УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Милан З. Аксић

МОРФОЛОШКЕ И БИОХЕМИЈСКЕ ПРОМЕНЕ У АЛОКОРТЕКСУ И НЕОКОРТЕКСУ МОЗГА ПАЦОВА УСЛОВЉЕНЕ МАТЕРНАЛНОМ ДЕПРИВАЦИЈОМ

докторска дисертација

Београд, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
FALCUTY OF MEDICINE

Milan Z. Aksić

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN THE ALLOCORTEX AND NEOCORTEX OF THE RAT BRAIN CONDITIONED BY MATERNAL DEPRIVATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Докторска дисертација је урађена у Институту за анатомију „Нико Миљанић“ и Институту за медицинску и клиничку биохемију Медицинског факултета, Универзитета у Београду.

Дисертација је реализована у оквиру пројеката Министарства просвете, науке и технолошког развоја републике Србије, чији су бројеви ИИИ41020 и 175058. Пројекти су под руководством проф. др Бранислава Филиповића и проф. др Наташе Петронијевић.

Ментор: Др Бранислав Филиповић, редовни професор

Универзитет у Београду – Медицински факултет

Коментор: Др Наташа Петронијевић, ванредни професор

Универзитет у Београду – Медицински факултет

Чланови комисије:

Др Видосава Радоњић, редовни професор

Универзитет у Београду – Медицински Факултет

Др Александра Исаковић, ванредни професор

Универзитет у Београду – Медицински Факултет

Др Маја Вуловић, ванредни професор

Универзитет у Крагујевцу - Факултету медицинских наука

Датум одбране:

Захваљујем се

Проф. др Браниславу Филиповићу, свом ментору, чија ми је научна визија била инспирација у научном раду испуњеном топлином и пријатељском атмосфером.

Проф. др Наташи Петронијевић, свом коментору, која ми је пружила велику подршку и омогућила реализацију овог рада.

Породици Радоњић, а посебно доц. др Невени Радоњић, свом учитељу, за указану безрезервну подршку и несебичност у преношењу знања и разумевању неопходном за израду овог рада.

Члановима Комисије на драгоценим саветима, подршци и стрпљењу.

Проф. др Зајцу, који ми је у сарадњи са Медицинским факултетом, Универзитета у Београду омогућио стручно усавршавање у Центру за молекуларну неуробиологију (ZMNH), *University Medical Center Hamburg – Eppendorf*.

Др Игору Јаковчевском, чије су ми знање, савети и пријатељски однос помогли током стручног усавршавања.

Др Дубравки Алексић и Гордани Јевтић за помоћ и подршку у лабораторијском раду.

Мед. техничарима Славиши Ђукићу и Марку Бошковићу за помоћ и ведрину у лабораторијском раду.

Свим члановима Института за анатомију „Нико Миљанић“ и Института за медицинску и клиничку биохемију.

Својој породици и драгим пријатељима, који су увек веровали у мене и подржали сваку моју одлуку и избор.

Овај рад посвећујем својој породици

Марији, Јовану и Миљани

Морфолошке и биохемијске промене у алокортексу и неокортексу мозга пацова условљене матерналном депривацијом

Увод: Матернална депривација (МД) представља рано одвајање младунаца од мајке и опште прихваћени анимални модел стреса. Рана трауматична искуства током живота изазивају дуготрајне промене у мозгу које су саставни део етиологије психијатријских поремећаја. Фактори као што су хипоксија, инфекција, стрес и потхрањеност код мајке током феталног развоја, се разматрају као допунски фактори ризика у настанку схизофреније током каснијег живота. Циљ овог истраживања је био да се испитају дуготрајне морфолошке и биохемијске промене у мозгу пацова након матерналне депривације.

Материјал и методе: У експериментима су коришћени пацови оба пола соја Wistar. Дан порођаја смо означили као нулти постнатални дан (PN 0). Деветог постнаталног дана (PN 9) легла смо подвргнули 24-часовној матерналној депривацији. Животиње су жртвоване шездесетог постнаталног дана (PN 60) како би се испитале дуготрајне последице МД. Микроскопске морфометријске методе су коришћене за мерење промена у густини, величини и облику неурона у когнитивно значајним деловима алокортекса и неокортекса. Биохемијске методе су коришћене за одређивање експресије појединих протеина у наведеним деловима кортекса.

Резултати: Показано је да стрес проузрокован матерналном депривацијом доводи до укупног смањења волумена хипокампуса, смањења волумена пирамидалног слоја хипокампуса и грануларног слоја *gyrus dentatus*-а, као и смањења површине пирамидалних и грануларних неурона у овим деловима алокортекса. Матернална депривација доводи до смањења кортикалне дебљине и густине неурона у префронталном, ретроспленијалном и моторном делу коре. Такође, дуготрајни утицај МД доводи и до смањења експресије маркера једарних протеина у префронталном кортексу и хипокампусу, као и смањене експресије маркера астроглије у алокортексу. Стрес попут матерналне депривације доводи и до смањене густине парвалбумин, калбиндин, калретинин и рилин позитивних интернеурона у одређеним субјединицама хипокампуса и кортекса. Матернална депривација утиче и на

смањење експресије маркера олигодендроглије и повећање експресије маркера микроглије у алокортексу. Повећана експресија неурегулина 1 у префронталном кортексу и хипокампусу након матерналне депривације показује да стрес у раном добу повећава експресију овог протеина. Матернална депривација изазива смањење експресије неуролигина у префронталном кортексу, али и његово повећање у хипокампусу мозга пацова, док је густина неурона у пролиферацији у хилусу *gyrus dentatus*-а хипокампуса непромењена.

Закључак: На основу добијених резултата може се закључити да утврђене промене које настају у мозгу експерименталних животиња као последица матерналне депривације могу допринети сагледавању патогенетских механизама схизофреније, као и развоју нових потенцијалних терапијских стратегија у лечењу ове болести.

Morphological and biochemical changes in the allocortex and neocortex of the rat brain conditioned by maternal deprivation

Background: Maternal deprivation (MD) represents early separation from the mother and generally accepted animal model of stress. Early traumatic experiences throughout life are causing long-lasting changes in the brain that are an integral part of the etiology of psychiatric disorders. Factors such as hypoxia, infections, stress and malnutrition during fetal development are questioned as possible additional risk factors for development of schizophrenia later in life. The aim of this study was to investigate the long-term morphological and biochemical changes in the brain following maternal deprivation.

Material and Methods: In the experiments Wistar rats of both sexes were used. Day of delivery was denoted as prime postnatal day (PN 0). On the ninth postnatal day (PN 9) animals were exposed to maternal deprivation. Animals were sacrificed sixtieth postnatal day (PN 60) to evaluate long term effects of MD. Microscopic morphometric measurements were used to evaluate changes in density and, size of neurons in allocortex and neocortex. Biochemical methods were used to study expression levels of proteins of interest.

Results: It is shown that the stress caused by maternal deprivation leads to an overall reduction in hippocampal volume, particularly volume reduction of the pyramidal layer of the hippocampus and of the granular layer of the dentate gyrus, as well as the decrease in the surface of the pyramidal and granular neurons in these areas of allocortex. Maternal deprivation leads to reduced cortical thickness and density of neurons in the prefrontal, retrosplenial and motor part of the cortex. Also, long-term impact of MD leads to decreased expression of markers for nuclear protein in the rat prefrontal cortex and the hippocampus, as well as decreased expression of markers for astroglia in allocortex. Stress such as maternal deprivation leads to a lower density parvalbumin, calbindin, kalretinin and reelin positive interneurons in specific subunits of the hippocampus and cortex. Maternal deprivation decreases expression of markers for oligodendroglia and increases expression of markers for microglia. Increased expression of neuregulin 1 in the prefrontal cortex and hippocampus after maternal deprivation shows that stress at an early age increases the expression of this protein. Maternal deprivation causes a decrease of neuroligin in the prefrontal cortex, as well as its increase in the hippocampus of rat brain, while the density of the neurons in the proliferation in the hilus of the dentate gyrus and hippocampus remains unchanged.

Conclusion: Based on these results it can be concluded that observed changes in the brain of experimental animals as a result of maternal deprivation may contribute to the perception of pathogenetic mechanisms of schizophrenia, as well as to the development of new potential therapeutic strategies in the treatment of this disease.

Keywords: Maternal deprivation (MD), schizophrenia, allocortex, neocortex.

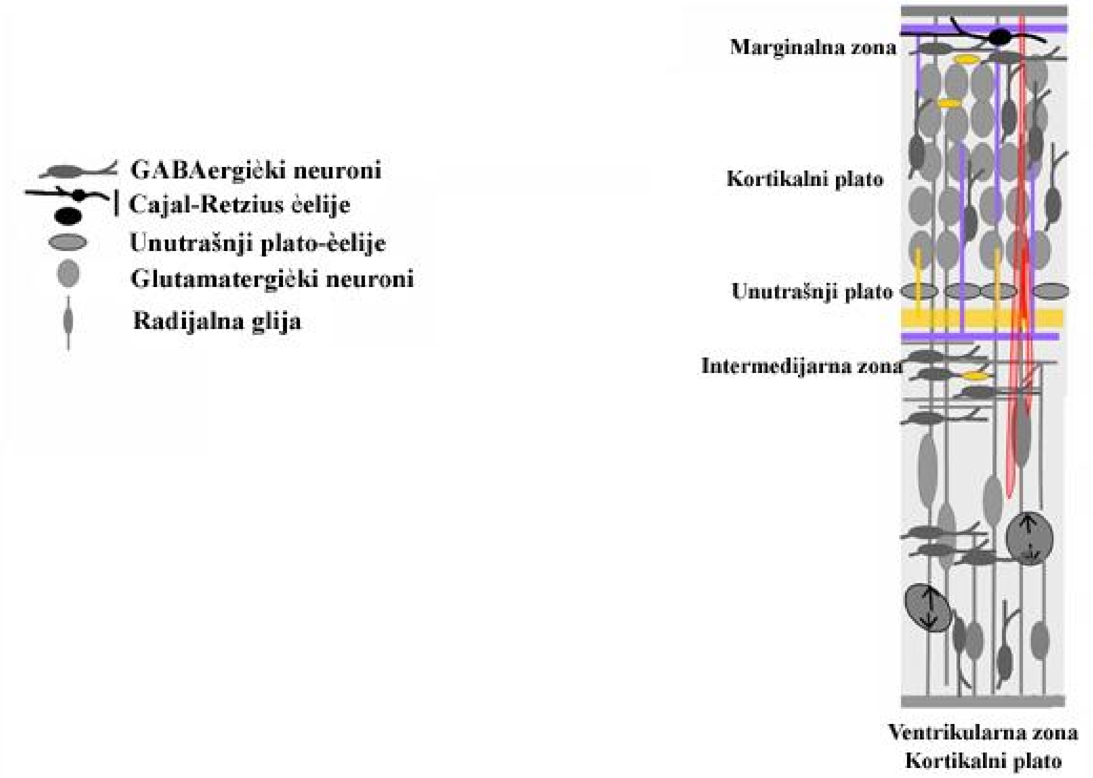
САДРЖАЈ

УВОД

1. ОПШТА ОРГАНИЗАЦИЈА НЕОКОРТЕКСА

1.1 Развој неокортекса

Мождана кора се развија у зидовима теленцефаличне везикуле предњег мозга сисара. Развија се из кортикалне плоче која се налази у примордијалној кортикалној плочи. Пионирски неурони примарне плоче регулишу неуронску миграцију неурона кортикалне плоче и формирање првих аксонских веза. Како се кортикална плоча шири, примарна плоча се дели на површни слој (маргинална зона) и слој који се налази испод кортикалне равни који се граничи са белом масом. На крају се кортикална плоча диференцира у кортикалне слојеве II-VI. Маргинална зона постаје слој I, а доња плоча се трансформише у слој VIb или нестаје. Већина постмитотичких неурона се ствара из неуробласта вентрикуларне зоне испод региона кортикалне плоче. Међутим, један део GABAергичких неурона се ствара у субвентрикуларној зони или ганглионском узвишењу. Вентрикуларне ћелије имају два начина деобе. Симетричном деобом настају две ћерке ћелије које задржавају пролиферативну способност и тако повећавају број неуробласта. Асиметричном деобом настаје једна пролиферативна ћелија и једна постмитотичка ћелија. Постмитотичка ћелија мигрира радијално ка унутрашњем платоу у неокортикалну плочу. Миграција је процес који се дешава од унутра ка споља при чему се прве ћелије заустављају у најдубљим слојевима, а наредне ћелије пролазе кроз претходно насељене слојеве и финално се заустављају у спољашњим слојевима. Оваква миграција кортикалних неурона (радијална миграција) коју потпомажу пролазно организоване ћелије радијалне глије контролисана је пионирским ћелијама платоа (Кахал-Рецијусове ћелије). Радијална миграција има две фазе: прво мигрира цео неурон, а касније долази до транслокације једра унутар радијално издужене ћелије на место у слоју где ће се налазити тело неурона (слика 1).



Слика 1. Схематски приказ пресека кроз мозак пацова током развоја. Неурони мигрирају потпомогнути радијалном глијом кроз интермедијарну зону како би поделиле примарни плато на спољашњу маргиналну зону и унутрашњи плато (Nadarajah i Parnavelas, 2002).

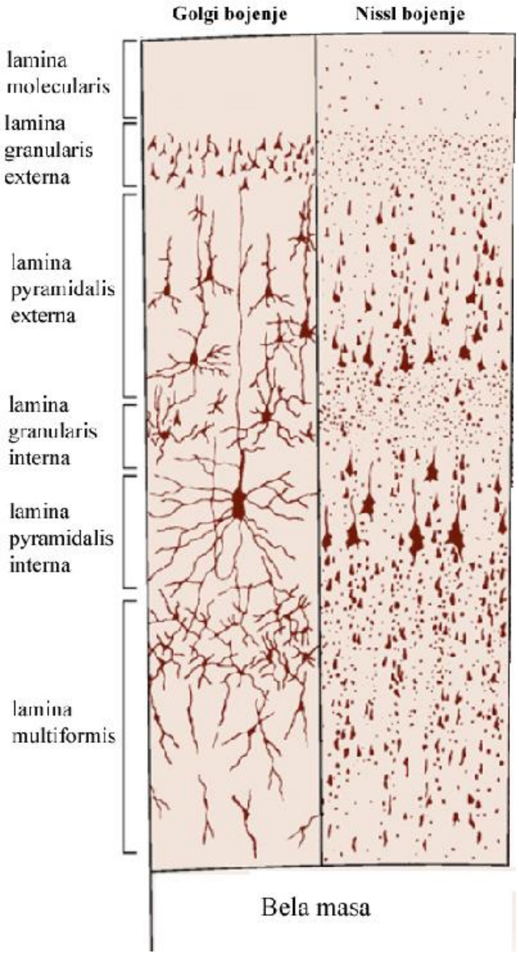
1.2 Анатомија неокортекса

Мождана кора (*cortex cerebri*) се налази на површини хемисфера великог мозга. Она у виду плашта (*pallium*) облаже хемисфере великог мозга. Овакав површински положај сиве масе омогућава њено даље увећавање током филогенетског развоја, односно њену неограничену еволуциону експанзију. Њена бурна еволуција и огромно увећање њене површине довели су до екстензивног набирања површине мозга и до појаве великог броја вијуга (*gyri*) и жлебова (*sulci*). Велики жлебови и вијуге који се јављају рано у феталном развоју имају приближно исти изглед и правац код свих особа и користе се у неуроанатомији за оријентацију. Мождана кора је дебела 2 – 2,8 mm, а њена тежина износи око половине целокупне тежине мозга. Сваки кубни милиметар кортекса садржи приближно 50 000 неурона. Грађа мождане коре током филогенезе постаје све сложенија и са све више различитих варијетета. Новији типови коре се појављују код све савршенијих врста сисара и заузимају већу површину. Сматра се да највећи део мождане коре човека има исту основну шестослојну грађу (***isocortex***). Ова шестослојна кора је новијег порекла па се још назива и нова кора (***neocortex***). Већина области неокортекса је директно изведена из основног типа шестослојне коре и свих шест слојева су јасно видљиви (Brodmann K., 1925). Ове области се означавају као хомотипична кора (*isocortex homogeneticus*). Међутим, у појединим областима коре поједини слојеви се јасно не разликују, јер су стопљени или недостају. Такав неокортекс назива се хетеротипична кора (*isocortex heterogeneticus*).

У неокортексу према већини аутора (Creutzfeldt, 1983; Szentagothai, 1975) постоје два основна типа неурона: пирамидални и непирамидални. Пирамидални неурони (Голџијев тип I) чине око 2/3 кортикалних неурона. Њихов дуги апикални дендрит који досеже до првог слоја коре и више базалних дендрита покривени су великим бројем бодљи (*spina*). Непирамидалне ћелије (Голџијев тип II) су интернеурони мождане коре, трансмитер им је GABA и обухватају претежно звездасте (грануларне) и фузиформне неуроне. Према томе који тип неурона, односно слоја недостаје, хетеротипична кора се грубо може поделити на **агрануларну кору** (моторна кора у којој недостају грануларни слојеви) и **грануларну кору** (сомато-сензорни кортекс у којем преовлађују грануларни слојеви на рачун пирамидалних неурона).

Идући од површине у дубину разликују се следећи слојеви (*lamine*) неокортекса (слика 2):

1. *lamina molecularis*, садржи веома мало специфичних неурона (Кахал Рецијусове ћелије), као и многобројна уздужна нервна влакна
2. *lamina granularis externa*, садржи мноштво малих звездастих и малих пирамидалних неурона
3. *lamina pyramidalis externa*, обухвата пирамидалне неуроне средње величине чији аксони углавном дају асоцијациона и комисурална влакна
4. *lamina granularis interna*, садржи звездасте неуроне и у овом слоју се завршавају специфична аферентна влакна. Овај слој се може поделити на 2-3 подслоја.
5. *lamina pyramidalis interna*, садржи велике пирамидалне неуроне чији су аксони нејчешће пројекциона влакна. У овом слоју се налазе и бројни интернеурони.
6. *lamina multiformis*, носи такав назив због бројних неурона различитог облика (вретенасти, пирамидални, звездасти) од којих често полазе кортикоталамичка влакна.



Слика 2. Схематски приказ слојева (*lamina*) неокортекса човека са распоредом по типу и величини ћелија. Лева слика показује изглед ћелија импрегнираних према Golgi-јевој методи, а десна слика одговара изгледу ћелија обојених по Nissl-у (Brodmann K., 1925).

Слојеви V и VI често се називају инфрагрануларни, а II и III супрагрануларни слојеви. Слојеви који показују највеће промене су II и IV, док III и V слој имају средњи варијабилитет (Brodmann K., 1925).

Мождана кора је са осталим деловима нервног система повезана аферентним и еферентним влакнима. Једно кортикално подручје може бити повезано и са другим кортикалним подручјима асоцијационим или комисуралним везама. Аферентна влакна из нижих делова нервног система која се завршавају у можданој кори у највећем броју потичу из можданог стабла, таламуса, хипоталамуса, клауструма и базалног теленцефалона. Према врсти трансмитера ова влакна могу бити различита (холинергичка, норадренергичка, допаминергичка, серотонергичка). Сва ова влакна се завршавају углавном дифузно у различитим деловима коре. Еферентна влакна мождане коре су најчешће аксони њених пирамидалних нервних ћелија. Ови аксони пре изласка из мождане коре дају повратне колатерале које учествују у формирању изузетно компликованих интракортикалних веза. Из мождане коре одлази пет пута више влакана него што у њу улази.

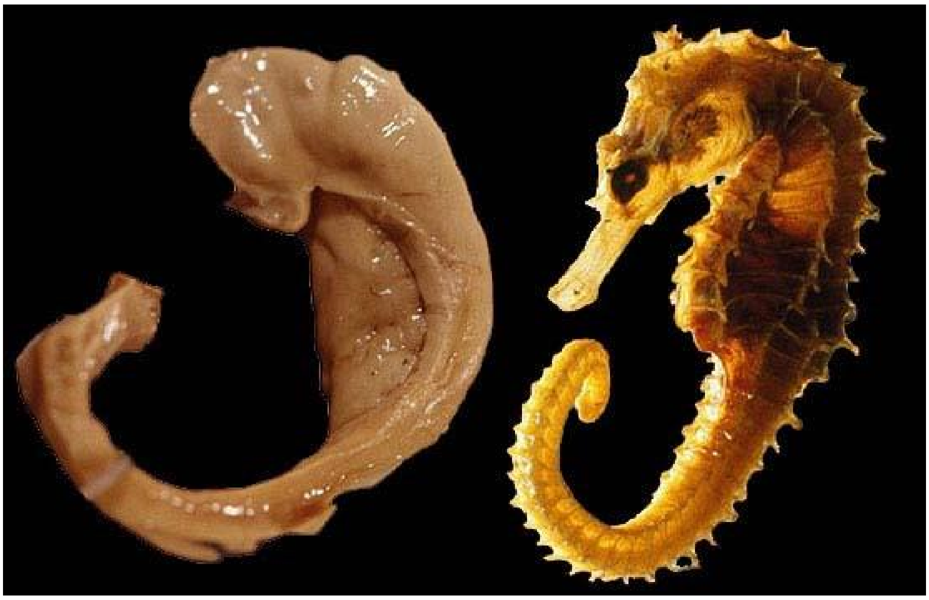
Главни биолошки супстрат за менталне способности код сисара су неуронски кругови мождане коре. Огромно еволутивно повећање броја неурона и веза у кори (De Felipe, 2011; Charvet i Finlay, 2012) дозвољава људима да усвоје језик и математичке вештине, као и велики капацитет когнитивне флексибилности и радне меморије (Rakić, 2009). Такав комплекс функционисања је уско везан за ширење мултимодалног - високог реда асоцијативних подручја, посебно грануларних подручја фронталног режња (Teffer i sar., 2013). Подаци код различитих психичких поремећаја показали су да селективно мењање великих пирамидалних ћелија у III слоју је у корелацији са већим падом когнитивних функција (Selemon i sar., 2013). Неокортекс, као што је речено, је најмлађи део кортекса и представља велико достигнуће еволуције и биолошки супстрат људске менталне снаге (Rakić, 2009).

2. ОПШТА ОРГАНИЗАЦИЈА АЛОКОРТЕКСА

Преостали део мождане коре има једноставнију грађу од изокортекса па се назива ***allocortex*** – другачија кора. Неке области алокортекса имају три слоја и код нижих животиња заузимају веће области хемисфере него код човека. Таква трослојна кора носи назив стара кора (***archicortex***) и обухвата *hippocampus*, *gyrus dentatus* и *induseum griseum*. Још примитивније грађе је онај део алокортекса који углавном обухвата филогенетски најстарије делове коре (примарна мирисна кора) на бази хемисфера и назива се *palaeocortex*. ***Mesocortex*** је назив за прелазну зону коре између типичних неокортикалних и алокортикалних области медијалне стране хемисфере. У мезокортекс спада шестослојна кора *gyrus-a cinguli* који припада лимбичком систему.

2.1 Анатомија хипокампуса

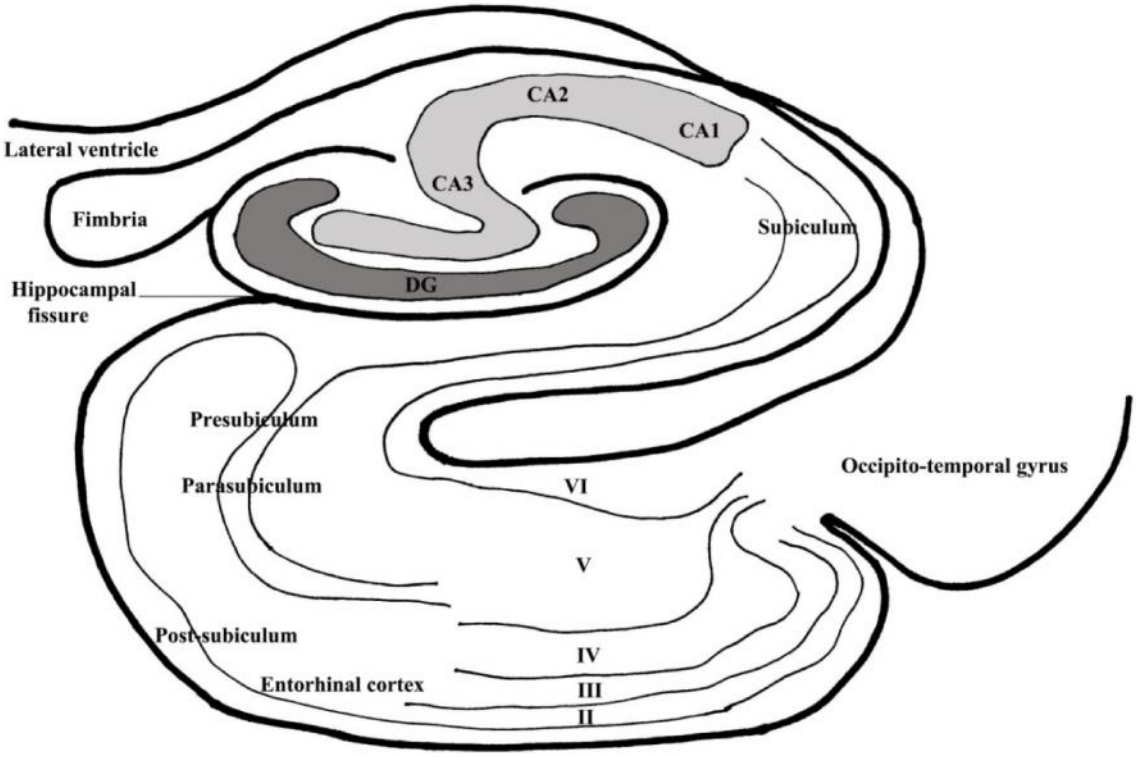
Први опис хипокампуса дао је Arantius када је структуру избочену у доњем делу слепоочног рога бочне мождане коморе упоредио са морским коњићем (*hippocampus*) (слика 3), двоумећи се између овог назива и назива свилена буба (*silkworm*).



Слика 3. Поређење хипокампуса са морским коњићем (Seress L, 1980)

У данашње време хипокампусом називамо обострану структуру унутрашњег дела слепоочног режња сисара, која изгледа као брежуљак који се избочује у доњи рог бочне коморе, док се Амонов рог користи само за хипокампус у ужем смислу речи (*hippocampus proper*). С обзиром на спољашњу морфологију хипокампус је подељен на три дела: главу (*caput*), тело (*corpus*) и реп (*cauda*) хипокампуса. Главна подручја хипокампуса која садрже нервне ћелије су Амонов рог и *gyrus dentatus*, који су у таквом међусобном односу као два латинична слова „U“ која једним својим краком улазе једно у друго. Обележје грађе хипокампуса су редови густо збијених неурона, који се добро виде на хистолошким пресецима који су бојени *Nissl*-овим бојењем. Ова зона која садржи густо постављене неуроне дефинише се као *hippocampus proper* (хипокампус у ужем смислу) или Амонов рог. Хипокампус обухвата *hippocampus proper* и *gyrus dentatus*. Међутим, назив хипокампална формација се често користи и обухвата *hippocampus proper*, *gyrus dentatus* и *subiculum* (слика 4). Амонов рог и *gyrus dentatus* спадају у *allocortex*. Субикуларни комплекс односно кортикална подручја смештена између хипокампуса и мождане коре слепоочног режња спадају у *mesocortex* , а настављају се у шестослојни *neocortex*.

Мезокортикална подручја заузимају готово читав *gyrus parahippocampalis*. Хипокампална формација, *gyrus parahippocampalis* и *gyrus cinguli* заједно чине лимбички режањ. Унутрашњи прстен лимбичког режња чине алокортикални делови хипокампалне формације, док мезокортикални делови *gyrus parahippocampalis*-а и *gyrus-a cinguli* образују спољашњи прстен.

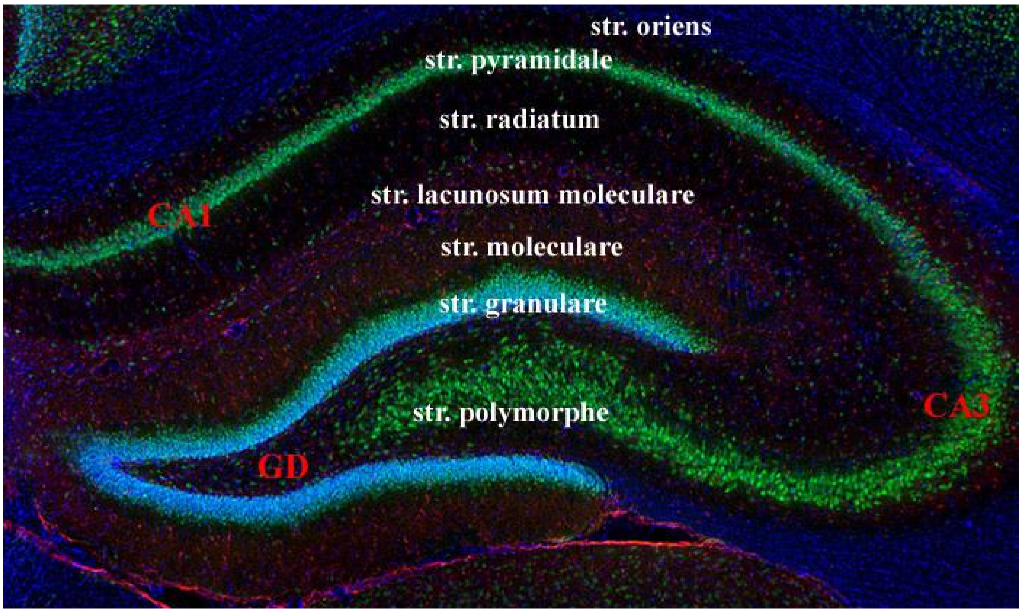


Слика 4. Схематски приказ хипокампалне формације која обухвата *hippocampus proper*, *gyrus dentatus* и *subiculum*, као и њен однос са околним структурама (Radonjić i sar., 2014).

