

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Bojan Batinić

**UTICAJ MODULACIJE GABA_A
RECEPTORA KOJI SADRŽE α 5
PODJEDINICU NA PROMENE
PONAŠANJA PACOVA PRENATALNO
IZLOŽENIH DEJSTVU
LIPOPOLISAHARIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Bojan Batinić

**THE INFLUENCE OF MODULATION
OF $\alpha 5$ SUBUNIT-CONTAINING GABA_A
RECEPTORS ON BEHAVIORAL
CHANGES IN RATS PRENATALLY
EXPOSED TO THE EFFECTS OF
LIPOPOLYSACCHARIDE**

doctoral dissertation

Belgrade, 2017

Mentor

Dr Miroslav Savić, redovni profesor

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor u penziji

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Dubravko Bokonjić, redovni profesor u penziji

Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije,

Univerzitet odbrane u Beogradu

Dr Bosiljka Plećaš-Solarević, redovni profesor

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

U Beogradu, _____

Istraživanja predstavljena u ovoj doktorskoj disertaciji sprovedena su na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za farmakologiju u okviru projekta 175076 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se

Mom mentoru prof. dr Miroslavu Saviću na izrazitoj predanosti u svim aktivnostima koje su doprinele realizaciji ove doktorske disertacije, na prenešenom znanju i iskustvu i dragocenom usmeravanju u istraživačkom radu.

Članovima komisije prof. dr Bosiljki Plećaš-Solarević, prof. dr Nenadu Ugrešiću i prof. Dubravku Bokonjiću na savetima i pomoći pri pisanju ove teze.

Prof. dr Vesni Pešić na ukazanom poverenju na Katedri za fiziologiju i podršci u planiranju i realizaciji mnogobrojnih aktivnosti.

Doc. dr Bojanu Markoviću i kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju na zalaganju u postavljanju metoda i interpretaciji rezultata u analitičkim eksperimentima .

Koleginicama Anji Santrač, Branki Divović, Mariji Milić, Tamari Stanković, Mariji Todosijević, Aleksandri Vidojević i kolegi Ivanu Jančiću na entuzijazmu i požrtvovanju u realizaciji svih ciljeva.

Istraživačima u laboratoriji prof. dr James M .Cook-a (Department of Chemistry, University of Wisconsin-Milwaukee, SAD) koji su sintetisali supstancu MP-III-022.

Dejanu Mitroviću i Danijeli Zrilić na pomoći u sprovođenju bihejvioralnih eksperimenata u vivarijumu.

Koleginicama Dušanki Stanić i Jeleni Petrović na pomoći u svakodnevnim aktivnostima na Katedri za fiziologiju.

Mojoj supruzi Nevenki i mojim roditeljima čija me ljubav i podrška prate na svim putevima.

SKRAĆENICE I AKRONIMI

5-HT – serotonin

ACh – acetil-holin

ADHD – hiperkinetički poremećaj pažnje (eng. *attention deficit hyperactivity disorder*)

ANOVA – analiza varijanse (statistički test)

CD14 – kluster diferencijacije 14 (eng. *cluster of differentiation 14*)

CNS – centralni nervni system

COX-2 – ciklooksigenaza 2 (eng. *cyclooxygenase*)

DA – dopamin

DAMP – molekularni obrasci u vezi sa oštećenjem (eng. *damage-associated molecular patterns*)

DAT – dopaminski transporter

DSTR – dorzalni strijatum

ELISA – imunoenzimski test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FR – fiziološki rastvor

GABA – γ -amino buterna kiselina (eng. *gamma-aminobutyric acid*)

GAD – glutamat dekarboksilaza (eng. *glutamic acid decarboxylase*)

Glu – glutamat

GPCR – receptori vezani za G proteine (eng. *G protein-coupled receptor*)

HESI – jonizacija sa zagrejanim elektrosprejom (eng. *heated electrospray ionization*)

IL-6 – interleukin 6

i.p. – intraperitonealno

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

KCC2 – K^+/Cl^- kotransporter

LBP – LPS vezujući protein (eng. *LPS binding protein*)

LC-MS/MS – tečna hromatografija uparena sa tandem masenom spektrometrijom (eng. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)

LPS – lipopolisaharid

MVL – Morisov vodeni lavirint

NA – noradrenalin

NAcc – nukleus akumbens

NKCC – $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransporter

NMDA – N-metil-D-aspartat

OP – otvoreno polje

PAM – pozitivni alosterni modulator

PAMP – molekularni obrasci u vezi sa patogenima (eng. *pathogen-associated molecular patterns*)

PFC – prefrontalni korteks

PGE2 – prostaglandin E2

Poly I:C – poliinozinska:policitidilna kiselina (eng. *polyinosinic:polycytidylic acid*)

PPI – prepulsna inhibicija

PRR – receptor koji prepoznaje obrazac (eng. *pattern recognition receptors*)

s.c. – supkutano

SNK – *Student–Newman–Keuls* (metod *post hoc* poređenja)

SOL – solvent

TAAR1 – *Trace amine-associated receptor 1* (eng.)

TLR – *Toll-like receptor* (eng.)

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*)

UPL – uzdignuti plus lavirint

VHPC – ventralni hipokampus

VMAT2 – vezikularni monoaminski transporter 2

Uticaj modulacije GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu na promene ponašanja pacova prenatalno izloženih dejstvu lipopolisaharida

Rezime

Epidemiološke studije dovele su u vezu prenatalno izlaganje efektima imune aktivacije izazvane virusnim, bakterijskim ili parazitskim infekcijama sa povećanim rizikom od nastanka neurorazvojnih poremećaja poput shizofrenije. Ova saznanja dovela su do razvoja animalnih modela prenatalne imune aktivacije sa ciljem da se u njima modeluju simptomi i patofiziološki mehanizmi relevantni za određena neurorazvojna oboljenja. Utvrđeno je da primena lipopolisaharida (LPS), imunogene komponente ćelijskog zida gram-negativnih bakterija, gravidnim ženkama glodara izaziva febrilni odgovor i indukciju više citokina, čime utiče na balans pro- i antiinflamatornih medijatora koji je neophodan za pravilan razvoj mozga fetusa.

U proučavanju etiologije shizofrenije akcenat je nedavno pomeren ka ispitivanjima poremećaja GABA-ergičkog sistema, a deficiti GABA-ergičke transmisije koji su zabeleženi kod pacijenata obolelih od shizofrenije nađeni su i u modelima prenatalne primene LPS-a gravidnim ženkama pacova. Od posebnog značaja za ispitivanja predstavljena u ovoj disertaciji stoje informacije da se vreme primene LPS-a u našem istraživanju poklapa sa periodom prvobitne ekspresije $\alpha 5$ GABA_A receptora u fetusnom mozgu pacova, kao i da prenatalna primena LPS-a u tim danima gestacije rezultira smanjenjem GABA-ergičke transmisije u hipokampusu potomaka u periodu preadolescencije. Otkrivanje ranih poremećaja u razvoju CNS-a leži u osnovi strategije prevencije razvoja shizofrenije i srodnih poremećaja, koja podrazumeva farmakološko delovanje na neurorazvojne promene u nastanku, pre ispoljavanja prvih simptoma.

U ovoj studiji, LPS (serotip O111:B4, *Escherichia coli*) je primenjivan gravidnim ženkama Wistar pacova 15. i 16. dana gestacije u dozi od 100 μ g/kg. Prenatalna inflamacija je detektovana kroz porast nivoa citokina TNF- α u krvi majke i placentalnom tkivu, i povećanje koncentracije IL-6 u krvi majke i amnionskoj tečnosti, dok fetusna neuroinflamacija posredovana ovim citokinima nije potvrđena. Ipak, istovremeno sa porastom koncentracije IL-6 u amnionskoj tečnosti zabeležen je porast nivoa GABA-e i smanjenje nivoa glutamata u fetusnim mozgovima. Ovaj disbalans u GABA-ergičkoj transmisiji odigrao se u vreme kada se u mozgu fetusa

pacova prvi put beleži ekspresija $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora. Opisana imuna aktivacija nije imala perzistentni karakter i kod odraslih pacova starosti 60 dana nisu registrovani povišeni nivoi TNF- α ili IL-6 u krvi ili moždanom tkivu. Bihevioralni efekti prenatalne primene LPS-s uočeni kod odraslih potomaka oba pola starosti 60 dana obuhvataju smanjenje spontane lokomotorne aktivnosti i aktivnosti indukovane primenom amfetamina u dozi 0.5 mg/kg (i.p.), dok su deficiti u prostornoj memoriji u testu Morisovog vodenog lavirinta i povećana bazična anksioznost registrovani samo kod muških potomaka starosti 60 dana.

U okviru pomenute strategije prevencije, a imajući u vidu da su naznake abnormalnosti u lokomotornoj aktivnosti pacova u našoj studiji primećene još u testiranju 40. postnatalnog dana, odlučili smo da hipotetisani deficit GABA-ergičkog sistema indukovani prenatalnom primenom LPS-a tretiramo u preadolescenciji, od 22. do 28. postnatalnog dana, dakle pre pojave prvih simptoma. U posebnoj studiji na pacovima starosti 22-28 dana utvrđen je povoljan farmakokinetički profil ponavljane i.p. primene liganda MP-III-022, pozitivnog selektivnog modulatora $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora, u dozi od 2 mg/kg/dan. Potencijacijom tonične inhibitorne transmisije posredovane $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptorima, ponavljanom primenom liganda MP-III-022 u kritičnom periodu preadolescencije, prevenirana je pojava deficita u lokomotornom odgovoru na amfetamin kod ženki prenatalno izloženih efektima primene LPS-a.

U okviru istraživanja koja se fokusiraju na ulogu GABA-ergičkog sistema u razvoju shizofrenije, primećeni izostanak pojedinih posledica prenatalne imune aktivacije, postignut farmakološkom modulacijom aktivnosti $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora, upućuje na novu metu istraživanja u strategiji preventivnih tretmana. Pozitivna modulacija GABA-ergičke transmisije u preadolescenciji, u periodu razvoja prvih prodroma, mogla bi da smanji rizik od kasnijeg javljanja shizofrenije.

Ključne reči: neurorazvojni poremećaji, shizofrenija, lipopolisaharid, neuroinflamacija, GABA, modulacija $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

UDK broj: 616-009.6:[577.175.8:616.891.8(043.3)]

The influence of modulation of $\alpha 5$ subunit-containing GABA_A receptors on behavioral changes in rats prenatally exposed to the effects of lipopolysaccharide

Abstract

Epidemiological studies have linked the exposure to the effects of maternal immune activation induced by viral, bacterial or parasitic infections, with the emergence of schizophrenia and several other neurodevelopmental disorders. These findings led to the development of animal models of prenatal immune activation designed to model symptoms and pathological mechanisms relevant to certain neurodevelopmental disorders. It has been shown that administration of lipopolysaccharide (LPS), an immunogen component of the cell wall of gram-negative bacteria, to pregnant rodents causes febrile response and cytokine induction, thus affecting the balance between pro- and anti-inflammatory mediators which is necessary for regular development of the fetal brain.

Within the studying of etiology of schizophrenia, a focus of investigation has recently been shifted to abnormalities observed in GABA-ergic system, and deficits of GABA-ergic transmission recorded in schizophrenia patients have also been found in rats tested in models of prenatal LPS administration. Some GABA-related findings are of special interest for investigation presented in this dissertation: the time of LPS administration in our protocol is the very time of primary expression of $\alpha 5$ GABA_A receptors in rat fetal brain, and prenatal LPS administration the selected days of gestation results in a decrease of GABA-ergic transmission in the hippocampus of preadolescent offspring. The discovery of early disturbances in the development of CNS underlies the strategy for prevention of schizophrenia and related disorders, which implies a pharmacological treatment of neurodevelopmental changes at their occurrence, before the manifestation of first symptoms.

In this study, LPS (serotype O111:B4, *Escherichia coli*) was administered to pregnant Wistar rats at 15th and 16th day of gestation, at the dose of 100 μ g/kg. Prenatal inflammation was detected via the elevation of TNF- α concentration in maternal blood and placenta, and IL-6 concentration in maternal blood and amniotic fluid, while fetal neuroinflammation mediated with these cytokines was not confirmed. Nevertheless, concurrently with the elevation of IL-6 concentration in amniotic fluid, a significant increase of GABA concentration and a decrease of glutamate occurred in

fetal brains. The observed disbalance in GABA-ergic transmission was detected in the period of primary expression of $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptors. The described immune activation was not persistent; increased concentration of TNF- α and IL-6 were not detected in the blood or brain tissue of adult rats at postnatal day 60 (P60). Behavioral effects of prenatal LPS administration observed in adult offspring of both genders include the decrease of spontaneous locomotor activity and activity induced by administration of amphetamine dosed at 0.5 mg/kg (i.p.), while deficits of spatial memory in Morris water maze and increased level of basal anxiety were detected only in male adult offspring.

Within the preventive strategy, and having in mind that first hints of locomotor deficits were observed at P40, we decided that hypothesized GABA-ergic deficit induced by prenatal LPS administration, should be treated in the period of preadolescence, from P22 to P28, before the emergence of first symptoms. In a separate study, we determined the favorable pharmacokinetic profile of repeated administration of MP-III-022, a positive selective modulator of $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptors, dosed at 2 mg/kg/day. By potentiating the tonic inhibitory neurotransmission mediated via $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptors, in the critical preadolescent period, we prevented the manifestation of deficit in locomotor response to amphetamine in LPS females.

Within the research focusing on the role of GABA-ergic system in the development of schizophrenia, the observed absence of some consequences of prenatal immune activation, achieved by pharmacological modulation of $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptors' activity, suggests the new target for investigation in the strategy of preventive treatments. Positive modulation of GABA-ergic neurotransmission in preadolescence, the period of initial prodromes occurrence, might reduce a risk of latter emergence of schizophrenia.

Key words: neurodevelopmental disorder, schizophrenia, lipopolysaccharide, neuroinflammation, GABA, modulation of $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptors

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Pharmacology

UDC N°: 616-009.6:[577.175.8:616.891.8(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Prenatalna inflamacija i neurorazvojni poremećaji	2
1.2. Animalni modeli prenatalne inflamacije i neurorazvojnih poremećaja	4
1.3. Lipopolisaharid.....	6
1.4. Modeli prenatalne primene lipopolisaharida.....	10
1.5. GABA i GABA _A receptori	13
1.6. α5GABA _A receptori	15
1.7. Prenatalni i postnatalni razvoj GABA-ergičkog sistema	16
1.8. Poremećaji GABA-ergičkog sistema u shizofreniji i animalnim modelima.....	19
1.9. Mehanizam dejstva amfetamina i dizocilpina	20
1.10. Bitna svojstva liganda MP-III-022	21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	23
3. MATERIJALI I METODE	24
3.1. Životinje	24
3.2. Supstance.....	24
3.3. Primena lipopolisaharida.....	24
3.4. Primena MP-III-022	25
3.5. Protokoli analitičkih eksperimenata	25
3.5.1. Kvantifikacija citokina	25
3.5.2. Kvantifikacija neurotransmitera	26
3.5.3. Ispitivanje kinetike ponavljene primene MP-III-022	27
3.6. Protokoli bihejvioralnih eksperimenata	27
3.6.1. Test spontane i indukovane lokomotorne aktivnosti	27
3.6.2. Test otvorenog polja	28
3.6.3. Uzdignuti plus lavirint	29

3.6.4. Morisov vodeni lavirint	29
3.6.5. Test socijalne interakcije	31
3.7. Vremenski tok eksperimenata	31
3.8. Statistička obrada rezultata.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Prvi set eksperimenata.....	34
4.1.1. Efekti primene lipopolisaharida na spontanu lokomotornu aktivnost	34
4.1.2. Efekti primene lipopolisaharida na spontanu i dizocilpinom indukovanu lokomotornu aktivnost.....	34
4.2. Drugi set eksperimenata	39
4.2.1. Kvantifikacija citokina u tkivima ženki i fetusa	39
4.2.2. Kvantifikacija citokina u tkivima odraslih pacova	39
4.2.3. Kvantifikacija neurotransmitera u moždanom tkivu fetusa.....	39
4.2.4. Efekti primene lipopolisaharida na spontanu i amfetaminom indukovanu lokomotornu aktivnost.....	41
4.2.5. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u testu socijalne interakcije	44
4.2.6. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u Morisovom vodenom lavirintu.....	45
4.2.7. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u testu otvorenog polja	52
4.2.8. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u uzdignutom plus lavirintu	53
4.3. Treći set eksperimenata.....	56
4.3.1. Kinetika ponavljane primene MP-III-022	56
4.3.2. Efekti primene lipopolisaharida i liganda MP-III-022 na spontanu i amfetaminom indukovanu lokomotornu aktivnost.....	57
4.3.3. Efekti primene lipopolisaharida i liganda MP-III-022 na ponašanje u uzdignutom plus lavirintu	60

4.3.4. Efekti primene lipopolisaharida i liganda MP-III-022 na ponašanje u Morisovom vodenom lavirintu	61
4.3.5. Kvantifikacija neurotransmitera u moždanom tkivu odraslih pacova	62
5. DISKUSIJA	65
5.1. Efekti primene lipopolisaharida	66
5.1.1. Aktivacija imunog odgovara	67
5.1.2. Status citokina u tkivima odraslih životinja	68
5.1.3. Disbalans neurotransmitera u fetusnom mozgu.....	69
5.1.4. Deficit spontane i amfetaminom indukovane lokomotorne aktivnosti.....	70
5.1.5. Deficit prostorne memorije.....	76
5.1.6. Promene u socijalnoj interakciji	78
5.1.7. Anksioznost u eksploraciji.....	79
5.2. Odabir doze MP-III-022.....	81
5.3. Efekti primene MP-III-022 na deficit u amfetaminom indukovanoj lokomotornoj aktivnosti	81
5.4. Promene u koncentraciji neurotransmitera u mozgu odraslih pacova.....	82
5.5. Opšta diskusija	83
6. ZAKLJUČCI.....	85
7. REFERENCE.....	87

1. UVOD

Epidemiološke studije dovele su u vezu prenatalno izlaganje efektima imune aktivacije izazvane virusnim, bakterijskim ili parazitskim infekcijama sa povećanim rizikom od razvoja pojedinih psihijatrijskih i neuroloških oboljenja, poput shizofrenije (Brown i Derkits, 2010), autizma (Wilkerson, 2002), cerebralne paralize (Wu, 2002), kao i epilepsije, Parkinsonove bolesti i Alchajmerove bolesti (Knuesel i sar., 2014). Ova saznanja su ukazala na potrebu razvoja prekliničkih animalnih modela navedenih neurorazvojnih poremećaja, sa akcentom na etiologiji vezanoj za pomenute faktore rizika i očekivanjima da modeli dostignu visok stepen validnosti sličnosti, kao i konstruktivne i prediktivne validnosti. Razvijeni su modeli sistemske gestacione inflamacije u glodara koji u relativno kratkom vremenskom periodu mogu pružiti informacije o prirodi i trajanju imune aktivacije tokom gestacije, eventualnoj perzistenciji inflamacije, kao i morfološkim, funkcionalnim i bihevioralnim promenama kod potomaka. U modelovanju bakterijskih infekcija, kao faktora rizika u razvoju shizofrenije, koristi se lipopolisaharid (LPS), komponenta zida gram-negativnih bakterija čija primena u periodu gestacije izaziva kod gravidnih ženki glodara febrilni odgovor i indukciju proinflamatornih citokina. Postulirano je da aktivacija imunog sistema majke izaziva poremećaj balansa između pro- i antiinflamatornih citokina fetusa, koji je neophodan za pravilan razvoj nervnog sistema (Meyer i sar., 2009).

U izučavanju etiologije shizofrenije akcenat je postepeno pomeran ka konceptu preplitanja uticaja genetskih faktora i faktora rizika iz okruženja na nivou transmisije posredovane γ -aminobuternom kiselinom (eng. *γ -aminobutyric acid*, GABA) kao glavnim inhibitornim neurotransmiterom (Schmidt i Mirnics, 2015). Dok je kod pacijenata obolelih od shizofrenije zabeležena redukcija nivoa iRNK i proteina glutamat-dekarboksilaze (eng. *glutamic acid decarboxylase*, GAD) 67, enzima koji konvertuje glutamat u GABA-u (npr. Benes i sar., 2007) i relina (npr. Eastwood i Harrison, 2006), konstruktivna validnost modela prenatalne primene LPS-a gravidnim ženka pacova potvrđena je nalazom redukovane imunoreaktivnosti neurona koji ekspimiraju GAD67 i relin u hipokampusu potomaka (Nouel i sar., 2012).

GABA_A receptori koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu ($\alpha 5$ GABA_A receptori) predstavljaju podtip jonotropnih receptora za GABA-u osetljivih na modulatorno dejstvo benzodiazepina, koji su posebno istaknuto prisutni u hipokampusu, gde pokazuju specifične obrasce makro- i mikrolokalizacije, dok su njihove funkcije još uvek u fokusu istraživanja. Od posebnog značaja za ispitivanja koja će biti predstavljena u ovoj disertaciji stoje izveštaji o ranoj ekspresiji $\alpha 5$ GABA_A receptora i posledicama prenatalne primene LPS-a na GABA-ergičku transmisiju. Prvi izveštaj je deo studije u kojoj je prijavljeno da se prvobitna ekspresija GABA_A receptora u hipokampusu fetusnog mozga pacova dešava između 14. i 17. dana embrionalnog razvića (Laurie i sar., 1992), u periodu gestacije kada se, po protokolu korišćenom u ovim ispitivanjima, primenom LPS-a izaziva sistemska prenatalna inflamacija. U drugoj studiji od interesa, prenatalna primena LPS-a po protokolu veoma sličnom onom koji je korišćen u našoj studiji, rezultirala je smanjenjem GABA-ergičke transmisije u hipokampusu potomaka starosti 14 i 28 dana (Nouel i sar., 2012). Jedna od predloženih strategija prevencije razvoja shizofrenije i srodnih poremećaja podrazumeva delovanje na neurorazvojne promene u nastanku, pre ispoljavanja prvih simptoma (Meyer i Feldon, 2010). U okviru takve strategije opaženi deficiti GABA-ergičke transmisije mogli bi se prevenirati ponavljanom primenom pozitivnih alosternih modulatora (PAM) GABA_A receptora. Dodatno, otkrića u oblasti sinteze liganada za benzodiazepinsko mesto vezivanja GABA_A receptora pružaju mogućnost da takva modulacija bude izvedena selektivno na nivou određenog podtipa GABA_A receptora. U ispitivanjima koja će u nastavku biti predstavljena korišćen je MP-III-022, novosintetisani ligand selektivnog afiniteta i efikasnosti za $\alpha 5$ GABA_A receptore (Stamenić i sar., 2016).

1.1. Prenatalna inflamacija i neurorazvojni poremećaji

U osnovi nekih psihijatrijskih i neuroloških oboljenja leže rani poremećaji u razvoju mozga koji se često dešavaju mnogo pre prvih manifestacija simptoma. Faktori rizika za nastanak neurorazvojnih poremećaja pored genetskih obuhvataju i prenatalne i postnatalne uticaje spoljašnje sredine, a postoje i dokazi o interakciji svih nabrojanih faktora. Od prenatalnih faktora rizika značajni su pušenje, konzumiranje alkohola i droga, unošenje toksina, zatim nedostaci i poremećaji u ishrani, psihički stres i infekcije tokom trudnoće (Schlotz i Phillips, 2009). Aktivacija imunog sistema majke

u trudnoći usled izlaganja virusnim, bakterijskim i parazitskim infekcijama prepoznata je u epidemiološkim studijama kao faktor rizika za razvoj shizofrenije (O'Callaghan i sar., 1994; Suvisaari i sar., 1999; Brown i Derkits, 2010). Slično, etiologija autizma, za koju se ranije smatralo da ima genetsku osnovu, remodelovana je i izlaganje imunoj aktivaciji majke u trudnoći je prepoznato kao jedan od bitnih faktora rizika (Atladóttir i sar., 2010; Goines i sar., 2011, Wilkerson, 2002). Smatra se da ova oboljenja, kao i Parkinsonova i Alchajmerova bolest, cerebralna paraliza, multipla skleroza i epilepsija dele zajedničke prenatalne etiološke faktore i neke od primarnih mehanizama pokretanja poremećaja (Knuesel i sar., 2014).

Brown i Derkits (2010) su sumirali nalaze epidemioloških studija baziranih na vremenskom i/ili prostornom preklapanju podataka o epidemijama zaraznih bolesti sa podacima o povećanoj incidenciji razvoja shizofrenije u populaciji, kao i nalaze studija znanovanih na izveštajima majki koje su prijavile oboljevanje od virusa influence ili razvoj neke druge virusne infekcije tokom trudnoće. Nedostatak prve vrste studija je taj što one ne pružaju jasne dokaze o razvoju virusne infekcije u majki kod čije je dece kasnije u životu postavljena dijagnoza ovog poremećaja, dok se studije koje su zasnovane na izveštajima majki koje su preležale infekciju influence suočavaju sa mogućnošću netačnog postavljanja dijagnoze infektivne bolesti. Nešto pouzdanijim smatraju se studije zasnovane na sačuvanim izveštajima iz zdravstvenih ustanova, i jedna od takvih studije dovela je u vezu povećanu incidenciju razvoja shizofrenije i prenatalno izlaganje bakterijskim infekcijama (Sørensen i sar. 2009). Kako sagledane studije predstavljaju dragocene, ali ne naročito pouzdane izvore, Brown i Derkits (2010) su istakli i značaj seroloških studija koje su dizajnirane tako da prikupe jasne podatke o nalazima biomarkera inflamacije u majki tokom trudnoće i prate eventualni razvoj psihičkih poremećaja tokom odrastanja potomstva (Brown i sar., 2004; Mortensen i sar., 2007; Xiao i sar., 2009).

U kontekstu značaja prenatalne inflamacije kao faktora rizika kod pacijenata obolelih od shizofrenije za koje je pouzdano utvrđeno da su prenatalno bili izloženi efektima aktivacije imunog sistema majke, primećeno je da su kognitivni deficiti bili izraženiji u odnosu na pacijente čije etiologija bolesti nije uključivala izlaganje infekcijama u gestacionom periodu (Brown i sar., 2009). Dodatno, opažena je i značajna interakcija prenatalnog izlaganja efektima aktivacije majčinog imunog

sistema i drugog bitnog etiološkog faktora, porodične istorije oboljevanja od shizofrenije (Clarke i sar., 2009). Pregled epidemioloških studija ukazuje i na to da prvi i drugi trimestar humane gestacije, više nego treći, predstavljaju periode u kojima izlaganje infekcijama i pratećoj imunoj aktivaciji povećava rizik od kasnijeg razvoja psihotičnih poremećaja (Boksa, 2010), što je podatak od posebnog značaja za dizajniranje prekliničkih animalnih modela prenatalne inflamacije.

1.2. Animalni modeli prenatalne inflamacije i neurorazvojnih poremećaja

Zapažanja iz navedenih epidemioloških studija ukazala su na potrebu pribavljanja novog nivoa dokaza o povezanosti prenatalne inflamacije i nastanka shizofrenije i drugih neurorazvojnih poremećaja. Krenulo se sa razvojem prekliničkih animalnih modela sistemske inflamacije tokom gestacije, koji u relativno kratkom vremenskom periodu mogu pružiti informacije o prirodi i trajanju imune aktivacije u gestaciji, kao i o eventualnoj perzistenciji inflamacije i morfološkim, funkcionalnim i bihevioralnim promenama kod potomaka. U modelima se za sada prevashodno koriste laboratorijski sojevi pacova i miševa, ali se od ovih modela očekuje visok stepen validnosti sličnosti, kao i konstruktivne i prediktivne validnosti (Meyer i Feldon, 2010). Pod validnošću sličnosti u animalnim modelima podrazumeva se značajno preklapanje bihevioralnih abnormalnosti opaženih u testiranju životinja sa određenim simptomima kod pacijenata, kao i etiološke sličnosti u razvoju fenotipa u modelu i humanoj patologiji. Konstruktivna validnost podrazumeva podudaranje patofizioloških mehanizama koji leže u osnovi poremećaja u animalnom modelu i odgovarajućeg poremećaja kod ljudi, dok prediktivna validacija, u užem smislu, upućuje na preklapanje efekata farmakoloških intervencija.

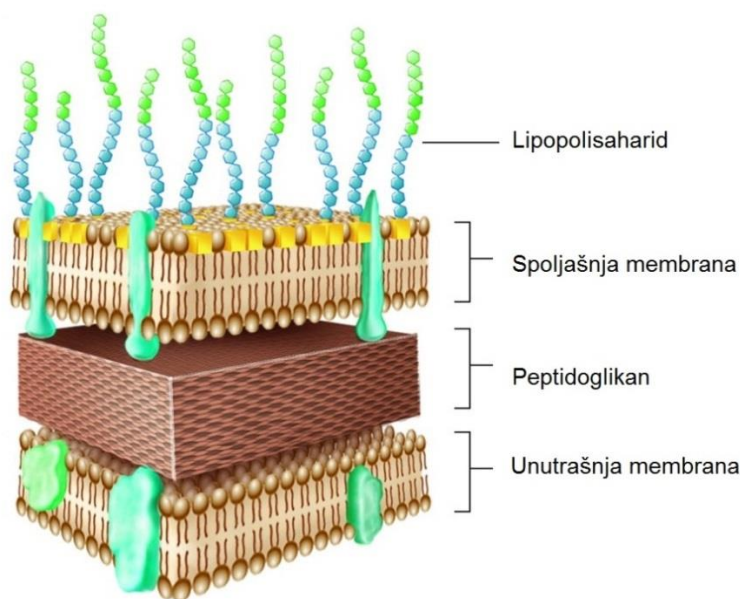
Kako bi se izazvao sistemski imuni odgovor, gravidne ženke glodara se tokom perioda gestacije izlažu bakterijskim ili virusnim imunogenima, a primenjuju se i hemijski agensi koji izazivaju inflamaciju ili sami medijatori inflamacije (Harvey i Boksa, 2012). Od bakterijskih imunogena koristi se lipopolisaharid (LPS), komponenta ćelijskog zida gram-negativnih bakterija, dok se pri modelovanju virusnih infekcija primenjuje poliinozinska-policitidilna kiselina (poly I:C) ili sam virus influence. Iako se ovi imunogeni agensi vezuju za različite receptore koji prepoznaju molekulske obrasce patogena, LPS za TLR4 (eng. *Toll-like receptor 4*) na površini ćelije, a poly I:C za TLR3 unutar ćelije, različiti putevi aktivacije imunog

odgovora rezultuju sistemskom indukcijom interleukina 6 (IL-6) (Boksa, 2010). Stoga se od medijatora inflamacije primenjuje i sam IL-6 kao proinflamatorni citokin, a njegovo sistemsko oslobađanje moguće je izazvati i primenom hemijskog agensa turpentina (Boksa, 2010).

Pri pregledu mnoštva modela, validiranih u većoj ili manjoj meri, ne može se naći jasna veza između izbora nekog imunogena, njegove doze ili vremena njegove primene i specifičnosti promena kod potomaka, u cilju kreiranja modela karakterističnog za određeni neurorazvojni poremećaj. Tako su, na primer, bihevioralne i funkcionalne promene povezane sa patologijom shizofrenije dobijene kako u modelima u kojima je LPS u relativno visokoj dozi (1 mg/kg) primenjivan kontinuirano tokom celog ili velikog dela gestacionog perioda (Borrell i sar., 2002; Basta-Kaim i sar., 2015), tako i u studijama sa dvodnevnom primenom umerene doze LPS-a (0,1 mg/kg) u kasnoj gestaciji (Fortier i sar., 2004), ili pak u modelima u kojima je poly I:C primenjen jednokratno u kasnoj gestaciji (Bitanirwe i sar., 2010). Izazivanjem prenatalne inflamacije u glodara postiže se modelovanje infekcija koje se u ljudi dešavaju tokom prva dva trimestra trudnoće, jer se mozak miša ili pacova na kraju gestacionog perioda (20-22 dana) nalazi na stepenu razvoja na kome se mozak humanog fetusa nalazi sredinom drugog trimestra trudnoće (Clancy i sar., 2001, 2007). Kako bi se modelovala inflamacija u kasnoj humanoj gestaciji (poslednji trimestar) postavljeni su i modeli u kojima se imunogeni agensi primenjuju u prvim danima postnatalnog života glodara (npr. Jenkins i sar., 2009), a procenjeno je da mozak glodara dostiže stepen razvoja ekvivalentan onom u novorođenčeta do 10. dana postnatalnog života glodara (Clancy i sar., 2001, 2007). Dalje, put aplikacije bitno utiče na prirodu, intenzitet i trajanje imunog odgovora, i do sada su postavljeni modeli u kojima se imunogeni agensi primenjuju gravidnim ženkama glodara supkutano, intraperitonealno, intravenski, intranazalno, intracervikalno, ili čak i intraamnijski. Dobar primer specifičnosti puta primene predstavlja intracervikalna ili intraamnijska primena LPS-a, koji inače ne prolazi placentalnu barijeru (Ashdown i sar., 2006), pa se pri ovakvoj primeni može očekivati pokretanje specifičnih mehanizama inflamacije u poređenju s drugim putevima aplikacije istog agensa. Značaj izbora doze imunogena, kao i vremena i puta njegove primene, u svetlu prirode i intenziteta imunog odgovora, biće razmatran detaljnije u delu uvoda posvećenom modelima prenatalne primene LPS-a.

1.3. Lipopolisaharid

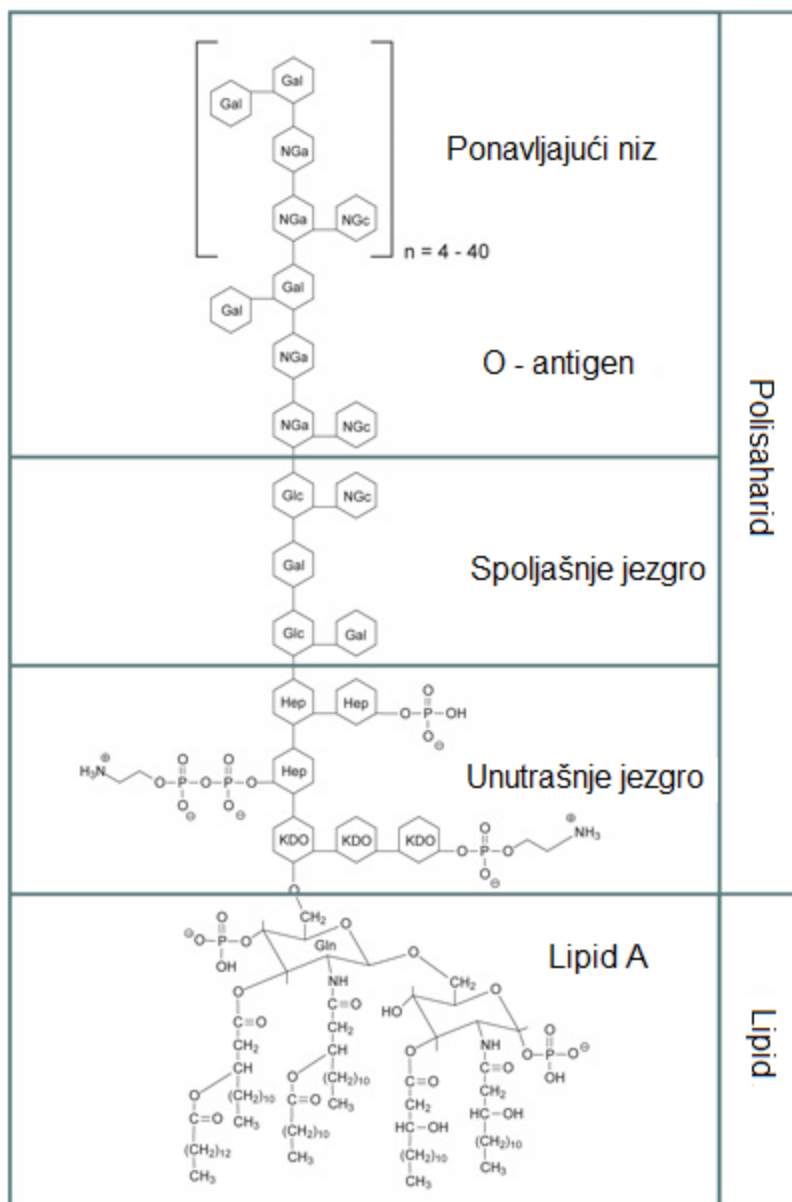
Lipopolisaharid (LPS) predstavlja komponentu ćelijskog zida gram-negativnih bakterija. Gram-negativne bakterije imaju troslojni ćelijski omotač koji se sastoji iz unutrašnje ili plazma-membrane, ćelijskog zida izgrađenog iz peptidoglikana i spoljašnje membrane na čijoj površini se nalaze izloženi molekuli LPS-a (**Slika 1**). Za razliku od njih, gram-pozitivne bakterije nemaju spoljašnju membranu i na njihovoj površini uglavnom nema molekula LSP-a. U inicijalnim istraživanjama toksičnih efekata bakterija, Richard Friedrich Johannes Pfeiffer je označio delovanje LPS-a kao delovanje „endotoksina“ za koje je, za razliku od „egzotoksina“, smatrao da se ne oslobađaju sa površine bakterijske ćelije osim u slučaju oštećenja membrane. Kasnije je pokazano da je LPS sastavni deo spoljašnjih membranskih vezikula uz pomoć kojih bakterije međusobno razmenjuju DNK i RNK materijal, proteine i endotoksine, a i da oslobađanje LPS-a na ovaj način u organizmu domaćina može izazvati imuni odgovor.



