

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Anja S. Santrač

**Uticaj pozitivne
modulacije GABA_A
receptora koji sadrže
 α 5 podjedinicu na
promene ponašanja
miševa i pacova u
modelima autističnih
poremećaja**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Anja S. Santrač

**UTICAJ POZITIVNE
MODULACIJE GABA_A
RECEPTORA KOJI SADRŽE α 5
PODJEDINICU NA PROMENE
PONAŠANJA MIŠEVA I
PACOVA U MODELIMA
AUTISTIČNIH POREMEĆAJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Anja S. Santrač

**THE INFLUENCE OF POSITIVE
MODULATION OF GABA_A
RECEPTORS CONTAINING
THE α 5 SUBUNIT ON
BEHAVIORAL CHANGES OF
MICE AND RATS IN MODELS
OF AUTISTIC DISORDERS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Delovi eksperimentalnog rada urađeni su u Centru za humanu molekularnu genetiku, Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i na Institutu za fiziologiju i biohemiju "Ivan Đaja", Katedra za opštu fiziologiju i biofiziku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

MENTOR

Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____
Dr Bojan Marković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr Ivan Jančić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____
Dr Bojan Batinić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. _____
Dr Maja Lozić, naučni saradnik
Dekanat biomedicinskih nauka, Centar za
nauke otkrića mozga, Univerzitet u Edinburgu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Veliko hvala mom mentoru profesoru Miroslavu Saviću na njegovom vođstvu sve ove godine, na ukazanom poverenju i bezgraničnom strpljenju, na bezbroj kreativnih i plodonosnih diskusija, na svemu što me je naučio za sve ove godine, a pre svega na prilici i slobodi da uvek iskažem i isprobam svoje ideje.

Bojanu Markoviću, hvala na hiljadama puštenih uzoraka tokom ovih godina, na uvek spremnoj pomoći, na pronalasku (nepostojećeg) vremena za poduke i objašnjenja i na mnogo sati druženja i priče kraj tandem MS aparata.

Ivanu Jančiću, mom samozvanom vodiču kroz život, hvala na detaljnom čitanju i pomoći u poboljšavanju ove disertacije, na zasmehavanju i razvedravanju kad mi je bilo teško, i savetima i uputstvima za život koje i danas sebi ponavljam i citiram drugima.

Bojanu Batiniću, veliko hvala na svojoj pomoći u nizu eksperimenata u ovoj disertaciji, na uvek spremnoj razmeni ideja, na sjajnim kolačima, savetima za dobra vina, i na satima druženja.

Maji Lozić, koja spada u ljude koji ostave trag u životu koliko god ih kratko znali, hvala na prijateljstvu i na konstatnom podsećanju da je nauka divna, ali da ne zaboravim druge divne stvari koje postoje na ovom svetu, a koje daju punoću ljudskom duhu.

Srđanu Joksimoviću, mom starijem bratu u nauci, hvala što me je uvek podsećao koliko je nauka zabavna, a pogotovo na ogromnoj pomoći i podršci i što je uvek tu za mene, čak i na drugom kraju sveta.

Mojim dragim kolegicama: Tamari Stanković, Tamari Timić Stamenić, Jovani Arandelović, Mariji Banićević, Tamari Major, na svojoj pomoći koje su mi pružile u bar jednoj od faza nastanka ove disertacije, na svojoj podršci, ramenu za plakanje kad su stvari bile preteške i na prijateljstvu za ceo život. Takođe i Branki Divović-Matović, Aleksandri Kovačević, Vladimiru Stevanoviću, hvala na satima provedenim u pomoći izvođenja eksperimenata ove disertacije i našim druženjima.

Posebnu zahvalnost dugujem Dejanu Mitroviću, ne samo na brizi o svim životinjama upotrebljenim u izradi ove disertaciji, nego i na brizi o meni, na moralnoj podršci i silnim razgovorima tokom godinama, i na priskakanju u pomoć uvek, čak i kad je ja naglas nisam ni tražila.

Nebojši Cekiću, hvala na nebrojeno sati koje je proveo u analiziranju tragova životinja, na svim razgovorima tokom godina, na smišljanju rešenja za niz ideja koje bi nam pale na pamet i na dobrim preporučenim filmovima.

Dolazak na Farmaceutski fakultet i rad na disertaciji mi je dao priliku da upoznam sjajne ljude i van moje grupe. Hvala svim kolegama sa katedri za farmakologiju, farmaceutsku hemiju, farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, bromatologiju, analitiku lekova, medicinsku biohemiju, fiziologiju, toksikologiju, koji su mi u nekom trenutku pomogli sa nedostajućom supstancom, upotrebom nekog aparata ili sa par minuta prijateljskog razgovora i smeha. Posebno hvala Marinu Jukiću na razgovorima koji su me naučili mnogo toga o svetu nauke i na pomoći u trenutku kad mi je bila preko potrebna. Najtoplije hvala mojim prijateljima Vanji Todorović, Mariji Berti i Urošu Pecikozi na svojoj pomoći prilikom izrade ove disertacije i u snalaženju u raznim aspektima rada na fakultetu, a pre svega na satima podrške, druženja i smeha, bez kojih bi ova disertacija daleko teže bila privedena kraju.

Veliko hvala dugujem Dunji Bijelić, na beskrajnoj nesebičnosti i izdvojenom vremenu čak i kada ga za sebe nije imala dovoljno. Svojom voljom, idejama i mesecima uloženog truda i rada ona je omogućila da ova priča bude upotpunjena na način na koji sam uvek želela. Mnogo me je naučila i bila mi je velika pomoć i podrška svih ovih godina.

Izrazitu zahvalnost dugujem mom prijatelju Jovanu Pešoviću. Zahvaljujući njemu i profesorki Dušanki Savić-Pavićević imala sam pristup aparatima koji su značajno doprineli obogaćenju disertacije. Ali pre svega, hvala mu na nizu vikenda koje je proveo sa mnom u laboratorijama dva fakulteta da bi ova disertacija bila odrađena, što je trpeo sva moja jadanja sve ove godine i što je uvek bio moja podrška.

Blagoju Šoškiću, hvala na svim savetima, razgovorima i raspravama. Hvala mu na svakoj poslatoj sreći za svaki veliki (a i mali) korak i što je bio moja konstanta tokom celog ovog puta.

Mom Nikoli, hvala na pomoći pruženoj prilikom izrade ove disertacije, a najviše na trpljenju, strpljenju i razumevanju tokom njenog stvaranja.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj mami, kojoj i posvećujem ovu disertaciju. Ona je moj temelj, moj stub oslonac i bez njene beskrajne nesebične ljubavi i podrške ova disertacija ne bi ni postojala.

Uticaj pozitivne modulacije GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu na promene ponašanja miševa i pacova u modelima autističnih poremećaja

SAŽETAK

Dobro je poznata uloga $\alpha 5$ GABA_A receptora u učenju i pamćenju. Zato smo odlučili da ispitamo efekat selektivnog pozitivnog alosternog modulatora (PAM), MP-III-022, na učenje i pamćenje zdravih životinja, kao i na ekspresiju GABRA5. Nakon pokazane dobre podnošljivosti i potencijalnog prokognitivnog efekta, ligand bi se primenio na odabrani animalni model spektra autističnih poremećaja (eng. *autism spectrum disorders*, ASD). ASD je neurorazvojni poremećaj koji obuhvata poremećaje u socijalnoj komunikaciji i interakciji, kao i repetitivnom i restriktivnom ponašanju, i dalje bez efikasne terapije. U ovom kontekstu, animalni modeli koji imitiraju specifične simptome bolesti su odličan alat translacionih istraživanja. Neki od najčešće korišćenih modela su BTBR T+ tf/J soj miševa (BTBR) i valproatni prenatalni model (VPA). Naši eksperimenti su pokazali da varijabilnost uloge $\alpha 5$ GABA_A receptora zavisi od njihovog nivoa ekspresije i lokalizacije, od tipa i protokola kognitivnog zadatka, kao i od vremena farmakološkog testiranja i intenziteta modulacije. Dobijeni su dokazi potencijalnog povoljnog dejstva MP-III-022 u kognitivnim testovima. BTBR model nije pokazao dovoljnu validnost sličnosti, dok je VPA demonstrirao adekvatnu validnost sličnosti i donekle konstruktivnu validnost. Stoga smo odlučili da subakutno primenimo MP-III-022 juvenilnim VPA pacovima. Tretman je doveo do smanjenja GABRA5 i do oštećenja sličnih onima kod ASD-a kod kontrolnih životinja, što otkriva moguću značajnu ulogu ovog receptora u patogenezi bolesti. Najbitnije, naši rezultati su pokazali potencijal PAM $\alpha 5$ GABA_A receptora u sekundarnoj prevenciji i tretmanu ASD-a, s time što bi program razvoja leka zahtevao elemente prilagođavanja koji bi uzimali u obzir i polne razlike.

Ključne reči: $\alpha 5$ GABA_A receptori, pozitivni alosterni modulatori, MP-III-022, učenje i pamćenje, spektar autističnih poremećaja, animalni modeli, BTBR T+ tf/J mišji soj, valproatni prenatalni model

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

The influence of positive modulation of GABA_A receptors containing the $\alpha 5$ subunit on behavioral changes of mice and rats in models of autistic disorders

ABSTRACT

The role of $\alpha 5$ GABA_A receptors in learning and memory is well known. Therefore, we decided to examine the effect of the selective positive allosteric modulator (PAM) MP-III-022 on learning and memory of healthy animals, as well as GABRA5 expression. After demonstrating the needed tolerability and potential procognitive effects, the ligand would be used in an animal model of autism spectrum disorders (ASD). ASD is a neurodevelopmental disorder that encompasses impairments in social communication and interaction, as well as repetitive and restrictive behavior, still without an effective treatment. In this context, animal models that imitate specific disease's symptoms are an excellent tool of translational research. Some of the most frequently used models are BTBR T+ tf/J mouse strain (BTBR) and valproate prenatal model (VPA). Our experiments have shown that the variability of $\alpha 5$ GABA_A receptors' roles depends on its level of expression and localization, on the type and protocol of cognitive tasks, the timing of testing and intensity of pharmacological modulation. Obtained results proved potential beneficial effects of MP-III-022 in cognitive tasks. The BTBR model failed to express sufficient face validity, while VPA demonstrated adequate face validity and in part construct validity. Thus, we decided to subacutely apply MP-III-022 to juvenile VPA rats. In control animals, treatment led to GABRA5 decrease and to impairments similar to ones seen in ASD, suggesting the possible role of this receptor in the pathogenesis of the disease. Most importantly, our results demonstrated the potential of $\alpha 5$ GABA_A receptor PAMs in secondary prevention and treatment of ASD, with the caveat that the drug development program would require adaptations tailored to sex-specific differences revealed.

Key words: $\alpha 5$ GABA_A receptors, positive allosteric modulator, MP-III-022, learning and memory, autism spectrum disorders, animal models, BTBR T+ tf/J mouse strain, valproate prenatal model

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmacology

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. $\alpha 5$ GABA _A receptori	1
1.1.1. $\alpha 5$ GABA _A receptori i procesi kognicije	4
1.2. Spektr autističnih poremećaja.....	5
1.2.1. ASD i neurotransmiteri	9
1.2.1.1. ASD i $\alpha 5$ GABA _A receptori.....	10
1.2.2. ASD i animalni modeli	10
1.2.2.1. BTBR T+ tf/J soj miševa	10
1.2.2.2. Valproatni model autizma	11
2. Ciljevi	13
3. Materijal i metode.....	14
3.1. Ispitivanje uticaja MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju $\alpha 5$ podjedinice ...	14
3.1.1. Morisov vodeni lavirint.....	14
3.1.2. Test prepoznavanja novog objekta.....	15
3.1.3. Test socijalne diskriminacije.....	15
3.1.4. Real-time PCR	16
3.1.5. Statistika.....	16
3.2. Karakterizacija mišjeg modela ASD-a	17
3.2.1. Neurološki testovi	17
3.2.2. Test socijalne interakcije.....	18
3.2.3. Uzdignuti plus lavirint	18
3.2.4. Test spontane lokomotorne aktivnosti	19
3.2.5. Test tri prostorije.....	19
3.2.6. Morisov vodeni lavirint.....	19
3.2.7. Olfaktorna diskriminacija	20
3.2.8. Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris	20
3.2.9. Statistika.....	20
3.3. Karakterizacija pacovskog modela ASD-a	21
3.3.1. Neurološki testovi i masa trudnih ženki.....	21
3.3.2. Test socijalne interakcije.....	22
3.3.3. Uzdignuti plus lavirint	23
3.3.4. Test spontane lokomotorne aktivnosti	23
3.3.5. Test tri prostorije.....	23
3.3.6. Morisov vodeni lavirint.....	23