Макроскопски хипокампус има изглед издужене банане чија је уздужна осовина облика слова „С“, а пружа се рострално од једра *area septalis* преко и изнад диенцефалона до темпоралног режња каудално и вентрално. Због тога се уздужна осовина хипокампуса назива септотемпорална осовина, док се ортогонална осовина назива трансверзална оса. Бројни су били покушаји класификације слојева хипокампуса и *gyrus dentatus*-а. Најједноставнија подела дели хипокампус пацова на горње (*regio superior*) и доње подручје (*regio inferior*) (Cajal, 1911). Међутим, Lorente de No 1934. је поделио хипокампус на три поља, CA1, CA2 и CA3. По његовој класификацији која се данас најчешће користи, горње подручје (*regio superior*) одговара CA1 пољу, а доње подручје (*regio inferior*) одговара пољу CA3. Пирамидалне ћелије CA1 региона имају на пресеку троугласти облик и релативно су мале и разбацане. Између CA1 и CA3 подручја налази се прелазни CA2 регион који се састоји од великих, овалних и густо смештених тела неурона. Поље CA3 се налази на месту где Амонов рог прави колено. Величина пирамидалних неурона је слична као у CA2 пољу, али је густина ћелија нешто мањег интензитета. Иза CA3 поља налази се подручје овалног облика које се на фронталном пресеку наставља у конкавни део латиничног слова „U“ *gyrus dentatus*-а. Ово подручје припада CA4 пољу које садржи велики број раштрканих пирамидалних неурона, који се налазе између немијелизованих маховинастих и великих мијелизованих влакана и познато је под називом *hilus gyrus dentatus*-а.

Gyrus dentatus обухвата три слоја (слика 5):

1. *stratum granulare*, принципални слој који садржи грануларне ћелије,
2. *stratum moleculare*, ацелуларни слој који се налази изнад грануларних ћелија и
3. *stratum polymorphe*, дифузни целуларни полиморфни слој, који се налази испод грануларног слоја ћелија (*hilus*)



Слика 5. Слојеви хипокампуса и *gyrus dentatus*-а мозга пацова (Melvin N, 2007)

Принципални неурони у гирусу дентатусу су грануларне ћелије, а у хипокампусу су то пирамидалне ћелије. Грануларне ћелије имају мала сферична тела која су распоређена у дебљини од четири до шест слојева и код пацова је овај слој облика латиничног слова „U“. Дендрити грануларних ћелија се пружају перпендикуларно у односу на молекуларни слој који се налази изнад, где примају синаптичке везе из више извора. Пошто дендрити крећу само са апикалног дела ћелијских тела, ове ћелије се убрајају у монополарне неуроне. Аксони грануларних ћелија се називају маховинаста влакна (*mossy fibers*) због карактеристичног изгледа њихових синаптичких терминала. Обично почињу са базалног дела ћелијског тела, супротно од дендрита, и пружају се према хилусу (*stratum polymorphe*). Маховинаста влакна напуштају хилус и улазе у *stratum lucidum* CA3 региона. У полиморфном слоју се налазе различите ћелије које се пројектују само у друге делове *gyrus dentatus*-a.

Hippocampus proper обухвата више слојева (слика 5) и то:

1a) *stratum moleculare*, садржи ретке интернеуроне као и завршна гранања дендрита који крећу са апикалног дела пирамидалних ћелија, која су у контакту са *Schaffer*-овим колатералама и перфорантним влакнима

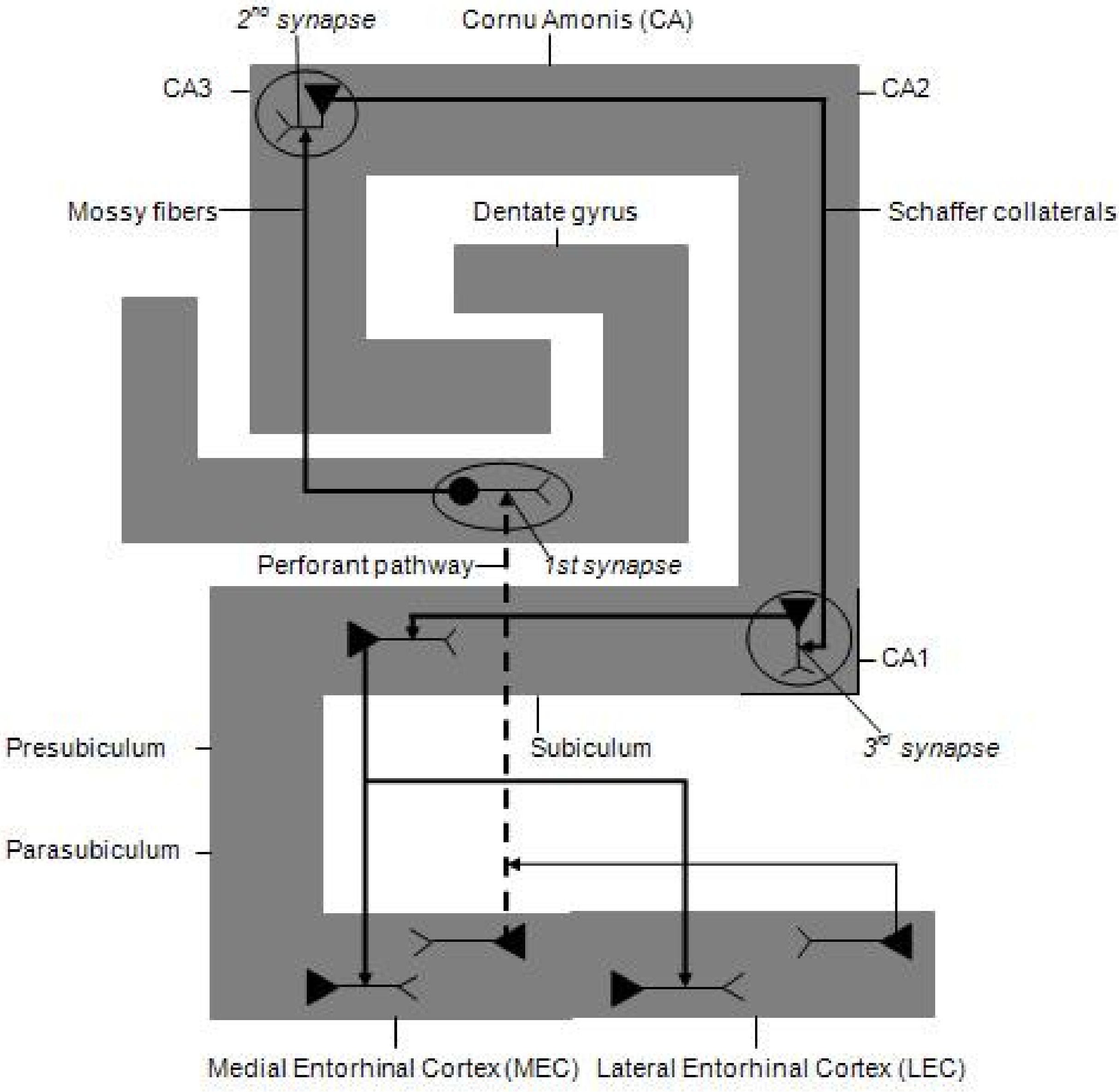
1b) *stratum lacunosum moleculare*, садржи аксоне који већином припадају перфорантним влакнима и *Schaffer*-овим колатералама и паралелни су са површином Амоновог рога

1c) *stratum radiatum moleculare*, састоји се из дендрита пирамидалних ћелија који чине синаптичке везе са *Schaffer*-овим колатералама

2) *stratum pyramidale*, чине пирамидални неурони које карактеришу сложена дендритска стабла која се пружају нормално у односу на ћелијски слој у оба правца те се због тога убрајају у мултиполарне неуроне али се уобичајено називају пирамидалне ћелије. Важна карактеристика аксона неурона CA3 региона је да у свом почетном делу формирају *Schaffer*-ове колатерале. Ове колатерале одмах заокрећу уназад у *stratum radiatum,* где образују синаптичке везе са другим пирамидалним неуронима CA1, CA3 региона и субикулума

3) *stratum oriens*, састоји се од малобројних кошарастих (*basket*) неурона и аксона пирамидалних неурона

Аферентна влакна долазе у хипокампус највећим делом индиректно из енториналног подручја (Lopes da Silva, 1984). Топографски је енторинално-хипокампална пројекција организована тако да латеромедијална осовина енториналне коре одговара спленотемпоралној осовини хипокампуса. То значи да латерални делови енториналне коре шаљу влакна у делове хипокампуса који су ближи сленијуму, док медијални делови шаљу влакна у све темпоралнија подручија хипокампуса (Amaral, 1993). Због ових веза се сматра да енторинални кортекс шаље хипокампалној формацији сажетак свега онога што се догађа у можданој кори. Енторинална кора највећим делом остварује контакт са хипокампусом преко перфорантног пута, а малим делом преко алвеарног пута. Перфорантни пут почиње од звездастих неурона другог слоја латералног дела енториналне коре и назива се још и темпороамонички или трисинаптички круг хипокампуса. Перфорантна влакна образују синапсе са дендритима грануларних неурона *gyrus dentatus-a* (прва синапса трисинаптичког круга), а у мањој мери и са дендритима неурона CA1 и CA3 региона. Еферентна маховинаста влакна грануларних неурона су аксони који се завршавају на апикалним дендритима неурона CA3 региона (друга синапса трисинаптичког круга). Од неурона CA3 региона аксони одлазе из хипокампуса у латерално септално подручје преко фимбрије и форникса. Бочне гране од ових аксона образују *Schaffer*-ов колатерални систем који одлази до дендрита неурона у CA3 и CA1 региону (трећа синапса трисинаптичког круга) (слика 6). Све три синапсе трисинаптичког круга су глутаматергичке (ексцитаторне). Сва еферентна влакна се могу поделити на: еферентна влакна Амоновог рога, субикуларна влакна за прекомисурални форникс, субикуларна влакна за посткомисурални форникс и еферентна влакна хипокампуса која не припадају форниксу. У неуронским круговима хипокампуса појављују се готово сви познати неуротрансмитери и модулатори који на свој начин утичу на функцију хипокампуса. Новија истраживања функционалном магнетном резонанцом (fMRI) показују да код психијатријских обољења постоји мањи број веза између хипокампуса, чеоног режња, таламуса и путамена (Knöchel i sar., 2014). Структурне промене у хипокампусу су најчешћи налаз код психијатријских болести међу којима је и схизофренија (Tamminga i sar., 2010).



Слика 6. Схематски приказ трисинаптичког пута (Radonjić i sar., 2014)

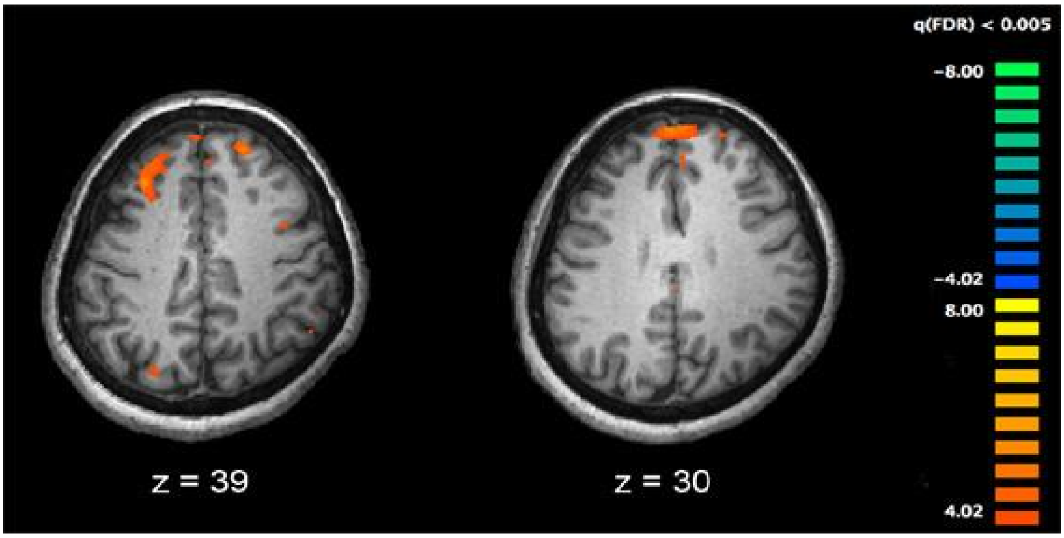
3. ЕТИОЛОГИЈА СХИЗОФРЕНИЈЕ

Постоје бројне хипотезе о етиологији схизофреније. Међу најзаступљенијим факторима који имају учешћа у етиологији схизофреније су генска експресија, неуроимунолошки поремећаји, пренатални и перинатални стрес. Комбинација генетике и фактора окружења утиче на развој схизофреније. Људи који су у породици имали схизофренију, а који пате од пролазне или ограничавајуће психозе имају 20 – 40% шанси да им се после годину дана дијагностикује схизофренија (Drake и Lewis, 2005). Процене наслеђа варирају због тешкоће у раздвајању генетских фактора од фактора окружења (OʼDonovan 2003). Највећи ризик од развоја схизофреније имају особе чији је најближи крвни сродник оболео од те болести. Данас се сматра да значајну улогу у настанку схизофреније могу имати следећи гени: неурегулин (Nrg1), дисбиндин (DTNBP1), регулатор G протеин-сигнала-4 (RGS4), оксидаза D-амино киселине (DAAO), катехол-о-метил трансфераза (COMT) (Crow 2008). Фактори окружења везани за развој схизофреније обухватају животну средину, коришћење дроге и пренаталне стресоре. Утврђено је са доследношћу да живот у урбаној средини током детињства или у зрелом добу повећава ризик од схизофреније (Jim van Os, 2004). Други фактори који играју важну улогу су социјална изолација и миграција везана за социјалне недаће, расну дискриминацију, нефункционалност породице, незапосленост и лоше услове становања (Selten i sar., 2007).

Бројни наркотици се повезују са развојем схизофреније, укључујући канабис, кокаин и амфетамине. Око 50% оних који су оболели од схизофреније у великој мери користе дроге и/или алкохол (Gregg i sar., 2007). Улога канабиса би могла да буде узрок , али друге дроге се користе само као механизам за борбу против депресије, анксиозности, досаде и усамљености (Leweke i Koethe, 2008). Мада се генерално не сматра узрочником болести, људи са схизофренијом користе никотин у много већој мери од остатка становништва (Sagud i sar., 2009).

Фактори као што су хипоксија, инфекција, стрес и потхрањеност код мајке током феталног развоја, могу да доведу до незнатног повећања ризика од схизофреније током каснијег живота. Постоји већа вероватноћа да су људи са дијагнозом схизофреније рођени у зиму или пролеће, што може бити последица повећаног степена изложености вирусима *in utero* (Yolken, 2004).

Начињен је низ покушаја да се да објашњење између мождане функције и схизофреније. Схизофренија је повезана са значајним разликама у структурама мозга, као и у хемијским супстанцама мозга током акутних психотичних стања. Студије које су користиле неуропсихолошке тестове и технике снимања мозга, као што су функционална магнетна резонанца (fMRI) и позитронска емисиона томографија (PET) (слика 7) за испитивање функционалних разлика у можданој активности, показале су да се разлике најчешће јављају у чеоном режњу, хипокампусу и слепоочном режњу (Kircher i Renate, 2006). Смањење запремине мозга, мање од оног које је пронађено код Алцхајмерове болести, примећено је у областима чеоног кортекса и у слепоочном режњу. Није баш најјасније да ли су ове запреминске промене прогресивне или су већ постојале пре почетка ове болести (Coyle, 2006). Ове разлике се повезују са неурокогнитивним дефицитима који су често у вези са схизофренијом (Green, 2006). Због промена у нервним импулсима, предложено је да о схизофренији треба размишљати као о скупу неуроразвојних поремећаја (Insel, 2010).



Слика 7. Функционална магнетна резонанца (fMRI) при чему су области које су биле активније код здраве контролне групе него код пацијената са схизофренијом приказане црвеном бојом, током једног испитивања радне меморије (Kim i sar., 2010).

Такође, схизофренија је обољење које се карактерише комплексном променом више неуротрансмитерских система. Један од неуротрансмитера је допамин који је у порасту код схизофрених пацијената. Међутим, потврђена је улога и других неуротрансмитера (серотонина, глутамата, ацетилхолина, норадреналина) у настанку схизофреније. Сматра се да саме промене у неуротрансмитерским системима представљају само фазу обољења, а да се основе самог обољења јављају још у раним периодима развоја централног нервног система које се манифестују у каснијим фазама развоја, када долази до преструктурисања система и елиминације неких синаптичких веза. Такође, се сматра да је главни разлог погрешне процене информација код схизофреније биохемијски и структурни поремећај мозга (Paunović i Babinski, 1995). Велико интересовање је усмерено и на неуротрансмитер глутамат и смањену функцију NMDA глутаматских рецептора код схизофреније, највећим делом због абнормално ниских нивоа глутаматних рецептора пронађених *post mortem* у мозговима особа са дијагнозом схизофреније (Konradi i Heckers, 2003), као и због открића да лекови који блокирају глутамат, као што су фенциклидин и кетамин, могу да опонашају симптоме и когнитивне проблеме повезане са овим стањем (Lahti i sar., 2001). Такође, дуготрајна примена фенциклидина доводи до промена у телесној температури и антиоксидантне одбране код модела схизофреније (Radonjić NV i sar., 2008; Radonjić NV i sar., 2010).

Смањена функција глутамата се повезује са слабијим резултатом на тестовима који захтевају функцију чеоног дела мозга и хипокампуса, а глутамат може да утиче на допаминску функцију, при чему су оба повезана са схизофренијом, што указује на значајну посредничку, а вероватно и узрочну улогу глутаматских путева код овог стања (Coyle i sar., 2003).

4. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ У ПСИХИЈАТРИЈИ

Поремећај когнитивних функција представља значајан феномен у оквиру схизофреније. Отуда и проистичу тешкоће транспортовања супстрата схизофреније, као јединственог хуманог поремећаја у хеуристичке оквире анималног модела. Немогућност анализе језика оболелог као и осталих когнитивних функција значајно лимитира креирање анималног модела схизофреније као менталног поремећаја *pars excellance*. Тешко је одређивати и мерити модалитете понашања код животиња који би одговарали хуманој схизофренији, али је могуће регистровати извесне индиректне корелате:

- **Условљени одговор избегавања (УОИ)** један је од најчешћих фармаколошких модела за изучавање инхибиторних ефеката неуролептичке терапије (Worms i sar., 1983).
- **Тест каталепсије** представља додатну могућност за тестирање ефеката неуролептичке терапије на анималном моделу. Значај теста каталепсије огледа се у студијама неурофармакологије екстрапирамидних функција, као и могућност брзе предикције нежељених моторних ефеката потенцијалних антипсихотичних медикамената (Sanberg i sar., 1988).
- **Тест шапе** одражава ефекте примене медикамената код пацова на спонтану ретракцију њихових екстендираних предњих и задњих удова (Ellenbroek i Cools, 1998). Као фармаколошки модел схизофреније овај тест показује специфичност антипсихотика уз

изостајући ефекат антихолинергика на продужење ретракционог времена код задњих екстремитета (Ellenbroek i sar., 1989).

- **Парадигма ауто – стимулације** је утицај неуролептика на инхибицију оперантно – условљене интракранијалне стимулације посредством притиска експерименталне животиње на полугу (Woorms i sar., 1983) или интравенских доза кокаина (Roberts i Vickers, 1994). Обе наведене парадигме представљају допаминергични фармаколошки модел у чијој је основи механизам церебралне награде, при чему се неуролептички ефекти интерпретирају као типична индукција анхедоничног стања (Ettenberg i sar., 1981).
- **Хомологи модели** имају претензију да укажу на директну повезаност између понашања које показује анимални модел и бихејвиоралног спецификума који се виђа у схизофренији и/или као последица основног процеса за који се сматра да дефинише схизофренију. Ови модели могу бити подељени у три типа. Први тип се односи на могућност анализе знакова и симптома схизофреније. Други тип покушава да код експерименталних животиња репродукује упадљиве симптоме који се виђају у схизофренији, а односе се на поремећај социјалног функционисања. Трећи тип репродукује физиолошке поремећаје који су теоретски повезани са етиологијом схизофреније (Freedman i Waldo, 1991).
- **Латентна инхибиција** представља добро проучени модел селективне пажње. У оквиру овог модела предложено је да неутрална презентација стимулуса успорава асоцијативно условљено учење стимулиса који следе (Lubow, 1973). Феномен латентне инхибиције покушава да репродукује дефицит пажње у схизофренији који се јавља као последица неадекватне и нефлексибилне стратегије обраде и филтрирања стимулуса. Латентна инхибиција садржи паралелу са конструктима схизофреније код којих поремећај пажње није доминантан, као што је дефицит контроле понашања у односу на контекст (Lubow, 1998) и утицај претходног искуства на перцепцију актуелних догађаја (Hemsley, 1997).
- **Блокирајућа парадигма** представља модел истраживања селективне пажње и утицаја контекста и претходног искуства на актуелну перцепцију и учење (Gray i sar., 1992). Задаци који обрађују проблем блокирајуће парадигме укључују претходну експозицију стимулусом, условљавање као и компоненту бихејвиоралног тестирања (Kamin, 1969). Блокирајући задаци су се иницијално користили као модел амфетамин – индукујућих психоза или егзацербирајућих психоза (Crider i sar., 1982).

- **Социјална интеракција** пацова предложена је као анимални модел за процену деловања психофармака на социјално понашање у оквиру схизофреније (Corbet i sar., 1997). Деградација социјалних вештина представља значајну карактеристику схизофреније и повезана је са хроничном фазом и негативном формом овог поремећаја (Kibel i sar., 1993).
- Бихејвиорални ефекти **амфетамином – индуковане активације допаминских рецептора** већ је релативно прихваћен као анимални модел психотичних симптома (Ellinwood i sar., 1972). Анимални бихејвиорални модели који се односе на индукцију хипердопаминергичког стања изведени су из тврдње о учешћу допамина у неурохемијској патологији схизофреније (Davis i sar., 1991). Индиректни подаци о хиперактивности допаминских неурона који инервишу субкортикалне структуре, односе се на бихејвиоралне симптоме пацијената, егзацербацију посредством допаминомиметика, као и на њихов терапеутски одговор на антидопаминергични третман (Crees i sar., 1976). Савременије реформулације допаминске хипотезе постулирају хипоактивност допаминских неурона који инервишу префронтални кортекс као неуралну базу негативних симптома у схизофренији (Davis i sar., 1991). Модел хроничне амфетаминске – интоксикације представља анимални бихејвиорални аналог већине хуманих позитивних и негативних симптома схизофреније. Употреба функционалних можданих „imaging“ техника може да демонстрира паралелу између функционалне неуроанатомије схизофреније (Tamminga i sar., 1999) и хроничне амфетаминске интоксикације, као и да представља значајан прилог у клиничкој валидизацији овог модела.
- **Модели генетске селекције** представљају пројекат мапирања хуманог генома, поред напора да се „дешифрује“ генска карта човека креиране су и мапе мишјег и пацовског генома, које могу бити врло корисне у изналажењу гена који контролишу одређене модалитете понашања. Значајна област у којој се могу примењивати генетске селекције се односи на психофармакологију. Генетски, различити сојеви мишева показују и различите реакције у односу на деловање неуролептика и индукцију каталепсије (Fink i sar., 1982).
- **Фенциклидински модел схизофреније** је углавном праћен на глодарима и приматима (мајмуни). Праћене су промене понашања везане за некогнитивне функције (некогнитивно понашање) и промене понашања везане за когнитивне функције

(когнитивно понашање). Испитивани су локомоторна активност, сензомоторно спровођење, когнитивне функције, мотивација и понашање у друштву (Steinpreis, 1996). Локомоторна активност код глодара може да представља користан показатељ способности неког једињења да изазове или погорша психозу (Moghaddam i sar., 1998). Једнократна доза фенциклидина код пацова доводи до оштећења препулсне инхибиције акустичног надражаја (Geyer i sar., 1984). Као последица дуготрајног третирања животиња фенциклидином долази до промена социјалног понашања, локомоторне сензитизације и измењених когнитивних функција (Jentsch, 1999).

5. МАТЕРНАЛНА ДЕПРИВАЦИЈА КАО АНИМАЛНИ МОДЕЛ

Матернална депривација (МД) представља један од веома распрострањених стрес модела. Овај модел подразумева рано раздвајање младунаца од мајке на 24 часа током прве две недеље постнаталног живота. Термин матернална депривација је фраза утемељена давно у раду психијатара и психоаналитичара. John Bowlby је средином прошлог века међу првима писао о ефектима одвајања одојчади и мале деце од мајке и како ефекат губитка мајке утиче на развој детета. Он је прикупио емпиријске доказе (после Другог светског рата) који су постојали у то време широм Европе и САД из чега је извукао закључак да одојче и мало дете мора имати топао, интиман и континуиран однос са мајком како не би дошло до значајних и неповратних менталних поремећаја за шта је тада постојало контраверзно мишљење. Ова монографија је објављена на 14 различитих језика и продата у више од 400 000 примерака само у енглеској верзији (Bowlby, 1951).

Иако животињски модели не могу да понове људску психопатологију у сваком детаљу, они треба да буду правилно замишљени као експериментални систем у којем се специфична питања могу истражити на начине које је немогуће учинити код људи. У општем разматрању анималних модела, морају се утврдити протоколи за модел који је дизајниран да симулира специфичне симптоме, да тестира одређену етиолошку теорију, да студирају темељна понашања и неуробиолошке механизме и оних чија је главна улога да омогући клиничка истраживања лекова. Пошто се матернална депривација сматра једним од етиолошких чиниоца схизофреније, животињски модели нуде могућност анализе главних ефеката и интеракција на контролисан начин.

Микроскопске морфометријске студије откривају промене у густини, величини и облику неурона у когнитивно значајним деловима алокортекса и неокортекса (Benes i sar., 1991). Хипокампално оштећење представља значајан епилог у покушају успостављања виталних аналогија хумане и „анималне“ схизофреније при чему је запажање да промене у волумену хипокампуса представљају конзистентну компоненту великог броја истраживања неуропатологије схизофреније (Bogerts i sar., 2000). Билатерална лезија хипокампуса код животиња захвата специфичне бихејвиоралне аспекте (пажња, будност, хабитуација), когнитивне функције (учење меморију) и физиолошке реакције (кожна спроводљивост) који су аналогни консталацији клиничких симптома дефицита асоцираног са схизофренијом (Schmajuk, 1997). Специфично хипокампално оштећење доводи до пораста спонтаног истраживачког понашања и амфетамином – индуковане локомоције индукујући повезану неуралну активност допаминских структура које инервишу лимбички (вентрални) стријатум и снижењем активности допаминских неурона у медијалном префронталном кортексу. Парадигма хипокампалног оштећења има велики значај и у оквиру хипотезе о неуроразвојном пореклу схизофреније (Damjanović i sar., 2000). Шта више, за неуроанатомске промене асоциране са схизофренијом (смањење волумена амигдало – хипокампалног комплекса темпоралног режња) сматра се да представљају рану развојну патологију која „мирује“ све до адолесценције или раног одраслог доба (Kendler i sar., 1987). У анималном моделу иботенинском киселином индуковано хипокампално оштећење код пацова и то седмог постнаталног дана, резултује (у односу на контролу) одложеним појачаним локомоторним одговором на нове стимулусе. Забележено је да се бихејвиорални ефекти лезије изазвани седмог постнаталног дана манифестују пост пубертетски 56-ог постнаталног дана, али никако пре 35-ог препубертетског дана. Ови бихејвиорални ефекти се интерпретирају појачаним одговором мезолимбичких допаминских неурона на стресогене growth средински и фармаколошке стимулусе. Хипокампално оштећење поседује аналогију са постпубертетским почетком схизофреније изазване стресом, као и са неурохемијским конструктом лимбичке допаминске дисрегулације (Lipska i sar., 1997). И поред описаних сличности промене које се запажају у волумену хипокампуса (Bogerts i sar., 2000) или цитоархитектоници (Conrad i sar., 1991) код одраслих схизофрених пацијената, одражавају суптилне асиметричне промене у контрасту са значајним губитком неуропила, глиозома и кавитацијама које се запажају код ледираних хипокампуса експерименталних животиња.

