BDNF predstavlja najzastupljeniji marker sinaptičke plastičnosti u mozgu, čija uloga u procesima ekstinkcije straha je izuzetno dobro okarakterisana (Heldt i sar., 2007; Psotta i sar., 2013). Ipak, u našoj studiji ni kod jednog pola nisu uočene starosne razlike u proteinskoj ekspresiji BDNF nakon četiri, odnosno sedam dana ekstinkcije. Jedno od mogućih objašnjenja ovog iznenađujućeg rezultata jeste da su promene u ekspresiji BDNF uslovljene ekstinkcijom straha suptilne, i da se ogledaju na nivou genske ekspresije tačno određenih egzona BDNF, čiji transkripti pojedinačno gledano čine mali udeo u ukupno sintetisanim proteinima. Naši rezultati su dalje pokazali da adolescentni mužjaci US grupe imaju povišen nivo egzona IV i IX u HPC u poređenju sa adultima. Dok se egzon IX konstitutivno eksprimira i kodira za proteinski molekul BDNF, egzon IV spada u alternativne egzone, a transkripti koji ga sadrže su uključeni u obradu različitih tipova memorije (Lubin i sar., 2008; Mizuno i sar., 2012; S. Takei i sar., 2011). Shodno tome, moguće je da viši početni nivoi ovih egzona kod adolescentnih mužjaka na neki način doprinose smanjenoj efikasnosti ekstinkcije straha kod ove grupe, iako mehanizam kojim bi se ovaj efekat ostvarivao ostaje nepoznanica.

5.3 Subanestetska doza ketamina poboljšava ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka

Dobro je poznato da se ketamin, zahvaljujući mehanizmu delovanja koji podrazumeva blokadu NMDA receptora, primarno koristi kao anestetik i da ima sedativno dejstvo. Iako je odabrana doza ketamina od 10 mg/kg za miša subanestetska (C. Wu i sar., 2020), prvo su ispitani njegovi potencijalni sedativni efekti na životinje jedan sat nakon injeciranja, čime je ispoštovana predviđena dinamika primene tretmana u paradigmi ekstinkcije straha. Poluživot sistemski ubrizganog ketamina u krvi iznosi od 15 do 25 min (Ganguly i sar., 2018; X. Li i sar., 2015), pri čemu doza ketamina od 10 mg/kg utiče na lokomociju miševa C57BL/6 soja unutar ovog vremenskog okvira (Akillioglu i

sar., 2012). Sa druge strane, u našoj studiji nisu uočeni značajni efekti ketamina na lokomociju i eksploratornu aktivnost jedan čas nakon njegove primene, što se podudara sa postojećim podacima za adolescentne C57BL/6 mužjake (Wei i sar., 2020).

U daljem toku istraživanja, životinje su prvo prošle kroz proces uslovljavanja straha, tokom kog nisu uočene razlike u ponašanju između kontrolne i ketaminske grupe. S obzirom na to da su životinje bile nasumično dodeljene obema grupama, kao i da tretman u ovoj fazi još uvek nije bio primenjen, ovakav rezultat je bio potpuno očekivan. Ipak, zbog kasnijeg tumačenja rezultata vezanih za samu ekstinkciju straha, bilo je važno da se ustanovi da li obe eksperimentalne grupe podjednako uspešno usvajaju strah, odnosno da li proces njegove ekstinkcije započinju sa približno istih početnih tačaka.

Naši eksperimenti su pokazali da adolescenti tretirani ketaminom ispoljavaju niže nivoe straha tokom početnih tačaka drugog, trećeg i četvrtog dana ekstinkcije, uz sniženu stopu njegovog spontanog oporavka u poređenju sa kontrolama. Ovi rezultati sugerisu da subanestetska doza ketamina od 10 mg/kg uspešno poboljšava ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka, delujući na konsolidaciju ekstinkcije i/ili pristupanje njenoj dugoročnoj memoriji. Na ovaj način, ketamin ostvaruje efekat na one faze ekstinkcije straha koje su kod adolescentnih životinja narušene (K. D. Baker i Richardson, 2015; J. H. Kim i sar., 2011; McCallum i sar., 2010). Hipotezu da ketamin deluje na procese formiranja i pristupanja dugoročnoj memoriji podržava nekoliko studija o njegovom uticaju na uslovljavanje i ekstinkciju straha. Primena ketamina odmah nakon uslovljavanja, u vremenskom okviru konsolidacije memorije, je učvrstila memoriju straha i usporila proces njegove ekstinkcije kod odraslih pacova (Radford i sar., 2018, 2022). Sa druge strane, Wei i saradnici su pokazali da doza ketamina od 10 mg/kg, primenjena pred svaku od četiri trening sesije, ostvaruje pozitivan efekat na dugoročnu ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka (Wei i sar., 2020). Pored toga što govore u prilog našim rezultatima, navedene studije ističu i važnost vremena primene ketamina u odnosu na sesiju uslovljavanja/ekstinkcije straha, s obzirom da ovaj faktor direktno utiče na efekte ketamina na ponašanje životinja.

Imajući u vidu da su rezultati ove disertacije pokazali da ketamin poboljšava ekstinkciju straha kod adolescentnih životinja, ističe se njegov potencijal za primenu u vidu adjuvantne terapije uz ET za ovu starosnu grupu. I dok preliminarni podaci ukazuju da kombinacija ketamina i ET poboljšava simptome poremećaja povezanih sa strahom kod odraslih osoba (Shiroma i sar., 2020), buduća istraživanja tek treba da utvrde da li je ovakav terapijski pristup efikasan i kod adolescentne populacije. Ovde treba istaći da ketamin na sličan način deluje na proces ekstinkcije straha kod adolescentnih i adultnih kohorti. U animalnom modelu za PTSP, i akutni i hronični tretman ketaminom je kod adultnih životinja doprineo smanjenju spontanog oporavka straha praćenom nedelju dana nakon ekstinkcije (Ju i sar., 2017; Sala i sar., 2022). Ovakav mehanizam delovanja ukazuje da ketamin ostvaruje dugoročne efekte na proces ekstinkcije straha, na šta se nadovezuje nalaz da akutna doza ketamina primenjena pre same ekstinkcije poboljšava kasnije pristupanje njenoj dugoročnoj memoriji (Girgenti i sar., 2017). Rezultati navedenih studija se podudaraju sa našim rezultatima dobijenim na adolescentnim životinjama, što je obećavajući znak za potencijalnu kliničku primenu ketamina kao adjuvanta ET u adolescentnoj populaciji. Ipak, ovde treba napomenuti i da primena ketamina sa sobom donosi određene nuspojave, što u određenoj meri ograničava njegovu upotrebu u kliničkoj praksi. Poznato je da ketamin izaziva simptome disocijacije, odnosno izuzetno neprijatnog osećaja otuđenosti od okruženja i samog sebe (White i sar., 1982). Takođe, njegova upotreba može dovesti do narušavanja kognitivnih funkcija, kao i javljanja halucinacija, zbog čega ketamin ima visok potencijal za zloupotrebu i razvijanje zavisnosti kod korisnika (Y. Liu i sar., 2016). Međutim, navedeni neželjeni efekti su prvenstveno povezani sa kontinuiranim i nekontrolisanim korišćenjem ketamina (Hottat i Hantson, 2023; Strous i sar., 2022). Sa druge strane, ni akutne ni hronične doze ketamina primenjene u terapijske svrhe ne izazivaju dugoročne neželjene fiziološke reakcije (Hovda i sar., 2024), niti negativne posledice na kogniciju i raspoloženje (Albott i sar., 2022), što ukazuje na mogućnost njegove bezbedne primene u kontrolisanom, kliničkom okruženju.

5.4 Pozitivni efekti ketamina na ekstinckiju straha kod adolescentnih mužjaka su praćeni aktivacijom Akt-mTOR-GluA1 signalnog puta u hipokampusu

U cilju daljeg razumevanja načina delovanja ketamina u okviru primenjenog modela, pristupljeno je analizi molekulskih mehanizama njegovih efekata na ekstinckiju straha kod adolescentnih mužjaka. Dobijeni rezultati su pokazali da ketamin podiže nivoe GluN2A i GluA1 subjedinica, kao i da povećava aktivnost Akt i mTOR kinaze u HPC adolescentnih mužjaka. Ovakav obrazac ekspresije i aktivnosti ispitivanih molekula prati bihejvioralne efekte ketamina, što ukazuje na zajednički doprinos glutamatskih receptora i mTOR signalizacije u HPC uticaju ketamina na adolescentnu ekstinckiju straha. Takođe, uzimajući u obzir rezultate prvog dela ove disertacije, možemo zaključiti da ketamin poboljšava proces ekstinckije delujući na one molekulske medijatore sinaptičke plastičnosti koji značajno doprinose uspešnom razuslovljavanju straha kod adolescentnih mužjaka.

Rezultati naših molekulskih analiza su u najvećoj meri podržani pretkliničkim studijama na adultnim životinjama, koje su pokazale da ketamin utiče na ekspresiju glutamatskih receptora i aktivnost mTOR signalizacije u HPC (Beurel i sar., 2016; J. Yamada i Jinno, 2019; C. Yang i sar., 2013; Zaytseva i sar., 2023; K. Zhang i sar., 2017). Ipak, imajući u vidu mehanizam delovanja ketamina putem antagonizma NMDA receptora, treba napomenuti da je zabeležen porast nivoa GluN2A subjedinice bio neočekivan. Jedno od mogućih objašnjenja ovog rezultata leži u činjenici da ketamin ima jači inhibitorski potencijal za GluN2B u odnosu na GluN2A subjedinicu (Dravid i sar., 2007; Zorumski i sar., 2016), koja ostaje delimično dostupna za vezivanje neurotransmitera. U skladu sa tim, pokazano je da je aktivacija GluN2A u HPC adultnih miševa neophodna za ispoljavanje antidepresivnih svojstava ketamina (Zanos i sar., 2023), što ukazuje da ova subjedinica ipak doprinosi njegovom uticaju na ponašanje životinja. Kada su u pitanju AMPA receptori, doza ketamina od 10 mg/kg je u HPC odraslih miševa dovela do porasta sinaptičkih GluA1 receptora neposredno nakon primene leka (Beurel i sar., 2016; Zaytseva i sar., 2023). Uz to, specifična blokada AMPA receptora bogatih GluA1 subjedinicama je rezultovala gubitkom pozitivnog dejstva ketamina na anksioznost i depresiju (Zaytseva i sar., 2023), što ukazuje da je ova subjedinica izuzetno značajna za ispoljavanje bihejvioralnih efekata ketamina. Zanimljivo je i da se povišen nivo GluA1 subjedinice u vHPC uočava i do dva dana nakon akutnog tretmana dozom od 10 mg/kg (J. Yamada i Jinno, 2019), što upućuje na postojane molekulske efekte ketamina unutar regiona specifično uključenog u ispoljavanje i ekstinckiju straha (Sierra-Mercado i sar., 2011). Shodno tome, GluA1 subjedinica hipokampusa bi mogla igrati ključnu ulogu u posredovanju dugoročnih efekata ketamina na proces ekstinckije, poput onih zabeleženih u našim eksperimentima. Ovu hipotezu podržava i činjenica da efekti ketamina na ekstinckiju straha kod adultnih životinja barem delimično zavise od aktivnosti AMPA receptora (Girgenti i sar., 2017), iako treba istaći da su ovi rezultati uočeni u mPFC, a ne u samom HPC.

Kada je u pitanju mTOR signalni put, aktivacija Erk kinaze pod uticajem ketamina zavisi od doze, načina i vremena primene tretmana (M. Shi i sar., 2020; M. Zhang i sar., 2019). Shodno tome, odsustvo promene u aktivnosti Erk u našoj studiji može biti posledica vremenske dinamike sprovedenih eksperimenata, kojom nije „uhvaćena” fosforilacija Erk. Sa druge strane, Park i saradnici su pokazali da ketamin u *in vitro* uslovima indukuje pojačanu aktivaciju Akt kinaze (Park i sar., 2014), dok je njegova primena u različitim subanestetskim dozama dovela do porasta nivoa fosforilisanog mTOR u HPC adultnih glodara (Caffino i sar., 2024; J. Yamada i Jinno, 2019; C. Yang i sar., 2013; K. Zhang i sar., 2017). Ovde je ključno istaći da se fosforilacija mTOR kinaze odvija istom dinamikom kao i porast sinaptičkih nivoa GluA1 (J. Yamada i Jinno, 2019; K. Zhang i sar., 2017), pri čemu su navedene promene bile asocirane sa antidepresivnim efektima ketamina (K. Zhang i sar., 2017). Na osnovu toga, možemo zaključiti da mTOR aktivacija u sprezi sa GluA1 subjedinicom doprinosi uticaju ketamina na ponašanje životinja. Dodatnu potvrdu ovom zapažanju pruža činjenica da pozitivan efekat ketamina na ekstinckiju straha kod adultnih pacova izostaje primenom mTOR inhibitora rapamicina (Girgenti i sar., 2017). Takođe, ovaj rezultat ukazuje na postojanje uzročno-

posledičnog odnosa između aktivnosti mTOR signalnog puta i efekata ketamina na proces ekstinkcije.