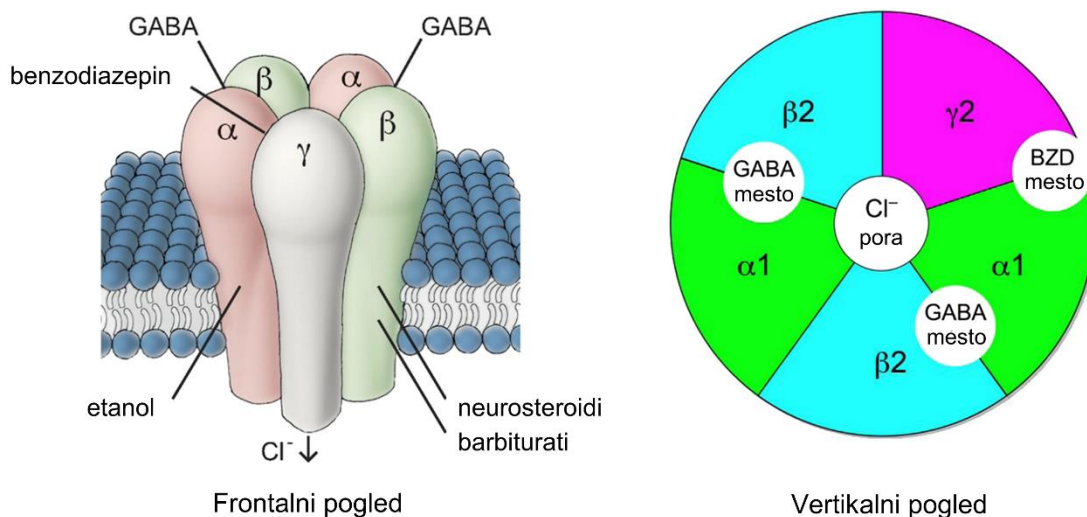
3.3.7.	Olfaktorna diskriminacija	23
3.3.8.	Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris	23
3.3.9.	Neurohemija.....	24
3.3.10.	Statistika.....	24
3.4.	Ispitivanje uticaja primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a.....	25
3.4.1.	Farmakokinetika MP-III-022	25
3.4.2.	Tretman sa MP-III-022	25
3.4.2.1.	Test socijalne interakcije	26
3.4.2.2.	Uzdignuti plus lavirint	26
3.4.2.3.	Test spontane lokomotorne aktivnosti	26
3.4.2.4.	Morisov vodeni lavirint	26
3.4.3.	Primarna ćelijska kultura i oslikavanje kalcijuma (eng. <i>calcium imaging</i>)	26
3.4.4.	Real-time PCR	27
3.4.5.	Statistika.....	28
4.	Rezultati.....	29
4.1.	Uticaj MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju $\alpha 5$ podjedinice.....	29
4.1.1.	Morisov vodeni lavirint.....	29
4.1.2.	Test prepoznavanja novog objekta.....	31
4.1.3.	Test socijalne diskriminacije.....	31
4.1.4.	Real-time PCR	31
4.2.	Mišji model ASD-a	35
4.2.1.	Neurološki testovi	35
4.2.2.	Test socijalne interakcije.....	35
4.2.3.	Uzdignuti plus lavirint	37
4.2.4.	Test spontane lokomotorne aktivnosti	39
4.2.5.	Test tri prostorije.....	41
4.2.6.	Morisov vodeni lavirint.....	43
4.2.7.	Olfaktorna diskriminacija	50
4.2.8.	Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris	50
4.3.	Pacovski model ASD-a	51
4.3.1.	Neurološki testovi i masa trudnih ženki.....	51
4.3.2.	Test socijalne interakcije.....	51
4.3.3.	Uzdgnuti plus lavirint	52
4.3.4.	Test spontane lokomotorne aktivnosti	56
4.3.5.	Test tri prostorije.....	59
4.3.6.	Morisov vodeni lavirint.....	61

4.3.7.	Olfaktorna diskriminacija	65
4.3.8.	Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris	66
4.3.9.	Neurohemija.....	67
4.4.	Uticaj primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a	70
4.4.1.	Farmakokinetika MP-III-022	70
4.4.2.	Bihevioralni rezultati posle tretmana sa MP-III-022	71
4.4.2.1.	Test socijalne interakcije	71
4.4.2.2.	Uzdignuti plus lavirint	71
4.4.2.3.	Test spontane lokomotorne aktivnosti	73
4.4.2.4.	Morisov vodeni lavirint	75
4.4.3.	Oslikavanje kalcijuma.....	77
4.4.4.	Real-time PCR	77
5.	Diskusija	80
5.1.	Uticaj MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju $\alpha 5$ podjedinice.....	80
5.2.	Mišji model ASD-a	83
5.3.	Pacovski model ASD-a	87
5.3.1.	VPA i neurotransmiteri	90
5.4.	Uticaj primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a	93
6.	Zaključci	96
7.	Literatura	97

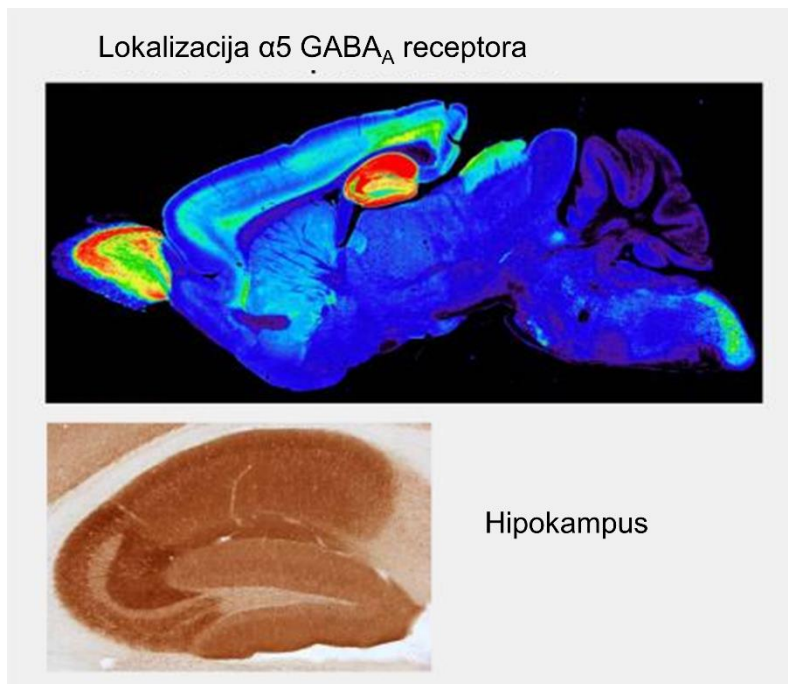
1. Uvod

1.1. $\alpha 5$ GABA_A receptori

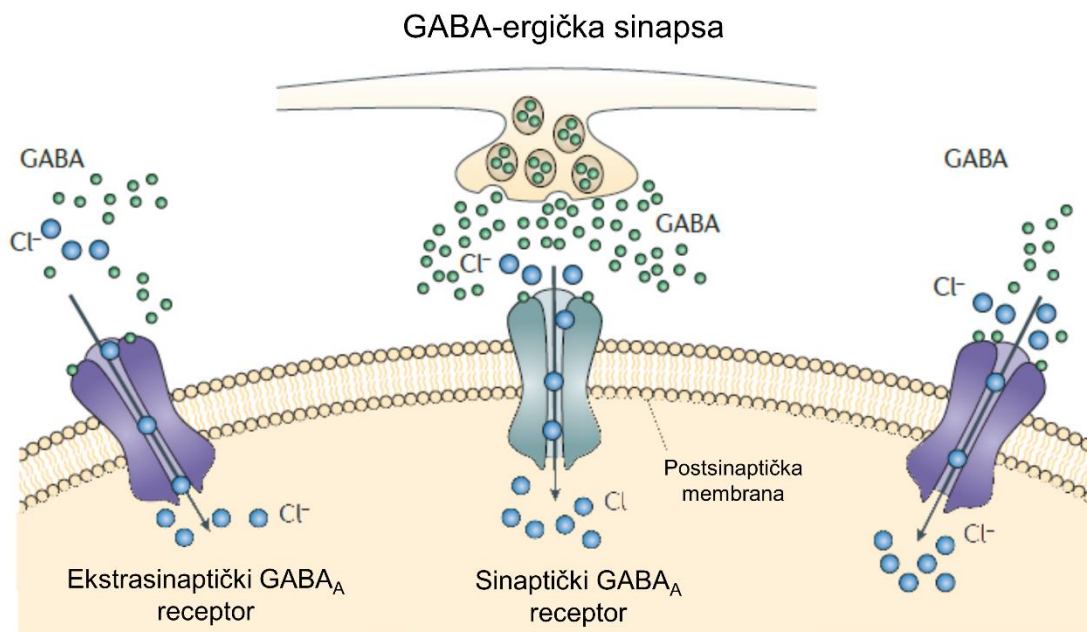
Gama-aminobuterna kiselina (eng. *gamma-aminobutyric acid*, GABA) deluje preko dva tipa receptora u mozgu sisara: jonotropni GABA_A i metabotropni GABA_B receptori. GABA_A receptori su heteropentameri koji se formiraju od 19 različitih podjedinica ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π , $\rho 1-3$). Većina se sastoji od dve α , dve β i jedne γ ili δ podjedinice (Olsen i Sieghart, 2009), (Slika 1). GABA_A receptori koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu ($\alpha 5$ GABA_A receptori) su od posebnog značaja zbog njihovog ograničenog obrasca distribucije i jedinstvenih fizioloških i farmakoloških svojstava (Jacob, 2019, Lee i Maguire, 2014, Lingford-Hughes i sar., 2002). Ovi receptori čine samo oko 5% ukupne populacije receptora u mozgu; visoko su eksprimirani u hipokampusu i olfaktornom bulbusu – čine oko 25% svih hipokampalnih GABA_A receptora (Olsen i Sieghart, 2009), i eksprimira ih preko trećine neurona u internom sloju granularnih neurona u olfaktornom bublbusu (Sur i sar., 1999). Takođe su prisutni u korteksu, subikulumu, hipotalamusu, neuronima simpatikusa, amigdali i kičmenoj moždini (Martin i sar., 2009), (Slika 2). Pre svega su zaduženi za toničnu inhibiciju, koja smanjuje ukupnu ekscitaciju i sinaptičku plastičnost (Bai i sar., 2001, Caraiscos i sar., 2004, Martin i sar., 2010), i to u CA3 i CA1 piramidalnim neuronima i granularnim ćelijama dentatnog girusa u hipokampusu i petom sloju kortikalnih neurona (Glykys i sar., 2008, Herd i sar., 2008). Intrigantno je da su to isti regioni koji su afektovani u čitavom nizu neuropsihijatrijskih poremećaja (Li i sar., 2015). U skladu sa tim, imunohistohemijski nalazi pokazuju izrazito ekstrasinaptičko prisustvo $\alpha 5$ GABA_A receptora (Slika 3), (Brünig i sar., 2002, Crestani i sar., 2002). Međutim, funkcionalne studije ukazuju da ovi receptori takođe imaju ulogu i u fazičnim događajima, u generisanju inhibitorynih postsinaptičkih struja (Collinson i sar., 2002, Prenosil i sar., 2006, Vargas-Caballero i sar., 2010, Zarnowska i sar., 2009). To se slaže sa studijama koje pokazuju da se $\alpha 5$ GABA_A receptori nalaze u sinapsama na dendritima i aksonskom brežuljku (Brünig i sar., 2002, Christie i de Blas, 2002, Serwanski i sar., 2006) i da se skoro polovina njih na površini neurona nalazi u sinapsama tokom prve tri nedelje razvoja neuronskih mreža (Brady i Jacob, 2015).



Slika 1. Šema GABA_A receptora sa obeleženim mestima vezivanja za benzodiazepine (BZD) i GABA-u. Preuzeto i prilagođeno iz (Chen i sar., 2019).