Slika 1. Ćelijski zid gram-negativnih bakterija sa molekulima lipopolisaharida na spoljašnoj membrani. Preuzeto i prilagođeno sa: <https://blogs.brandeis.edu/flyonthewall/breaking-research-a-method-by-which-invading-bacteria-avoid-detection-could-also-be-our-key-to-defeating-them/>

LPS se sastoji iz lipida A, hidrofilnog jezgra i O-antigena, ukupne težine 10-20 kDa (**Slika 2**). Lipid A je kompleks fosforilisanog glikozamin-disaharida sa

molekulima masne kiseline koje ceo kompleks LPS-a vezuju za fosfolipide membrane. Upravo lipid A predstavlja toksičnu komponentu LPS-a i prilikom lize bakterijskih ćelija od strane imunog sistema domaćina, lipid A oslobođen u fragmentima membrane može izazvati groznicu, dijareju i endotoksični šok. Hidrofilno jezgro sadrži heptoze i 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonsku kiselinu (DKO). Hidrofilno jezgro sadrži heptoze i 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonsku kiselinu (DKO).



Slika 2. Sastavni delovi strukture lipopolisaharida: hidrofobni Lipid A, hidrofilno oligosaharidno jezgro, i hidrofilni oligosaharidni ponavljajući niz (O-antigen). DKO: 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonska kiselina; Hep: heptaza; NGa: galaktozamin; NGc: glukozaamin. Preuzeto i prilagođeno sa: <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html>

O-antigen se sastoji iz ponavljajućeg niza hidrofilnih oligosaharida i predstavlja spoljašnji domen LPS molekula. LPS čiji O-antigen ima kraće lance naziva se još i „grubi“ LPS (eng. *rough LPS*) dok je onaj koji ima duže lance O-antigena „glatki“ LPS (eng. *smooth LPS*). Antitela domaćina prepoznaju upravo O-antigene a njihova struktura varira u zavisnosti od soja bakterija i otkriveno je da različiti sojevi samo jedne vrste bakterije *E. coli* produkujju oko 160 različitih O-antigena (Raetz i Whitfield, 2002). O-antigen, koji se smatra najbitnijim, u kombinaciji sa K-antigenom (antigen kapsule) i H-antigenom (flagelin) određuju serotip u okviru jedne bakterijske vrste, pa je na primer, kombinacija O111:K58:H2 registrovana kao serotip *E. coli* O111:B4. Zbog razlika u biološkoj aktivnosti različitih O-antigena, pri sprovođenju eksperimenata u kojima se LPS-om izaziva imuni odgovor neophodno je voditi računa o izboru i konzistentnom korišćenju jednog serotipa (Akarsu i Mamuk, 2007), a Harvey i Boksa (2012) su sugerisali da se razlike u biološkoj aktivnosti LPS-a poreklom od istog serotipa *E. coli* mogu javiti čak i između različitih šarži istog proizvođača. Iz evolutivne perspektive, smatra se je da raznovrsnost strukture O-antigena osnova uspešnog izbegavanja odgovora domaćina. O-antigen pruža bakteriji zaštitu od dejstva žučnih kiselina i nekih antibiotika, pa tako spoljašnja membrana bakterije čiji molekuli LPS-a imaju kraće lance O-antigena ima slabiju zaštitu od hidrofobnih antibiotika.

LPS izaziva aktivaciju urođenog imunog odgovora preko CD14/TLR4/MD2 receptorskog kompleksa koji je ispoljen na monocitima, dendritičkim ćelijama, makrofagama, B limfocitima i još nekim ćelijama. CD14 (eng. *cluster of differentiation 14*) i TLR4 pripadaju receptorima koji prepoznaju obrazac (eng. *pattern recognition receptors*, PRR), tačnije receptorima koji prepoznaju molekulske obrasce patogena (eng. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Njima u prepoznavanju O-antigena LPS-a pomažu MD2 molekul koji predstavlja koreceptor TLR4 i protein koji vezuje LPS (eng. *LPS binding protein*, LBP) i prezentuje ga navedenim receptorima. Smatra se da postoje dva puta aktivacije urođenog imunog odgovora LPS-om, u zavisnosti od tipa LPS-a koji pokreće aktivaciju i prisutnih receptora. Grubi LPS može aktivirati TLR4 i bez aktivacije CD14 receptora, pri čemu se pokreće signalni put koji rezultira transkripcijom tumorskog faktora nekroze (eng. *tumor necrosis factor*, TNF), dok glatki LPS zahteva aktivaciju CD14 receptora i u njegovom prisustvu može doći do aktivacije puta koji rezultira transkripcijom

interferona β (IFN- β) ili koaktivacije TLR4 i prvog puta (Godowski, 2005). Sugerisano je i da zbog šire rasprostranjenosti TLR4 naspram CD14 receptora, gde su ovi poslednji eksprimirani samo na makrofagama, neutrofilima i dendritskim ćelijama, grubi LPS može aktivirati veći broj ćelija i izazvati potentniji imuni odgovor (Godowski, 2005). Sistemska imuna aktivacija u odgovoru na prisustvo LPS-a obuhvata transkripciju i oslobađanje proinflammatoryh citokina, među kojima su najzastupljeniji IL-1, IL-6 i TNF- α (Luheshi, 1998). IL-1 i TNF- α nastaju lokalno na mestu pokretanja imunog odgovora i deluju na fibroblaste i endotelne ćelije koje dodatno produkuju ove citokine, kao i IL-6. Cirkulišući IL-6 indukuje u hipotalamusu sintezu prostaglandina (PG) posredovanu ciklooksigenazom 2 (eng. COX-2), a PGE2 deluje na termosenzitivne neurone hipotalamusa, što dovodi do povećanja telesne temperature (Roth i sar., 2009). Prisustvo LPS-a u krvi može dovesti do septičkog šoka u slučaju izraženog imunog odgovora i naziva se endotoksemija.

LPS, kao agens koji izaziva sistemski imuni odgovor, našao je široku primenu u prekliničkim animalnim modelima, a u zavisnosti od modelovane patologije aplikacija LPS-a može biti prenatalna ili postnatalna. Primena LPS-a gravidnim ženkama glodara, sa varijacijama u vremenu i putu primene, koristi se u modelovanju shizofrenije, o čemu će kasnije biti više reči, ali i cerebralne paralize i Parkinsonove bolesti. Pri modelovanju cerebralne paralize LPS se najčešće primenjuje intrauterino kako bi izazvao prevremeni porođaj koji predstavlja jedan od faktora rizika za razvoj ovog poremećaja (npr. Bell i Hallenbeck, 2002). Intraperitonealna primena LPS-a gravidnim ženkama sredinom gestacionog perioda dovela je do smanjenja broja dopaminergičkih neurona i perzistentne inflamacije u odraslih, što je poslužilo za postavljanje modela Parkinsonove bolesti (Ling i sar., 2002, 2006, 2009). S druge strane, postnatalna aplikacija LPS-a se koristi u modelovanju depresivnog ponašanja ili proučavanju uticaja inflamacije na razvoj epileptičnih stanja. Pokazano je da inflamacija izazvana primenom LPS-a može indukovati depresivno ponašanje kod miševa (O'Connor i sar., 2009; Couch i sar., 2016) ili povećati podložnost epileptičkim napadima koji se ekperimentalno indukuju agensima poput litijum-pilokarpina ili kainske kiseline, i doprineti povećanju obima oštećenja koja nastaju prilikom napada (Auvin i sar., 2007).

1.4. Modeli prenatalne primene lipopolisaharida

Ubedljivu sliku o spektru mogućih posledica prenatalne aplikacije LPS-a pružila je studija u kojoj je nakon primene samo jedne doze LPS-a (250 µg/kg) 15. dana gestacije zabeležen poremećaj regulacije 3285 gena u mozgu pacova i obimna nishodna regulacija ekspresije gena kritičnih za neurorazvoj (Oskvig i sar., 2012). U ovom delu uvoda biće iznet kratak pregled najbitnijih nalaza iz studija koje su koristile modele prenatalne primene LPS-a. Ovi nalazi obuhvataju imunološka zbivanja u organizmu majke i fetusa, i bihevioralne i funkcionalne promene u mladunaca koji su bili izloženi efektima aktivacije imunog sistema majke.

Ashdown i sar. (2006) su pokazali da LPS kao intaktan makromolekul ne prolazi placentalnu barijeru, već da svoje efekte ostvaruje posredno preko aktivacije imunog sistema majke, dok su Meyer i sar. (2009) izneli hipotezu po kojoj indukcija citokina u tkivima fetusa posredovana aktivacijom imunog sistema majke, odnosno poremećaj balansa između pro- i antiinflamatornih citokina u mozgu fetusa, predstavlja konkretni mehanizam koji izaziva neurorazvojne poremećaje u mozgu fetusa. Kada je LPS obeležen radioaktivnim jodom (¹²⁵I-LPS) i primenjen intraperitonealno, već nakon sat vremena registrovan je u krvi i pojedinim tkivima gravidne ženke pacova, a nakon 2 h i u placenti, dok u fetusu prisustvo ¹²⁵I-LPS nije registrovano ni nakon 8 h (Ashdown i sar., 2006). U istoj studiji umereno niska doza LPS-a (50 µg/kg, O111:B4, *E. coli*) dovela je do indukcije citokina TNF-α, IL-1β i IL-6 u krvi majke i placenti kao i IL-1β u plazmi fetusa, dok u mozgu fetusa, u ispitivanom periodu do 8 h nakon administracije LPS-a, autori nisu prijavili značajno povećanje koncentracija nijednog ispitivanog citokina (Ashdown i sar., 2006). Povećane koncentracije citokina u moždanom tkivu fetusa jesu registrovane u nekim modelima, ali nakon primene znatno viših doza LPS-a (250-2500 µg/kg) različitih serotipova (Urakabo i sar., 2001; Cai i sar., 2002; Oskvig i sar., 2012). Ovde treba napomenuti da je pri primeni visokih doza LPS-a zabeležen i redukovan broj okota mladunaca, pa su na primer, Cai i sar. (2002) prijavili da je samo 9 od 20 ženki tretiranih LPS-om u dozi od 500 µg/kg, uspešno okotilo mladunce. Ovaj problem je sagledan i u studiji u kojoj je praćen stepen preživljavanja gravidnih ženki i mladunaca u zavisnosti od doze LPS-a i vremena administracije, gde je zapaženo da čak i doza od 100 µg/kg primenjena 10. i 11. dana gestacije izaziva smanjenje stepena preživljavanja ženki, a da je pri primeni 18. i 19. dana gestacije dovela do toga da

nijedna od tretiranih ženki nije okotila žive mladunce (Fortier i sar., 2007). Ipak, u istoj studiji, doza od 100 µg/kg LPS-a primenjivana gravidnim ženkama 15. i 16. dana gestacije nije dovela do pomenutih gubitaka (Fortier i sar., 2007), i ova doza i vreme primene korišćeni su i u modelu na kome su vršena naša ispitivanja.

Manji broj studija je pratio citokinski status kod odraslih jedinki koje su prenatalno bile izložene efektima primene LPS-a, i u tkivima odraslih životinja povišene koncentracije citokina prijavljene su samo u protokolima sa izrazito visokom dozom LPS-a (1-2 mg/kg) (Borrell i sar., 2002; Romero i sar., 2010). Ovi nalazi, bilo pozitivni bilo negativni, mogu značajno doprineti tumačenju promena u modelu i to u svetlu hipoteze po kojoj akutna fetusna neuroinflamacija može doprineti razvoju patoloških odlika zajedničkih za shizofreniju i autizam, dok dalji tok inflamacije može voditi diferencijaciji mehanizama specifičnih za pomenute poremećaje, pa je tako predloženo da latentna neuroinflamacija vodi razvoju shizofrenije, a perzistentna nastanku autizma (Meyer i sar., 2011).

Bihevioralne i funkcionalne promene zabeležene u modelima prenatalne primene LPS-a su obimne i ponekad protivurečne, i njihovo tumačenje zahteva detaljno upoznavanje sa protokolima primene LPS-a, kao i eksperimentalnim procedurama i interpretacijom rezultata. Značajnu analizu statističkog pristupa obradi bihevioralnih rezultata dali su autori Lazic i Essioux (2013), koji su skrenuli pažnju na efekat legla prisutan u svim modelima prenatalne primene, a koji na vrednosti analiziranih parametara može uticati i više od samog prenatalnog tretmana. Ipak, promene uočene u znatnom broju studija na glodarima prenatalno izloženim efektima primene LPS-a konzistentne su sa onim registrovanim kod pacijenata obolelih od shizofrenije (Boksa, 2010). Sa aspekta humane patologije, simptomi u shizofreniji su dobro opisani i klasifikovani kao pozitivni (sumanutost, poremećaji misli i govora, kao i taktilne, vizuelne, slušne i olfaktorne halucinacije), negativni (manjak emocija, siromaštvo govora, smanjena motivacija i socijalizacija) i kognitivni (poremećaji pažnje i učenja, formiranja radne i epizodne memorije, kao i semantičkog procesuiranja i verbalne deklarativne memorije). Međutim, imajući u vidu da su mnogi od ovih simptoma karakteristični i za druga oboljenja, validacija nekog animalnog modela kao modela shizofrenije time je dodatno otežana. Jedan od karakterističnih nalaza u pacijenata sa shizofrenijom je smanjenje senzorno-motorne filtracije stimulusa (eng. *sensorimotor gating*) (Ludewig i sar., 2003) koja se kod

Tabela 1. Pregled nalaza bihejvioralnih promena kod pacova koji su prenatalno bili izloženi efektima primene LPS-a. Skraćenice: E (dan embionalnog razvića); P (dan postnatalnog života); PPI (prepulsna inhibicija); sc (supkutano); ip (intraperitonealno). Preuzeto iz Boksa (2010), prilagođeno i dopunjeno.

Nalaz bihejvioralne promene	Protokol primene LPS-a	Referenca
↓ PPI (P70, P100, P300)	1 mg/kg, sc, svakog drugog dana	Borrell i sar. (2002)
↓ PPI (P35, P70, P170, P180, P400)	2 mg/kg, sc, svakog dana	Romero i sar. (2007, 2010)
↑ unos etanola; ↓ propinjanje (P100-P130)	1 mg/kg, sc, svakog drugog dana	Liu i sar. (2004)
↑ lokomotorna aktivnost (P90); ↓ lokomotorna aktivnost (P480)	1 mg/kg, ip, E10,5–E11	Ling i sar. (2009)
↓ PPI (P70)	100 µg/kg, ip, E15/16	Fortier i sar. (2007)
↓ latencija do pada sa rotaroda (P30, P35, P40)	200 µg/kg, ip, dva puta dnevno od E17 do rođenja	Girard i sar. (2009, 2010)
↓ PPI; ↑ amfetaminom indukovana lokomotorna aktivnost (P70)	50 µg/kg, ip, E18/19	Fortier i sar. (2004a, 2007)
↓ prostorna memorija u vodenom lavirintu (P28)	500 µg/kg, ip, E19	Lanté i sar. (2007, 2008)
↓ izbegavanje pada sa ivice; ↓ lokomotorna aktivnost (P7 i P60)	50 µg/kg, ip, E15/16	Harvey i Boksa (2014a)
↓ lokomotorna aktivnost i lokomotorni odgovor na amfetamin P70	50 µg/kg, ip, E15/16	Harvey i Boksa (2014b)
↑ lokomotorna aktivnost (P33 i P60); ↓ PPI (P45 i P90); ↓ prepoznavanje novog objekta	100 µg/kg, ip, E15/16	Wischhof i sar. (2015a)
↑ lokomotorna aktivnost indukovana agonistom 5HT _{2A} receptora (P100-120)	100 µg/kg, ip, E15/16	Wischhof i sar. (2015b)

životinja ispituje testom prepulsne inhibicije (eng. *prepulse inhibition*, PPI) (Powell i Miyakawa, 2006). Poznato je da podjeki koji boluju od shizofrenije mogu na psihostimulanse poput amfetamina reagovati izraženije u odnosu na zdrave podjekte, pa se u animalnim testovima pored bazične lokomotorne aktivnosti ispituje i aktivnost indukovana amfetaminom (Powell i Miyakawa, 2006). Ispitivanja kognitivnih oštećenja se vrše testovima prostorne memorije (npr. vodeni lavirint) ili testovima prepoznavanja koji sadrže i komponentu ispitivanja motivacije ili socijalizacije (test prepoznavanja novog objekta i test socijalne rekognicije). Ponašanje ekvivalentno socijalnom povlačenju u ljudi ispituje se primarno u testu socijalne interakcije, a anksioznost pri eksploraciji testom otvorenog polja ili u uzdignutom plus lavirintu. Kratak pregled nalaza bihevioralnih promena u modelima prenatalne primene LPS-a prikazan je u **Tabeli 1**, a izveštaji najrelevantnijih studija biće komentarisani detaljno u diskusiji. Od mnogobrojnih funkcionalnih promena u mozgu odraslih životinja, izazavnih prenatalnom primenom LPS-a, a koje predstavljaju osnovu konstruktivne validnosti ovih modela, u posebnom delu uvoda biće razmotrene najznačajnije, i to one vezane za promene u GABA-ergičkom sistemu.

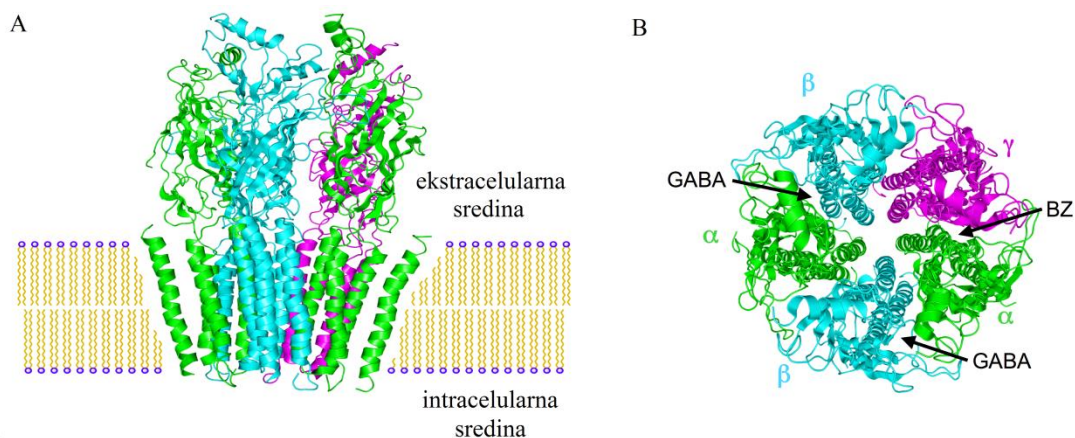
1.5. GABA i GABA_A receptori

Glavni inhibitorni neurotransmitter u centralnom nervnom sistemu je γ -aminobuterna kiselina (GABA), i ona nastaje iz glavnog ekscitatornog neurotransmitera glutamata u reakciji dekarboksilacije koju katalizuje enzim glutamat dekarboksilaza (GAD). Svoje dejstvo GABA ostvaruje preko dva tipa receptora: jonotropnih GABA_A i metabotropnih GABA_B receptora. Primarne efekte ovaj neurotransmitter ostvaruje preko GABA_A receptora, ligand-zavisnih jonskih kanala selektivno propustljivih za hloridni anjon (Cl⁻). Po vezivanju GABA-e dolazi do promene konformacije proteinske strukture receptora i otvaranja pore u njegovom centru, te ulaska Cl⁻ jona u citoplazmu neurona zahvaljujući koncentracionom gradijentu ovog ekstracelularnog anjona. Ovo izaziva poremećaj potencijala mirovanja neurona (oko -65 mV), odnosno njegov otklon ka negativnijim vrednostima što dovodi do hiperpolarizacije i stabilizacije neurona.

GABA_A receptori se sastoje iz pet podjedinica, a do sada je poznato ukupno 19 podtipova podjedinica koje učestvuju u njihovoj građi (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ i ρ 1-3) (Olsen i Sieghart, 2008). Pokazano je da samo određene kombinacije

podjedinica omogućavaju vezivanje GABA-e i aktivaciju receptora, a najveći broj poznatih kombinacija ima dve α , dve β i jednu γ podjedinicu (Olsen i Sieghart, 2009).

Vezno mesto za GABA-u nalazi se na granici između α i β podjedinica i na jednom receptoru postoje dva takva mesta (Sieghart, 2015). Efekat vezivanja GABA-e za receptor može biti izmenjen vezivanjem pozitivnih ili negativnih modulatora, među kojima su najznačajnija jedinjenja benzodiazepinske strukture. Pozitivni modulatori (agonisti u kontekstu efekata benzodiazepina) povećavaju, a negativni (inverzni agonisti) smanjuju frekvenciju otvaranja receptorskog kanala kada je za njega vezana GABA, dok sami modulatori bez prisustva GABA-e ne mogu aktivirati ove receptore. Dodatna grupa ovih jedinjenja klasifikuje se u antagoniste, i oni interakcijom sa benzodiazepinskim mestom ne utiču na frekvenciju otvaranja kanala već samo sprečavaju agoniste da ostvare svoje dejstvo. Vezivno mesto za ligande sa benzodiazepinskom strukturom nalazi se na granici između γ i α podjedinice (Sieghart, 2015). Ovde treba napomenuti da se klasični benzodiazepini ne vezuju za receptore koji sadže $\alpha 4$ ili $\alpha 6$ podjedinice (Olsen i Sieghart, 2009). Građa GABA_A receptora i vezivna mesta za GABA-u i benzodiazepine prikazani su na **Slici 3**.



Slika 3. Prikaz GABA_A receptora koji se sastoji iz dve α , dve β i jedne γ podjedinice, gledano u nivou membrane neurona (A) i iz ekstralularne sredine (B). Prikazana su mesta vezivanja GABA-e i benzodiazepina (BZ). Preuzeto sa: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/46/NAchR_2BG9.png

Raznovrsnost GABA_A receptora i specifičnost farmakoloških efekata lekova i eksperimentalnih liganada koji se vezuju za ove receptore proizilaze prevashodno iz razlike u podtipu α podjedinice. Funkcije određenih podtipova GABA_A receptora

rasvetljene su u eksperimentima na genetski modifikovanim životinjama. Suptilnom genetskom manipulacijom metodom tačkaste mutacije kreirane su linije miševa čiji GABA_A receptori sadrže modifikovane α podjedinice koje onemogućavaju modulaciju benzodiazepinima, a pritom sposobnost vezivanja GABA-e, kao i efekti ovog neurotransmitera ostaju nepromenjeni. Kako je primećeno da $\alpha 4$ i $\alpha 6$ podjedinice na određenom mestu u poznatom nizu aminokiselina imaju arginin umesto histidina, a s obzirom da su receptori koji sadrže ove podjedinice neosetljivi na klasične benzodiazepine (Olsen i Sieghart, 2009), histidinski ostaci na odgovarajućim pozicijama u ostalim α podjedinicama ($\alpha 1$ -H101, $\alpha 2$ -H101, $\alpha 3$ -H126 i $\alpha 5$ -H105) zamenjeni su argininom (Benson i sar., 1998). Tako dobijene linije *knock in* miševa, sa $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ili $\alpha 5$ receptorima neosetljivim na dejstvo benzodiazepina, praćene su u bihevioralnim testovima i farmakološki efekti koji su izostali u odgovarajućem testiranju, u odnosu na performanse kontrolnih životinja, pripisivani su podtipu receptora koji je mutiran.

Oko 60% svih GABA_A receptora u CNS-u sadrže $\alpha 1$ podjedinicu i oni su prividno neselektivno rasprostranjeni u svim strukturama mozga (Pirker i sar., 2000). Smatra se da su ovi receptori odgovorni za neželjena dejstva diazepama poput sedacije, gubitka motorne koordinacije (ataksija) i mišićnog tonusa (miorelaksacija), kao i za pojavu anterogradne amnezije. Sledeću grupu receptora po zastupljenosti čine oni koji sadrže $\alpha 2$ podjedinicu (15-20%) i njih nalazimo uglavnom u hipokampusu i amigdali (Pirker i sar., 2000). Ovi receptori posreduju u anksiolitičkom dejstvu diazepama, ali sudeluju i u efektima miorelaksacije (Löw i sar., 2000). Uloga receptora koji sadrže $\alpha 3$ podjedinicu (10-15% zastupljenosti) nije još uvek rasvetljena do kraja, iako postoje naznake da ovi receptori doprinose anksiolitičkom dejstvu benzodiazepina (Atack i sar., 2005). Specifičnosti GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu ($\alpha 5$ GABA_A receptora) biće razmatrane zasebno.

1.6. $\alpha 5$ GABA_A receptori

GABA_A receptori koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu su najmanje zastupljeni, sa samo 5% u ukupnoj populaciji, prisutni su u više regija mozga, ali je posebno izraženo njihovo prisustvo u hipokampusu (Pirker i sar., 2000). Efekti pozitivne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora su raznovrsni, ali nisu karakteristični samo za potencijaciju tog receptora. U inicijalnim ispitivanjima na $\alpha 5$ (H105R) miševima sa receptorima neosetljivim na

diazepam, zabeležena miorelaksacija je bila blažeg intenziteta od one kod kontrolnih životinja (Crestani i sar., 2002), implicirajući da je ovaj efekat delimično posredovan $\alpha 5$ GABA_A receptorima. Isti zaključak izveden je i u studiji na pacovima u kojoj je miorelaksantni efekat indukovano primenom neselektivnog PAM diazepama uspešno antagonizovan istovremenom primenom $\alpha 5$ selektivnog antagonist XLI093 (Milić i sar., 2012). Iako je poznato da u sedativnom efektu diazepama posreduju $\alpha 1$ GABA_A receptori, u studiji Savić i sar. (2008) hipotetisano je da i neka jedinjenja koja imaju profil vezivanja selektivan za $\alpha 5$ GABA_A receptore, a lišena su efikasnosti na $\alpha 1$ GABA_A receptorima, mogu izazvati određeni stepen sedacije. S druge strane, tretman $\alpha 5$ selektivnim antagonistom XLI093 neočekivano je pojačao sedativno dejstvo diazepama u testu lokomotorne aktivnosti (Savić i sar., 2009). Oštećenja proceduralne i deklarativne komponente prostorne memorije u testu Morisovog vodenog lavirinta nastala pod dejstvom diazepama uspešno su antagonizovana kako primenom $\alpha 1$ selektivnog antagonist (β -CCt), tako i tretmanom $\alpha 5$ selektivnim antagonistom (XLI093), što je ukazalo da je neželjeno dejstvo pojave anterogradne amnezije posledica potencijacije i $\alpha 5$ - i $\alpha 1$ GABA_A receptora (Savić i sar., 2009). U prilog tezi da $\alpha 5$ GABA_A receptori posreduju u amnestičkim efektima benzodiazepina govori i to da je kod $\alpha 5$ -*knock out* miševa zabeležena veća efikasnost puta do nalaska platforme u Morisovom vodenom lavirintu (Collinson i sar., 2002). Pažnju na specifičnost i osetljivost organizacije i funkcije $\alpha 5$ GABA_A receptora skreće i podatak da je prilikom kreiranja linija miševa sa tačastim mutacijama, od intervencija na svim podjedinicama jedino mutacija na $\alpha 5$ podjedinici izazavala smanjenje ekspresije pripadajućih receptora (Crestani i sar., 2002).

1.7. Prenatalni i postnatalni razvoj GABA-ergičkog sistema

U prenatalnom periodu razvoja mozga, kao i tokom prvih nedelju dana postnatalnog života pacova, GABA, paradoksalno, igra ulogu primarnog ekscitatornog neurotransmitera (Ben-Ari, 2002). U membrani neurona na ovom stupnju razvoja, od transportera koji u stanju mirovanja regulišu intracelularnu koncentraciju hloridnih jona, dominiraju Na⁺/K⁺/2Cl⁻ kotransporteri (NKCC) koji ubacuju Cl⁻ anjon u ćeliju, dok su K⁺/Cl⁻ kotransporteri (KCC2) koji izbacuju Cl⁻ anjon manje zastupljeni (Ben-Ari, 2014). Hlor je stoga u ovom periodu razvoja CNS-a pretežno intracelularni anjon i otvaranje pore GABA_A receptora dovodi do izlaska

hlora iz ćelije što izaziva početnu depolarizaciju. Ova promena potencijala mirovanja uzrokuje otvaranje natrijumovih (Na^+) i kalcijumovih (Ca^{2+}) voltažno-zavisnih kanala kao i potencijaciju aktivnosti ligand-zavisnih N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora za glutamat preko smanjenja voltažno-zavisnog magnezijumskog (Mg^{2+}) bloka (Leinekugel i sar., 1999), što vodi daljoj depolarizaciji neurona. Ovakva ekscitatorna uloga GABA-e u fetusnom mozgu pacova prekida se na kratko pri porođaju, gde oksitocin posreduje u prvom, naglom i kratkotrajnom prelasku GABA-ergičke transmisije u inhibitorni obrazac (Tyzio i sar., 2006). Nakon prestanka dejstva oksitocina, ova transmisija se brzo vraća u ekscitatorni obrazac sve do postepenog i konačnog prelaska u inhibitorni u prvim nedeljama postnatalnog života (Tyzio i sar., 2006).

U trenutku rođenja mozak mladunca pacova nalazi se nivou razvoja na kome se mozak humanog embriona nalazi u sredini drugog trimestra trudnoće (Clancy i sar., 2001, 2007), što ne čudi ako se zna da se neuralna tuba kao struktura iz koje se razvija mozak embiona kod pacova pojavljuje oko 10. dana gestacije, a ceo period gestacije traje svega 22 dana. Hipokampus pacova, kao struktura u kojoj su $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori dominantno ispoljeni, počinje da se diferencira sredinom gestacionog perioda, a razvoj GABA-ergičkog sistema u hipokampusu okvirno traje i do drugog meseca postnatalnog života (Cohen i sar., 2000; Banks i sar., 2002). U studiji koja je pratila ekspresiju GABA_A receptora od 14. dana embrionalnog razvića do perioda odraslosti, otkriveno je da se prvobitna ekspresija $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora u hipokampusu dešava između 14. i 17. dana embrionalnog razvića (Laurie i sar., 1992), što je podatak od značaja u kontekstu vremena primene LPS-a u modelima prenatalne inflamacije. Laurie i sar. (1992) su u ovoj studiji primetili da 14. dana embrionalnog razvića u fetusnom hipokampusu još uvek nema ekspresije iRNK nijedne podjedinice GABA_A receptora, dok je od 17. embrionalnog dana do kraja prenatalnog razvoja beležena samo ekspresija iRNK za $\alpha 5$ i $\alpha 2$ podjedinice, koje ujedno predstavljaju i dominantne podjedinice u adultnom hipokampusu.

U studiji Ramos i sar. (2004) otkriveno je da u relativno kratkom periodu od nultog do petog dana postnatalnog razvoja u hipokampusu pacova dolazi do naročitog porasta ekspresije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora, kako nivoa iRNK, tako i proteina (do 300% adultne ekspresije), a da nakon toga ekspresija polako opada do adultnog nivoa. U istoj studiji pokazano je i da ovaj kratkotrajni porast ekspresije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora

prethodi porastu ekspresije sinaptofizina, i enzima GAD65 i GAD67, odnosno GABA-ergičkoj sinaptogenezi. Dodatno, u periodu rođenja do 7. postnatalnog dana $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori se uglavnom mogu naći na somi piramidalnih i granularnih neurona, dok se nakon 10. dana ovi receptori izmeštaju ka udaljenim segmentima dendrita (Ramos i sar., 2004). Ovi autori su sugerisali da je ovakav vremenski obrazac ekspresije i relokalizacije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora sličan onom koji je otkriven kod $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportera (Plotkin i sar., 1998; Marty i sar., 2002) i hipotetisali da paralelan razvoj ova dva sistema ukazuje na mogućnost da $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori igraju ključnu ulogu u ekscitatornoj funkciji GABA-e u tom periodu, što je podržano i činjenicom da se upravo $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori među prvima eksprimiraju u hipokampusu (Laurie i sar., 1992). U studiji koja je pratila razvoj GABA-ergičkog sistema u hipokampusu zdravih pacova *Wistar* soja od 10. postnatalnog dana do 18 meseci starosti, opaženo je da u ovom delu mozga, nakon promene funkcije GABA-ergičkog sistema i „seobe“ $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora (Ramos i sar., 2004), dolazi do porasta broja $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora od 10. do 30. postnatalnog dana, kao periodu koji nije usko analiziran u drugim studijama (Yu i sar., 2006).

GABA-ergička regulacija adultnog hipokampusa je kompleksna, a njena specifičnost se ogleda pre svega u prisustvu i ulozi GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu. Na piramidalnim neuronima hipokampusa, $\alpha 1$ - i $\alpha 2\text{GABA}_A$ receptori ulaze u sastav sinapsi preko kojih interneuroni inhibiraju piramidalne neurone (Nyiri i sar., 2001), dok su $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori, nakon „seobe“ od soma ka dendritima u ranom postnatalnom periodu, lokalizovani pre svega ekstrasinaptički (Fritschy i sar., 1998; Brunig i sar., 2002). Smatra se da ekstrasinaptičke $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptore aktivira „curenje“ GABA-e iz bliskih sinapsi i da se tom aktivacijom postiže tonična inhibicija piramidalnog neurona (Caraiscos i sar., 2004). Tonična inhibicija između ostalog reguliše i stepen povratne propagacije akcionog potencijala (eng. *backpropagation*), sa aksonskog brežuljka ka dendritima na kojima je taj piramidalni neuron primio „informaciju“ (Groen i sar., 2014). Stoga se smatra da $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori igraju važnu ulogu u regulaciji ekscitacije piramidalnih neurona i njihove sinaptičke plastičnosti.

1.8. Poremećaji GABA-ergičkog sistema u shizofreniji i animalnim modelima

Schmidt i Mirnics (2015) su ukazali na rastući obim dokaza koji podržavaju koncept GABA-ergičkog sistema kao glavne tačke susticanja uticaja genetskih faktora i faktora okruženja za razvoj shizofrenije. U navedenom preglednom radu sumirane su promene u ekspresiji ključnih gena GABA-ergičkog sistema u shizofreniji, koje obuhvataju poremećaje GAD65 i GAD67, proteina na GABA-ergičkim interneuronima poput parvalbumina (PV), neuropeptida poput holecistokinina (eng. CCK), $\alpha 1$ i $\alpha 2$ podjedinica GABA_A receptora, kao i GABA transportera 1 i kotransporteru NKCC1 i KCC2. Neke *postmortem* studije su izvestile da u pacijenata obolelih od shizofrenije iRNK za GAD67 nije pronađena čak u 30% GABA-ergičkih interneurona (Volk i sar., 2000). Dalji nalazi govore da je u pacijenata obolelih od shizofrenije registrovana i smanjena ekspresija relina, ekstracelularnog matriksnog glikoproteina koji ima važnu ulogu u migracijama GABA-ergičkih neurona u korteksu i hipokampusu za vreme razvoja, kao i kasnijoj stabilizaciji neurona i sinapsi (Eastwood i Harrison, 2006).

Paralelno, u animalnim modelima prenatalne primene LPS-a došlo se do nalaza koji veoma liče na navedene poremećaje. Oskvig i sar. (2012) su pokazali da je kod pacova tretman LPS-om 15. dana gestacije akutno uticao na veliki broj gena bitnih za GABA-ergički sistem, među kojima na gene za GAD67 i GAD65 i gene čija ekspresija omogućava migraciju neurona u hipokampusu i korteksu (Dlx1, 2, 5, and 6) (Cobos i sar., 2005). U skladu sa izveštajima o redukciji nivoa iRNK i proteina GAD67 (npr. Benes i sar., 2007) i relina (npr. Eastwood i Harrison, 2006) u raznim delovima mozga pacijenata obolelih od shizofrenije, uključujući hipokampus, Nouel i sar. (2012) su izvestili da tretman gravidnih ženki pacova LPS-om (100 μ g/kg) 15. i 16. dana gestacije dovodi do redukovane imunoreaktivnosti neurona koji ekspimiraju GAD67 i relin u hipokampusu potomaka. Ovde je interesantno naglasiti da su u studiji koja je primenjivala identičan protokol primene LPS-a, Fortier i sar. (2007) u bihevioralnim testiranju zabeležili smanjenje prepulsne inhibicije kod odraslih pacova, koje ukazuje na deficit u senzomotorom filtriranju karakterističan za shizofreniju, a Nouel i sar. (2012) su sugerisali da ove promene u prepulsnoj inhibiciji, kao formi ponašanja parcijalno modulisanog od strane hipokampusa, mogu biti uzrokovane promenama nivoa GABA-e ili relina, koji su važne neurohemijske komponente funkcije hipokampusa.

Pun obim i trajanje neurorazvojnih promena u GABA-ergičkom sistemu koje su indukovane prenatalnom imunom aktivacijom teško je sagledati, jer se neke promene ispoljavaju relativno kasno, a druge pak nakon nekog vremena bivaju kompenzovane. Tako, LPS tretman primenjen 15. i 16. dana gestacije ostvaruje ne samo akutne efekte na dentatne ćelije hipokampusa već, s obzirom da je hipokampus struktura koja se razvija i u prvih nekoliko nedelja postanatalnog života, rezultira i u smanjenoj proliferaciji i preživljavanju dentatnih ćelija generisanih 14. postnatalnog dana; s druge strane, ne utiče na neurogenezu u hipokampusu odraslog mozga starosti 60 dana (Cui i sar., 2009).