U celini, rezultati naše studije ističu vezu između pozitivnog uticaja ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka i aktivacije Akt-mTOR-GluA1 signalnog puta u HPC. Takođe, oni ukazuju da ketamin ostvaruje svoje efekte u ispitivanom modelu učenja kroz stimulaciju sinaptičke plastičnosti na tkivno-specifičan način. Ipak, ovde treba istaći da zabeleženo odsustvo promena u PFC može biti i posledica primenjene metodologije, s obzirom da su molekulske analize rađene na čitavoj strukturi, a ne unutar vmPFC, regiona specifično uključenog u regulaciju straha kod miševa (Giustino i Maren, 2015). S obzirom da vmPFC čini tek deo izolovane strukture, moguće je da primenjena metoda imunoblota jednostavno nije bila dovoljno senzitivna da detektuje promene koje su na nivou celog PFC suptilne.

Konačno, u okviru ispitivanja uticaja ketamina na različite molekulske medijatore sinaptičke plastičnosti, analizirana je kako proteinska, tako i genska ekspresija BDNF. Na nivou proteina, ni u jednom analiziranom tkivu nisu uočeni efekti ketamina na ekspresiju BDNF. Poznato je da vezikularno oslobađanje BDNF u sinaptički prostor i njegovo vezivanje za TrkB receptor predstavljaju neophodan preduslov za ostvarivanje efekata ovog trofičkog faktora na sinaptičku plastičnost (Christie i sar., 2008). Ipak, BDNF zavisna aktivacija TrkB receptora ne mora biti asocirana sa izmenjenom ekspresijom BDNF (Hill i van den Buuse, 2011). Ovo ukazuje da efekti BDNF mogu biti postignuti i samom preraspodelom postojećeg pula ovog proteina u ćeliji, što može da objasni naš rezultat. Sa druge strane, u oba tkiva je zabeležena povišena ekspresija BDNF egzona IV nakon tretmana ketaminom. Transkripti ovog egzona su lokalizovani u telu neurona i proksimalnom delu dendrita (Chiaruttini i sar., 2009), što im omogućava da utiču na plastičnost sinapse putem regulacije dendritske arhitekture (Baj i sar., 2011). U skladu sa tim, ekspresija BDNF egzona IV je asocirana sa obradom dugoročne memorije (Lubin i sar., 2008; Mizuno i sar., 2012; S. Takei i sar., 2011), uključujući formiranje i očuvanje memorije ekstinkcije straha (Bredy i sar., 2007; McDowell i sar., 2010). Ketamin podstiče ekspresiju BDNF egzona IV (Choi i sar., 2017; Yao i sar., 2022), i to tako što omogućava aktivnost njegovog promotora (Choi i sar., 2017; Ju i sar., 2017). Naime, u kombinaciji sa treningom ekstinkcije straha, ketamin dovodi do hipometilacije promotora egzona IV i povećanja njegove ekspresije u HPC i mPFC odraslih mužjaka (Ju i sar., 2017), što podržava i naše rezultate o dejstvu ketamina u modelu ekstinkcije straha.

5.5 Pozitivni efekti ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka su asocirani sa pojačanom aktivacijom dHPC, vHPC i levog IL vmPFC

Rezultati naših analiza su pokazali da efekte ketamina na proces ekstinkcije prate tkivno-specifične molekulske promene u vidu aktivacije Akt-mTOR-GluA1 signalnog puta u HPC. Ipak, ostaje nepoznato koje regione HPC ketamin aktivira, kao i da li vmPFC doprinosi njegovim efektima na ekstinkciju straha kod adolescentnih životinja, usled čega je pristupljeno imunohistohemijskoj analizi ekspresije cFos u odabranim regionima HPC i vmPFC. c-Fos je transkripcioni faktor koji pripada porodici gena ranog odgovora (Herrera i Robertson, 1996), čija ekspresija u različitim tipovima ćelija, uključujući i neurone, raste u odgovoru na stimulaciju različitim signalima. Ovo čini c-Fos pouzdanim markerom neuronske aktivnosti (Bullitt, 1990), u kom svojstvu je i ispitivan u ovoj doktorskoj disertaciji. Takođe, s obzirom na to da se pojačana ekspresija c-Fos nakon ekstinkcije straha uočava u regionima ključnim za njeno uspešno odvijanje (Knapska i Maren, 2009; Szadzinska i sar., 2021), analiza ekspresije c-Fos u našoj studiji predstavlja dobar pokazatelj doprinosa ispitivanih struktura efikasnoj ekstinkciji straha pod dejstvom ketamina.

U našem eksperimentalnom modelu, ketamin dovodi do porasta ekspresije c-Fos u CA1 i CA3 regionima kako dHPC, tako i vHPC, što ukazuje na potpunu aktivaciju HPC u datim uslovima. Dorzalni region HPC je primarno uključen u prepoznavanje konteksta (Fanselow i Dong, 2010), uključujući i diskriminaciju između različitih konteksta, što predstavlja jedan od ključnih elemenata u paradigmatu signalnog uslovljavanja straha (Bergstrom, 2020; Frankland i sar., 1998). Sa druge strane, zahvaljujući snažnoj povezanosti sa mPFC i amigdalom (Sierra-Mercado i sar., 2011), vHPC

prevashodno igra ulogu u odgovoru na stres, a učestvuje i u različitim oblicima emocionalnog učenja, uključujući uslovljavanje straha (Fanselow i Dong, 2010). Imajući u vidu različite uloge dHPC i vHPC u ekstinkciji straha, naši rezultati sugeriraju da ketamin kod adolescentnih životinja deluje na različite komponente ovog oblika učenja, pri čemu potvrdu ovoj hipotezi pružaju mnogobrojne studije o uticaju ketamina na HPC. U njima je pokazano da iako ketamin primarno deluje na vHPC (Mastrodonato i sar., 2018; Rawat i sar., 2022; J. Yamada i Jinno, 2019), može da ostvari efekte i na nivou dHPC, gde stimuliše različite sinaptičke procese prethodno narušene pod uticajem stresa (Aleksandrova i sar., 2020; Fraga, Camargo, Olescowicz, Azevedo Padilha, i sar., 2021; Fraga, Camargo, Olescowicz, Padilha, i sar., 2021; Knapska i Maren, 2009; Logue i sar., 2022).

Nakon uspešne ekstinkcije straha adolescentnih mužjaka pod uticajem ketamina, zabeležena je i pojačana ekspresija c-Fos specifično unutar leve hemisfere IL kore, regiona sa ključnom ulogom u procesu ekstinkcije straha (Knapska i Maren, 2009; Pattwell i sar., 2012). Levi vmPFC inhibira ispoljavanje reakcija izazvanih stresom (Costa i sar., 2016; Victoriano i sar., 2020), dok stimulacija regiona leve hemisfere PFC funkcionalno povezanog sa IL korom dovodi do smanjenja reakcije straha kod ljudi (Raij i sar., 2018). Shodno tome, možemo zaključiti da aktivacija levog IL vmPFC nakon primene ketamina igra značajnu ulogu u ostvarivanju njegovih efekata na proces ekstinkcije kod adolescentnih životinja.

Konačno, dobijene rezultate je potrebno razmotriti i u kontekstu promena koje se tokom razvika jedinke dešavaju unutar nervnog kola regulacije straha. U periodu adolescencije, dolazi do izmene ekscitabilnosti mPFC na način koji favorizuje aktivaciju PrL kore (Pattwell i sar., 2016; Zimmermann i sar., 2019), jednog od regiona ključnih za ispoljavanje straha (Corcoran i Quirk, 2007; Pattwell i sar., 2012). Uz to, Pattwell i saradnici su pokazali potpuno odsustvo tipične neuronske aktivnosti u IL kori kod adolescentnih miševa sa narušenom ekstinkcijom straha (Pattwell i sar., 2012). Adolescenciju karakteriše i odloženo sazrevanje funkcionalne vHPC-mPFC veze, što dovodi do povećane osetljivosti mPFC na inpute iz amigdale (Zimmermann i sar., 2019), potencijalno doprinoseći narušenoj ekstinkciji straha ove starosne grupe. Prethodno je pokazano da ketamin ostvaruje svoje antidepresivne efekte putem aktivacije vHPC-mPFC puta (Carreno i sar., 2016; Jett i sar., 2015), pri čemu je IL region mPFC naročito osetljiv na dejstvo ketamina (Shirayama i Hashimoto, 2017). U skladu sa tim, rezultati naše studije ukazuju da aktivacijom vHPC i levog IL vmPFC, ketamin poboljšava ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka delujući na one strukture čiji obrazac aktivnosti je kod ove starosne grupe izmenjen.

6. ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljevima i rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Adolescentni miševi muškog pola imaju narušenu ekstinkciju straha u poređenju sa adultnim životinjama, dok kod ženki nisu uočene promene u ponašanju između ispitivanih starosnih grupa. Smanjena efikasnost ekstinkcije straha kod adolescentnih mužjaka je uspešno prevaziđena povećanjem broja sesija ekstinkcije;
2. Uspešna ekstinkcija straha kod adolescentnih mužjaka povezana je sa aktivacijom NMDA-Erk-mTOR-GluA1 signalnog puta u HPC, što naglašava ključnu ulogu interakcije između glutamatskih receptora i mTOR signalnog puta u modulaciji ekstinkcije straha kod adolescenata muškog pola. Sa druge strane, nisu uočene značajne promene u ekspresiji i aktivnosti ispitivanih molekulskih medijatora ekstinkcije straha između adolescentnih i adultnih ženki;
3. Subanestetika doza ketamina (10 mg/kg) uspešno poboljšava ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka, ostvarujući efekat na konsolidaciju i/ili pristupanje dugoročnoj memoriji ekstinkcije;
4. Pozitivni efekti ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka praćeni su aktivacijom Akt-mTOR-GluA1 signalnog puta u HPC, što ukazuje na stimulaciju sinaptičke plastičnosti pod dejstvom ketamina;
5. Pozitivni efekti ketamina na ekstinkciju straha kod adolescentnih mužjaka asocirani su sa pojačanom aktivacijom dHPC i vHPC, kao i pojačanom neuronskom aktivnošću unutar leve hemisfere IL kore, što upućuje na to da ketamin podstiče aktivaciju moždanih struktura uključenih u ekstinkciju straha.

Sumarno, rezultati ove doktorske disertacije su po prvi put okarakterisali molekulske mehanizme koji leže u osnovi polno-specifičnih starosnih razlika u ekstinkciji straha, ističući značaj NMDA-Erk-mTOR-GluA1 signalnog puta u HPC za uspešnu ekstinkciju kod adolescentnih mužjaka. Pored doprinosa boljem razumevanju neurobiologije straha, ovi rezultati usmeravaju i buduće pravce traganja za potencijalnim adjuvansima koji mogu da unaprede primenu ET u adolescentnoj populaciji. Jedan od takvih farmakoloških tretmana je i ketamin, za koji je u ovoj disertaciji pokazano da efikasno poboljšava ekstinkciju straha kod adolescenata muškog pola, što se dovodi u vezu sa aktivacijom Akt-mTOR-GluA1 puta u HPC. Trenutno se suočavamo sa krizom mentalnog zdravlja kod adolescenata, okarakterisanom visokim stopama javljanja različitih psihijatrijskih poremećaja i čestim nedostatkom odgovora na uobičajene tretmane. I dok postoje snažni dokazi o efikasnosti ketamina kod odraslih osoba sa mentalnim bolestima otpornim na standardne kliničke tretmane, istraživanja o njegovoj upotrebi kod adolescenata su još uvek u ranoj fazi. U skladu sa tim, rezultati ove doktorske disertacije ističu ketamin kao obećavajući tretman za kombinovanje sa ET u kliničkom lečenju adolescenata, i to za tretman poremećaja povezanih sa strahom.