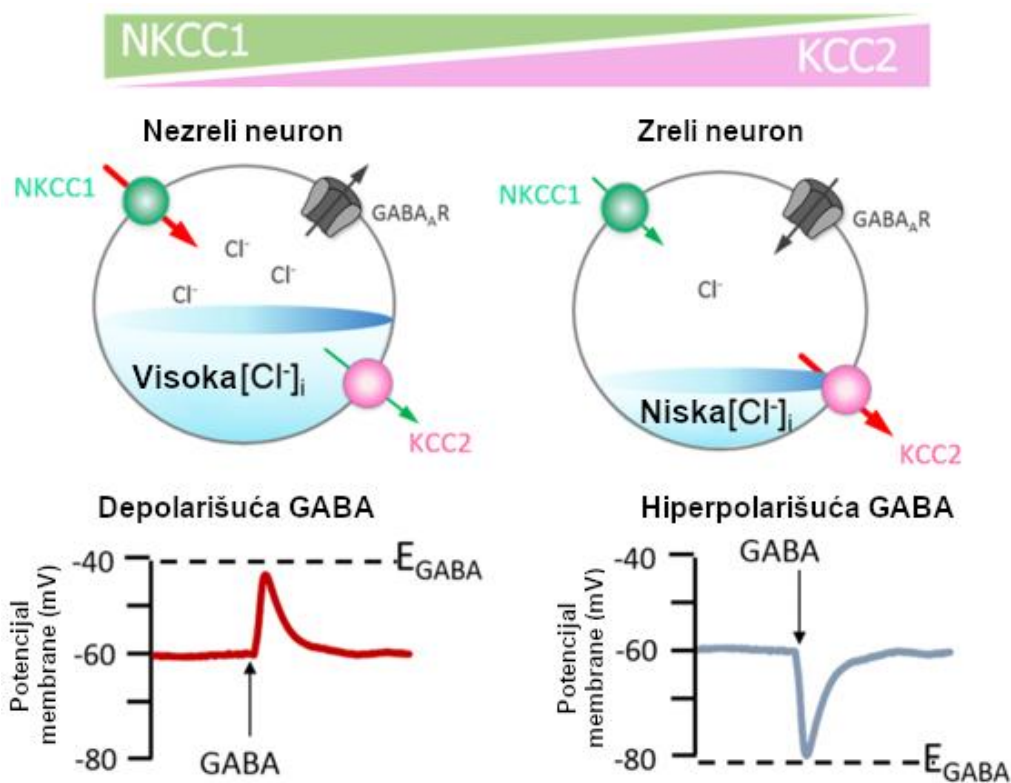
Slika 2. Distribucija $\alpha 5$ GABA_A receptora. Preuzeto i prilagođeno iz (Rudolph i Möhler, 2014).



Slika 3. Efekti otvaranja GABA_A receptora na postsinaptičkoj membrani: povećanje provodljivosti postsinaptičke membrane i promena u potencijalu membrane zahvaljujući kretanju hloridnih jona (hiperpolarizujuća inhibicija). Sinaptički receptori detektuju mM koncentracije GABA-e i posreduju brzi inhibitorni postsinaptički potencijal (fazična inhibicija), dok ekstrasinaptički receptori detektuju μ M koncentracije GABA-e i bitni su za spori inhibitorni postsinaptički potencijal (tonična inhibicija). Preuzeto i prilagođeno iz (Rudolph i Knoflach, 2011).

U poređenju sa inhibitornom ulogom koju GABA_A receptori imaju u zreom nervnom sistemu, u novonastalim mrežama oni promovišu ekscitaciju, koja dovodi do ulaska kalcijuma, rasta dendrita, sinaptogeneze i razvoju glutamatargičkim sinapsi (Ben-Ari i sar., 2007). Ovo je moguće zahvaljujući regulaciji dva glavna hloridna kotransportera: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ kotransporter 1 (NKCC1), koji akumulira

hloridne anjone unutar ćelije, i K^+-2Cl^- kotransporter 2 (KCC2) koji ga izbacuje. U nezrelim neuronima ima više NKCC1 i manje KCC2 što dovodi do toga da ima više hlorida unutar ćelije, i da otvaranje $GABA_A$ receptora dovodi do izlaska hlorida iz ćelije i posledične depolarizacije. Tokom razvića se smanjuje ekspresija NKCC1 i povećava ekspresija KCC2 dok ne dođe do promene, tzv. „GABA switch“, kada otvaranje $GABA_A$ receptora dovodi do ulaska hlorida u adultne neurone i njihove posledične inhibicije (Rivera i sar., 1999), (Slika 4). $GABA_A$ receptori koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu su pogotovo dobro pozicionirani da oblikuju rani razvoj hipokampalnih neuronskih mreža jer su veoma visoko eksprimirani tokom prve dve nedelje postnatalnog razvoja (Bader i sar., 2017, Ramos i sar., 2004, Yu i sar., 2014), i nalaze se i u ekstrasinapsi i u sinapsi. Tokom prve postnatalne nedelje, tonične $\alpha 5$ struje pojačavaju ekscitabilnost ćelija i njihovu sinaptičku aktivnost, olakšavajući indukciju džinovskih depolarišućih potencijala, koji su bitni za sazrevanje mreža (Ben-Ari, 2002, Marchionni i sar., 2007). GABA-ergička aktivacija formiranja veza se takođe događa kod novih neurona koji se integrišu u mrežu u adultnim mozgovima sisara (Ge i sar., 2006). Dodatno je zanimljivo da je pokazano da tokom razvoja hipokampusu pacova, posle prve postnatalne nedelje, $\alpha 5$ $GABA_A$ receptori menjaju svoju lokalizaciju sa some neurona na dendrite. Od potencijalnog je značaja da se u tom periodu isto dešava sa NKCC1 kotransporterom, kao i da se tada događa promena uloge GABA-e, iz ekscitatornog u inhibični neurotransmiter. Može se spekulirati da su ta dva događaja povezana (Ramos i sar., 2004).



Slika 4. $GABA_A$ signalizacija se menja od depolarišuće ka hiperpolarišućoj zahvaljujući promeni ekspresije KCC2 i NKCC1 u mozgu. $Na^+-K^+-Cl^-$ kotransporter 1 (NKCC1) upumpava Cl^- u neurone; njegova ekspresija je visoka u ranom postnatalnom periodu, i smanjuje se tokom sazrevanja. Ekspresija K^+-2Cl^- kotransportera 2 (KCC2), odgovornog za ulazak Cl^- , je suprotna. U embrionskom i ranom postnatalnom razviću $[Cl^-]_i$ je visoka, i samim tim je GABA-ergička signalizacija ekscitatorna; tokom sazrevanja, $[Cl^-]_i$ se smanjuje, što započinje prelazak u hiperpolarizaciju, i GABA-ergička signalizacija postaje inhibična. Preuzeto i prilagođeno iz (Andrews i sar., 2020).

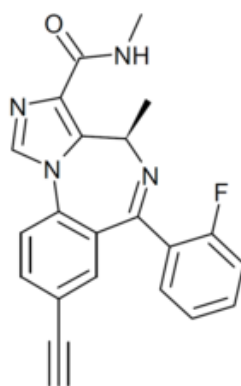
1.1.1. $\alpha 5$ GABA_A receptori i procesi kognicije

Genetičke i farmakološke studije su pokazale da su $\alpha 5$ GABA_A receptori ključni u procesima učenja i memorije. Jedna od prvih studija koja je istraživala doprinos ovih receptora hipokampalnom učenju je pokazala da životinje koji nemaju gen za $\alpha 5$ podjedinicu imaju bolju prostornu memoriju (Collinson i sar., 2002), ali kasnije studije nisu uspele da ponove ovaj nalaz (Cheng i sar., 2006, Martin i sar., 2009). Slično, Crestani i sar. (2002) su pokazali da je smanjenje $\alpha 5$ GABA_A receptora u hipokampusu poboljšalo uslovljenost na strah (Crestani i sar., 2002). Takođe, veliki broj negativnih alosternih modulatora (NAM) $\alpha 5$ GABA_A receptora (jedinjenje 43 (eng. *Compound 43*), 13 (eng. *Compound 13*), $\alpha 5$ IA-II, $\alpha 5$ IA, L-655,708, redom) poboljšali su prostorno učenje u Morisovom vodenom lavirintu ((Chambers i sar., 2003), (Chambers i sar., 2004), (Collinson i sar., 2006), (Dawson i sar., 2006), (Atack i sar., 2006), redom). Prethodno smo pokazali da još jedan NAM, PWZ-029, poboljšava memoriju u testu pasivnog izbegavanja kod pacova (Savić i sar., 2008), u testu uslovljenog straha kod pacova tretiranih skopolaminom, kao i pamćenje objekta u normalnim i skopolaminom-tretiranim pacovima (Milić i sar., 2013). Sa druge strane, PWZ-029 nije imao efekta na normalne i skopolaminom-tretirane pacove u Morisovom vodenom lavirintu (Milić i sar., 2013), ali je poboljšao izvođenje u istom testu animalnog modela Alchajmerove bolesti (Clayton i sar., 2015). Takođe je objavljeno da negativna modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora sa MRK-016 može da poboljša izvođenje u testu kontekstualnog uslovljavanja strahom miševa tretiranih lipopolisaharidom (Eimerbrink i sar., 2019). Tretman sa drugim NAM, RO4938581, imao je povoljan uticaj na prostornu memoriju kod pacova tretiranih skopolaminom, ali ne i normalnih pacova, i poboljšao je izvođenje majmuna u zadatku povraćaja objekta (Ballard i sar., 2009, Knust i sar., 2009). Takođe je uspeo da dovede do poboljšanja kognicije u mišjem modelu Daunovog sindroma, i zatim pređe u klinička ispitivanja (Martínez-Cué i sar., 2013). Međutim, NAM $\alpha 5$ IA koji jeste poboljšao test odloženog pogađanja pozicije kod pacova tretiranih skopolaminom, prostornu memoriju i memoriju za predmete u mišjem modelu Daunovog sindroma (Braudeau i sar., 2011), nije uspeo da poboljša kogniciju kod starijih ispitanika, čak je imao oštećujući efekat na njihovo izvođenje zadatka u testu uparenih asocijacija (Atack, 2010). Nažalost, mali broj ovih jedinjenja je uspeo da uđe u klinička ispitivanja i nijedan nije stigao do tržišta.

Stoga, može se reći da su NAM obećavali poboljšanje memorije u ranim animalnim studijama, ali u kasnijim fazama je postalo očigledno da imaju različite efekte u zavisnosti od uslova i tipa testirane memorije. Dodatno, pokazano je da smanjenje broja $\alpha 5$ GABA_A receptora u hipokampusu ima nepovoljan uticaj na memoriju za lokaciju objekata kod miševa (Prut i sar., 2010), kao i da smanjena ekspresija $\alpha 5$ podjedinice u dentatnom girusu oštećuje memorijske zadatke visoke interferencije (Engin i sar., 2015). Dalje, niz studija je pokazao smanjen nivo $\alpha 5$ GABA_A receptora kod ljudi sa shizofrenijom (Marques i sar., 2020), autizmom (Mendez i sar., 2013), Daunovim sindromom (Bhattacharyya i sar., 2009), i u starosti (Yu i sar., 2006). Pokazano je da je povećana ekspresija $\alpha 5$ GABA_A receptora u metilazoksimetanol acetatnom (MAM) pacovskom modelu shizofrenije dovela do ublažavanja simptoma ove bolesti (Donegan i sar., 2019). Na osnovu ovih nalaza, u prethodnim godinama fokus je počeo da se okreće od negativnih ka pozitivnim alosternim modulatorima (PAM). U skladu sa prethodno navedenim rezultatima dobijenim ispitivanjem uloge $\alpha 5$ GABA_A receptora u shizofreniji, pokazano je da PAM, SH-053-2'F-R-CH₃, smanjuje hiperaktivnost u MAM modelu shizofrenije (Gill i sar., 2011). PAM su se dodatno pokazali korisnim kao pomoć ostarelim pacovima sa oštećenom kognicijom, poput jedinjenja 44 and 6 (eng. *Compound 44*; *Compound 6*), koji su, za razliku od NAM, pokazali obećavajuće rezultate (Koh i sar., 2013). Slično tome, GL-II-73 i GL-II-75 su poboljšali kognitivne deficite izazvane stresom ili starenjem (Prevot i sar., 2019, Prevot i sar., 2020). Ovo prividno neslaganje efekata NAM i PAM pokazuje da značajan broj $\alpha 5$ GABA_A receptora mora da koegzistira u osetljivom balansu, i da narušavanje tog balansa u bilo kom smeru može negativno da utiče na kogniciju (Gill i Grace, 2014).