1.9. Mehanizam dejstva amfetamina i dizocilpina

Amfetamin predstavlja psihostimulans koji se koristi u terapiji hiperkinetičkog poremećaja pažnje (eng. *attention deficit hyperactivity disorder, ADHD*), narkolepsije i gojaznosti, a efekti na ponašanje ljudi obuhvataju euforiju, povećanu budnost i poboljšanje kognitivnih funkcija. Kako dopaminergički putevi u mozgu učestvuju u kontroli motornih funkcija, kod eksperimentalnih životinja se po primeni nižih doza amfetamina opaža povećanje lokomotorne aktivnosti, a više doze uzrokuju i stereotipno ponašanje. Amfetamin svoje dejstvo ostvaruje modifikacijom transmisije kateholamina, pre svega dopamina, na nivou aksonskih terminala neurona koji oslobađaju ove neurotransmitere. Amfetamin ulazi u aksonski terminal difuzijom kroz membranu terminala ili kompetitivnim preuzimanjem od strane dopaminskog transportera (eng. *DAT*), koji inače preuzima oslobođeni dopamin iz sinaptičke pukotine nazad u terminal. Unutar ćelije amfetamin se ponaša kao agonista TAAR1 (eng. *trace amine-associated receptor 1*), ili putem vezikularnog transportera za monoamine 2 (eng. *VMAT2*) ulazi u vezikule u kojima se pakuju kateholamini, što dovodi do izbacivanja dopamina iz vezikula u citoplazmu. Vezivanje za TAAR1, koji pripada receptorima vezanim za G proteine (eng. *G protein-coupled receptor, GPCR*) i aktivira Gs i Gq protein, dovodi do aktivacije protein-kinaze A i protein-kinaze C, čija udružena fosforilacija DAT-a ima za rezultat da se jedan deo ovih transportera internalizuje i prestaje da preuzima dopamin iz sinaptičke pukotine, a drugi deo transportera menja smer transporta tako da dopamin izbačen iz vezikula dalje izbacuje iz terminala u sinaptičku pukotinu (Miller, 2011). Ovim komplikovanim mehanizmom amfetamin povećava sadržaj dopamina u sinapsi i pospešuje njegovo

dejstvo na dopaminske receptore na postsinaptičkoj membrani. Poznato je da kod pacijenata sa shizofrenijom koncentracije dopamina u sinapsi nakon primene amfetamina mogu biti dodatno povišene (Breier i sar., 1997). Shodno ovome, i u animalnim modelima shizofrenije može se očekivati povećana osetljivost na primenu amfetamina, što je kod pacova prenatalno izloženih efektima primene LPS-a registovano u vidu povećane lokomotorne reaktivnosti na amfetamin (Fortier i sar., 2004).

Dizocilpin (MK-801) je nekompetitivni antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora za glutamat, sa dodatnim dejstvima antagoniste nikotinskih receptora i inhibitora serotoninskih i dopaminskih transportera. Našao je primenu u animalnim modelima shizofrenije jer je opaženo da, za razliku od dopaminergičkih agonista poput amfetamina koji modeluju samo pozitivne simptome shizofrenije, administracija samo jedne doze MK-801 izaziva promene u ponašanju životinja koje nalikuju i pozitivnim i negativnim simptomima. Takođe, pacovi prenatalno izloženi efektima primene LPS-a, kod kojih je zabeleženo povećanje lokomocije i smanjenje prepulsne inhibicije u adultnom periodu, ispoljili su i hiperreaktivnost na dizocilpin u ovim testovima (Basta-Kaim i sar., 2011a).

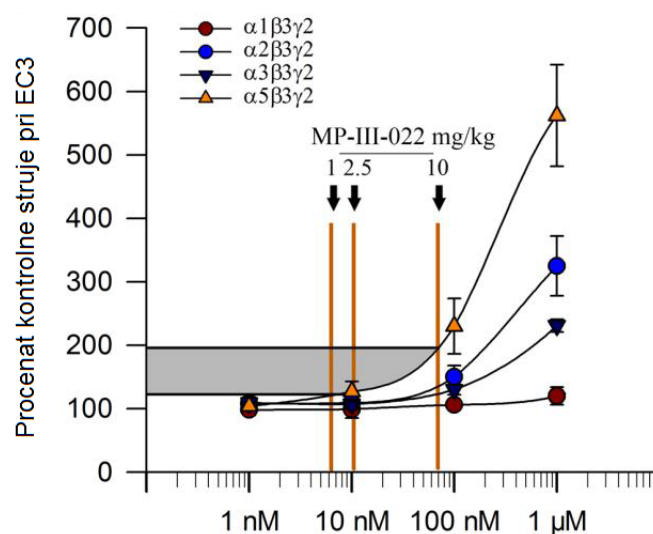
1.10. Bitna svojstva liganda MP-III-022

Pozitivni alosterični modulator GABA_A receptora MP-III-022 (*R*-stereoizomer (8-etinil-6-(2-fluorofenil)-*N*,4-dimetil-4*H*-benzo[*f*]imidazo[1,5-*a*][1,4]diazepin-3-karboksiamid) sintetisan je u saradničkoj laboratoriji profesora James M. Cook-a (Department of Chemistry, University of Wisconsin-Milwaukee, SAD). U *in vitro* ispitivanjima na ćelijskim kulturama ovaj benzodiazepin je okarakterisan kao ligand umereno selektivnog afiniteta za $\alpha 5$ GABA_A receptore (**Tabela 2**) i selektivne efikasnosti pri njihovoj modulaciji u odnosu na druge podtipove GABA_A receptora (Stamenić i sar., 2016). Na **Slici 4** prikazana je efikasnost ovog liganda na GABA_A receptorima pri velikom rasponu koncentracija MP-III-022 u *in vitro* sistemu, kao i aproksimacija *in vivo* efikasnosti u rasponu doza koje su u studiji Stamenić i sar. (2016) korišćene u bihjeviornalnim eksperimentima. U osnovi ove aproksimacije stoji teorija koja kaže da je samo slobodna, odnosno nevezana frakcija liganda u mozgu u mogućnosti da aktivira receptore, te da ona predstavlja bolji prediktor *in vivo* efikasnosti od ukupne koncentracije liganda u mozgu ili krvi (Hammarlund-Udenaes,

2010; Read i Braggio, 2010). Praktično, slobodne koncentracije MP-III-022 u mozgu pacova procenjene su kombinovanjem kinetičkih podataka o ukupnoj koncentraciji liganda u mozgu *ex vivo* i metode brze ekvilibrijumske dijalize (RED, eng. *rapid equilibrium dialysis*) za procenu slobodne frakcije. U bihejvioralnim eksperimentima spovedenim u studiji Stamenić i sar. (2016), MP-III-022 je u rasponu doza od 1-10 mg/kg uz blagu miorelaksaciju, bio lišen ataksičnog i sedativnog dejstva, kao i uticaja na anksioznost što je potvrdilo njegov selektivni *in vitro* profil, i kandidovalo ga za optimalnu alatku u ispitivanjima aktivnosti i funkcije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora u poremećajima CNS-a.

Tabela 2. Afiniteti za vezivanje (K_i) liganda MP-III-022 za različite podtipove GABA_A receptora. Preuzeto i prilagođeno iz rada Stamenić i sar. (2016).

$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$
850 ± 110 nM	360 ± 56 nM	660 ± 170 nM	55 ± 17 nM



Slika 4. Efikasnost liganda MP-III-022 u potencijaciji različitih podtipova GABA_A receptora $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ i $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ izražena kao procenat kontrolne struje pri koncentraciji GABA-e od 3%. Presek krive koja predstavlja *in vitro* efikasnost na $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ receptorima i odgovarajuće žute vertikalne linije koja predstavlja procenjenu slobodnu koncentraciju MP-III-022 u mozgu pacova nakon primene odgovarajuće doze, ekstrapoliran na y osu predstavlja aproksimaciju vrednosti potencijacije ovih receptora pri akutnoj intraperitonealnoj primeni liganda u toj dozi. Preuzeto i prilagođeno iz rada Stamenić i sar. (2016).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje imalo je za prvi cilj uspostavljanje i karakterizaciju modela prenatalne izloženosti efektima imune aktivacije postignute primenom LPS-a gravidnim ženkama pacova *Wistar* soja 15. i 16. dana gestacije. Drugi cilj je bio da se, nakon karakterizacije modela, ispita uticaj preventivne modulacije GABA-ergičke transmisije u periodu preadolescencije kod potomaka oba pola prenatalno izloženih efektima lipopolisaharida, na promene u njihovom ponašanju u periodu rane odraslosti. Ispitivanja su bila organizovana u četiri faze.

Prva faza ispitivanja imala je za cilj da rasvetli imunološka zbivanja u organizmu gravidnih ženi, fetusima i kod odraslih potomaka, kao i do sada neispitivane moguće promene u neurotransmisiji u mozgu fetusa nakon intraperitonealne primene LPS-a. Praćeni su nivoi citokina, kao markera inflamacije, u krvi ženke, placenti, amnijskoj tečnosti i mozgu fetusa, kao i mozgu odraslih potomaka, radi validacije modela i ispitivanja prirode, intenziteta i trajanja procesa imune aktivacije. Kvantifikovani su nivoi šest ključnih neurotransmitera u mozgu fetusa.

U drugoj fazi ispitivane su promene u ponašanju potomaka u periodu njihove adolescencije (40. postnatalni dan) i rane odraslosti (60. postnatalni dan), u testovima spontane i amfetaminom indukovane lokomotorne aktivnosti, zatim testovima anksioznosti, socijalne interakcije i prostorne memorije (Morisov vodeni lavirint).

U trećoj fazi određivani su kinetički profili, ukupne koncentracije i slobodne frakcije MP-III-022, liganda selektivnog za α_5 podtip GABA_A receptora, u mozgu i plazmi mladih pacova, u periodu njihove ponavaljane primene (od 22. do 28. postnatalnog dana).

U četvrtoj fazi ispitivan je uticaj ponavaljane primene liganda selektivnog za α_5 podtip GABA_A receptora na promene u ponašanju potomaka opažene u nizu testova korišćenih za bihejvioralnu karakterizaciju u drugoj fazi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinje

Eksperimenti su izvođeni na pacovima oba pola, *Wistar* soja, odgajanim na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu i u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ženke i mužjaci su držani u odvojenim sobama, u standardnim kavezima od pleksiglasa, najviše po pet životinja u jednom kavezu, pri sobnoj temperaturi, relativnoj vlažnosti 40-70% i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 6 do 18 h, intenzitet svetla 120 lx). Životinje su sve vreme imale pristup hrani i vodi *ad libitum*. Negovanje životinja i bihejvioralno testiranje sprovedeni su tokom svetle faze dnevno/noćnog ciklusa. Sve primenjene procedure bile su u skladu sa Direktivom 2010/63/EU i sprovedene su u sklopu nacionalnog projekta u oblasti osnovnih istraživanja (OI 175076), koji ima odgovarajuće odobrenje, koje podrazumeva i etičnost rada sa oglednim životinjama.

3.2. Supstance

U postupku izazivanja inflamacije kod trudnih ženki pacova korišćen je lipopolisaharid (LPS) izolovan iz bakterije *Escherichia coli* (serotip 0111:B4, proizvođač Sigma-Aldrich) koji je za intraperitonealnu primenu rastvaran u 0,9%-nom rastvoru natrijum-hlorida – fiziološkom rastvoru (FR). Ligand MP-III-022 sintetisan je u saradničkoj laboratoriji profesora James M. Cook-a, Department of Chemistry, University of Wisconsin-Milwaukee, SAD. Supstanca MP-III-022 je za intraperitonealnu primenu suspendovana uz pomoć ultrazvučnog kupatila, u farmakološki inertnom vehikulumu (SOL) koji sadrži 85% destilovane vode, 14% propilenglikola i 1% Tween-a. U testovima indukovane lokomotorne aktivnosti korišćeni su MK-801 (Sigma-Aldrich) i amfetamin (Sigma-Aldrich) koji su za intraperitonealnu primenu rastvarani u FR-u.

3.3. Primena lipopolisaharida

Prilikom sparivanja, jedan polno zreli mužjak i jedna ženka pacova smeštani su u standardni kavez i vaginalni brisevi su uzimani svakog dana u 9 h, sve dok mikroskopski nalaz brisa ne bi bio pozitivan na spermatozoide. Nakon pozitivnog

nalaza, ženke su odvajane od mužjaka i, kako bi se izbegao uticaj socijalne izolacije, do 19. dana gestacije boravile su u zajedničkom standardnom kavezu (tri ženke po kavezu), a potom su do okota (21. ili 22. dana gestacije) bile smeštane u pojedinačnim standardnim kavezima. Intraperitonealna primena LPS-a (100 µg/kg, 2 ml/kg) ili FR-a (2 ml/kg) gravidnim ženkama vršena je 15. i 16. dana gestacije u razmaku od 24 h. Nakon okota mladunci su sa svojim majkama držani u standardnom kavezu do 21. dana starosti mladunaca, kada je vršeno zalučivanje i razdvajanje mladunca po polu, i oni su nadalje odvojeno čuvani u muškoj i ženkoj sobi.

3.4. Primena MP-III-022

Mladunci pacova oba pola prenatalno izloženi efektima primene LPS-a ili FR-a, tretirani su intraperitonealno, jednom dnevno svakog dana u periodu od 22. do 28. postnatalnog dana, ligandom MP-III-022 u dozi 2 mg/kg i zapremini 5 ml/kg, ili vehikulumom (SOL) u zapremini 5 ml/kg.

3.5. Protokoli analitičkih eksperimenata

3.5.1. Kvantifikacija citokina

U svrhu utvrđivanja stepena indukcije citokina LPS-om 15. i 16. prenatalnog dana, gravidne ženke iz ciljano sparivane kohorte žrtvovane su 2 i 4 sata nakon primene LPS-a ili FR-a, kao što je detaljno objašnjeno u radu Bell i sar. (2004). Sakupljeni su sledeći uzorci: krv ženki, placente, amnionske tečnosti i fetusni mozgovi. Da bi se detektovala moguća perzistentna indukcija citokina kod odraslih prenatalno tretiranih pacova oba pola, životinje su žrtvovane nakon bihejvioralnih testova u 60. postnatalnom danu i prikupljeni su uzorci krvi i moždanog tkiva.

Krv je prikupljena u hepariniziranim tubama (Eppendorf) i centrifugirana na 1000 g tokom 10 minuta, a potom je izdvajana plazma. Placentalno i moždano tkivo je smeštano u tube sa puferom (50 mM Tris-HCl, 0,6 M NaCl, 0,2% Triton X-100, 0,5% BSA i inhibitori proteaza), homogenizovano i centrifugirano na 14000 g na 4°C, a potom su prikupljeni supernatanti. Uzorci plazme, amnionske tečnosti i supernatanti su skladišteni na - 80°C do naknadnih analiza. U detekciji citokina, po uputstvu proizvođača, korišćeni su ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kitovi za

TNF- α (Rat TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go!®, eBioscience, USA) i IL-6 (ELISA Kit, Rat, Life Technologies, USA). Limit detekcije je za TNF- α iznosio 16 pg/mL, a za IL-6 23,5 pg/mL.

3.5.2. Kvantifikacija neurotransmitera

U uzorcima moždanog tkiva, metodom opisanom u radu Huang i sar. (2014), određivano je šest važnih neurotransmitera: glutamat (GLU), gama-aminobuterna kiselina (GABA), dopamin (DA), noradrenalin (NA), serotonin (5-HT) i acetilholin (ACh). Celi fetusni mozgovi prikupljeni su nakon žrtvovanja gravidnih ženki 15. i 16. dana gestacije, 2 i 6 sati nakon administracije LPS-a ili FR-a, po 3 uzorka od svake ženke. Moždano tkivo odraslih pacova prikupljano je prilikom žrtvovanja ovih životinja nakon bihejvioralnih testova u 60. postnatalnom danu, i uzorkovane su sledeće strukture od interesa: prefrontalni korteks, dorzalni strijatum, nukleus akumbens i ventralni hipokampus. Sva tkiva su odmah po uzorkovanju pakovana u tube i zaleđivana u tečnom azotu, a nakon završetka žrtvovanja prebačena i čuvana na -80°C do daljnjih analiza. Prilikom analize u tube je dodavan hladni metanol (sa 0,1% mravlje kiseline), u odnosu 1:12,5 (tkivo (mg): metanol (μL)), i uzorak je homogenizovan. 100 μL homogenata je razblaživano 3,2 puta (čime je postignuto ukupno razblaženje od 40 puta) dodavanjem 175,2 μL metanola (sa 0,1% mravlje kiseline) i 44,8 μL internog standarda (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ benzilamin). Tako pripremljeni uzorci su vorteksovani i centrifugirani (18.000 g, tokom 10 minuta na 4°C). Potom prikupljeni supernatanti su uparivani do suvog u sistemu sa gasovitim azotom. Ostaci nakon uparavanja su rekonstituisani sa 350 μL mobilne faze (smesa vode i acetonitrila u zapreminskom odnosu 98:20 sa 0,1% mravlje kiseline), i tako pripremljeni uzorci su analizirani u LC-MS/MS sistemu. LC-MS/MS analize su izvedene korišćenjem Accela LC sistema uparenim sa trostrukim kvadripolnim masenim spektrometerom (Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max, San Jose, CA, USA) sa jonizacijom zagrejanim elektrosprejom (eng. *heated electrospray ionization*, HESI). Prilikom analize korišćeni su sledeći optimizovani parametri: napon spreja, 4000V; temperatura uparivača, 325°C ; pritisak linearnog protoka gasa nosača (azot), 30 arbitražnih jedinica; pritisak cirkularnog protoka gasa nosača (azot), 10 arbitražnih jedinica; temperatura kapilare, 300°C ; vreme skeniranja, 0,2 s; rezolucija (FWHM – *full width at half maximum*), 0,70; pritisak kolizionog gasa (argon), 1,5 mTorr. Analiti

su praćeni preko odabranih jonskih tranzicija (*Selected Reaction Monitoring* – SRM) u pozitivnom modu: GABA m/z 104 → 87 (koliziona energija CE, 10 V), Ach m/z 146 → 87 (CE, 14 V), GLU m/z 148 → 84 (CE, 16 V), DA m/z 154 → 137 (CE, 8 V), NE m/z 170 → 152 (CE, 5 V), 5-HT 177 → 160 (CE, 8 V) i benzilamin m/z 108 → 91 (CE, 10 V).

3.5.3. Ispitivanje kinetike ponavljene primene MP-III-022

Za ispitivanje kinetičkog ponašanja MP-III-022 (2,5 mg/kg) tokom ponavljene intraperitonealne primene ovog liganda, jednom dnevno od 22. do 28. dana postnatalnog života, korišćena je posebna kohorta muških i ženskih mladunaca čije majke nisu bile tretirane u gestacionom periodu. U pet različitih vremenskih tačaka (20 minuta nakon 1. doze, 24 h nakon 1. doze, 20 minuta nakon 3. doze, 20 minuta nakon 7. doze i 24 h nakon 7. doze) žrtvovano je 3 pacova po polu. Životinje su dekapitovane i celi mozgovi su izmereni, homogenizovani u 2 mL metanola i centrifugirani na 3400 g tokom 20 minuta. Da bi se odredila koncentracija MP-III-022 u supernatantima homogenata moždanog tkiva, MP-III-022 je ekstrahovan iz ovih uzoraka metodom ekstrakcije u čvrstoj fazi uz korišćenje Oasis HLB kertridža (Waters Corporation, Milford, Massachusetts). Procedura pripreme uzoraka i određivanja MP-III-022 korišćenjem tečne hromatografije ultravisokih performansi (Thermo Scientific Accela 600 UPLC system) uparenom sa tandem masenim sprekometrom (Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX triple quadrupole mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific, San Jose, California), opremljenim elektosprejnim jonizatorom (ESI), detaljno je opisana u radu Stamenić i sar., 2016.

3.6. Protokoli bihevioralnih eksperimenata

3.6.1. Test spontane i indukovane lokomotorne aktivnosti

Merenje spontane i indukovane lokomotorne aktivnosti vršeno je pod prigušenim crvenim svetlom (20 lx) u četiri bele poluprozirne kutije od pleksiglasa sa crnim dnom, dimenzija 40 × 25 × 35 cm. Nakon svake grupe ispitivanih životinja kutije su brisane 70%-nim etanolom radi uklanjanja olfaktornih tragova, a mužjaci i ženke pacova nisu testirani u isto vreme. Životinje su praćene kamerom koja se nalazila na

plafonu sobe za testiranje i koja je bila povezana sa računarom na kome su preko ANY-maze softvera analizirani parametri od interesa.

U inicijalnom testiranju životinja u prvom setu eksperimenata korišćeni su protokoli A i B. U protokolu A praćena je samo spontana lokomotorna aktivnost životinja tokom 30 minuta, a u protokolu B životinje su nakon 30 minuta spontane lokomotorne aktivnosti tretirane ligandom MK-801, intraperitonealno u dozi 0,1 mg/kg, ili FR-om, i njihova aktivnost je praćena još 30 minuta. U oba protokola analizirani su ukupni pređeni put i vreme imobilnosti.

U drugom setu eksperimenata za ispitivanje spontane i amfetaminom indukovane lokomotorne aktivnosti korišćen je protokol C. U njemu je testiranje bilo podeljeno na tri vremenska segmenta: habituaciju, placebo segment i amfetaminski segment. U prvom segmentu životinja je puštana u aparaturu i njena aktivnost je praćena tokom 30 minuta. Zatim je životinja uklanjana iz aparature da bi intraperitonealno primila FR u zapremini 2 ml/kg i odmah vraćana kako bi se pratio uticaj stresa prouzrokovanog injektovanjem na lokomotornu aktivnost u drugom segmentu, koji je takođe trajao 30 minuta.

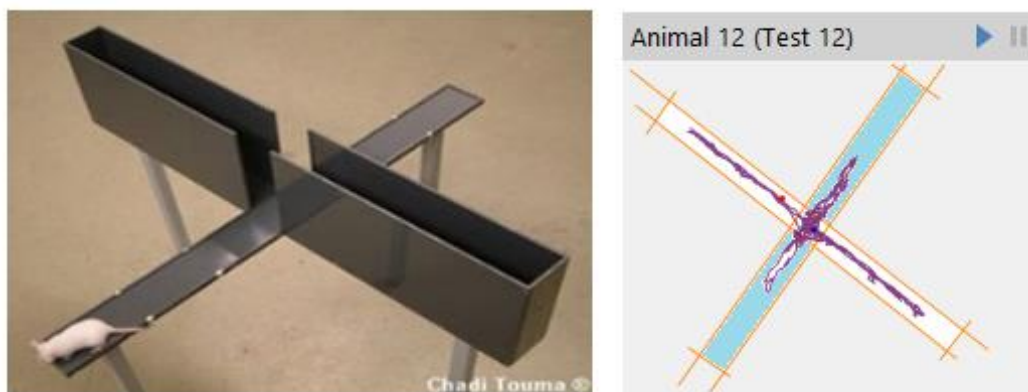
U trećem segmentu, u trajanju od 60 minuta, praćena je lokomocija indukovana intraperitonealnom aplikacijom amfetamina u dozi 0,5 mg/kg i zapremini 2 ml/kg, koja je izvođena na isti način kao i aplikacija FR-a pre drugog segmenta. Analiziran je ukupni pređeni put u sva tri segmenta, kao i put koji su životinje prelazile u intervalima od po 10 minuta unutar svakog segmenta.

3.6.2. Test otvorenog polja

Test otvorenog polja (OP) je izvođen u okrugloj areni od crnog pleksiglasa (100x100x50 cm) izloženoj indirektnom belom osvetljenju (20 lx). Pod arene je čišćen 70%-nim etanolom nakon testiranja svake životinje kako bi se uklonili oflaktorni tragovi. Na dan testiranja, bez prethodne habituacije na aparaturu, životinja je uzimana iz svog grupnog kaveza i puštana u centar arene. Aktivnost životinje je praćena uz pomoć ANY-maze softvera i centralnih 50% površine je virtuelno podešeno kao centralna zona arene. Praćeni su sledeći parametri aktivnosti i/ili anksioznosti: pređeni put (m), procenat puta u centralnoj zoni u odnosu na ukupni pređeni put (%) i vreme provedeno u centralnoj zoni (s).

3.6.3. Uzdignuti plus lavirint

Aparatura za izvođenje testa uzdignutog plus lavirinta (UPL) ima dva otvorena i dva zatvorena kraka dužine 50 i širine 10 cm (**Slika 5**). Dok otvoreni kraci imaju obod uzdignut 0,3 cm, zatvoreni kraci imaju zidove visine 40 cm, a središte lavirinta u kome se sastaju kraci je polje dimenzija 10 x 10 cm. Bez prethodne aklimatizacije na sobu u kojoj se izvodi test, pojedinačne životinje su donošene iz svojih grupnih kaveza i puštane u centar UPL-a, glave usmerene ka zatvorenim kracima, i njihovo ponašanje je snimano pod crvenim svetlom tokom 5 minuta uz korišćenje ANY-maze softvera. Pre početka svakog testa, olfaktorni tragovi prethodne životinje uklanjani su razblaženim etanolom. Softver beleži ulazak u otvoreni ili zatvoreni krak kada se najmanje 90% tela životinje nađe sa druge strane virtuelne linije koja razdvaja krak od centralnog polja, dok je za izlazak iz kraka takođe potrebno da se najmanje 90% tela životinje nađe van tog kraka. Od promenljivih koje softver računa, korišćeni su parametri vezani za anksioznost (procenat vremena provedenog na otvorenim kracima i procenat ulazaka u otvorene krake) i parametri opšte aktivnosti (broj ulazaka u zatvorene krake i ukupni broj ulazaka).



Slika 5. Uzdignuti plus lavirint (UPL) i prikaz podele lavirinta na zone sa putanjom kretanja jedne životinje iz ANY-maze softvera. Plavom bojom obeleženi su otvoreni kraci, a belom zatvoreni.

3.6.4. Morisov vodeni lavirint

Kao vodeni lavirint korišćen je crni cilindrični bazen, prečnika 200 cm i visine 60 cm, koji je punjen vodom temperature 23 °C (± 1 °C) do visine od 30 cm (**Slika 6**). Platforma (15 × 10 cm) koja predstavlja izlaz iz lavirinta je postavljena na dno bazena

tako da se njena gornja površina nalazila 2 cm ispod nivoa vode i bile je načinjena od crne plastike kako bi bila nevidljiva za pacove (Terry, 2000). U prostoriji za testiranje nalazili su se vizuelni tragovi poput vrata i cevi na zidovima i plafonu, a indirektno belo osvetljenje je obezbeđeno postavljanjem neonskih lampi na zid ispod nivoa gornje ivice bazena. Kod testiranih pacova prostorno učenje u lavirintu praćeno je tokom pet uzastopnih dana. Svakog dana životinje su puštane da plivaju četiri puta uzastopno u pokušaju da pronađu platformu. U svakom pokušaju puštane su sa jedne od četiri pseudo-nasumično odabrane pozicije. Kako je platforma bila skrivena u severoistočnom kvadrantu bazena, pozicije za puštanje su bile istočna, zapadna, severozapadna i jugoistočna. Ako bi pronašla platformu i popela se na nju, životinja je ostavljena na njoj narednih 15 sekundi. Ukoliko životinja ne bi pronašla platformu za 120 sekundi, istraživač bi je odveo do platforme. Da bi se procenila dugoročna prostorna memorija nakon pet dana učenja (akvizicije), životinja je šestog dana puštana u bazen bez platforme da pliva u trajanju od 60 sekundi. Pacovi su u ovom pokušaju puštani sa, od platforme najudaljenije, jugozapadne pozicije.



Slika 6. Bazen i prikaz podele površine na zone sa putanjom plivanja jedne životinje iz ANY-maze softvera. Plavom bojom obeležena je zona platforme, a zelenom tigmotaksična zona (periferni prsten).

Uz pomoć ANY-Maze softvera bazen je virtuelno podeljen na četiri kvadranta, a ujedno i na dva koncentrična prstena i centralni krug (Slika 6). Ciljna zona se nalazila u preseku unutrašnjeg prstena i kvadranta u kome se nalazila platforma, kao što je grafički predstavljeno u Savić i sar., 2008. Centralni krug je predstavljao 10%, unutrašnji prsten 40%, a spoljašnji prsten ili tigmotaksična zona je iznosila 50% ukupne površine bazena. Promenljive koje su praćene tokom pet dana

prostornog učenja, a u većoj ili manjoj meri su vezane za orijentisanje ka poziciji platforme, tj. prostorno učenje (Vorhees i Williams, 2006), bile su: latencija i pređeni put do pronalaska platforme, prosečna brzina plivanja i efikasnost putanje (odnos najkraće moguće putanje i pređenog puta). Gubitak tigmotaksije (tendencije plivanja uz ivicu bazena) je vezan za proceduralnu komponentu akvizicije i obično se postepeno dešava tokom uzastopnih pokušaja, i da bi se kvantifikovao računati su procenat puta i vremena koje su životinje provodile u spoljašnjem prstenu. U ponašanju životinja tokom pokušaja šestog dana praćeni su efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu, kao i broj ulazaka u ciljnu zonu, s obzirom da je očekivano da životinja pokuša da locira platformu na drugom mestu ukoliko se ona ne nalazi na poznatoj lokaciji (Blokland i sar., 2006).

3.6.5. Test socijalne interakcije

Ispitivanje socijalnog ponašanja je vršeno u otvorenoj drvenoj kvadratnoj areni (100 × 100 × 40 cm) sa podom od sivog pleksiglasa koji je omogućavao lako brisanje olfaktornih tragova. Prostorija za testiranje je osvetljena indirektnom belom svetlošću (80 lx). 24 sata pre testiranja pacovi su u pojedinačnim kavezima boravili 10 minuta u prostoriji za testiranje kako bi se aklimatizovali. Prilikom testiranja, dva pacova istog pola, istog prenatalnog tretmana i otprilike iste mase ($\pm 10\%$), koji pre toga nikad nisu bili u istom društvu, puštani su istovremeno u suprotne uglove arene. Ponašanje je praćeno tokom 10 minuta i bodovano od strane istraživača uz pomoć AnyMaze softvera (Stoelting Co.). Svaki međusobni kontakt i situacija u kojoj su se pacovi nalazili jedno od drugog na razdaljini manjoj od dužine repa smatrano je interakcijom, dok istraživač koji je vršio procenu nije znao kojoj grupi pripadaju testirane životinje. Vreme koje su životinje provodile u interakciji kvantifikovano je kao glavna promenljiva.

3.7. Vremenski tok eksperimenata

U prvom setu eksperimenata praćeni su efekti prenatalne primene LPS-a na ponašanje odraslih mladunaca oba pola u testovima spontane i indukovane lokomotorne aktivnosti. U prvom eksperimentu su mereni parametri kretanja pacova tokom eksploracije i spontane lokomotorne aktivnosti (protokol A), dok je u drugom eksperimentu dodatno analizirana i lokomotorna aktivnost indukovana primenom

agensa MK-801 (protokol B). Ova inicijalna ispitivanja izvedena su na relativno malom broju životinja (n=8, po tretmanu i polu), bez uzimanja u obzir efekta legla, pa su pojedine eksperimentalne grupe činili mladunci poreklom od samo dve majke.

U drugom setu eksperimenata ispitivan je razvoj i trajanje inflamacije indukovane primenom LPS-a u tkivima gravidnih ženki i fetusa, kao i potencijalni poremećaj balansa neurotransmitera u fetusnom mozgu za vreme inflamacije. Dalje, radilo se na široj bihevioralnoj karakterizaciji modela vodeći računa o efektu legla, pa se težilo da u svim korišćenim testovima jednu eksperimentalnu grupu čine mladunci poreklom od najmanje osam ženki istog tretmana. Životinje su prema prenatalnom tretmanu i polu bile podeljene u četiri eksperimentalne grupe koje će u daljem testu biće označavane kao: LPS mužjaci, LPS ženke, FR mužjaci i FR ženke. Bihevioralna karakterizacija modela sprovedena je kroz nekoliko baterija ili pojedinačnih testova u danima kada su životinje bile stare 40 i 60 dana. U prvoj bateriji testova jedna kohorta životinja je najpre učestvovala u ispitivanju socijalne interakcije, a potom u testu amfetaminom indukovane lokomotorne aktivnosti (protokol C). Druga kohorta životinja je praćena u testu prostorne memorije (MVL). Životinje koje su ispitivane u određenom testu u jednoj vremenskoj tački (40. ili 60. dan) u drugoj nisu bile testirane u tom istom testu, a u cilju izbegavanja eventualne tolerancije. Budući da su pojedine promene u ponašanju uočene samo kod životinja starosti 60 dana, u toj vremenskoj tački dodatno je ispitana bazična anksioznost pacova oba pola u drugoj bateriji testova (UPL i OP), sa posebnom kohortom životinja.

U trećem setu eksperimenata najpre je, na posebnoj grupi mladunaca, ispitivana kinetika ponavljane primene MP-III-022 i određena je doza koja je potom korišćena u ispitivanju uticaja ovog tretmana (MP-III-022) na promene u ponašanju životinja prenatalno izloženih efektima LPS-a, koje su uočene u prethodnom eksperimentalnom setu. U ovim bihevioralnim testovima učestvovalo je ukupno osam eksperimentalnih grupa koje su dobijene razdvajanjem životinja po polu, prenatalnom tretmanu (LPS ili FR) i postnatalnom tretmanu (MP-III-022 ili SOL). Ispitivanja su obuhvatila merenje spontane i amfetaminom indukovane lokomotorne aktivnosti (protokol C), test anksioznosti (UPL) i test prostorne memorije (MVL). Dodatno su ispitivani citokinski status odraslih životinja i koncentracije neurotransmitera u određenim strukturama mozga.

3.8. Statistička obrada rezultata

U prvom setu eksperimenata parametri lokomotorne aktivnosti životinja istog pola poređeni su Studentovim t-testom gde je faktor bio prenatalni tretman (LPS ili FR). U ovom setu eksperimenata nije korišćeno uprosečavanje po leglima.

U drugom setu eksperimenata vrednosti parametara iz bihevioralnih testova su uprosečene po leglima i srednja vrednost za jedno leglo je korišćena u statističkim analizama. Vrednosti dobijene od životinja određene starosti i pola analizirane su posebno. U statističkoj analizi parametara lokomotorne aktivnosti i ponašanja u MVL-u korišćena je dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem, gde su faktori bili prenatalni tretman i vremenski interval (lokomotorni esej) ili dan akvizicije (MVL). U analizi spontane i amfetaminom indukovane aktivnosti svaki segment testa je analiziran posebno. Procedura višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom (eng. *pairwise multiple comparison procedure, Student-Newman-Keuls method*) korišćena je za poređenje efekta jednog faktora po nivoima drugog faktora. Vrednosti parametara iz testa pozivanja u MVL-u analizirani su Studentovim t-testom. Podaci su analizirani softverom SigmaPlot (Systat Software Inc.).

Koncentracije neurotransmitera u fetusnim mozgovima analizirane su Studentovim t-testom, i odvojene analize su rađene za svaku vremensku tačku. Koncentracije neurotransmitera u mozgovima odraslih životinja starosti 60 dana analizirane su dvofaktorskom ANOVOM gde su faktori bili LPS i MP-III-022, i to odvojeno za mužjake i ženke. Koncentracije citokina nisu analizirane statističkim testovima jer su vrednosti citokina kod životinja koje nisu bile tretirane LPS-om bile ispod praga detekcije.

U trećem setu eksperimenata vrednosti iz testa lokomotorne aktivnosti analizirane su trofaktorskom ANOVOM, gde su faktori bili LPS, MP-III-022 i vremenski interval, a rezultati svakog segmenta testa su analizirani odvojeno. Procedura višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom (eng. *pairwise multiple comparison procedure, Student-Newman-Keuls method*) korišćena je za poređenje efekta jednog faktora po nivoima drugog faktora. Podaci su analizirani softverom SPSS Statistics 20 (IBM).

U svim statističkim testovima značajnim su smatrane vrednosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Prvi set eksperimenata

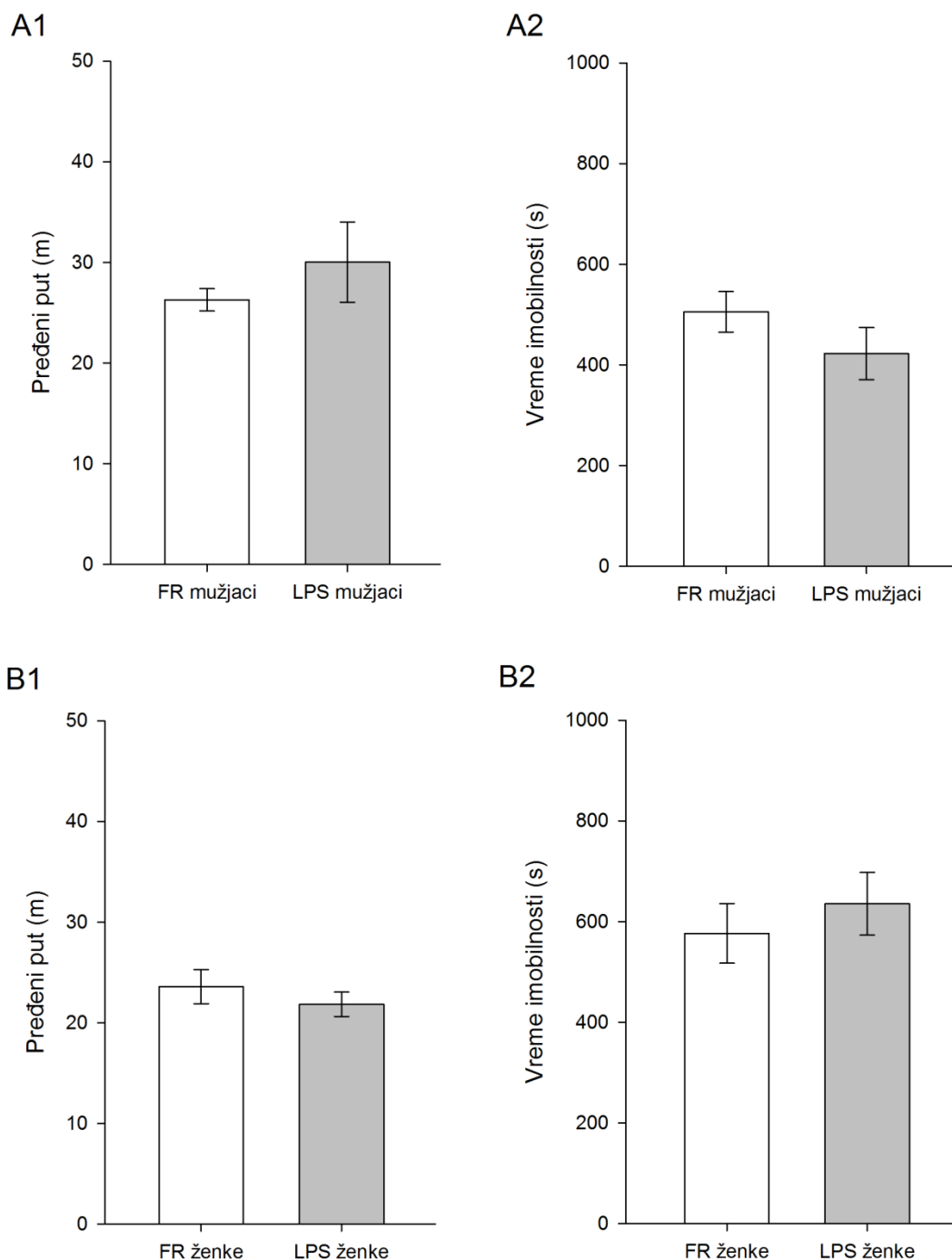
4.1.1. Efekti primene lipopolisaharida na spontanu lokomotornu aktivnost

Kada su efekti LPS-a na spontanu lokomotornu aktivnost, ispitivanu po protokolu A, analizirani Studentovim t-testom, ispostavilo se da ovaj tretman kod mužjaka starosti 40 dana nije značajno uticao na pređeni put ($t_{(12)}=1,0281$, $p=0,324$), niti na vreme imobilnosti ($t_{(12)}=1,2867$, $p=0,222$), a ni kod ženki starosti 40 dana nije bilo razlike u vrednostima ova dva parametra ($t_{(14)}=0,847$, $p=0,411$; $t_{(14)}=0,819$, $p=0,506$). Ovi rezultati prikazani su na **Slici 7**. Kod mužjaka starosti 60 dana (**Slika 8**) efekat prenatalne primene LPS-a je registrovan kao trend povećanja pređenog puta ($t_{(12)}=2,038$, $p=0,064$), dok u vremenu imobilnosti nije bio razlike ($t_{(12)}=1,359$, $p=0,199$). Kod ženki starosti 60 dana (**Slika 8**), LPS nije ostvario značajan efekat ni na jedan od ova dva parametra ($t_{(16)}=1,572$, $p=0,136$; $t_{(16)}=0,1355$, $p=0,894$).