7. LITERATURA

- Abdallah, C. G., De Feyter, H. M., Averill, L. A., Jiang, L., Averill, C. L., Chowdhury, G. M. I., Purohit, P., de Graaf, R. A., Esterlis, I., Juchem, C., Pittman, B. P., Krystal, J. H., Rothman, D. L., Sanacora, G., & Mason, G. F. (2018). The effects of ketamine on prefrontal glutamate neurotransmission in healthy and depressed subjects. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(10), 2154–2160.
- Adolph, D., Teismann, T., Wannemüller, A., & Margraf, J. (2023). Fear conditioning and extinction learning in the mood and anxiety disorders spectrum - Associations with the outcome of cognitive behavior therapy. *Behaviour Research and Therapy*, 160, 104229.
- Adolphs, R. (2013). The biology of fear. *Current Biology: CB*, 23(2), R79-93.
- Ahmad, F., & Liu, P. (2020). Synaptosome as a tool in Alzheimer's disease research. *Brain Research*, 1746, 147009.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., & Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research*, 85(3), 525–535.
- Akillioglu, K., Melik, E. B., Melik, E., & Boga, A. (2012). Effect of ketamine on exploratory behaviour in BALB/C and C57BL/6 mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 100(3), 513–517.
- Albott, C. S., Lim, K. O., Erbes, C., Thuras, P., Wels, J., Tye, S. J., & Shiroma, P. R. (2022). Neurocognitive effects of repeated ketamine infusions in comorbid posttraumatic stress disorder and major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 308, 289–297.
- Albott, C. S., Lim, K. O., Forbes, M. K., Erbes, C., Tye, S. J., Grabowski, J. G., Thuras, P., Batres-Y-Carr, T. M., Wels, J., & Shiroma, P. R. (2018). Efficacy, Safety, and Durability of Repeated Ketamine Infusions for Comorbid Posttraumatic Stress Disorder and Treatment-Resistant Depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 79(3).
- Aleksandrova, L. R., Wang, Y. T., & Phillips, A. G. (2020). Ketamine and its metabolite, (2R,6R)-HNK, restore hippocampal LTP and long-term spatial memory in the Wistar-Kyoto rat model of depression. *Molecular Brain*, 13(1), 92.
- Alexander, L., Wood, C. M., & Roberts, A. C. (2023). The ventromedial prefrontal cortex and emotion regulation: lost in translation? *The Journal of Physiology*, 601(1), 37–50.
- Aliczki, M., & Haller, J. (2015). Electric Shock as Model of Post-traumatic Stress Disorder in Rodents. *Comprehensive Guide to Post-Traumatic Stress Disorder*, 1–16.
- Almey, A., Milner, T. A., & Brake, W. G. (2015). Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Hormones and Behavior*, 74, 125–138.
- Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239–246.
- Andero, R., & Ressler, K. J. (2012). Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes, Brain, and Behavior*, 11(5), 503–512.
- Araújo-de-Freitas, L., Santos-Lima, C., Mendonça-Filho, E., Vieira, F., França, R. J. A. F., Magnavita, G., Cardoso, T. L., Correia-Melo, F. S., Leal, G. C., Jesus-Nunes, A. P., Souza-Marques, B., Marback, R., Teles, M., Echegaray, M. V., Beanes, G., Guerreiro-Costa, L. N. F., Mello, R. P.,

- Rabanea, T., Lucchese, A. C., ... Quarantini, L. C. (2021). Neurocognitive aspects of ketamine and esketamine on subjects with treatment-resistant depression: A comparative, randomized and double-blind study. *Psychiatry Research*, 303, 114058.
- Arruda-Carvalho, M., & Clem, R. L. (2015). Prefrontal-amygdala fear networks come into focus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9, 145.
- Aubry, A. V, Serrano, P. A., & Burghardt, N. S. (2016). Molecular Mechanisms of Stress-Induced Increases in Fear Memory Consolidation within the Amygdala. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 191.
- Autry, A. E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E. S., Los, M. F., Cheng, P., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, 475(7354), 91–95.
- Baez, M. V., Cercato, M. C., & Jerusalinsky, D. A. (2018). NMDA Receptor Subunits Change after Synaptic Plasticity Induction and Learning and Memory Acquisition. *Neural Plasticity*, 2018, 5093048.
- Bai, F., & Witzmann, F. A. (2007). Synaptosome proteomics. *Sub-Cellular Biochemistry*, 43, 77–98.
- Baj, G., Leone, E., Chao, M. V, & Tongiorgi, E. (2011). Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16813–16818.
- Baker, J. D., & Azorlosa, J. L. (1996). The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 110(3), 618–620.
- Baker, K. D., & Richardson, R. (2015). Forming competing fear learning and extinction memories in adolescence makes fear difficult to inhibit. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 22(11), 537–543.
- Bali, A., & Jaggi, A. S. (2015). Electric foot shock stress: a useful tool in neuropsychiatric studies. *Reviews in the Neurosciences*, 26(6), 655–677.
- Ball, T. M., Knapp, S. E., Paulus, M. P., & Stein, M. B. (2017). Brain activation during fear extinction predicts exposure success. *Depression and Anxiety*, 34(3), 257–266.
- Bandelow, B., Reitt, M., Röver, C., Michaelis, S., Görlich, Y., & Wedekind, D. (2015). Efficacy of treatments for anxiety disorders: a meta-analysis. *International Clinical Psychopharmacology*, 30(4), 183–192.
- Baranovic, J. (2021). AMPA receptors in the synapse: Very little space and even less time. *Neuropharmacology*, 196, 108711.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2015). *Neuroscience : exploring the brain* (4th ed., international ed). Wolters Kluwer.
- Beesdo, K., Knappe, S., & Pine, D. S. (2009). Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *The Psychiatric Clinics of North America*, 32(3), 483–524.
- Behrooz, A. B., Nasiri, M., Adeli, S., Jafarian, M., Pestehei, S. K., & Babaei, J. F. (2024). Pre-adolescence repeat exposure to sub-anesthetic doses of ketamine induces long-lasting behaviors and cognition impairment in male and female rat adults. *IBRO Neuroscience Reports*, 16, 211–223.

- Bekinschtein, P., Katzev, C., Slipczuk, L. N., Igaz, L. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(2), 303–307.
- Bell, M. R. (2018). Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. *Endocrinology*, 159(7), 2596–2613.
- Belzung, C., & Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 1(1), 9.
- Bergmann, E., Zur, G., Bershadsky, G., & Kahn, I. (2016). The Organization of Mouse and Human Cortico-Hippocampal Networks Estimated by Intrinsic Functional Connectivity. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 26(12), 4497–4512.
- Bergstrom, H. C. (2020). Assaying Fear Memory Discrimination and Generalization: Methods and Concepts. *Current Protocols in Neuroscience*, 91(1), e89.
- Beurel, E., Grieco, S. F., Amadei, C., Downey, K., & Jope, R. S. (2016). Ketamine-induced inhibition of glycogen synthase kinase-3 contributes to the augmentation of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor signaling. *Bipolar Disorders*, 18(6), 473–480.
- Bizon, J. L., Foster, T. C., Alexander, G. E., & Glisky, E. L. (2012). Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 4, 19.
- Blazon, M. (2018). *Regulation of gaba release by presynaptic cav2.2 in the basolateral amygdala and infralimbic cortex*.
- Bloodgood, D. W., Sugam, J. A., Holmes, A., & Kash, T. L. (2018). Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. *Translational Psychiatry*, 8(1), 60.
- Blundell, J., Kouser, M., & Powell, C. M. (2008). Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 28–35.
- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 11(5), 485–494.
- Bouton, M. E., Vurbic, D., & Woods, A. M. (2008). D-cycloserine facilitates context-specific fear extinction learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 504–510.
- Bredy, T. W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y. E., & Barad, M. (2007). Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(4), 268–276.
- Brown, L. A., Belli, G., Suzuki, N., Capaldi, S., & Foa, E. B. (2020). Reduction in Suicidal Ideation from Prolonged Exposure Therapy for Adolescents. *Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology : The Official Journal for the Society of Clinical Child and Adolescent Psychology, American Psychological Association, Division 53*, 49(5), 651–659.
- Browne, C. A., & Lucki, I. (2013). Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 161.
- Bullitt, E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 296(4), 517–530.

- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., & Quirk, G. J. (2007). Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*, 53(6), 871–880.
- Caballero, A., Diah, K. C., & Tseng, K. Y. (2013). Region-specific upregulation of parvalbumin-, but not calretinin-positive cells in the ventral hippocampus during adolescence. *Hippocampus*, 23(12), 1331–1336.
- Caffino, L., Mottarlini, F., Piva, A., Rizzi, B., Fumagalli, F., & Chiamulera, C. (2024). Temporal dynamics of BDNF signaling recruitment in the rat prefrontal cortex and hippocampus following a single infusion of a translational dose of ketamine. *Neuropharmacology*, 242, 109767.
- Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R., Correia, S. S., Backos, D. S., Carvalho, A. L., Esteban, J. A., & Duarte, C. B. (2007). Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12619–12628.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Bonini, J. S., Rossatto, J. I., Medina, J. H., & Izquierdo, N. (2004). Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotoxicity Research*, 6(3), 205–212.
- Carreno, F. R., Donegan, J. J., Boley, A. M., Shah, A., DeGuzman, M., Frazer, A., & Lodge, D. J. (2016). Activation of a ventral hippocampus-medial prefrontal cortex pathway is both necessary and sufficient for an antidepressant response to ketamine. *Molecular Psychiatry*, 21(9), 1298–1308.
- Casey, B. J., Jones, R. M., Levita, L., Libby, V., Pattwell, S. S., Ruberry, E. J., Soliman, F., & Somerville, L. H. (2010). The storm and stress of adolescence: insights from human imaging and mouse genetics. *Developmental Psychobiology*, 52(3), 225–235.
- Catuzzi, J. E., & Beck, K. D. (2014). Anxiety vulnerability in women: a two-hit hypothesis. *Experimental Neurology*, 259, 75–80.
- Chan, W. Y. M., & McNally, G. P. (2009). Conditioned stimulus familiarity determines effects of MK-801 on fear extinction. *Behavioral Neuroscience*, 123(2), 303–314.
- Chareyron, L. J., Banta Lavenex, P., Amaral, D. G., & Lavenex, P. (2011). Stereological analysis of the rat and monkey amygdala. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(16), 3218–3239.
- Chhatwal, J. P., Stanek-Rattiner, L., Davis, M., & Ressler, K. J. (2006). Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nature Neuroscience*, 9(7), 870–872.
- Chiaruttini, C., Vicario, A., Li, Z., Baj, G., Braiuca, P., Wu, Y., Lee, F. S., Gardossi, L., Baraban, J. M., & Tongiorgi, E. (2009). Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16481–16486.
- Cho, J.-H., Deisseroth, K., & Bolshakov, V. Y. (2013). Synaptic encoding of fear extinction in mPFC-amygdala circuits. *Neuron*, 80(6), 1491–1507.
- Choi, M., Lee, S. H., Park, M. H., Kim, Y.-S., & Son, H. (2017). Ketamine induces brain-derived neurotrophic factor expression via phosphorylation of histone deacetylase 5 in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 489(4), 420–425.
- Chowdhury, G. M. I., Zhang, J., Thomas, M., Banasr, M., Ma, X., Pittman, B., Bristow, L., Schaeffer, E., Duman, R. S., Rothman, D. L., Behar, K. L., & Sanacora, G. (2017). Transiently increased

- glutamate cycling in rat PFC is associated with rapid onset of antidepressant-like effects. *Molecular Psychiatry*, 22(1), 120–126.
- Christie, B. R., Eadie, B. D., Kannangara, T. S., Robillard, J. M., Shin, J., & Titterness, A. K. (2008). Exercising our brains: how physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Neuromolecular Medicine*, 10(2), 47–58.
- Clark, R. E., & Squire, L. R. (2013). Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 Suppl 2(Suppl 2), 10365–10370.
- Cooper, A. A., Clifton, E. G., & Feeny, N. C. (2017). An empirical review of potential mediators and mechanisms of prolonged exposure therapy. *Clinical Psychology Review*, 56, 106–121.
- Corcoran, K. A., & Quirk, G. J. (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(4), 840–844.
- Costa, N. S., Vicente, M. A., Cipriano, A. C., Miguel, T. T., & Nunes-de-Souza, R. L. (2016). Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? *Neuropharmacology*, 108, 82–90.
- Coutinho, E., Vincent, A. (2014). Central Nervous System Neuronal Surface Antibodies Editor(s): Yehuda Shoenfeld, Pier Luigi Meroni, M. Eric Gershwin, Autoantibodies (Third Edition), Elsevier, Chapter 70. Pages 595-603
- Cover, K. K., Maeng, L. Y., Lebrón-Milad, K., & Milad, M. R. (2014). Mechanisms of estradiol in fear circuitry: implications for sex differences in psychopathology. *Translational Psychiatry*, 4(8), e422.
- Craske, M. G., Hermans, D., & Vervliet, B. (2018). State-of-the-art and future directions for extinction as a translational model for fear and anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 373(1742).
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2004(255), re16.
- Culver, N. C., Stoyanova, M., & Craske, M. G. (2011). Clinical relevance of retrieval cues for attenuating context renewal of fear. *Journal of Anxiety Disorders*, 25(2), 284–292.
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 3, 1.
- Curzon P, Rustay NR, Browman KE. (2009). Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 2.
- Dalkiran, B., Acikgoz, B., & Dayi, A. (2022). Behavioral Tests Used in the Evaluation of Learning and Memory in Experimental Animals. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 6(3), 938–945.
- Dalton, G. L., Wu, D. C., Wang, Y. T., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (2012). NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in the acquisition and extinction of conditioned fear. *Neuropharmacology*, 62(2), 797–806.
- Dash, P. K., Orsi, S. A., & Moore, A. N. (2006). Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex-Mammalian target of

rapamycin pathway. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(31), 8048–8056.