Jasno je da ligandi koji utiču na $\alpha 5$ GABA_A receptore imaju potencijal da poprave kognitivne deficite u čitavom dijapazonu bolesti centralnog nervnog sistema (CNS). Preduslov za razvoj novih uspešnih terapija je bolje razumevanje bihejvioralnih efekata koje izaziva selektivna aktivacija ove populacije

GABA_A receptora. Do sada je bilo relativno malo studija koje su ispitivale efekat PAM u zdravim, adultnim životinjama, što bi trebalo da bude prvi korak. U našoj laboratoriji smo koristili MP-III-022, metil amid (R) 8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3-karboksilne kiseline (Slika 5), sintetisan u saradničkoj laboratoriji prof. James M. Cook-a, *Department of Chemistry, University of Wisconsin-Milwaukee, SAD*. To je PAM koji se vezuje za benzodiazepinsko mesto vezivanja i poseduje 15, 6, i 12 puta veću selektivnost u vezivanju za $\alpha 5$ GABA_A receptore u poređenju sa GABA_A receptorima koji sadrže $\alpha 1$, $\alpha 2$, ili $\alpha 3$ podjedinice, redom (Stamenić i sar., 2016). Pokazano je da ovaj ligand u rasponu doza 1-10 mg/kg selektivno i postepeno potencira $\alpha 5$ GABA_A receptore u širokom rasponu od 138% do 314%. Od tri glavna bihevioralna domena koja se ispituju na životinjama, testiranje prva dva, motorike i raspoloženja, pokazala je da pacovi posle akutne primene liganda u pomenutom rasponu doza ne pokazuju razlike u pogledu ataksije, sedacije ili anksioznosti u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Stamenić i sar., 2016). Kako nismo otkrili oštećujući efekat MP-III-022, moglo se pristupiti ispitivanju trećeg bihevioralnog domena, kognicije. Potvrda bezbednosti primene, a potencijalno i pozitivnih efekata primene liganda kod zdravih životinja, dovela je do sledećih koraka, a to je primena u animalnim modelima bolesti.



Slika 5. Struktura MP-III-022. Preuzeto iz (Stamenić i sar., 2016).

1.2. Spektar autističnih poremećaja

Spektar autističnih poremećaja (eng. *Autism spectrum disorders*, ASD) spada u najozbiljnije psihijatrijske poremećaje u detinjstvu u pogledu prevalencije, ishoda, uticaja na porodice i troškova po društvo (Buescher i sar., 2014, Elsabbagh i sar., 2012, Fombonne, 2003). Direktni i indirektni troškovi brige o deci i odraslima sa ASD u SAD smatra se da iznose više nego zajednički troškovi lečenja moždanog udara i hipertenzije (Leigh i Du, 2015); cena brige o pojedinačnom pacijentu sa ASD-om tokom celog njegovog života iznosi 1,4 do 2,4 miliona dolara, u zavisnosti od nivoa prisutnosti intelektualnih oštećenja (Buescher i sar., 2014). Novije svetske epidemiološke studije konzistentno pokazuju povećanu prevalenciju ASD-a u poređenju sa onom s kraja 20. veka (Hyman i sar., 2020). Kao rezultat promena u dijagnostičkim kriterijumima, usvajanjem mnogo šireg koncepta (jedna kategorija „ASD“ je zamenila niz podtipova: autizam, Aspergerov poremećaj, pervazivni razvojni poremećaj ne drugačije preciziran, dečki dezintegrativni poremećaj i Retov poremećaj), i prepoznavanjem ove bolesti među ljudima normalne inteligencije, trenutna procena prevalencije za ASD iznosi oko 1% opšte populacije (Ghosh i sar., 2013, Lai i sar., 2013).

Do sad je dobro poznato da prevalenca za ASD pokazuje izrazitu polnu razliku, sa četiri muška pacijenta na jednog ženskog; takođe, skorašnje studije pokazuju polnu razliku u samom fenotipu bolesti - žene imaju slabije ispoljene simptome u odnosu na muškarce. Objašnjenje ovog fenomena se potencijalno nalazi u modulaciji uticaja genetičkih varijacija na fenotip od strane polnih gena i/ili hormona (Werling i Geschwind, 2013).

U petom izdanju Dijagnostičkog i statističkog priručnika mentalnih poremećaja (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM-5, 2013), tradicionalna trijada domena ASD simptoma

(socijalna, komunikativna i atipična/repetitivna ponašanja) redukovana je na dva domena kombinovanjem socijalnih i komunikativnih simptoma u jedan jedinstveni dijagnostički kriterijum – kriterijum A: socijalni/komunikativni deficiti; kriterijum B uključuje restriktivne, repetitivne obrasce ponašanja, interesovanja ili aktivnosti. Ovi simptomi su prisutni od ranog detinjstva (kriterijum C) i ograničavaju ili otežavaju svakodnevni život (kriterijum D) (Association, 2013). Primeri ponašanja koji odgovaraju kriterijumima A i B su dati u Tabeli 1.

Tabela 1. Opis DSM-5 kriterijuma A i B za ASD (Association, 2013)

Domeni	Deficiti	Primeri
A. Perzistentni deficiti u socijalnoj komunikaciji i socijalnoj interakciji u različitim kontekstima, manifestovani opisanim deficitima, trenutno ili prethodno prisutni; mora da ima sva tri simptoma u ovom domenu	1. Socijalno-emosivni reciprocitet	Abnormalan socijalni pristup i nemogućnost održavanja normalne konverzacije; smanjeno pokazivanje interesa, emocija ili afekta; nemogućnost iniciranja ili odgovaranja na socijalnu interakciju
	2. Neverbalno komunikativno ponašanje koje se koristi za socijalnu interakciju	Slabo integrisana verbalna i neverbalna komunikacija, abnormalnosti u kontaktu očima i govoru tela ili deficiti u razumevanju i upotrebi gestikulacije; totalni nedostatak facijalnih ekspresija i neverbalne komunikacije
	3. Razvoj, održavanje i razumevanje međuljudskih odnosa	Teškoće u prilagođavanju ponašanja da odgovara različitim socijalnim kontekstima; teškoće u učestvovanju u imaginarnoj igri ili u pravljenju prijateljstava; nedostatak interesovanja za vršnjake
B. Restriktivni, repetitivni obrasci ponašanja, interesovanja ili aktivnosti, koji se manifestuju sa bar dva opisana deficita, trenutno ili prethodno prisutni; mora da ima 2 od 4 simptoma u ovom domenu	1. Stereotipna ili ponavljajuća motorika, upotreba govora ili objekata	Jednostavne motorne stereotipije, ređanje igraćaka ili okretanje objekata, eholalia, idiosinkratske fraze
	2. Insistiranje na istom, nefleksibilno pridržavanje rutina, ili ritualizovanih obrazaca ili verbalnog i neverbalnog ponašanja	Ekstremno uzrujavanje posle malih promena, teškoće sa promenama, rigidni obrasci razmišljanja, pozdravni rituali, potreba da se koristi ista ruta ili jede ista hrana svaki dan
	3. Veoma restriktivni, fiksni interesi koji su abnormalni u pogledu interesa ili fokusiranosti	Jaka privrženost ili preokupacija neobičnim objektima, izrazito ograničena ili istrajavajuća interesovanja
	4. Hiper- ili hiporeaktivnost na senzorne signale ili neuobičajena zainteresovanost za senzorne aspekte okruženja	Nedostatak vidne reakcije na bol/temperature, negativne reakcije na određene zvukove ili teksture, preterano mirisanje ili dodirivanje objekata, vizuelna fascinacija svetlom ili pokretima

Ključni deficiti, pre svega oni vezani za socijalnu komunikaciju, javljaju se veoma rano. Potrebno je raditi rani pregled (eng. *screening*), pre svega dece za koju postoji visok rizik za ASD, u uzrastu od 18 i 24 meseca starosti prilikom redovnih pedijatrijskih poseta. Ovo je veoma bitno, pošto rana intervencija može i zaista utiče na ishod i razvoj bolesti (Hyman i sar., 2020). Neki od ranih simptoma koji mogu da upozore roditelje o potencijalnom ASD-u su dati u Tabeli 2.

Stanja koja se često javljaju pored ključnih simptoma i koja dodatno otežavaju život pacijenta, njegove porodice i kliničko lečenje uključuju: poremećaje spavanja, epileptične napade, poremećaj nedostatka pažnje i hiperaktivnosti (eng. *attention-deficit/hyperactivity disorder*, ADHD), opsesivno-kompulzivni poremećaj, anksioznost, poremećaje raspoloženja (depresija), gastrointestinalne

poremećaje, poremećaje jedenja, gojaznost, katatoniju, samo-povređivanje, agresivnost (Coury, 2010). Oko 30% dece sa ASD takođe ima intelektualne poremećaje (Baio i sar., 2018) i oko 30% minimalno govori (Tager-Flusberg i Kasari, 2013). Takođe je pokazana prisutnost poremećene percepcije mirisa, ukusa, vida, sluha i dodira (McCormick i sar., 2016, Rogers i sar., 2003). Tako je na primer utvrđeno da autistična deca ne razlikuju prijatne od neprijatnih mirisa i da ova karakteristika možda čak može da se koristi kao novi vid testiranja, a i donekle objasni poremećaje u socijalnom ponašanju (Rozenkrantz i sar., 2015). Gubitak sluha takođe može da se javi uporedo sa ASD (Mandy i Lai, 2016).

Tabela 2. Rani simptomi ASD-a (CDC, 2022)

Simptomi	
Do 12 meseci	Ne odaziva se na ime
Do 14 meseci	Ne pokazuje na predmete da demonstrira svoje interesovanje
Do 18 meseci	Ne igra se igre pretvaranja
Opšte	Izbegava kontakt očima i hoće da bude ostavljeno samo
	Ima problema da razume tuđa osećanja ili da priča o svojim
	Ima zakasneo govor i govorne veštine
	Ponavlja reči ili fraze iznova i iznova (eholalia)
	Daje odgovore nepovezane sa postavljenim pitanjima
	Uznemiravaju ga manje promene
	Ima opsesivne interese
	Ima repetitivne radnje poput mlataranja rukama, ljuljanja ili vrtenja u krug
Ima neuobičajene reakcije na zvuk, miris, ukus, izgled ili dodir	

Uzevši u obzir raznolik set simptoma koji ispoljavaju ASD pacijenti, nije iznenađujuće mišljenje da je više etioloških komponenti uključeno u patogenezu bolesti, uključujući genetičke faktore i faktore sredine (Jeste i Geschwind, 2014). Značajna uloga genetike u autizmu je jasna, sa nivoom genetičkog slaganja od 60% do 92% kod jednojajčanih blizanaca. Skorašnje studije su pokazale genetičku kompleksnost ASD-a i njegovu poligenisku prirodu (Nishimura i sar., 2007, Sebat i sar., 2007, Szatmari i sar., 2007). Iako su *de novo* i nasleđene retke varijante koje imaju velike posledice relativno česte, ne postoji individualna patogenska varijanta prisutna u više od 1% slučajeva sa ASD-om (Bourgeron, 2015, de la Torre-Ubieta i sar., 2016, De Rubeis i Buxbaum, 2015, Lee i sar., 2014, Sanders i sar., 2015). Geni koji doprinose pojavi ASD-a su uključeni u niz bioloških funkcija, koje su generalno prisutne u razvoju i funkcionisanju mozga, uključujući struktuisanje i funkcionisanje sinapsi, unutarćelijsku signalizaciju, transkripcionu regulaciju i remodelovanje hromatina (de la Torre-Ubieta i sar., 2016, De Rubeis i Buxbaum, 2015, Krumm i sar., 2014). Do sada nije identifikovana specifična mutacija koja je jedinstvena za ASD; postoji značajno genetičko preklapanje između ASD-a i drugih neurorazvojnih poremećaja, uključujući mentalnu zaostalost, epilepsiju i shizofreniju (Coe i sar., 2012, Li i sar., 2016, Pescosolido i sar., 2013).

Faktori sredine koji su asocirani sa ASD-om uključuju *in utero* izloženost lekovima, poput valproata i talidomida. Drugi prenatalni uticaji koji mogu da budu asocirani sa povećanim rizikom za ASD uključuju kratke pauze između trudnoća, mnogobrojne trudnoće, gojaznost majke, krvarenje tokom trudnoće, dijabetes tokom trudnoće, veća starost roditelja, infekcije, tj. aktivacija majčinog imunskog sistema (Bromley i sar., 2008, Dodds i sar., 2011, Gardener i sar., 2011, Wu i sar., 2017). Tu su takođe i perinatalni faktori, kao što su prevremeni porođaji, mala težina novorođenčeta, smanjen rast fetusa, hipoksija tokom porođaja, neonatalna encefalopatija, koji su asocirani sa povećanim rizikom za ASD (Gardener i sar., 2011, Guinchat i sar., 2012, Lampi i sar., 2012). Ovi sredinski faktori mogu da predstavljaju nezavisni rizik prenatalnog razvoja mozga, ili mogu da utiču na funkciju gena kod pojedinaca sa genetičkom predispozicijom (Duncan i Keller, 2011). Naučna literatura, uključujući i meta-analizu iz 2014. godine koja je obuhvatila preko 1,25 miliona dece (Taylor i sar., 2014), odbacuje vakcine kao faktor sredine asociran sa povećanim rizikom za ASD. Nema čak ni dokaza da bi imunizacija mogla da pogorša stanje u genetski podložnim podgrupama. Konkretno, vakcina protiv

malih boginja, zauški i rubeola nije asocirana sa povećanim rizikom za ASD, čak ni kod dece koja imaju stariju braću ili sestre sa ASD-om (Jain i sar., 2015).