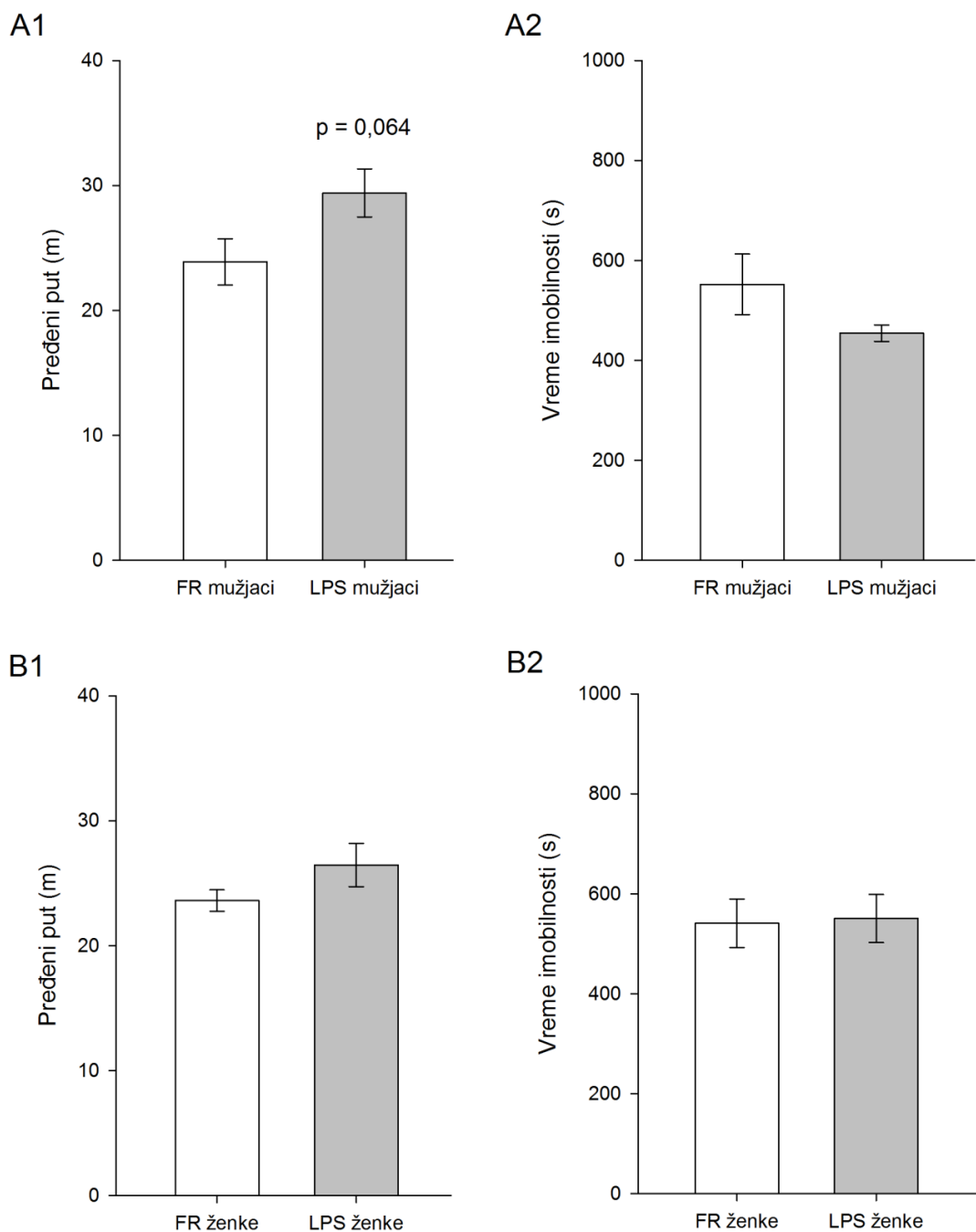
4.1.2. Efekti primene lipopolisaharida na spontanu i dizocilpinom indukovanu lokomotornu aktivnost

Kao donekle robusniji, a svakako više korišćeni parametar, u ovom eksperimentu (protokol B) analiziran je samo pređeni put, i to odvojeno u prvom segmentu, u kome je praćena spontana aktivnost, i drugom u kome je praćena lokomotorna aktivnost indukovana primenom MK-801. LPS mužjaci starosti 40 dana (**Slika 9**) prelazili su duži put u odnosu na kontrolne mužjake tokom spontane lokomocije ($t_{(12)}=2,516$; $p=0,027$), ali pod dejstvom MK-801 nije bilo razlika ($t_{(12)}=1,093$; $p=0,296$). Kod ženki starosti 40 dana (**Slika 9**) nije bilo razlike ni u prvom ($t_{(11)}=1,583$; $p=0,142$), ni u drugom segmentu testa ($t_{(11)}=0,878$; $p=0,398$). Tokom testiranja spontane lokomocije 60. postnatalnog dana LPS mužjaci su prelazili manji put u odnosu na kontrole ($t_{(12)}=3,053$; $p=0,010$), ali pod dejstvom MK-801 opet nije bilo razlika ($t_{(12)}=0,289$; $p=0,777$). što je prikazano na **Slici 10**. Kod LPS ženki starosti 60 dana postojao je trend smanjenja puta tokom spontane lokomocije ($t_{(14)}=1,994$; $p=0,066$), dok pod dejstvom MK-801 takođe nije bilo razlika ($t_{(14)}=0,335$; $p=0,742$) (**Slika 10**). U testiranju spontane lokomocije u ovom eksperimentu dobijeni su rezultati kontradiktorni onim iz predhodnog eksperimenta, ali nezavisno od toga došlo se do

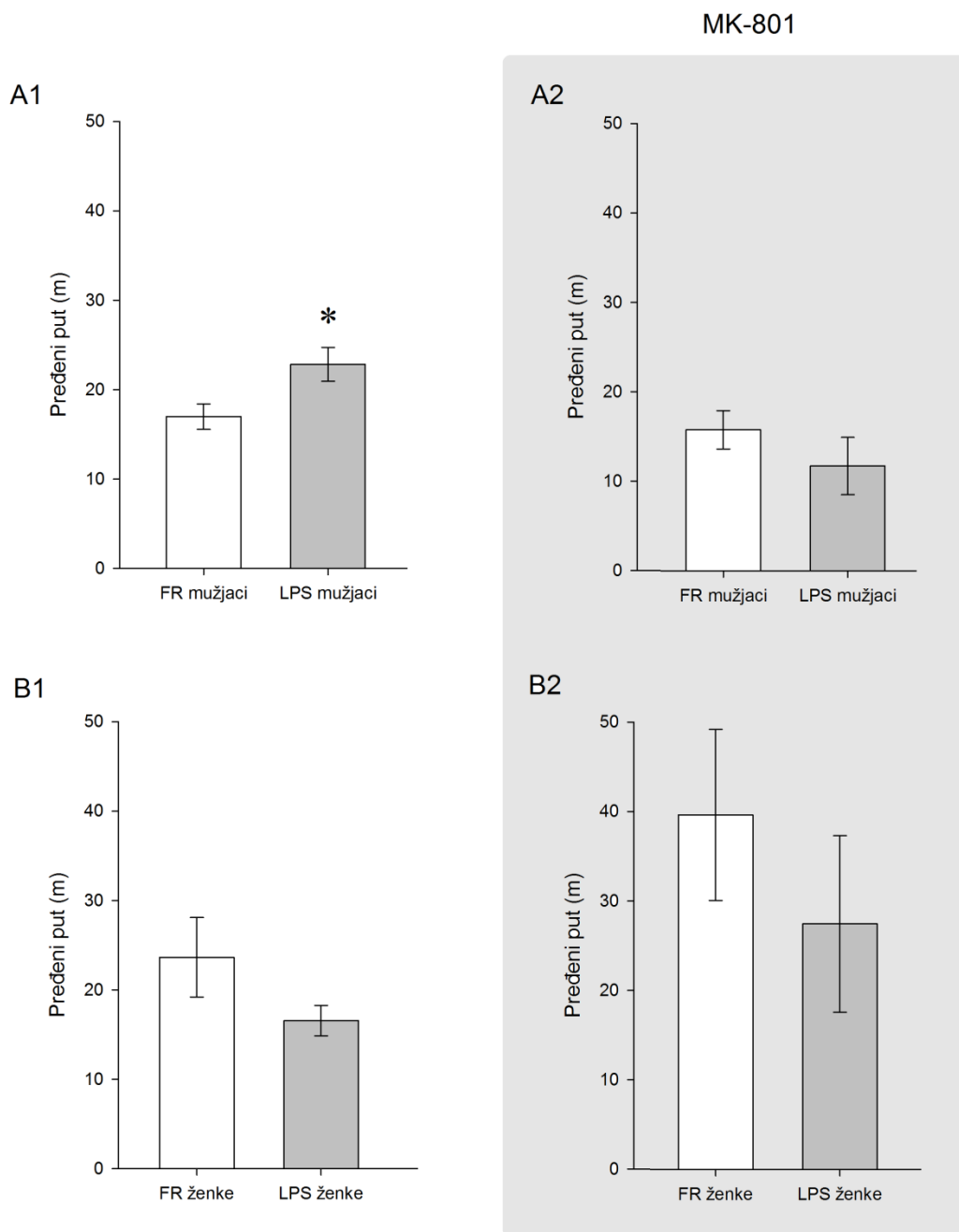
nalaza da primena MK-801 ne otkriva razlike u indukovanoj lokomotornoj aktivnosti između kontrolnih životinja i onih izloženih efektima prenatalne primene LPS-a.



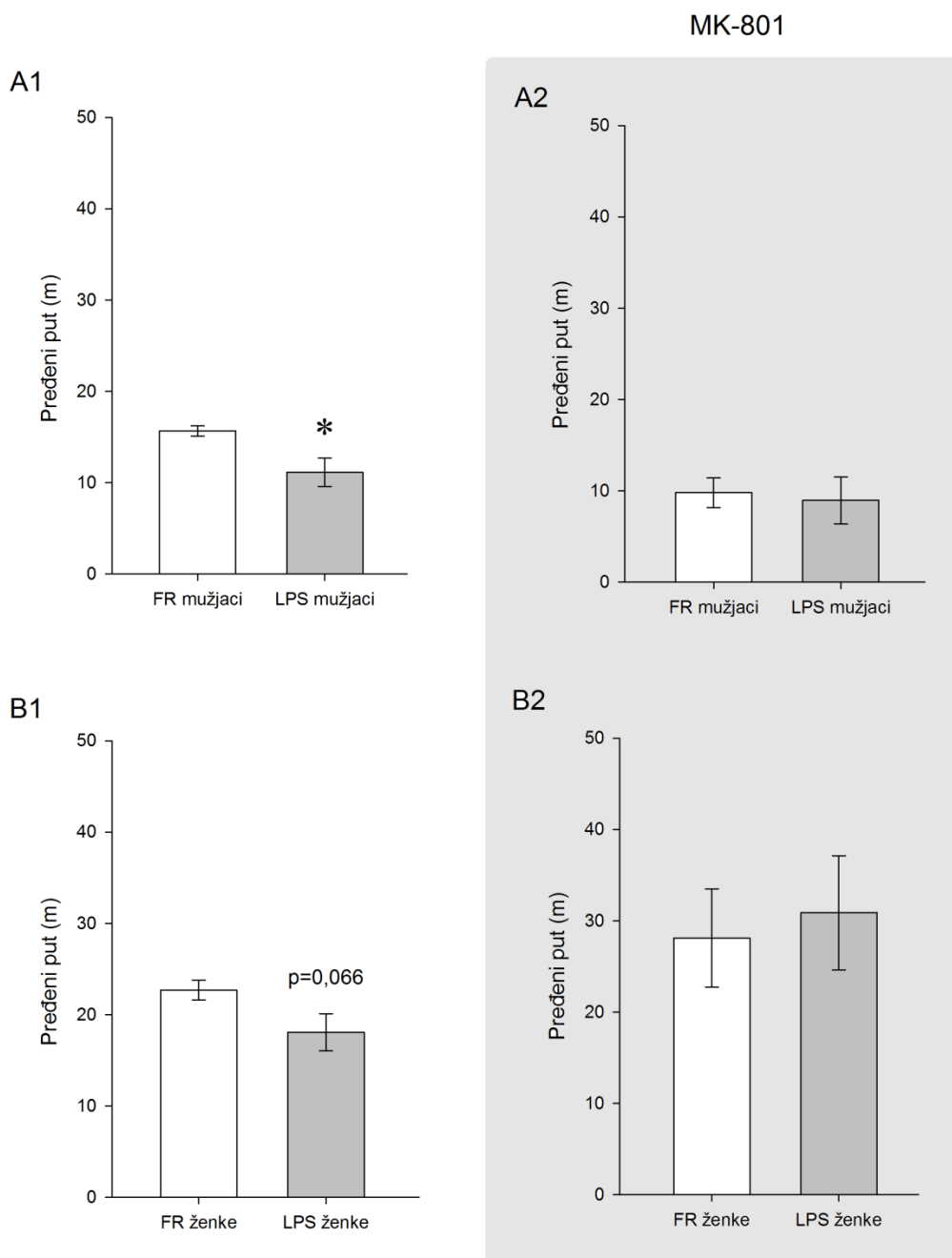
Slika 7. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put mužjaka (A1) i ženki (B1), i vreme imobilnosti kod mužjaka (A2) i ženki (B2) starosti 40 dana tokom 30 minuta praćenja (protokol A). FR - fiziološki rastvor, LPS – lipopolisaharid. U okviru jedne tretmanske grupe testirano je 7 do 8 jedinki iz 2 do 3 legla. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška.



Slika 8. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put mužjaka (A1) i ženki (B1), i vreme imobilnosti kod mužjaka (A2) i ženki (B2) starosti 60 dana tokom 30 minuta praćenja (protokol A). FR - fiziološki rastvor, LPS – lipopolisaharid. U okviru jedne tretmanske grupe testirano je 7 do 9 jedinki iz 2 do 3 legla. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Oznaka $p=0,064$ prikazuje trend povećanja pređenog puta u odnosu na kontrolne životinje, analizirano Studentovim t-testom.



Slika 9. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put tokom ispitivanja spontane lokomocije (30 min) kod mužjaka (A1) i ženki (B1), i pređeni put nakon tretmana MK-801 u dozi od 0,1 mg/kg (30 min) kod mužjaka (A2) i ženki (B2) starosti 40 dana (protokol B). FR - fiziološki rastvor, LPS – lipopolisaharid. U okviru jedne tretmanske grupe testirano je 6 do 7 jedinki iz 2 do 3 legla. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Efekat LPS-a analiziran je Studentovim t-testom. *($p < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu.



Slika 10. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put tokom ispitivanja spontane lokomocije (30 min) kod mužjaka (A1) i ženki (B1), i pređeni put nakon tretmana MK-801 u dozi od 0,1 mg/kg (30 min) kod mužjaka (A2) i ženki (B2) starosti 60 dana (protokol B). FR - fiziološki rastvor, LPS – lipopolisaharid. U okviru jedne tretmanske grupe testirano je 7 do 8 jedinki iz 2 do 3 legla. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Efekat LPS-a analiziran je Studentovim t-testom. $*(p < 0.05)$ u odnosu na kontrolnu grupu. Oznaka $p=0,066$ prikazuje trend smanjenja pređenog puta u odnosu na kontrolne životinje.

4.2. Drugi set eksperimenata

4.2.1. Kvantifikacija citokina u tkivima ženki i fetusa

Koncentracije citokina u tkivima uzorkovanim 15. i 16. dana gestacije, 2 ili 6 časova nakon primene LPS-a, prikazane su u **Tabeli 3**. Koncetracije IL-6 u čvrstim tkivima (placenta i fetusni mozak) nisu uspešno izmerene. U tkivima ženki tretiranih FR-om i njihovih fetusa, koncentracije citokina bile su ispod nivoa detekcije.

Tabela 3. Koncentracije TNF- α i IL6 u krvi ženke, placenti, amnionskoj tečnosti i fetusnom mozgu, 2 i 6 časova nakon primene LPS-a 15. i 16. dana embrionalnog razvića (E15, E16). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (pg/mL), osim kod uzoraka u kojima ovi citokini nisu detektovani (ND).

Citokin	Tkivo	Koncentracija u vremenskoj tački (pg/mL)			
		E15 (2 h)	E15 (6 h)	E16 (2 h)	E16 (6 h)
TNF- α	Krv ženke	137,05 \pm 71,12	17,22 \pm 4,91	ND	ND
	Placenta	145,71 \pm 63,08	33,36 \pm 12,67	18,33 \pm 6,73	ND
	Amn. tečnost	ND	ND	ND	ND
	Mozak fetusa	ND	ND	ND	ND
IL-6	Krv ženke	>3000	2585,75 \pm 243,71	723,33 \pm 297,14	ND
	Amn. tečnost	ND	48,50 \pm 65,48	ND	ND

4.2.2. Kvantifikacija citokina u tkivima odraslih pacova

U uzorcima krvi i moždanog tkiva odraslih pacova oba pola starosti 60 dana, prenatalno tretiranih LPS-om ili FR-om, nisu pronađene detektabilne koncentracije TNF- α i IL-6.

4.2.3. Kvantifikacija neurotransmitera u moždanom tkivu fetusa

Koncentracije svih šest neurotransmitera u mozgu fetusa predstavljene su u **Tabeli 4**. Efekat primene LPS-a na koncentraciju određenog neurotransmitera analiziran je Studentovim t-testom, zasebno u svakoj od četiri vremenske tačke. Značajno povećanje koncentracije GABA-e u odnosu na vrednosti u kontrolnom tkivu zabeleženo je 6 h nakon primene prve doze LPS-a ($t_{(16)}=2,655$, $p=0,017$), dok je

Tabela 4. Koncentracije dopamina (DA), γ -aminobuterne kiseline (GABA), glutamata (Glu), acetilholina (ACh), noradrenalina (NA) i serotonina (5-HT) u fetusnom mozgu, 2 h i 6 h nakon administracije LPS-a ili FR-a. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna greška ($\mu\text{g/g}$) i analizirani Studentovim t-testom. Uzorci su uzimani od po 3 ženke u svakoj vremenskoj tački. *($p<0,05$) i ^t($p<0,10$) u odnosu na kontrolu u datoj vremenskoj tački.

Tretman / vremenska tačka	Koncentracija neurotransmitera ($\mu\text{g/g}$)					
	DA	GABA	GLU	ACh	NA	5-HT
LPS / E15 (2 h)	0,14 \pm 0,01	15,82 \pm 0,71	543,88 \pm 9,99 ^t	0,25 \pm 0,10	10,12 \pm 0,88	0,07 \pm 0,00
FR / E15 (2 h)	0,14 \pm 0,01	16,64 \pm 0,66	575,75 \pm 15,77	0,28 \pm 0,08	9,90 \pm 0,87	0,08 \pm 0,01
LPS / E15 (6 h)	0,11 \pm 0,01	27,17 \pm 3,49 *	567,04 \pm 12,42*	0,12 \pm 0,04	9,48 \pm 0,50	0,06 \pm 0,00
FR / E15 (6 h)	0,10 \pm 0,01	13,66 \pm 1,33	624,90 \pm 24,87	0,15 \pm 0,06	8,70 \pm 0,71	0,06 \pm 0,00
LPS / E16 (2 h)	0,12 \pm 0,01	15,36 \pm 1,17	508,48 \pm 27,77	0,24 \pm 0,09	9,86 \pm 0,79	0,06 \pm 0,00
FR / E16 (2 h)	0,11 \pm 0,01	14,64 \pm 1,78	540,62 \pm 12,33	0,21 \pm 0,09	9,74 \pm 0,86	0,05 \pm 0,00
LPS / E16 (6 h)	0,11 \pm 0,00	16,74 \pm 1,28	498,60 \pm 13,69	0,19 \pm 0,05	9,15 \pm 0,49	0,06 \pm 0,00
FR / E16 (6 h)	0,11 \pm 0,01	14,44 \pm 5,31	515,28 \pm 30,79	0,28 \pm 0,11	8,98 \pm 0,87	0,06 \pm 0,01

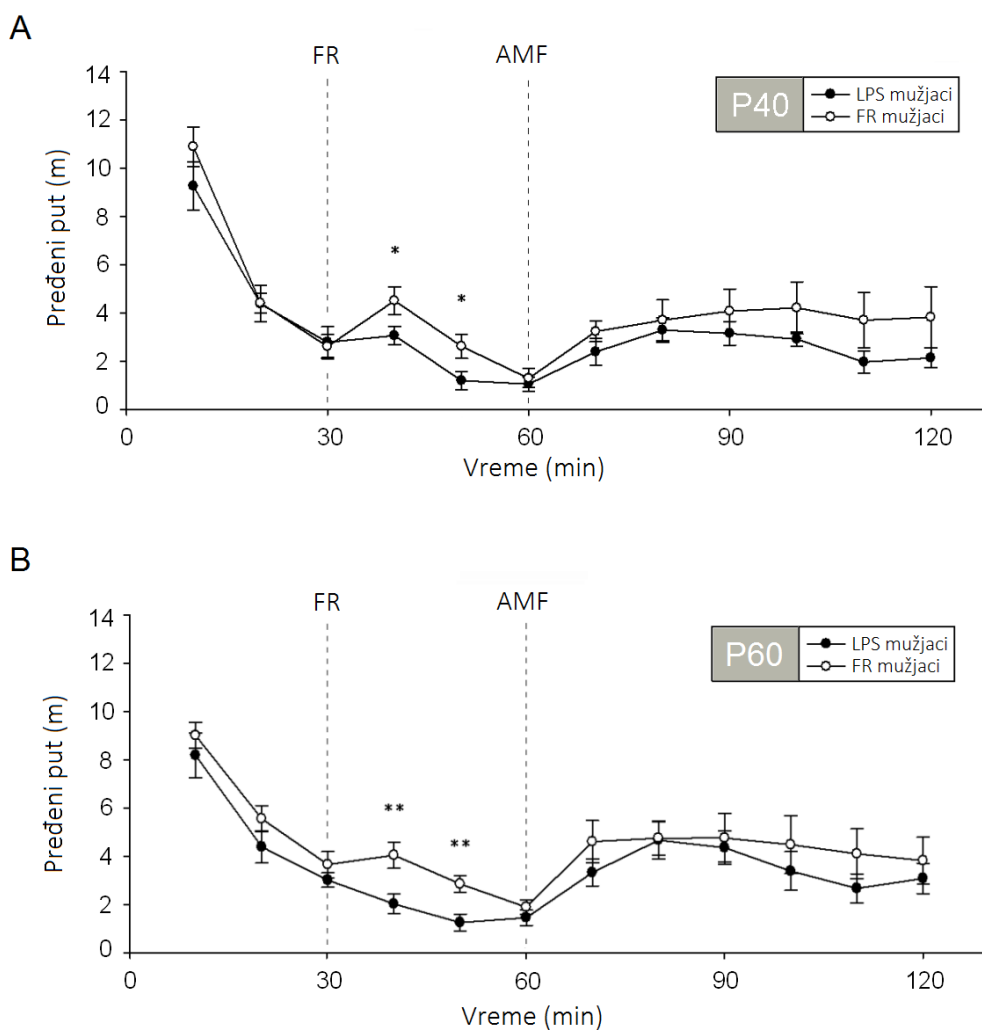
koncentracija glutamata u istoj vremenskoj tački značajno opala ($t_{(16)}=2,346$, $p=0,032$), a trend ovog pada zabeležen je već 2 h nakon prve administracije LPS-a ($t_{(13)}=1,801$, $p=0,095$).

4.2.4. Efekti primene lipopolisaharida na spontanu i amfetaminom indukovanu lokomotornu aktivnost

Rezultati ispitivanja lokomotorne aktivnosti pacova u drugom setu eksperimenata analizirani su dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem u kojoj su kao faktori korišćeni prenatalni tretman i vremenski interval. Ukupno je odrađeno dvanaest ovakvih analiza; ponašanje životinja odgovarajuće starosti i pola zasebno je analizirano u sva tri segmenta testiranja (habituciji, placebo segmentu i amfetaminskom segmentu). Ni u jednoj od ovih analiza nije otkrivena značajna interakcija između dva navedena faktora, dok je glavni efekat vremenskog intervala u okviru svake analize bio značajan, ali ne i od intreresa za dalju diskusiju pa prateće vrednosti neće biti navedene.

Vrednosti pređenog puta muških potomaka prikazane su na **Slici 11**. Analizom ponašanja mužjaka starosti 40 dana utvrđeno je da prenatalna primena LPS-a nije uticala na pređeni put u segmentu habituacije ($F_{(1,32)}=0,587$, $p=0,307$), ali jeste dovela do značajnog smanjenja pređenog puta u sledećem segmentu, nakon administracije placebo injekcije, u odnosu na vrednosti kontrolne grupe ($F_{(1,32)}=5,599$, $p=0,031$). Pređeni put u trećem segmentu, pod dejstvom amfetamina, nije bio pod značajnim uticajem prenatalnog tretmana ($F_{(1,80)}=1,583$, $p=0,226$).

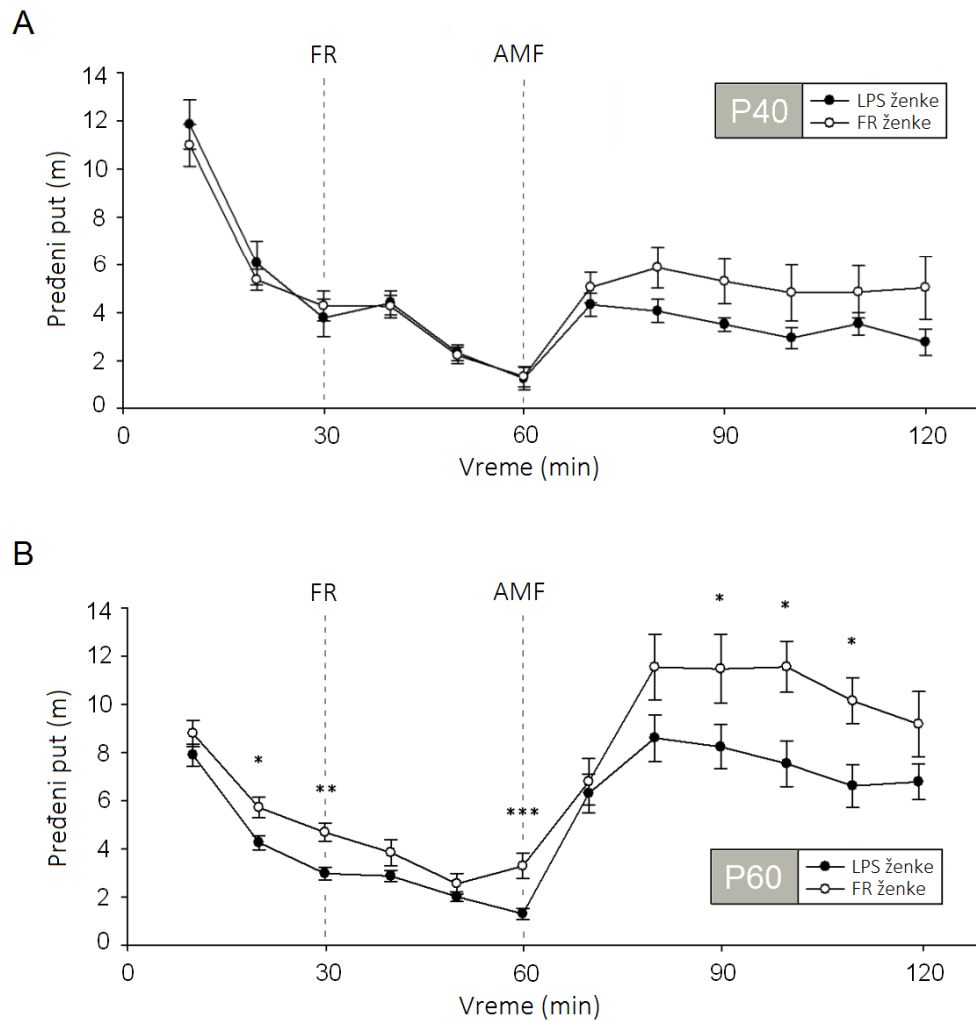
Kada je testirana lokomotorna aktivnost mužjaka starosti 60 dana (**Slika 11**), uočeno je da je LPS uticao na pređeni put na isti način: u prvom segmentu nije bilo efekta ($F_{(1,20)}=1,507$, $p=0,248$), ali je u drugom segmentu pređeni put bio značajno manji u poređenju sa kontrolnom grupom ($F_{(1,20)}=13,613$, $p=0,004$), dok u trećem segmentu nije bilo razlike između dve grupe ($F_{(1,50)}=0,668$, $p=0,433$). Procedura višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom otkrila je da su LPS mužjaci starosti 40 i 60 dana, nakon injekcije fiziološkog rastvora, manji put prelazili u narednih 20 minuta. Ovaj efekat LPS-a na lokomotorni odgovor na placebo injekciju (P40: $p=0,020$ i $p=0,022$; P60: $p=0,001$ i $p=0,007$) prikazan je na **Slici 11**.



Slika 11. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put mužjaka starosti 40 dana (A) i 60 dana (B) tokom tri vremenska segmenta: habituacije (0-30 min), nakon *i.p.* primene fiziološkog rastvora (30-60 min) i nakon *i.p.* primene amfetamina u dozi 0,5 mg/kg (60-120 min). FR - fiziološki rastvor, AMF – amfetamin. U okviru jedne tretmanske grupe testirani su pacovi iz 8 do 10 (P40) ili 5 do 7 (P60) legala. Pređeni put je prikazan u metrima po vremenskim intervalima od 10 min (srednja vrednost \pm standardna greška). Glavni efekat LPS-a je analiziran dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i predstavljen značajnostima iz procedure višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom: *($p < 0,05$) i **($p < 0,01$) u odnosu na kontrolne životinje.

Između LPS-om tretiranih i kontrolnih ženki pacova starosti 40 dana nije bilo razlike u pređenom putu ni u jednom od tri segmenta ($F_{(1,28)}=0,145$, $p=0,709$; $F_{(1,28)}=0,022$, $p=0,883$; $F_{(1,70)}=2,761$, $p=0,119$) kao što je prikazano na **Slici 12**. Kada su testirane ženke starosti 60 dana uočeno je da je LPS doveo do značajnog smanjenja pređenog puta u sva tri segmenta (**Slika 12**). Kada je razlika u pređenom putu u segmentu

habituacije ($F_{(1,24)}=10,235$; $p=0,008$) analizirana po vremenskim intervalima uočeno je značajno smanjenje pređenog puta kod LPS ženki u drugom i trećem intervalu ($p=0,015$ i $p=0,005$). U drugom segmentu smanjenje puta koji su prelazile LPS ženke u odnosu na kontrole ($F_{(1,24)}=10,143$, $p=0,008$),

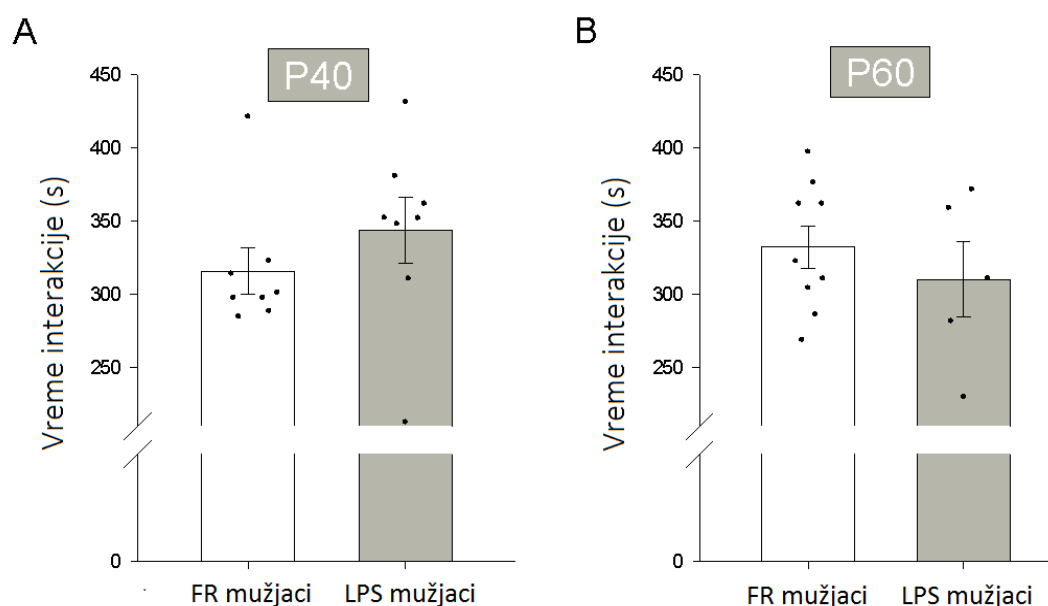


Slika 12. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put ženki starosti 40 dana (A) i 60 dana (B) tokom tri vremenska segmenta: habituacije (0-30 min), nakon *i.p.* primene fiziološkog rastvora (30-60 min) i nakon *i.p.* primene amfetamina u dozi 0,5 mg/kg (60-120 min). FR - fiziološki rastvor, AMF – amfetamin. U okviru jedne tretmanske grupe testirani su pacovi iz 6 do 8 legala. Pređeni put je prikazan u metrima po vremenskim intervalima od 10 min (srednja vrednost \pm standardna greška). Glavni efekat LPS-a je analiziran dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i predstavljen značajnostima iz procedure višestrukog uparenog *post hoc* poredenja SNK metodom: *($p<0,05$), **($p<0,01$), *($p<0,001$) u odnosu na kontrolne životinje.**

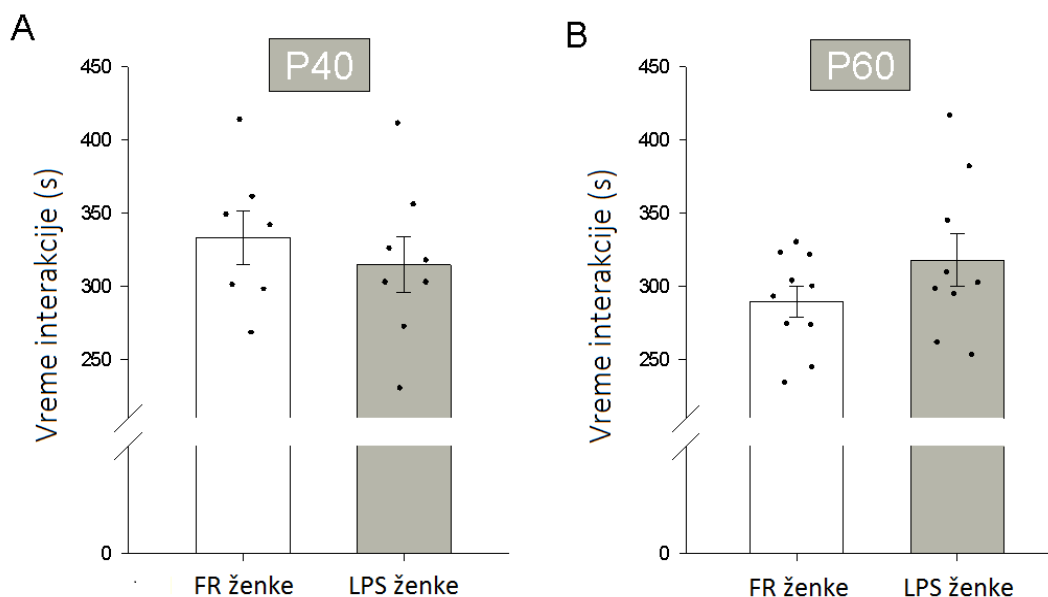
bilo je naročito izraženo u poslednjih 10 minuta ovog segmenta ($p < 0,001$). Takođe, pređeni put pod dejstvom amfetamina bio je kraći kod LPS ženki u poređenju sa kontrolnom grupom ($F_{(1,60)} = 5,185$; $p = 0,042$), i to u sledećim intervalima: 20–30 min ($p = 0,036$), 30–40 min ($p = 0,011$) i 40–50 min ($p = 0,023$). Ove značajnosti su prikazane na **Slici 12**.