- DEA (2018). *Drug Scheduling*. United States Drug Enforcement Administration. <https://www.dea.gov/drug-information/drug-scheduling>
- de Jong, R., Lommen, M. J. J., de Jong, P. J., & Nauta, M. H. (2019). Using Multiple Contexts and Retrieval Cues in Exposure-Based Therapy to Prevent Relapse in Anxiety Disorders. *Cognitive and Behavioral Practice*, 26(1), 154–165.
- de Lima, M. A. X., Baldo, M. V. C., Oliveira, F. A., & Canteras, N. S. (2022). The anterior cingulate cortex and its role in controlling contextual fear memory to predatory threats. *ELife*, 11.
- Deli, A., Schipany, K., Rosner, M., Höger, H., Pollak, A., Li, L., Hengstschläger, M., & Lubec, G. (2012). Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 229(2), 320–324.
- Dibbets, P., Havermans, R., & Arntz, A. (2008). All we need is a cue to remember: the effect of an extinction cue on renewal. *Behaviour Research and Therapy*, 46(9), 1070–1077.
- Diering, G. H., & Huganir, R. L. (2018). The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron*, 100(2), 314–329.
- DiMauro, J., Domingues, J., Fernandez, G., & Tolin, D. F. (2013). Long-term effectiveness of CBT for anxiety disorders in an adult outpatient clinic sample: a follow-up study. *Behaviour Research and Therapy*, 51(2), 82–86.
- Domschke, K., Seuling, P. D., Schiele, M. A., Bandelow, B., Batelaan, N. M., Bokma, W. A., Branchi, I., Broich, K., Burkauskas, J., Davies, S. J. C., Dell’Osso, B., Fagan, H., Fineberg, N. A., Furukawa, T. A., Hofmann, S. G., Hood, S., Huneke, N. T. M., Latas, M., Lidbetter, N., ... Baldwin, D. S. (2024). The definition of treatment resistance in anxiety disorders: a Delphi method-based consensus guideline. *World Psychiatry: Official Journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 23(1), 113–123.
- Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387.
- Dravid, S. M., Erreger, K., Yuan, H., Nicholson, K., Le, P., Lyuboslavsky, P., Almonte, A., Murray, E., Mosely, C., Barber, J., French, A., Balster, R., Murray, T. F., & Traynelis, S. F. (2007). Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *The Journal of Physiology*, 581(Pt 1), 107–128.
- Duits, P., Cath, D. C., Heitland, I., & Baas, J. M. P. (2016). High Current Anxiety Symptoms, But Not a Past Anxiety Disorder Diagnosis, are Associated with Impaired Fear Extinction. *Frontiers in Psychology*, 7, 252.
- Duits, P., Cath, D. C., Lissek, S., Hox, J. J., Hamm, A. O., Engelhard, I. M., van den Hout, M. A., & Baas, J. M. P. (2015). Updated meta-analysis of classical fear conditioning in the anxiety disorders. *Depression and Anxiety*, 32(4), 239–253.
- Durieux, M. E. (1995). Inhibition by ketamine of muscarinic acetylcholine receptor function. *Anesthesia and Analgesia*, 81(1), 57–62.

- Dwyer, J. M., & Duman, R. S. (2013). Activation of mammalian target of rapamycin and synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants. *Biological Psychiatry*, 73(12), 1189–1198.
- Eaton, W. W., Bienvenu, O. J., & Miloyan, B. (2018). Specific phobias. *The Lancet. Psychiatry*, 5(8), 678–686.
- Edelmann, E., Lessmann, V., & Brigadski, T. (2014). Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76 Pt C, 610–627.
- Ehret, M. (2019). Treatment of posttraumatic stress disorder: Focus on pharmacotherapy. *The Mental Health Clinician*, 9(6), 373–382.
- El Gaamouch, F., Buisson, A., Moustié, O., Lemieux, M., Labrecque, S., Bontempi, B., De Koninck, P., & Nicole, O. (2012). Interaction between α CaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(31), 10767–10779.
- Endres, T., & Lessmann, V. (2012). Age-dependent deficits in fear learning in heterozygous BDNF knock-out mice. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19(12), 561–570.
- Ewald RC, Cline HT. (2009). NMDA Receptors and Brain Development. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 1.
- Falls, W. A., Miserendino, M. J., & Davis, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(3), 854–863.
- Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7–19.
- FDA News release. (2019). *FDA approves new nasal spray medication for treatment-resistant depression; available only at a certified doctor's office or clinic*. US Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-nasal-spray-medication-treatment-resistant-depression-available-only-certified>
- Feder, A., Costi, S., Rutter, S. B., Collins, A. B., Govindarajulu, U., Jha, M. K., Horn, S. R., Kautz, M., Corniquel, M., Collins, K. A., Bevilacqua, L., Glasgow, A. M., Brallier, J., Pietrzak, R. H., Murrough, J. W., & Charney, D. S. (2021). A Randomized Controlled Trial of Repeated Ketamine Administration for Chronic Posttraumatic Stress Disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 178(2), 193–202.
- Feder, A., Parides, M. K., Murrough, J. W., Perez, A. M., Morgan, J. E., Saxena, S., Kirkwood, K., Aan Het Rot, M., Lapidus, K. A. B., Wan, L.-B., Iosifescu, D., & Charney, D. S. (2014). Efficacy of intravenous ketamine for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*, 71(6), 681–688.
- Felmingham, K., Kemp, A., Williams, L., Das, P., Hughes, G., Peduto, A., & Bryant, R. (2007). Changes in anterior cingulate and amygdala after cognitive behavior therapy of posttraumatic stress disorder. *Psychological Science*, 18(2), 127–129.
- Florido, A., Velasco, E. R., Soto-Faguás, C. M., Gomez-Gomez, A., Perez-Caballero, L., Molina, P., Nadal, R., Pozo, O. J., Saura, C. A., & Andero, R. (2021). Sex differences in fear memory consolidation via Tac2 signaling in mice. *Nature Communications*, 12(1), 2496.
- Foa, E. B., Dancu, C. V., Hembree, E. A., Jaycox, L. H., Meadows, E. A., & Street, G. P. (1999). A comparison of exposure therapy, stress inoculation training, and their combination for reducing

posttraumatic stress disorder in female assault victims. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 67(2), 194–200.

- Fraga, D. B., Camargo, A., Olescowicz, G., Azevedo Padilha, D., Mina, F., Budni, J., Brocardo, P. S., & Rodrigues, A. L. S. (2021). A single administration of ascorbic acid rapidly reverses depressive-like behavior and hippocampal synaptic dysfunction induced by corticosterone in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 342, 109476.
- Fraga, D. B., Camargo, A., Olescowicz, G., Padilha, D. A., Mina, F., Budni, J., Brocardo, P. S., & Rodrigues, A. L. S. (2021). Ketamine, but not fluoxetine, rapidly rescues corticosterone-induced impairments on glucocorticoid receptor and dendritic branching in the hippocampus of mice. *Metabolic Brain Disease*, 36(8), 2223–2233.
- Frankland, P. W., Cestari, V., Filipkowski, R. K., McDonald, R. J., & Silva, A. J. (1998). The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 863–874.
- Fucich, E. A., Paredes, D., & Morilak, D. A. (2016). Therapeutic Effects of Extinction Learning as a Model of Exposure Therapy in Rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(13), 3092–3102.
- Fujita, Y., Morinobu, S., Takei, S., Fuchikami, M., Matsumoto, T., Yamamoto, S., & Yamawaki, S. (2012). Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, facilitates fear extinction and enhances expression of the hippocampal NR2B-containing NMDA receptor gene. *Journal of Psychiatric Research*, 46(5), 635–643.
- Gafford, G. M., Parsons, R. G., & Helmstetter, F. J. (2011). Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience*, 182, 98–104.
- Galvin, C., & Ninan, I. (2014). Regulation of the mouse medial prefrontal cortical synapses by endogenous estradiol. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2086–2094.
- Ganguly, S., Panetta, J. C., Roberts, J. K., & Schuetz, E. G. (2018). Ketamine Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Are Altered by P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein Efflux Transporters in Mice. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 46(7), 1014–1022.
- Garcia, R. (2017). Neurobiology of fear and specific phobias. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 24(9), 462–471.
- Gill, H., Gill, B., Rodrigues, N. B., Lipsitz, O., Rosenblat, J. D., El-Halabi, S., Nasri, F., Mansur, R. B., Lee, Y., & McIntyre, R. S. (2021). The Effects of Ketamine on Cognition in Treatment-Resistant Depression: A Systematic Review and Priority Avenues for Future Research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 120, 78–85.
- Gingnell, M., Morell, A., Bannbers, E., Wikström, J., & Sundström Poromaa, I. (2012). Menstrual cycle effects on amygdala reactivity to emotional stimulation in premenstrual dysphoric disorder. *Hormones and Behavior*, 62(4), 400–406.
- Ginsburg, G. S., Becker, E. M., Keeton, C. P., Sakolsky, D., Piacentini, J., Albano, A. M., Compton, S. N., Iyengar, S., Sullivan, K., Caporino, N., Peris, T., Birmaher, B., Rynn, M., March, J., & Kendall, P. C. (2014). Naturalistic follow-up of youths treated for pediatric anxiety disorders. *JAMA Psychiatry*, 71(3), 310–318.
- Girgenti, M. J., Ghosal, S., LoPresto, D., Taylor, J. R., & Duman, R. S. (2017). Ketamine accelerates fear extinction via mTORC1 signaling. *Neurobiology of Disease*, 100, 1–8.

- Giustino, T. F., & Maren, S. (2015). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 298.
- Goldstein, J. M., Jerram, M., Poldrack, R., Ahern, T., Kennedy, D. N., Seidman, L. J., & Makris, N. (2005). Hormonal cycle modulates arousal circuitry in women using functional magnetic resonance imaging. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(40), 9309–9316.
- Gomes, G. M., Mello, C. F., da Rosa, M. M., Bochi, G. V., Ferreira, J., Barron, S., & Rubin, M. A. (2010). Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(4), 589–595.
- Gomez, A. F., Barthel, A. L., & Hofmann, S. G. (2018). Comparing the efficacy of benzodiazepines and serotonergic anti-depressants for adults with generalized anxiety disorder: a meta-analytic review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(8), 883–894.
- Gong, R., Park, C. S., Abbassi, N. R., & Tang, S.-J. (2006). Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18802–18815.
- Gourley, S. L., Kedves, A. T., Olausson, P., & Taylor, J. R. (2009). A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(3), 707–716.
- Graber, T. E., McCamphill, P. K., & Sossin, W. S. (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 20(10), 518–530.
- Graham, B. M., Li, S. H., Black, M. J., & Öst, L.-G. (2018). The association between estradiol levels, hormonal contraceptive use, and responsiveness to one-session-treatment for spider phobia in women. *Psychoneuroendocrinology*, 90, 134–140.
- Graham, B. M., & Milad, M. R. (2011). The study of fear extinction: implications for anxiety disorders. *The American Journal of Psychiatry*, 168(12), 1255–1265.
- Graham, B. M., & Milad, M. R. (2013). Blockade of estrogen by hormonal contraceptives impairs fear extinction in female rats and women. *Biological Psychiatry*, 73(4), 371–378.
- Graham, B. M., & Milad, M. R. (2014). Inhibition of estradiol synthesis impairs fear extinction in male rats. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 21(7), 347–350.
- Green, S. A., & Graham, B. M. (2022). Symptom fluctuation over the menstrual cycle in anxiety disorders, PTSD, and OCD: a systematic review. *Archives of Women's Mental Health*, 25(1), 71–85.
- Gruene, T. M., Lipps, J., Rey, C. D., Bouck, A., & Shansky, R. M. (2014). Heat exposure in female rats elicits abnormal fear expression and cellular changes in prefrontal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 115, 38–42.
- Guo, H., Lai, L., Butchbach, M. E. R., Stockinger, M. P., Shan, X., Bishop, G. A., & Lin, C. G. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human Molecular Genetics*, 12(19), 2519–2532.
- Gupta, A., Devi, L. A., & Gomes, I. (2011). Potentiation of μ -opioid receptor-mediated signaling by ketamine. *Journal of Neurochemistry*, 119(2), 294–302.