Razvojni poremećaji u mozgu pacijenata sa ASD-om su primećeni u cerebralnom neokorteksu; strukturama limbičkog sistema, uključujući hipokampus i amigdalnu; bazalnim ganglijama; talamusu; moždanom stablu; cerebelumu. Značajna većina abnormalnosti koje su opisane potiče iz prenatalnog razvoja mozga (Casanova, 2007, Stoner i sar., 2014, Wegiel i sar., 2010). Ovi poremećaji uključuju displaziju, promene u neurogenezi i abnormalnu migraciju neurona (Casanova, 2007, Stoner i sar., 2014, Wegiel i sar., 2010). Nalazi u cerebralnom korteksu uključuju fokalnu disrupciju neuronalnih migracija, minikolumnarne abnormalnosti i varijacije u neuronalnoj gustini (Casanova, 2007, Stoner i sar., 2014, Wegiel i sar., 2010). Nove tehnike skeniranja mozga su dodatno demonstrirale prekidanje puteva u beloj masi i prekid konekcije između moždanih regiona kod pacijenata sa autizmom (Barnea-Goraly i sar., 2004). Dodatne analize su pokazale i asimetrije u mnogobrojnim strukturama pacijenata sa ASD-om (Nickl-Jockschat i sar., 2012). Možda i najčešća neuropatološka promena u autizmu jeste poremećena citoarhitekturna organizacija cerebralnog korteksa, cerebeluma i drugih subkortikalnih struktura (Bailey i sar., 1998, Kemper i Bauman, 2002). Neobična laminarna citoarhitektura sa napakovanim malim neuronima je opisana u klasičnim neuropatološkim studijama, bez primetnih abnormalnosti u eksternoj konfiguraciji cerebralnog korteksa (Kemper i Bauman, 2002). Patologija cerebeluma i moždanog stabla je isto primetno izražena, do tačke da se može reći da je gubitak i atrofija Purkinjeovih ćelija u neocerebelarnom korteksu najčešće prijavljeni neuropatološki nalaz asociran sa ASD-om (Casanova, 2007). Ipak, ne postoji uniformna neuropatologija identifikovana kod ljudi sa ASD-om.

Jedan od češće prijavljenih nalaza je i poremećen rast mozga (Courchesne, 2004). Pre kliničkog početka autizma se izgleda dešavaju dve faze poremećaja moždanog rasta: smanjena veličina glave po rođenju i potom nagli preterani rast između 1-2 i 6-14 meseci starosti (Courchesne, 2004, Courchesne i sar., 2004). Dodatno, ove i druge studije skeniranja mozga su otkrile abnormalan obrazac preteranog rasta mozga i u prednjem režnju, cerebelumu i limbičkim strukturama između 2 i 4 godine uzrasta, koji je potom bio praćen preteranim usporavanjem u rastu mozga (Courchesne, 2004, Courchesne i Pierce, 2005, Schumann i sar., 2004). Studije su takođe pokazale preveliki volumen mozga asociran sa povećanom subkortikalnom belom masom u prednjem režnju i poremećenim obrascem rasta u cerebralnom korteksu, amigdali i hipokampusu (Herbert, 2005). Ćelijska osnova rasta mozga nije još uvek razjašnjena, ali postoji nekoliko teorija. Neke od mogućnosti su povećani broj neurona ili glija ćelija u mozgu, bilo kroz početnu preteranu produkciju ili smanjenje ćelijske smrti. Moguće je čak i da hipertrofija pojedinačnih ćelija dovodi do povećane veličine mozga. Jedna od hipoteza je da i redukcija u "orezivanju" i konsolidaciji sinapsi tokom razvića dovodi do povećanog broja neurita (McCaffery i Deutsch, 2005). Dendritske abnormalnosti su takođe prisutne u ASD-u; smanjeno grananje dendrita u CA1 i CA4 regionu hipokampusa je jedan od najranije primećenih nalaza u autizmu (Raymond i sar., 1996).

Uzeti zajedno, rezultati kliničkih, neuropatoloških studija i studija skeniranja mozga podržavaju teoriju da je ASD poremećaj neuronalno-kortikalne organizacije koji dovodi do poremećaja u procesuiranju informacija na različitim nivoima nervnog sistema, od strukture sinapsi i dendrita do povezanosti puteva i strukture mozga (Geschwind i Levitt, 2007, Minshew i Williams, 2007). Ove neurobiološke promene verovatno utiču na razvojni put socijalnog ponašanja i komunikacije tokom ranih faza detinjstva (Landa i sar., 2007), i izgleda da su pod uticajem i genetičkih i sredinskih faktora. Neke od morfoloških abnormalnosti (na primer, minikolumnarna organizacija) sugerišu da se događaji koji su uključeni u patogenezu ASD-a odigravaju tokom ranog neurorazvoja, moguće tokom prvog i drugog trimestra trudnoće, mada to još nije zasigurno potvrđeno (Pardo i Eberhart, 2007).

1.2.1. ASD i neurotransmiteri

Kod patologije nervnog sistema, očekuje se da su utvrđene strukturne specifičnosti praćene promjenama u neurotransmiterskim sistemima. Kod ASD-a, više istraživanja je potvrdilo prisutnost abnormalnosti u serotonergičkom, glutamatergičkom i GABAergičkim putevima (Cetin, 2015).

Nekoliko studija je otkrilo povećan nivo serotonina u krvi, preciznije u trombocitima pacijenata sa ASD-om (Burgess i sar., 2006, Lam i sar., 2006). Zanimljivo je da je ovo povećanje specifično za autizam ili ASD jer nije primećeno ni u jednom drugom intelektualnom ili neuropsihijatrijskom poremećaju (Marotta i sar., 2020). Skorašnje studije su pokazale smanjeno vezivanje za 5-HT_{2A} receptore u cerebralnom korteksu (Murphy i sar., 2006). Takođe su pronađeni polimorfizmi u promoteru gena za serotoninški transporter SLC6A4 za koje se smatra da su asocirani sa autizmom i volumenom kortikalne sive mase (Cho i sar., 2007, Cook i sar., 1997, Devlin i sar., 2005). Dodatno je gen *ITGB3* predložen kao regulator nivoa serotonina u autizmu na osnovu genetičkih studija asocijacije (Weiss i sar., 2006a, Weiss i sar., 2006b); smatra se da postoji sinergistička interakcija između ovog i prethodno pomenutog gena, *SLC6A4* (Coutinho i sar., 2007). Serotonin igra važnu ulogu u razvoju socijalnog ponašanja tokom trudnoće i ranog detinjstva, tako da promene u njegovom metabolizmu mogu da dovedu do trajnih problema u socijalnim veštinama i održavanju međuljudskih veza (Cetin, 2015).

Dokazi neuronske disfunkcije i čest razvoj epilepsije podržavaju teoriju o povećanoj ekscitatornoj i smanjenoj inhibitornoj aktivnosti u CNS-a kod pacijenata sa ASD (Zimmerman i Connors, 2014).

Ekscitatorna signalizacija preko glutamatergičkih receptora (GluR) ima verovatnu ulogu u kortikalnom razvoju (Manent i Represa, 2007), sa potencijalom učesća u patogenezi ASD-a. Skeniranje gena-kandidata i analize asocijacije su pokazale da je niz glutamatergičkih receptora asociran sa ASD-om: GluR6 (Jamain i sar., 2002), GluR8 (Serajee i sar., 2003), podjedinica za N-metil-D-aspartat (NMDA) receptor 2, GRIN2A (Barnby i sar., 2005). Ispitivanje nivoa informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) i proteina u mozgu pacijenata sa ASD-om je pokazalo značajno povećanje u ekspresiji nekoliko gena povezanih sa glutamatergičkim putevima, uključujući transporter 1 za ekscitatorne aminokiseline i glutamatni receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (AMPA), (Purcell i sar., 2001). Kako je moguće da GluR-i učestvuju u finom podešavanju sinaptičke aktivnosti (Derkach i sar., 2007), moguće je da poremećaji glutamatergičke aktivnosti utiču na kortikalni razvoj i plastičnost.

Što se tiče GABA, kao glavnog inhibitornog neurotransmitera, pokazano je da se u periodu od 15. do 30. postnatalnog dana kod pacova GABAergički sistem stabilizuje i dostiže vrednosti adultnog. Međutim, ispitivanje pacova valproatnog modela autizma u juvenilnom periodu je pokazalo smanjenu ekspresiju KCC2, što dovodi do povećanja unutarćelijskog hlora i hiperaktivnosti (Tyzio i sar., 2014). Smanjena funkcija i/ili ekspresija GABA_A receptora se povezuju sa ASD (Ma i sar., 2005, Menold i sar., 2001, Piton i sar., 2013). Konkretno, najčešća varijacija broja ponovaka (eng. *copy number variation*) koja se povezuje sa ASD je duplikacija q11.2-13 regiona 15. hromozoma (Hogart i sar., 2010, Moreno-De-Luca i sar., 2013). Ovaj region sadrži gene za $\alpha 5$, $\beta 3$ i $\gamma 3$ podjedinicu GABA_A receptora (Klauck, 2006). *Post-mortem* analize moždanog tkiva osoba sa ASD su pokazale smanjeni nivo i iRNK i proteina za nekoliko podjedinica GABA_A receptora, uključujući $\alpha 5$ i $\beta 3$ podjedinicu (Blatt i sar., 2001, Fatemi i sar., 2009, Fatemi i sar., 2010). Što se tiče farmakoloških studija, tretman sa niskom dozom neselektivnog PAM-a GABA_A receptora, klonazepamom, ublažio je deficite u socijalnom ponašanju i memoriji straha u mišjem modelu Dravetovog sindroma, kao neuropsihijatrijskog poremećaja koji ima određene obrasce ponašanja prisutne i u ASD-u (Han i sar., 2012). Pored toga, PAM za $\alpha 2$ i $\alpha 3$ GABA_A receptore, L-838,417, popravio je deficite u socijalnoj interakciji, repetitivnom ponašanju i prostornom učenju u mišjem modelu ASD-a (Han i sar., 2014).

1.2.1.1. ASD i $\alpha 5$ GABA_A receptori

Kod pacijenata sa ASD nađene su retke varijacije u genu za $\alpha 5$ podjedinicu. Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida *GABRA5* su asocirani i sa predispozicijom i sa fenotipskim manifestacijama kod dece i adolescenata sa ASD-om među pripadnicima Han etničke grupe u Kini (Yang i sar., 2017). Pozitronska emisijska tomografija (PET) je pokazala smanjeno vezivanje liganada selektivnih za $\alpha 5$ GABA_A receptore u amigdali i nukleus akumbensu, regionima mozga koji učestvuju u socijalnoj interakciji i ponašanjima vezanim za sistem nagrade (Mendez i sar., 2013). Miševi koji nemaju gen za $\alpha 5$ podjedinicu (*Gabra5*^{-/-}) pokazuju nekoliko različitih fenotipova, uključujući ponašanje slično autizmu, i ujedno i poboljšano i pogoršano izvođenje pojedinih testova učenja i memorije (Martin i sar., 2010). U poređenju sa kontrolnim miševima, *Gabra5*^{-/-} miševi imaju smanjeni broj socijalnih kontakata, oštećene funkcije realizacije, smanjenu vokalizaciju, i od strane majke smanjeno prikupljanje prethodno izmeštenih mladunaca (Zurek i sar., 2016). Sve pomenute dosadašnje studije sugerišu da bi ligandi koji deluju kao PAM $\alpha 5$ GABA_A receptora mogli da ublaže simptome ASD (Zurek i sar., 2016).

1.2.2. ASD i animalni modeli

Dosadašnji tretmani za pacijente sa ASD-om su uključivali: psihostimulanse (metilfenidat, deksmetilfenidat, soli amfetamina, lisdeksamfetamin, deksamfetamin), $\alpha 2$ adrenergičke agoniste (klonidin, guanfacin), atipične antipsihotike druge generacije (aripirazol, risperidon), selektivne inhibitore preuzimanja serotonina (fluvoksamin, citalopram), antiepileptike – stabilizatore raspoloženja (valproinska kiselina i natrijum divalproeks). Pomenuta farmakoterapija je uvođena u zavisnosti od simptoma pacijenata, pre svega za hiperaktivnost, iritabilnost i disruptivno ponašanje (poput agresivnosti i samopovređivanja), repetitivno ponašanje, anksioznost i depresiju (Hyman i sar., 2020). Dodatne intervencije se pružaju kroz edukativne prakse, razvojne terapije i bihevioralne intervencije. Međutim, za sada nije dostupan nijedan specifični i delotvorni lek za ASD (Lai i sar., 2013, Mohiuddin i Ghaziuddin, 2013), tako da postoji hitna potreba za novim tretmanima koji mogu da ublaže simptomatologiju bolesti, posebno u socijalnom domenu ispoljavanja.