4.2.5. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u testu socijalne interakcije

Vreme koje je par LPS životinja istog pola i određene statisti proveo u interakciji poređeno je sa vremenom interakcije kontrolnih životinja primenom Studentovog t-testa. Prenatalni tretman nije značajno uticao na vreme interakcije kod mužjaka starosti 40 dana ($t_{14} = 1,023$, $p = 0,324$) ili 60 dana ($t_{12} = 0,808$, $p = 0,435$), kao ni kod ženki starosti 40 dana ($t_{13} = 0,696$, $p = 0,499$) ili 60 dana ($t_{17} = 1,390$, $p = 0,182$). Rezultati testa socijalne interakcije prikazani su za mužjake na **Slici 13**, a za ženke na **Slici 14**.



Slika 13. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na vreme provedeno u socijalnoj interakciji kod mužjaka starosti 40 dana (A) i 60 dana (B). Efekat je analiziran Studentovim t-testom. Broj legala po grupi iznosio je 5-10. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svako leglo.



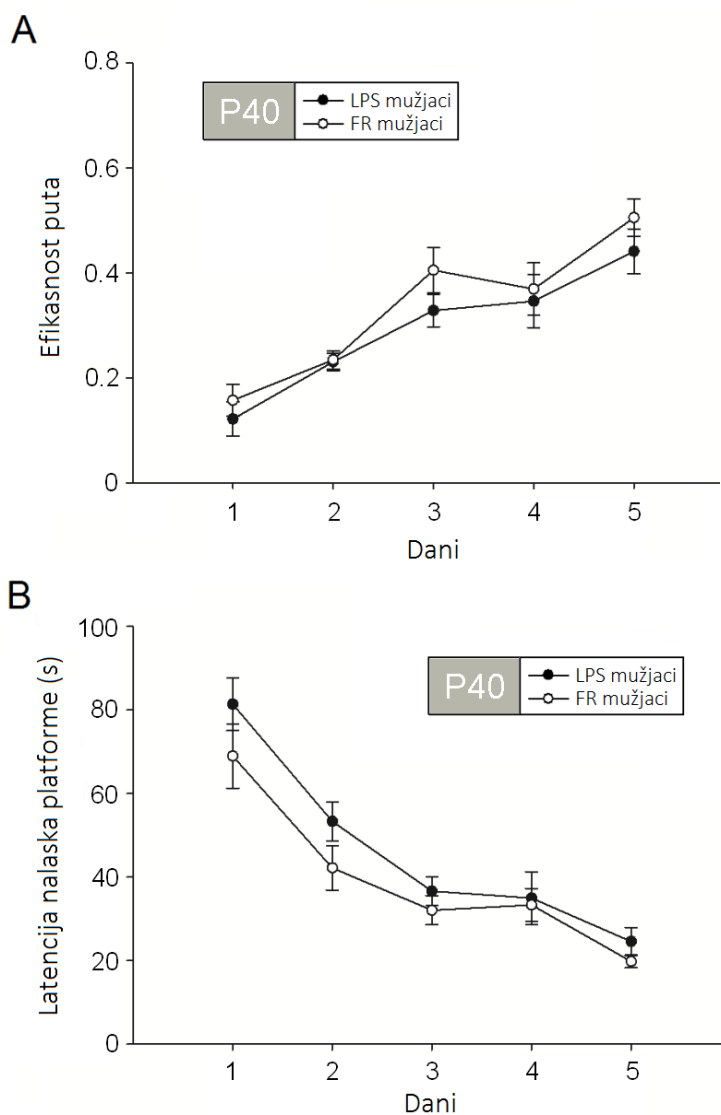
Slika 14. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na vreme provedeno u socijalnoj interakciji kod mužjaka starosti 40 dana (A) i 60 dana (B). Efekat je analiziran Studentovim t-testom. Broj legala po grupi iznosio je 5-10. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svako leglo.

4.2.6. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u Morisovom vodenom lavirintu

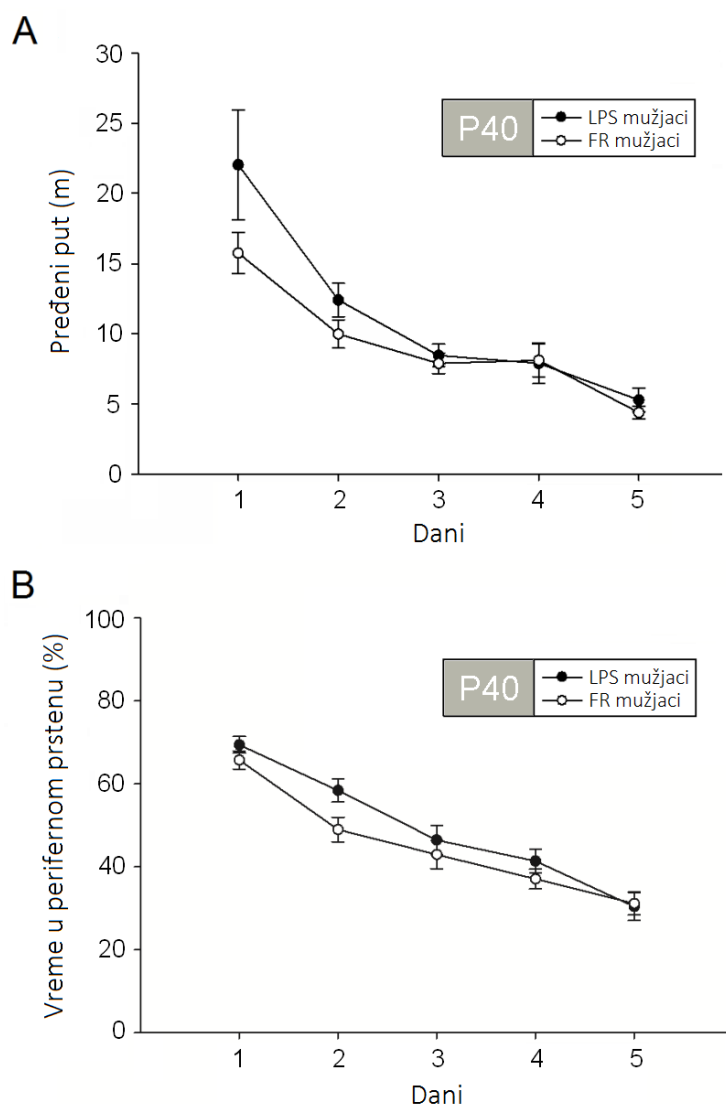
Odabrani parametri ponašanja pacova tokom pet dana akvizicije u MVL-u analizirani su dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem, a kao faktori su uzeti prenatalni tretman i dan akvizicije. Rezultati životinja određene starosti i pola obrađivani su odvojeno, tako da je za svaki parametar odrađeno ukupno četiri dvofaktorske ANOVE sa ponavljanjem. U testu pozivanja memorije, za poređenje rezultata koje su ostvarile LPS životinje određene starosti i pola sa kontrolnom grupom, korišćen je Studentov t-test. Ni u jednoj dvofaktorskoj ANOVI sa ponavljanjem nije bilo značajnih interakcija između prenatalnog tretmana i dana akvizicije, dok je glavni efekat dana akvizicije bio značajan u svim sprovedenim analizama što je i očekivano u petodnevnom MVL protokolu i ovi rezultati nisu od značaja za dalju diskusiju pa stoga prateće vrednosti neće biti navođene.

U analizi procesa akvizicije kod mužjaka starosti 40 dana nije uočen uticaj prenatalnog tretmana na odabrane parametre: latencija do nalaska platforme ($F_{(1,48)}=2,484$, $p=0,141$), pređeni put ($F_{(1,48)}=3,764$, $p=0,076$), efikasnost puta

($F_{(1,48)}=3,101$, $p=0,104$), i procenat vremena u perifernom prstenu ($F_{(1,48)}=3,688$, $p=0,079$). Ovi rezultati prikazani su na **Slici 15** i **Slici 16**. Takođe, ni u testu pozivanja memorije LPS nije uticao na efikasnost puta do prvog ulaska u ciljnu zonu ($t_{12}=0,330$, $p=0,747$), kao što je prikazano na **Slici 19**, niti na broj ulazaka u ciljnu zonu ($t_{12}=0,302$; $p=0,768$) što ovde nije grafički prikazano.



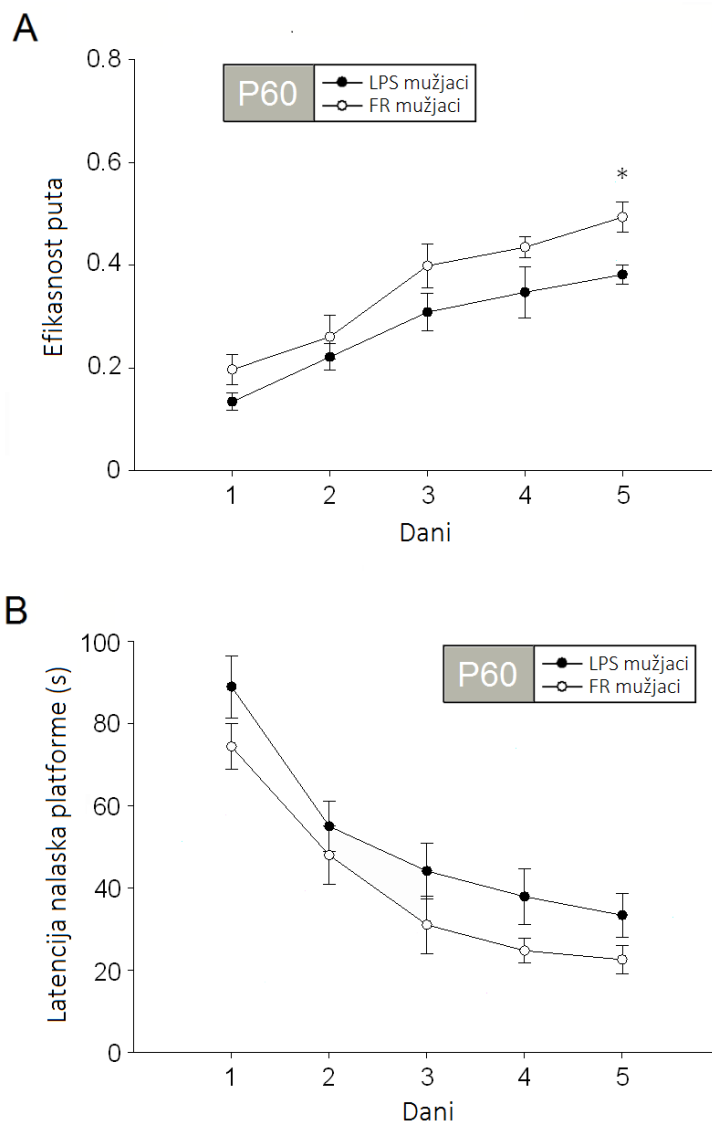
Slika 15. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na efikasnost puta (A) i latenciju nalaska platforme (B) u MVL-u tokom 5 dana akvizicije kod mužjaka starosti 40 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost parametra \pm standardna greška. Broj legala po grupi iznosio je 8. Glavni efekat LPS-a je analiziran dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i dodatnom procedurom višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom.



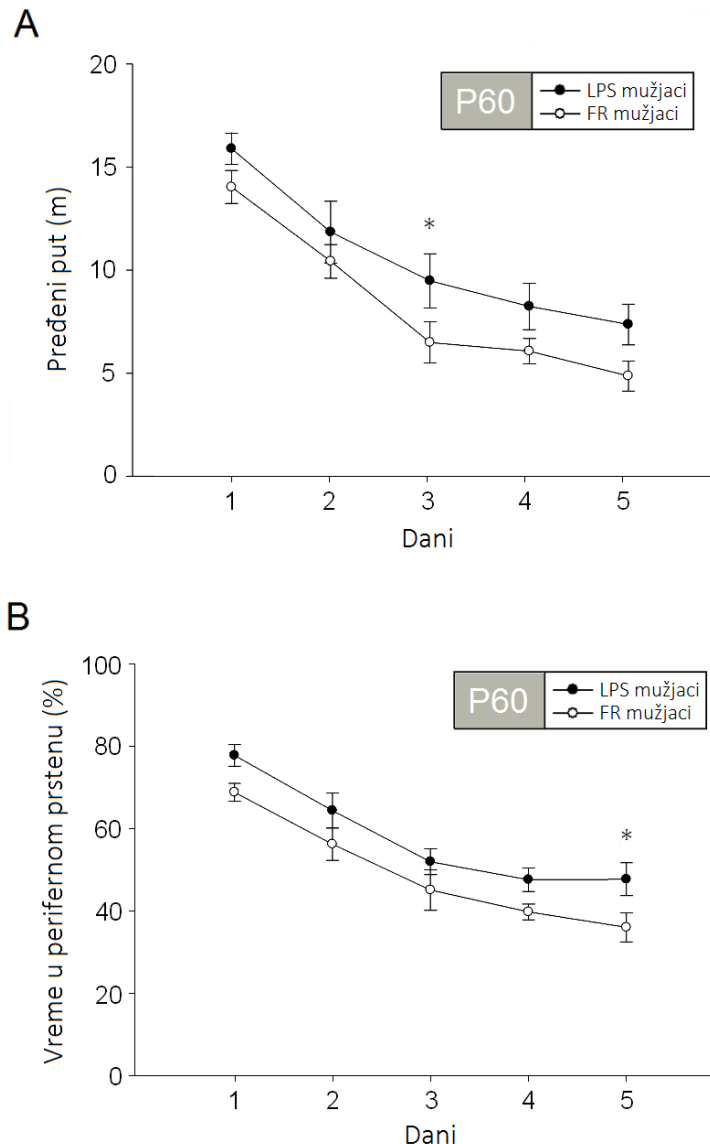
Slika 16. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put u MVL-u (A) i vreme u perifernom prstenu (B) tokom 5 dana akvizicije kod mužjaka starosti 40 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost parametra \pm standardna greška. Broj legala po grupi iznosio je 8. Glavni efekat LPS-a je analiziran dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i dodatnom procedurom višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom.

Analizom ponašanja mužjaka starosti 60 dana utvrđeno je da je LPS značajno uticao na proces akvizicije. LPS mužjaci su ostvarili značajno manju efikasnost puta ($F_{(1,56)}=8,244$, $p=0,012$; **Slika 17A**), prelazili značajno veći put do platforme ($F_{(1,56)}=6,200$, $p=0,026$; **Slika 18A**) i provodili značajno više vremena u perifernom prstenu ($F_{(1,56)}=5,288$, $p=0,037$; **Slika 18B**), dok je povećanje latencije nalaska platforme dostiglo trend značajnosti ($F_{(1,56)}=4,566$, $p=0,051$; **Slika 17B**) u poređenju

sa kontrolom. U testu pozivanja memorije LPS mužjaci su ostvarili manju efikasnost do prvog ulaska u ciljnu zonu ($t_{14}=2,770$, $p=0,015$; **Slika 19**), dok u broju ulazaka u ciljnu zonu nije bilo razlike ($t_{14}=0,337$, $p=0,741$), što nije grafički prikazano.



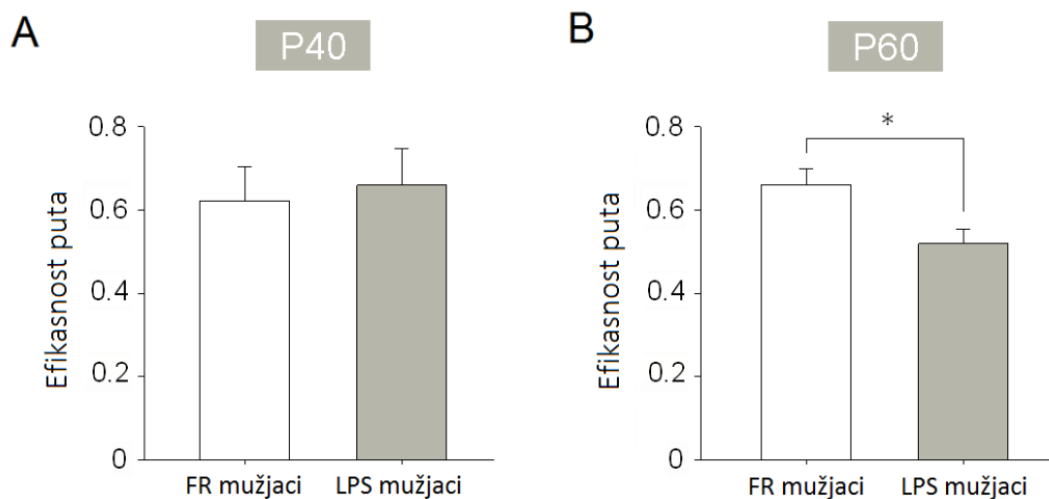
Slika 17. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na efikasnost puta(A) i latenciju nalaska platforme (B) u MVL-u tokom 5 dana akvizicije kod mužjaka starosti 60 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost parametra \pm standardna greška. Broj legala po grupi iznosio je 8. Glavni efekat LPS-a je analiziran dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i predstavljen značajnostima iz dodatne procedure višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom: $*(p<0.05)$ u odnosu na kontrolne životinje.



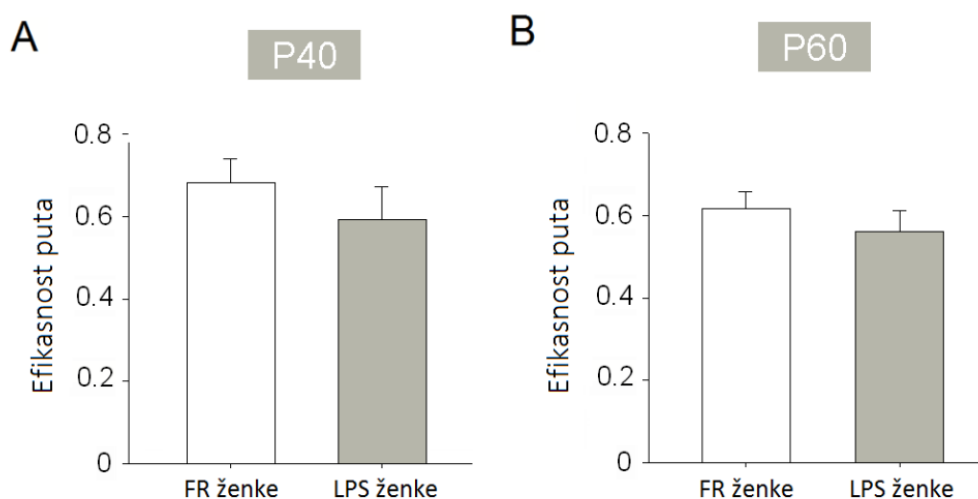
Slika 18. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put u MVL-u (A) i vreme u perifernom prstenu (B) tokom 5 dana akvizicije kod mužjaka starosti 60 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost parametra \pm standardna greška. Broj legala po grupi iznosio je 8. Glavni efekat LPS-a je analiziran dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i predstavljen značajnostima iz dodatne procedure višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom: *($p < 0.05$) u odnosu na kontrolne životinje.

Kod ženki pacova starosti 40 i 60 dana u procesu akvizicije nije bilo značajnog uticaja LPS-a na letenciju do pronalaska platforme (P40: $F_{(1,52)}=2,381$, $p=0,147$ i P60: $F_{(1,56)}=0,005$, $p=0,945$; **Slika 21**), niti na ostale parametre od interesa. Prenatalni tretman nije uticao na efikasnost puta do prvog ulaska u ciljnu zonu u testu pozivanja memorije (P40: $t_{13}=0,887$, $p=0,391$) i P60 ($t_{14}=0,862$, $p=0,403$), što je

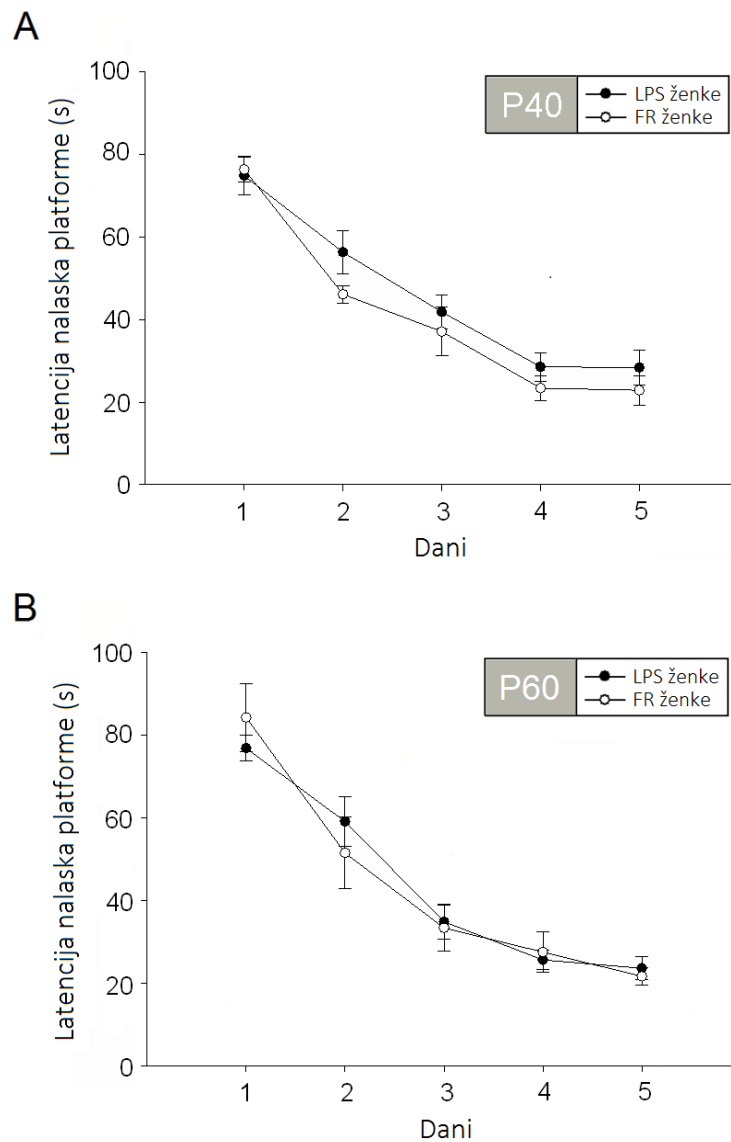
prikazano na **Slici 20**, kao ni na broj ulazaka u ciljnu zonu (P40: $t_{13}=0,249$, $p=0,807$; P60: $t_{14}=2,066$, $p=0,058$), što nije grafički prikazano.



Slika 19. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na efikasnost puta do prvog ulaska u ciljnu zonu MVL-a u testu pozivanja memorije kod mužjaka starosti 40 dana (A) i 60 dana (B). Broj legala po grupi iznosio je 8. Oznake na slici predstavljaju značajnosti dobijene u Studentovom t-testu: $*(p<0,05)$ u odnosu na kontrolne životinje.



Slika 20. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na efikasnost puta do prvog ulaska u ciljnu zonu MVL-a u testu pozivanja memorije kod ženki starosti 40 dana (A) i 60 dana (B). Efekat je analiziran Studentovim t-testom. Broj legala po grupi iznosio je 8.

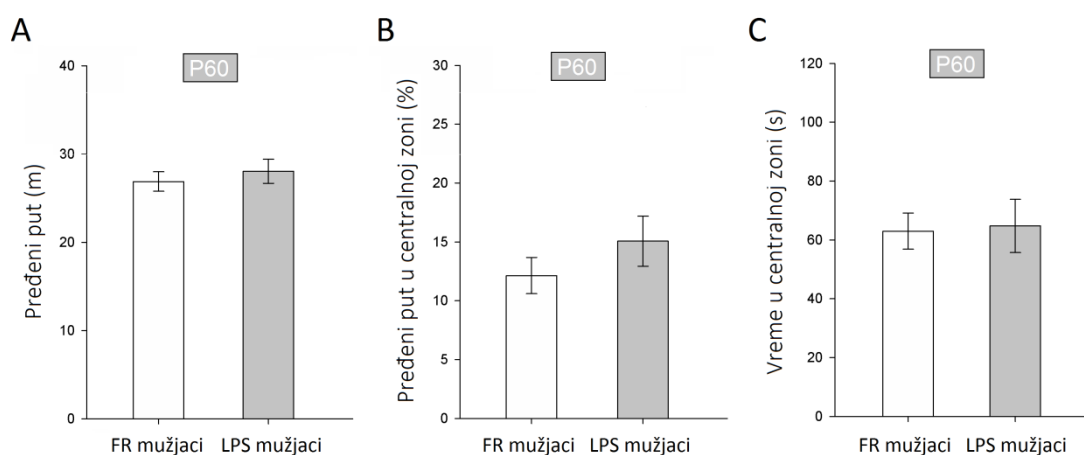


Slika 21. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na i latenciju nalaska platforme MVL-u kod ženki starosti 40 dana (A) i 60 dana (B) tokom 5 dana akvizicije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost parametra \pm standardna greška. Broj legala po grupi iznosio je 8. Glavni efekat LPS-a je analiziran dvofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem i dodatnom procedurom višestrukog uparenog *post hoc* poređenja SNK metodom.

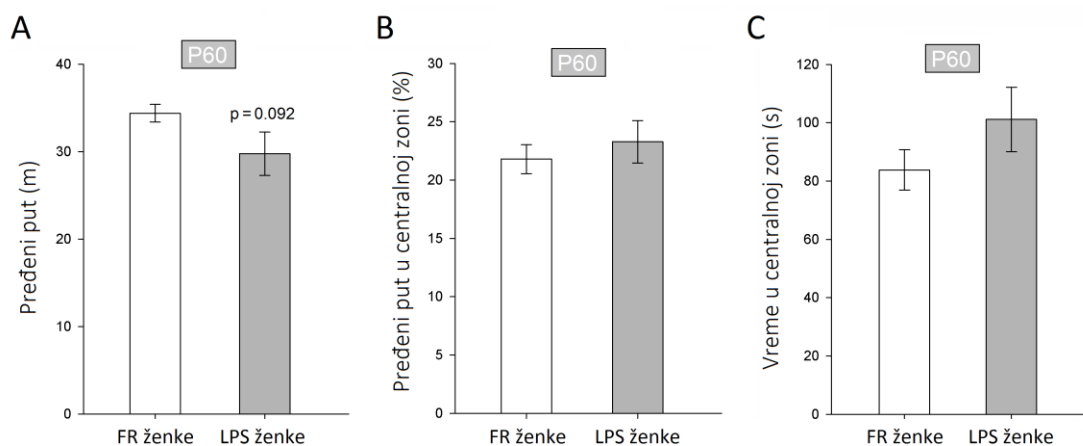
4.2.7. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u testu otvorenog polja

Kod mužjaka starosti 60 dana, LPS, čiji su efekti u ovom testu analizirani Studentovim t-testom, nije značajno uticao na opštu aktivnost sageldanu kroz parametar pređeni put ($t_{14}=0,665$, $p=0,517$), kao ni na bazičnu anksioznost izraženu kao procenat pređenog puta u centralnoj zoni ($t_{14}=1,111$, $p=0,285$) ili vreme provedeno u centralnoj zoni ($t_{14}=0,165$, $p=0,871$), kao što je prikazano na **Slici 22**.

Kod ženki starosti 60 dana (**Slika 23**) prenatalna primena LPS-a je dovela do smanjenja pređenog puta tokom 10 minuta eksplorativne aktivnosti u otvorenom polju i ovaj efekat LPS-a je dostigao statistički trend ($t_{13}=1,817$, $p=0,092$) u odnosu na kontrolnu grupu. Dodatno, u ovom testu ni kod ženki nije zabeležen značajan efekat LPS-a na parametre anksioznosti: procenat puta u centralnoj zoni ($t_{13}=0,689$, $p=0,503$) ili vreme provedeno u centralnoj zoni ($t_{13}=1,365$, $p=0,195$).



Slika 22. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put (A), procenat pređenog puta u centralnoj zoni (B) i vreme u centralnoj zoni (C) otvorenog polja kod mužjaka starosti 60 dana. Broj legala po grupi je bio 7-8. Efekat LPS-a analiziran je Studentovim t-testom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška.

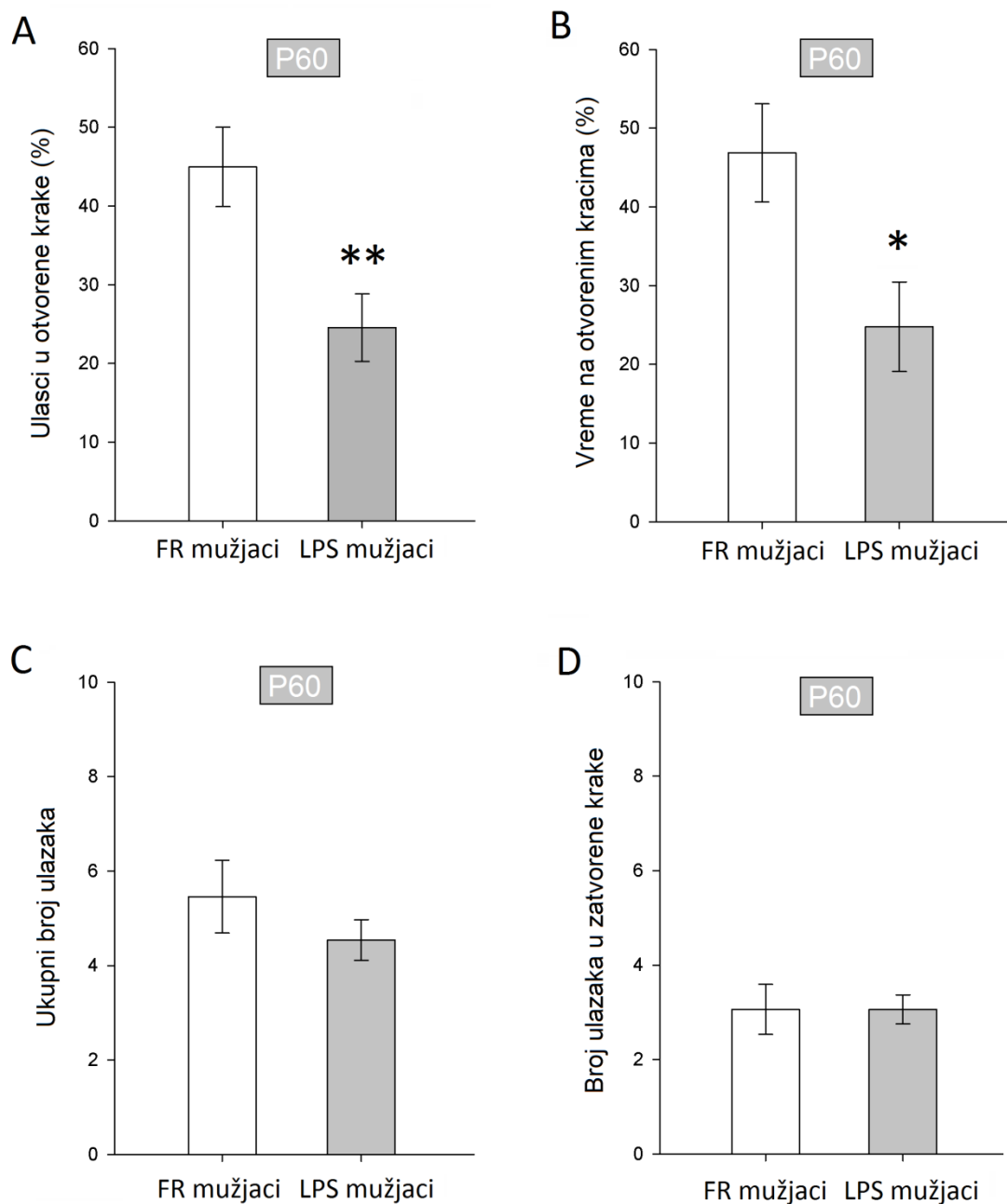


Slika 23. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na pređeni put (A), procenat pređenog puta u centralnoj zoni (B) i vreme u centralnoj zoni (C) otvorenog polja kod ženki starosti 60 dana. Broj legala po grupi je bio 7-8. Efekat LPS-a analiziran je Studentovim t-testom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška. Oznaka $p=0,092$ prikazuje trend smanjenja pređenog puta u odnosu na kontrolne životinje.

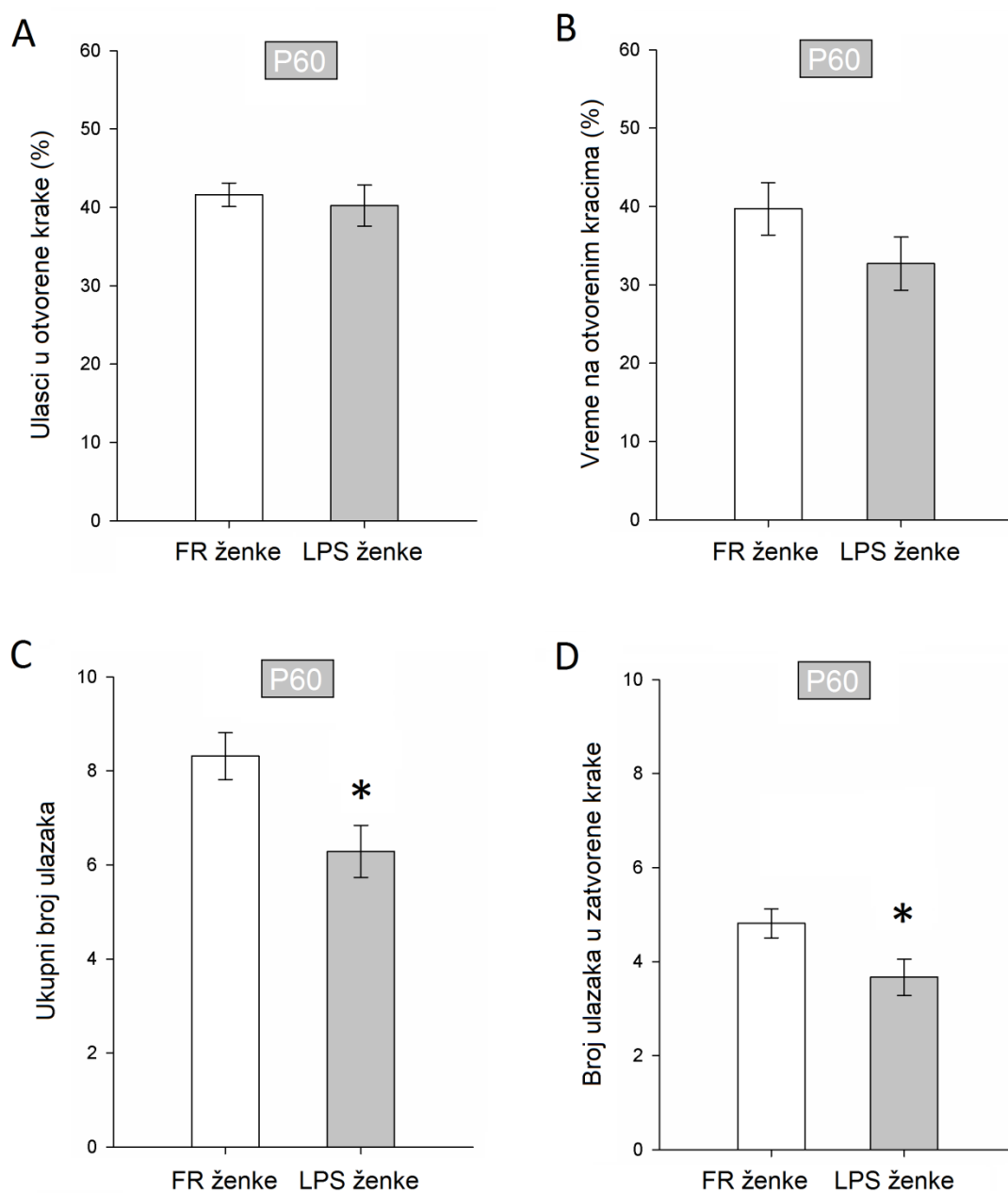
4.2.8. Efekti primene lipopolisaharida na ponašanje u uzdignutom plus lavirintu

Svi parametri ponašanja LPS životinja određene starosti i pola u UPL-u poređeni su sa vrednostima kontrolne grupe Studentovim t-testom. Prenatalna primena LPS-a je kod mužjaka starosti 60 dana za posledicu imala povećanje anksioznosti koje je izmereno kroz smanjenje procenta ulazaka u otvorene krake ($t_{14}=3,088$, $p=0,008$) i procenta vremena na otvorenim kracima ($t_{14}=2,620$, $p=0,020$). LPS nije značajanouticao na parametre opšte aktivnosti: ukupni broj ulazaka ($t_{14}=1,040$, $p=0,316$) ili broj ulazaka u zatvorene krake ($t_{14}=0,000$, $p=1,000$). Ovi rezultati su prikazani na **Slici 24**.

S druge strane, kod ženki starosti 60 dana prenatalni tretman LPS-om doveo je do značajnog smanjenja nivoa opšte aktivnosti odnosno smanjenja broja ukupnih ulazaka ($t_{13}=2,728$, $p=0,017$) i broja ulazaka u zatvorene krake ($t_{13}=2,351$, $p=0,035$), ali nije uticao na vrednosti parametara anksioznosti: procenat vremena provedenog na otvorenim kracima ($t_{13}=1,462$, $p=0,168$) ili procenat ulazaka u otvorene krake ($t_{13}=0,473$, $p=0,644$). Ovi rezultati su prikazani na **Slici 25**.



Slika 24. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na procenat ulazaka u otvorene krake (A), procenat vremena na otvorenim kracima (B), ukupan broj ulazaka (C) i broj ulazaka u zatvorene krake (D) uzdignutog plus lavirinta kod mužjaka pacova starosti 60 dana. Broj legala po grupi je bio 7-8. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška, a oznake predstavljaju značajnosti dobijene Studentovim t-testom: *($p < 0,05$) i **($p < 0,01$) u odnosu na kontrolne životinje.



Slika 25. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na procenat ulazaka u otvorene krake (A), procenat vremena na otvorenim kracima (B), ukupan broj ulazaka (C) i broj ulazaka u zatvorene krake (D) uzdignutog plus lavirinta kod ženki pacova starosti 60 dana. Broj legala po grupi je bio 7-8. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška, a oznake predstavljaju značajnosti dobijene Studentovim t-testom: $*(p < 0,05)$ u odnosu na kontrolne životinje.