- Gupta, S. C., Hillman, B. G., Prakash, A., Ugale, R. R., Stairs, D. J., & Dravid, S. M. (2013). Effect of D-cycloserine in conjunction with fear extinction training on extracellular signal-regulated kinase activation in the medial prefrontal cortex and amygdala in rat. *The European Journal of Neuroscience*, 37(11), 1811–1822.
- Haaker, J., Maren, S., Andreatta, M., Merz, C. J., Richter, J., Richter, S. H., Meir Drexler, S., Lange, M. D., Jüngling, K., Nees, F., Seidenbecher, T., Fullana, M. A., Wotjak, C. T., & Lonsdorf, T. B. (2019). Making translation work: Harmonizing cross-species methodology in the behavioural neuroscience of Pavlovian fear conditioning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 107, 329–345.
- Haddad, A. D. M., Lissek, S., Pine, D. S., & Lau, J. Y. F. (2011). How do social fears in adolescence develop? Fear conditioning shapes attention orienting to social threat cues. *Cognition & Emotion*, 25(6), 1139–1147.
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., & Traynelis, S. F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of General Physiology*, 150(8), 1081–1105.
- Hare, T. A., Tottenham, N., Galvan, A., Voss, H. U., Glover, G. H., & Casey, B. J. (2008). Biological substrates of emotional reactivity and regulation in adolescence during an emotional go-nogo task. *Biological Psychiatry*, 63(10), 927–934.
- Haskell, S. G., Gordon, K. S., Mattocks, K., Duggal, M., Erdos, J., Justice, A., & Brandt, C. A. (2010). Gender differences in rates of depression, PTSD, pain, obesity, and military sexual trauma among Connecticut War Veterans of Iraq and Afghanistan. *Journal of Women's Health* (2002), 19(2), 267–271.
- Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., & Ressler, K. J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry*, 12(7), 656–670.
- Hermann, C., Ziegler, S., Birbaumer, N., & Flor, H. (2002). Psychophysiological and subjective indicators of aversive pavlovian conditioning in generalized social phobia. *Biological Psychiatry*, 52(4), 328–337.
- Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50(2–3), 83–107.
- Herry, C., Ciocchi, S., Senn, V., Demmou, L., Müller, C., & Lüthi, A. (2008). Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature*, 454(7204), 600–606.
- Herry, C., & Garcia, R. (2002). Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(2), 577–583.
- Hetrick, S. E., Purcell, R., Garner, B., & Parslow, R. (2010). Combined pharmacotherapy and psychological therapies for post traumatic stress disorder (PTSD). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7, CD007316.
- Hill, R. A., & van den Buuse, M. (2011). Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. *Brain Research*, 1384, 51–60.
- Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences*, 33(2), 67–75.
- Hong, I., & Kaang, B.-K. (2022). The complexity of ventral CA1 and its multiple functionalities. *Genes, Brain, and Behavior*, 21(7), e12826.

- Hottat, A., & Hantson, P. (2023). Toxicity patterns associated with chronic ketamine exposure. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 35(2), 113–123.
- Hovda, N., Gerrish, W., Frizzell, W., & Shackelford, R. (2024). A systematic review of the incidence of medical serious adverse events in sub-anesthetic ketamine treatment of psychiatric disorders. *Journal of Affective Disorders*, 345, 262–271.
- Iafrati, J., Orejarena, M. J., Lassalle, O., Bouamrane, L., Gonzalez-Campo, C., & Chavis, P. (2014). Reelin, an extracellular matrix protein linked to early onset psychiatric diseases, drives postnatal development of the prefrontal cortex via GluN2B-NMDARs and the mTOR pathway. *Molecular Psychiatry*, 19(4), 417–426.
- Impey, S., Obrietan, K., Wong, S. T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J. C., Chan, G., & Storm, D. R. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*, 21(4), 869–883.
- Ishikawa, A., & Nakamura, S. (2006). Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat. *Journal of Neurophysiology*, 96(4), 2134–2138.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., & Medina, I. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*, 572(Pt 3), 789–798.
- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750.
- Jacobs, E. G., Holsen, L. M., Lancaster, K., Makris, N., Whitfield-Gabrieli, S., Remington, A., Weiss, B., Buka, S., Klibanski, A., & Goldstein, J. M. (2015). 17 β -estradiol differentially regulates stress circuitry activity in healthy and depressed women. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(3), 566–576.
- Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2014). Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 61.
- Jelen, L. A., Young, A. H., & Stone, J. M. (2021). Ketamine: A tale of two enantiomers. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 35(2), 109–123.
- Jett, J. D., Boley, A. M., Girotti, M., Shah, A., Lodge, D. J., & Morilak, D. A. (2015). Antidepressant-like cognitive and behavioral effects of acute ketamine administration associated with plasticity in the ventral hippocampus to medial prefrontal cortex pathway. *Psychopharmacology*, 232(17), 3123–3133.
- Jin, S., & Feig, L. A. (2010). Long-term potentiation in the CA1 hippocampus induced by NR2A subunit-containing NMDA glutamate receptors is mediated by Ras-GRF2/Erk map kinase signaling. *PloS One*, 5(7), e11732.
- Jobim, P. F. C., Pedroso, T. R., Christoff, R. R., Werenicz, A., Maurmann, N., Reolon, G. K., & Roesler, R. (2012). Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(1), 105–112.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147(3), 509–524.

- Jovanovic, T., Norrholm, S. D., Blanding, N. Q., Davis, M., Duncan, E., Bradley, B., & Ressler, K. J. (2010). Impaired fear inhibition is a biomarker of PTSD but not depression. *Depression and Anxiety*, 27(3), 244–251.
- Jovanovic, T., Norrholm, S. D., Fennell, J. E., Keyes, M., Fiallos, A. M., Myers, K. M., Davis, M., & Duncan, E. J. (2009). Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. *Psychiatry Research*, 167(1–2), 151–160.
- Ju, L.-S., Yang, J.-J., Lei, L., Xia, J.-Y., Luo, D., Ji, M.-H., Martynyuk, A. E., & Yang, J.-J. (2017). The Combination of Long-term Ketamine and Extinction Training Contributes to Fear Erasure by Bdnf Methylation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 100.
- Kapur, S., & Seeman, P. (2002). NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors-implications for models of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 7(8), 837–844.
- Karpova, N. N., Pickenhagen, A., Lindholm, J., Tiraboschi, E., Kuleskaya, N., Agústsóttir, A., Antila, H., Popova, D., Akamine, Y., Bahi, A., Sullivan, R., Hen, R., Drew, L. J., & Castrén, E. (2011). Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6063), 1731–1734.
- Kaysen, D. L., Bedard-Gilligan, M. A., & Saxon, A. J. (2019). Use of Prolonged Exposure and Sertraline in the Treatment of Posttraumatic Stress Disorder for Veterans. *JAMA Psychiatry*, 76(2), 109–110.
- Kim, J. H., Li, S., & Richardson, R. (2011). Immunohistochemical analyses of long-term extinction of conditioned fear in adolescent rats. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 21(3), 530–538.
- Kim, J. J., & Jung, M. W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(2), 188–202.
- Kim, M. J., Dunah, A. W., Wang, Y. T., & Sheng, M. (2005). Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 46(5), 745–760.
- Kim, M. J., Gee, D. G., Loucks, R. A., Davis, F. C., & Whalen, P. J. (2011). Anxiety dissociates dorsal and ventral medial prefrontal cortex functional connectivity with the amygdala at rest. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 21(7), 1667–1673.
- Kim, M. J., & Whalen, P. J. (2009). The structural integrity of an amygdala-prefrontal pathway predicts trait anxiety. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(37), 11614–11618.
- Kim-Cohen, J., Caspi, A., Moffitt, T. E., Harrington, H., Milne, B. J., & Poulton, R. (2003). Prior juvenile diagnoses in adults with mental disorder: developmental follow-back of a prospective-longitudinal cohort. *Archives of General Psychiatry*, 60(7), 709–717.
- Kirby, E. D., Muroy, S. E., Sun, W. G., Covarrubias, D., Leong, M. J., Barchas, L. A., & Kaufer, D. (2013). Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *ELife*, 2, e00362.
- Kitayama, N., Vaccarino, V., Kutner, M., Weiss, P., & Bremner, J. D. (2005). Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 88(1), 79–86.
- Knapska, E., & Maren, S. (2009). Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(8), 486–493.

- Knapska, E., Radwanska, K., Werka, T., & Kaczmarek, L. (2007). Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiological Reviews*, 87(4), 1113–1173.
- Kojima, M., & Mizui, T. (2017). BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity. *Vitamins and Hormones*, 104, 19–28.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., & Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8856–8860.
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(3), 579–593.
- Kurdi, M. S., Theerth, K. A., & Deva, R. S. (2014). Ketamine: Current applications in anesthesia, pain, and critical care. *Anesthesia, Essays and Researches*, 8(3), 283–290.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lange, I., Goossens, L., Michiels, S., Bakker, J., Vervliet, B., Marcelis, M., Wichers, M., van Os, J., van Amelsvoort, T., & Schruers, K. (2020). Neural responses during extinction learning predict exposure therapy outcome in phobia: results from a randomized-controlled trial. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 45(3), 534–541.
- Langton, J. M., Kim, J. H., Nicholas, J., & Richardson, R. (2007). The effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on the acquisition and extinction of learned fear in the developing rat. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(10), 665–668.
- Laubach, M., Amarante, L. M., Swanson, K., & White, S. R. (2018). What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *ENeuro*, 5(5).
- Lebron-Milad, K., & Milad, M. R. (2012). Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 2, 3.
- Ledgerwood, L., Richardson, R., & Cranney, J. (2003). Effects of D-cycloserine on extinction of conditioned freezing. *Behavioral Neuroscience*, 117(2), 341–349.
- Ledgerwood, L., Richardson, R., & Cranney, J. (2005). D-cycloserine facilitates extinction of learned fear: effects on reacquisition and generalized extinction. *Biological Psychiatry*, 57(8), 841–847.
- LeDoux, J. E. (2012). Evolution of human emotion: a view through fear. *Progress in Brain Research*, 195, 431–442.
- Li, C., Brake, W. G., Romeo, R. D., Dunlop, J. C., Gordon, M., Buzescu, R., Magarinos, A. M., Allen, P. B., Greengard, P., Luine, V., & McEwen, B. S. (2004). Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2185–2190.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., Li, X.-Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5994), 959–964.
- Li, X., Martinez-Lozano Sinues, P., Dallmann, R., Bregy, L., Hollmén, M., Proulx, S., Brown, S. A., Detmar, M., Kohler, M., & Zenobi, R. (2015). Drug Pharmacokinetics Determined by Real-Time

Analysis of Mouse Breath. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(27), 7815–7818.

- Linnarsson, S., Björklund, A., & Ernfors, P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *The European Journal of Neuroscience*, 9(12), 2581–2587.
- Lissek, S., Powers, A. S., McClure, E. B., Phelps, E. A., Woldehawariat, G., Grillon, C., & Pine, D. S. (2005). Classical fear conditioning in the anxiety disorders: a meta-analysis. *Behaviour Research and Therapy*, 43(11), 1391–1424.
- Liu, J.-L., Li, M., Dang, X.-R., Wang, Z.-H., Rao, Z.-R., Wu, S.-X., Li, Y.-Q., & Wang, W. (2009). A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PloS One*, 4(10), e7548.
- Liu, Y., Lin, D., Wu, B., & Zhou, W. (2016). Ketamine abuse potential and use disorder. *Brain Research Bulletin*, 126(Pt 1), 68–73.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Logue, J., Schoepfer, K., Guerrero, A. B., Zhou, Y., & Kabbaj, M. (2022). Sex-specific effects of social isolation stress and ketamine on hippocampal plasticity. *Neuroscience Letters*, 766, 136301.
- Lu, K., Jing, X.-B., Xue, Q., Song, X.-J., Wei, M.-D., & Wang, A.-G. (2019). Impaired fear memory extinction during adolescence is accompanied by the depressive-like behaviors. *Neuroscience Letters*, 699, 8–15.
- Lubin, F. D., Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(42), 10576–10586.
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6).
- Ma, H., Groth, R. D., Cohen, S. M., Emery, J. F., Li, B., Hoedt, E., Zhang, G., Neubert, T. A., & Tsien, R. W. (2014). γ CaMKII shuttles Ca^{2+} /CaM to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression. *Cell*, 159(2), 281–294.
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 103–126.
- Maren, S. (2008). Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *The European Journal of Neuroscience*, 28(8), 1661–1666.
- Margatho, L. O., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2009). GABA in the central amygdaloid nucleus modulates the electrolyte excretion and hormonal responses to blood volume expansion in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 42(1), 114–121.
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206–210.
- Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2012). The influence of stress on fear memory processes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 45(4), 308–313.

- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 649–711.
- Mastrodonato, A., Martinez, R., Pavlova, I. P., LaGamma, C. T., Brachman, R. A., Robison, A. J., & Denny, C. A. (2018). Ventral CA3 Activation Mediates Prophylactic Ketamine Efficacy Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. *Biological Psychiatry*, 84(11), 846–856.
- Mataix-Cols, D., Fernández de la Cruz, L., Monzani, B., Rosenfield, D., Andersson, E., Pérez-Vigil, A., Frumento, P., de Kleine, R. A., Difede, J., Dunlop, B. W., Farrell, L. J., Geller, D., Gerardi, M., Guastella, A. J., Hofmann, S. G., Hendriks, G.-J., Kushner, M. G., Lee, F. S., Lenze, E. J., ... Thuras, P. (2017). D-Cycloserine Augmentation of Exposure-Based Cognitive Behavior Therapy for Anxiety, Obsessive-Compulsive, and Posttraumatic Stress Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data. *JAMA Psychiatry*, 74(5), 501–510.
- McCallum, J., Kim, J. H., & Richardson, R. (2010). Impaired extinction retention in adolescent rats: effects of D-cycloserine. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(10), 2134–2142.
- McDermott, K. B. & Roediger, H. L. (2024). Memory (encoding, storage, retrieval). In R. Biswas-Diener & E. Diener (Eds), *Noba textbook series: Psychology*. Champaign, IL: DEF publishers.
- McDowell, K. A., Hutchinson, A. N., Wong-Goodrich, S. J. E., Presby, M. M., Su, D., Rodriguiz, R. M., Law, K. C., Williams, C. L., Wetsel, W. C., & West, A. E. (2010). Reduced cortical BDNF expression and aberrant memory in Carf knock-out mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(22), 7453–7465.
- Meis, S., Endres, T., Munsch, T., & Lessmann, V. (2018). The Relation Between Long-Term Synaptic Plasticity at Glutamatergic Synapses in the Amygdala and Fear Learning in Adult Heterozygous BDNF-Knockout Mice. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 28(4), 1195–1208.
- Michael, T., Blechert, J., Vriends, N., Margraf, J., & Wilhelm, F. H. (2007). Fear conditioning in panic disorder: Enhanced resistance to extinction. *Journal of Abnormal Psychology*, 116(3), 612–617.
- Milad, M. R., Igoe, S. A., Lebron-Milad, K., & Novales, J. E. (2009). Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience*, 164(3), 887–895.
- Milad, M. R., Orr, S. P., Lasko, N. B., Chang, Y., Rauch, S. L., & Pitman, R. K. (2008). Presence and acquired origin of reduced recall for fear extinction in PTSD: results of a twin study. *Journal of Psychiatric Research*, 42(7), 515–520.
- Milad, M. R., Pitman, R. K., Ellis, C. B., Gold, A. L., Shin, L. M., Lasko, N. B., Zeidan, M. A., Handwerker, K., Orr, S. P., & Rauch, S. L. (2009). Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, 66(12), 1075–1082.
- Milad, M. R., Rauch, S. L., Pitman, R. K., & Quirk, G. J. (2006). Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biological Psychology*, 73(1), 61–71.
- Milad, M. R., Zeidan, M. A., Contero, A., Pitman, R. K., Klibanski, A., Rauch, S. L., & Goldstein, J. M. (2010). The influence of gonadal hormones on conditioned fear extinction in healthy humans. *Neuroscience*, 168(3), 652–658.
- Mizuno, K., Dempster, E., Mill, J., & Giese, K. P. (2012). Long-lasting regulation of hippocampal Bdnf gene transcription after contextual fear conditioning. *Genes, Brain, and Behavior*, 11(6), 651–659.
- Moaddel, R., Farmer, C. A., Yavi, M., Kadriu, B., Zhu, M., Fan, J., Chen, Q., Lehrmann, E., Fantoni, G., De, S., Mazucanti, C. H., Acevedo-Diaz, E. E., Yuan, P., Gould, T. D., Park, L. T., Egan, J. M., Ferrucci, L., & Zarate, C. A. (2023). Cerebrospinal fluid exploratory proteomics and

ketamine metabolite pharmacokinetics in human volunteers after ketamine infusion. *IScience*, 26(12), 108527.

- Moya, N. A., Tanner, M. K., Smith, A. M., Balolia, A., Davis, J. K. P., Bonar, K., Jaime, J., Hubert, T., Silva, J., Whitworth, W., Loetz, E. C., Bland, S. T., & Greenwood, B. N. (2020). Acute exercise enhances fear extinction through a mechanism involving central mTOR signaling. *Neurobiology of Learning and Memory*, 176, 107328.
- Müller, T., Albrecht, D., & Gebhardt, C. (2009). Both NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor are critical for long-term potentiation and long-term depression in the lateral amygdala of horizontal slices of adult mice. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(6), 395–405.
- Münsterkötter, A. L., Notzon, S., Redlich, R., Grotegerd, D., Dohm, K., Arolt, V., Kugel, H., Zwanzger, P., & Dannlowski, U. (2015). Spider or no spider? Neural correlates of sustained and phasic fear in spider phobia. *Depression and Anxiety*, 32(9), 656–663.
- Myers, K. M., Carlezon, W. A., & Davis, M. (2011). Glutamate receptors in extinction and extinction-based therapies for psychiatric illness. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(1), 274–293.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120–150.
- Nair, A., & Vaidya, V. A. (2006). Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? *Journal of Biosciences*, 31(3), 423–434.
- Nakao, T., Takezawa, T., Miyatani, M., & Ohira, H. (2009). Medial prefrontal cortex and cognitive regulation. *Psychologia*, 52(2), 93–109.
- Neske, G. T., Patrick, S. L., & Connors, B. W. (2015). Contributions of diverse excitatory and inhibitory neurons to recurrent network activity in cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(3), 1089–1105.
- Neumann, D. L., & Kitlertsirivatana, E. (2010). Exposure to a novel context after extinction causes a renewal of extinguished conditioned responses: implications for the treatment of fear. *Behaviour Research and Therapy*, 48(6), 565–570.
- Norberg, M. M., Krystal, J. H., & Tolin, D. F. (2008). A meta-analysis of D-cycloserine and the facilitation of fear extinction and exposure therapy. *Biological Psychiatry*, 63(12), 1118–1126.
- Nosyreva, E., Szabla, K., Autry, A. E., Ryazanov, A. G., Monteggia, L. M., & Kavalali, E. T. (2013). Acute suppression of spontaneous neurotransmission drives synaptic potentiation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(16), 6990–7002.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(6), 383–400.
- Pape, H.-C., & Pare, D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews*, 90(2), 419–463.
- Paredes, D., & Morilak, D. A. (2019). A Rodent Model of Exposure Therapy: The Use of Fear Extinction as a Therapeutic Intervention for PTSD. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 46.
- Park, S. W., Lee, J. G., Seo, M. K., Lee, C. H., Cho, H. Y., Lee, B. J., Seol, W., & Kim, Y. H. (2014). Differential effects of antidepressant drugs on mTOR signalling in rat hippocampal neurons. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(11), 1831–1846.

- Parsons, R. G., Gafford, G. M., & Helmstetter, F. J. (2006). Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(50), 12977–12983.
- Pattwell, S. S., Duhoux, S., Hartley, C. A., Johnson, D. C., Jing, D., Elliott, M. D., Ruberry, E. J., Powers, A., Mehta, N., Yang, R. R., Soliman, F., Glatt, C. E., Casey, B. J., Ninan, I., & Lee, F. S. (2012). Altered fear learning across development in both mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16318–16323.
- Pattwell, S. S., Lee, F. S., & Casey, B. J. (2013). Fear learning and memory across adolescent development: Hormones and Behavior Special Issue: Puberty and Adolescence. *Hormones and Behavior*, 64(2), 380–389.
- Pattwell, S. S., Liston, C., Jing, D., Ninan, I., Yang, R. R., Witzum, J., Murdock, M. H., Dincheva, I., Bath, K. G., Casey, B. J., Deisseroth, K., & Lee, F. S. (2016). Dynamic changes in neural circuitry during adolescence are associated with persistent attenuation of fear memories. *Nature Communications*, 7, 11475.
- Pavlov, I. P. (2010). Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of Neurosciences*, 17(3).
- Penninx, B. W., Pine, D. S., Holmes, E. A., & Reif, A. (2021). Anxiety disorders. *Lancet (London, England)*, 397(10277), 914–927.
- Pérez-Otaño, I., & Ehlers, M. D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends in Neurosciences*, 28(5), 229–238.
- Perkinton, M. S., Sihra, T. S., & Williams, R. J. (1999). Ca(2+)-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), 5861–5874.
- Perry, C. J., Ganella, D. E., Nguyen, L. D., Du, X., Drummond, K. D., Whittle, S., Pang, T. Y., & Kim, J. H. (2020). Assessment of conditioned fear extinction in male and female adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology*, 116, 104670.
- Peters, J., Dieppa-Perea, L. M., Melendez, L. M., & Quirk, G. J. (2010). Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5983), 1288–1290.
- Petzold, A., Psotta, L., Brigadski, T., Endres, T., & Lessmann, V. (2015). Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 120, 52–60.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274–285.
- Phoumthipphavong, V., Barthas, F., Hassett, S., & Kwan, A. C. (2016). Longitudinal Effects of Ketamine on Dendritic Architecture In Vivo in the Mouse Medial Frontal Cortex. *ENeuro*, 3(2).
- Pitman, R. K., Rasmusson, A. M., Koenen, K. C., Shin, L. M., Orr, S. P., Gilbertson, M. W., Milad, M. R., & Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(11), 769–787.
- Popiel, A., Zawadzki, B., Pragłowska, E., & Teichman, Y. (2015). Prolonged exposure, paroxetine and the combination in the treatment of PTSD following a motor vehicle accident. A randomized

clinical trial - The “TRAKT” study. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 48, 17–26.

- Popova, D., Ágústsdóttir, A., Lindholm, J., Mazulis, U., Akamine, Y., Castrén, E., & Karpova, N. N. (2014). Combination of fluoxetine and extinction treatments forms a unique synaptic protein profile that correlates with long-term fear reduction in adult mice. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 24(7), 1162–1174.
- Portmann, S., Kwan, H. Y., Theurillat, R., Schmitz, A., Mevissen, M., & Thormann, W. (2010). Enantioselective capillary electrophoresis for identification and characterization of human cytochrome P450 enzymes which metabolize ketamine and norketamine in vitro. *Journal of Chromatography. A*, 1217(51), 7942–7948.
- Pozzo-Miller, L. D., Gottschalk, W., Zhang, L., McDermott, K., Du, J., Gopalakrishnan, R., Oho, C., Sheng, Z. H., & Lu, B. (1999). Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(12), 4972–4983.
- Pratchett, L. C., Daly, K., Bierer, L. M., & Yehuda, R. (2011). New approaches to combining pharmacotherapy and psychotherapy for posttraumatic stress disorder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 12(15), 2339–2354.
- Pryazhnikov, E., Mugantseva, E., Casarotto, P., Kolikova, J., Fred, S. M., Toptunov, D., Afzalov, R., Hotulainen, P., Voikar, V., Terry-Lorenzo, R., Engel, S., Kirov, S., Castren, E., & Khiroug, L. (2018). Longitudinal two-photon imaging in somatosensory cortex of behaving mice reveals dendritic spine formation enhancement by subchronic administration of low-dose ketamine. *Scientific Reports*, 8(1), 6464.
- Psotta, L., Lessmann, V., & Endres, T. (2013). Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 103, 34–38.
- Purkey, A. M., & Dell’Acqua, M. L. (2020). Phosphorylation-Dependent Regulation of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors During Hippocampal Synaptic Plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 8.
- Quirk, G. J., Likhtik, E., Pelletier, J. G., & Paré, D. (2003). Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8800–8807.
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56–72.
- Radford, K. D., Berman, R. Y., Jaiswal, S., Kim, S. Y., Zhang, M., Spencer, H. F., & Choi, K. H. (2022). Enhanced Fear Memories and Altered Brain Glucose Metabolism (18F-FDG-PET) following Subanesthetic Intravenous Ketamine Infusion in Female Sprague-Dawley Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3).
- Radford, K. D., Park, T. Y., Jaiswal, S., Pan, H., Knutsen, A., Zhang, M., Driscoll, M., Osborne-Smith, L. A., Dardzinski, B. J., & Choi, K. H. (2018). Enhanced fear memories and brain glucose metabolism (18F-FDG-PET) following sub-anesthetic intravenous ketamine infusion in Sprague-Dawley rats. *Translational Psychiatry*, 8(1), 263.