U ovom kontekstu, animalni modeli koji imitiraju specifične simptome bolesti su odličan alat translacionih istraživanja. Prvo, oni omogućavaju disekciju uloga genetičkih i sredinskih poremećaja u patogenezi ASD, čime obezbeđuju bolje razumevanje bioloških mehanizama koji čine osnovu ključnih simptoma bolesti. Drugo, oni čine mogućim da se razjasni veza između izmenjenih moždanih funkcija u ASD i ponašanja. Konačno, oni su neophodni da bi se validirale nove terapijske mete i sposobnost potencijalnog leka da suzbije i/ili spreči simptome (Servadio i sar., 2015).

Validnost je ključan kriterijum kada se procenjuje korisnost animalnih modela. Idealni animalni model bi trebalo da podražava bolest u njenoj simptomatologiji, etiologiji i tretmanu, odnosno da ima validnost sličnosti, konstruktivnu validnost i prediktivnu validnost (Blanchard i sar., 2013, Willner, 1984). Očigledno, imajući u vidu multifaktorsku etiologiju ASD i veliku fenotipsku varijaciju unutar svakog domena simptoma, ne postoji animalni model koji može da istovremeno objedini sve molekularne, ćelijske i bihevioralne odlike ASD. Bolji pristup u istraživanju je fokus na domene ponašanja životinja koji odgovaraju ključnim dijagnostičkim simptomima bolesti (Crawley, 2012).

1.2.2.1. BTBR T+ tf/J soj miševa

Od svih animalnih modela zasnovanih na genetičkim faktorima, jedan od najčešće korišćenih je BTBR T+ tf/J (BTBR), visokosrodni (eng. *inbred*) soj miševa (Slika 6).

U pitanju je spontani genetički soj koji se od 1997. godine koristio za istraživanja gojaznosti (Chadman KK, 2012), a 2007. godine su Moy i saradnici objavili uporedni pregled socijalnog ponašanja i reverznog učenja 10 visokosrodnih sojeva, sa zaključkom da je BTBR soj najbolji

kandidat za model autizma (Moy i sar., 2007). Ovaj soj ima visoku validnost sličnosti. Prvo, prisutni su komunikacioni deficiti – kada se odvoje od svoje majke i legla, BTBR mladunci pokazuju neuobičajeni obrazac ultrasonične vokalizacije (USV) i oglašavaju se više i duže u poređenju sa kontrolnim C57BL/6J (C57BL) mladuncima (Scattoni i sar., 2008). Ovo može da podseća na atipičnu vokalizaciju i intenzivnije i duže plakanje koje je prisutno kod neke autistične odojčadi (Johnson, 2008). Komunikativni i socijalni deficiti koje pokazuju BTBR životinje perzistiraju tokom razvoja. Juvenilni BTBR miševi imaju nizak nivo socijalnog ponašanja u svom kavezu (Babineau i sar., 2013), oštećeno socijalno ponašanje (McFarlane i sar., 2008) i smanjeno socijalno istraživanje, asocirano sa smanjenom USV (Scattoni i sar., 2013). Kao adulti, imaju smanjeno socijalno prilaženje (McFarlane i sar., 2008), poremećen transfer preferencije za određenu hranu od drugog miša (eng. *social transmission of food preference*), (McFarlane i sar., 2008), izmenjenu socijabilnost (Jasien i sar., 2014), manje obeležavanje teritorije kao odgovora na miris (eng. *scent marking*) i minimalne USV odgovore na ženski urin (Wöhr i sar., 2011). Dalje, i juvenilni i adultni BTBR miševi pokazuju izraženu perseveraciju, kao što je kontinualno pokušavanje okretanja točka, čak i kada je zaglavljen (Karvat i Kimchi, 2012). Karakteristika soja je njihova visoka sklonost ka timarenju (Brodkin i sar., 2014, McFarlane i sar., 2008). Postojala je bojazan da je timarenje posledica svraba koji je povezan sa gubitkom dlake. Uzrok tome je što BTBR miševi imaju *tufted* (“bokorast”), *tf* lokus, tj. mutaciju zbog koje imaju karakteristiku da im se u ciklusima gubi dlaka na telu (Lyon, 1956). Međutim, istraživanja su potvrdila da broj opalih dlaka tokom timarenja ne pokazuje korelaciju ni sa jednom od varijabli timarenja koje su praćene, čime se sugerise da povećani intenzitet timarenja nije posledica svraba, već može da bude primer repetitivnog ponašanja koje su potencijalno izazvali neuropsihijatrijski poremećaji (Pearson i sar., 2011).



Slika 6. Adultni BTBR T + *tf*/J miš na kome se vidi karakteristično gubljenje dlake u talasima, koji kreće od dorzalne površine glave i nastavljaju se ventralno. Preuzeto iz (Ellis i sar., 2012).

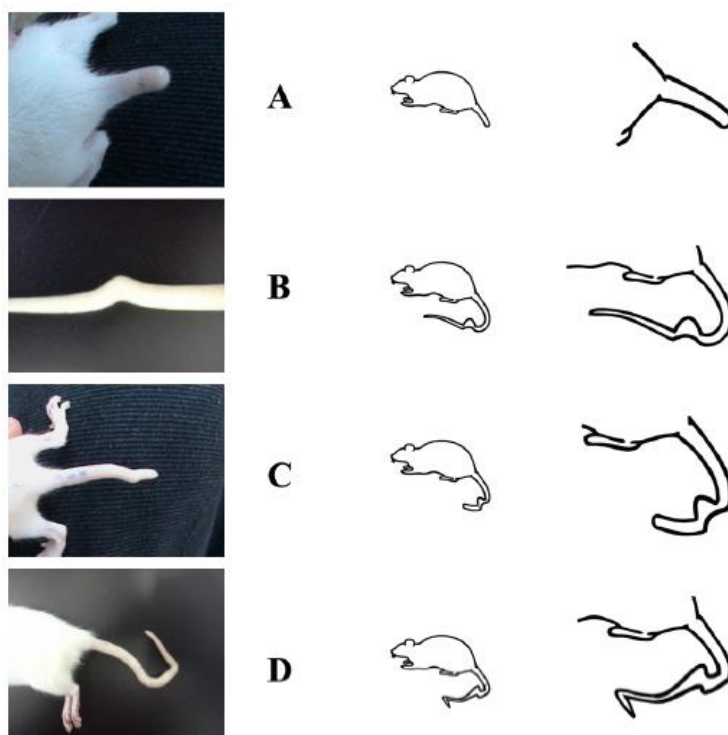
1.2.2.2. Valproatni model autizma

Najčešći modeli ASD na glodarima zasnovani na sredinskim faktorima, za koje se zna da indukuju bolest kod ljudi, koriste prenatalnu izloženost infekcijama ili farmakološkim agensima, kao što je valproinska kiselina, u vreme zatvaranja neuralne tube. Valproat je lek sa antikonvulzivnim dejstvom i stabilizator raspoloženja, koji se primarno propisuje za lečenje epilepsije i bipolarnog poremećaja (Johannessen i Johannessen, 2003). Uprkos velikoj primeni i kliničkoj efikasnosti, ovaj lek ima dobro poznata teratogena svojstva. Njegovo korišćenje se povezuje sa rizikom izazivanja više manjih i većih malformacija u potomstvu (Jentink i sar., 2010, Kozma, 2001), a pored toga, epidemiološke studije su pokazale da je izloženost efektima valproata tokom trudnoće faktor rizika za ASD (Christianson i sar., 1994, Williams i Hersh, 1997, Williams i sar., 2001). Na osnovu ovih nalaza, prenatalna izloženost valproatu kod glodara je validirana i standardizovana u više laboratorija, i postala je najčešće korišćeni model ASD izazvan faktorima sredine kod pacova (Markram i sar., 2008, Rodier i sar., 1996) i miševa (Gandal i sar., 2010, Wagner i sar., 2006).

Uprkos dobro poznatim posledicama izlaganja valproatu tokom trudnoće, mehanizam koji dovodi do njih je još uvek nepoznat. Mehanizam dejstva ovog leka uključuje povećanje GABAergičke aktivnosti, smanjenje ekscitatorne transmisije, modifikaciju monoamina, kao i modulaciju voltažno

zavisnih natrijumovih i kalcijumovih kanala (Johannessen i Johannessen, 2003). Međutim, izgleda da ovi mehanizmi ne korelišu sa promenama u mozgu povezanim sa ASD (Jessberger i sar., 2007). Trenutno najšire prihvaćena teorija sugerise da bi valproat mogao da deluje kao inhibitor histon deacetilaze u vreme zatvaranja neuralne tube. Modulacija hromatinske strukture koju kontroliše histon deacetilaza je bitna za regulaciju transkripcije i diferencijacije neuralnih matičnih ćelija, tako da bi, nakon izlaganja valproatu, funkcije u koje su uključene ove ćelije mogle biti kompromitovane (Servadio i sar., 2015). Poremećaji tokom zatvaranja neuralne tube mogu da dovedu do spine bifide (Detrait i sar., 2005), koja se kod glodara demonstrira malformacijama repa, karakterističnim markerom valproatnog animalnog modela (Saft i sar., 2014), (Slika 7). Dodatno, zatvaranje neuralne tube se kod ljudi događa u prvom trimestru (Cavalli, 2008); prethodno je pomenuto da je moguće da se promene koje dovode do patogeneze ASD-a događaju upravo u tom periodu (Pardo i Eberhart, 2007). Kod glodara se neuralna tuba zatvara 11. dana gestacije (Altman i Bayer, 1980). Pokazano je da je tretiranje trudnih ženki valproatom 12,5 dana gestacije dovodi do potomaka koji pokazuju moždane abnormalnosti koje liče na one koje su prisutne kod autističnih pacijenata (Rodier i sar., 1997).

Što se tiče validnosti ovog modela, životinje izložene valproatu pokazuju većinu promena u ponašanju koje se viđaju kod autističnih pacijenata. Konkretno, ove životinje imaju poremećeno socijalno ponašanje kada se testiraju u testu socijalne igre u detinjstvu (eng. *juvenile play test*) (Chomiak i sar., 2010, Schneider i Przewłocki, 2005), testu socijalne interakcije u odraslosti (Markram i sar., 2008, Schneider i Przewłocki, 2005), i testu socijabilnog ponašanja u tri prostorije (eng. *three-chamber sociability test*), (Baronio i sar., 2015, Kerr i sar., 2013). Takođe, pokazane su promene u broju USV-ova koje emituju mladunci odvojeni od gnezda (Gandal i sar., 2010). Pored poremećaja u socijalnom ponašanju i komunikaciji, otkrivena su i repetitivna i stereotipna ponašanja kod životinja prenatalno izloženih efektima valproata, kao što su povećanje vremena provedenog u pretresanju šuške i repetitivno timarenje (Baronio i sar., 2015, Kim i sar., 2014, Mehta i sar., 2011).



Slika 7. Kategorije poremećaja repa kod mladunaca pacova prenatalno izloženih valproatu. A – skraćeni rep, B – presavijen u sredini, C – skraćeni i savijen rep, D – rep sa dvostrukim presavijanjem. Preuzeto iz (Saft i sar., 2014).

2. Ciljevi

Predmet ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje dejstva PAM-a $\alpha 5$ GABA_A receptora, MP-III-022, nakon primene na zdravim životinjama u kognitivnim testovima i posle primene u animalnom modelu autizma izabranom po ispunjavanju kriterijuma validnosti sličnosti. U skladu sa tim definisani su sledeći ciljevi:

1. Ispitivanje MP-III-022 u različitim testovima memorije koji ne uključuju uslovljavanje (da bi se izbegli dodatni efekti nagrade ili kazne) i na nivo GABRA5 iRNK u odabranim regionima mozga;
2. Ispitivanje validnosti sličnosti BTBR animalnog modela, i ukoliko ti kriterijumi budu zadovoljeni, ispitivanje konstruktivne sličnosti u nivou neurotransmitera;
3. Ispitivanje validnosti sličnosti valproatnog animalnog modela, i ukoliko ti kriterijumi budu zadovoljeni, ispitivanje konstruktivne sličnosti u nivou neurotransmitera;
4. Ispitivanje efekata primene MP-III-022 na izabrani model ASD-a u pogledu ponašanja, neuronske funkcije i ekspresije izabranih gena.