У покушају да се разреши мистерија схизофреније, очекује се да ће ови налази омогућити давање одговора на питања „када“ и „где“ се одигравају неуропатолошки процеси у мозгу који се налазе у основи схизофреније и на који начин захватају когнитивне процесе. Отуда је за очекивати да ће будући анимални модели схизофреније бити „конструисани“ посредством комплексне интеракције генски контролисаних неуротрансмитера што ће представљати значајан помак ка разумевању и третману схизофреније.

6. ИНТЕРНЕУРОНИ

Интернеурони (*intrinsic* неурони) се сматрају неуронима који имају локално ограничен аксонски плексус и ослобађају гама амино бутерну киселину (GABA).

У *gyrus dentatus*-у најпроминентнији су пирамидални кошарасти (*basket*) неурони чија се тела налазе на ивици грануларног и полиморфног слоја. Постоји најмање пет различитих типова *basket* ћелија. Аксони ових неурона одлазе до тела грануларних ћелија. Такође, интернеурона има и у молекуларном слоју. Интернеурони полиморфног слоја или остају у оквиру овог слоја или инервишу грануларни или молекуларни слој. Интернеурон из ове групе је аксо-аксонска ћелија која се завршава на иницијалном сегменту аксона грануларних ћелија.

Хипокампални интернеурони са ћелијским телима у/или близу пирамидалног слоја могу да се поделе у три групе на основу њихових синаптичких мета: аксо-аксонске ћелије, кошарасте (*basket*) ћелије и *bistratified* ћелије. Аксо-аксонске ћелије имају синапсе на иницијалном сегменту пирамидалних неурона и стога имају јаку контролу над иницијацијом акционог потенцијала. Кошарасте (*basket*) ћелије имају синапсе на телима пирамидалних неурона. Свака кошараста ћелија може да има мултипле контакте на пирамидалном неурону формирајући изглед налик корпи у којој је тело неурона. *Bistratified* ћелије имају синаптичке контакте на апикалним и базалним дендритима пирамидалних неурона. Иако има веома мало преклапања међу циљним регијама, дендрити сва три ћелијска типа се пројектују у *stratum radiatum* и *stratum oriens* и стога могу да примају ексцитаторне инпуте из *Schaffer*-ових колатерала, комисуро-асоцијативних влакана и утичу на синапсе са пирамидалним неуронима у локалној области интернеурона. Такође, постоје међусобне инхибиторне конекције између ових интернеурона.

Подтипови интернеурона се разликују по неурохемијском саставу и физиолошким карактеристикама. Различити GABA-ергички неурони експримирају различите калцијум везујуће протеине, парвалбумин (PV), калретинин (CR) и калбиндин (CB). Поред тога, ови интернеурони формирају везе са различитим субдоменима пирамидалних неурона. Парвалбумин позитивни интернеурони који обухватају кошарасте (*basket*) и неуроне облика свећњака (*chandelier*) показују веома селективно циљање и подложни су регулацији неуротрофинима. Неуротрофини су импликовани у регулацији преживљавања, диференцијацији и сазревању GABA-ергичких интернеурона. Прекид допаминергичке сигнализације током раног развоја доводи до абноралности GABA-ергичких интернеурона (McCarthy i sar., 2011; Ross i sar. 2014).

Кортикални интернеурони не експримирају неуротрофине, али реагују на њих преко тирозин-киназа (Trk) рецептора. Мождана кора садржи више класа GABA-ергичких интернеурона који се разликују по морфологији, физиологији и ћелијским карактеристикама. На основу њиховог хемијског састава, интернеурони су подељени у популације које су позитивне за парвалбумин (PV), калбиндин (CB), соматостатин (ST), калретинин (CR) и вазоактивни интестинални пептид (VIP) (DeFelipe, 1997). Интернеурони који се разликују по хемијском саставу такође, се разликују и по својим електрофизиолошких особинама. *In vitro* истраживања показују да D2 рецептори мењају диференцијацију парвалбумин позитивних неурона у кортексу као и других GABA-ергичких интернеурона. Ови подаци су од великог значаја јер представљају кључне разлоге за настанак бројних неуропсихијатријских поремећаја (Marin , 2012; Oh i sar., 2012; Khundakar i sar., 2011).

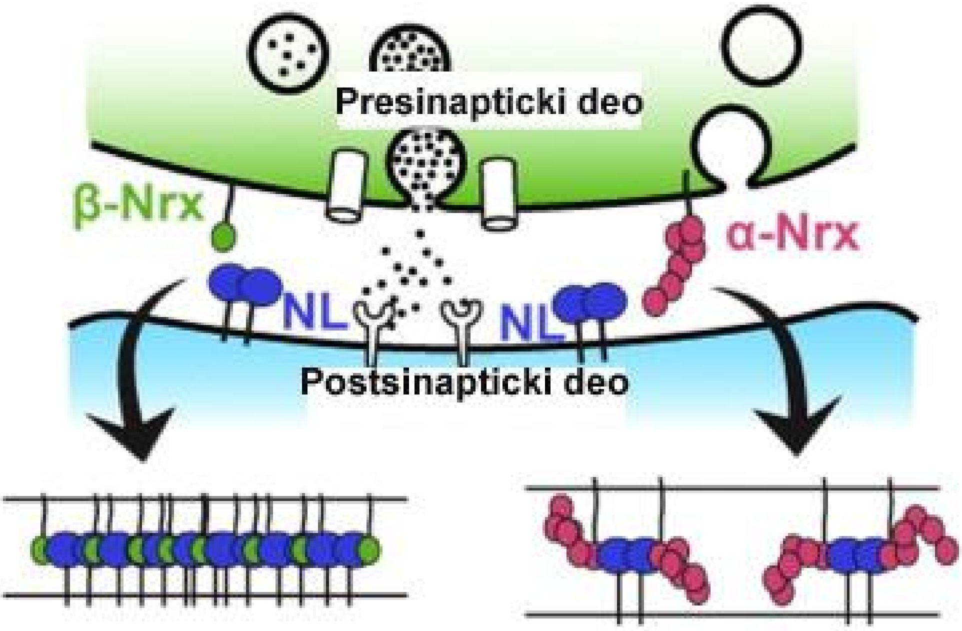
Рилин (*reelin*) је гликопротеин екстрацелуларног матрикса који помаже процесе миграције неурона и њихово позиционирање у мозгу током развоја. Поред ове важне улоге, након развоја мозга, рилин модулише синаптичку пластичност, неуротрансмисију и формирање памћења (Weber i sar. 2002). Такође, везујући се за интегринске рецепторе рилин стимулише дендрите (Niu i sar., 2004) и регулише пластичност дендритских бодљи (Niu i sar., 2008) модулацијом транслације mRNA која је присутна у дендритима. Налази се не само у мозгу и кичменој мождини већ и у крви и другим органима и ткивима. Претпоставља се да рилин учествује у патогенези више неуропсихијатриских обољења

(лисенцефалија, схизофренија, биполарни поремећај, аутизам, темпорална епилепсија, Алцхајмерова болест). Смањена експресија овог протеина је доказана код шизофреније и биполарног поремећаја, али узрок овог смањења остаје неизвестан (Grayson i sar., 2008).
Име рилин настало је од ненормалног тетурастог хода код reeler мишева, (Falconer, 1951) за које је касније утврђено да имају мањак овог протеина у мозгу, а били су хомозиготи за мутацију гена РЕЛН. Примарни фенотип губитком рилина доводи до немогућности правилног позиционирања неурона током развоја централног нервног система. Током развоја мозга, рилин се синтетише у кортексу и хипокампусу из Кахал-Рецијусових ћелија (Meyer i sar., 1999) које се углавном налазе у маргиналној зони теленцефалона, спољашњим грануларним ћелијама малог мозга и у *stratum lacunorum moleculare* хипокампуса. Након секреције у екстрацелуларни матрикс, рилин се везује за интегринске рецепторе и покреће унутар ћелијску фосфорилацију и адапторску функцију *disabled-1* протеина (*Dab 1* протеин). Фосфорилисани *Dab 1* везује и транспортује тирозин-киназе и транскрипционе факторе у функционалне ћелијске одељке. У одраслом периоду, рилин се синтетише и секретује у скоро свим GABAергичким интернеуронима у кортексу и хипокампусу (Meyer i sar., 1998). Рилин регулише развој специфичних веза у хипокампусу и енториналном кортексу (Del Rio i sar., 1997).

7. НЕУРЕКСИНИ И НЕУРОЛИГИНИ

Мозак обрађује информације преношењем сигнала кроз синапсе, формирајући тако мреже неурона. У овим мрежама синапсе не само да преносе већ и обрађују информације и формирају неуронску мрежу за обраду сложених сигнала. Неурексини и неуролигини су синаптички атхезиони молекули који повезују пре и постсинаптичке неуроне посредујући транссинаптичку сигнализацију. Мозак добија и обрађује сензорне информације и генерише моторну снагу за опстанак организма, тако да сви поремећаји мождане функције су заправо директно или индиректно условљени синаптичком функцијом (Südhof, 2008).
Формирање синапси и спецификација синаптичке разноврсности су повезане и зависе од дејства синаптичких ћелијских атхезионих молекула (Dityatev, 2006). Разноврсност синапси делом настаје услед разлика у рецепторима. Формирање синапси се дешава у три корака:

1. иницијално препознавање циљне ћелије
2. формирање синаптичких веза
3. сазревање синаптичких веза карактеристичних за неуронски круг



Слика 8. Међусинаптички однос неурексина и неуролигина у формирању синапсе (Hiroki i sar., 2012)

Неурексини (*Nrx*) и неуролигини (*NL*) су једни од најбоље проучених синаптичких ћелијских атхезионих молекула за које је установљна специфична синаптичка функција. Неурексини и неуролигини су неопходни за функционисање синапси али не и за њихово формирање (Craig, 2007; Dean, 2006).

Неурексин (*Nrx*) је пресинаптички мембрански протеин који садржи трансмембрански домен и учествује у формирању синапси између неурона (Li i sar., 2006). Екстрацелуларни домен интереагује са протеинима у синаптичкој пукотини (неуролигин), док интрацелуларни цитоплазматски део интереагује са протеинима одговорним за егзоцитозу (Chen i sar., 2011). Неурексини имају способност да вежу α-латротоксин (компоненту отрова паука црне удовице) који активира отпуштање неуротрансмитера. Три гена кодирају α, β неурексине и сви се предоминантно налазе у неуронима. Код људи промене у генима који кодирају неурексине и неуролигине доводе до аутизма и других когнитивних поремећаја као што су схизофренија и Tourrete синдром (Südhof, 2008). Постоји транссинаптичка комуникација између неурексина и неуролигина што значи да неуролигин може изазвати активност неурексина и обрнуто (Knight i sar., 2011).

Неуролигин 1 (*NL1*) је мембрански ћелијски атхезиони протеин на постсинаптичкој мембрани која посредује у формирању и одржавању синапси између неурона. Неуролигини делују као лиганд за β неурексине који представљају пресинаптичке атхезионе молекуле. Неуролигин и β неурексин се „рукују“ и успостављају синаптичку везу између два неурона (слика 8.). Неуролигини интерагују са другим постсинаптичким протеинима повећавајући постсинаптичку густину за рецепторе у периоду ћелијског сазревања. Поред тога неуролигини су присутни у ћелијама периферних ткива и имају важну улогу у процесу ангиогенезе (Bottos i sar., 2009). У хуманој популацији је идентификовано 5 гена, а код глодара 3 гена за неуролигине. Код људи се сматра да промене на генима који кодирају неуролигин доводећи до аутизма и других когнитивних поремећаја (Südhof, 2008).

8. НЕУРЕГУЛИН

Иако су узроци схизофреније непознати истраживања указују на то да схизофренија има значајну генетску компоненту (Ming i sar., 2000). Хаплотип анализа идентификује неурегулин 1 (*Nrg1*), као ген одговоран за настанак схизофреније. Неурегулин 1 је опште прихваћен ген за схизофренију, који има значајну улогу у можданом сазревању, ћелијској пролиферацији, мијелинизацији и синаптичкој пластичности (Law i sar., 2006). Неурегулин 1 је лиганд ErbB рецепторских тирозин киназа, везујући се за ErbB3/4 рецепторе преко EGF (*epidermal growth factor*) домена. Након везивања лиганда долази до димеризације/олигомеризације рецептора, активације тирозин киназе и фосфорилације тирозина на цитоплазматском домену рецептора. Након тога долази до регрутовања различитих молекула, што доводи до активације интрацелуларних сигналних путева као што су митоген активирајући протеин (Map-kinaze) и фосфоинозитид 3 (PI3-kinaze/Akt), што доводи до миграције, пролиферације, ћелијског преживљавања и диференцијације. Занимљиво је да схизофрени пацијенти показују измењену експресију на ErbB фамилији рецептора за Nrg1 i NMDA (Alaerts i sar., 2009; Hatzimanolis, 2013). Уопштено, неурегулин 1 је најважнији лиганд ErbB рецептора у развоју који контролише миграцију кортикалних GABAергичких интернеурона (Birchmeier, 2009). Још један фокус истраживања представља регулација NMDA рецептора неурегулином 1 интеракцијом помоћу post-synaptic density-95 (PSD-95). Такође, истраживања су показала да неурегулин 1 има важну улогу у сигнализацији између аксона и Швановиих ћелија (Newbern i Birchmeier, 2010; Paterson i sar., 2014). Смањена функција глутаматергичке неуротрансмисије у облику абнормалног функционисања NMDA рецептора у кортиколимбичким регионима мозга се сматра да може да објасни симптоме схизофреније (Bennett, 2009). Показано је да неуроразвојни утицаји стреса доводе до генетских варијација у неурегулину 1 као одговора на стрес (Taylor, 2010). Недавно је показано да делимична генетска делеција неурегулина 1 мења неуробихејвиоралну реакцију на поновљени стрес у адолесценцији (Chohan i sar., 2014). Све ово указује да је испитивање улоге неурегулина у етиопатогенези схизофреније од изузетног значаја.

ЦИЉЕВИ

Стрес у раном периоду живота као што је матернална депривација (МД) представља један од актуелних анималних модела схизофреније. Досадашња испитивања су показала да стрес у раном периоду живота изазива комплексно дејство на различите неуротрансмитерске системе, док дуготрајни утицаји нарочито код матерналне депривације као раног модела стреса још увек нису познати. Познато је да излагање пацова матерналној депривацији доводи до различитих промена у понашању које подсећају на симптоме схизофреније. Ова студија би требало да разјасни морфолошке параметре у мозгу који су потенцијални узрок промена у понашању пацова. Једна од карактеристика схизофреније је оштећење радне меморије посредоване променама у дебљини коре, броју ћелија и величини неурона префронталног кортекса (Pantelis i sar., 2005). Ова студија има за циљ да испита утицај матерналне депривације на кортикалну дебљину, број ћелија и величину неурона у овом делу коре, као и кортикалну дебљину ретроспленијалног и моторног дела коре, волумен хипокампуса и одговор глије у овим структурама. С друге стране, намера ове студије је да проучи густину појединих подкласа GABA-ергичких интернеурона што може додатно допринети разјашњавању морфолошких ефеката матерналне депривације. До сада није разјашњено да ли губитак парвалбумин позитивних интернеурона представља иреверзибилно оштећење неурона и смрт или представља губитак имунореактивности ових интернеурона. Од посебног интереса је проучавање експресије неурегулина, као трофичког фактора, који има значајну улогу у синаптичкој трансмисији, стварању мијелина, преживљавању неурона и глијалних ћелија што ће бити један од циљева овог истраживања. Иако је веза између неурегулина и схизофреније показана, до сада није проучавана његова експресија у матерналној депривацији као анималном моделу. Сагледавање промена које се дешавају након матерналне депривације у мозгу експерименталних животиња може допринети разумевању процеса који представљају патогенетске механизме схизофреније, као и развоју нових потенцијалних терапијских стратегија у лечењу ове болести.

С обзиром на претходно изнете чињенице постављени су следећи циљеви ове докторске тезе:

1. Испитати постојање дуготрајног утицаја МД на морфолошке промене, експресију NeuN протеина, одговор микроглије, астроглије и олигодендроглије у алокортексу и неокортексу мозгова пацова.
2. Испитати постојање дуготрајног утицаја МД на GABA-ергички систем одређивањем броја интернеурона који се позитивно боје на парвалбумин, калретинин, калбиндин и рилин у алокортексу и неокортексу мозгова пацова.
3. Испитати постојање дуготрајног утицаја МД на неурогенезу у хилусу *gyrus dentatus*-а (активна зона неурогенезе).
4. Испитати постојање дуготрајног утицаја МД на експресију неурегулина 1 и неуролигина у алокортексу и неокортексу мозгова пацова.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

1. Експерименталне животиње

У експеримантима су коришћени пацови оба пола, соја *Wistar* који су узети из узгајалишта Института за биомедицинска истраживања Галеника у Београду.

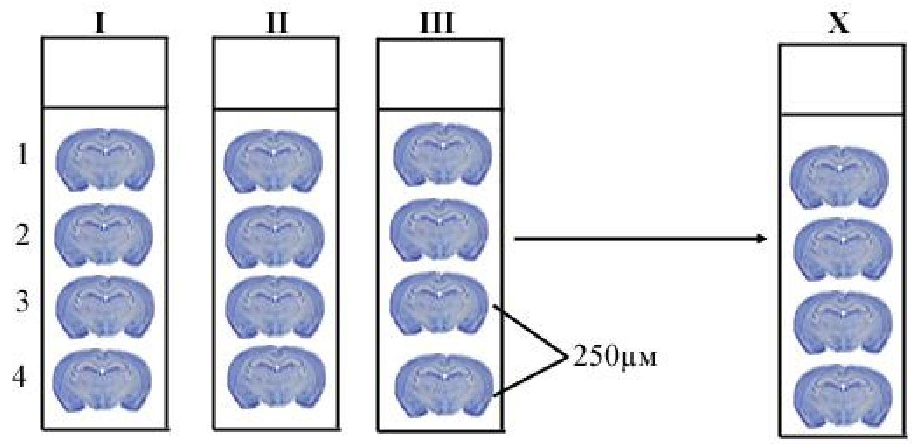
2. Третирање животиња

Мужјак и четири женке *Wistar* пацова старе три месеца су чувани заједно у стандардном кавезу од плексигласа са пиљевином (26x42x15 цм). Трудне женке *Wistar* пацова су појединачно чуване у кавезима са 12-часовним циклусом светло-мрак. Храна и вода били су доступни *ad libitum*. Дан порођаја смо означили као нулти постнатални дан (PN 0). Деветог постнаталног дана (PN 9) легла смо подвргнули матерналној депривацији, при чему смо младунце мушког пола уклонили из кавеза на 24 часа (Ellenbroek, 1995b; Roceri i sar., 2002). Младунцима је измерена телесна тежина након чега ће остати у кавезима на собној температури 24 часа без мајке. Десетог постнаталног дана (PN 10) младунцима смо опет мерили телесну тежину након чега су враћени у кавез са мајком (експериментална група). У контролној групи младунци остају са својом мајком све време уз мерење телесне тежине деветог и десетог постнаталног дана (PN 9 и PN 10). Након тога младунце нисмо узнемиравали, осим због рутинског чишћења кавеза, до PN 21 када смо извршили класификацију према полу. За морфометријске и биохемијске студије користили смо мужјаке, како би избегли сексуални диморфизам (Woolley, 1992), јер су све претходне студије извођене на мужјацима (Vivinetto, 2013; Own, 2013). Животиње су жртвоване шездесетог постнаталног дана (PN 60). Сви експерименти су у складу Водича за бригу и коришћење Лабораторијских Животиња NIH - National Institute for Health.

3. Припрема узорака за имунохистохемију (криопресеци)

За испитивање морфолошких промена у неокортексу и алокортексу је жртвовано по 5 животиња из експерименталне и контролне групе. Животиње смо анестезирали 3.6%

хлорал хидратом (10мл/кг i.p.) и затим перфундовали свеже припремљеним 4% параформалдехидом (4°C). Извађене мозгове смо остављали 24 h у 4% параформалдехиду после чега смо их пребацили у раствор сахарозе (растућег градијента концентрације 10%, 20%, 30%) у 0.1M фосфатном пуферу pH=7.4 (криопрезервација). Након тога, мозгове смо тренутно замрзавали на -80°C урањањем у 2-метилбутан (*Fluka Biochemika*), који је претходно охлађен на -80°C. За сечење ткива, каудални пол сваког мозга је причвршћен за криостатски носач коришћењем криостатског медијума (*Kilik*, Италија). Вентрална површина мозга је оријентисана према сечиву и серијски коронални пресеци дебљине 25μм за имунохистохемијске анализе су сечени на криокату Leica (*Leica Instruments*, Немачка). Пресеци су сакупљани на *SuperFrost Plus* плочицама (*Menzel Braunschweig*, Немачка). Како стереолошке анализе захтевају бројне пресеке проучаваних структура и употребу серијских пресека, сакупљање пресека је увек вршено на исти начин. На крају на свакој плочици је било по 4 пресека који су међусобно удаљени 250μм (слика 9). Пресеци су до тренутка бојења чувани на -20°C.



Слика. 9. Стандардизовани начин сакупљања узорака на стакленим плочицама

4. Општи протокол за имунохистохемијско бојење

За имунохистохемијско бојење, прво је извршено демаскирање антигена: плочице су инкубиране 30 минута на 80°C (у кивети у воденом купатилу) у 0,01M цитратном пуферу pH=9. По завршетку инкубације, плочице су остављене да се охладе на собној температури. Затим је извршено неспецифично блокирање током 1h на собној температури користећи нормалан козји серум (0,2% Triton X-100, 0,02% NaN_3, 5% нормални козји серум у PBS-у pH=7.3). Након тога, раствор за блокирање је аспириран, а плочице су инкубиране са примарним антителима (24 – 48h на +4°C) која су растворена у PBS-у који садржи 0.5% λ carrageenan (омогућава бољу пенетрацију антитела кроз релативно дебео исечак) и 0.02% NaN_3. Плочице су инкубиране у добро затвореним влажним коморама. Коришћена су следећа примарна антитела:

Табела 1. Антитела коришћена за имунохистохемијска бојења

Антитело	**Скраћеница**	**Врста**	**Произвођач**	**Разблажење**
антинеурон специфично нуклеарно антитело	anti – NeuN	мишје моноклонско	Chemicon, USA	1:1000
анти-парвалбумин	anti – PV	мишје моноклонско	Sigma-Aldrich, Germany	1:1000
анти-калбиндин	anti – CB	мишје моноклонско	Sigma-Aldrich, Germany	1:1000
анти-калретинин	anti – CL	зечје поликлонско	Sigma-Aldrich, Germany	1:1000
анти-рилин	anti – rilin	мишје моноклонско	Merck, Germany	1:500
анти-ки67	anti – ki67	зечје поликлонско	Abcam, UK	1:500

Након инкубације, плочице су 3 пута испиране PBS-ом (по 15 мин) пре стављања одговарајућег секундарног антитела. За визуелизацију је коришћен *En Vision Dual Link System-HRP* (DAKO), који садржи секундарна антитела (према примарним мишјим и зечјим антителима) коњугована са пероксидазом рена (*horseradish peroxidase*, HRP). Након реакције са секундарним антителима следила је инкубација (10 минута) са 3,3-диаминобензидином (DAB) који је хромогени супстрат за пероксидазу, што доводи до појаве преципитата браон боје на месту присуства антигена. На крају, пресеци су поново испирани PBS-ом након чега је извршена дехидратација и постављено покровно стакло помоћу DPX-a (Sigma-Aldrich, Немачка). Обојене плочице су чуване у мраку на +4°C.

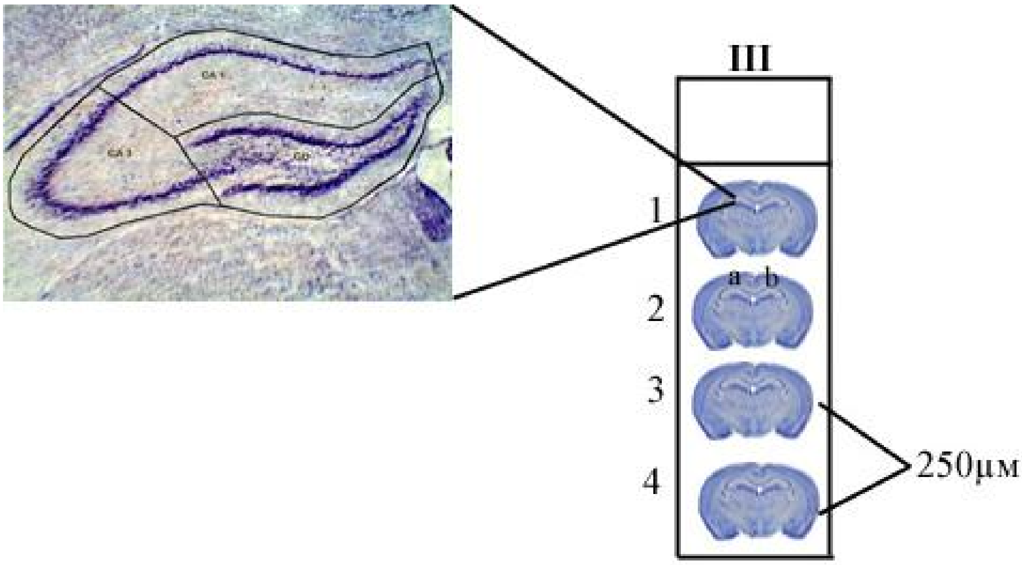
5. Морфолошке студије

Морфолошке параметре у кортексу и хипокампусу мерили смо користећи *Image Tool 3.0* и *ImageJ* софтвер (слободно доступан на http: //www. ddsdx. uthscsa. edu/dig/) на стереолошким микрографијама.

5.1 Одређивање волумена хипокампуса

Волумен хипокампуса са субјединицама (CA1, CA3 и *gyrus dentatus* GD) израчунали смо према принципу *Cavalieri* методе. Исти принцип је коришћен за израчунавање волумена пирамидалног слоја Амоновог рога хипокампуса и грануларног слоја *gyrus dentatus*-а. Сва мерења су рађена билатерално. На микрографијама су помоћу ImageJ софтвера одређиване вредности обележених структура билатерално на већини пресека по једној плочици. Добијене вредности у микрометрима смо сабирали и помножили са 250 (што представља однос од 250µm између два пресека на плочици). Добијена вредност је подељена са 10^9 што представља однос између μm^3 и mm^3.

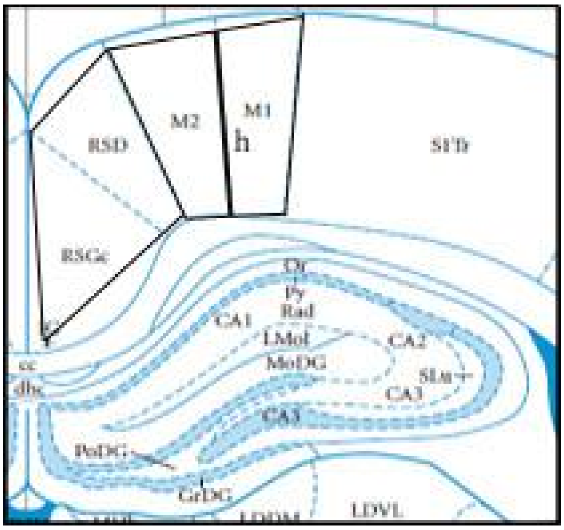
Формула: V= (1+2+3+...)*250/1000000000



Слика 10. На слици је приказана микрографија хипокампуса на којој су обележени CA1, CA3, GD помоћу софтвера *ImageJ*. Бројеви (1-4) представљају пресеке на плочици, док (a, b) означавају леву и десну половину пресека, а 250μm представља вредност између два пресека на плочици.

5.2 Одређивање кортикалне дебљине префронталног, ретроспленијалног и моторног дела коре

Кортикална дебљина префронталног кортекса (изузев првог слоја) је мерена билатерално на стереолошким пресецима који су удаљени од брегме 2,52 милиметара док је дебљина ретроспленијалног и моторног дела коре мерена на удаљености од -2,76 од брегме (Paxinos i Watson, 2005). Израчунавање кортикалне дебљине је вршено обележавањем споменутих делова коре на микрографијама помоћу софтвера *ImageJ* . Након тога је одређивана кортикална дебљина (висина) која представља растојање између две паралелне странице на обележеној микрографији које се виде у односу на менингеалну површину.



Слика 11. На слици је приказано израчунавање кортикалне дебљине (висина) која представља растојање између две паралелне странице на обележеној микрографији које се виде у односу на менингеалну површину (Paxinos i Watson, 2005).

5.3 Квантификација величине и густине тела неурона

Процена величине и густине пирамидалних и грануларних тела неурона је рађена на микрографијама коришћењем *Image Tool 3.0* и *ImageJ software*-а у нивоу попречног пресека где су најбоље видљива неуронска тела. Пирамидални и грануларни неурони су идентификовани према свом положају у својим слојевима у хипокампусу и *gyrus dentatus*-у. Одређивање густине субјединица интернеурона је мерено по истом принципу према површини микрографија у одређеним регионима кортекса и хипокампуса. Сва мерења су рађена билатерално.