4.3. Treći set eksperimenata

4.3.1. Kinetika ponavljane primene MP-III-022

U farmakokinetičkoj studiji sprovedenoj na posebnoj kohorti prenatalno netretiranih mladunaca određene su ukupne koncentracije MP-III-022, primenjenog u dozi 2,5 mg/kg, u mozgu pacova nakon jednog, tri ili sedam dana primene počevši od 22. dana života. Nakon toga, slobodne koncentracije u mozgu su procenjene tako što su vrednosti ukupnih koncentracija pomnožene sa vrednošću slobodne frakcije MP-III-022 u moždanom tkivu (6,61%) koja je predhodno određena metodom brze ekvilibrijumske dijalize u studiji Stamenić i sar. (2016). Ukupne i procenjene slobodne koncentracije MP-III-022 predstavljene su u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Ukupne i slobodne koncentracije MP-III-022 primenjenog u dozi 2,5 mg/kg, u mozgu mladunaca starosti između 22 i 28 dana. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna greška (nmol/kg), n=3.

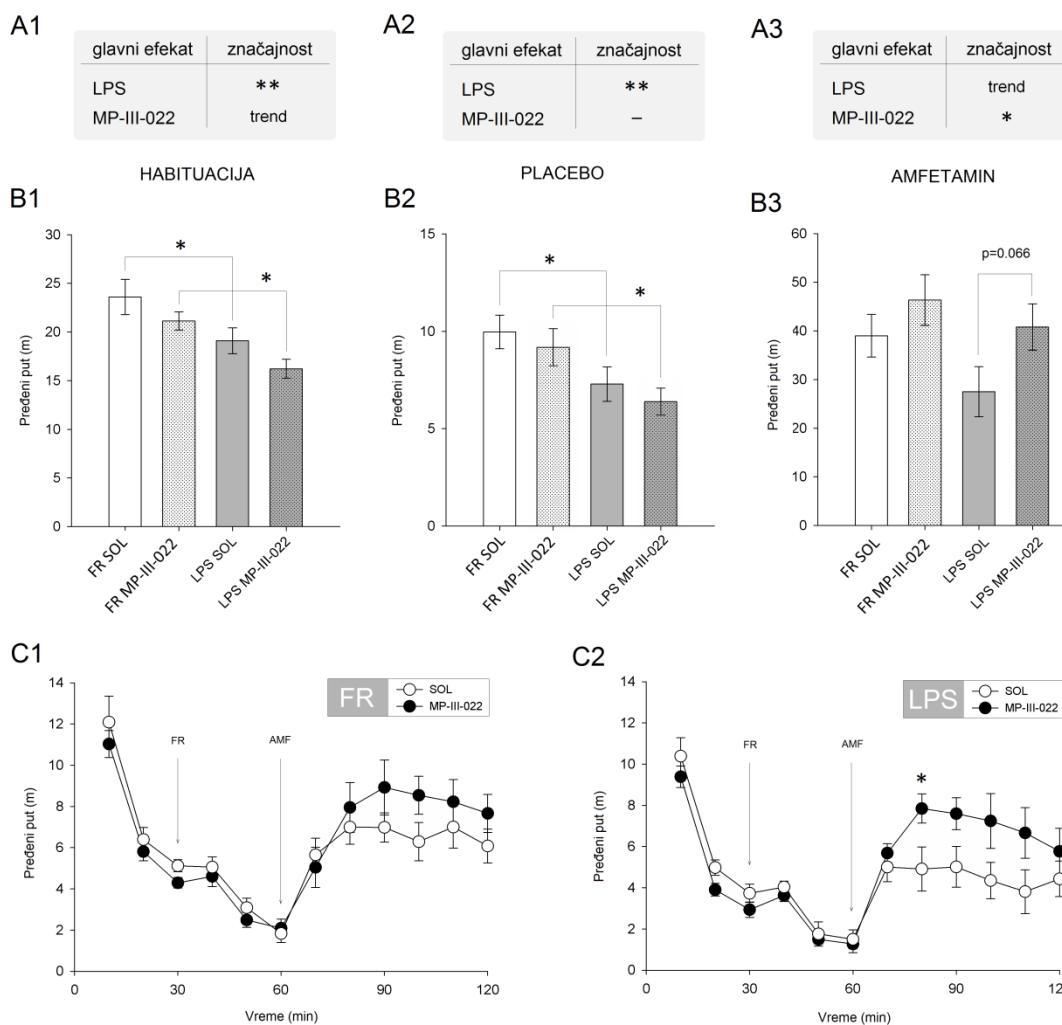
Pol	Vreme administracije	koncentracija (nmol/kg)	
		Ukupna	Slobodna
Mužjaci	20 min posle 1. doze	1408,64 \pm 330,42	93,11 \pm 0,02
	24 h posle 1. doze	139,76 \pm 70,27	9,24 \pm 0,01
	20 min posle 3. doze	1653,90 \pm 696,19	109,32 \pm 0,05
	20 min posle 7. doze	1318,81 \pm 1119,20	87,17 \pm 0,07
	24 h posle 7. doze	148,41 \pm 8,55	9,81 \pm 0,01
Ženke	20 min posle 1. doze	981,65 \pm 285,25	64,89 \pm 0,02
	24 h posle 1. doze	38,95 \pm 8,71	2,57 \pm 0,01
	20 min posle 3. doze	517,77 \pm 118,06	34,22 \pm 0,01
	20 min posle 7. doze	345,53 \pm 177,92	22,84 \pm 0,01
	24 h posle 7. doze	216,03 \pm 71,92	14,28 \pm 0,01

4.3.2. Efekti primene lipopolisaharida i liganda MP-III-022 na spontanu i amfetaminom indukovanu lokomotornu aktivnost

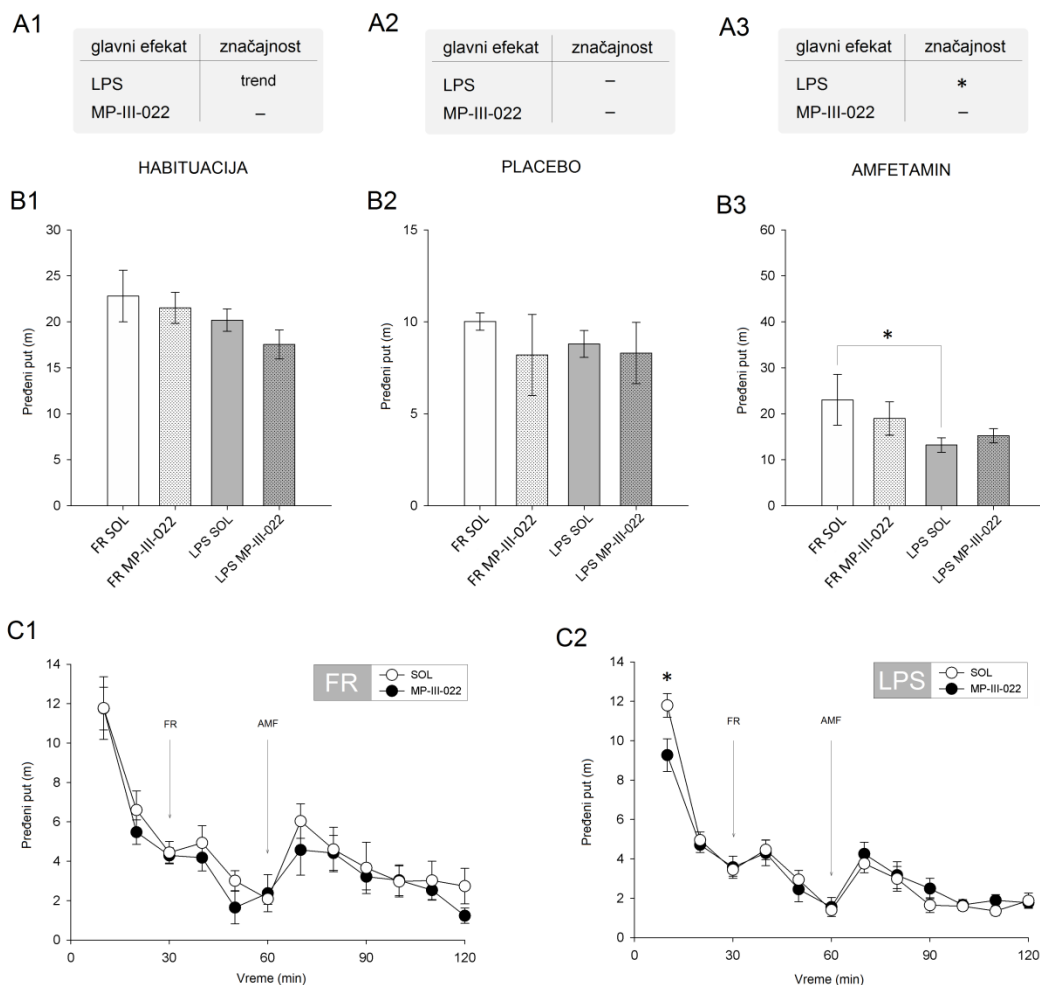
Ukupno šest trofaktorskih ANOVA sa ponavljanjem je korišćeno za analize pređenog puta u svakom od tri segmenta (habituacija, placebo segment i amfetaminski segment) i to odvojeno za ženke (**Slika 26**) i mušjake (**Slika 27**) Na ovim slikama su na panelu A prikazane značajnosti glavnih efekata faktora LPS i MP-III-022, dok su značajnosti *post hoc* analiza prikazane na graficima B, C, D, E i F. Tačne F i p vrednosti za faktore LPS i MP-III-022 i njihovu interakciju prikazane su u **Tabeli 6**. Efekat vremenskog intervala kao faktora je bio značajan, ali nije od interesa za dalju diskusiju pa te vrednosti ovde nisu prikazane.

Tabela 6. Rezultati trofaktorske ANOVE sa ponavljanjem (faktori: LPS, MP-III-022 i vreme) koja je rađena za svaki segment testa lokomocije. Prikazane su F i p vrednosti za faktore LPS i MP-III-022, kao i njihovu interakciju.

Segment	Efekti	Pol	
		Mušjaci	Ženke
Habitucija	LPS	$F_{(1,21)}=3,465, p=0,077$	$F_{(1,24)}=12,785, p=0,002$
	MP-III-022	$F_{(1,21)}=1,227, p=0,281$	$F_{(1,24)}=4,129, p=0,053$
	Interakcija	$F_{(1,21)}=0,145, p=0,707$	$F_{(1,24)}=0,024, p=0,877$
Placebo	LPS	$F_{(1,21)}=0,129, p=0,723$	$F_{(1,24)}=10,232, p=0,004$
	MP-III-022	$F_{(1,21)}=0,565, p=0,461$	$F_{(1,24)}=0,975, p=0,333$
	Interakcija	$F_{(1,21)}=0,182, p=0,674$	$F_{(1,24)}=0,004, p=0,947$
Amfetamin	LPS	$F_{(1,21)}=6,150, p=0,022$	$F_{(1,24)}=3,048, p=0,094$
	MP-III-022	$F_{(1,21)}=0,134, p=0,718$	$F_{(1,24)}=4,476, p=0,045$
	Interakcija	$F_{(1,21)}=1,224, p=0,281$	$F_{(1,24)}=0,371, p=0,548$



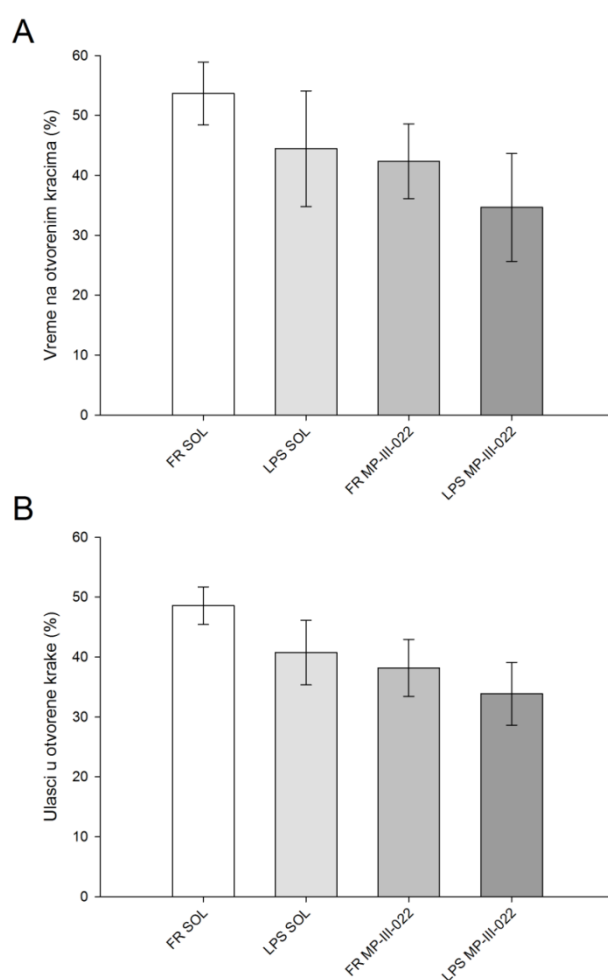
Slika 26. Efekti prenatalnog tretmana (LPS) i postnatalnog tretmana (MP-III-022) na pređeni put ženki pacova starosti 60 dana. Lokomotorna aktivnost je praćena tokom sva tri segmenta: habituacije (30 minuta), placebo segmenta (30 minuta posle primene FR-a) i amfetaminskog segmenta (60 minuta posle primene AMF u dozi 0,5 mg/kg). Panel A1, A2 i A3: glavni efekti faktora LPS i MP-III-022 u svakom od tri segmenta analizirani trofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem, pri čemu glavni efekat faktora vreme nije od interesa i radi preglednosti nije prikazan. Grafici B1, B2 i B3: upareno *post hoc* poređenje (Student–Newman–Keuls metod) efekta jednog faktora po nivoima drugog faktora (LPS i MP-III-022) na ukupan pređeni put u svakom od tri segmenta. Grafici C1 i C2: Efekat faktora MP-III-022 na pređeni put u intervalima od 10 minuta, analizirani uparenim *post hoc* poređenjem (Student–Newman–Keuls metod) kod životinja prenatalno izloženih efektima tretmana FR-om ili LPS-om. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška ukupnog pređenog puta (B1, B2 i B3) ili puta pređenog u intervalu od 10 minuta (C1 i C2) izraženog u metrima. *($p < 0.05$) i **($p < 0.01$). Trend oznaćava „p“ vrednost između 0,05 i 0,1.



Slika 27. Efekti prenatalnog tretmana (LPS) i postnatalnog tretmana (MP-III-022) na pređeni put mužjaka pacova starosti 60 dana. Lokomotorna aktivnost je praćena tokom sva tri segmenta: habituacije (30 minuta), placebo segmenta (30 minuta posle primene FR-a) i amfetaminskog segmenta (60 minuta posle primene AMF u dozi 0,5 mg/kg). Panel A1, A2 i A3: glavni efekti faktora LPS i MP-III-022 u svakom od tri segmenta analizirani trofaktorskom ANOVOM sa ponavljanjem, pri čemu glavni efekat faktora vreme nije od interesa i radi preglednosti nije prikazan. Grafici B1, B2 i B3: upareno *post hoc* poređenje (Student–Newman–Keuls metod) efekta jednog faktora po nivoima drugog faktora (LPS i MP-III-022) na ukupan pređeni put u svakom od tri segmenta. Grafici C1 i C2: Efekat faktora MP-III-022 na pređeni put u intervalima od 10 minuta, analiziran uparenim *post hoc* poređenjem (Student–Newman–Keuls metod) kod životinja prenatalno izloženih efektima tretmana FR-om ili LPS-om. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška ukupnog pređenog puta (B1, B2 i B3) ili puta pređenog u intervalu od 10 minuta (C1 i C2) izraženog u metrima. *($p < 0.05$). Trend oznaćava „p“ vrednost između 0,05 i 0,1.

4.3.3. Efekti primene lipopolisaharida i liganda MP-III-022 na ponašanje u uzdignutom plus lavirintu

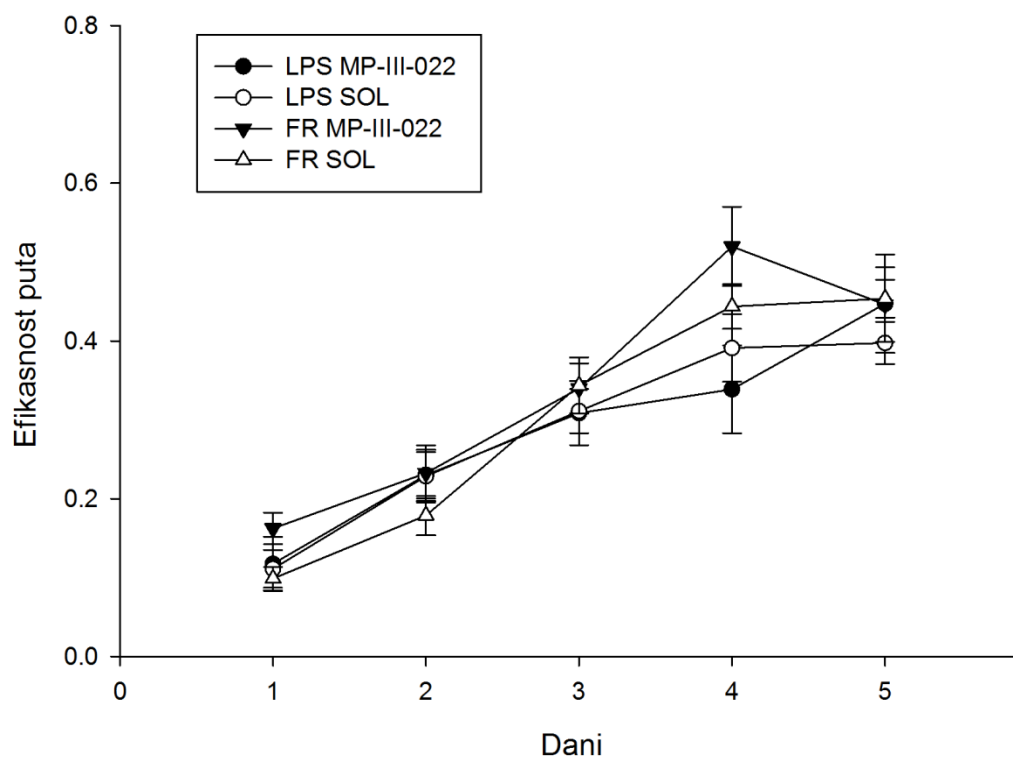
Efekti prenatalnog tretmana LPS-om i postnatalnog tretmana ligandom MP-III-022 na ponašanje mužjaka starosti 60 dana u UPL-u prikazani su na **Slici 28**. Kada su efekti oba tretmana na ponašanje mužjaka u UPL-u analizirani dvofaktorskom ANOVOM, uočeno je da oni nisu značajno uticali na procenat vremena na otvorenim kracima (LPS: ($F_{(1,28)}=1,186$; $p=0,285$) i MP-III-022: ($F_{(1,28)}=1,854$; $p=0,184$) kao ni na procenat ulazaka u otvorene krake (LPS: $F_{(1, 28)}=1,654$; $p=0,209$); MP-III-022: ($F_{(1,28)}=3,354$; $p=0,078$).



Slika 28. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om i postnatalnog tretmana ligandom MP-III-022 na procenat vremena na otvorenim kracima (A) i procenat ulazaka u otvorene krake (B) kod mužjaka pacova starosti 60 dana. Broj legala po grupi je bio 8. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna greška.

4.3.4. Efekti primene lipopolisaharida i liganda MP-III-022 na ponašanje u Morisovom vodenom lavirintu

Efekti prenatalnog tretmana LPS-om i postnatalnog tretmana ligandom MP-III-022 na odabrane parametre akvizicije u MVL-u kod mužjaka starosti 60 dana nisu bili značajni. Na **Slici 29** prikazan je uticaj ovih faktora na odabrani parametar, efikasnost puta do pronalaska platforme (LPS: ($F_{(1,28)}=2,437$; $p=0,130$) i MP-III-022: ($F_{(1,28)}=0,732$; $p=0,399$), pri čemu interakcija ovih faktora takođe nije bila značajna ($F_{(1,28)}=0,639$; $p=0,412$). Efekat faktora dan je očekivano bio značajan ali nije od interesa za dalje tumačenje rezultata.



Slika 29. Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na efikasnost puta u MVL-u tokom 5 dana akvizicije kod mužjaka starosti 60 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost parametra \pm standardna greška. Broj legala po grupi iznosio je 8.

4.3.5. Kvantifikacija neurotransmitera u moždanom tkivu odraslih pacova

Efekti LPS-a i liganda MP-III-022 na koncentraciju svakog od šest neurotransmitera u svakoj od četiri strukture u mozgu mužjaka i ženki pacova starosti 60 dana analizirani su odvojeno, dvofaktorskom ANOVOM, i ukupno je urađeno 48 ovakvih analiza. U ovom odeljku biće iznete F i p vrednosti samo onih analiza u kojima je bilo značajnih razlika. U mozgu mužjaka prenatalno tretiranih LPS-om nivo acetilholina je bio značajno povećan u strijatumu ($F_{(18,1)}=5,357$; $p=0,033$), dok je koncentracija glutamata bila veća u ventralnom hipokampusu ($F_{(18,1)}=6,513$; $p=0,020$) u odnosu na kontrole. U ventralnom hipokampusu ženki MP-III-022 tretman je doveo do smanjenja koncentracije acetilholina ($F_{(20,1)}=6,533$; $p=0,019$). Koncentracije svih neurotransmitera u analiziranim strukturama mozga i značajnosti dobijene uparenim SNK *post hoc* metodom prikazane su u **Tabeli 7** (mužjaci) i **Tabeli 8** (ženke).

Tabela 7. Koncentracije dopamina (DA), gama-aminobuterne kiseline (GABA), glutamata (Glu), acetilholina (ACh), noradrenalina (NA) i serotonina (5-HT) u prefrontalnom korteksu (PFC), dorzalnem strijatumu (DSTR), nukleusu akumbensu (NAcc) i ventralnom hpokampusu (VHPC) mužjaka pacova tretiranih prenatalno LPS-om ili fiziološkim rastvorom (FR) i postnatalno ligandom MP-III-022 ili odgovarajućim vehikulom (SOL). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna greška (µg/g). *(p<0,05) i ^t(p<0,10) značajnosti dobijene u odnosu na FR kontrolu korišćenjem procedure višestrukog uparenog poređenja (SNK).

Tkivo	Pol, tretman	DA	GABA	Glu	ACh	NA	5-HT
PFC	M FR SOL	0,54 ± 0,00	160,34 ± 2,56	1537,61 ± 48,73	1,26 ± 0,11	13,66 ± 0,92	0,24 ± 0,07
	M LPS SOL	0,55 ± 0,01	166,96 ± 7,10	1556,52 ± 17,93	1,40 ± 0,09	14,80 ± 0,56	0,25 ± 0,02
	M FR MP-III-022	0,55 ± 0,02	166,04 ± 10,99	1522,00 ± 58,75	1,33 ± 0,07	15,11 ± 0,39	0,25 ± 0,03
	M LPS MP-III-022	0,56 ± 0,01	166,45 ± 5,25	1550,86 ± 42,97	1,35 ± 0,06	14,60 ± 0,52	0,22 ± 0,01
DSTR	M FR SOL	1,61 ± 0,30	208,66 ± 9,61	1198,43 ± 50,09	1,92 ± 0,26	12,22 ± 0,53	1,24 ± 0,22
	M LPS SOL	2,29 ± 0,56	205,73 ± 4,24	1269,04 ± 60,33	2,35 ± 0,24	14,18 ± 0,44	1,74 ± 0,40
	M FR MP-III-022	1,87 ± 0,45	225,80 ± 16,48	1201,26 ± 65,76	1,73 ± 0,10	12,41 ± 0,57	1,44 ± 0,33
	M LPS MP-III-022	1,93 ± 0,33	237,60 ± 16,33	1436,75 ± 229,38	2,25 ± 0,16 ^t	15,40 ± 2,50	1,48 ± 0,24
NAcc	M FR SOL	2,06 ± 0,56	346,81 ± 64,51	1107,50 ± 103,04	1,21 ± 0,40	10,64 ± 1,23	0,21 ± 0,10
	M LPS SOL	2,16 ± 0,22	292,70 ± 26,60	1222,39 ± 111,91	1,26 ± 0,23	10,39 ± 1,57	0,29 ± 0,05
	M FR MP-III-022	2,06 ± 0,67	328,38 ± 30,08	1306,42 ± 88,97	1,20 ± 0,34	9,66 ± 1,73	0,30 ± 0,10
	M LPS MP-III-022	1,73 ± 0,47	300,20 ± 47,43	1138,09 ± 96,55	0,99 ± 0,18	10,48 ± 0,66	0,39 ± 0,15
VHPC	M FR SOL	0,12 ± 0,01	143,35 ± 8,68	805,27 ± 21,52	1,55 ± 0,10	10,82 ± 0,85	0,15 ± 0,02
	M LPS SOL	0,12 ± 0,01	145,45 ± 7,83	862,89 ± 23,32 *	1,63 ± 0,06	10,96 ± 0,61	0,23 ± 0,03
	M FR MP-III-022	0,13 ± 0,01	136,20 ± 4,72	844,52 ± 16,03	1,56 ± 0,10	9,81 ± 0,21	0,17 ± 0,03
	M LPS MP-III-022	0,13 ± 0,01	149,28 ± 4,50	880,36 ± 10,01	1,62 ± 0,14	11,35 ± 0,84	0,21 ± 0,04

Tabela 8. Koncentracije dopamina (DA), gama-aminobuterne kiseline (GABA), glutamata (Glu), acetilholina (ACh), noradrenalina (NA) i serotonina (5-HT) u prefrontalnom korteksu (PFC), dorzalnem strijatumu (DSTR), nukleusu akumbensu (NAcc) i ventralnom hpokampusu (VHPC) ženki pacova tretiranih pranatalno LPS-om ili fiziološkim rastvorom (FR) i postnatalno ligandom MP-III-022 ili odgovarajućim vehikulomom (SOL).

Tkivo	Pol, tretman	DA	GABA	Glu	ACh	NA	5-HT
PFC	F FR SOL	0,53 ± 0,01	158,55 ± 17,77	1445,59 ± 90,07	1,23 ± 0,16	12,49 ± 1,60	0,18 ± 0,03
	F LPS SOL	0,54 ± 0,01	158,42 ± 10,58	1507,51 ± 66,59	1,41 ± 0,10	14,22 ± 0,88	0,21 ± 0,03
	F FR MP-III-022	0,55 ± 0,00	163,37 ± 7,41	1506,19 ± 37,47	1,32 ± 0,05	14,32 ± 0,15	0,20 ± 0,03
	F LPS MP-III-022	0,55 ± 0,00	160,83 ± 4,59	1547,84 ± 42,49	1,47 ± 0,08	15,00 ± 0,81	0,25 ± 0,04
DSTR	F FR SOL	2,28 ± 0,38	224,19 ± 20,32	1297,97 ± 31,15	1,86 ± 0,12	12,81 ± 0,40	1,73 ± 0,28
	F LPS SOL	2,15 ± 0,36	200,88 ± 21,65	1185,17 ± 75,02	1,77 ± 0,10	12,03 ± 0,69	1,64 ± 0,26
	F FR MP-III-022	1,47 ± 0,36	228,21 ± 7,22	1478,53 ± 186,58	1,82 ± 0,24	16,46 ± 3,77	1,14 ± 0,26
	F LPS MP-III-022	2,31 ± 0,42	232,60 ± 10,12	1291,57 ± 69,11	1,96 ± 0,10	12,98 ± 0,51	1,75 ± 0,31
NAcc	F FR SOL	2,49 ± 0,52	332,74 ± 16,50	1325,91 ± 82,02	1,46 ± 0,43	11,15 ± 1,31	0,17 ± 0,08
	F LPS SOL	2,38 ± 0,36	366,27 ± 36,41	1277,58 ± 62,30	1,40 ± 0,32	13,05 ± 0,96	0,33 ± 0,07
	F FR MP-III-022	1,62 ± 0,59	325,15 ± 45,33	1297,72 ± 206,08	1,28 ± 0,39	10,35 ± 0,61	0,14 ± 0,05
	F LPS MP-III-022	1,74 ± 0,40	327,64 ± 34,64	1118,07 ± 33,33	0,98 ± 0,16	10,63 ± 0,45	0,21 ± 0,05
VHPC	F FR SOL	0,13 ± 0,01	152,25 ± 10,29	901,50 ± 30,04	1,77 ± 0,20	11,55 ± 0,93	0,18 ± 0,02
	F LPS SOL	0,13 ± 0,01	146,83 ± 4,77	944,17 ± 35,46	1,73 ± 0,08	11,96 ± 0,82	0,19 ± 0,02
	F FR MP-III-022	0,16 ± 0,03	144,21 ± 6,24	865,90 ± 19,34	1,43 ± 0,04	10,96 ± 0,82	0,20 ± 0,02
	F LPS MP-III-022	0,13 ± 0,01	149,40 ± 6,50	875,56 ± 35,53	1,48 ± 0,07	10,46 ± 0,79	0,18 ± 0,03

5. DISKUSIJA

Dosadašnji izveštaji iz oblasti istraživanja relevantnih za diskusiju prezentovanih rezultata ukazuju na to da:

Aktivacija imunog sistema majke u trudnoći predstavlja faktor rizika za razvoj psihijatrijskih poremećaja (Boksa, 2010).

Prenatalna primena imunogena, među kojima i LPS-a, u animalnim modelima neurorazvojnih poremećaja izaziva aktivaciju imunog sistema gravidnih ženki glodara i funkcionalne i bihevioralne abnormalnosti kod mladunaca (Meyer i Feldon, 2010).

Efekti prenatalne primene LPS-a na razvoj fetusnog mozga nisu direktni, jer LPS ne prolazi placentalnu barijeru, već izaziva febrilni odgovor i indukciju citokina, naročito na nivou placente (Ashdown i sar., 2006).

Posledica aktivacije imunog sistema majke može biti indukcija citokina u amnijskoj tečnosti i tkivima fetusa, dok je poremećaj balansa pro- i antiinflamatornih citokina u mozgu fetusa predložen kao efektni mehanizam koji izaziva neurorazvojne poremećaje (Meyer i sar., 2009).

Rezultati bihevioralnih ispitivanja iz studija zasnovanih na sličnim, ali u detaljima različitim, protokolima primene LPS-a jesu raznovrsni i ponekad kontradiktorni, ali je sličnost primećenih abnormalnosti u ponašanju životinja sa simptomatologijom shizofrenije evidentna (Boksa, 2010).

U protokolima u kojima se tretman aplikuje gravidnim ženkama, rezultati bihevioralnog testiranja mladunaca mogu biti pod značajnim uticajem efekta legla, koji može nadjačati efekat prenatalnog tretmana ukoliko testirane životinje potiču iz malog broja legala (Lazic i Essioux, 2013).

U bihevioralnim testiranjima prenatalna primena LPS-a kod potomaka dovodi do poremećaja poput deficita prepulsne inhibicije (Fortier i sar., 2004), promena u lokomotoronoj aktivnosti (Harvey i Boksa, 2014b), oštećenja prostorne memorije (Yin i sar., 2013) i asocijalnosti (Kirsten i sar., 2010).

Prenatalna primena LPS-a kod mladunaca izaziva smanjenje GABA-ergičke transmisije u hipokampusu (Nouel i sar., 2012), što je u skladu sa izveštajima o redukciji nivoa mRNA i proteina GAD67 (npr. Benes i sar., 2007), kao i relina (npr. Eastwood i Harrison, 2006) u raznim delovima mozga pacijenata obolelih od shizofrenije, uključujući hipokampus.

Nakon prvobitne ekspresije u fetusnom mozgu pacova između 14. i 17. dana embrionalnog razvika (Laurie i sar., 1992), $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori posreduju u ekscitatornoj GABA-ergičkoj transmisiji u prenatalnom periodu (Ben-Ari, 2001), a u adultnom hipokampusu u toničnoj inhibiciji piramidarnih neurona (Caraiscos i sar., 2004), kojom se u značajnoj meri reguliše i sinaptička plastičnost.

Otkrića u oblasti sinteze liganada za benzodiazepinsko mesto vezivanja GABA_A receptora pružaju mogućnost selektivne modulacije određenih podtipova GABA_A receptora, a primer predstavlja MP-III-022, nosintetisani ligand umereno selektivnog afiniteta i efikasnosti za $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptore (Stamenić i sar., 2016).

Jedna od predloženih strategija prevencije javljanja shizofrenije i srodnih poremećaja podrazumeva delovanje na neurorazvojne promene u pojedinim fazama razvoja, a pre ispoljavanja prvih simptoma (Meyer i Feldon., 2010).

U svetlu ovih izveštaja, u nastavku će biti diskutovani nalazi naših eksperimenata koji su doprineli punijoj karakterizaciji modela prenatalne primene LPS-a u dozi od 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 15. i 16. dana gestacije gravidnim ženka pacova Wistar soja, kao i efekti ponavljane pozitivne modulacije GABA-ergičke transmisije na nivou $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora u preadolescenciji, koja je sprovedena u pokušaju prevencije zabeleženih bihevioralnih abnormalnosti u periodu rane odraslosti.

5.1. Efekti primene lipopolisaharida

Prilikom postavljanja odabranog animalnog modela u našoj laboratoriji, zasnovanog na protokolu primene LPS-a koji je identičan ili veoma sličan protokolima korišćenim u nekoliko drugih studija (Fortier i sar., 2007; Harvey i Boksa, 2014a i 2014b; Wischhof i sar., 2015a i 2015b), dosadašnja slika imunoloških dešavanja i promena u mozgu fetusa je dopunjena novim saznanjima, dok se kroz tri seta bihevioralnih eksperimenata došlo do brojnih rezultata, od kojih su neki pokazali visok stepen

konzistentnosti unutar studije, kao i sa ranije publikovanim izveštajima. U okviru karakterizacije modela pokazali smo da primena LPS-a 15. dana gestacije dovodi do akutnog disbalansa GABA-e i glutamata u mozgu fetusa, kao i da dodatna primena LPS-a 16. dana gestacije ne izaziva adekvatan imuni odgovor; od bihejvioralnih rezultata, ovaj model je najpouzdanije okarakterisao deficit u lokomotornoj aktivnosti i reaktivnosti na amfetamin registrovan kod životinja starosti 60 dana.

5.1.1. Aktivacija imunog odgovora

Aktivacija imunog sistema majke intraperitonealnom primenom LPS-a (100 µg/kg, O111:B4 serotip) u našoj studiji potvrđena je detekcijom citokina TNF-α i IL-6 u krvi gravidnih ženki već u prvoj vremenskoj tački, 2 h nakon primene LPS-a 15. dana gestacije. Po našim saznanjima, nijedna od prethodno publikovanih studija o prenatalnom izlaganju efektima primene LPS-a nije iznela podatke o indukciji citokina nakon druge doze LPS-a, a koja se često primenjuje u sličnim protokolima (Wischof i sar., 2015a i 2015b; Harvey i Boksa, 2014a i 2014b). U našoj studiji, nakon druge doze LPS-a 16. dana gestacije nije bilo dodatne indukcije analiziranih citokina u krvi ženke, a povećanje koncentracije TNF-α u placentalnom tkivu detektovano 15. dana gestacije postepeno se smanjivalo tokom naredna 24 h. Dok u amnionskoj tečnosti i mozgu fetusa povećanja koncentracije TNF-α nije bilo ni u jednoj vremenskoj tački, porast nivoa IL-6 zabeležen je u amnionskoj tečnosti 6 h nakon prve administracije LPS-a. Nažalost, koncentracije IL-6 u fetusnom mozgu nisu se mogle interpretirati usled tehničkih ograničenja pri analizi uzoraka. Različiti nalazi o indukciji ova dva proinflamatorna citokina u amnionskoj tečnosti u našoj studiji nisu iznenađujući ako se zna da je u studiji permeabilnosti humane placentе pokazano da se IL-6, ali ne i TNF-α, značajno transportuje u fetusnu cirkulaciju (Zaretsky i sar. 2004). Ovde treba napomenuti da povećani nivoi citokina u amnionskoj tečnosti mogu biti registrovani ne samo usled prolaska kroz placentalnu barijeru, već mogu poticati i iz inflamacijom aktiviranog horioamniona, membrane koja okružuje fetus tokom gestacije, što je diskutovano u radu Gayle i sar. (2004).

Porast nivoa TNF-α i IL-6 u mozgu fetusa nije zabeležen ni u studiji u kojoj je gravidnim ženkama *Sprague–Dawley* pacova 18. dana gestacije primenjena ista doza LPS-a (100 µg/kg, O111:B4 serotip), koja je pritom dovela do povećanja koncentracije TNF-α i IL-6 u krvi ženki, i ushodno regulisala nivoe iRNK ovih

citokina u placenti i horioamnionu (Gayle i sar., 2004). U skladu sa ovim nalazima stoji i izveštaj da koncentracija TNF- α i IL-6 u fetusnom mozgu nije značajno promenjena 4 h posle administracije 50 μ g/kg LPS-a (O111:B4 serotip) *Sprague–Dawley* ženkama 18. dana gestacije (Ashdown i sar, 2006). Međutim, u studiji sa drugim serotipom LPS-a (O55:B5, iz *Escherichia coli*) koji je primenjen *Sprague–Dawley* ženkama 15. dana gestacije u višoj dozi (250 μ g/kg), oba citokina detektovana su i u mozgu fetusa i u amnionskoj tečnosti 4 h nakon primene LPS-a, ali su odgovarajuće koncentracije ovih citokina u krvi pritom bile više nego 100 puta veće u slučaju TNF- α , odnosno 5 puta veće u slučaju IL-6, u poređenju sa koncentracijama koje su dobijene u našem eksperimentu (Oskvig i sar., 2012). Stoga se, u okolnostima manje snažne imune aktivacije u našoj studiji, porast nivoa IL-6 u fetusnom mozgu ne može isključiti, naročito imajući u vidu da bi permeabilnost pacovske placentalne barijere za IL-6 mogla biti veća 15. nego 18. dana gestacije (Dahlgren i sar., 2006), i da je u amnionskoj tečnosti zabeležen porast koncentracije ovog citokina.