3. Materijal i metode

Istraživanja su sprovedena koristeći albino pacove *Wistar* soja, C57BL i BTBR miševе. Životinje korišćene za uspostavljanje kolonije su kupljene od Jackson Laboratory, SAD (BTBR soj miševa) i od Vojne farme, Beograd (*Wistar* pacovi i C57BL miševi). Nakon toga, životinje su gajene u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta u standardnim laboratorijskim uslovima ($21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, relativna vlažnost 40% – 45%), po 3-5 životinja u standardnim kavezima za pacove ili miševе od pleksiglasа, sa slobodnim pristupom hrani (Veterinarski institut, Zemun) i česmenkoj vodi. Držani su na 12 h : 12 h dnevno/noćnom ciklusu sa uključivanjem svetala (120 lx) u 6 h ujutru. Negovanje životinja i većina bihevioralnih testova (sem ako nije drugačije naznačeno) je sprovedeno tokom dnevne faze. Ponašanje životinja u *in vivo* testovima praćeno je kamerom na plafonu povezanom sa ANY-maze softverom (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD) koji omogućava analizu praćenog ponašanja. Svi *in vivo* eksperimenti sprovedeni su u namenskim prostorijama vivarijuma Farmaceutskog fakulteta. U eksperimentima je korišćen ligand MP-III-022 (MP), pre primene životinjama suspendovan u odgovarajućem farmakološki inertnom vehikulumu (VEH; 85% destilovana voda, 14% propilen glikol, 1% Tween 80).

3.1. Ispitivanje uticaja MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju $\alpha 5$ podjedinice

Eksperimenti su sprovedeni na 7 – 9 *Wistar* mužjaka po testu, 9 – 11 nedelja starosti (270 g – 330 g), osim juvenilnih pacova koji su korišćeni za test socijalne diskriminacije (3 – 4 nedelje starosti, 18 *Wistar* mužjaka po testu). Životinje su primale VEH ili MP i.p. u zapremini od 2 ml/kg telesne mase, 20 minuta pre bihevioralnog testa. Testirane su prethodno ustanovljene doze od 1 mg/kg ili 2,5 mg/kg ili 10 mg/kg (MP1, MP2,5, MP10) (Stamenić i sar., 2016).

Životinje smo testirali u 3 različita bihevioralna testa: Morisov vodeni lavirint za prostornu memoriju, test prepoznavanja novog objekta za vizuelnu memoriju i test socijalne diskriminacije za socijalnu memoriju. Svi testovi su odrađeni za kratkotrajnu i dugotrajnu memoriju. Dodatno, pored 3 testirane doze, odlučili smo da testiramo uticaj ponovljenje najmanje doze u testu prepoznavanja novog objekta i testu socijalne diskriminacije, na osnovu rezultata dobijenih sa ovom dozom u Morisovom vodenom lavirintu.

Odvojena kohorta bihevioralno naivnih životinja iste starosti je korišćena za određivanje relativne količine iRNK uz pomoć reakcije lančane polimerizacije u realnom vremenu (eng. *real-time polymerase chain reaction*, Real-time PCR).

3.1.1. Morisov vodeni lavirint

Vodeni lavirint čini crni kružni bazen (prečnik 200 cm, visina 60 cm) sa uniformnom unutrašnjom površinom. Bazen se puni vodom temperature $23\text{ °C} (\pm 1\text{ °C})$ do visine od 30 cm. Ciljna platforma od crne plastike (15 cm \times 10 cm) je potopljena 2 cm ispod površine vode. Platforma je nevidljiva za životinje jer je iste boje kao zid bazena. U okolini bazena nalazi se mnogo orjentira (vrata, cevi na zidovima i plafonu, kamera iznad centra bazena). Softver za praćenje virtualno deli bazen u 4 kvadranta, 3 koncentrična kruga koja obrazuju prstenove i ciljni region koji se nalazi oko platforme, u preseku severoistočnog kvadranta i središnjeg prstena (Savić i sar., 2009). Centralni krug zauzima 10%, središnji prsten 40% i periferni prsten 50% ukupne površine bazena. U eksperimentalnoj sobi je indirektno svetlo koje potiče od belih neonskih lampi koje se nalaze na zidovima ispod ravni gornje ivice bazena.

Za ispitivanje kratkotrajne memorije životinje su testirane u jednom danu. Imale su četiri pokušaja od maksimalno 120 s da nađu platformu koja se nalazila u sredini severoistočne strane bazena. Pacov

se postavljao u vodu (okrenut ka ivici bazena) svaki put sa iste startne pozicije, jugozapadne, koja je najdalja od platforme.

Radi testiranja dugotrajne memorije, pacovi su tokom 5 uzastopnih dana imali eksperimentalni blok od 4 pokušaja, takođe maksimalnog trajanja 120 s (akviziciona faza). Pacovi su spuštani u bazen sa jedne od četiri nasumično odabrane pozicije: jug, zapad, severozapad i jugoistok, dok je platforma bila isto pozicionirana kao prilikom ispitivanja kratkotrajne memorije. Šestog dana pacovi su pušteni u probni test u trajanju od 60 s, bez platforme u bazenu, sa jugozapadne pozicije. Tretmani su primenjivani jednom dnevno pre svakog eksperimentalnog bloka, sem pre probnog testa koji je izveden bez tretmana.

U oba testa, eksperimentator je vodio pacova do platforme u slučaju da nije uspeo da je nađe tokom 120 s. Pacovu koji je uspeo da nađe i da se popne na platformu je dozvoljeno da ostane na njoj 15 s. Nakon završenog plivanja pacovi su brisani peškirom i vraćani u kavez.

Parametri koji su bili izabrani za praćenje su: latencija i efikasnost puta za test kratkotrajne memorije i akvizicionu fazu testa dugotrajne memorije, kao i vreme provedeno u ciljnom regionu i efikasnost puta do ciljnog regiona tokom probnog testa. Efikasnost puta je odnos najkraće moguće putanje do platforme i stvarnog pređenog puta životinje.

3.1.2. Test prepoznavanja novog objekta

Test prepoznavanja novog objekta je izvođen u drvenoj kutiji (65 cm × 45 cm × 45 cm) u prostoriji sa indirektnim belim svetlom jačine 20 lx (Timić Stamenić i sar., 2015). Dan pre početka eksperimenta, životinje se habituiraju u praznoj aparaturi u trajanju od 10 min. Sam eksperiment se sastoji iz dve faze, familijarizacije i testiranja. Tokom familijarizacije 2 identična objekta se pozicioniraju 15 cm od ivica kutije i 25 cm udaljeni jedan od drugog. Pacov se postavlja u aparaturu između dva objekta okrenut suprotnom zidu i ostavlja da istražuje tokom 5 min. Životinja se onda uklanja iz aparature i vraća se u matični kavez na 30 min za ispitivanje kratkotrajne memorije ili na 24 h za ispitivanje dugotrajne memorije. Za fazu testiranja, jedan od poznatih objekata je zamenjen sa novim; pacov je vraćen u aparaturu i pušten je da istražuje 3 min. Softver je beležio eksploraciju objekta kad bi se njuška životinje našla u njegovoj neposrednoj blizini (2 cm ili manje). Za objekte su korišćeni Rubikova kocka i limenka Coca-Cola-e. Svaki objekat je bio dostupan u triplikatu i sve kombinacije objekata i lokacije objekata su korišćene u balansiranom rasporedu da se smanji uticaj potencijalne preferencije ka određenom objektu ili lokaciji. Nakon svake faze, aparatura i objekti su brisani sa 70% etanolom da bi se umanjio uticaj olfaktornih stimulusa.

Životinje su tretirane 20 min pre familijarizacije tokom ispitivanja i kratkotrajne i dugotrajne memorije. Odrađen je još jedan test dugotrajne memorije samo sa najmanjom dozom, 1 mg/kg MP-III-022. Tretman (MP ili VEH) su davani 20 min i pre familijarizacije i pre testiranja u svim kombinacijama, dajući 4 eksperimentalne grupe: VEH/VEH, VEH/MP1, MP1/VEH, MP1/MP1.

Za analizu je korišćen diskriminacioni indeks (vreme provedeno u eksploraciji novog objekta/zbir vremena provedenih u eksploraciji poznatog i novog objekta tokom faze testiranja).

3.1.3. Test socijalne diskriminacije

Test socijalne diskriminacije poredi vreme koje pacov provodi istražujući poznatog nasuprot novog juvenilnog pacova (Terranova i sar., 2005). Procedura se izvodi u noćnoj fazi, 18 h do 21 h, pod crvenim svetlom (20 lx). Testiranje se sastoji od dva perioda. Na početku prvog perioda jedan juvenilni pacov se postavlja u kavez ispitivanog pacova i njihovo ponašanje se snima tokom 5 min. Nakon toga, juvenilni pacov se uklanja iz kaveza i ispitivani pacov ostaje sam tokom 30 min (za ispitivanje kratkotrajne memorije) ili 24 h (za ispitivanje dugotrajne memorije). Potom sledi drugi period, tokom koga se u kavez ispitivanog pacova vraća poznati juvenilni pacov, i stavlja drugi, novi juvenilni pacov. Njihovo ponašanje se snima 3 min. Ručno se meri koliko je ispitivani pacov proveo

vremena ispitujući novog, a koliko poznatog juvenilnog pacova (prati se anogenitalno njuškanje, lizanje, blisko praćenje i kontakt šapicama). Istraživaču koji prati ponašanje nije poznat tretman kojem je izložen ispitivani pacov. Različit par juvenilnih pacova prezentovanom je svakom testiranom pacovu. Testirani pacovi su 24 h pre testa bili izdvajani u zasebne kaveze, tretirani 20 min pre prvog perioda. U dodatnom, trećem eksperimentu se ispitivala samo najmanja doza, i tretman (MP ili VEH) je davan 20 min pre i prvog i drugog perioda, čineći 4 grupe, isto kao što je prethodno opisano za test prepoznavanja novog objekta.

Za analizu je korišćen diskriminacioni indeks dobijen deljenjem vremena koje je testirani pacov proveo sa novim juvenilnim pacovom sa vremenom provedenim sa poznatim pacovom tokom drugog perioda.

3.1.4. Real-time PCR

Korišćeni pacovi (6 – 8 po grupi) su bili netretirani (kontrolna grupa, eng. *control* (CTRL)) ili su primili MP1 ili MP10 i žrtvovani nakon 30 min ili 24 h. Njihovi mozgovi su uklonjeni i postavljeni u matriks za mozak (Zivic Instruments). Na osnovu priručnika „Pacovski mozak u stereotaksičnim koordinatama” (*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos i Watson, 2005)), izabrani su režnjevi mozga koji su isečeni i izvađeni koristeći matriks za mozak i žilete. Strukture od interesa (prefrontalni korteks, CA1 i CA2 regioni hipokampusa) isečene su iz režnjeva upotrebom skalpela (prefrontalni korteks) i posebno napravljene modle prečnika 1 mm (CA1 i CA2). Ti uzorci su čuvani na -80 °C do postupka izolacije RNK. Prvi korak je bila homogenizacija ultrazvučnim homogenizerom u trizolu (TRI Reagent, Thermo Scientific AM9738, SAD). Nakon kratkog centrifugiranja, dodavan je hloroform, 3 M natrijum acetat (Sigma Aldrich, Nemačka) i glikogen (Thermo Scientific R0551). Smeša se vorteksovala i potom centrifugirala (15 min, 15.000 g, 4 °C). Uzimao se supernatant koji se potom ispirao tako što se dodavao redom izopropanol, 70% etanol i 100 % etanol (Sigma Aldrich). Nakon dodavanja svakog alkohola, uzorci su bili vorteksovani, centrifugirani (10 min, 15.000 g, 4 °C) i izdvojen je supernatant. Samo u poslednjem koraku se čuvao talog, a supernatant se odbacivao i višak etanola se ostavljao da ispari. Talog se potom rastvarao u dvostruko prečišćenoj vodi. Merenje koncentracije dobijene RNK je pokazalo da su uzorci imali oko 500 ng/μl RNK.

Izolovana RNK je potom podvrgnuta DNaznom tretmanu, radi uklanjanja zaostale dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), koristeći kit sa DNazom (DNase I, RNase-free kit, Thermo Scientific EN0523). Odmah nakon toga je RNK prevedena u komplementarnu DNK uz pomoć komercijalno dostupnog kita (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Thermo Scientific 4374967). Sama reakcija Real-time PCR-a je izvedena koristeći kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific 4367659) pri standardnim uslovima na aparatu StepOnePlus Real-time PCR System's (Thermo Scientific). Korišćeni su sledeći prajmeri: β-aktin *forward* 5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3', *reverse* 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3' (Faseleh Jahromi i sar., 2017) i GABRA5 *forward* 5'-GCCTTGGAAGCAGCTAAAATC-3', *reverse* 5'-GAAGTCTTCTCCTCAGATGCTCT-3' (Mendu i sar., 2012).