6. Одређивање експресије протеина техником *Western blot*-а

Експресија синаптичких маркера, као и појединачних глијалних протеина је одређивана техником *Western blot*-а. По пет животиња из експерименталне и контролне групе је било жртвовано цервикалном дислокацијом и декапитацијом. По декапитацији главе су тренутно замрзаване у течном азоту, а затим чуване на -85°C. Мождане структуре (кортекс и хипокампус) су препарисане на хладно, а потом су изоловани укупни протеини у RIPA пуферу (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH=7.5, 0.2% SDS, 2% Na-deoksiholat, 2% Triton X-100) чија концентрација је одређивана методом по Bradfordu. Затим је извршена електрофореза протеина у денатуришућем SDS полиакриламидном гелу, након чега је вршен трансфер протеина са гела на мембрану. Мембране су потом неспецифично блокиране 1h 5% немасним млеком у праху у TBST-u (50 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Након блокирања мембране су инкубиране са следећим примарним антителима:

Tabela 2. Антитела коришћена за *Western blot*

Антитело	**Скраћеница**	**Врста**	**Произвођач**	**Разблажење**
анти-глијални фибрилизирајући протеин	anti – GFAP	зечје поликлонско	DAKO, Denmark	1:500
анти-неурон специфично нуклерано антитело	anti – NeuN	мишје моноклонско	Chemicon, USA	1:1000
анти-мијелин олигодендроцитни гликопротеин	anti – MOG	зечје моноклонско	Abcam, UK	1:500
анти-јонизовани калцијум везујући адаптивни молекул 1	anti – Iba 1	козје поликлонско	Abcam, UK	1:500
Неурегулин 1	anti - Nrg 1	мишје моноклонско	Abcam, UK	1:500

Потом су мембране инкубиране са одговарајућим HRP-обележеним секундарним антителима (anti – mouse, anti – rabbit, anti – goat). У фото-комори, рентген филм је излаган мембрани која је третирана са Enhanced Chemiluminescence System (ECS) и развијен. Блотови су скенирани и семиквантитативна дензитометријска анализа је вршена коришћењем програма *ImageQuant 5.2*.

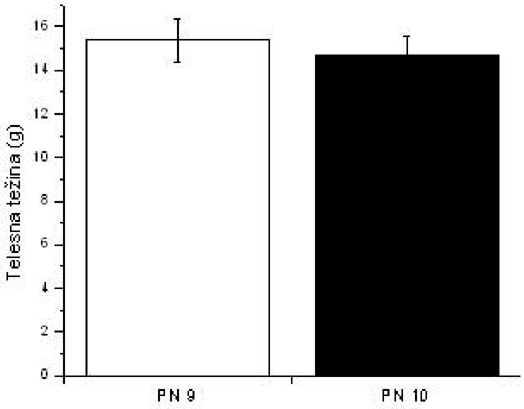
7. Статистичка анализа

Статистичка обрада добијених резултата између контролне и експериманталне групе вршена је помоћу програма *Statistica StatSoft*, одговарајућим статистичким тестовима, пре свега Студентовим т-тестом за два независна узорка. Уколико је вероватноћа да је нулта хипотеза („постоји разлика између посматраних величина“) тачна, била једнака или мања од 5% ($p \leq 0.05$), разлика је сматрана за статистички значајну. Резултати су приказани графичким стубичастим дијаграмима. Графички приказ је урађен у програму *OriginPro8*.

РЕЗУЛТАТИ

1. Утицај матерналне депривације на телесну тежину пацова

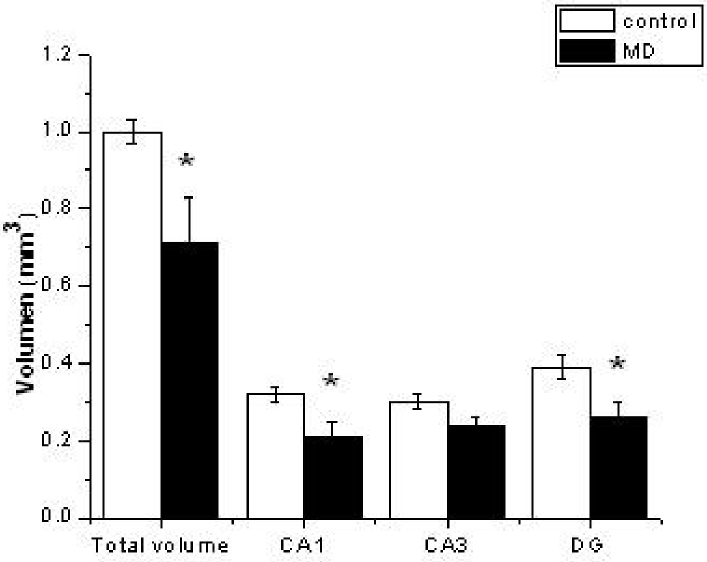
Телесна тежина животиња је мерена пре одвајања експерименталне групе од мајке, деветог постнаталног дана (PN 9) и износила је 15.37 ± 1 g. Такође, десетог постнаталног дана (PN 10) мерена је телесна тежина матернално депривираних животиња која је износила 14.72 ± 0.84 g. Статистичком анализом телесних тежина експерименталне групе PN 9 и PN 10, коришћењем T теста за два независна узорка, показано је да ова разлика није статистички значајна ($p>0.05$) (графикон 1).



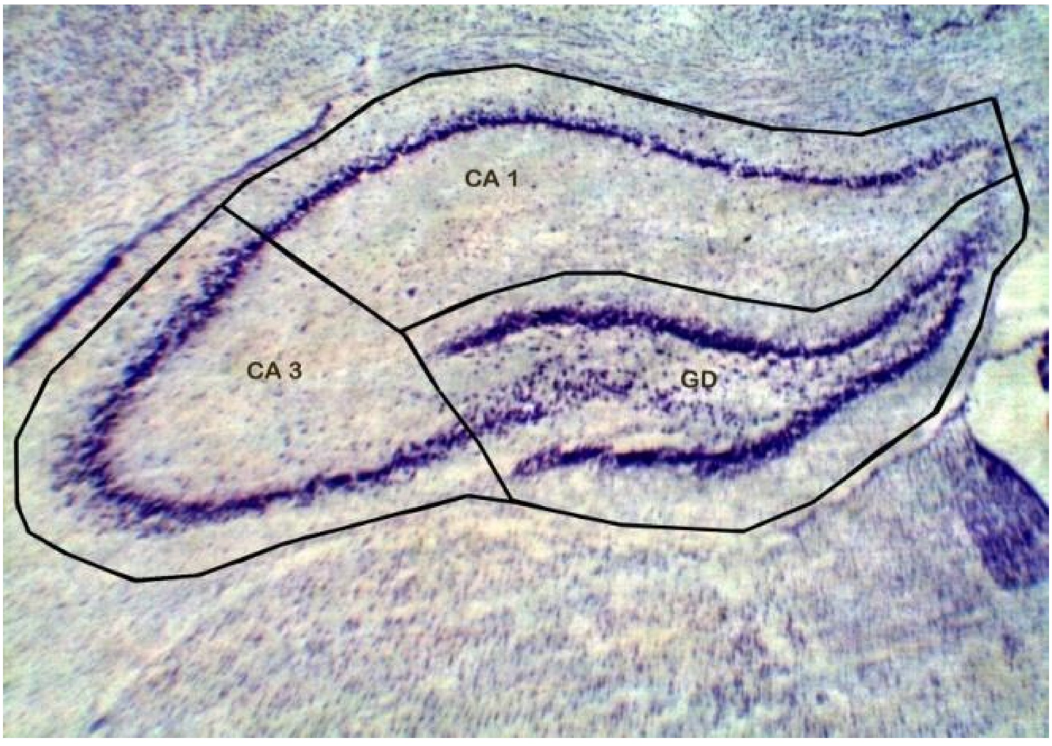
Графикон 1. Телесна тежина животиња пре и после подвргавања матерналној депривацији (PN 9 и PN 10). Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

2. Дуготрајни утицај матерналне депривације на волумен хипокампуса

Волумен хипокампуса је мерен билатерално код матернално депривираних и контролних животиња у CA1, CA3 и *gyrus dentatus*-у GD. Статистичком анализом коришћењем T теста за два независна узорка показано је да постоји статистички значајно смањење укупног волумена хипокампуса, као и статистички значајно смањење у CA1 и GD ($p<0.05$), али не и у CA3 ($p>0.05$) (графикон 2).



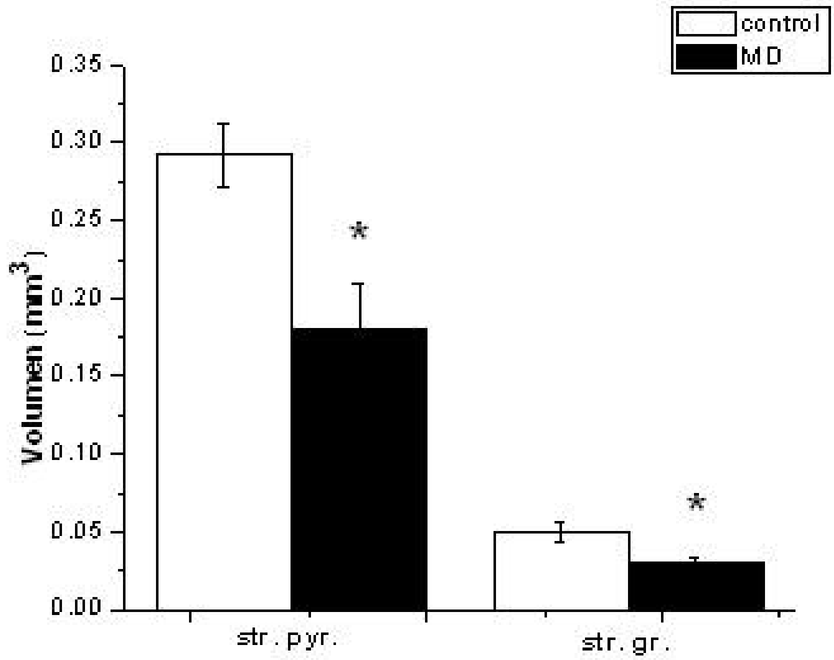
Графикон. 2. Укупан волумен хипокампуса и његових регија CA1, CA3 и GD код контролних и матернално депривираних животиња. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.



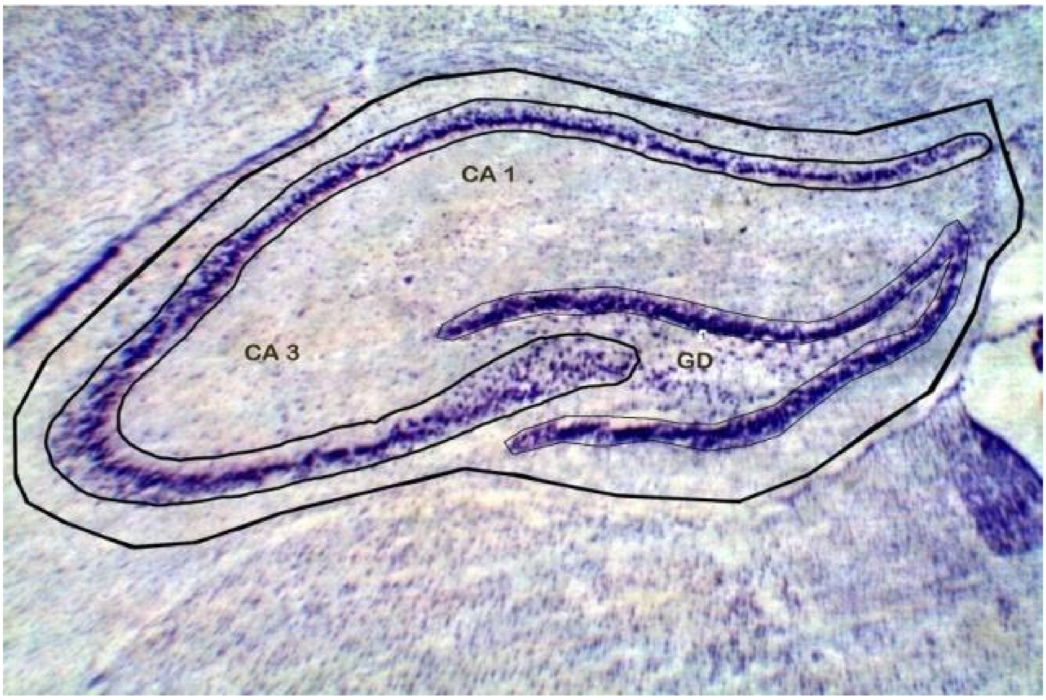
Слика 12. Репрезентативни приказ волумена хипокампуса са својим регионима CA1, CA3 и GD код контролних и матернално депривираних животиња.

3. Дуготрајни утицај матерналне депривације на волумен пирамидалног слоја хипокампуса и грануларног слоја *gyrus dentatus*-а

Волумен пирамидалног слоја (*stratum pyramudale*) хипокампуса и грануларног слоја (*stratum granulare*) *gyrus dentatus*-а је мерен билатерално код матернално депривираних и контролних животиња. Статистичком анализом коришћењем Т теста за два независна узорка показано је да постоји статистички значајно смањење волумена пирамидалног слоја хипокампуса, као и грануларног слоја *gyrus dentatus*-а ($p<0.05$) (графикон 3).



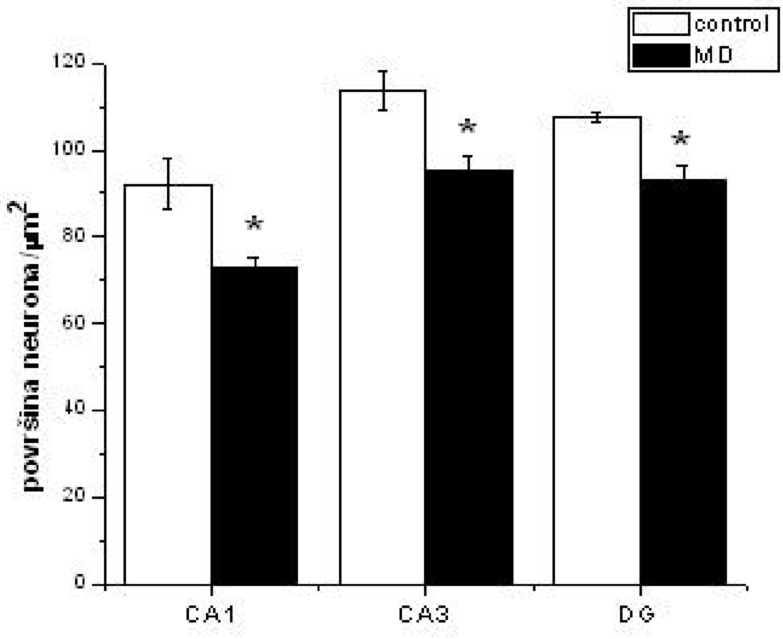
Графикон 3. Волумен пирамидалног слоја (*stratum pyramudale*) хипокампуса и грануларног слоја (*stratum granulare*) *gyrus dentatus*-а код контролних и матернално депривираних животиња. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.



Слика 13. Репрезентативни приказ пирамидалног слоја (*stratum pyramudale*) хипокампуса и грануларног слоја (*stratum granulare*) *gyrus dentatus*-а.

4. Дуготрајни утицај матерналне депривације на површину пирамидалних неурона хипокампуса и грануларних неурона *gyrus dentatus*-а

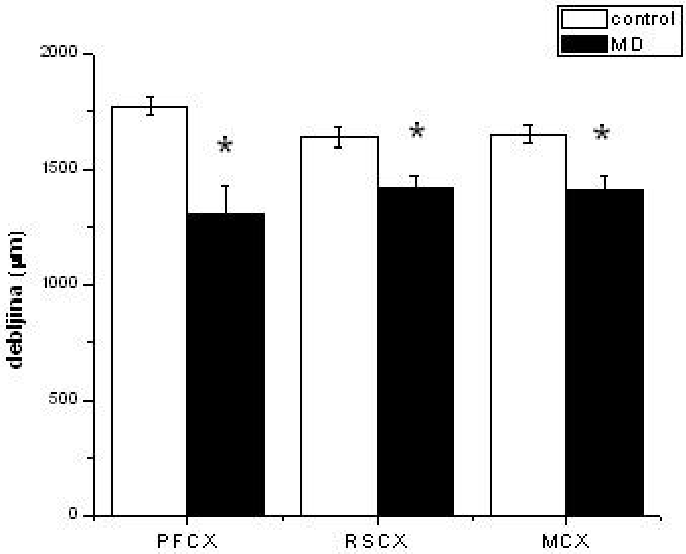
Површина пирамидалних неурона хипокампуса и грануларних неурона *gyrus dentatus*-а мерена је билатерално на стереолошким пресецима код матернално депривираних и контролних животиња. Статистичком анализом коришћењем Т теста за два независна узорка показано је да постоји статистички значајно смањење површине пирамидалних ћелија у CA1 и CA3 регионима као и грануларних ћелија *gyrus dentatus*-а GD ($p<0.05$) (графикон 4).



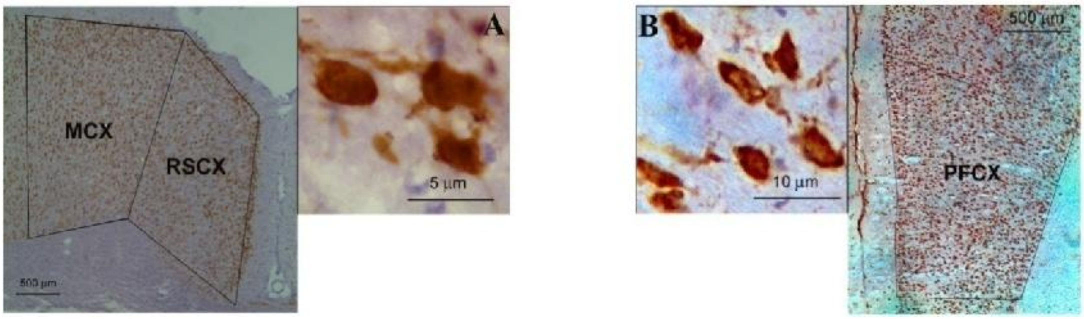
Графикон 4. Површина пирамидалних и грануларних неурона хипокампуса и *gyrus dentatus*-а код контролних и матернално депривираних животиња. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

5. Дуготрајни утицај матерналне депривације на кортикалну дебљину

Кортикална дебљина префронталног кортекса (PFCX) је мерена билатерално на стереолошким пресецима који су удаљени од брегме 2,52 mm, док је дебљина ретроспленијалног (RSCX) и моторног (MCX) дела коре мерена на удаљености од -2.76 mm од брегме (Paxinos and Watson, 2005). Статистичком анализом коришћењем Т теста за два независна узорка показано је статистистички значајно смањење кортикалне дебљине у свим деловима неокортекса који смо истраживали ($p<0.05$) (графикон 5).



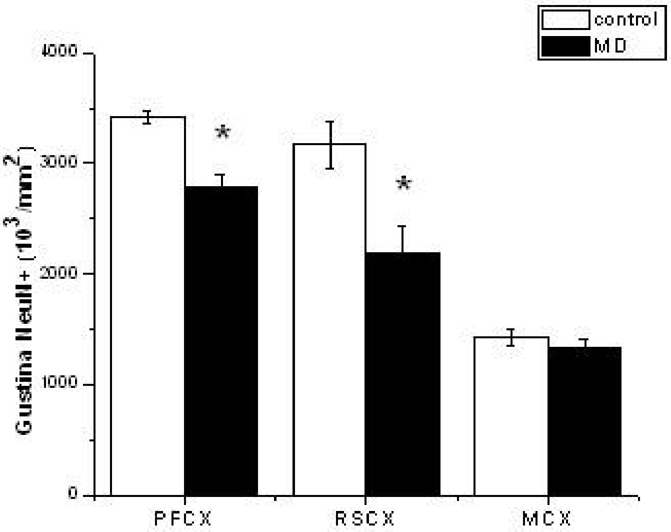
Графикон 5. Кортикална дебљина префронталног (PFCX), ретроспленијалног (RSCX) и моторног (MCX) дела коре великог мозга. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.



Слика 14. Репрезентативни приказ, **(A)** кортикалне дебљине ретроспленијалног (RSCX) и моторног (MCX) кортекса са густином NeuN имунопозитивних неурона, **(B)** кортикалне дебљине префронталног (PFCX) кортекса са густином NeuN имунопозитивних неурона.

6. Дуготрајни утицај матерналне депривације на густину Neu-N имунопозитивних неурона у неокортексу

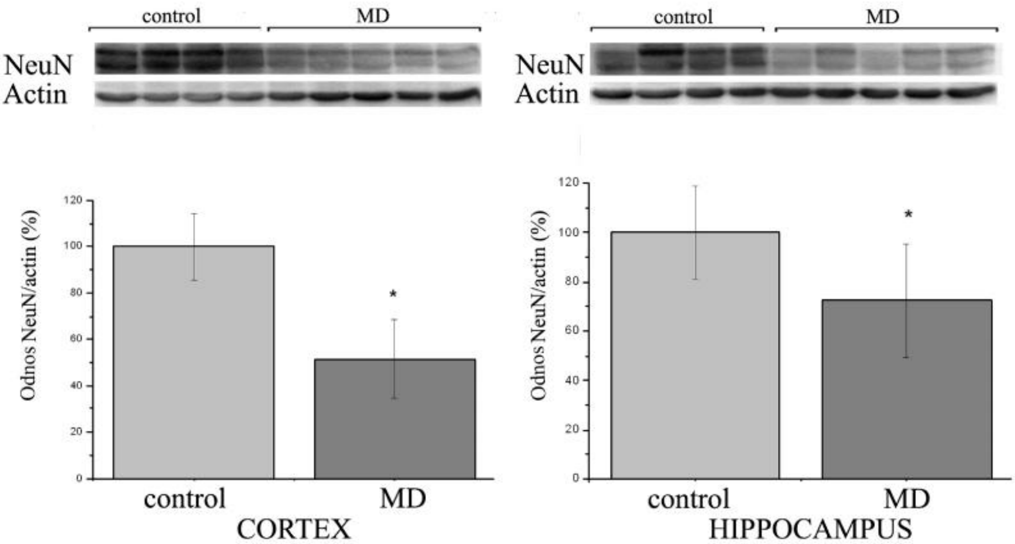
Због смањења кортикалне дебљине у деловима неокортекса који смо истраживали одређена је и густина NeuN имунопозитивних неурона на стереолошким препаратима мозга пацова на истој удаљености од брегме, где је вршено мерење кортикалне дебљине префронталног (PFCX), ретроспленијалног (RSCX) и моторног кортекса (MCX). Статистичком анализом коришћењем T теста за два независна узорка показано је статистистички значајно смањење густине NeuN имунопозитивних ћелија у префронталној ($p<0.01$) и ретроспленијалној кори ($p<0.05$), али не и у моторној кори ($p>0.05$) (графикон 6).



Графикон 6. Густина NeuN+ ћелија у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) делу коре великог мозга. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

7. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију Neu-N протеина у хипокампусу и префронталном кортексу

Експресија NeuN протеина у хипокампусу и префронталном кортексу је процењивана методом Western blot-а, како бисмо потврдили претходно квантификоване резултате у густини NeuN имунопозитивних ћелија. Добијени резултати овом методом указују на смањену експресију NeuN протеина у хипокампусу за око 30% и префронталном кортексу скоро 50%, што указује да постоји статистичка значајност експресије NeuN протеина у овим деловима мозга (графикон 7).

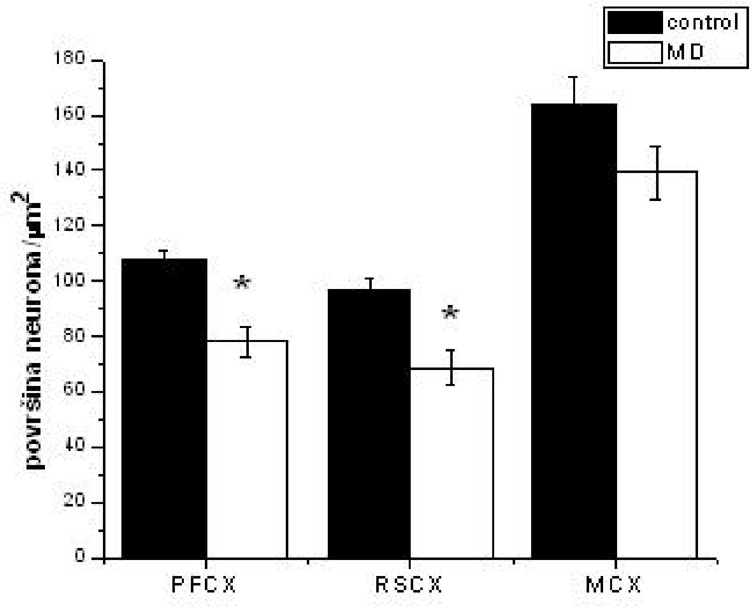


Графикон 7. Експресија NeuN протеина у префронталном кортексу и хипокампусу код матернално депривираних животиња у поређењу са контролном групом. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

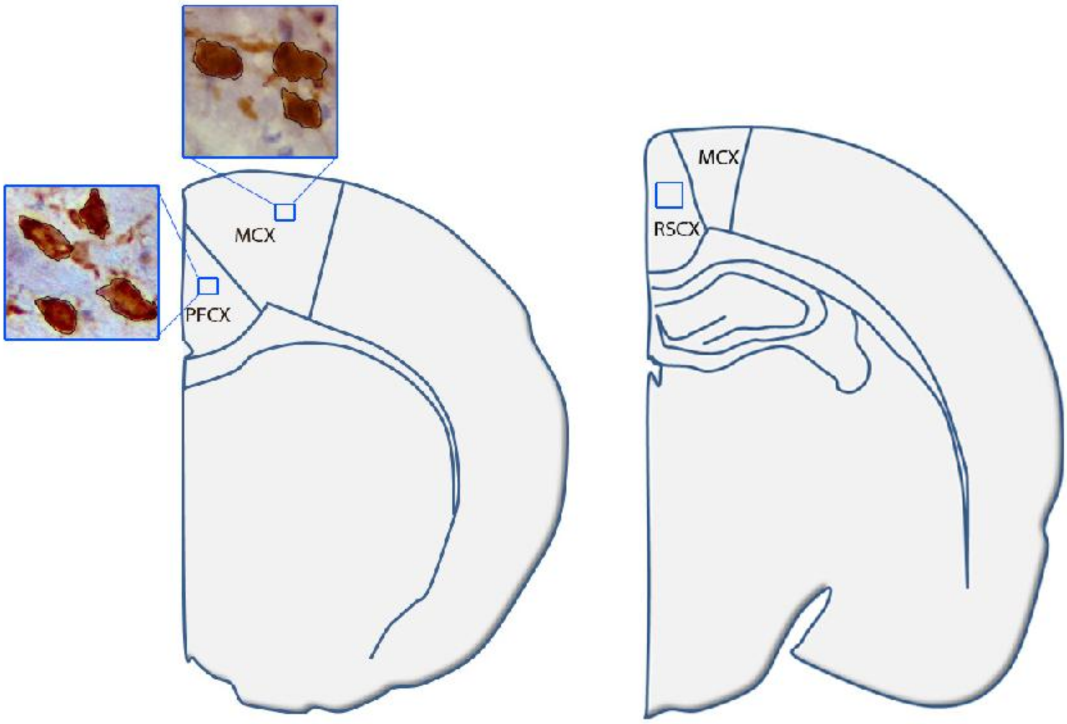
*p<0.05 у поређењу са контролом

8. Дуготрајни утицај матерналне депривације на површину неурона у неокортексу

За процену смањења кортикалне дебљине измерена је и површина самих NeuN имунопозитивних ћелија у неокортексу. Површина NeuN имунопозитивних неурона у префронталној (PFCX), ретроспленијалној (RSCX) и моторној (MCX) кори мерена је билатерално код матернално депривираних и контролних животиња. Статистичком анализом коришћењем Т теста за два независна узорка показано је статистистички значајно смањење површине NeuN имунопозитивних ћелија у префронталној ($p<0.01$) и ретроспленијалној кори ($p<0.01$), али не и у моторној кори ($p>0.05$) (графикон 8).