- Radiske, A., Gonzalez, M. C., Nôga, D. A., Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., & Cammarota, M. (2021). mTOR inhibition impairs extinction memory reconsolidation. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 28(1), 1–6.
- Raij, T., Nummenmaa, A., Marin, M.-F., Porter, D., Furtak, S., Setsompop, K., & Milad, M. R. (2018). Prefrontal Cortex Stimulation Enhances Fear Extinction Memory in Humans. *Biological Psychiatry*, 84(2), 129–137.
- Rauch, S. A. M., Kim, H. M., Powell, C., Tuerk, P. W., Simon, N. M., Acierno, R., Allard, C. B., Norman, S. B., Venners, M. R., Rothbaum, B. O., Stein, M. B., Porter, K., Martis, B., King, A. P., Liberzon, I., Phan, K. L., & Hoge, C. W. (2019). Efficacy of Prolonged Exposure Therapy, Sertraline Hydrochloride, and Their Combination Among Combat Veterans With Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, 76(2), 117–126.
- Rauch, S. L., Shin, L. M., & Phelps, E. A. (2006). Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present, and future. *Biological Psychiatry*, 60(4), 376–382.
- Rawat, R., Tunc-Ozcan, E., McGuire, T. L., Peng, C.-Y., & Kessler, J. A. (2022). Ketamine activates adult-born immature granule neurons to rapidly alleviate depression-like behaviors in mice. *Nature Communications*, 13(1), 2650.
- Ressler, K. J., Rothbaum, B. O., Tannenbaum, L., Anderson, P., Graap, K., Zimand, E., Hodges, L., & Davis, M. (2004). Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Archives of General Psychiatry*, 61(11), 1136–1144.
- Rodrigues, H., Figueira, I., Lopes, A., Gonçalves, R., Mendlowicz, M. V., Coutinho, E. S. F., & Ventura, P. (2014). Does D-cycloserine enhance exposure therapy for anxiety disorders in humans? A meta-analysis. *PloS One*, 9(7), e93519.
- Rodrigues, S. M., LeDoux, J. E., & Sapolsky, R. M. (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 289–313.
- Rosa, J., de Carvalho Myskiw, J., Fiorenza, N. G., Furini, C. R. G., Sapiras, G. G., & Izquierdo, I. (2023). Hippocampal cholinergic receptors and the mTOR participation in fear-motivated inhibitory avoidance extinction memory. *Behavioural Brain Research*, 437, 114129.
- Rosado, J., Bui, V. D., Haas, C. A., Beck, J., Queisser, G., & Vlachos, A. (2022). Calcium modeling of spine apparatus-containing human dendritic spines demonstrates an “all-or-nothing” communication switch between the spine head and dendrite. *PLoS Computational Biology*, 18(4), e1010069.
- Rosas-Vidal, L. E., Do-Monte, F. H., Sotres-Bayon, F., & Quirk, G. J. (2014). Hippocampal--prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2161–2169.
- Rossouw, J., Yadin, E., Alexander, D., & Seedat, S. (2018). Prolonged exposure therapy and supportive counselling for post-traumatic stress disorder in adolescents: task-shifting randomised controlled trial. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 213(4), 587–594.
- Rossouw, J., Yadin, E., Alexander, D., & Seedat, S. (2022). Long-term follow-up of a randomised controlled trial of prolonged exposure therapy and supportive counselling for post-traumatic stress disorder in adolescents: a task-shifted intervention. *Psychological Medicine*, 52(6), 1022–1030.

- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., & Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16(3), 675–686.
- Rozenbaum, M. (2022). *A history of mice in scientific research*. Understanding animal research. <https://www.understandinganimalresearch.org.uk/news/a-history-of-mice-in-scientific-research>
- Rozov, A., & Burnashev, N. (2016). Fast interaction between AMPA and NMDA receptors by intracellular calcium. *Cell Calcium*, 60(6), 407–414.
- Ruvinsky, I., & Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(6), 342–348.
- Sala, N., Paoli, C., Bonifacino, T., Mingardi, J., Schiavon, E., La Via, L., Milanese, M., Tornese, P., Datusalia, A. K., Rosa, J., Facchinetti, R., Frumento, G., Carini, G., Salerno Scarzella, F., Scuderi, C., Forti, L., Barbon, A., Bonanno, G., Popoli, M., & Musazzi, L. (2022). Acute Ketamine Facilitates Fear Memory Extinction in a Rat Model of PTSD Along With Restoring Glutamatergic Alterations and Dendritic Atrophy in the Prefrontal Cortex. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 759626.
- Samifanni, R., Zhao, M., Cruz-Sanchez, A., Satheesh, A., Mumtaz, U., & Arruda-Carvalho, M. (2021). Developmental emergence of persistent memory for contextual and auditory fear in mice. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 28(11), 414–421.
- Santini, E., Huynh, T. N., & Klann, E. (2014). Mechanisms of translation control underlying long-lasting synaptic plasticity and the consolidation of long-term memory. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 122, 131–167.
- Santini, E., Muller, R. U., & Quirk, G. J. (2001). Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(22), 9009–9017.
- Santini, E., Quirk, G. J., & Porter, J. T. (2008). Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(15), 4028–4036.
- Schaeffer, D. J., Hori, Y., Gilbert, K. M., Gati, J. S., Menon, R. S., & Everling, S. (2020). Divergence of rodent and primate medial frontal cortex functional connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(35), 21681–21689.
- Schafe, G. E., Nadel, N. V, Sullivan, G. M., Harris, A., & LeDoux, J. E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 6(2), 97–110.
- Scheveneels, S., Boddez, Y., Vervliet, B., & Hermans, D. (2016). The validity of laboratory-based treatment research: Bridging the gap between fear extinction and exposure treatment. *Behaviour Research and Therapy*, 86, 87–94.
- Schienle, A., Schäfer, A., Hermann, A., Rohrmann, S., & Vaitl, D. (2007). Symptom provocation and reduction in patients suffering from spider phobia: an fMRI study on exposure therapy. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 257(8), 486–493.
- Schrader, C., & Ross, A. (2021). A Review of PTSD and Current Treatment Strategies. *Missouri Medicine*, 118(6), 546–551.

- Shi, M., Ding, J., Li, L., Bai, H., Li, X., Lan, L., Fan, H., & Gao, L. (2020). Effects of Ketamine on Learning and Memory in the Hippocampus of Rats through ERK, CREB, and Arc. *Brain Sciences*, 11(1).
- Shi, S., Hayashi, Y., Esteban, J. A., & Malinow, R. (2001). Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell*, 105(3), 331–343.
- Shi, Y.-W., Fan, B.-F., Xue, L., Wen, J.-L., & Zhao, H. (2017). Regulation of Fear Extinction in the Basolateral Amygdala by Dopamine D2 Receptors Accompanied by Altered GluR1, GluR1-Ser845 and NR2B Levels. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11, 116.
- Shin, L. M., Rauch, S. L., & Pitman, R. K. (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1071, 67–79.
- Shin, L. M., Wright, C. I., Cannistraro, P. A., Wedig, M. M., McMullin, K., Martis, B., Macklin, M. L., Lasko, N. B., Cavanagh, S. R., Krangel, T. S., Orr, S. P., Pitman, R. K., Whalen, P. J., & Rauch, S. L. (2005). A functional magnetic resonance imaging study of amygdala and medial prefrontal cortex responses to overtly presented fearful faces in posttraumatic stress disorder. *Archives of General Psychiatry*, 62(3), 273–281.
- Shipton, O. A., & Paulsen, O. (2014). GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1633), 20130163.
- Shirayama, Y., & Hashimoto, K. (2017). Effects of a single bilateral infusion of R-ketamine in the rat brain regions of a learned helplessness model of depression. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 267(2), 177–182.
- Shiroma, P. R., Thuras, P., Wels, J., Erbes, C., Kehle-Forbes, S., & Polusny, M. (2020). A Proof-of-Concept Study of Subanesthetic Intravenous Ketamine Combined With Prolonged Exposure Therapy Among Veterans With Posttraumatic Stress Disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 81(6).
- Siegel, R. S., & Dickstein, D. P. (2012). Anxiety in adolescents: Update on its diagnosis and treatment for primary care providers. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*, 3, 1–16.
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(2), 529–538.
- Singewald, N., & Holmes, A. (2019). Rodent models of impaired fear extinction. *Psychopharmacology*, 236(1), 21–32.
- Small, D. L., Murray, C. L., Mealing, G. A., Poulter, M. O., Buchan, A. M., & Morley, P. (1998). Brain derived neurotrophic factor induction of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A expression in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 252(3), 211–214.
- Smalla, K.H, Li, K.W., Smit, A.B., and Gundelfinger, E. D. (2004). Proteomic analysis of synaptic structures. *Konferencja „Nowe metody w neurobiologii”* (15 grudnia 2004)
- Soda, T., Brunetti, V., Berra-Romani, R., & Moccia, F. (2023). The Emerging Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in the Cardiovascular System: Physiological Implications, Pathological Consequences, and Therapeutic Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4).
- Sotres-Bayon, F., Bush, D. E. A., & LeDoux, J. E. (2007). Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala.

- Sotres-Bayon, F., Diaz-Mataix, L., Bush, D. E. A., & LeDoux, J. E. (2009). Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 19(2), 474–482.
- Spear, L. P. (2004). Adolescent brain development and animal models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021, 23–26.
- Spear, L. P. (2009). Heightened stress responsivity and emotional reactivity during pubertal maturation: Implications for psychopathology. *Development and Psychopathology*, 21(1), 87–97.
- Strous, J. F. M., Weeland, C. J., van der Draai, F. A., Daams, J. G., Denys, D., Lok, A., Schoevers, R. A., & Figeet, M. (2022). Brain Changes Associated With Long-Term Ketamine Abuse, A Systematic Review. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16, 795231.
- Suen, P. C., Wu, K., Levine, E. S., Mount, H. T., Xu, J. L., Lin, S. Y., & Black, I. B. (1997). Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), 8191–8195.
- Sui, L., Wang, J., & Li, B.-M. (2008). Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(10), 762–776.
- Sun, Y., Xu, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, Y., Zhang, L., Wang, L., Hu, J., & Gao, Z. (2018). The differences between GluN2A and GluN2B signaling in the brain. *Journal of Neuroscience Research*, 96(8), 1430–1443.
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*, 341, 112–153.
- Szadzinska, W., Danielewski, K., Kondrakiewicz, K., Andraka, K., Nikolaev, E., Mikosz, M., & Knapska, E. (2021). Hippocampal Inputs in the Prelimbic Cortex Curb Fear after Extinction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 41(44), 9129–9140.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(44), 9760–9769.
- Takei, S., Morinobu, S., Yamamoto, S., Fuchikami, M., Matsumoto, T., & Yamawaki, S. (2011). Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 45(4), 460–468.
- Takita, M., Izaki, Y., Jay, T. M., Kaneko, H., & Suzuki, S. S. (1999). Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. *The European Journal of Neuroscience*, 11(11), 4145–4148.
- Tang, J., Ko, S., Ding, H.-K., Qiu, C.-S., Calejesan, A. A., & Zhuo, M. (2005). Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Molecular Pain*, 1, 6.
- Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G., & Tsien, J. Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401(6748), 63–69.

- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1998). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20(4), 709–726.
- Taylor, J. H., Landeros-Weisenberger, A., Coughlin, C., Mulqueen, J., Johnson, J. A., Gabriel, D., Reed, M. O., Jakubovski, E., & Bloch, M. H. (2018). Ketamine for Social Anxiety Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Crossover Trial. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(2), 325–333.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., & Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(22), 5455–5463.
- Trent, S., Barnes, P., Hall, J., & Thomas, K. L. (2017). AMPA receptors control fear extinction through an Arc-dependent mechanism. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 24(8), 375–380.
- Tully, J. L., Dahlén, A. D., Haggarty, C. J., Schiöth, H. B., & Brooks, S. (2022). Ketamine treatment for refractory anxiety: A systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 88(10), 4412–4426.
- Urbanska, M., Gozdz, A., Swiech, L. J., & Jaworski, J. (2012). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30240–30256.
- van den Berg, H. (2022). Evaluating the validity of animal models of mental disorder: from modeling syndromes to modeling endophenotypes. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 44(4), 59.
- Vasey, M. W., Harbaugh, C. N., Buffington, A. G., Jones, C. R., & Fazio, R. H. (2012). Predicting return of fear following exposure therapy with an implicit measure of attitudes. *Behaviour Research and Therapy*, 50(12), 767–774.
- Velasco, E. R., Florido, A., Milad, M. R., & Andero, R. (2019). Sex differences in fear extinction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 103, 81–108.
- Victoriano, G., Santos-Costa, N., Mascarenhas, D. C., & Nunes-de-Souza, R. L. (2020). Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced anxiogenesis in mice: Attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. *Behavioural Brain Research*, 378, 112312.
- Walker, D. L., Ressler, K. J., Lu, K.-T., & Davis, M. (2002). Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(6), 2343–2351.
- Wang, G., Gilbert, J., & Man, H.-Y. (2012). AMPA receptor trafficking in homeostatic synaptic plasticity: functional molecules and signaling cascades. *Neural Plasticity*, 2012, 825364.
- Wang, J., Han, J., Wang, S., Duan, Y., Bao, C., Luo, Y., Xue, Q., & Cao, X. (2021). Forebrain GluN2A overexpression impairs fear extinction and NMDAR-dependent long-term depression in the lateral amygdala. *Brain Research Bulletin*, 174, 1–10.
- Wang, Q., Wang, Q., Song, X.-L., Jiang, Q., Wu, Y.-J., Li, Y., Yuan, T.-F., Zhang, S., Xu, N.-J., Zhu, M. X., Li, W.-G., & Xu, T.-L. (2018). Fear extinction requires ASIC1a-dependent regulation of hippocampal-prefrontal correlates. *Science Advances*, 4(10), eaau3075.

- Wei, M.-D., Wang, Y.-H., Lu, K., Lv, B.-J., Wang, Y., & Chen, W.-Y. (2020). Ketamine reverses the impaired fear memory extinction and accompanied depressive-like behaviors in adolescent mice. *Behavioural Brain Research*, 379, 112342.
- White, P. F., Way, W. L., & Trevor, A. J. (1982). Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology*, 56(2), 119–136.
- Widman, A. J., & McMahon, L. L. (2018). Disinhibition of CA1 pyramidal cells by low-dose ketamine and other antagonists with rapid antidepressant efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(13), E3007–E3016.
- Wieber, J., Gugler, R., Hengstmann, J. H., & Dengler, H. J. (1975). Pharmacokinetics of ketamine in man. *Der Anaesthetist*, 24(6), 260–263.
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83(1), 1–16.
- Winter, J. N., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2011). ERK and Akt signaling pathways function through parallel mechanisms to promote mTORC1 signaling. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300(5), C1172–80.
- World Health Organization. (2022). ICD-11: International classification of diseases (11th revision). <https://icd.who.int/>
- Wotjak, C. T., & Pape, H.-C. (2013). Neuronal circuits of fear memory and fear extinction. *E-Neuroforum*, 19(3), 47–56.
- Wu, C., Wang, Y., He, Y., Wu, S., Xie, Z., Zhang, J., Shen, J., Wang, Z., & He, L. (2020). Sub-anesthetic and anesthetic ketamine produce different long-lasting behavioral phenotypes (24 h post-treatment) via inducing different brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression level in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 167, 107136.
- Wu, M., Minkowicz, S., Dumrongprechachan, V., Hamilton, P., & Kozorovitskiy, Y. (2021). Ketamine Rapidly Enhances Glutamate-Evoked Dendritic Spinogenesis in Medial Prefrontal Cortex Through Dopaminergic Mechanisms. *Biological Psychiatry*, 89(11), 1096–1105.
- Xue, L., Li, Z. D., Chen, Z. X., Wang, X. G., Shi, Y. W., & Zhao, H. (2014). Fear response failed to return in AAB extinction paradigm accompanied with increased NR2B and GluR1 per845 in hippocampal CA1. *Neuroscience*, 260, 1–11.
- Yamada, D., Wada, K., & Sekiguchi, M. (2011). Facilitating actions of an AMPA receptor potentiator upon extinction of contextually conditioned fear response in stressed mice. *Neuroscience Letters*, 488(3), 242–246.
- Yamada, D., Zushida, K., Wada, K., & Sekiguchi, M. (2009). Pharmacological discrimination of extinction and reconsolidation of contextual fear memory by a potentiator of AMPA receptors. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(12), 2574–2584.
- Yamada, J., & Jinno, S. (2019). Potential link between antidepressant-like effects of ketamine and promotion of adult neurogenesis in the ventral hippocampus of mice. *Neuropharmacology*, 158, 107710.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., Lopez, O. T., Bennett, L., & Welcher, A. A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 78(2), 431–448.
- Yang, C., Hu, Y.-M., Zhou, Z.-Q., Zhang, G.-F., & Yang, J.-J. (2013). Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 118(1), 3–8.

- Yang, J., Harte-Hargrove, L. C., Siao, C.-J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., Lafrancois, J. J., Bath, K. G., Mark, W., Ballon, D., Lee, F. S., Scharfman, H. E., & Hempstead, B. L. (2014). proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Reports*, 7(3), 796–806.
- Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F. S., Lu, B., & Hempstead, B. L. (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nature Neuroscience*, 12(2), 113–115.
- Yao, W., Cao, Q., Luo, S., He, L., Yang, C., Chen, J., Qi, Q., Hashimoto, K., & Zhang, J.-C. (2022). Microglial ERK-NRBP1-CREB-BDNF signaling in sustained antidepressant actions of (R)-ketamine. *Molecular Psychiatry*, 27(3), 1618–1629.
- Yin, Y., Edelman, G. M., & Vanderklish, P. W. (2002). The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneurosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2368–2373.
- Yoshii, A., & Constantine-Paton, M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Developmental Neurobiology*, 70(5), 304–322.
- You, H., & Lu, B. (2023). Diverse Functions of Multiple Bdnf Transcripts Driven by Distinct Bdnf Promoters. *Biomolecules*, 13(4).
- Zandberg, L., Kaczurkin, A. N., McLean, C. P., Rescorla, L., Yadin, E., & Foa, E. B. (2016). Treatment of Adolescent PTSD: The Impact of Prolonged Exposure Versus Client-Centered Therapy on Co-Occurring Emotional and Behavioral Problems. *Journal of Traumatic Stress*, 29(6), 507–514.
- Zanos, P., Brown, K. A., Georgiou, P., Yuan, P., Zarate, C. A., Thompson, S. M., & Gould, T. D. (2023). NMDA Receptor Activation-Dependent Antidepressant-Relevant Behavioral and Synaptic Actions of Ketamine. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 43(6), 1038–1050.
- Zanos, P., & Gould, T. D. (2018). Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Molecular Psychiatry*, 23(4), 801–811.
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Riggs, L. M., Highland, J. N., Georgiou, P., Pereira, E. F. R., Albuquerque, E. X., Thomas, C. J., Zarate, C. A., & Gould, T. D. (2018). Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 70(3), 621–660.
- Zarate, C. A., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S., & Manji, H. K. (2006). A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry*, 63(8), 856–864.
- Zaytseva, A., Bouckova, E., Wiles, M. J., Wustrau, M. H., Schmidt, I. G., Mendez-Vazquez, H., Khatri, L., & Kim, S. (2023). Ketamine's rapid antidepressant effects are mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *ELife*, 12.
- Zeidan, M. A., Igoe, S. A., Linnman, C., Vitalo, A., Levine, J. B., Klibanski, A., Goldstein, J. M., & Milad, M. R. (2011). Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. *Biological Psychiatry*, 70(10), 920–927.
- Zhang, B., Li, C.-Y., & Wang, X.-S. (2017). The effect of hippocampal NMDA receptor blockade by MK-801 on cued fear extinction. *Behavioural Brain Research*, 332, 200–203.
- Zhang, K., Yamaki, V. N., Wei, Z., Zheng, Y., & Cai, X. (2017). Differential regulation of GluA1 expression by ketamine and memantine. *Behavioural Brain Research*, 316, 152–159.

- Zhang, M., Radford, K. D., Driscoll, M., Purnomo, S., Kim, J., & Choi, K. H. (2019). Effects of subanesthetic intravenous ketamine infusion on neuroplasticity-related proteins in the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus of Sprague-Dawley rats. *IBRO Reports*, 6, 87–94.
- Zhang, X.-M., & Luo, J.-H. (2013). GluN2A versus GluN2B: twins, but quite different. *Neuroscience Bulletin*, 29(6), 761–772.
- Zhou, W., Wang, N., Yang, C., Li, X.-M., Zhou, Z.-Q., & Yang, J.-J. (2014). Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists*, 29(7), 419–423.
- Zhu, S., & Paoletti, P. (2015). Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Current Opinion in Pharmacology*, 20, 14–23.
- Ziffra, M. (2021). Panic disorder: A review of treatment options. *Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*, 33(2), 124–133.
- Zimmermann, K. S., Richardson, R., & Baker, K. D. (2019). Maturation Changes in Prefrontal and Amygdala Circuits in Adolescence: Implications for Understanding Fear Inhibition during a Vulnerable Period of Development. *Brain Sciences*, 9(3).
- Zoellner, L. A., Roy-Byrne, P. P., Mavissakalian, M., & Feeny, N. C. (2019). Doubly Randomized Preference Trial of Prolonged Exposure Versus Sertraline for Treatment of PTSD. *The American Journal of Psychiatry*, 176(4), 287–296.
- Zorumski, C. F., Izumi, Y., & Mennerick, S. (2016). Ketamine: NMDA Receptors and Beyond. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(44), 11158–11164.
- Zushida, K., Sakurai, M., Wada, K., & Sekiguchi, M. (2007). Facilitation of extinction learning for contextual fear memory by PEPA: a potentiator of AMPA receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(1), 158–166.

8. PRILOZI

Биографија аутора

Емилија Главонић је рођена 04.03.1994. године у Београду. Основну школу и гимназију (природно-математички смер) завршава 2008., односно 2012. године са одличним успесима. По завршетку гимназије, уписује основне академске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду (модул Молекуларна биологија и физиологија), које завршава 2016. године са просечном оценом 9.64. Исте године наставља мастер академске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду (модул Експериментална биомедицина), који завршава са просечном оценом 10 и одбрањеним мастер радом под називом „Молекуларни механизми емоционалног условљавања у хипокампусу адолесцентних и адултних мишева оба пола“. Докторске академске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду (модул Експериментална неуробиологија), уписује 2017. године.

Од јануара 2018. године запослена је у лабораторији за Молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке „Винча“ – Института од националног значаја за Републику Србију. Експериментални део своје докторске дисертације је израдила у оквиру ангажовања на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја III41029 „Дефинисање кластера молекуларних биомаркера за побољшање и терапију поремећаја расположења“ под руководством др Мирослава Аџића. Од 01. јануара 2020. године, израду докторске тезе је наставила кроз ангажовање у оквиру Програма „Животна средина и здравље“ ИИН „Винча“ на теми „Преклиничка и клиничка испитивања психијатријских и неуродегенеративних болести“ под руководством др Мирослава Аџића.

Емилија Главонић је члан Друштва за неуронауке Србије и Европске федерације друштава за неуронауке (FENS), а њен истраживачки рад је фокусиран на изучавање молекулских механизма екстинкције страха код адолесцената и испитивање фармаколошких третмана за побољшање ефикасности овог процеса код адолесцентне популације. Емилија је до сада аутор 3 и коаутор још 3 рада публикована у међународним часописима, као и аутор или коаутор 10 саопштења са међународних скупова.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Емилија Б. Главонић**

Број индекса: **Б3010/2017**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетамином код адолесцентних мишева

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Емилија Б. Главонић**

Број индекса: **Б3010/2017**

Студијски програм: **Биологија**

Наслов рада: **Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетамином код адолесцентних мишева**

Ментори: **др Мирослав Ацић и проф. др Надежда Недељковић**

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетамином код адолесцентних мишева

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.