U svakom slučaju, iako je poremećaj balansa citokina u fetusnom mozgu označen kao mehanizam koji direktno izaziva rane neurorazvojne poremećaje (Meyer i sar., 2009; Boksa, 2010), treba imati u vidu da takav disbalans može biti posredovan i drugim citokinima koji nisu određivani u ovoj studiji, poput proinflatornog IL-1 ili antiinflatornog IL-10. Dodatno, bihevioralne abnormalnosti koje stoje u osnovi validacije modela u nekim studijama (npr. Fortier i sar., 2007), mogu biti posledica primene LPS-a po protokolu koji nije rezultovao značajnom indukcijom citokina u fetusnim mozgovima (Ashdown i sar, 2006).

5.1.2. Status citokina u tkivima odraslih životinja

U našoj studiji, kod odraslih pacova oba pola starosti 60 dana prenatalno izloženih efektima administracije LPS-a nisu detektovani povišeni nivoi citokina. Radi poređenja, povišeni nivoi citokina jesu nalaženi u krvi odraslih životinja prenatalno izloženih dejstvu LPS-a, ali u studijama koje su koristile protokole značajno drugačije od našeg. U njima je LPS (serotip O26:B6) primenjivan svakog dana u izuzetno velikoj dozi od 2 mg/kg (Romero i sar., 2010), ili svakog drugog dana u dozi od 1 mg/kg (Borrell i sar., 2002), tokom celog gravidnog perioda. Odsustvo detektabilnih koncentracija TNF- α i IL-6 u mozgu i krvi adultnih pacova sugerise da naše životinje

izložene efektima primene LPS-a nisu razvile perzistentnu inflamaciju za koju je, u preglednom radu Meyer i sar. (2011), hipotetisano da predstavlja osnov razvoja autizma. Ako zanemarimo potencijalni disbalans citokina koje nismo ispitivali, ovakav nalaz ostavlja mesta za pretpostavku da se u našem modelu inflamacija u adultnih životinja ne razvija dalje od nivoa latentne inflamacije koja u okviru pomenute hipoteze predisponira razvoj shizofrenije (Meyer i sar., 2011).

5.1.3. Disbalans neurotransmitera u fetusnom mozgu

Iako u ovoj studiji nismo našli direktne dokaze fetusne neuroinflamacije nakon administracije LPS-a, porast nivoa IL-6 u amniotskoj tečnosti zabeležen je istovremeno kada i značajni disbalans GABA-e i glutamata u fetalnom mozgu. Ako zanemarimo izvesne efekte drugih citokina, i pretpostavimo da su fetusni mozgovi bili izloženi povećanim koncentracijama IL-6 u kratkom periodu, možemo hipotetisati da takvo povećanje nivoa IL-6 ushodno reguliše ekspresiju neurotrofina-3 (März i sar., 1999), koji pak povećava aktivnost GAD67, enzima koji konvertuje glutamat u GABA-u (Pérez-Navarro i sar., 1999). U našoj studiji koncentracija GABA-e u fetusnom mozgu dostigla je vrednosti duplo više u odnosu na kontrolno tkivo, dok je nivo glutamata u istoj vremenskoj tački (6 h nakon prve injekcije LPS-a) značajno snižen, a trend sniženja opažen je još 2 h nakon primene LPS-a. Dodatni disbalansi drugih neurotransmitera u fetusnom mozgu nisu uočeni, a koncentracije GABA-e i glutamata se nisu menjale značajno posle druge injekcije LPS-a 16. dana gestacije.

Ako se ima u vidu da se fetusni mozak pacova razvija veoma brzo zahvaljujući kratkom gestacionom periodu (tri nedelje), čak i disbalans GABA-e i glutamata u trajanju od nekoliko časova mogao bi da ostvari značajan uticaj na regulatorne procese u razvoju GABA-ergičkog sistema. Ovde pažnju treba pokloniti vremenskom poklapanju prvobitne ekspresije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora tokom formiranja hipokampusa i aktivacije imunog sistema majke i pojave disbalansa GABA-e i glutamata u našoj studiji. Laurie i sar. (1992) su pokazali da 14. dana embrionalnog razvića $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora još uvek nema, dok su 17. prenatalnog dana oni veoma zastupljeni u hipokampusu i korteksu mozga fetusa. Budući da $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptori dominantno posreduju u prenatalnoj ekscitatornoj i postnatalnoj inhibitornoj GABA-ergičkoj transmisiji u hipokampusu, bilo bi interesantno videti da li i kako administracija LPS-a utiče na ekspresiju ovih receptora. U vezi sa efektom primene

LPS-a na druge elemente GABA-ergičke transmisije, treba napomenuti da su Oskvig i sar. (2012) u eksperimentu sa nešto drugačijim protokolom primene LPS-a, u sklopu disregulacije 3285 gena zapazili i značajnu nishodnu regulaciju gena za GAD67 i GAD65, što implicira potencijalno smanjenje nivoa GABA-e. Pošto se ovaj podatak na prvi pogled može tumačiti kao kontradiktoran nalazu dobijenom u našoj studiji, gde je koncentracija GABA-e povećana a glutamata smanjena, treba naglasiti prilične razlike između ova dva modela maternalne imune aktivacije. Razlike u soju pacova (*Sprague-Dawley*, odnosno *Wistar*), serotipu (O55:B5 vs O111:B4) i najviše doziranju LPS-a (250 vs 100 µg/kg) mogle su rezultovati imunom aktivacijom punog obima u studiji koju su sproveli Oskvig i sar. (2012), dok je u našoj studiji imuna aktivacija bila relativno ograničena.

5.1.4. Deficit spontane i amfetaminom indukovane lokomotorne aktivnosti

U prvom setu bihevioralnih eksperimenata ispitivana je spontana i dizocilpinom (MK-801) indukovana lokomotorna aktivnost pacova oba pola starosti 40 i 60 dana, ali u dizajnu ovih eksperimenata nije uzet u obzir „efekat legla“, o kome je opsežno diskutovano u studiji Lazic i Essioux (2013). Nakon dodatnih analiza zaključeno je da je upravo ovaj efekat doveo do kontradiktornih rezultata u ovom setu, gde je u prvom eksperimentu, tokom snimanja spontane lokomotorne aktivnosti, opažen trend povećanja pređenog puta kod mužjaka i neznajno povećanje kod ženki starosti 60 dana, dok je u ponovljenom testiranju zabeleženo statistički značajno smanjenje ovog parametra kod mužjaka i trend smanjenja kod ženki. U protokolima u kojima se tretman aplikuje gravidnim ženkama, efekat legla može nadjačati efekat prenatalnog tretmana ukoliko testirane životinje potiču iz malog broja legala (Lazic i Essioux, 2013). Tada varijacije u vrednosti nekog parametra unutar jedne tretmanske grupe često proizilaze upravo iz pripadnosti određenom leglu, a kako je u prvom setu eksperimenata u okviru jedne tretmanske grupe merena aktivnost mladunaca poreklom iz samo dva do tri legla, rezultati tih grupa mogli su biti pod značajnim uticajem fenotipa određenog legla. Koristeći realne setove podataka iz različitih eksperimenata, Lazic i Essioux (2013) su pokazali da su upravo parametri lokomotorne aktivnosti među onima koji su najpodložniji efektu legla, kojem se u tom slučaju može pripisati čak 61% varijabilnosti podataka unutar tretmanske grupe. Ipak, ovaj efekat ima značajno manji uticaj ako se ispituje lokomotorna aktivnost pod

dejavom akutnog farmakološkog tretmana (Lazic i Essioux, 2013). U vezi sa tim, u analizi pređenog puta pod uticajem dizocilpina nisu uočene značajne razlike između LPS i kontrolnih životinja oba pola, pa se u drugom setu eksperimenata prešlo na indukovanje specifičnog ponašanja primenom amfetamina. Ovde treba napomenuti da su pacovi oba pola, kod kojih je prenatalna primena LPS-a po značajno drugačijem protokolu uzrokovala povećanje lokomotorne aktivnosti i smanjenje prepulsne inhibicije, ispoljili hiperreaktivnost na dizocilpin u ovim testovima (Basta-Kaim i sar., 2011a).

Kako bi se uticaj legla eliminisao, samo leglo se mora posmatrati kao statistička jedinica, a broj mladunaca iz jednog legla koje treba uključiti u testiranje smanjuje se sa porastom broja legala (Lazic i Essioux, 2013). Od više optimizovanih kombinacija sugerisanih u ovoj studiji, u drugom i trećem setu naših eksperimenata korišćen je dizajn u kome je iz 8 legala čije su majke primile određeni tretman (LPS ili FR) nasumično odabirano po 3 mladunčeta jednog pola. Iako su u drugom i trećem setu eksperimenata zabeležene određene razlike u stepenu statističke značajnosti, promene izazvane prenatalnom primenom LPS-a su, za razliku od onih u prvom setu, usmerene istovetno, i biće komentarisane paralelno. Radi lakšeg praćenja relevantnih rezultata tokom diskusije oni su sumirani u **Tabeli 9**, dok je za neke od detalja koji će biti razmatrani potrebno sagledavanje grafika sa detaljnim prikazom pređenog puta po desetominutnim intervalima.

Tabela 9. Opšti efekat LPS-a na lokomotornu aktivnost pacova oba pola starosti 40 i 60 dana bio je smanjenje pređenog puta u različitim segmentima testiranja. U tabeli su prikazani segmenti u kojima je smanjenje puta bilo značajno ($p < 0,05$), zabeležen je trend smanjenja (t: $p < 0,10$), ili nije bilo uticaja (–). H: segment habituacije; P: placebo segment; A: amfetaminski segment.

Eksperimentalni set	Starost pacova	Mužjaci			Ženke		
		H	P	A	H	P	A
2. set	40 dana	–	$p < 0,05$	–	–	–	–
	60 dana	–	$p < 0,05$	–	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
3. set	60 dana	t	–	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	t

Kod životinja oba pola starosti 40 dana izloženih efektima prenatalne primene LPS-a uočen je blagi deficit lokomotorne aktivnosti, posebno one indukovane primenom amfetamina. Ove promene, osim smanjene lokomotorne reaktivnosti na injektovanje placeba u drugom segmentu testiranja mužjaka, nisu bile statistički značajne (**Tabela 9**) mada su dale jasnu naznaku smera u kome LPS utiče na lokomotornu aktivnost (**Slika 11** i **Slika 12**), i kod potomaka starosti 60 dana postale još izraženije. Promene opažene kod pacova starosti 60 dana biće u narednom tekstu diskutovane po segmentima.

Iako dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem, kojom je analiziran pređeni put u drugom setu eksperimenata, nije istakla smanjenje spontane lokomotorne aktivnosti tokom habituacije kod LPS mužjaka starosti 60 dana kao značajno, na grafiku se jasno može videti da je pređeni put LPS mužjaka u svakom intervalu testiranja manji od puta koji su prelazile kontrolne životinje. Tako je trofaktorska ANOVA sa ponavljanjem u trećem setu eksperimenata pokazala da je ovo smanjenje kod LPS mužjaka na nivou statističkog trenda, i da zapravo LPS na aktivnost mužjaka tokom habituacije ostvaruje kvalitativno isti efekat kao i kod ženki kod kojih je statistički značajno smanjenje puta bilo konzistentno u oba seta eksperimenata. Slični nalazi prezentovani su i u dve studije autora Harvey i Boksa (2014a; 2014b), u kojima je administracija LPS-a vršena takođe 15. i 16. dana gestacije, ali u dozi od 50 µg/kg, dok su korišćeni pacovi bili soja *Sprague Dawley*. Primena ove doze LPS-a je kod muških potomaka starosti 60 dana dovela do značajnog smanjenja pređenog puta tokom 60 minuta spontane lokomotorne aktivnosti, dok kod ženki ovo smanjenje nije dostiglo statističku značajnost (Harvey i Boksa, 2014a). U drugoj studiji, LPS mužjaci starosti 70 dana takođe su prešli manji put u odnosu na kontrole u toku prvih 10 minuta spontane lokomocije, dok ženski potomci u ovoj studiji nisu ispitivani (Harvey i Boksa, 2014b). Ovde treba naglasiti da su apsolutne vrednosti pređenog puta u studijama Harvey i Boksa (2014a i 2014b) u ravni sa našim vrednostima. U suprotnosti sa našim, i rezultatima prezentovanim u Harvey i Boksa (2014a i 2014b), stoje nalazi studija u kojima je LPS primenjen po protokolu identičnom našem, ali se apsolutne vrednosti pređenog puta koje su autori izneli ne nalaze u okvirima očekivanih u datim eksperimentalnim postavkama (Wischhof i sar., 2015a i 2015b). Naime, u ove dve studije prijavljeno je da su LPS ženke starosti 60 dana prelazile i do 35 m tokom prvih 5 min spontane aktivnosti, i do 200 m tokom 60 min testiranja

(Wischhof i sar., 2015a), a LPS ženke starosti 100-120 dana čak i do 350 m tokom samo 30 min (Wischhof i sar., 2015b). Iako su ovi autori u prvoj studiji izvestili da su LPS ženke prelezile značajno veći put od kontrola (Wischhof i sar., 2015a), a u drugoj da razlika u spontanoj lokomociji nije bilo (Wischhof i sar., 2015b), kao i to da kod mužjaka ni u jednoj od ove dve studije nisu zabeležili razlike, nerealne vrednosti pređenog puta onemogućavaju svako poređenje efekta LPS-a sa našim, ili rezultatima istraživanja drugih grupa autora.

Drugi od tri segmenta praćenja aktivnosti se nalazi između dva važna segmenta, prvog u kome se ispituje spontana i drugog u kome se meri amfetaminom indukovana lokomocija. Svrha drugog segmenta je da se eksperimentalno naivne životinje izlože stresnom stimulusu intraperitonealne primene injekcije FR-a pre testiranja efekata amfetamina, kako bi se prepoznala moguća interakcija ova dva uticaja. U drugom esperimentalnom setu opažena razlika kod mužjaka u ovom segmentu testiranja zaslužuje posebnu diskusiju. Poznato je da intraperitonealna aplikacija fiziološkog rastvora može uticati na telesnu temperaturu (Dilsaver i Majchrzak, 1990) i srčanu frekvenciju (Meijer i sar., 2006), što predstavlja fiziološki odgovor na akutni stres. Smanjenje puta koje je kod LPS mužjaka ovde uočeno još u adolescenciji (40 dana starosti) može se tumačiti kao posledica veće podložnosti stresu uzrokovanom primenom prve intraperitonealne injekcije na početku ovog segmenta, a takav efekat placebo injekcije primećen je i komentarisano i u studiji koja je koristila identičan protokol primene LPS-a (Wischhof i sar., 2015b). Ovaj efekat se u drugom setu eksperimenata ponovio kod mužjaka starosti 60 dana, mada je kod ženki deficit u lokomotornoj aktivnosti tada već bio značajan u svim segmentima. Dva dodatna nalaza kod naših LPS mužjaka podržavaju ovu hipotezu. Prvi je podatak da u trećem setu eksperimenata, u kome su testirane životinje prethodno iskusile ponavljanu intraperitonealnu primenu FR-a ili MP-III-022 u periodu od 22. do 28. dana postnatalnog života, LPS mužjaci nisu na placebo injekciju reagovali drugačije od kontrolnih životinja. Drugi je pak nalaz iz testiranja u UPL-u, u kome su postnatalno netretirani LPS mužjaci starosti 60 dana demonstrirali povećan nivo bazalne anksioznosti pri suočavanju sa novim stimulusima u istraživanju nepoznate sredine. Konačno, značajno smanjenje reaktivnosti na amfetamin kod LPS mužjaka starosti 60 dana u trećem setu eksperimenata, kao i trend smanjenja lokomotorne aktivnosti u segmentnu habituaciju, približili su profil efekata LPS-a na lokomotornu

aktivnost mužjaka onom koji je viđen kod ženki. U tom svjetlu ne može se isključiti da je smanjena lokomocija kod netretiranih mužjaka u placebo segmentu u drugom setu eksperimenata jednostavno odraz uniformnog efekta LPS-a.

Efekti prenatalnog tretmana LPS-om na razvoj dopaminergičkih puteva u CNS-u mogu se uočiti mnogo pre manifestacija bihevioralnih i kognitivnih abnormalnosti u periodu odraslosti Meyer i Feldon (2010). Naše istraživanje je prvo koje se bavilo efektima amfetamina, supstance sa indirektnim dopaminergičkim dejstvom, na lokomotornu aktivnost ženki pacova prenatalno izloženih dejstvu LPS-a u 15. i 16. danu gestacije, odnosno u periodu kasne gestacije uopšte. U skladu sa ciljem ovog testa, a to je ispitivanje promena u amfetaminom indukovanoj lokomotornoj aktivnosti bez indukcije stereotipnog ponašanja, odabrali smo dozu amfetamina od 0,5 mg/kg koja je u literaturi klasifikovana kao umerena doza (Grilly i sar., 2001). Kada smo u drugom eksperimentalnom setu za analizu loomotorne aktivnosti koristili dvofaktorsku ANOVU sa ponavljanjem, uočili smo da su LPS ženke pod dejstvom amfetamina prelazile značajno manji put u odnosu na kontrolnu grupu, dok kod mužjaka ovo smanjenje puta nije dostiglo statističku značajnost, iako se na grafiku opet može videti da je pređeni put LPS mužjaka u svakom intervalu testiranja manji od puta koji su prešle kontrolne životinje. U trećem setu eksperimenata korišćena je trofaktorska ANOVA sa ponavljanjem i smanjenje puta kod LPS mužjaka je postalo značajno, dok je kod ženki smanjenje puta u odnosu na kontrolnu vrednost dostiglo nivo statističkog trenda. Zapaženo smanjenje lokomotorne reaktivnosti na amfetamin kod LPS mužjaka podržano je rezultatima studije čiji se nalazi slažu sa našim i u segmentu spontane lokomocije i habituacije (Harvey i Boksa, 2014b). Ovi autori su prijavili da prenatalna primena LPS-a (50 µg/kg) 15. i 16. dana gestacije kod muških potomaka *Sprague Dawley* pacova dovodi do smanjene reaktivnosti na amfetamin primenjen u dozi od 2 mg/kg (Harvey i Boksa, 2014b). Iako bi promena reaktivnosti na amfetamin, imajući u vidu njegov mehanizam dejstva, mogla implicirati potencijalni poremećaj u oslobađanju dopamina u strijatumu, naše analize neurotransmitera kod životinja starosti 60 dana nisu otkrile disbalans u ukupnoj koncentraciji ovog neurotransmitera.

Nezavisno od efekta prenatalnog tretmana, izraženiji lokomotorni odgovor na amfetamin kod ženki starosti 60 dana u odnosu na odgovor adolescentnih ženki poznat je od ranije (Mathews i McCormick, 2007), a zna se i da je odgovor na istu

dozu amfetamina jači kod ženki nego kod mužjaka iste starosti (Simpson i sar., 2012). Vezano za ove nalaze, potrebno je sagledati varijabilnost efekata LPS-a na amfetaminom indukovanu aktivnost kod pacova u zavisnosti od doze amfetamina, i to naročito kod mužjaka. U odabiru doze amfetamina rukovodili smo se, pored želje da izbegujemo stereotipno ponašanje, i rezultatima sličnih studija koje su ispitivale reaktivnost na amfetamin. U protokolu sličnom našem, gde je LPS primenjen 18. i 19. dana gestacije, umerena doza amfetamina (0,5 mg/kg) bila je dovoljna da „otkrije“ posledice prenatalne imune aktivacije koja je mužjake *Sprague Dawley* pacova učinila reaktivnijim na dejstvo amfetamina u poređenju sa kontrolnim životinjama (Fortier i sar., 2004). U protokolu jako različitom od našeg, u kome je LPS primenjivan u dozi od 1 mg/kg svakog drugog dana od 7. dana gestacije do dana okota, amfetamin (0,5 mg/kg) dat 90 dana starim *Wistar* pacovima izazivao je značajno izraženiju hiperlokomociju kod LPS pacova nego kod kontrolnih životinja (Basta-Kaim i sar., 2011b). Konačno, u već pomenutoj studiji (Harvey i Boksa, 2014b), u eksperimentu u kojem je amfetamin primenjen u dozi od 2 mg/kg mužjacima *Sprague Dawley* pacova, pređeni put tokom prvih 30 minuta nakon primene amfetamina bio je značajno kraći kod LPS mužjaka, iako je glavni efekat LPS na ukupni pređeni put tokom 100 minuta testa izostao (Harvey i Boksa, 2014b). Ovde se, očigledno, kao značajan faktor nameće i dužina segmenta u kome se prati dejstvo amfetamina, jer se nakon prestanka dejstva psihostimulansa razlike u lokomociji svode na fenotipske razlike. Stoga smo mi, za razliku od studije u kojoj je glavni efekat amfetamina izostao usled dugog trajanja amfetaminskog segmenta testa (Harvey i Boksa, 2014b), odabrali da ovaj segment traje 60 min.

Dodatno, treba napomenuti da je pojava statističke značajnosti u analizi pređenog puta kod mužjaka u trećem setu eksperimenata mogao doprineti i veći broj statističkih jedinica (legala) koje su analizirane u trofaktorskoj ANOVI, mada je ista analiza kod ženki dovela do registovanja statističkog trenda u trećem setu umesto značajnosti iz drugog seta. Ako se uzme u obzir da veličina efekta (eng. *effect size*) LPS-a na analizirane parametre u bihejvioralnim testovima nije unapred određena, te da se na planu statističkog dizajna odabiru broja statističkih jedinica pristupalo tradicionalno i vodeći računa o efektu legla, odabrani broj legala (oko 8) u ponovljenim eksperimentima omogućio je da razlike između LPS i kontrolnih životinja budu dobro sagledane. Sveukupna analiza lokomotorne aktivnosti pacova u

testovima korišćenim u našem modelu upućuje na zaključak da *Wistar* pacovi oba pola, prenatalno izloženi efektima primene LPS-a (100 µg/kg 15. i 16. dana gestacije), manifestuju analogne deficite u bazalnoj lokomotornoj aktivnosti kao i u reaktivnosti na amfetamin u ranoj odraslosti. Sa aspekta validacije i reproducibilnosti modela treba još jednom naglasiti da su slični deficiti opisani i u modelu u kome je, u istim danima gestacije, LPS primenjen ženkama *Sprague Dawley* pacova u duplo manjoj dozi (50 µg/kg) (Harvey i Boksa, 2014a, 2014b).

5.1.5. Deficit prostorne memorije

U drugom setu eksperimenata u MVL-u primećen je deficit u akviziciji (učenju) i pozivanju memorije kod mladih adultnih mužjaka prenatalno izloženih efektima primene LPS-a. I deklarativna i proceduralna komponenta memorije u zadatku akvizicije bile su oštećene pod uticajem prenatalnog LPS tretmana. Ta oštećenja nisu opažena kod mladih adultnih ženki, niti u pacova oba pola u njihovoj adolescenciji. Ovi nalazi su konzistentni sa oštećenjima prostorne memorije zabeleženim kod mužjaka pacova koji su bili izloženi efektima primene više doze LPS-a u kasnoj gestaciji (Lante i sar., 2007 i 2008; Yin i sar., 2013). Odrasli mužjaci *Wistar* pacova prenatalno tretirani sa 200 µg/kg LPS-a 15. i 16. dana gestacije, i testirani u vodenom lavirintu manjem od standardnog u četvrodnevnom protokolu, ispoljili su deficite u akviziciji i pozivanju memorije (Yin i sar., 2013); ovi autori nisu testirali ženke. Slična oštećenja memorije u MVL-u prijavljena su u preadolescentnih pacova soja *Sprague Dawley*, i to mužjaka ali ne i ženki, koji su prenatalno bili izloženi efektima primene 500 µg/kg LPS-a, 19. dana gestacije (Lante i sar., 2007). Konzistentnost ovih nalaza kod mužjaka potvrđena je u izveštaju o deficitu radne memorije u vodenom lavirintu kod preadolescentnih pacova (Lante i sar., 2008). S druge strane, prenatalno izlaganje efektima LPS-a primenjenog u dozi od 790 µg/kg (E8/10/12) nije dovelo do poremećaja u prostornoj memoriji kod *Sprague Dawley* pacova starosti 90 dana (Hao i sar., 2010).

Pomenute studije koje su zabeležile deficite, i naši rezultati iz ovog seta eksperimenata, sugerišu da su LPS-om prenatalno tretirani mužjaci, pre nego ženke, podložni oštećenju akvizicije i pozivanja prostorne memorije, kao zadacima koji su povezani sa funkcijom hipokampusa (Vorhees i Williams, 2006). Ovi deficiti manifestovani u adultnom periodu mogu se očekivati nakon izlaganja efektima imune

aktivacije u kasnoj gestaciji. Zabeleženo je da je imuna aktivacija u gravidnih ženki izazvana administracijom LPS-a 15. i 16. dana gestacije za posledicu imala promene u sinaptičkoj transmisiji u hipokampusu mladih pacova, koje su se ogledale u smanjenju transmisije u CA1 sloju ćelija i kompenzatornom povećanju ekscitabilnosti piramidarnih nerona (Lowe i sar., 2008). Kod *Sprague-Dawley* pacova prenatalno tretiranih LPS-om 15. i 16. dana gestacije, Baharnoori i sar. (2009) su opisali poremećaje u razvoju piramidarnih neurona hipokampusa i medijalnog prefrontalnog korteksa, i to po specifičnom obrazcu: dužina dendrita je u medijalnom prefrontalnom korteksu bila značajno smanjena 10. i 35. postanatalnog dana, a do 60. dana se vratila u normalu, dok je u CA1 regionu hipokampusa 10. i 35. dana bila normalna, a 60. dana smanjena. Kako se neurogeneza u hipokampusu odvija i tokom postnatalnog razvoja mozga, uključujući adolescenciju i adultni period, promene u postnatalnoj proliferaciji ćelija dentatnog girusa i stepenu njihovog preživljavanja, indukovane prenatalnom primenom LPS-a u 15. i 16. ili 18. i 19. danu gestacije, mogu imati dugotrajne posledice na funkcionalnu morfologiju hipokampusa (Cui i sar., 2009). Takođe, izgleda da stepen ovih oštećenja, a i pratećih deficita prostorne memorije, zavisi od doze primenjenog LPS-a. Nakon izlaganja efektima više doze LPS-a, poremećaji u izvođenju prostornog zadatka u vodenom lavirintu zabeleženi su i kod preadolescentnih mužjaka pacova (Lante i sar., 2007 i 2008). Dodatno, imajući u vidu da prenatalna primena IL-6 u periodima od 11. do 13. ili od 17. do 19. dana gestacije dovodi do polno nespecifičnih deficita u izvođenju memorijskog zadatka u vodenom lavirintu, možemo pretpostaviti da mehanizmi poremećaja koji vode inkapacitaciji u vodenom lavirintu u mužjaka prenatalno tretiranih LPS-om u kasnoj gestaciji nisu posredovani isključivo efektima koje tokom imune aktivacije ostvaruje IL-6 (Samuelsson i sar., 2006).

U trećem setu eksperimenata, gde su mladunci nakon zalučivanja od 22. do 28. dana života intraperitonealno tretirani odgovarajućim ligandom MP-III-022 ili vehikulumom, razlike u ponašanju LPS mužjaka starosti 60 dana u odnosu na kontrolne životinje nisu registrovane ni u jednom od ispitivanih parametara proceduralne i deklarativne memorije. Iako to ne možemo potvrditi nekim relevantnim bihevioralnim ili nalazom druge vrste, možemo hipotetisati da je svakodnevno rukovanje životinjama u pomenutom periodu, koje je nosilo određenu dozu stresa u vidu primene injekcije, uticalo i na razvoj određenih kognitivnih

spособnosti bilo pozitivno kod LPS ili negativno kod kontrolnih životinja. Takođe, veliki broj životinja koje su učestvovala u trećem eksperimentalnom setu diktirao je i dosta širi vremenski okvir u kome su životinje oba prenatalna tretmana testirane u MVL-u. Iako se, koliko je to bilo moguće, išlo na ravnomerno uvođenje životinja određenog tretmana u ovaj test, razmak između prvog dana testiranja prve grupe životinja i poslednjeg dana testiranja poslednje grupe životinja je iznosio oko mesec dana, što može da utiče na rezultate u istraživanju ponašanja. Izostanak razlika koje su primećene u karakterizaciji modela u drugom setu eksperimenata, dodatno je onemogućio i tumačenje efekata primene MP-III-022.

5.1.6. Promene u socijalnoj interakciji

U proceni socijalne interakcije nismo našli razlike između životinja prenatalno izloženih efektima LPS-a i kontrolnih životinja istog pola starosti 40 ili 60 dana. Druge studije koje su istraživale socijalno ponašanje u modelima prenatalne primene LPS-a iznale su različite rezultate, od onih koji sugerišu asocijalnost (Kirsten i sar., 2010; Taylor i sar., 2012), preko nepromenjenog ponašanja (Kirsten i sar., 2012; Foley i sar., 2014) do povećanja socijalne interakcije (Harvey i Boksa, 2014a). Ovde svakako treba imati u vidu da je u ovim studijama korišćeno mnoštvo različitih protokola. Pored razlika u protokolu izazivanja imune aktivacije, u različitim studijama su korišćene životinje različite starosti, a varirao je i način uparivanja životinja u testu u zavisnosti od prenatalnog tretmana, kao i procedure postupanja sa životinjama i njihove izolacije. Taylor i sar. (2012) su izvestili da je primena LPS-a 15. dana gestacije dovela do smanjenja frekvencije interakcije među mladim mužjacima, ali ne i ženkama, inače na kratko izolovanim pre početka testa i uparenim sa poznatim životinjama iz istog kaveza. Imuna aktivacija izazavana primenom LPS-a u drugoj polovini 9. dana gestacije dovela je do deficita u socijalnom ponašanju izolovanih mladih i adultnih mužjaka (Kirsten i sar., 2010), ali ne i kada je isti protokol primenjen u testiranju ženki (Kirsten i sar., 2012). Kada su *Long-Evans* pacovi, prenatalno tretirani LPS-om 12. dana gestacije, na kratko pre testiranja 30. i 70. dana starosti izolovani i potom testirani u parovima istog prenatalnog tretmana, primećeni su samo suptilni deficiti, i to 70. dana života kada je efekat LPS-a sagledan kumulativno na nivou oba pola (Foley i sar., 2014). S druge strane, mužjaci *Sprague-Dawley* pacova, izloženi efektima administracije LPS-a 15. i 16. dana gestacije,

pokazali su značajno povećanje nivoa socijalne interakcije sa naivnim mladuncima koje su okotile netretirane ženke (Harvey i Boksa, 2014a). U animalnim neurorazvojnim modelima shizofrenije i autizma, testovi socijalne interakcije se generalno koriste u nastojanjima da se detektuju eventualne promene u ponašanju koje liče na socijalno povlačenje, te bi se mogle povezati sa negativnim simptomima shizofrenije, ili na deficite u socijalnoj interakciji i komunikaciji, koje se mogu opaziti u autizmu (Wilson i sar., 2014; Moser i sar., 2014). Iako nam ovi testovi ne mogu pomoći u diferencijaciji manifestacija socijalnih disfunkcija u ova dva poremećaja, od testa socijalne interakcije se očekuje da pomogne u validaciji sličnosti ovih animalnih modela. Dodatno, deficiti u socijalnom ponašanju životinja prenatalno izloženih efektima primene LPS-a uočeni su samo u protokolima koji uključuju period izolacije, što dodatno motiviše jedinke da interaguju, a zapravo rezultuje povećanom interakcijom kod kontrolnih životinja (Kirsten i sar., 2010). Izgleda da se takve promene ne mogu uočiti kada se životinje testiraju bez izolacije (Kirsten i sar., 2010). U našoj studiji, analizirane su interakcije između životinja istog prenatalnog tretmana, sa ciljem da se lakše uoči pretpostavljeno socijalno povlačenje kod LPS-om tretiranih jedinki. Uprkos ovom pristupu, izostale su promene u socijalnom ponašanju u našem protokolu, u okolnostima bez izolacije.

5.1.7. Anksioznost u eksploraciji

Odrasli mužjaci pacova prenatalno izloženi efektima primene LPS-a 15. i 16. dana gestacije ispoljili su u drugom setu naših eksperimenata povećan nivo bazične anksioznosti. Kada su pacovi starosti 60 dana testirani u UPL-u, LPS mužjaci su ostvarili manje vrednosti procenta vremena provedenog na otvorenim kracima i procenta ulazaka u otvorene krake, dok parametri opšte aktivnosti nisu varirali značajno u odnosu na kontrolnu grupu. Jedina studija, pored naše, u kojoj su autori koristili identični protokol LPS administracije i Wistar pacove nije prijavila razlike u nivou anksioznosti u UPL-u između LPS i kontrolnih mužjaka starosti 120 dana (Wishhof i sar., 2015a), mada parametri anksioznosti analizirani u ovoj studiji nisu bili standardni (Hogg, 1996). Dodatno, lavirint korišćen u studiji Wischhof i sar. (2015a) nije bio standardnih dimenzija, testirane životinje nisu bile eksperimentalno naivne, i efekat legla nije uzet u obzir prilikom statističke analize kao u našoj studiji, a što je preporučeno u Lazic i Essioux (2013). Povećana anksioznost odraslih LPS

mužjaka detektovana u našoj studiji u UPL-u ipak nije uočena u testu OP-a u analizi odgovarajućih parametara (procenat pređenog puta u centralnoj zoni i vreme provedeno u centralnoj zoni) tokom inicijalnih 10 min eksploracije, koliko je trajao test OP-a. Ovo relativno neslaganje naših nalaza iz UPL-a i OP-a ne čudi ako se zna da ova dva testa zapravo mere različite vidove anksioznosti (Ramos, 2008). UPL se smatra robusnijim u testiranju anksioznosti povezane sa eksplorativnom aktivnošću i preporučuje se da se izvodi pre drugih testova uz korišćenje isključivo eksperimentalno naivnih životinja koje prethodno nisu iskusile efekte izlaganja nepoznatoj sredini (Walf i Frye, 2007). Ovde se može hipotetisati i da su slični efekti doprineli nedostatku razlika u testu OP-a, pogotovo što je test OP-a sproveden 24 h nakon UPL-a. Nezavisno od ovog razmatranja, izostanak razlike između LPS i kontrolnih mužjaka u nivou anksioznosti u OP-u u našim eksperimentima slaže se za rezultatima iz druge dve studije koje su koristile isti protokol primene LPS-a i pratile ponašanje mužjaka starosti 60 dana tokom 1 h (Wischhof i sar., 2015a), ili starosti 100-120 dana tokom 30 minuta (Wischhof i sar., 2015b).

Pri analizi ponašanja ženskih potomaka starosti 60 dana u UPL-u i OP-u, nismo našli značajne razlike u vrednostima parametara vezanih za anksioznost. Naši rezultati su u suprotnosti sa izveštajem iz studije Wischhof i sar. (2015), prema kome su LPS ženke starosti 60 dana provele više vremena istražujuću centralnu zonu OP-a, dok su manje istraživale otvorene krake UPL-a u poređenju sa kontrolnim životinjama (autori ove studije procenjivali su anksioznost koristeći nestandardne parametre). Dodatno, u analizi opšteg nivoa aktivnosti ženki u ovim testovima dobili smo potvrdu nalaza iz lokomotornog eseja. Dok je u UPL-u smanjena aktivnost LPS ženki u odnosu na kontrolne vrednosti potvrđena kroz dva relevantna parametra (broj ulazaka u zatvorene krake i ukupan broj ulazaka), u testu OP-a zabeležen je trend smanjenja pređenog puta tokom samo 10 minuta snimanja.

U trećem setu eksperimenata, gde su mladunci nakon zalučivanja od 22. do 28. dana života intraperitonealno tretirani odgovarajućim ligandom MP-III-022 ili vehikulumom, razlike u anksioznosti LPS mužjaka starosti 60 dana u odnosu na kontrolne životinje nisu bile značajne. Kao što je ranije komentarisano, svakodnevno rukovanje životinjama u pomenutom periodu, koje je podrazumevalo i ponavljani stres usled primene injekcije, moglo je, i više nego na kognitivne sposobnosti, uticati na bazičnu anksioznost odraslih životinja merenu u UPL-u. Takođe, imajući u vidu i

veliku osetljivost samog UPL testa na faktore okoline, koji se čak i u kontrolisanim laboratorijskim uslovima mogu delimično menjati tokom dužeg perioda testiranja, izostanak značajnog povećanja anksioznosti se delom može pripisati i dugom trajanju ovog eksperimenta sa velikim brojem životinja. Izostanak razlika koje su primećene u karakterizaciji modela dodatno je onemogućio i tumačenje efekata primene MP-III-022.

5.2. Odabir doze MP-III-022

Analize farmakokinetičkih i elektrofizioloških podataka o ligandu MP-III-022, prezentovanih u radu Stamenić i sar. (2016), pomogle su u tumačenju efekata jednokratne primene ovog liganda na nivou modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora. Postulirano je da doze od 1 do 10 mg/kg kod odraslih pacova prouzrokuju blagu do umerenu ili jaku selektivnu potencijaciju ovih receptora. Ovakva modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora nije bila praćena ataksijom ili sedacijom životinja, što je pokazano u rotarod testu i testu spontane lokomotorne aktivnosti. Kako su, pri ponavljanoj primeni doze od 2,5 mg/kg u prezentovanoj kinetičkoj studiji, maksimalne slobodne koncentracije MP-III-022 u mozgu mladunaca procenjene na oko 100 nM, što je koncentracija koja je u *in vitro* eksperimentima povezana sa blagom pozitivnom modulacijom $\alpha 2$ - i $\alpha 3$ GABA_A receptora (Slika 3), doneli smo odluku da tokom ponavljane primene ovog liganda od 22. do 28. dana koristimo za 20% nižu dozu (2 mg/kg). Na osnovu detaljnih analiza studije Stamenić i sar. (2016) i rezultata ovde izložene kinetičke studije može se smatrati da je ova doza pri ponavljanoj primeni kod mladunaca pacova omogućila dugotrajnu blagu do umerenu pozitivnu modulaciju $\alpha 5$ GABA_A receptora, bez istovremene modulacije drugih podtipova GABA_A receptora.