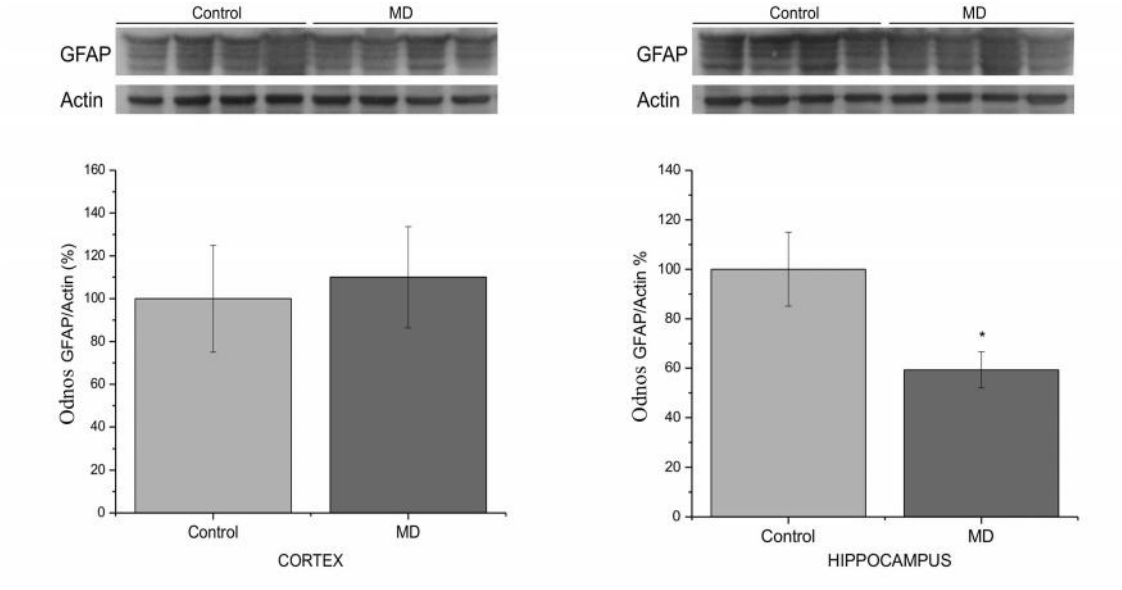
Графикон 8. Површина NeuN имунопозитивних ћелија неокортекса код контролних и матернално депривираних животиња. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.



Слика 15. Репрезентативни приказ површине NeuN имунопозитивних неурона у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу.

9. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију GFAP протеина у хипокампусу и префронталном кортексу

Експресија GFAP протеина као маркера астроцита у префронталном кортексу и алокортексу је процењена методом Western blot-а између контролне и матернално депривиране групе животиња. Квантитативна анализа података показује да је експресија GFAP протеина у хипокампусу смањена за око 40 % код МД групе у односу на контролну, док промене нису детектоване у префронталном кортексу. Овим закључујемо да стрес изазван одвајањем од мајке је у корелацији са смањењем GFAP протеина у хипокампусу (графикон 9).

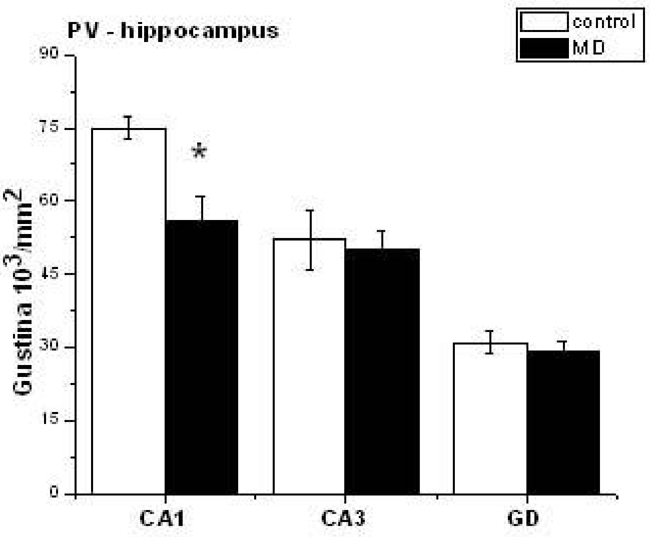


Графикон 9. Експресија GFAP протеина у префронталном кортексу и хипокампусу код матернално депривираних животиња у поређењу са контролном групом. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

$p<0.05$ у поређењу са контролом

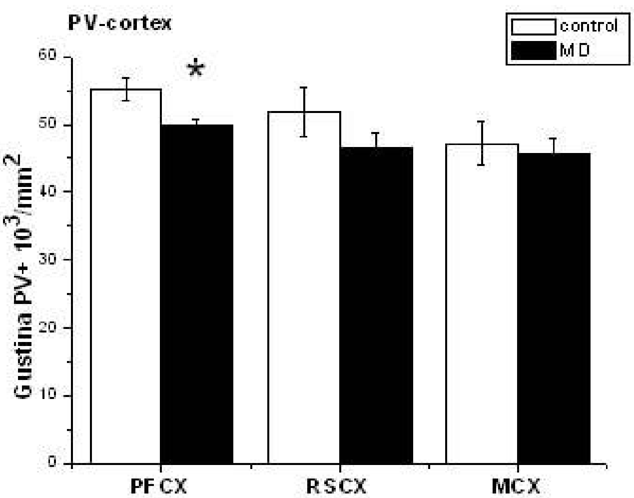
10. Дуготрајни утицај матерналне депривације на парвалбумин (PV) имунопозитивне неуроне у хипокампусу и неокортексу

Број парвалбумин + интернеурона је одређиван у хипокампусу и то у CA1, CA3 и GD субрегионима. У кортексу је број парвалбумин + интернеурона одређиван у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу. У хипокампусу је број парвалбумин + неурона био статистички значајно снижен у CA1 (графикон 10), док је у кортексу број парвалбумин + интернеурона био смањен у префронталном кортексу (PFCX) (графикон 11).



Графикон 10. Број парвалбумин (PV)+ интернеурона у субрегионима хипокампуса. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

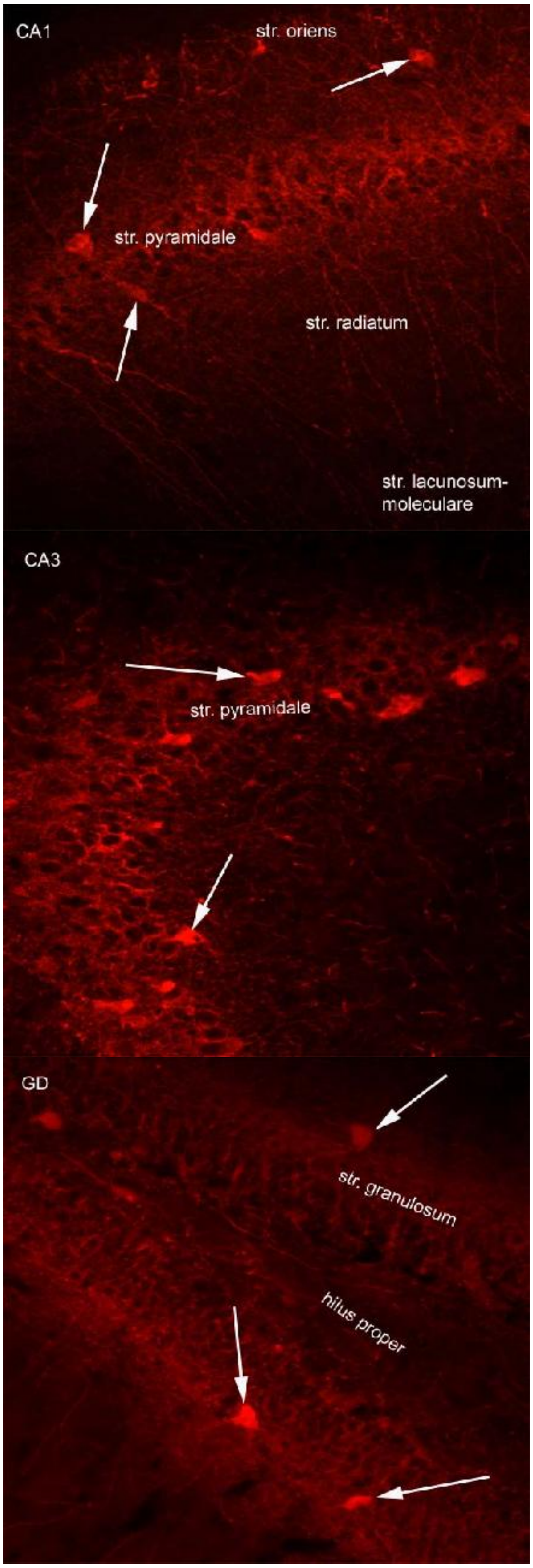
*p<0.05 у поређењу са контролом

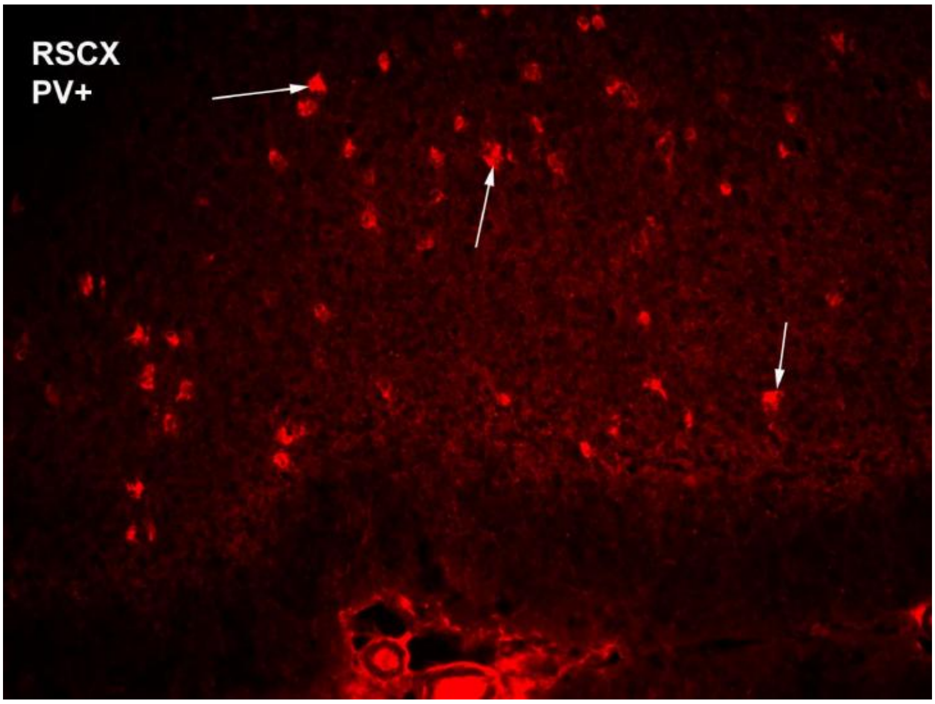


Графикон 11. Број парвалбумин (PV)+ интернеурона у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

*p<0.05 у поређењу са контролом

Слика 16. Репрезентативни пример имунохистохемијског бојења: PV+ ћелије (црвене боје, обележене стрелицом) у различитим регионима хипокампуса

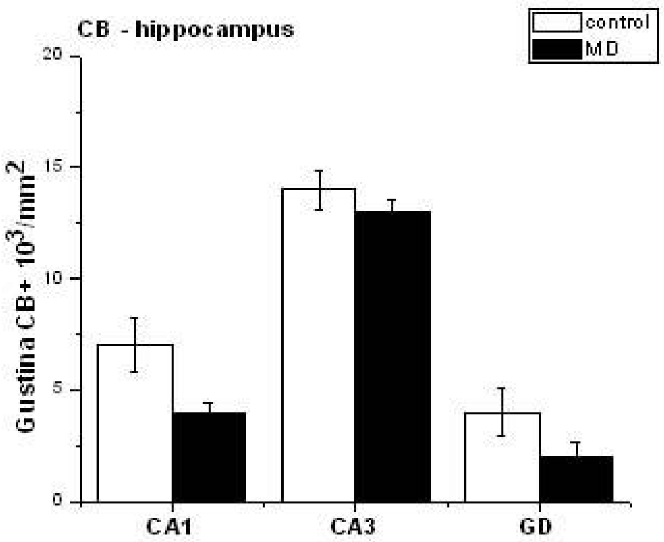




Слика 17. Репрезентативни пример парвалбумин (PV) имунопозитивних неурона у ретроспленијалном (RSCX) делу неокортекса (црвене боје, обележене стрелицом).

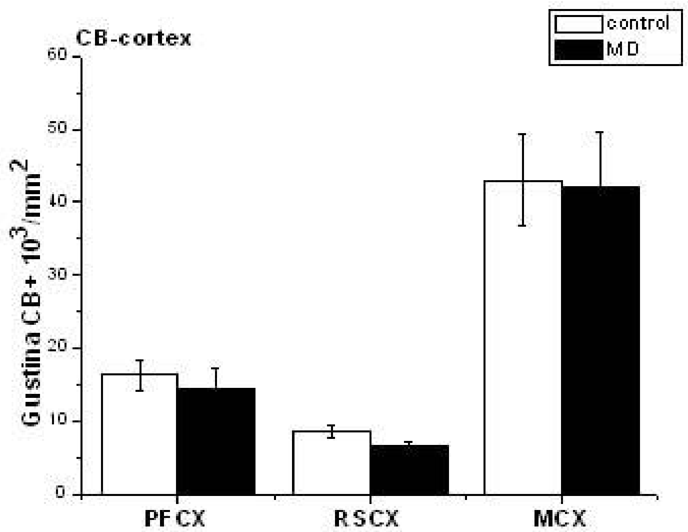
11. Дуготрајни утицај матерналне депривације на калбиндин (CB) имунопозитивне неуроне у хипокампусу и неокортексу

Одређивањем броја калбиндин + интернеурона у CA1, CA3 и GD субрегионима хипокампуса показано је да нема статистички значајних промена (графикон 12). У неокортексу је број калбиндин + интернеурона одређиван у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) делу, где није постојала статистички значајна разлика (графикон 13).



Графикон 12. Број калбиндин (CB)+ интернеурона у субрегионима хипокампуса. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

*p>0.05 у поређењу са контролом

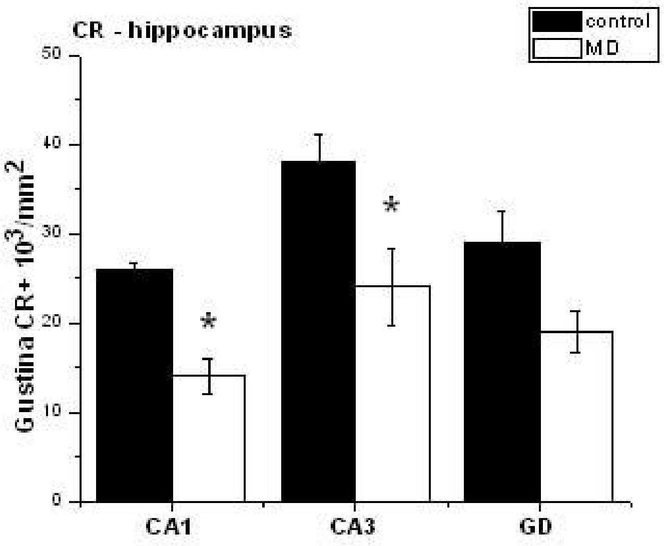


Графикон 13. Број калбиндин (CB)+ интернеурона у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

*p>0.05 у поређењу са контролом

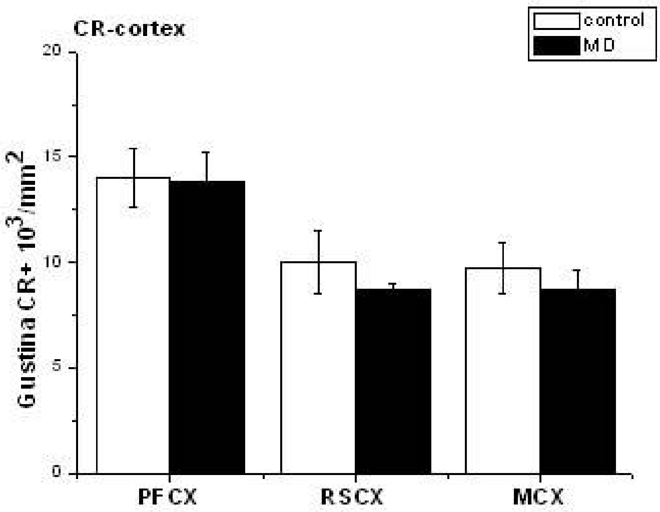
12. Дуготрајни утицај матерналне депривације на калретинин (CR) имунопозитивне неуроне у хипокампусу и неокортексу

Испитиван је и утицај матерналне депривације на број калретинин имунопозитивних неурона у субрегионима хипокампуса. У кортексу је број калретинин + интернеурона одређиван у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу. У хипокампусу је број калретинин + неурона био статистички значајно снижен у CA1 и CA3 ($p<0.05$) (графикон 14), док у кортексу број калретинин + интернеурона није био статистички промењен (графикон 15).

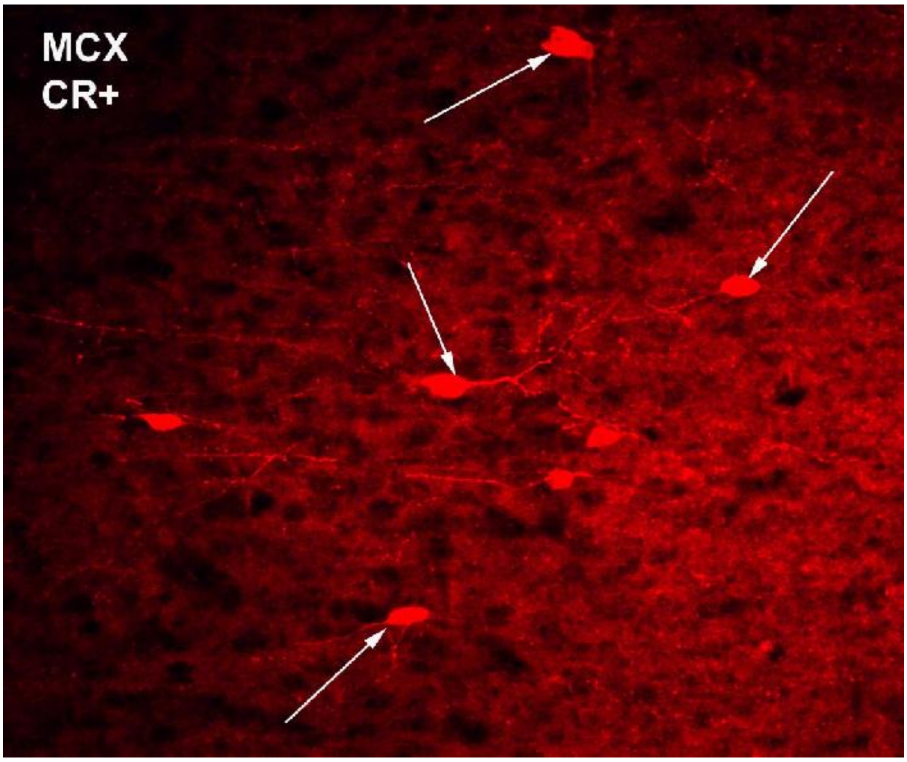


Графикон 14. Број калретинин (CR)+ интернеурона у субрегионима хипокампуса. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

*p<0.05 у поређењу са контролом



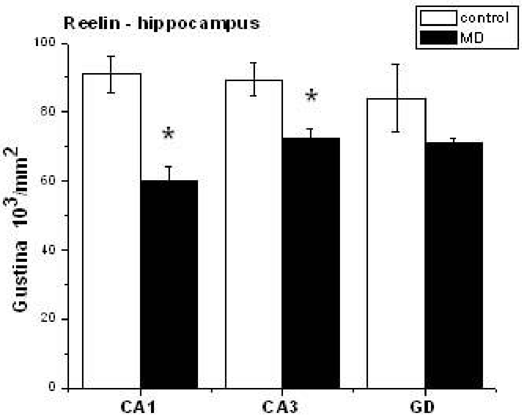
Графикон 15. Број калретинин (CR)+ интернеурона у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M. *p>0.05 у поређењу са контролом



Слика 18. Репрезентативни пример калретинин (CR) имунопозитивних неурона у моторном (MCX) делу неокортекса (црвене боје, обележене стрелицом).

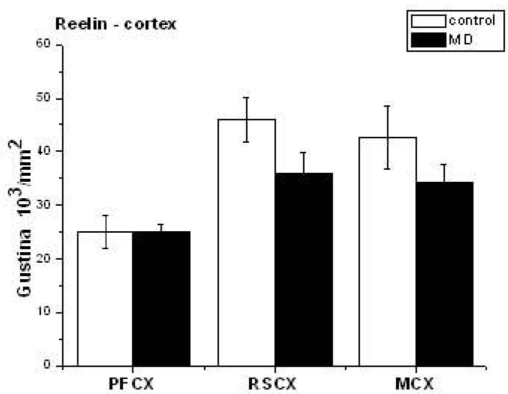
13. Дуготрајни утицај матерналне депривације на рилин имунопозитивне неуроне у хипокампусу и неокортексу

Број рилин + интернеурона је одређиван у хипокампусу и то у CA1, CA3 и GD субрегионима. У кортексу је број рилин + интернеурона одређиван у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу. У хипокампусу је број рилин + интернеурона био статистички значајно снижен у CA1 и CA3 ($p<0.05$) (графикон 16), док је у кортексу број рилин + неурона без статистичких значајних промена ($p>0.05$) (графикон 17) у односу на контролну групу.



Графикон 16. Број рилин+ интернеурона у субрегионима хипокампуса. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

*p<0.05 у поређењу са контролом

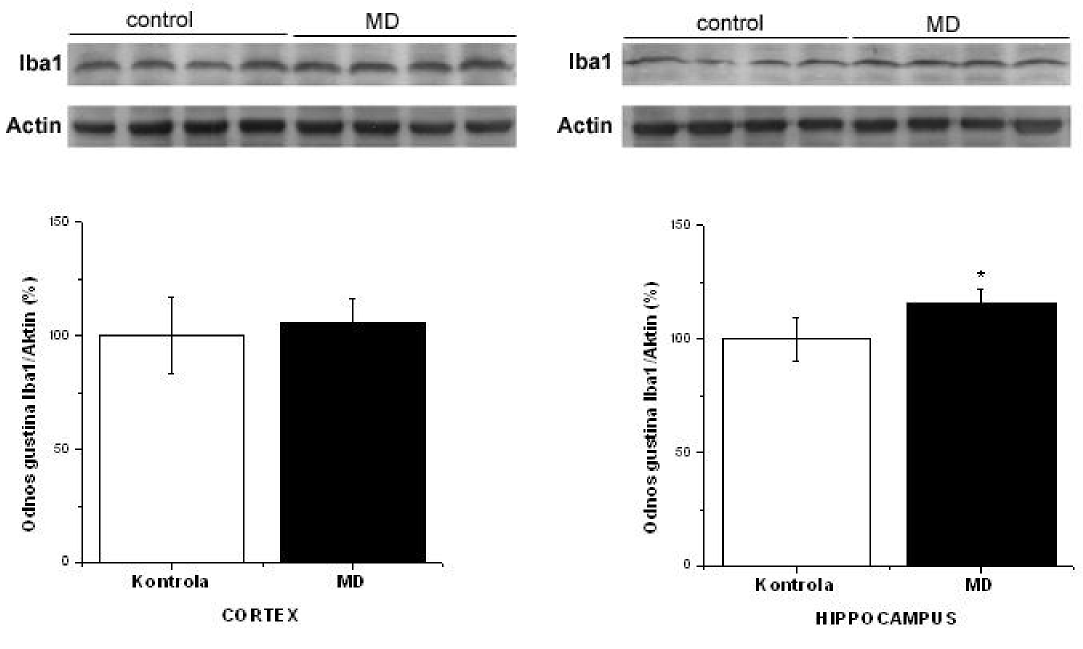


Графикон 17. Број рилин+ интернеурона у префронталном (PFCX), ретроспленијалном (RSCX) и моторном (MCX) кортексу. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

*p>0.05 у поређењу са контролом

14. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију Iba1 протеина у префронталном кортексу и хипокампусу мозга пацова

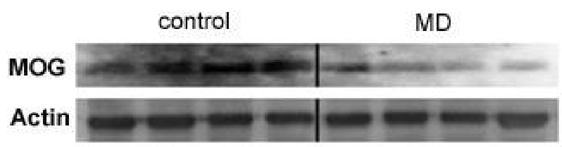
Експресија Iba1 (јонизовани калцијум-везујући адаптивни молекул 1) протеина као маркера за микроглију у неокортексу и алокортексу је процењена методом Western blot-a између контролне и матернално деприviране групе животиња. Квантитативна анализа података показује да је експресија Iba1 протеина у хипокампусу била повећана за око 20 % код МД групе у односу на контролну, док статистички значајне промене нису детектоване у префронталном кортексу. Овим закључујемо да је стрес изазван одвајањем од мајке у корелацији са повећањем Iba1 протеина у хипокампусу (графикон 18).

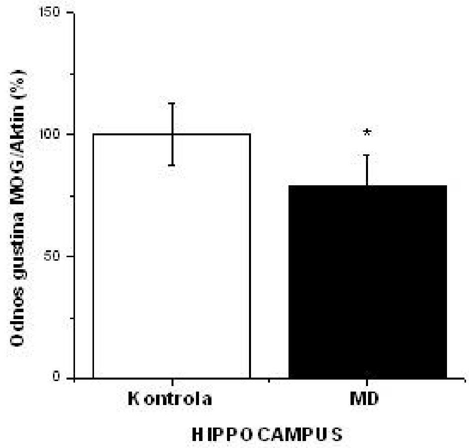


Графикон 18. Експресија Iba1 протеина у префронталном кортексу и хипокампусу код матернално депривираних животиња у поређењу са контролном групом. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

15. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију MOG протеина у префронталном кортексу и хипокампусу мозга пацова

Експресија MOG (мијелин олигодендроцитни гликопротеин) протеина као маркера за олигодендроглију у кортексу и хипокампусу је процењена методом Western blot-a. Добијени резултати овом методом указују на смањену експресију MOG протеина у хипокампусу за око 20 %, док статистички значајне промене нису детектоване у кортексу у односу на контролну групу. Овим закључујемо да је стрес изазван одвајањем од мајке у корелацији са смањењем MOG протеина у хипокампусу (графикон 19).

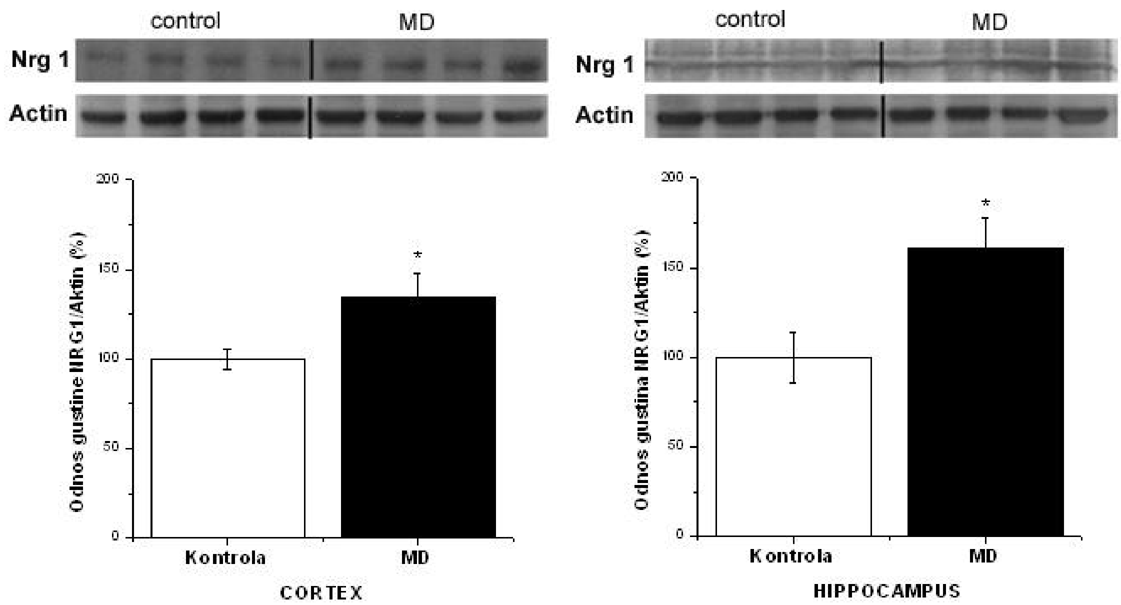




Графикон 19. Експресија MOG протеина хипокампусу код матернално депривираних животиња у поређењу са контролном групом. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

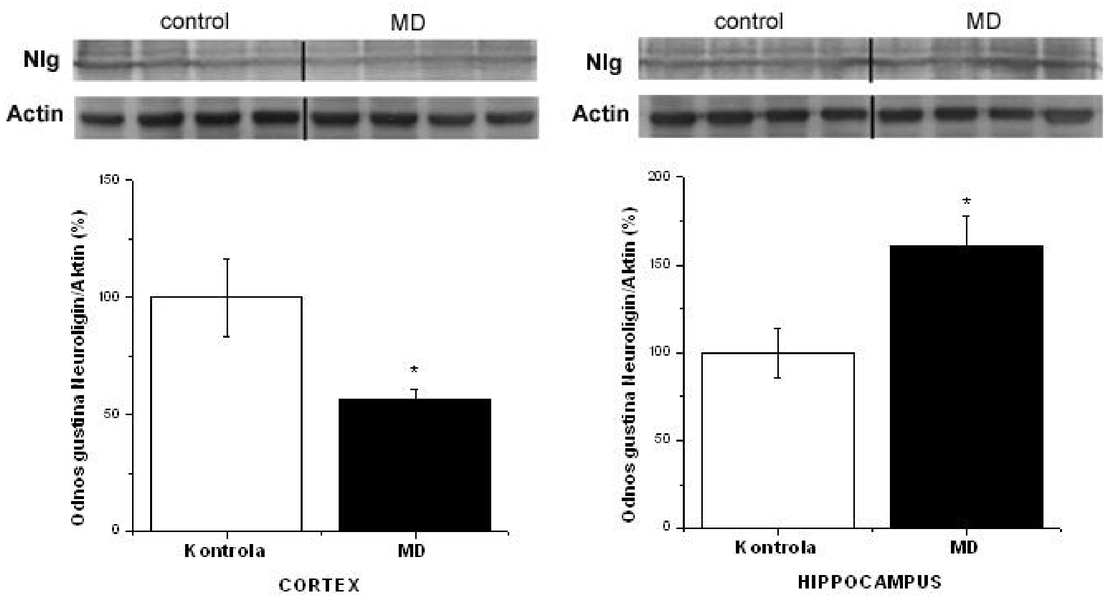
16. Дуготрајни утицај матерналне депривације на експресију неурегулина и неуролигина у префронталном кортексу и хипокампусу мозга пацова

Експресија синаптичких маркера неурегулина 1 и неуролигина је процењивана методом Western blot-a. Добијени резултати указују на повећану експресију неурегулина 1 у префронталном кортексу и хипокампусу матернално депривираних животиња у односу на контролну групу (графикон 20). Експресија неуролигина је у префронталном кортексу смањена док је у хипокампусу утврђено њено повећање (графикон 21).



Графикон 20. Експресија неурегулина у префронталном кортексу и хипокампусу животиња подвргнутих матерналној депривацији. Анализом Western blot-a се уочава повећање експресије неурегулина у кортексу и хипокампусу матернално депривираних животиња у поређењу са контролном групом. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

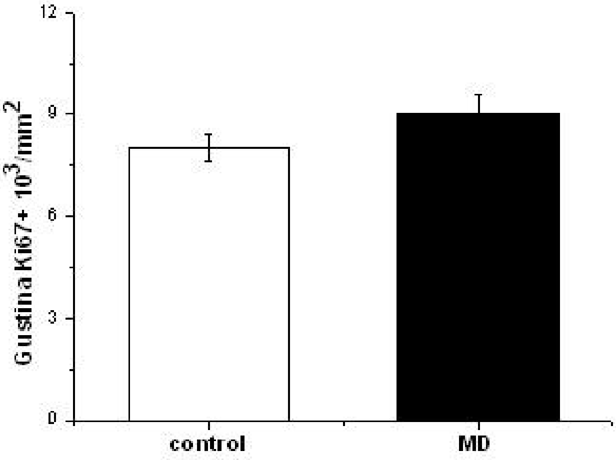
*$p<0.05$ у поређењу са контролном групом



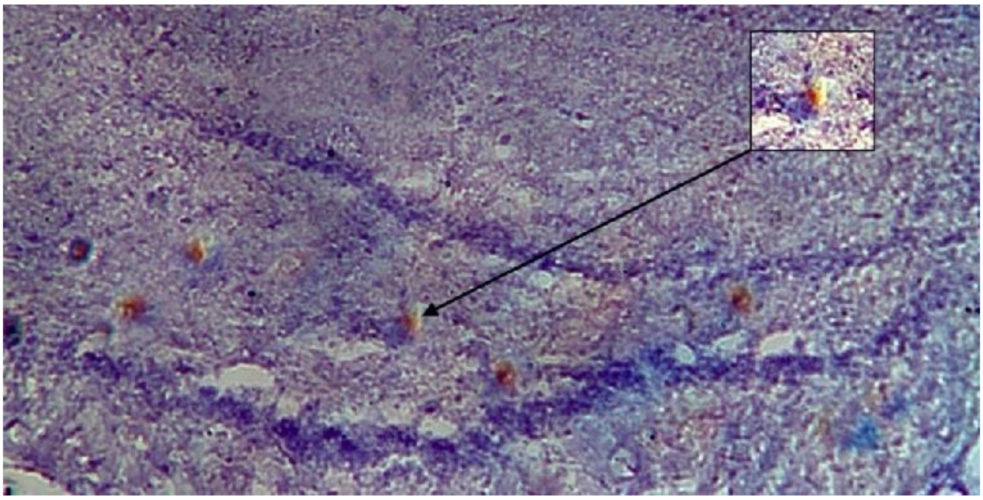
Графикон 21. Експресија неуролигина у префронталном кортексу и хипокампусу животиња подвргнутих матерналној депривацији. Анализом Western blot-а се уочава смањење експресије неуролигина у кортексу док је експресија била повећана у хипокампусу матернално депривираних животиња у поређењу са контролном групом. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.

17. Дуготрајни утицај матерналне депривације на број ki 67 позитивних ћелија у *gyrus dentatus*-у мозга пацова

За процену адултне неурогенезе одређивали смо број ki67+ ћелија (маркер ћелија у пролиферацији) у хилусу *gyrus dentatus*-а (GD), који представља поред субвентрикуларне зоне једину зону адултне неурогенезе. Статистичком анализом коришћењем Т теста за два независна узорка показано је да нема статистички значајних промена код животиња излаганих матерналној депривацији у поређењу са контролном групом ($p>0.05$) (графикон 22).



Графикон 22 . Број ki 67+ ћелија у хилусу GD хипокампуса. Резултати су приказани као средња вредност ±S.E.M.
*p>0.05 у поређењу са контролном групом



Слика 19. Репрезентативни пример ki 67+ неурона у хилусу GD хипокампуса (обележене стрелицом).

ДИСКУСИЈА

Стресни животни догађаји имају кључну улогу у етиопатогенези психијатријских обољења као што су схизофренија, хронична анксиозност и депресија (Muscatell i sar., 2009). Стрес је неизбежан део људског постојања. Екстремни облици акутног и хроничног стреса представљају факторе ризика за психијатријска оболења (Roberts, 1994). Мајка може бити кључни узрок стреса у животу са трајним последицама на развој мозга (Francis i Meaney, 1999). Ово је веома честа појава међу животињама, где абнормално понашање мајки развија хронични стресно окружење које се манифестује дугорочним поремећајима афективног понашања касније током живота јединки (Joëls i Baram, 2009). Анимални модел матерналне депривације је корисна парадигма која изазива повећану осетљивост акутног стреса у раном добу, који је повезан са неколико дугорочних епигенетских и неуронских промена (Zhang i sar., 2010). Схизофренија је тешко психијатријско обољење у чију је патогенезу укључено више фактора. Код пацијената оболелих од схизофреније утврђен је поремећај неколико неуротрансмитерских система и функционалних мрежа. Матернална депривација представља један од актуелних анималних модела схизофреније. У овој студији смо испитивали морфолошке и биохемијске промене у мозгу пацова након раног одвајања младунаца од мајке. Испитиване су последице стреса на телесну тежину пацова, волумен хипокампуса, кортикалну дебљину, густину ћелија, одговор микроглије, олигодендроглије и астроглије у неокортексу и алокортексу мозга пацова који су били изложени матерналној депривацији.

Иако постоји тенденција да се телесна тежина смањује након претрпљеног стреса, резултати нашег истраживања су показали да није било значајне разлике у телесној тежини PN9 и PN10 међу животињама које су подвргнуте матерналној депривацији. Када је у питању телесна тежина, наша искуства показују да на овај параметар знатно утиче број животиња у леглу, где са порастом броја животиња долази до веће редукције телесне масе.

Испитивање хипокампуса је од посебног значаја у схизофренији, где су промене у волумену хипокампуса један од најконзистентнијих налаза у схизофренији (Bilder i sar., 1995). Смањење волумена хипокампуса повезано је и са клиничким знацима схизофреније посебно оштећењима радне и вербалне меморије. Новија *neuroimaging* истраживања хипокампуса магнетном резонанцом код људи су показала да постоји значајно смањење ове структуре код пацијената са схизофренијом, али не и код пацијената са биполарним поремећајем (Radonić i sar., 2011). Овакав резултат потврђује претпоставку да смањење хипокампуса, може представљати неуробиолошку подлогу клиничких симптома схизофреније и схизоафективног поремаћаја. Наша истраживања су показала да рани стрес доводи до укупног смањења волумена хипокампуса. Подаци добијени неуровизуелизацијом о волумену хипокампуса код пацијената са схизофренијом су релативно конзистентни, показујући просечно смањење хипокампалног волумена од приближно 4% (Fritzen i sar., 2007). Мета анализе пацијената са првом епизодом схизофреније су показале билатералну атрофију хипокампуса у 8% случајева, на основу чега је претпостављено да дефицит у волумену није дуготрајна неуроадаптивна последица обољења или терапије, већ лежи у основи самог обољења (Steen i sar., 2006). Још једна мета анализа је показала да код више од 50% испитивања постоји смањење волумена унутрашњег слепоочног режња и хипокампуса (Knöchel i sar., 2014). Интересантно је да у студијама неуровизуелизације је показана корелација дефицита хипокампалног волумена и степена когнитивне дисфункције, поготову памћења (Antonova i sar., 2004). Прве *post mortem* студије пацијената оболелих од схизофреније привукле су доста пажње налазима губитка броја и смањењем величине тела неурона као и неуређеношћу хипокампалних неурона. Стереолошка испитивања су поготову довела у питање смањење укупног броја хипокампалних неурона. У нашем истраживању је стереолошки одређиван волумен *str.pyramudale* CA1 и CA3 хипокампуса и *str.granulare gyrus dentatus*-a, при чему је показано статистички значајно смањење волумена у овим деловима алокортекса у односу на контролну групу. Такође, стрес у раном периоду живота (који смо ми испитивали) доводи до дугорочног смањења величине тела пирамидалних неурона у хипокампусу и грануларних ћелија у *gyrus dentatus*-у код експерименталне групе животиња у односу на контролну групу.

Применом напредних техника неуровизуелизације код схизофрених пацијената је показано смањење волумена кортекса и проширење латералних комора. Кортикална редукција је најчешће евидентирана у медијалном делу темпоралног режња (Bansal i sar., 2013). *Post mortem* студије су показале одсуство глиозе и пролиферацију глијалних ћелија што се виђа у свим дегенеративним можданим болестима које настају постнатално. Ово указује да се лезија можданог ткива вероватно догађа пре него што глија достигне функционалну зрелост да одреагује на оштећење, а то се дешава у трећем тромесечју ембрионалног развоја. Неуроразвојни процеси су вероватно прошли кроз фазу праћену елиминацијом неурона, њиховом модификацијом и синаптичким оштећењем. Значајан увид за настанак схизофреније представљају промене у цитоархитектури можданог ткива. Запажене су аномалије у оријентацији неурона и ламинарној организацији у хипокампусу, енториналној кори и дорзолатералном префронталном кортексу (Akbarian i sar., 1993). Ово се објашњава поремећајем миграције неурона, при чему неурони који би требало да се позиционирају у површним кортикалним слојевима заостају у дубљим деловима коре. Након рођења наставља се развој мозга синаптогенезом и мијелинизацијом. Урађене су студије мијелинизације можданих регија за које је утврђено да показују морфолошке промене код схизофреније (Mighdoll i sar., 2015). Истраживани су префронтални кортекс, цингулатни кортекс, парахипокампална кора, субикулум и хипокампус. Потврђено је да се мијелинизација примарне моторне и сензорне коре завршава око шесте године, а да су асоцијативне кортикалне зоне веома слабо мијелинизоване пре друге деценије живота (Kemper i sar., 1971). Најинтензивнији процес мијелинизације у периоду адолесценције запажен је у субикулуму. Примећено је да активност мезокортикалног допаминергичког система модулира субкортикалну, мезолимбичку допаминергичку активност (Deutch, 1992). Мерења кортикалне цитоархитектонике усмерена су на лимбичке структуре, јер се сматра да промене у њима корелирају са психотичношћу. Поред тога испитивања неуроналних параметара обухватила су мерење броја, величине, облика, положаја и груписања неурона, као и студије синапси дендрита и аксона, које су проучаване применом имунолошких и молекуларних маркера (Petronijević i sar., 2003). Наша истраживања показују значајну редукцију у дебљини неокортекса, док је густина самих неурона смањена у префронталном и ретроспленијалном делу коре код групе излагане матерналној депривацији у односу на контролну групу. Такође, наша истраживања су показала да перинатални стрес изазива дугорочне промене на површину самих нервних ћелија у неокортексу. Међутим, експресија једарног протеина неурона смањена је како у кори тако и у хипокампусу мозга матернално депривираних пацова. Просторне, временске и квантитативне грешке у стимулусима који иницирају апоптозу, могу резултирати променом броја неурона и патолошким развојем нервног система.

Клиничка и *post mortem* истраживања етиологије и патогенезе схизофреније указују на промене у развоју неурона и синаптогенезе у различитим регионима у схизофренији (Eastwood i Harrison, 2000). Кад клиничко испољавање схизофреније постане манифестно неурогенеза и развој су скоро комплетно завршени. Међутим, грануларни неурони GD хипокампуса се стварају током целог живота чиме пружају могућност испитивања ћелијских и молекуларних процеса неурогенезе и развоја у постнаталном периоду, чак и код одраслих (Keilhoff i sar., 2004). Имајући у виду неконзистентне налазе укупног броја ћелија у хипокампусу уз присутно смањење волумена, непосредно по откривању адултне неурогенезе код сисара, наметнуло се питање о евентуалном поремећају овог процеса код оболелих од схизофреније. У нашем истраживању испитиван је дуготрајни утицај матерналне депривације на број ki67+ ћелија. Ki67 представља маркер ћелија у пролиферацији и поред BrdU представља један од најчешће коришћених индикатора ћелија у деоби. Неурогенезу смо процењивали у субгрануларној зони (SGZ) хипокампуса. Дуготрајни утицај матерналне депривације на број ki67+ ћелија се није разликовао у поређењу са контролном групом. Ранија истраживања су показала да употреба клозапина али не и халоперидола, спречава смањење броја BrdU обележених ћелија, али понављано давање антипсихотика не утиче на неурогенезу (Maeda i sar., 2007). Ово доводи до закључка да стрес у раном периоду живота нема значајнијег утицаја на неурогенезу.

У последње време се придаје значај утицају неуроинфламације и имуногенетике у схизофренији, што показују и повећане концентрације интерлеукина код схизофрених пацијената, а имуномодулаторски лекови показују повољне ефекте на схизофрене симптоме (Monji i sar., 2009). *Post mortem* истраживања показују активацију микроглије и повећану густину микроглије код пацијената који су боловали од схизофреније (Steiner i sar., 2008). Проучавањем активације микроглије *in vivo*, показано је повећање активности микроглије у сивој маси пацијената са схизофренијом, што се подудара и са налазом код пацијената са неуродегенеративном деменцијом. Позитронска емисиона томографија показује повећану активацију микроглије у мозгу код особа са почетним симптомима схизофреније (Monji i sar., 2009). Међутим, ова запажања у људском мозгу су слабо схваћена, јер се не зна и даље да ли је активација микроглије медијатор у настанку болести под одређеним условима или је то реакција микроглије на одређене неуронске дисфункције. Другачије речено, питање је да ли активација микроглије има значајну улогу у развојним процесима, који доводе до аутизма и схизофреније или је њена повећана активност нуспојава већ постојећег патолошког процеса? Почетна истраживања на ову тему отпочела су пре десетак година где је *in vivo imaging* студија покренула хипотезу о великој активности микроглије у кортексу код здравих одраслих пацова (Davalos i sar., 2005; Nimmerjahn i sar., 2005). На основу овога уочавамо да о утицају стреса на микроглију није пуно познато. Потврђена повећана активност микроглије на *post mortem* студијама код особа са схизофренијом указују на потребу развоја, до данас малобројних, анималних модела који би се бавили овом проблематиком. У овој студији Western blot методом анализирана је експресија Iba1 (*ionized calcium bundung adaptor molecule 1*) протеина у префронталном кортексу и хипокампусу матернално депривираних животиња. Iba1 протеин је мали протеин који се специфично експримира у микроглији и чија се експресија повећава при активацији микроглије (Ito i sar., 1998). Резултати наше анализе показују повећану експресију Iba1 протеина, што показује повећану активност микроглије у алокортексу матернално депривираних животиња. Неопходна су даља истраживања на анималним моделима која би расветлила утицај раног стреса на ћелије микроглије.

Постоји низ маркера као што су глијални фибриларни кисели протеин (GFAP) и атхезиони молекул неурона (*neural cell adhesuon molecules NCAM*), који указују да мождана оштећења утичу на когнитивне функције. Познато је да ови маркери учествују у синаптогенези и синаптичкој пластичности неурона, а посебно су у синаптичким променама које су од значаја за формирање меморије (Tzeng i sar., 2001). GFAP је протеин глијалних ћелија укључен у диференцијацији, сазревању и активности астроцита (Cerutti i sar., 2000). Као одговор на повреду мозга или шлог може доћи до реактивне хипертрофије астроцита, а сам процес је познат као астроглиоза (Herrmann i sar., 2000). Повећана активност GFAP-а се уочава као одговор на оштећење нервних ћелија (Schäfer i sar., 1996). Новија истраживања показују да астроцити активно учествују у синаптичком преносу, пластичности и неурозаштити (Romero i sar., 2014). Већина студија о утицају социјалне изолације на пластичност астроцита рађена је на пацовима и показује пораст глиогенезе и промене у глијалној морфологији и експресији антигена (Viola i sar., 2009; Williamson i sar., 2012). Дуготрајни утицај социјалне изолације смањује број и величину астроцита у хипокампусу (Bizon i sar., 2009), док промене у морфологији астроцита у неокортексу показују супротно (Briones i sar., 2006). С друге стране промене на астроцитима и њихова улога код когнитивних оштећења је недовољно истражена. Сматра се да социјална изолација животиња на половини животног века може имати значајну улогу на когнитивне функције. Истраживањима која смо ми радили Western blot методом анализирана је експресија GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) протеина у префронталном кортексу и хипокампусу матернално депривираних пацова. С обзиром да се повећава активност GFAP-а код оштећења самих нервних ћелија у нашим резултатима постоји значајно смањена експресија овог протеина у хипокампусу док у кортексу нису постојале промене. С обзиром да социјална изолација повећава број и морфолошку сложеност астроцита у хипокампусу можемо закључити да рани стрес попут матерналне депривације изазива смањење активности астроглије.

Олигодендроцити су значајни у одржавању интегритета нервног ткива мијелином. Они омогућавају брзу проводљивост и функционалну повезаност удаљених структура мозга и имају кључно место у снабдевању аксона енергијом (Bernstein i sar., 2009; Schmitt i sar., 2009). Губитак олигодендроцита и дисфункција метаболичке активности идентификовани су код схизофреније (Bernstein i sar., 2015). Поред тога, утврђено је смањење мијелина у таламусу пацијената оболелих од схизофреније који су третирани типичним антипсихотиком као што је халоперидол (Schmitt i sar., 2009). Повишене концентрације глукозе су детектоване код пациената оболелих од схизофреније који су тек почели са антипсихотичном терапијом (Holmes i sar., 2006). Интересантно је да је краткорочни третман са атипичним антипсихотицима (клозапин) резултирао нормализацијом метаболита код око 50% пацијената, док типични антипсихотици нису показали овакав ефекат (Holmes i sar., 2006). *Post mortem* истраживања префронталног кортекса (PFCX) и *nc.caudatus*-а су показала абнормалности мијелина код пацијената који су оболели од схизофреније (Davis i sar., 2003). Почетак психотичних поремећаја у касној адолесценцији и раној зрелости поклапа се са завршеном мијелинизацијом префронталног кортекса (Tamnes i sar., 2010). Поред тога, утврђен је и функционални дефицит радне меморије који може да настане као последица лоше проводљивости између можданих структура код схизофреније (Pantelis i sar., 1997). Студије неуровизуелизације подржавају ову тврдњу и показују абнормалности беле масе код схизофреније (Lagopoulos i sar., 2013). Ови докази су у складу са хипотезом да промене у мијелинским структурама могу бити у корелацији са схизофренијом. *Post mortem* и *neuroimaging* истраживања показују да постоји смањење слуха и ултраструктурне промене у белој маси префронталног кортекса (Jungerius i sar., 2008). На основу *post mortem* и генетских истраживања мијелина и олигодендроцита утврђено је да су морфолошке промене у белој маси кортекса патолошки супстрат развоја схизофреније (Uranova i sar., 2004). Број олигодендроцита је значајно смањен у кортикалној области 9, 24 (Hof i sar., 2003) и предњим једрима таламуса (Takahashi i sar., 2011). Код схизофреније *post mortem* истраживања су показала да је смањење олигодендроцита и мијелина у кортексу значајније него у субкортикалним деловима беле масе (Bartzokis, 2011). Новија истраживања субкортикалних делова беле масе показују да промене олигодендроцита нису запажене на почетку болести, али како болест напредује промене постају све израженије (Bartzokis, 2011). Смањење мијелина може довести до функционалне деградације синапси што доводи до когнитивних промена, као и промена у понашању који су део клиничких манифестација схизофреније (Bartzokis, 2011). У прилог свему изнетом није утврђена тачна корелација између дисфункције беле масе и схизофреније (Melonakos i sar., 2011). У овој студији Western blot методом анализирана је експресија MOG (*Mielin oligodendrocite Glicoprotein*) протеина у префронталном кортексу и хипокампусу матернално депривираних животиња. MOG је гликопротеин који има значајну улогу у мијелинизацији у централном нервном систему. Код људи је кодиран MOG геном и претпоставља се да служи као атхезиони молекул који обезбеђује структурни интегритет мијелинског омотача и обезбеђује развој олигодендроцита. Резултати наше анализе показују смањену експресију MOG протеина, што потврђује досадашња бројна истраживања која корелирају између промена мијелина и схизофреније. Неопходна су даља истраживања која би расветлила утицај раног стреса на олигодендроците.

Иако су узроци схизофреније непознати истраживања указују на то да схизофренија има значајну генетску компоненту (Ming i sar., 2000). Хаплотип анализа идентификује неурегулин 1 (*Nrg1*), као ген одговоран за настанак схизофреније. Неурегулин 1 је опште прихваћен ген за схизофренију, који има значајну улогу у можданом сазревању, ћелијској пролиферацији, мијелинизацији и синаптичкој пластичности (Law i sar., 2006). Занимљиво је да схизофрени пацијенти показују измењену експресију на ErbB фамилији рецептора за Nrg1 и NMDA (Alaerts i sar., 2009; Hatzimanolis, 2013). Показано је да неуроразвојни утицаји стреса доводе до генетских варијација у неурегулину 1 као одговора на стрес (Taylor, 2010). Међутим, механизам којим Nrg1 хаплотип доприноси патофизиологији схизофреније остаје непознат (Schmitt, A i sar., 2008).

Интеракције генетских фактора и стресова животне средине у раним фазама живота представљају важан узрок у настанку схизофреније (Cirulli i sar., 2009; Nestler i Hyman, 2010). Међу бројним генима који су испитивани највише пажње је привукао Nrg1 као ризик за настанак схизофреније (Gong i sar., 2009). Неколико истраживања показује повезаност између Nrg1 и поремећених неуроинфламаторних процеса код схизофреније (Deng i sar., 2015; Chohan i sar., 2014). Ова интеракција Nrg1 и интерлеукина је повезана са повећаним ризиком за настанак схизофреније (Hänninen i sar., 2008). Такође, генске мутације трансмембранских делова Nrg1 повећавају активацију проинфламаторних цитокина код болесника са схизофренијом (Marballi i sar., 2010). Изузетан податак је да неонатална изложеност вирусу инфлуенце корелира са смањеном експресијом Nrg1 у медијалном префронталном кортексу одраслих мишева (Asp i sar., 2009). Недавно је показано да генске варијације Nrg1 изазивају повећану рањивост на неуробихејвиоралне ефекте стреса што доводи до модификације неурона и сигналних путева као одговора на стрес (King i sar., 2010). Изузетан пример је да пацови хетерозиготи са тип II Nrg1 мењају експресију глукокортикоидних рецептора у хипофизи, хипокампусу и паравентрикуларном једру хипоталамуса (Taylor i sar., 2011). Генетско брисање Nrg1 повећава ефекте стреса у адолесцентном периоду и изазива поремећаје радне меморије као и модулације упалних цитокина у префронталном кортексу и хипокампусу (Desbonnet i sar., 2012). Пирамидални неурони у префронталном кортексу код Nrg1 мутираних пацова који су изложени стресу у адолесценцији имају краће дендритске наставке, а повећану густину дендритских спина. Овим се претпоставља да стрес заједно са поремећајем Nrg1- ErbB4 сигнализације у периоду адолесценције изазива промене на NMDA рецепторима у мозгу пацова (Chohan i sar., 2014). У *gyrus dentatus*-u хипокампуса Nrg1 мутираних пацова стрес значајно повећава везивање за NMDA рецепторе (Chohan i sar., 2014). Постоји све више доказа који показују да рани стрес током живота код пацова изазива дуготрајне промене у понашању који подсећају на психичке поремећаје (Holloway i sar., 2013). Претходна истраживања доводе у везу Nrg1 са биполарним поремећајем и маничном психозом (Thomson i sar., 2007). У складу са тим утврђена су три типа Nrg1 која дају већи ризик за биполарни поремећај него за схизофренију (Green, 2006). Ова корелација између Nrg1 и схизофреније указује на значајност генетике у настанку овог обољења. Међутим, алелска хетерогеност отежава апсолутну сигурност и дефиницију Nrg1 као недвосмисленог фактора у настанку схизофреније (Crisafulli i sar., 2012). Најновија морфометријска истраживања показују да Nrg1 има значајну улогу на фенотипско испољавање структура у мозгу (Thirunavukkarasu i sar., 2014). Иако је веза између Nrg1 и схизофреније показана, до сада није проучавана експресија неурегулина у матерналној депривацији као анималном моделу схизофреније. Nrg1 +/- мутант показује хиперактивност и умерене дефиците у препулсној инхибицији код акустичног надражаја који представља модел сензомоторног спровођења, као и суптилне промене изражене код понашања налик анксиозношћу и промене у социјалном понашању (Karl i sar., 2007). У одраслом добу Nrg1 промовише развој GABA-ергичке инервације пирамидалних неурона *in vivo* (Fazzari i sar., 2010). Наши резултати показују повишен ниво експресије неурегулина у хипокампусу и префронталном кортексу као дугорочни ефекат стреса изазван матерналном депривацијом. Такође, новија истраживања показују повећану експресију Nrg1 код перинаталне примене фенциклидина као анималног модела (Radonjić i sar., 2013). Варијације у DNK секвенци могу да доведу до измењене генске експресије или измењене секвенце аминокиселина у протеинима чиме доприносе механизму настанка обољења. Схизофренија представља комплексно полигенско обољење, где сваки ген кандидат доприноси повећању осетљивости малим својим доприносом.

Правилна функција мозга се заснива на равнотежи између ексцитације и инхибиције које су углавном посредоване помоћу два неуротрансмитера глутамата и GABA-е. Укупан број синапси и однос ексцитаторних и инхибиторних синаптичких улаза одређују ексцитабилност неурона (Schummers i sar., 2001). Молекули који су укључени у контролу равнотеже између ексцитаторних и инхибиторних синапси су веома важни за правилну ексцитабилност неурона. Претходна истраживања показују да неуролигини учествују у контроли и формирању равнотеже између ексцитаторних и инхибиторних синапси (Levinson i El-Husseini, 2005). *In vitro* истраживања показују да потискивање неких изоформи неуролигина у култури неурона хипокампуса пацова доводи до губитка ексцитаторних и инхибиторних синапси, док електрофизиолошке студије показују доминантно смањење инхибиторне синаптичке функције неурона (Chih и сар., 2005). Највеће промене инхибиторне синаптичке трансмисије су примећене у електрофизиолошкој студији неуролигин нокаут мишева (Varoqueaux и сар., 2006). Ови подаци указују да је правилна експресија неуролигин протеина важан фактор у контроли ексцитаторне и инхибиторне равнотеже у мозгу, док смањење нивоа неуролигина углавном утиче на инхибиторни процес. Са друге стране истраживања на трансгеним мишевима показују да прекомерна експресија неуролигина 1 повећава сазревање ексцитаторних синапси (Dahlhaus и сар., 2010), док прекомерна експресија неуролигина 2 доводи до значајнијег повећања инхибиторних синапси у кортикалној области (Hines i sar., 2008). Ово показује да су одређене изоформе неуролигина специфичне за одређени тип синапси и да се могу функционално смењивати. Разлике у синаптичкој локализацији различитих неуролигина показују да су они укључени у одржавању ексцитаторно/инхибиторне равнотеже. Ранија истраживања показују да неуролигини делују на ексцитаторно/инхибиторни развој синапсе кроз транссинаптичку интеракцију са неурексинима (Levinson i sar., 2005).