5.3. Efekti primene MP-III-022 na deficit u amfetaminom indukovanoj lokomotornoj aktivnosti

U trećem setu eksperimenata pokazali smo da ponavljana potencijacija $\alpha 5$ GABA_A receptora u preadolescenciji pacova, od 22. do 28. postnatalnog dana, prevenira razvoj deficita u lokomotornom odgovoru na amfetamin kod LPS ženki starosti 60 dana. Inače, nagoveštaj ovog deficita može se uočiti već u lokomotornim testovima iz drugog seta eksperimenata, sprovedenih na životinjama starosti 40 dana.

Dodatno, posle pojave $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora u fetusnom mozgu pacova između 14. i 17. dana embrionalnog razvića (Laurie i sar., 1992), sledeći kritični period u razvoju funkcije ovih receptora je između 10. i 30. postnatalnog dana (Yu i sar., 2006). Imajući u vidu ove nalaze, prepostavili smo da bi selektivna modulacija $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora trebalo da se izvrši pre perioda adolescencije.

Razlika među polovima u efektima modulacije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora je dodatni originalan nalaz, ali ne i neočekivan ako se ima u vidu da je do sada opisan veliki broj razlika u bihevioralnim i elektrofiziološkim parametrima vezanim za funkciju hipokampusa (Monfort i sar., 2015). Dalje, Tonsfeldt i sar. (2016) su zapazili da je perzistentna neuroinflamacija pod uticajem faktora pol, kao i da su GABA_A receptori u opisanim okolnostima manje aktivni kod ženki, što može objasniti intenzivnije posledice pozitivne modulacije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora kod ženki u našoj studiji. Takođe, nedavno je pokazano da i jednokratni i ponavljani tretman ligandom relativno selektivnim za $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptore i strukturno sličnim ligandu MP-III-022, ostvaruje određene bihevioralne efekte u bateriji testova samo kod ženki, a ne i mužjaka miševa koji su izloženi blagom nepredvidljivom hroničnom stresu (Piantadossi i sar., 2016). Da su potencijalni poremećaji na nivou GABA-ergičke transmisije posredovane $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptorima, indukovani prenatalnom primenom LPS-a, kod ženki drugačije prirode od onih kod mužjaka, implicira i nalaz promene ponašanja pacova u MVL-u u drugom setu naših eksperimenata, gde kod LPS ženki nisu registrovana oštećenja prostorne memorije uočena kod LPS mužjaka. Za detaljnije zaključke o efektima modulacije $\alpha 5\text{GABA}_A$ receptora u modelu korišćenom u našoj studiji, neophodne su i studije genske ekspresije i elektrofiziološke aktivnosti ovih receptora *ex vivo*.

5.4. Promene u koncentraciji neurotransmitera u mozgu odraslih pacova

U analizi neurotransmitera u mozgu LPS mužjaka starosti 60 dana u našem eksperimentu primećen je značajan porast koncentracije glutamata u ventralnom hipokampusu i acetilholina u dorzalnom strijatumu, ali eventualne uticaje ovih promena na ponašanje životinja nije moguće jednoznačno sagledati. Moguće je da značajno smanjenje koncentracije acetilholina u ventralnom hipokampusu ženki tretiranih ligandom MP-III-022 podržava nalaz o smanjenoj lokomociji u segmentu

habitucije, jer je oslobađanje acetilholina u ventralnom hipokampusu povezano sa povećanom eksplorativnom aktivnošću (Bianci i sar., 2003)

5.5. Opšta diskusija

Jedna od glavnih tema koje se nameću u diskusiji tiče se translacione vrednosti dobijenih rezultata. Poznato je da postoje periodi ranjivosti u embriogenezi tokom kojih uticaji okoline mogu izazvati poremećaje u razvoju i predisponirati shizofreniju (Selemon i Zecevic, 2015) ili autizam (Arndt i sar., 2005). Imajući u vidu da su bihevioralne promene u našem modelu zabeležene u periodu rane odraslosti, a ne već tokom adolescencije, nameće se zaključak da korišćeni protokol prenatalne primene LPS-a modeluje razvoj fenotipa predisponiranog za razvoj shizofrenije, a ne autizma. Međutim, dva prateća nalaza treba takođe razmotriti. Prvi predstavlja razliku uočenu među polovima, a drugi samu prirodu odloženih bihevioralnih posledica izlaganja efektima LPS-a. Razlike u ranjivosti među polovima, sagledane kroz rezultate u MVL-u i UPL-u, treba tumačiti u svetlu razlika u njihovim neurorazvojnim putevima koje se javljaju već tokom kasne embriogeneze (Davis i Pfaff, 2014). Za drugi nalaz, smanjenu lokomotornu aktivnost i reaktivnost na amfetamin kod oba pola, koja kod ženki predstavlja novinu u izveštajima, možemo se postaviti pitanje da li on oslikava stanje koje liči na shizofreniju. Smanjena reaktivnost na amfetamin je već dokumentovana u nekoliko animalnih modela koji se koriste u istraživanju shizofrenije (Schmidt i sar., 2010; Bronson i sar., 2011; Paredes i sar., 2015), i takva relativna neosetljivost na dejstvo amfetamina može se povezati sa nalazima koji opisuju značajno smanjenu reaktivnost na amfetamin kod pacijenata sa izolovanom manifestacijom negativnih simptoma (Cesarec i sar., 1985; Sanfilipo i sar., 1996). U svakom slučaju, svaka replikabilnost i reproduktivnost rezultata dobijenih u ovakvim modelima zavređuje fokusirano ispitivanje karakterističnih promena koje se mogu povezati sa specifičnim simptomima, umesto traženja načina da se taj model u svojoj celini validira kao model određenog psihijatrijskog poremećaja, koji je pak u svojoj svojoj kompleksnosti svojstven samo ljudima.

Prenatalno izlaganje efektima primene LPS-a je prihvaćeno kao referentni model prenatalne imune aktivacije sa značajem za proučavanje razvoja shizofrenije i/ili autizma (Harvey i Boksa, 2012; Kirsten i sar., 2013). Nasuprot protokolima ponavljane administracije visokih doza LPS-a tokom celog perioda graviditeta koji

dovode do dugotrajne postnatalne inflamacije (Borrell i sar., 2002; Romero i sar., 2010), naš model sa analiziranim bihevioralnim promenama kao posledicama kratkotrajnog izlaganja umerenoj dozi LPS-a može se smatrati replikabilnim i translaciono realističnim modelom poremećaja prenatalnog neurorazvoja. Klinička ispitivanja raznih psihotropnih lekova u slučajevima prodroma shizofrenije kod adolescentnih pacijanata (npr. Cornblatt i sar., 2007) uvrstila su među prioritete zadatke kreiranje animalnih prekliničkih modela koji bi omogućili ispitivanje ranih intervencija i preventivnih tretmana (Meyer i Feldon, 2010). U prekliničkim studijama koje su uvele koncept preventivnog tretmana u periadolescenciji, u modelu prenatalne primene PolyI:C, potvrđeno je da je tretman antipsihoticima i/ili antidepresivima uspešno blokirao neke od abnormalnosti povezanih sa shizofrenijom (Piontkewitz i sar., 2009; Meyer i sar., 2010). U okviru istraživanja koja se fokusiraju na ulogu GABA-ergičkog sistema u razvoju shizofrenije (Schmidt i Mirnics, 2015), naši nalazi o preveniranju, uz pomoć farmakološke modulacije aktivnosti $\alpha 5$ GABA_A receptora u preadolescenciji, makar nekih od uočenih posledica prenatalne imune aktivacije, upućuju na novu metu istraživanja u strategiji preventivnih tretmana.

6. ZAKLJUČCI

1. U modelu prenatalnog poremećaja razvoja nervnog sistema, izazvanog imunološkom aktivacijom, primena prve doze LPS-a (100 µg/kg, O111:B4 serotip *E. coli*) 15. dana gestacije kod ženki *Wistar* pacova dovodi do indukcije ključnih inflamatornih citokina: TNF- α u krvi majke i placentalnom tkivu, i IL-6 u krvi majke i amnionskoj tečnosti. Indukcija ovih citokina u mozgu fetusa nije utvrđena.
2. Druga primena iste doze LPS-a 16. dana gestacije ne dovodi do nove aktivacije imunog sistema, praćene preko ključnih inflamatornih citokina TNF- α i IL-6.
3. Istovremeno sa porastom nivoa IL-6 u amnionskoj tečnosti, indukovanim prvom dozom LPS-a, u fetusnim mozgovima je zabeležen porast koncentracije GABA-e i smanjenje koncentracije glutamata. Ova značajna promena ključnih neurotransmitera nije zabeležena nakon primene druge doze LPS-a 16. dana gestacije.
4. U moždanom tkivu i krvi mladih odraslih pacova koji su prenatalno bili izloženi efektima primene LPS-a nisu registrovane povišene koncentracije TNF- α ili IL-6. Imajući u vidu široko potkrepljenu hipotezu da prenatalna akutna inflamacija može da se razvije u latentnu i perzistentnu formu, koje predisponiraju razvoj shizofrenije, odnosno autizma, utvrđeni izostanak perzistentne neuroinflamacije sugeriše da korišćeni protokol primene LPS-a prevashodno modeluje fenotip predisponiran za razvoj shizofrenije.
5. Oštećenje prostorne memorije i povećana anksioznost kod mladih odraslih, ali ne i adolescentnih mužjaka prenatalno izloženih efektima primene LPS-a, jesu promene koje se mogu povezati sa standardnom simptomatologijom shizofrenije.
6. S druge strane, smanjena spontana lokomotorna aktivnost i smanjeni lokomotorni odgovor na amfetamin kod odraslih potomaka oba pola mogu se povezati sa smanjenom reaktivnošću na amfetamin kod pacijenata sa izolovanom manifestacijom negativnih simptoma shizofrenije.
7. Potencijacija α 5GABA_A receptora u periodu preadolescencije, sprovedena ponavljanom primenom farmakokinetički optimizovane doze MP-III-022, koja

je obezbedila selektivnost dejstva na ovim receptorima, prevenirala je pojavu deficita u lokomotornom odgovoru na amfetamin kod ženki prenatalno izoženih efektima primene LPS-a.

Klinički značaj sprovedenih istraživanja ogleda se u mogućnosti da se podesnom modulacijom GABA-ergičke neurotransmisije u kritičnom periodu koji prethodi pojavi prvih simptoma neurorazvojnog poremećaja, kakva je shizofrenija, obezbedi sprečavanje ili ublažavanje promena u ponašanju koje umanjuju kvalitet života pacijenata. Dalja istraživanja treba da razjasne zapažene razlike u efektima kako prenatalne inflamacije, tako i postnatalne pozitivne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora, u zavisnosti od ispitivanog pola. Rasvetljavanje molekuskog i celularnog supstrata potencijalne primene ovog inovativnog pristupa zahteva sprovođenje niza molekularno-bioloških, elektrofizioloških i bihejvioralnih ispitivanja.

7. REFERENCE

- Akarsu ES, Mamuk S. Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292: 1846-50. doi 10.1152/ajpregu.00786.2006
- Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci.* 2005; 23: 189-99. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001
- Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2006; 11: 47-55. doi: 10.1038/sj.mp.4001748
- Atack JR. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors as a target for the development of novel anxiolytics. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005; 14: 601-18. doi: 10.1517/13543784.14.5.601
- Atladóttir HO, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 2010; 40: 1423-30. doi: 10.1007/s10803-010-1006-y.
- Auvin S, Shin D, Mazarati A, Nakagawa J, Miyamoto J, Sankar R. Inflammation exacerbates seizure-induced injury in the immature brain. *Epilepsia.* 2007; 48 Suppl 5:27-34. Erratum in: *Epilepsia.* 2007; 48: 2379. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01286.x
- Baharoori M, Brake WG, Srivastava LK. Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex and hippocampus in rats. *Schizophr Res.* 2009; 107: 99-109. doi: 10.1016/j.schres.2008.10.003.
- Banks MI, Hardie JB, Pearce RA. Development of GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in hippocampus. *J Neurophysiol.* 2002; 88: 3097-107. doi: 10.1152/jn.00026.2002
- Basta-Kaim A, Budziszewska B, Leśkiewicz M, Fijał K, Regulska M, Kubera M, Wędzony K, Lasoń W. Hyperactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in lipopolysaccharide-induced neurodevelopmental model of schizophrenia in rats: effects of antipsychotic drugs. *Eur J Pharmacol.* 2011b; 650: 586-95. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.083.
- Basta-Kaim A, Fijał K, Budziszewska B, Regulska M, Leśkiewicz M, Kubera M, Gołembowska K, Lasoń W, Wędzony K. Prenatal lipopolysaccharide treatment enhances MK-801-induced psychotomimetic effects in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011a; 98: 241-9. doi: 10.1016/j.pbb.2010.12.026.

Basta-Kaim A, Fijał K, Ślusarczyk J, Trojan E, Głombik K, Budziszewska B, Leśkiewicz M, Regulska M, Kubera M, Lasoń W, Wędzony K. Prenatal administration of lipopolysaccharide induces sex-dependent changes in glutamic acid decarboxylase and parvalbumin in the adult rat brain. *Neuroscience*. 2015; 287: 78-92. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.013.

Bell MJ, Hallenbeck JM, Gallo V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr Res*. 2004; 56: 541-6. doi: 10.1203/01.PDR.0000139407.89883.6B

Bell MJ, Hallenbeck JM. Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain. *J Neurosci Res*. 2002; 70: 570-9. doi: 10.1002/jnr.10423

Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3: 728-39. doi: 10.1038/nrn920

Ben-Ari Y. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience*. 2014; 279: 187-219. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.001.

Benes FM, Lim B, Matzilevich D, Walsh JP, Subburaju S, Minns M. Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 10164-9. doi: 10.1073/pnas.0703806104

Benson JA, Löw K, Keist R, Mohler H, Rudolph U. Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett*. 1998; 431: 400-4.

Bianchi L, Ballini C, Colivicchi MA, Della Corte L, Giovannini MG, Pepeu G. Investigation on acetylcholine, aspartate, glutamate and GABA extracellular levels from ventral hippocampus during repeated exploratory activity in the rat. *Neurochem Res*. 2003; 28: 565-73. doi 10.1023/A:1022881625378

Bitanhirwe BK, Peleg-Raibstein D, Mouttet F, Feldon J, Meyer U. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35: 2462-78. doi: 10.1038/npp.2010.129.

Blokland A, Rutten K, Prickaerts J. Analysis of spatial orientation strategies of male and female Wistar rats in a Morris water escape task. *Behav Brain Res*. 2006; 171: 216-24. doi: 10.1016/j.bbr.2006.03.033

Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*. 2010; 24: 881-97. doi: 10.1016/j.bbi.2010.03.005.

Borrell J, Vela JM, Arévalo-Martin A, Molina-Holgado E, Guaza C. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the

etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 26: 204-15. doi: 10.1016/S0893-133X(01)00360-8

Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 2569-74. doi: 10.1073/pnas.94.6.2569.

Bronson SL, Ahlbrand R, Horn PS, Kern JR, Richtand NM. Individual differences in maternal response to immune challenge predict offspring behavior: contribution of environmental factors. *Behav Brain Res*. 2011; 220: 55-64. doi: 10.1016/j.bbr.2010.12.040.

Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M, Babulas VP, Susser ES. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2004; 61: 774-80. doi: 10.1001/archpsyc.61.8.774.

Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry*. 2010; 167: 261-80. doi: 10.1176/appi.ajp.2009.09030361.

Brown AS, Vinogradov S, Kremen WS, Poole JH, Deicken RF, Penner JD, McKeague IW, Kochetkova A, Kern D, Schaefer CA. Prenatal exposure to maternal infection and executive dysfunction in adult schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2009; 166: 683-90. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.08010089.

Brunig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM: Intact sorting, targeting, and clustering of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol* 2002; 443: 43-55. doi: 10.1002/cne.10102

Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res*. 2000; 47: 64-72. doi: 10.1203/00006450-200001000-00013

Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 3662-7. doi: 10.1073/pnas.0307231101

Cesarec Z, Nyman AK. Differential response to amphetamine in schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*. 1985; 71: 523-38. doi: 10.1111/j.1600-0447.1985.tb05066.x

Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*. 2001; 105: 7-17. doi:

Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 2007; 28: 931-7. doi: 10.1016/j.neuro.2007.01.014

Clarke MC, Tanskanen A, Huttunen M, Whittaker JC, Cannon M. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2009; 166: 1025-30. doi: 10.1176/appi.ajp.2009.08010031.

Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL. Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 1059-68. doi: 10.1038/nn1499

Cohen AS, Lin DD, Coulter DA. Protracted postnatal development of inhibitory synaptic transmission in rat hippocampal area CA1 neurons. *J Neurophysiol*. 2000; 84: 2465-76.

Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, et al. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the $\alpha 5$ subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci*. 2002; 22: 5572-80. doi: 20026436

Cornblatt BA, Lencz T, Smith CW, Olsen R, Auther AM, Nakayama E, Lesser ML, Tai JY, Shah MR, Foley CA, Kane JM, Correll CU. Can antidepressants be used to treat the schizophrenia prodrome? Results of a prospective, naturalistic treatment study of adolescents. *J Clin Psychiatry*. 2007; 68: 546-57. doi: 10.4088/JCP.v68n0410

Couch Y, Trofimov A, Markova N, Nikolenko V, Steinbusch HW, Chekhonin V, Schroeter C, Lesch KP, Anthony DC, Strekalova T. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice. *J Neuroinflammation*. 2016; 13: 108. doi: 10.1186/s12974-016-0572-0.

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U. Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 8980-5. doi: 10.1073/pnas.142288699

Cui K, Ashdown H, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophr Res*. 2009; 113: 288-97. doi: 10.1016/j.schres.2009.05.003.

Dahlgren J, Samuelsson AM, Jansson T, Holmäng A. Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatr Res*. 2006; 60: 147-51. doi: 10.1203/01.pdr.0000230026.74139.18

Davis EP, Pfaff D. Sexually dimorphic responses to early adversity: implications for affective problems and autism spectrum disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 49: 11-25. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.06.014.

Dilsaver SC, Majchrzak MJ. Effects of placebo (saline) injections on core temperature in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1990; 14(3): 417-22. doi: 10.1016/0278-5846(90)90029-G

Eastwood SL, Harrison PJ. Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2006; 163: 540-2. doi: 10.1176/appi.ajp.163.3.540

Foley KA, MacFabe DF, Vaz A, Ossenkopp KP, Kavaliers M. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: implications for autism spectrum disorders. *Int J Dev Neurosci*. 2014; 39: 68-78. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.04.001.

Fortier ME, Joobar R, Luheshi GN, Boksa P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *J Psychiatr Res*. 2004; 38: 335-45. doi: 10.1016/j.jpsychires.2003.10.001

Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res*. 2007; 181 :270-7. doi: 10.1016/j.bbr.2007.04.016

Fritschy JM, Johnson DK, Mohler H, Rudolph U. Independent assembly and subcellular targeting of GABA(A)-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett*. 1998; 249: 99-102.

Gayle DA, Beloosesky R, Desai M, Amidi F, Nuñez SE, Ross MG. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286: 1024-9. doi: 10.1152/ajpregu.00664.2003

Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P, Sébire G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*. 2009; 158: 673-82. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.032. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.032

Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sébire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol*. 2010; 184: 3997-4005. doi: 10.4049/jimmunol.0903349.

Godowski PJ. A smooth operator for LPS responses. *Nature Immunology*. 2005; 6: 544-6. doi: 10.1038/ni0605-544

Goines PE, Croen LA, Braunschweig D, Yoshida CK, Grether J, Hansen R, Kharrazi M, Ashwood P, Van de Water J. Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Mol Autism*. 2011; 2: 13. doi: 10.1186/2040-2392-2-13.

Grilly DM, Loveland A. What is a "low dose" of d-amphetamine for inducing behavioral effects in laboratory rats? *Psychopharmacology (Berl)*. 2001; 153: 155-69. doi: 10.1007/s002130000580

Groen MR, Paulsen O, Pérez-Garci E, Nevian T, Wortel J, Dekker MP, Mansvelder HD, van Ooyen A, Meredith RM. Development of dendritic tonic GABAergic inhibition regulates excitability and plasticity in CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2014; 112:287-99. doi: 10.1152/jn.00066.2014

Hammarlund-Udenaes M. Active-site concentrations of chemicals - are they a better predictor of effect than plasma/organ/tissue concentrations? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010; 106: 215-20. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00517.x.

Hao LY, Hao XQ, Li SH, Li XH. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. *Neuroscience*. 2010; 166: 763-70. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.006.

Harvey L, Boksa P. Additive effects of maternal iron deficiency and prenatal immune activation on adult behaviors in rat offspring. *Brain Behav Immun*. 2014b; 40: 27-37. doi: 10.1016/j.bbi.2014.06.005.

Harvey L, Boksa P. Do prenatal immune activation and maternal iron deficiency interact to affect neurodevelopment and early behavior in rat offspring? *Brain Behav Immun*. 2014a; 35: 144-54. doi: 10.1016/j.bbi.2013.09.009.

Harvey L, Boksa P. Prenatal and postnatal animal models of immune activation: relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Dev Neurobiol*. 2012; 72: 1335-48. doi: 10.1002/dneu.22043.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 54: 21-30. doi: 10.1016/0091-3057(95)02126-4

Huang F, Li J, Shi HL, Wang TT, Muhtar W, Du M, Zhang BB, Wu H, Yang L, Hu ZB, Wu XJ. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC-MS/MS. *J Neurosci Methods*. 2014 May 30;229:8-14. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.04.004.

Jenkins TA, Harte MK, Stenson G, Reynolds GP. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Behav Brain Res*. 2009; 205: 355-9. doi: 10.1016/j.bbr.2009.07.014.

Kirsten TB, Chaves-Kirsten GP, Chaible LM, Silva AC, Martins DO, Britto LR, Dagli ML, Torrão AS, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. *J Neurosci Res.* 2012; 90: 1903-12. doi: 10.1002/jnr.23089.

Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, Bernardi MM. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS One.* 2013; 8: e82244. doi: 10.1371/journal.pone.0082244.

Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation.* 2010; 17: 240-51. doi: 10.1159/000290040.

Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinssen EP. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol.* 2014; 10: 643-60. doi: 10.1038/nrneurol.2014.187.

Lanté F, Meunier J, Guiramand J, De Jesus Ferreira MC, Cambonie G, Aimar R, Cohen-Solal C, Maurice T, Vignes M, Barbanel G. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus.* 2008; 18: 602-9. doi: 10.1002/hipo.20421.

Lanté F, Meunier J, Guiramand J, Maurice T, Cavalier M, de Jesus Ferreira MC, Aimar R, Cohen-Solal C, Vignes M, Barbanel G. Neurodevelopmental damage after prenatal infection: role of oxidative stress in the fetal brain. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42: 1231-45. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.027

Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J neurosci.* 1992; 12: 4151-72.

Lazic SE, Essioux L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci.* 2013; 14:37. doi: 10.1186/1471-2202-14-37.

Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol.* 1999; 79: 189-201.

Ling Z, Gayle DA, Ma SY, Lipton JW, Tong CW, Hong JS, Carvey PM. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Mov Disord.* 2002; 17: 116-124. doi: 10.1002/mds.10078

Ling Z, Zhu Y, Tong C, Snyder JA, Lipton JW, Carvey PM. Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats

exposed to LPS prenatally. *Exp Neurol.* 2006; 199: 499–512. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.01.010

Ling Z, Zhu Y, Tong CW, Snyder JA, Lipton JW, Carvey PM. Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging. *Exp Neurol.* 2009; 216: 312–20. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.12.004.

Liu X, Lee JG, Yee SK, Bresee CJ, Poland RE, Pechnick RN. Endotoxin exposure in utero increases ethanol consumption in adult male offspring. *Neuroreport.* 2004; 15: 203–6. doi: 10.1097/00001756-200401190-00039

Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüllicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. Molecular and neuronal substrate of the selective attenuation of anxiety. *Science* 2000; 290: 131–34. doi: 10.1126/science.290.5489.131

Lowe GC, Luheshi GN, Williams S. Maternal infection and fever during late gestation are associated with altered synaptic transmission in the hippocampus of juvenile offspring rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295: R1563–71. doi: 10.1152/ajpregu.90350.2008.

Ludewig K, Geyer MA, Vollenweider FX. Deficits in prepulse inhibition and habituation in never-medicated, first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2003; 54:121–8. doi: doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01925-X

Luheshi GN. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 856: 83–9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08316.x

Marty R, Wehrle FJ, Alvarez-Leefmans B, Gasnier C, Sotelo. Postnatal maturation of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ co-transporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15: 233–245. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01854.x

März P, Heese K, Dimitriadis-Schmutz B, Rose-John S, Otten U. Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia.* 1999; 26: 191–200. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199905)26:33.0.CO;2-#

Mathews IZ, McCormick CM. Female and male rats in late adolescence differ from adults in amphetamine-induced locomotor activity, but not in conditioned place preference for amphetamine. *Behav Pharmacol.* 2007; 18: 641–50. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282effbf5

Meijer MK, Spruijt BM, van Zutphen LF, Baumans V. Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Lab Anim.* 2006; 40: 382–91. doi: 10.1258/002367706778476370

- Meyer U, Feldon J, Dammann O. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr Res.* 2011; 69: 26-33. doi: 10.1203/PDR.0b013e318212c196.
- Meyer U, Feldon J, Yee BK. A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2009; 35: 959-72. doi: 10.1093/schbul/sbn022
- Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010; 90: 285-326. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.10.018.
- Meyer U, Spoerri E, Yee BK, Schwarz MJ, Feldon J. Evaluating early preventive antipsychotic and antidepressant drug treatment in an infection-based neurodevelopmental mouse model of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2010; 36: 607-23. doi: 10.1093/schbul/sbn131.
- Milić M, Divljaković J, Rallapalli S, van Linn ML, Timić T, Cook JM, Savić MM. The role of $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol.* 2012; 23: 191-7. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283512c85.
- Miller GM. The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. *J Neurochem.* 2011; 116: 164-76. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07109.x.
- Monfort P, Gomez-Gimenez B, Llansola M, Felipe V. Gender differences in spatial learning, synaptic activity, and long-term potentiation in the hippocampus in rats: molecular mechanisms. *ACS Chem Neurosci.* 2015; 6: 1420-7. doi: 10.1021/acschemneuro.5b00096
- Mortensen PB, Nørgaard-Pedersen B, Waltoft BL, Sørensen TL, Hougaard D, Yolken RH. Early infections of *Toxoplasma gondii* and the later development of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2007; 33: 741-4. doi: 10.1093/schbul/sbm009
- Moser P. Evaluating negative-symptom-like behavioural changes in developmental models of schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2014; 24: 774-787. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.11.004
- Nouel D, Burt M, Zhang Y, Harvey L, Boksa P. Prenatal exposure to bacterial endotoxin reduces the number of GAD67- and reelin-immunoreactive neurons in the hippocampus of rat offspring. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012; 22: 300-7. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.08.001.
- Nyiri G, Freund TF, Somogyi P. Input-dependent synaptic targeting of $\alpha(2)$ -subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur J Neurosci.* 2001; 13: 428-42

O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R.. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Molecular psychiatry*. 2009; 14: 511-522. doi:10.1038/sj.mp.4002148.

O'Callaghan E, Sham PC, Takei N, Murray G, Glover G, Hare EH, Murray RM. The relationship of schizophrenic births to 16 infectious diseases. *Br J Psychiatry*. 1994; 165: 353-6.

OECD, Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, France, 2007.

Olsen RW, Sieghart W. GABA_A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacol*. 2009; 56: 141-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.045

Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. *Update Pharmacol Rev*. 2008; 60: 243-60. doi: 10.1124/pr.108.00505

Oskvig DB, Elkahlon AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun*. 2012; 26: 623-34. doi: 10.1016/j.bbi.2012.01.015

Paredes RM, Piccart E, Navaira E, Cruz D, Javors MA, Koek W, Beckstead MJ, Walss-Bass C. Physiological and behavioral effects of amphetamine in BACE1(-/-) mice. *Genes Brain Behav*. 2015; 14: 411-8. doi: 10.1111/gbb.12222.

Pérez-Navarro E, Alberch J, Neveu I, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo. *Neuroscience*. 1999; 91: 1257-64. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00723-4

Piantadosi SC, French BJ, Poe MM, Timić T, Marković BD, Pabba M, Seney ML, Oh H, Orser BA, Savić MM, Cook JM, Sibille E. Sex-Dependent Anti-Stress Effect of an $\alpha 5$ Subunit Containing GABA(A) Receptor Positive Allosteric Modulator. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 446. doi: 10.3389/fphar.2016.00446

Piontkewitz Y, Assaf Y, Weiner I. Clozapine administration in adolescence prevents postpubertal emergence of brain structural pathology in an animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2009 Dec 1;66(11):1038-46. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.07.005.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. 2000; 101: 815-50. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00442-5

Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E. Expression of the Na-K-2Clcotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol*. 1997; 33: 781-95. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(19971120)33:6<781::AID-NEU6>3.0.CO;2-5

Powell CM, Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry*. 2006; 59: 1198-207. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.05.008

Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71: 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414

Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29: 493-8. doi: 10.1016/j.tips.2008.07.005.

Ramos B, Lopez-Tellez JF, Vela J, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. Expression of alpha 5 GABAA receptor subunit in developing rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004; 151: 87-98. doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.04.003

Read KD, Braggio S. Assessing brain free fraction in early drug discovery. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010; 6: 337-44. doi: 10.1517/17425250903559873.

Romero E, Ali C, Molina-Holgado E, Castellano B, Guaza C, Borrell J. Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32: 1791-804. doi: 10.1038/sj.npp.1301292

Romero E, Guaza C, Castellano B, Borrell J. Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2010; 15: 372-83. doi: 10.1038/mp.2008.44.

Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R, Hübschle T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009; 29: 229-45. doi: 10.1016/j.iac.2009.02.005.

Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmäng A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290: R1345-56. doi: 10.1152/ajpregu.00268.2005

Sanfilippo M, Wolkin A, Angrist B, van Kammen DP, Duncan E, Wieland S, Cooper TB, Peselow ED, Rotrosen J. Amphetamine and negative symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996; 123: 211-4. doi: 10.1007/BF02246180

Savić MM, Huang S, Furtmüller R, Clayton T, Huck S, Obradović DI, Ugresić ND, Sieghart W, Bokonjić DR, Cook JM. Are GABAA receptors containing alpha5 ubunits contributing to the sedative properties of benzodiazepine site agonists? *Neuropsychopharmacology*. 2008b; 33: 332-9. doi: 10.1038/sj.npp.1301403

Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of α 1- and α 5-containing GABAA receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*. 2009; 12: 1179-93. doi:10.1017/S1461145709000108. doi: 10.1017/S1461145709000108

Schlotz W, Phillips DI. Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun*. 2009; 23: 905-16. doi: 10.1016/j.bbi.2009.02.001.

Schmidt LS, Miller AD, Lester DB, Bay-Richter C, Schülein C, Frikke-Schmidt H, Wess J, Blaha CD, Woldbye DP, Fink-Jensen A, Wortwein G. Increased amphetamine-induced locomotor activity, sensitization, and accumbal dopamine release in M5 muscarinic receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010; 207: 547-58. doi: 10.1007/s00213-009-1685-2.

Schmidt MJ, Mirnics K. Neurodevelopment, GABA system dysfunction, and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2015; 40: 190-206. doi: 10.1038/npp.2014.95.

Selemon LD, Zecevic N. Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Transl Psychiatry*. 2015; 5: e623. doi: 10.1038/tp.2015.115.

Sieghart W. Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol*. 2015; 72: 53-96. doi: 10.1016/bs.apha.2014.10.002

Simpson J, Ryan C, Curley A, Mulcaire J, Kelly JP. Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 37: 227-36. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.02.004.

Sørensen HJ, Mortensen EL, Reinisch JM, Mednick SA. Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2009; 35: 631-7. doi: 10.1093/schbul/sbn121.

Stamenić TT, Poe MM, Rehman S, Santrač A, Divović B, Scholze P, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Ester to amide substitution improves selectivity, efficacy and kinetic

behavior of a benzodiazepine positive modulator of GABA(A) receptors containing the $\alpha 5$ subunit. *Eur J Pharmacol.* 2016; 791: 433-443. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.09.016.

Suvisaari J, Haukka J, Tanskanen A, Hovi T, Lönnqvist J. Association between prenatal exposure to poliovirus infection and adult schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1999; 156: 1100-2. doi: 10.1176/ajp.156.7.1100

Taylor PV, Veenema AH, Paul MJ, Bredewold R, Isaacs S, de Vries GJ. Sexually/dimorphic effects of a prenatal immune challenge on social play and vasopressin expression in juvenile rats. *Biol Sex Differ.* 2012; 3: 15. doi: 10.1186/2042-6410-3-15.

Terry AV. Spatial navigation (water maze) tasks, in: J.J. Buccafusco (Ed.), *Behavioral Methods in Neuroscience*, CRC Press, Boca Raton. 2000; 153–166.

Tonsfeldt KJ, Suchland KL, Beeson KA, Lowe JD, Li MH, Ingram SL. Sex Differences in GABAA Signaling in the Periaqueductal Gray Induced by Persistent Inflammation. *J Neurosci.* 2016; 36: 1669-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1928-15.2016

Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science.* 2006; 314: 1788-92. doi: 10.1126/science.1133212

Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res.* 2001; 47: 27-36. doi: 10.1016/S0920-9964(00)00032-3

Volk DW, Austin MC, Pierri JN, Sampson AR, Lewis DA. Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2000; 57: 237-45. doi: 10.1001/archpsyc.57.3.237

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006; 1: 848-58. doi: 10.1038/nprot.2006.116

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols.* 2007;2(2):322-328. doi:10.1038/nprot.2007.44.

Wilkerson DS, Volpe AG, Dean RS, Titus JB. Perinatal complications as predictors of infantile autism. *Int J Neurosci.* 2002; 112: 1085-98. doi: 10.1080/002074502900260.76.

Wilson CA, Koenig JI. Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014; 24: 759-73. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.11.008.

Wischhof L, Irrsack E, Dietz F, Koch M. Maternal lipopolysaccharide treatment differentially affects 5-HT(2A) and mGlu2/3 receptor function in the adult male and female rat offspring. *Neuropharmacology*. 2015b; 97: 275-88. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.029.

Wischhof L, Irrsack E, Osorio C, Koch M. Prenatal LPS-exposure—a neurodevelopmental rat model of schizophrenia—differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015a; 57: 17-30. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.10.004

Wu YW. Systematic review of chorioamnionitis and cerebral palsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002; 8: 25-9. doi: 10.1002/mrdd.10003

Xiao J, Buka SL, Cannon TD, Suzuki Y, Viscidi RP, Torrey EF, Yolken RH. Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes Infect*. 2009; 11: 1011-8. doi: 10.1016/j.micinf.2009.07.007.

Yin P, Liu J, Li Z, Wang YY, Qiao NN, Huang SY, Li BM, Sun RP. Prenatal immune challenge in rats increases susceptibility to seizure-induced brain injury in adulthood. *Brain Res*. 2013 Jun 26;1519:78-86. doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.047.

Yu ZY, Wang W, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C. Changes in neocortical and hippocampal GABAA receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain Res*. 2006; 1099: 73-81. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.118

Zaretsky MV, Alexander JM, Byrd W, Bawdon RE. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol*. 2004; 103: 546-50. doi: 10.1097/01.AOG.0000114980.40445.83

Biografija

Bojan Batinić je rođen 29.11.1981. u Beogradu. Pohađao je Treću beogradsku gimnaziju i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu - smer diplomirani farmaceut, na kome je diplomirao 2009. Diplomski rad pod nazivom „*GABA_A receptori: struktura i funkcija*“ odbranio je na Katedri za farmakologiju. Pripravnički staž je odradio u AU Farmanea (2009), a nakon toga je radio kao stručni saradnik u Roche d.o.o. (2010) i MSD d.o.o. (2011).

Doktorske studije iz farmakologije upisao je 2009. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a od 2011. godine radi kao istraživač na projektu „*Bihejvioralni efekti ponavljane primene nosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazpinskog mesta vezivanja GABA_A receptora: poređenje sa standardnim psihofarmakološkim lekovima*“ iz Osnovnih istraživanja – oblast Medicina (projekat br. 175076, rukovodilac prof. dr Miroslav Savić) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

U školskoj 2011/12 učestvovao je u izvođenju praktične nastave iz predmeta Osnovi farmaceutske biotehnologije. Od 2012. radi kao saradnik u nastavi, a od 2013. kao asistent na Katedri za fiziologiju. 2016. godine prijavio je temu doktorske disertacije pod nazivom „*Uticaj modulacije GABA_A receptora koji sadrže alfa 5 podjedinicu na promene ponašanja pacova prenatalno izloženih dejstvu lipopolisaharida*“.

Do sada je objavio 8 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja: 3 u časopisima kategorije M21, 4 rada kategorije M22 i 1 rad kategorije M23. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu učestvovao je sa više saopštenja štampanih u izvodu i . Dobitnik je nagrada *ECNP seminar award 2016* i *ECNP travel award 2016*.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Bojan Batinić

Broj indeksa: 1/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Uticaj modulacije GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu na promene ponašanja pacova prenatalno izloženih dejstvu lipopolisaharida“.

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 7. juli 2017.

Potpis autora



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Bojan Batinić

Broj indeksa: 1/09

Studijski program: Doktorske studije (Izborni modul: Farmakologija)

Naslov rada: „Uticaj modulacije GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu na promene ponašanja pacova prenatalno izloženih dejstvu lipopolisaharida“.

Mentor: Prof. dr Miroslav Savić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 7. juli 2017.

Potpis autora



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Uticaj modulacije GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu na promene ponašanja pacova prenatalno izloženih dejstvu lipopolisaharida“.

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, 7. juli 2017.

Potpis autora