Ћелијски атхезиони молекули су укључени у механизам настанка неких неуропсихијатријских поремећаја (Wędzony i sar., 2013). За неколико неуроразвојних поремећаја као што су аутизам, ментална ретардација, схизофренија сматра се да настају сменама ексцитаторних и инхибиторних биланса (Südhof, 2008). Фактори укључени у регулисању ексцитаторних и инхибиторних синаптичких биланса могу да имају важну улогу у развоју болести, али могу бити и потенцијалне мете за нове терапеутске стратегије. Схизофренија је неуроразвојни поремећај са когнитивним инвалидитетом (Lewis i González-Burgos, 2008). Почетак схизофреније обично се сматра да настаје у касној адолесценцији или раној зрелости, док се симптоми сматрају као резултат раних развојних поремећаја током живота. Генетско епидемиолошка истраживања показују да је схизофренија комплексно обољење са мутацијом гена за неуролигин 2 и 4 (Sun i sar., 2011). Проучавање неуролигина на анималном моделу схизофреније показује смањење овог протеина у префронталном кортексу код адолесцентних али не и одраслих пацова (Maćkowiak i sar., 2011). Наши резултати показују смањен ниво експресије неуролигина у префронталном кортексу, док је експресија у хипокампусу била повишена што је настало као последица дугорочног утицаја стреса изазваног матерналном депривацијом. Резултат нашег истраживања говори у прилог да је код матерналне депривације нарушена равнотежа између ексцитације и инхибиције неурона. Ови докази указују да промене у нивоу неуролигина изазване генски или факторима средине доводе, највероватније у периоду адолесценције до сметњи у развоју синапси, али и дефициту GABA-ергичких преноса што је примећено код одраслих болесника са схизофренијом (Lewis i González-Burgos, 2008). Способност неуролигина да контролише баланс између ексцитаторних и инхибиторних синапси је занимљива мета у потрази патофизиологије неуропсихијатријских поремећаја. Досадашње функционалне студије на пацовима су показале значајну умешаност неуролигина како у процесима радне меморије тако и у социјалном и емоционалном понашању (Tsetsenis i sar., 2014). Генетска анализа људи може показати да промене на неуролигину могу довести до неких неуроразвојних поремећаја који су укључени у механизам настанка психичких поремећаја попут аутизма и схизофреније.

Кортекс и хипокампус садрже мултипле субпопулације кортикалних GABA неурона. Ранија истраживања су утврдила смањење GABA-ергичких интернеурона у хипокампусу и фронталном делу коре код пацијената са схизофренијом (Benes i Berretta, 2001). GABA-ергички неурони експримирају и рилин који се по отпуштању везује за постсинаптичке рецепторе који су смештени у дендритима, телу неурона или на почетном делу аксона пирамидалних неурона. Постоји нисходна регулација декарбоксилазе глутаминске киселине (GAD67) и рилина у схизофренији. Поред тога код пацијната са схизофренијом уочена је редукција дендритских бодљи у префронталном кортексу. *Post mortem* студије су показале селективно смањење експресије парвалбуминергичких интернеурона у префронталном кортексу и још израженије смањење у хипокампусу код пацијената са схизофренијом (Beasley i sar., 2002).

Већина инхибиторних интернеурона експримира најмање један од калцијум везујућих протеина (парвалбумин-PV, калбиндин-CB, калретинин-CR), који су одлични маркери за различите субпопулације GABA-ергичких интернеурона (DeFelipe, 1997). Ове субпопулације GABA-ергичких интернеурона су различито усмерене на дисталним деловима дендрита (регулишу синаптичку активност и интеграцију) или на почетном сегменту тела и аксона (врше контролу инхибиције излаза код пирамидалних неурона) (Matrisciano i sar., 2013). У погледу ексцитаторних синаптичких мрежа код пацова је показано да излагање перинаталном стресу (Radley i sar., 2006) и одређеним антипсихотицима (Selemon i sar., 2013; Radonjić i sar., 2013) доводи до промена у дендритској сложености и синаптичкој густини пирамидалних неурона у префронталном кортексу, хипокампусу и амигдалоидном комплексу (Konradi i sar., 2011). Моноаминергички и пептидергички модулаторни системи у кортиколимбичким круговима су драматично реорганизовани као одговор на претходно изазвани стрес (Becker i sar., 2007). Главни циљеви моноаминергичких путева су GABA-ергички интернеурони у префронталном кортексу, амигдали и хипокампалној формацији (Grace i sar., 2002). Постоји више популација неурона у локалним круговима са различитим функцијама и специфичним међусобним везама које могу бити неурохемијске, физиолошке или морфолошке (Woodruff i Sah, 2007). Различите GABA-ергичке субпопулације интернеурона (парвалбумин, калбиндин) испољавају своју инхибиторну функцију на нивоу тела, аксона или дендрита неурона у неокортексу, хипокампусу и амигдали (Szabadits i sar., 2007). Такође, сазревање и састав различитих инхибиторних субпопулација интернеурона у лимбичким деловима је значајно модификован, јер је узрокован одговором на рани стрес проузрокован одвајањем од мајке (Zhang i sar., 2002). Код раног излагања стресу хипокампус и амигдала су показали адекватан одговор на нивоу GABA-ергичких субпопулација интернеурона (парвалбумин, калбиндин, калретинин), док хипоталамус није укључен у последице стреса (Zhang i sar., 2002). Повећана апоптоза и смањена неурогенеза је пронађена у *gyrus dentatus*-u код пацова изложених 24h одвајању од мајке (Zhang i sar., 2002). Све ово указује да су промене у синтези протеина код животиња под стресом у корелацији са активношћу ових инхибиторних интернеурона. Ова претпоставка је потврђена у студијама које су показале да је синтеза парвалбумина и калбиндина зависна и регулисана интрацелуларном активношћу (Zhang i sar., 2002).

Кортикални лимбички региони, а посебно префронтални кортекс суштински највише реагују на стрес, јер су укључени у контролу емоција, учењу, и формирању памћења (Radley i sar., 2006). Стресом изазване промене ексцитаторних и инхибиторних синаптичких веза унутар медијаног префронталног кортекса највероватније стварају неуронске адаптивне механизме што утврђује емотивну и когнитивну надлежност (Radley i sar., 2006). Давна хипотеза је била да стресом индуковани број имунореактивних ћелија за различите калцијум везујуће протеине не одражава праве промене у броју неурона већ су те промене резултат различитих нивоа експресије датог протеина што највероватније корелира са неуронском активношћу (Heizmann i sar.,1993). Међутим, новија истраживања показују да између пубертета и зрелог доба код пацова постоји смањење густине парвалбумин, калбиндин и калретинин интернеурона у медијалном префронталном кортексу, док њихова општа расподела остаје непромењена (Seidel i sar., 2009). У префронталном кортексу пацова старих између 40 и 60 дана нађена је смањена експресија калбиндина и калретинина (Papazafiri i sar., 1995). Ранија истраживања су показала да рани модел стреса у току прве три недеље живота пацова доводи до смањене густине/активности субпопулација интернеурона у медијалном префронталном кортексу за које је познато да контролишу и регулишу улазну и излазну активност пирамидалних ћелија (Seidel i sar., 2009).

У овој студији проучавани су дуготрајни ефекти матерналне деприваније на густину парвалбумин, калбиндин, калретинин и рилин позитивних интернеурона у кортексу и хипокампусу пацова. Показали смо смањење броја парвалбумин позитивних субпопулација интернеурона у префронталном кортексу, док у ретроспленијалном и моторном промене нису уочене. Што се тиче хипокампуса резултати приказани у нашим истраживањима су показали значајно смањење густине парвалбумин (CA1 регион), калретинин (CA1 и CA3 регион), рилин (CA1 и CA3 регион) субпопулације интернеурона у наведеним субрегионима хипокампуса. Ови резултати потврђују наше предвиђање да рано стресно искуство омета развој различитих неуронских субпопулација у префронталном кортексу и хипокампусу. Такође, ранија биохемијска истраживања указују на смањену активност инхибиторних интернеурона калбиндина и калретинина на нивоу хипокампуса код матернално одвојених пацова (Lephart i Watson, 1999). Раније студије показују смањену густину парвалбумин позитивних интернеурона у свим деловима хипокампуса (Zhang i Reynolds, 2002). Сличан налаз показују и нове студије у смањеном укупном броју парвалбумин и соматостатин позитивних интернеурона *in vivo* (Konradi i sar., 2011). Недавна студија је показала да трочасовно раздвајање од мајке током прве две недеље живота утиче на смањење густине калретинин, калбиндин и парвалбумин интернеурона у хипокампусу и амигдали што је у корелацији са нашим резултатима (Giachino i sar., 2007). *Post mortem* истраживања потврђују мању густину непирамидалних неурона у хипокампусу код схизофреније и биполарног поремећаја (Benes, 1998). Док се пад у специфичним интернеуронским популацијама посматраних у *post mortem* студијама поклапа са хипокампалном хиперактивношћу утврђеном неуровизуелизацијом, на животињским моделима се може додатно испитати повезаност између интернеурона и хиперактивности хипокампуса. Истраживања на животињама доводе у корелацију смањење парвалбумин позитивних интернеурона у хипокампусу што може да корелира са променама које узрокују настанак схизофреније. Инхибиција NMDA рецептора у хипокампусу (посебно у CA1) смањује активност парвалбумин позитивних интернеурона, што за узврат доводи до дезинхибиције пирамидалних ћелија (Bickel i Javitt, 2009). Новије студије су испитивале хипотезу да је хипокампална хиперреактивност изазвана променама глутаматергичке и GABA-ергичке неуротрансмисије, где се обично блокирају NMDA рецептори на GABA интернеуронима, што изазива дезинхибицију глутаматних неурона који ослобађају глутамат и повећавају активност неурона (Seidel i sar., 2009). Функционална MRI испитивања су показала да модулација парвалбумин позитивних интернеурона доводи до *in vivo* повећане активности пројекционих неурона и *in vivo* повећане метаболичке активности (Gilani i sar., 2014). Ове студије постављају питање када се хиперреактивност хипокампуса развија у психозу?

Све више доказа, укључујући *post mortem*, генетске и *neuroimaging* студије доводе схизофренију у корелацију са променама у GABA-ергичкој трансмисији (Lewis i sar., 2012). Смањење кортикалних GABA-ергичких интернеурона укључујући парвалбумин, соматостатин и рилин у мозгу код пацијената оболелих од схизофреније потврђује све претходне налазе (Gong i sar., 2009). Примена фенциклидина, посредована NMDA блокадом у перинаталном периоду доводи до смањења густине главних субпопулација интернеурона у неокортексу и хипокампусу пацова (Radonjić i sar., 2013). Коришћење антагониста NMDA рецептора током неуроразвоја подстиче велику апоптотичку неуродегенерацију (Ikonomidou i sar., 1999). Све је више доказа који показују да употреба NMDA антагониста током развоја може изазвати дугорочни губитак парвалбумин позитивних интернеурона због њиховог сазревања које почиње на крају прве недеље постнаталног живота пацова (du Bois i sar., 2009).

Такође, код пацијената са схизофренијом је потврђено смањење нивоа декарбоксилазе глутаминске киселине (GAD), који представља маркер специфичан за GABA синтезу неурона (Heckers i Konradi, 2002). Интернеурони иако су малобројни имају значајну улогу у функцији хипокампуса, јер врше динамичко просторно-временску контролу неурона у хипокампусу и имају кључни значај у понашању (Somogyi i Klausberger, 2005). Парвалбумин интернеурони генеришу гама осцилације које су кључне за функционисање мозга (Bartos i sar., 2007). Ове неуронске осцилације су од суштинског значаја за успостављање везе између неурона и GABA-ергичких интернеурона што је предложено као анатомски корелат за промену нервних осцилација код схизофреније (Uhlhaas i Singer, 2010).

ЗАКЉУЧЦИ

У складу са постављеним циљевима овог истраживања, а на основу добијених резултата могу се извести следећи закључци.

1. Стрес проузрокован раним одвајањем младунаца од мајке доводи до укупног смањења волумена хипокампуса.
2. Дуготрајни утицај матерналне депривације корелира са смањењем волумена пирамидалног слоја хипокампуса и грануларног слоја *gyrus dentatus*-а, као и са смањењем површине пирамидалних и грануларних неурона у овим деловима алокортекса.
3. Рани стрес, као што је матернална депривација, доводи до смањења кортикалне дебљине у префронталном, ретроспленијалном и моторном делу коре.
4. Овај модел стреса доводи до смањене густине NeuN ћелија у префронталном, ретроспленијалном и моторном делу коре, док је површина самих ћелија смањена у префронталном и ретроспленијалном делу коре.
5. Дуготрајни утицај матерналне депривације доводи и до смањене експресије NeuN протеина у префронталном кортексу и хипокампусу.
6. Стрес изазван раним одвајањем од мајке је у корелацији са смањењем GFAP протеина у алокортексу.
7. Стрес проузрокован матерналном депривацијом је у корелацији са смањењем густине парвалбумин позитивних интернеурона у префронталном делу коре и CA1 региону хипокампуса.
8. Дуготрајни утицај матерналне депривације утиче на смањење густине калретинин имунопозитивних интернеурона у CA1 и CA3 субјединицама хипокамуса, док не утиче на промену густине калбиндин позитивних интернеурона у хипокампусу и кортексу.
9. Број рилин имунопозитивних неурона након матерналне депривације је значајно смањен у CA1 и CA3 субјединицама хипокамуса.
10. Дуготрајни утицај матерналне депривације је у корелацији са повећањем експресије Iba1 протеина у хипокампусу.

11. Матернална депривација дуготрајно утиче на смањење експресије MOG протеина у хипокампусу.
12. Стрес попут матерналне депривације доводи до повећања неурегулина 1 у кортексу и хипокампусу мозга пацова.
13. Матернална депривација изазива смањење неуролигина у кортексу, али и повећање истог у хипокампусу мозга пацова.
14. Густина ki67+ ћелија (неурона у пролиферацији) у хилусу *gyrus dentatus*-а хипокампуса није промењена након матерналне депривације.

На основу добијених резултата ових истраживања, може се закључити да утврђене промене које настају у мозгу експерименталних животиња, као последица матерналне депривације, могу допринети сагледавању патогенетских механизама схизофреније, као и развоју нових потенцијалних терапијских стратегија у лечењу ове болести.

ЛИТЕРАТУРА

Akbarian, S., Bunney, W.E., Potkin, S.G., Wigal, S.B., Hagman, J.O., Sandman, C.A., Jones, E.G., 1993. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. Arch Gen Psychiatry. 50(3):169-77.

Alaerts, M., Ceulemans, S., Forero, D., Moens, L.N., De Zutter, S., Heyrman, L., Lenaerts, A.S., Norrback, K.F., De Rijk, P., Nilsson, L.G., Goossens, D., Adolfsson, R., Del-Favero, J., 2009. Support for NRG1 as a susceptibility factor for schizophrenia in a northern Swedish isolated population. Arch Gen Psychiatry. 66(8): 828-37.

Amaral, D.G., 1993. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. Curr Opin Neurobiol., 3(2): 225-9. Review.

Antonova, E., Sharma, T., Morris, R., Kumari, V., 2004. The relationship between brain structure and neurocognition in schizophrenia: a selective review. Schizophr Res. 70(2-3): 117-45.

Asp, L., Beraki, S., Kristensson, K., Ogren, SO., Karlsson, H., 2009. Neonatal infection with neurotropic influenza A virus affects working memory and expression of type III Nrg1 in adult mice. Brain Behav Immun. 23(6):733-41.

Bansal, R., Hao, X., Liu, F., Xu, D., Liu, J., Peterson, B.S., 2013. The effects of changing water content, relaxation times, and tissue contrast on tissue segmentation and measures of cortical anatomy in MR images. Magn Reson Imaging. 31(10):1709-30.

Bartos, M., Vida, I., Jonas, P., 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. Nat Rev Neurosci. 8(1):45-56.

Bartzokis, G., 2011. Neuroglialpharmacology: white matter pathophysiologies and psychiatric treatments. Front Biosci (Landmark Ed). 16: 2695-733.

Beasley, C.L., Zhang, Z.J., Patten, I., Reynolds, G.P., 2002. Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. Biol Psychiatry. 52(7):708-15.

Becker, J.B., Monteggia, L.M., Perrot-Sinal, T.S., Romeo, R.D., Taylor, J.R., Yehuda, R., Bale, TL., 2007. Stress and disease: is being female a predisposing factor? J Neurosci. 27(44): 11851-5.

Benes, F.M., McSparren, J., Bird, E.D., San Giovannni, J.P., Vincent, S.L., 1991. Deficits in small interneurons in prefrontal cortex and anterior cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. Arch Gen Psychiatry 48: 996-1001.

Benes, F.M., 1998. Model generation and testing to probe neural circuitry in the cingulate cortex of postmortem schizophrenic brain. Schizophr Bull. 24(2):219-30.

Benes, F.M., Berretta, S., 2001. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. Neuropsychopharmacology. 25(1):1-27.

Bennett, M., 2009. Positive and negative symptoms in schizophrenia: the NMDA receptor hypofunction hypothesis, neuregulin/ErbB4 and synapse regression. Aust N Z J Psychiatry. 43, 711-21.

Bernstein, H.G., Steiner, J., Bogerts, B., 2009. Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. Expert Rev Neurother. 9(7):1059-71.

Bernstein, H.G., Steiner, J., Guest, P.C., Dobrowolny, H., Bogerts, B., 2015. Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy. Schizophr Res. 161(1): 4-18.

Bickel,S., Javitt, D.C., 2009. Neurophysiological and neurochemical animal models of schizophrenia: focus on glutamate. Behav Brain Res. 204(2):352-62.

Bilder, R.M., Bogerts, B., Ashtari, M., Wu, H., Alvir, J.M., Jody, D., Reiter, G., Bell, L., Lieberman, J.A., 1995. Anterior hippocampal volume reductions predict frontal lobe dysfunction in first episode schizophrenia. Schizophr Res. 17(1): 47-58.

Birchmeier, C., 2009. ErbB receptors and the development of the nervous system. Experimental Cell Research 315, 611-618.

Bizon, J.L., LaSarge, C.L., Montgomery, K.S., McDermott, A.N., Setlow, B., Griffith, W.H., 2009. Spatial reference and working memory across the lifespan of male Fischer 344 rats. Neurobiol Aging. 30(4):646-55.

Bogerts, B., Lieberman, J., Ashtari, M., 2000. Hippocampus-amygdala volumes and psychopatology in chronic schizophrenia. Biol Psych 33:236.

Bottos, A., Destro, E., Rissone, A., Graziano, S., Cordara, G., Assenzio, B., Cera, M.R., Mascia, L., Bussolino, F., Arese, M., 2009. The synaptic proteins neurexins and neuroligins are widely expressed in the vascular system and contribute to its functions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106(49): 20782–7.

Bowlby, J., 1951. Maternal Care and Mental Health. Geneva: World Health Organisation.

Briones, T.L., Woods, J., Wadowska, M., Rogozinska, M., Nguyen, M., 2006. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. Behav Brain Res. 171(1):17-25.

Brodmann, K., Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde, 2.Aufl., Velag JA Barth, Leipzig. 1925., 136.

Cajal, S.R., 1911. Histologie du Systeme Nerveux de l´Homme et des Vertebres. A. Maloine, Paris. English translation by N. Swanson and L.W. Swanson, Histology of the Nervous System, Vol. 2. Oxford University Press, New York, Oxford, 1995.

Cerutti, S.M., Chadi, G., 2000. S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. Cell Biol Int. 24(1):35-49.

Charvet, C.J., Finlay, B.L., 2012. Embracing covariation in brain evolution: Large brains, extended development, and flexible primate social systems. Prog Brain Res. 195: 71–87.

Chen, F., Venugopal, V., Murray, B., Rudenko, G., 2011. The structure of neurexin 1α reveals features promoting a role as synaptic organizer. Structure 19(6): 779–89.

Chih, B., Engelman, H., Scheiffele, P., 2005. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. Science. 307(5713): 1324-8.

Chohan, T.W., Nguyen, A., Todd, S.M., Bennett, M.R., Callaghan, P., Arnold, J.C., 2014. Partial genetic deletion of neuregulin 1 and adolescent stress interact to alter NMDA receptor binding in the medial prefrontal cortex. Front Behav Neurosci. 8, 298.

Cirulli,F., Francia, N., Berry, A., Aloe, L., Alleva, E., Suomi, S.J., 2009. Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. Neurosci Biobehav Rev. 33(4): 573-85.

Conrad, A., Abebe, T., Austin, R., 1991. Hippocampal pyramidal cell disarray in schizophrenia as a bilateral phenomenon. Arch Gen Psych 48:431.

Corbet, R., Hartmna, H., Kerman, L., 1997. Effects of atypical antipsychotic agents on social behaviour in rodents. Pharmacol Biochem Behav. 45:9-17.

Coyle, J.T., Tsai, G., Goff, D., 2003. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. Annals of the New York Academy of Sciences. 1003: 318–27.

Coyle, J., 2006. "Chapter 54: The Neurochemistry of Schizophrenia". Siegal, George Jet al. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects(7th). Burlington, MA: Elsevier Academic Press. p.876–78.

Craig, A.M., Kang, Y., 2007. Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. Curr Opin Neurobiol. 17: 43–52.

Crees, I., Burt, D., Snyder, S., 1976. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antipsychophrenic drugs. Natura 261:717.

Creutzfeldt, O.D., Cortex Cerebri, Springer Verlag, Berlin, 1983.

Crider, A., Solomon, P., Mc Mahon, P., 1982. Disruption of selective attention in the rat following chronic d-amphetamineadministration:relationship to schizophrenic attention disorders. Biol Psych. 17:351-360.

Crisafulli, C., Chiesa, A., De Ronchi, D., Han, C., Lee, SJ., Park, M.H., Patkar, A.A., Pae, C.U., Serretti, A., 2012. Influence of GRIA1, GRIA2 and GRIA4 polymorphisms on diagnosis and response to antipsychotic treatment in patients with schizophrenia. Neurosci Lett. 506(1): 170-4.

Crow, T.J., 2008. The 'big bang' theory of the origin of psychosis and the faculty of language. Schizophrenia Research. 102(1–3): 31–52.

Dahlhaus, R.,Hines,R.M., Eadie, B.D., Kannangara, T.S.,Hines D.J., Brown, C.E., Christie, B.R., El-Husseini, A., 2010. Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus. Hippocampus. 20(2): 305-22.

Damjanović, A., Ivković, M., Jašović, M., Marić, N., 2000. Depression and schizophrenia: Differentation in the context of neurodevelopmental disorders. Eur Neuropsychopharm 1:2s.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci. 8(6):752-8.

Davis, K., Kahn, R., Ko, G., 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. Am J Psychiatry. 148:1474-1486.

Davis, K.L., Stewart, D.G., Friedman, J.I., Buchsbaum, M., Harvey, P.D., Hof, P.R., Buxbaum, J., Haroutunian, V., 2003. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. Arch Gen Psychiatry. 60(5):443-56.

Dean, C., Dresbach, T., 2006. Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. Trends Neurosci. 29: 21–29.

DeFelipe, J., 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. J Chem Neuroanat. 14(1):1-19.

DeFelipe, J., 2011. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. Front. Neuroanat. 5:29.

Del Río, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., Soriano, E., 1997. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. Nature 385(6611): 70–4.

Deng, C., Pan, B., Hu, C.H., Han, M., Huang, X.F., 2015. Differential effects of short- and long-term antipsychotic treatment on the expression ofneuregulin-1 and ErbB4 receptors in the rat brain. Psychiatry Res. 225(3):347-54.

Desbonnet, L., O'Tuathaigh, C., Clarke, G., O'Leary, C., Petit, E., Clarke, N., Tighe, O., Lai, D., Harvey, R., Cryan, JF., Dinan, TG., Waddington, JL., 2012. Phenotypic effects of repeated psychosocial stress during adolescence in mice mutant for the schizophrenia risk gene neuregulin-1: a putative model of gene × environment interaction. Brain Behav Immun. 26(4):660-71.

Deutch, A.Y., 1992. The regulation of subcortical dopamine systems by the prefrontal cortex: interactions of central dopamine systems and the pathogenesis of schizophrenia. J Neural Transm. 36:61-89.

Dityatev, A., El-Husseini, A., 2006. Molecular Mechanisms of synaptogenesis. Springer Verlag New York.

Drake, R.J, Lewis, S.W., 2005. Early detection of schizophrenia. Current Opinion in Psychiatry. 18(2): 147–50.

du Bois, T.M., Deng, C., Han, M., Newell, K.A., Huang, X.F., 2009. Excitatory and inhibitory neurotransmission is chronically altered following perinatal NMDA receptor blockade. Eur Neuropsychopharmacol. 19(4):256-65.

Ellenbroek, B., Willeman, A., Cools, A., 1989. Are antagonists of dopamine D1 receptors drugs that attenuate both positive and negative symptomes of schizophrenia. Neuropsychophramocology 2:191-199.

Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 1995b. Maternal separation reduces latent inhibition in the conditioned taste aversion paradigm. Neurosci Res Commun 17, 27-33.

Ellenbroek, B., Cools, A., 1998. The paw test: an animal model for neuroleptic drugs whicih fulfills the criteria for pharmacolocigal isomorpism. Life sci 42:1205-1213.

Ellinwood, E., Sudilovsky, A., Nelson, L., 1972. Behavioral analysis of chronic amphetamine intoxication. Biol Psych 4:215-225.

Eastwood, S.L., Harrison, P.J., 2000. Hippocampal synaptic pathology in schizophrenia, bipolar disorder and major depression: a study of complexin mRNAs. Mol Psychiatry. 5(4):425-32.

Ettenberg, A., Koob, Z., Bloom, F., 1981. Response artifact in the measuremnt of neuroleptic induced anhedonia. Science. 213:357.

Falconer, D.S., 1951. Two new mutants, 'trembler' and 'reeler', with neurological actions in the house mouse (Mus musculus L.). Journal of Genetics. 50(2): 192–201.

Fazzari, P., Paternain, A.V., Valiente, M., Pla, R., Luján, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marín, O., Rico, B., 2010. Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. Nature. 464(7293):1376-80.

Fink, J., Swerdloff, A., Reis, D., 1982. Genetic control of dopamine receptors in mouse caudate nucleus: relationship of cataleptic response to neuroleptic drugs. Neurosci Lett. 32:301-305.

Francis, D.D., Meaney, M.J., 1999. Maternal care and the development of stress responses. Curr Opin Neurobiol. 9, 128-34.

Freedman, R., Waldo, M., 1991. Elementary neuronal dysfunction in schizophrenia. Schizophrenia Res. 4:233-243.

Fritzen, S., Schmitt, A., Köth, K., Sommer, C., Lesch, K.P., Reif, A., 2007. Neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) knockout increases the survival rate of neural cells in the hippocampus independently of BDNF. Mol Cell Neurosci. 35(2): 261-71.

Giachino, C., Canalia, N., Capone, F., Fasolo, A., Alleva, E., Riva, M.A., Cirulli, F., Peretto, P., 2007. Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. Neuroscience. 145(2):568-78.

Gilani,A.I., Chohan, M.O., Inan, M., Schobel, S.A., Chaudhury, N.H., Paskewitz, S., Chuhma, N., Glickstein, S., Merker, R.J., Xu, Q., Small, S.A., Anderson, S.A., Ross, M.E., Moore, H., 2014. Interneuron precursor transplants in adult hippocampus reverse psychosis-relevant features in a mouse model of hippocampal disinhibition. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(20):7450-5.

Gong, N., Li, Y., Cai, G.Q., Niu, R.F.,Fang, Q., Wu, K., Chen, Z., Lin, L.N., Xu, L., Fei, J., Xu, T.L., 2009. GABA transporter-1 activity modulates hippocampal theta oscillation and theta burst stimulation-induced long-term potentiation. J Neurosci. 29(50):15836-45.

Grace, A.A., Rosenkranz, JA., 2002. Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. Physiol Behav. 77(4-5):489-93.

Gray, J., Feldon, J., Rawlins, J.,1992. The neuropsychology of schizophrenia. Behavior and Brain science. 14:1-35.

Green M.F., 2006. Cognitive impairment and functional outcome in schizophrenia and bipolar disorder. J Clin Psychiatry. 67(10):e12.

Geyer, M.A., Segal, D.S., Greenberg, B.D., 1984. Increased startle responding in rats treated with phencyclidine. Neurobeha Toxicol Terato 6, 1-4.

Gong Y.G., Wu, C.N., Xing, Q.H., Zhao, X.Z., Zhu, J., He, L., 2009. A two-method meta-analysis of Neuregulin 1(NRG1) association and heterogeneity in schizophrenia. Schizophr Res. 111(1-3):109-14.

Grayson, D.R., Guidotti, A., Costa, E., 2008. Current Hypotheses. Schizophrenia Research Forum. schizophreniaforum.org.

Gregg, L., Barrowclough, C., Haddock, G., 2007. Reasons for increased substance use in psychosis. Clin Psychol Rev. 27(4): 494–510.

Hatzimanolis,A., McGrath, J.A., Wang, R., Li, T., Wong, P.C., Nestadt, G., Wolyniec, P.S., Valle, D., Pulver, A.E., Avramopoulos, D., 2013. Multiple variants aggregate in the neuregulin signaling pathway in a subset of schizophrenia patients. Transl Psychiatry. 3:e264.

Heckers, S., Konradi, C., 2002. Hippocampal neurons in schizophrenia. J Neural Transm. 109(5-6): 891-905.

Heizmann, C.W., 1993. Calcium signaling in the brain. Acta Neurobiol Exp (Wars). 1993;53(1):15-23.

Hemsley, D.,1997. An experimental psychological model for schizophrenia, in Search for the Causesof Schizophrenia. Springer-Verlag, pp 179-188.

Herrmann, M., Vos, P., Wunderlich, M.T., de Bruijn, C.H., Lamers, K.J., 2000. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. Stroke. 31(11):2670-7.

Hines, R.M., Wu, L., Hines, D.J., Steenland, H., Mansour, S., Dahlhaus, R., Singaraja, RR., Cao, X., Sammler, E., Hormuzdi, SG., Zhuo, M., El-Husseini, A., 2008. Synaptic imbalance, stereotypies, and impaired social interactions in mice with altered neuroligin 2 expression. J Neurosci. 28(24):6055-67.

Hiroki, T., Naoyuki, M., Kyoko, M., Terukazu, N., Kenji, I., Junichi, T., 2012. Higher-order architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neurexin and neuroligin. Cell Rep. 2(1): p101-110.

Hof, P.R., Haroutunian, V., Friedrich, V.L., Byne, W., Buitron, C., Perl, D.P., Davis, K.L., 2003. Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. Biol Psychiatry. 53(12):1075-85.

Holmes, A., Hodge, M., Lenten, S., Fielding, J., Castle, D., Velakoulis, D., Bradley, G., 2006. Chronic mental illness and community treatment resistance. Australas Psychiatry. 14(3):272-6.

Holloway, T., Moreno, J.L., Umali, A., Rayannavar, V., Hodes, G.E., Russo, S.J., González-Maeso, J., 2013. Prenatal stress induces schizophrenia-like alterations of serotonin 2A and metabotropic glutamate 2 receptors in the adult offspring: role of maternal immune system. J Neurosci. 33(3): 1088-98.

Hänninen, K., Katila, H., Saarela, M., Rontu, R., Mattila, K.M., Fan, M., Hurme, M., Lehtimäki, T., 2008. Interleukin-1 beta gene polymorphism and its interactions with neuregulin-1 gene polymorphism are associated with schizophrenia. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 258(1): 10-5.

Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, TI., Stefovska, V., Turski, L., Olney, JW., 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science. 283(5398): 70-4.

Insel, TR., 2010. Rethinking schizophrenia. Nature. 468(7321):187–93.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S., 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. Brain Res Mol Brain Res. 57(1):1-9.

Jentsch, J.D., Roth, R.H., 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NmMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. Neuropsychopharmacology 20, 201-225.

Jim, van Os., 2004. Does the urban environment cause psychosis?. British Journal of Psychiatry. 184(4): 287–288.

Joëls, M., Baram, T.Z., 2009. The neuro-symphony of stress. Nat Rev Neurosci. 10(6):459-66.

Jungerius, B.J., Hoogendoorn, M.L., Bakker, S.C., Van't Slot, R., Bardoel, A.F., Ophoff, R.A., Wijmenga, C., Kahn, R.S., Sinke, R.J., 2008. An association screen of myelin-related genes implicates the chromosome 22q11 PIK4CA gene in schizophrenia. Mol Psychiatry. 13(11): 1060-8.

Kamin, Lj., 1969. Predictability, surprise, attention and conditioning, in Punishment and Aversive Behaviour. New York, Appelton-Century-Crofts. 279- 296.

Karl, T., Duffy, L., Scimone, A., Harvey, R.P., Schofield, P.R., 2007. Altered motor activity, exploration and anxiety in heterozygous neuregulin 1 mutant mice: implications for understanding schizophrenia. Genes Brain Behav. 6(7): 677-87.

Keilhoff, G., Bernstein, H.G., Becker, A., Grecksch, G., Wolf, G., 2004. Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. Biol Psychiatry. 56(5):317-22.

Kemper, T.L., Yakovlev, PI., Caveness, W.F., Kato, M., 1971. Maturation of the motor cortex in relation to focal seizure development and propagation--structural considerations. Trans Am Neurol Assoc. 96:84-7.

Kendler, K., Tsuang, M., Hays, P., 1987. Age at onset in schizophrenia. Arch Gen Psych 44:881.

Khundakar, A., Morris, C., Thomas, A.J., 2011. The immunohistochemical examination of GABAergic interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with late-life depression. Int. Psychogeriatr. 23: 644–653.

Kibe,L.D., Lafont, I., Liddle, P., 1993. The composition of the negative syndrome of chronic schizophrenia. Br J Psych. 162:744.

Kim, J., Matthews, N.L., Park, S., 2010. An event-related FMRI study of phonological verbal working memory in schizophrenia, PloS One. 5(8): e12068.

King, G., Alicata, D., Cloak, C., Chang, L., 2010. Psychiatric symptoms and HPA axis function in adolescent methamphetamine users. J Neuroimmune Pharmacol. 5(4): 582-91.

Kircher, T., Renate, T., 2006. Functional brain imaging of symptoms and cognition in schizophrenia".The Boundaries of Consciousness. Amsterdam: Elsevier. p.302.

Knight, D., Xie, W., Boulianne, G.L., 2011. Neurexins and neuroligins: recent insights from invertebrates. Mol. Neurobiol. 44(3): 426–40.

Knöchel, C., Stäblein, M., Storchak, H., Reinke, B., Jurcoane, A., Prvulovic, D., Linden, D.E., van de Ven, V., Ghinea, D., Wenzler, S., Alves, G., Matura, S., Kröger, A., Oertel-Knöchel, V., 2014. Multimodal assessments of the hippocampal formation in schizophrenia and bipolar disorder: evidences from neurobehavioral measures and functional and structural MRI. Neuroimage Clin. 23;6:134-44.

Konradi, C., Heckers, S., 2003. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. Pharmacology and Therapeutics. 97(2): 153–79.

Konradi, C., Yang, C.K., Zimmerman, E.I., Lohmann, K.M., Gresch, P., Pantazopoulos, H., Berretta, S., Heckers, S., 2011. Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia. Schizophr Res. 131(1-3):165-73.

Lagopoulos, J., Hermens, D.F., Hatton, S.N., Battisti, R.A., Tobias-Webb, J., White, D., Naismith, S.L., Scott, E.M., Ryder, W.J., Bennett, M.R., Hickie, I.B., 2013. Microstructural white matter changes are correlated with the stage of psychiatric illness. Transl Psychiatry. 3:e248.

Lahti, A.C., Weiler, M.A., Tamara Michaelidis, B.A., Parwani, A., Tamminga, C.A., 2001. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers.Neuropsychopharmacology. 25(4):455–67.

Law, A.J., Lipska, B., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Straub R.E., Hashimoto, R., Harrison, P.J., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2006. Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5′ SNPs associated with the disease. Proc Natl Acad Sci U S A.103(17): 6747–6752.

Lephart, E.D., Watson M.A., 1999. Maternal separation: hypothalamic-preoptic area and hippocampal calbindin-D28K and calretinin in male and female infantile rats. Neurosci Lett. 267(1):41-4.

Levinson, J.N., El-Husseini, A., 2005. Building excitatory and inhibitory synapses: balancing neuroligin partnerships. Neuron. 48(2): 171-4.

Levinson, J.N., Chéry, N., Huang, K., Wong, T.P., Gerrow, K., Kang, R., Prange, O., Wang Y.T., El-Husseini, A., 2005. Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity. J Biol Chem. 280(17): 17312-9.

Leweke, F.M., Koethe, D., 2008. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. Addict Biol. 13(2): 264–75.

Lewis, D.A., González-Burgos, G., 2008. Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. Neuropsychopharmacology. 33(1):141-65.

Lewis, D.A., Curley, A.A., Glausier, J.R., Volk, D.W., 2012. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. Trends Neurosci. 35(1):57-67.

Li, X., Zhang, J., Cao, Z., Wu, J., Shi, Y., 2006. Solution structure of GOPC PDZ domain and its interaction with the C-terminal motif of neuroligin. Protein Sci. 15(9): 2149–58.

Lipska, B., Jaskiw, G., Weinberger, D., 1997. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. Neuropsychopharmacology 9:67-75.

Lorente de No, R., 1934. Studies of the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. J. Phychol. Neurol. 46: 113-117.

Lopes da Silva, F.H., Arnolds, D.E., Neijt, H.C., 1984. A functional link between the limbic cortex and ventral striatum: physiology of the subiculum accumbens pathway. Exp Brain Res. 55(2):205-14.

Lubow, R., 1973. Latent inhibition. Psychol. Bull. 79:398-407.

Lubow, R., Latent inhibition and and conditioned Attention Theory. New York, Cambridge University Press, 1998.

Maeda, K., Sugino, H., Hirose, T., Kitagawa, H., Nagai, T., Mizoguchi, H., Takuma, K., Yamada, K., 2007. Clozapine prevents a decrease in neurogenesis in mice repeatedly treated with phencyclidine. J Pharmacol Sci. 103(3):299-308.

Maćkowiak, M., Mordalska, P., Dudys, D., Korostyński, M., Bator, E., Wedzony, K., 2011. Cocaine enhances ST8SiaII mRNA expression and neural cell adhesion molecule polysialylation in the rat medial prefrontal cortex. Neuroscience. 186: 21-31.

Marballi, K., Quinones, M.P., Jimenez, F., Escamilla, M.A., Raventós, H., Soto-Bernardini, M.C., Ahuja, S.S., Walss-Bass, C., 2010. In vivo and in vitro genetic evidence of involvement of neuregulin 1 in immune system dysregulation. J Mol Med (Berl). 88(11):1133-41.

Marin, O., 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. Nat. Rev. Neurosci.13, 107–120.

Matrisciano, F., Tueting, P., Dalal, I., Kadriu, B., Grayson, D.R., Davis, J.M., Nicoletti, F., Guidotti, A., 2013. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. Neuropharmacology. 68:184-94.

McCarthy, D.M., Zhang, X., Darnell, S.B., Sangrey, G.R., Yanagawa, Y., Sadri-Vakili, G., Bhide, P.G., 2011.Cocaine alters BDNF expression and neuronal migration in the embryonic mouse forebrain. J. Neurosci. 31: 13400–13411.

Melonakos, E.D., Shenton, M.E., Rathi, Y., Terry, D.P., Bouix, S., Kubicki, M., 2011. Voxel-based morphometry (VBM) studies in schizophrenia-can white matter changes be reliably detected with VBM? Psychiatry Res. 193(2): 65-70.

Melvin, N., 2007. Rat hippocampus – Olympus Bioscapes International Digital Imaging Competition. Canadian Centre for Behavioural Neuroscience, University of Lethbridge, Alberta, Canada.

Meyer, G., Goffinet, A.M., 1998. Prenatal development of reelin-immunoreactive neurons in the human neocortex. J. Comp. Neurol. 397(1): 29–40.

Meyer, G., Goffinet, A.M., Fairén, A., 1999. What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex. Cereb Cortex. 9(8): 765-75.

Mighdoll, M.I., Tao, R., Kleinman, J.E., Hyde, T.M., 2015. Myelin, myelin-related disorders, and psychosis. Schizophr Res. 161(1): 85-93.

Ming T. Tsuang, William S. Stone, Stephen V. Faraone., 2000. Schizophrenia: vulnerability versus disease. Dialogues Clin Neurosci. 2(3): 257–266.

Monji, A., Kato, T., Kanba, S., 2009. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. Psychiatry Clin Neurosci. 63(3):257-65.

Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A., Daly, D., 1997. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. Journal of Neuroscience 17, 2921-2927.

Muscatell, K.A., Slavich, G.M., Monroe, S.M., Gotlib, I.H., 2009. Stressful life events, chronic difficulties, and the symptoms of clinical depression. J Nerv Ment Dis. 197, 154-60.

Nadarajah, B., Parnavelas, J.G., 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. Nat Rev Neurosci. 3(6):423-32.

Nestler, E.J., Hyman, S.E., 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. Nat Neurosci. 13(10):1161-9.

Newbern, J., Birchmeier, C., 2010. Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. Semin Cell Dev Biol. 21(9):922-8.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 308(5726):1314-8.

Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., D'Arcangelo, G., 2004. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway".Neuron 41(1): 71–84.

Niu, S., Yabut, O., D'Arcangelo, G., 2008. The Reelin Signaling Pathway Promotes Dendritic Spine Development in Hippocampal Neurons. Journal of Neuroscience 28(41): 10339–48.

O'Donovan M.C., Williams N.M., Owen M.J., 2003. Recent advances in the genetics of schizophrenia. Hum. Mol. Genet. 12(2): R125–33.

Oh, D.H., Son, H., Hwang, S., Kim, S.H., 2012. Neuropathological abnormalities of astrocytes, GABAergic neurons, and pyramidal neurons in the dorsolateral prefrontal cortices of patients with major depressive disorder. Eur. Neuropsychopharmacol. 22, 330–338.

Own, L.S., Patel, P.D., 2013. Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in C57B/6 mice. HormBehav 60, 411-419.

Pantelis, C., Barnes, T.R., Nelson, H.E., Tanner, S., Weatherley, L., Owen, A.M., Robbins, T.W., 1997. Frontal-striatal cognitive deficits in patients with chronic schizophrenia. Brain. 120 (Pt 10):1823-43.

Pantelis, C., Yucel, M., Woood, S.J., 2005. Structural brain imaging evidence for multiple pathological processes at different stages of brain development in schizophrenia. Schizophr Bull 31, 672-696.

Papazafiri, P., Podini, P., Meldolesi, J., Yamaguchi, T., 1995. Ageing affects cytosolic Ca2+ binding proteins and synaptic markers in the retina but not in cerebral cortex neurons of the rat. Neurosci Lett. 186(1):65-8.

Paterson, C., Wang, Y., Kleinman, J.E., Law, A.J., 2014. Effects of schizophrenia risk variation in the NRG1 gene on NRG1-IV splicing during fetal and early postnatal human neocortical development. Am J Psychiatry. 171, 979-89.

Paunović, V., Babinski, T., Biološka pshijatrija 1. Molekularna osnova mentalnih procesa. Medicinski fakultet, Beograd 1995.

Paxinos, G., Watson, C., 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates Amsterdam: Elsevier, 2007.

Petronijević, N.D., Mićić, D.V., Duricić, B., Marinković, D., Paunović, V.R., 2003. Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 27(3):431-40.

Radley, J.J., Arias, C.M., Sawchenko, PE., 2006. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. J Neurosci. 26(50): 12967-76.

Radonić, E., Rados, M., Kalember, P., Bajs-Janović, M., Folnegović-Smalc, V., Henigsberg, N., 2011. Comparison of hippocampal volumes in schizophrenia, schizoaffective and bipolar disorder. Coll Antropol. 35 Suppl 1:249-52.

Radonjić, N.V., Petronijević, N.D., Vucković, S.M., Prostran, M.S., Nesić, Z.I., Todorović, V.R., Paunović, V.R., 2008. Baseline temperature in an animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. Physiol Behav. 93(3):437-43.

Radonjić, N.V., Knezević, I.D., Vilimanovich, U., Kravić-Stevović, T., Marina, L.V., Nikolić, T., Todorović, V., Bumbasirević, V., Petronijević, ND., 2010. Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of schizophrenia: Long-term effects of perinatal phencyclidine administration. Neuropharmacology. 58(4-5):739-45.

Radonjić, N.V., Jakovcevski, I., Bumbaširević, V., Petronijević, N.D., 2013. Perinatal phencyclidine administration decreases the density of cortical interneurons and increases the expression of neuregulin-1. Psychopharmacology (Berl). 227(4):673-83.

Radonjić, V., Malobabić, S., Radonjić, V., Puskas, L., Stijak, L., Aksić, M., Filipović,B., 2014. Hippocampus--why is it studied so frequently? Vojnosanit Pregl. 71(2):195-201.

Rakic, P., 2009. Evolution of the neocortex: Perspective from developmental biology. Nat Rev Neurosci. 10: 724–735.

Roberts, D., Vickers, G., 1994: Atypical neuroleptics increase self-administration of cocaine: an evaluation of behavioural screen for antipsychotic activity. Psychopharmacology (Berl) 82:135- 139.

Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus: implications for cellular plasticity. Mol. Psychiatry 7, 609-616.

Romero,J., Muñiz, J., Logica Tornatore, T., Holubiec, M., González, J., Barreto, G.E., Guelman, L., Lillig, C.H., Blanco, E., Capani, F., 2014. Dual role of astrocytes in perinatal asphyxia injury and neuroprotection. Neurosci Lett. 565:42-6.

Ross, E.J., Graham, D.L., Money, K.M., Stanwood, G.D., 2014. Developmental Consequences of Fetal Exposure to Drugs: What We Know and What We Still Must LearnNeuropsychopharmacology10.1038/npp.2014.147

Sagud, M., Mihaljević-Peles, A., Mück-Seler, D., Pivac, N., Vuksan-Cusa, B., Brataljenović, T., Jakovljević, M., 2009. Smoking and schizophrenia. Psychiatria Danubina. 21(3): 371–5.

Sanberg, P., Bunsey, M., Giordano, M.,1988. The catalepsy test :its ups and down. Behan Neurosci. 102:748-759.

Schmajuk, N., 1997. Animal models of schizophrenia: the hippocampally lessioned animal. Schizophrenia Bull. 13: 317-327.

Schmitt, A., Parlapani, E., Gruber, O., Wobrock, T., Falkai, P., 2008. Impact of neuregulin-1 on the pathophysiology of schizophrenia in human post-mortem studies. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 258 Suppl 5: 35-9.

Schmitt, A., Steyskal, C., Bernstein, H.G., Schneider-Axmann, T., Parlapani, E., Schaeffer, E.L., Gattaz, W.F., Bogerts, B., Schmitz, C., Falkai, P., 2009. Stereologic investigation of the posterior part of the hippocampus in schizophrenia. Acta Neuropathol. 117(4):395-407.

Schummers, J., Browning, M.D., 2001. Evidence for a role for GABA(A) and NMDA receptors in ethanol inhibition of long-term potentiation. Brain Res Mol Brain Res. 94(1-2):9-14.

Schäfer, B.W., Heizmann, C.W., 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci. 21(4):134-40.

Seidel, K., Helmeke, C., Poeggel, G., Braun, K., 2009. Repeated neonatal separation stress alters the composition of neurochemically characterized interneuron subpopulations in the rodent dentate gyrus and basolateral amygdala. Dev Neurobiol. 69(4):203-11.

Selemon, L.D., Ceritoglu, C., Ratnanather, J.T., Wang, L., Harms, M.P., Aldridge, K., Begovic, A., Csernansky, J.G., Miller, M., Rakic, P., 2013. Distinct abnormalities of the primate prefrontal cortex caused by ionizing radiation in early or midgestation. J Comp Neurol. 521(5): 1040–1053.

Selten, J.P., Cantor-Graae E., Kahn R.S., 2007. Migration and schizophrenia. Current Opinion in Psychiatry. 20(2): 111–115.

Seres, L., 1980. Hippocampus and seahorse. Preparation of a human hippocampus alongside a sea horse.

Somogyi, P., Klausberger, T., 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J Physiol. 562(Pt 1):9-26.

Steen, R.G., Mull, C., McClure, R., Hamer, R.M., Lieberman, J.A., 2006. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. Br J Psychiatry. 188: 510-8.

Steiner, J., Bernstein, H.G., Bielau, H., Farkas, N., Winter, J., Dobrowolny, H., Brisch, R., Gos, T., Mawrin, C., Myint, A.M., Bogerts, B., 2008. S100B-immunopositive glia is elevated in paranoid as compared to residual schizophrenia: a morphometric study. J Psychiatr Res. 42(10):868-76.

Steinpreis, R.E., 1996. The behavioral and neurochemical effects of phencyclidine in humans and animals: some implications for modeling psychosis. Behavioural Brain Research 74, 45-55.

Sun, C., Cheng, M.C., Qin, R., Liao, D.L., Chen, T.T., Koong, F.J., Chen, G., Chen, C.H., 2011. Identification and functional characterization of rare mutations of the neuroligin-2 gene (NLGN2) associated with schizophrenia. Hum Mol Genet. 20(15): 3042-51.

Szabadits, E., Cserép, C., Ludányi, A., Katona, I., Gracia-Llanes, J., Freund, T.F., Nyíri, G., 2007. Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. J Neurosci. 27(30):8101-11.

Szentagothai, J., 1975. The “module-concept” in cerebral cortex architecture. Brain Res 95: 475-496.

Südhof, T.C., 2008. Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease. Nature. 455(7215): 903-11.

Takahashi, N., Sakurai, T., Davis, K.L., Buxbaum, J.D., 2011. Linking oligodendrocyte and myelin dysfunction to neurocircuitry abnormalities in schizophrenia. Prog Neurobiol. 93(1):13-24.

Tamminga, C., Thaker, G., Buchanan, R., 1999. Limbic systems abnormalities identified in schizophrenia using positron emissin tomography with fluorodeoxyglucose and neocortical alteration with deficit syndrome. Arch Gen Psych. 49:522-530.

Tamminga, C.A., Stan, A.D., Wagner, A.D., 2010. The hippocampal formation in schizophrenia. Am J Psychiatry. 167(10):1178-93.

Tamnes, C.K., Østby, Y., Walhovd, K.B., Westlye, L.T., Due-Tønnessen, P., Fjell, A.M., 2010. Neuroanatomical correlates of executive functions in children and adolescents: a magnetic resonance imaging (MRI) study of cortical thickness. Neuropsychologia. 48(9): 2496-508.

Taylor, S.B., Taylor, A.R., Markham, J.A., Geurts, A.M., Kanaskie, B.Z., Koenig, J.I., 2011. Disruption of the neuregulin 1 gene in the rat alters HPA axis activity and behavioral responses to environmental stimuli. Physiol Behav. 104, 205-14.

Teffer, K., Buxhoeveden, D.P., Stimpson, C.D., Fobbs, A.J., Schapiro, S.J., Baze, W.B., McArthur, M.J., Hopkins, W.D., Hof, P.R., Sherwood,C., Semendeferi, K., 2013. Developmental changes in the spatial organization of neurons in the neocortex of humans and common chimpanzees. J Comp Neurol. 521(18): 4249–4259.

Thirunavukkarasu, P.,Vijayakumari, A.A.,John, J.P.,Halahalli, H.N.,Paul, P.,Sen, S., Purushottam, M.,Jain, S., 2014. An exploratory association study of the influence of dysbindin and neuregulin polymorphisms on brain morphometry in patients with schizophrenia and healthy subjects from South India. Asian J Psychiatr. 10: 62-8.

Thomson, P.A., Christoforou, A., Morris, S.W., Adie, E., Pickard, B.S., Porteous, D.J., Muir, W.J., Blackwood, D.H., Evans, K.L., 2007. Association of Neuregulin 1 with schizophrenia and bipolar disorder in a second cohort from the Scottish population. Mol Psychiatry. 12(1):94-104.

Tsetsenis, T., Boucard, A.A., Araç, D., Brunger, A.T., Südhof, T.C., 2014. Direct visualization of trans-synaptic neurexin-neuroligin interactions during synapse formation. J Neurosci. 34(45):15083-96.

Tzeng, S.F., Cheng, H., Lee, Y.S., Wu, J.P., Hoffer, B.J., Kuo, J.S., 2001. Expression of neural cell adhesion molecule in spinal cords following a complete transection. Life Sci. 68(9):1005-12.

Uhlhaas, P.J., Singer, W., 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. Nat Rev Neurosci. 11(2): 100-13.

Uranova, N.A., Vostrikov, V.M., Orlovskaya, D.D., Rachmanova, V.I., 2004. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. Schizophr Res. 67(2-3):269-75.

Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R.L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Südhof, T.C., Brose, N., 2006. Neuroligins determine synapse maturation and function. Neuron. 51(6):741-54.

Viola, G.G., Rodrigues, L., Américo, J.C., Hansel, G., Vargas, R.S., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Gonçalves, C.A., Xavier, L.L., Achaval, M., Souza, D.O., Amaral, O.B., 2009. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. Brain Res. 1274:47-54.

Vivinetto, A.L., Suarez, M.M., Rivarola, M.A., 2013. Neurogiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning enviromental enrichment. Behav Brain Res 240, 110-118.

Wędzony, K., Chocyk, A., Maćkowiak, M., 2013. Potential roles of NCAM/PSA-NCAM proteins in depression and the mechanism of action of antidepressant drugs. Pharmacol Rep. 65(6): 1471-8.

Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., 2002. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. Neuron 47(4): 471–3.

Williamson, L.L., Chao, A., Bilbo, S.D., 2012. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. Brain Behav Immun. 26(3):500-10.

Woodruff, A.R., Sah, P., 2007. Inhibition and synchronization of basal amygdala principal neuron spiking by parvalbumin-positive interneurons. J Neurophysiol. 98(5):2956-61.

Woolley, C.S., McEwen, B.S., 1992. Estradiol mediates fluctuations in hippocampal synapses density during the estrous cycle in the adult rat. J Neurosci 12, 2549-2554.

Worms, P., Broekkamp, C., Lloyd, K., 1983: Behavioral effects of neuroleptics, in Neuroleptics: Neurochemistry, Behavioral, and Clinical Perspectives, Edited by Coyle, J. , Enna, S. New York, Raven Press. pp 93-117.

Yolken, R., 2004. Viruses and schizophrenia: a focus on herpes simplex virus. Herpes. 11(2): 83A–88A.

Zhang, T.Y., Hellstrom, I.C., Bagot, R.C., Wen, X., Diorio, J., Meaney, M.J., 2010. Maternal care and DNA methylation of a glutamic acid decarboxylase 1 promoter in rat hippocampus. J Neurosci. 30(39): 13130-7.

Zhang, Z., Sun, J., Reynolds, G.P., 2002. A selective reduction in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia patients. Chin Med J (Engl). 115(6):819-23.

Zhang, Z.J., Reynolds, G.P., 2002. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. Schizophr Res. 55(1-2): 1-10.

Списак скраћеница

CB – kalbindin

COMT – katehol-o-metil transferaza

CR – kalretinin

DAAO – oksidaza D- aminokiseline

DTNBP1 – disbindin

EGF – epidermalni faktor rasta

fMRI – funkcionalna magnetna rezonanca

GABA - gama amino buterna kiselina

GAD67 – dekarboksilaza glutaminske kiseline

GD – gyrus dentatus

GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein

Iba1 – jonizujući kalcijum vezujući adaptivni molekul 1

Map-kinaze – mitogen aktivirajući protein

MCX – motorni korteks

MD – maternalna deprivacija

MOG – mijelin oligodendrocitni glikoprotein

NCAM – athezioni molekul neurona

NMDA – N-metil-D-aspartat

NL/Nlg – neuroligin

Nrg1 – neuregulin 1

Nrx – neureksin

PBS – fosfatni rastvor pufera

Pi3-kinaze/Akt – fosfoinozitid 3

PET – pozitronska emisiona tomografija

PFCX – prefrontalni korteks

PN – postnatalni

PV – parvalbumin

RGS4 – regulator G protein signala 4

RSCX – retrosplenijalni korteks

SGZ – subgranularna zona

ST – sotatostatin

Trk – tirozin kinaza

UOI – uslovljeni odgovor izbegavanja

VIP – vazoaktivni intestinalni peptid

БИОГРАФИЈА

Др Милан Аксић рођен је 23. oktобра 1980. у Скопљу. Медицински факултет у Београду уписао је 1998/1999, а дипломирао 2006 године са просечном оценом 8.33. Још као студент др Аксић, учествује у научно-истраживачком раду из чега произилазе радови презентовани на студентским конгресима у земљи и иностранству.

Од новембра 2007 године запослен је на Институту за анатомију „Нико Миљанић“ Медицинског факултета Универзитета у Београду као сарадник у настави, а од 2010 године изабран је у звање асистента за ужу научну област Анатомија. Основну, здравствену специјализацију из Физикалне медицине са рехабилитацијом похађа од 2012 године.

У периоду од 2008-2011. др Аксић је сарадник на пројекту Министарства науке Републике Србије бр. 156031 “Старосне и полне, морфолошке и структурне разлике базалног теленцефалона“. Такође, од 2011 је сарадник на пројекту Министарства за науку и технолошки развој под бројем ИИИ41020 „Морфолошке промене у мозгу код особа са транссексуализмом, другим поремећајима полног идентитета и развојних психијатријских поремећаја“, као и на пројекту 175058 „Структурне и биохемијске карактеристике поремећаја синаптичке пластичности у психијатријским обољењима“.

Аутор је бројних научно истраживачких радова од којих је 15 публиковано у часописима који су са JCR листе. Такође, је аутор више поглавља у уџбеницима, као и бројних саопштења са научних скупова.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milan Aksić

broj upisa 08-DS-MM-09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Morfološke i biohemijske promene u alokorteksu i neokorteksu mozga pacova uslovljene maternalnom deprivacijom

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.03.2015

Aksić Milan

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Milan Aksić

Broj upisa 08-DS-MM-09

Studijski program MOLEKULARNA MEDICINA

Naslov rada Morfološke i biohemijske promene u alokorteksu i neokorteksu mozga pacova uslovljene maternalnom deprivacijom

Mentor prof. dr Branislav Filipović

Potpisani Aksić Milan

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja 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.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.03.2015

Aksić Milan

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Morfološke i biohemijske promene u alokorteksu i neokorteksu mozga pacova uslovljene maternalnom deprivacijom

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilozima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.03.2015.

Aksić Milan

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.