3.1.5. Statistika

Za sledeće bihejvioralne testove je korišćena jednofaktorska ANOVA: probni test Morisovog vodenog lavirinta, test prepoznavanja novog objekta i test socijalne diskriminacije. Za akvizicionu fazu Morisovog vodenog lavirinta je uzeta srednja vrednost četiri pokušaja po jednom danu po jednom pacovu. Morisov vodeni lavirint je potom analiziran koristeći jednofaktorski ANOVA test sa ponavljanjem (faktori: tretman i vreme: dani za dugotrajnu memoriju, pokušaji za kratkotrajnu memoriju). U slučaju značajnih interakcija za dugotrajni Morisov vodeni lavirint, odvojene jednofaktorske ANOVA-e su sprovedene da bi se ustanovio uticaj tretmana na nivou pojedinačnog

dana. Gde su bili potrebni *post-hoc* testovi, rađeni su koristeći Student-Newman-Keuls (SNK) test. Nivo iRNK GABRA5 je analiziran poredeći ΔCt vredosti. Svaka tretirana grupa je poređena sa kontrolnom koristeći Studentov t-test. Grafička prezentacija Real-time PCR rezultata je urađena kao u (Biasin i sar., 2017).

Svi numerički podaci prezentovani u figurama su dati kao srednja vrednost \pm standardna greška. Razlike su smatrane značajnim za $p < 0,05$, dok je $0,05 < p < 0,1$ smatrano statističkim trendom. Statistička analiza je odrađena u softveru SigmaPlot 14 (Systat Software Inc., Richmond, SAD), a grafičko predstavljanje u GraphPad 9 (GraphPad Software, La Jolla California, SAD).

3.2. Karakterizacija mišjeg modela ASD-a

Eksperimenti su sprovedeni na miševima BTBR i C57BL soja kao kontroli. Mladunci su ostajali sa svojim majkama do 21. postnatalnog dana (P21), kada su bili odvojeni i razvrstani na mužjake i ženke. Mladunci oba pola su podvrgnuta bihejvioralnoj bateriji u dva perioda: P30 i P90 (pregled dat na Slici 8). Ove dve vremenske tačke su odabrane zato što P30 odgovara prepubertetskom periodu, dok P90 predstavlja odraslo doba. Iste životinje nisu prolazile testiranje u oba peroda, da ne bi iskustvo stečeno u prvom setu testova uticalo na naredni (eng. *carryover effect*). Bihejvioralna baterija se sastojala iz: neuroloških testova (P21), testa socijalne interakcije (P28/29; P90 \pm 2), uzdignutog plus lavirinta (P29/30; P91 \pm 2), testa spontane lokomotorne aktivnosti (P30/31; P92 \pm 2), testa tri prostorije (P31 – 33; P93 \pm 2 – 95 \pm 2), Morisovog vodenog lavirinta (P32 \pm 2 – 43 \pm 2; P95 \pm 2 – 106 \pm 2), testa olfaktorne diskriminacije (P43 \pm 2; P1016 \pm 2), testa obeležavanja teritorije kao odgovor na miris (P107 \pm 2). Po soju i polu testirano je 9 – 10 životinja.

3.2.1. Neurološki testovi

Kada su mladunci odvojeni od majki, izmerena im je masa i podvrgnuti su seriji neuroloških ispitivanja da bi se ustanovilo da nemaju poremećaje koji bi mogli uticati na njihovo ponašanje u bihejvioralnim testovima. Ispitivani su sledeći parametri:

Refleks uspravljanja: Miš se postavljao na žičanu mrežu i okretao tako da leđima leži na podlozi. Normalan odgovor je predstavljao da se miš što pre okrene i stane na podlogu sa sve četiri šape.

Refleks spajanja zadnjih ekstremiteta: Miš se podizao za rep i posmatrali su se pokreti njegovih zadnjih ekstremiteta. Dodeljivala se ocena od 1 do 4: 1 za normalan odgovor (širenje zadnjih ekstremiteta) do 4 koje ukazuje na neurološke poremećaje (ukrštanje zadnjih ekstremiteta).

Refleks hvatanja: Šapice miša su nežno dodirivane tankom šipkom. Neurološki normalan odgovor je predstavljao hvatanje šipke.

Refleks održanja ravnoteže: Miš se postavljao na sredinu praznog kaveza. Istraživač je nežno podizao kavez, a potom bi ga naglo spustio za oko 10 cm. Normalni odgovor je bio širenje sva četiri ekstremiteta da bi se održala ravnoteža i uspravan položaj tela.

Vizuelni refleks: Životinja je podizana za rep i lagano spuštana do tamne i čvrste površine (ivice stola) do visine njuške/očiju, bez da je dodirne. Očekivan odgovor je bilo pružanje prednjih ekstremiteta u pokušaju da dosegnu ivicu.

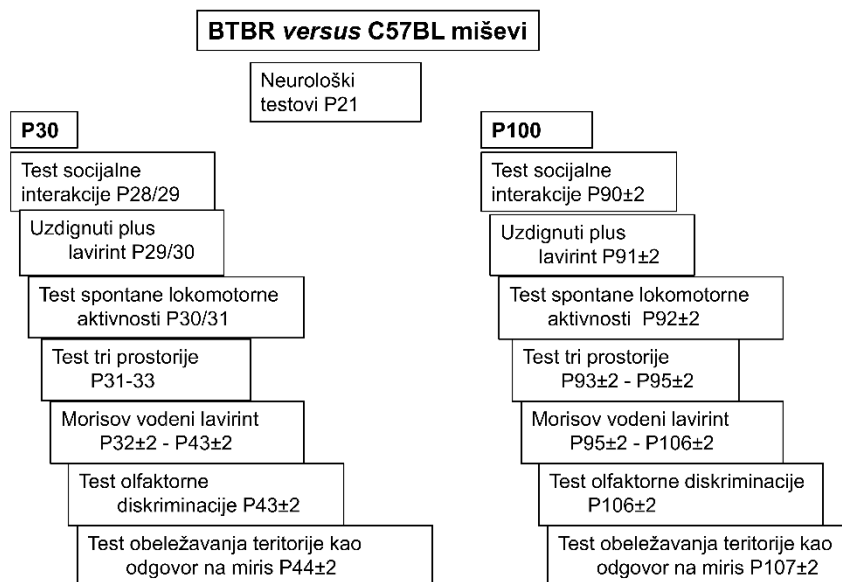
Negativna geotaksija: Životinja se postavljala na ravan komad stiropora nagnut pod uglom od 45°, tako da joj je glava okrenuta na dole. Normalan odgovor je bio okretanje na gore i penjanje do najvišeg vrha stiropora.

Orijentacija vibrisa: Vbrise su nežno dodirivane štapićem za uši i očekivan odgovor je bio okretanje glave ka stimulusu.

Odgovor treptanja: Štapić za uši se primicao ka otvorenom oku miša. Normalan odgovor je bio treptaj pre nego što štapić dotakne oko.

Odgovor na akustični prepad: U blizini životinje se proizvodio jak, nagli zvuk (udarac metala o metal), što je trebalo da izazove trenutni odgovor u vidu iznenadne ekstenzije glave i ekstremiteta praćeno skupljanjem u pritajeni položaj ili pokušaj bega.

Test održavanja na žici: Miš se postavljao na dno kutije 20 cm × 20 cm, čiji su zidovi od providnog pleksiglasa, a dno žičana mreža. Kad bi se miš stabilizovao, kutija bi se brzo okretala tako da miš visi, tj. drži se za žicu. Mereno je koliko je miš uspevao da se održi.



Slika 8. Redosled testiranja BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa u bihevioralnoj bateriji po postnatalnim danima (P); *versus*=u poređenju sa.

3.2.2. Test socijalne interakcije

Test socijalne interakcije se izvodio dva dana pod crvenim svetlom (20 lx); prvi dan je bila habituacija, a drugi sam test. Svi uslovi su bili isti oba dana, sem što su drugog, test-dana, životinje bile uparene. Životinje su oba dana prošle socijalnu izolaciju koja je podrazumevala jedan sat proveden samostalno u kavezu. Nakon toga, životinje su stavljane u kaveze (manje kaveze za juvenilne miševe (30 cm × 18 cm × 13 cm) i veće kaveze za odrasle miševe (35 cm × 21 cm × 13 cm)) prekrivene tankim slojem šuške (0,5 cm) na 10 min. Svaka životinja, odnosno svaki par, stavljan je u čist kavez sa čistom šuškom. Ponašanje parova je snimano tokom tog vremena u test-danu i snimci su posle analizirani od strane istraživača koji nisu znali pol i soj ispitvanih miševa. Životinje smo uparili po polu, soju, i težini. Parove su činile životinje iz različitih legala koje se nikad pre nisu srele. Praćeni parametri su bili: anogenitalno njušenje, njušenje prednjeg dela tela, praćenje parnjaka, provlačenje preko/ispod parnjaka, ležanje jedno pored drugog, i dva ne-socijalna parametra – kopanje šuške i timarenje.

3.2.3. Uzdignuti plus lavirint

Arena za uzdignuti plus lavirint se nalazi na visini od 60 cm, i sastoji od 2 otvorena (30 cm × 7 cm) i dva zatvorena kraka (30 cm × 7 cm × 24 cm), koje povezuje središnji prostor (7 cm × 7 cm). Svaka životinja je uzimana iz svog legla, kratko stavljana (~15 s) na sto da se navikne na ravnu površinu i odmah potom stavljana u centar aparature, okrenuta ka jednom od zatvorenih krakova. Između svake životinje, aparatura je prebrisana 70% etanolom i ostavljena da se osuši. Ponašanje životinje je

praćeno tokom 5 min pod crvenim svetlom (20 lx) i analizirani su sledeći parametri: procenat vremena proveden u otvorenim kracima i procenat ulazaka u otvorene krake.

3.2.4. Test spontane lokomotorne aktivnosti

Na dan testiranja miševi su stavljeni u čiste, prazne, bele kutije od pleksiglasa (40 cm × 25 cm × 35 cm), koje su smeštene u sobu sa crvenim svetlom (20 lx). Strugotina nije korišćena kako bi bilo sprečeno kopanje od strane miševa, što bi potencijalno moglo uticati na druge oblike ponašanja. Test je trajao 20 minuta, a između svakog testiranja arena je čišćen 70% etanolom, ostavljan da se osuši 5 min i zatim obrisano papirnom vatom kako bi se uklonili olfaktorni tragovi prethodne životinje.

U okviru SLA testa praćeni su parametri: vreme provedeno u aktivnosti, pređena distanca, prosečna brzina, broj rotacija, broj rotacija u smeru kazaljke na satu i u smeru suprotnom kazaljci na satu, kao i vreme provedeno u timarenju, koje je ručno praćeno drugih 10 min (prvih 10 min se smatralo habituacijom) naknadnom analizom snimljenog testa od strane istraživača slepih za pripadajuće grupe.

3.2.5. Test tri prostorije

Test tri prostorije se sprovodio pod crvenim svetlom (20 lx) u aparaturi opštih dimenzija (60 cm × 40 cm × 22 cm) koja je podeljena na 3 jednake prostorije, jednu centralnu i dve bočne, međusobno povezane otvorima (7,5 cm) sa kliznim vratima. Procedura se sastoji iz tri dela. Prvi je habituacija u trajanju od 5 min, gde je miš mogao da ispituje sve 3 prostorije. Prostorije su tokom habituacije bile prazne, sem 2 prazna žičana kaveza (prečnika 8 cm, visine 15 cm), po jedan u svakoj bočnoj prostoriji. Tokom drugog dela procedure, testu socijalnosti, u jedan kavez je stavljan stimulus-miš, u drugi igračkica i test-mišu je dozvoljeno da ispituje prostor tokom 10 min. Pozicije miša-stimulusa i igračkice su naizmenično menjane za svakog test-miša. Na kraju, u testu socijalne memorije, umesto igračkice je stavljan drugi miš-stimulus, i test-mišu je dato 10 min da se slobodno kreće. Između svakog testa, miš je nežno poguran ka centralnom delu, gde je privremeno zatvoren kliznim vratima, dok je istraživač postavljao miševe-stimuluse i igračkicu ispod žičanih kaveza. Dva cm oko žičanih kaveza su uzeti kao praćena zona njuškanja. Miševi-stimulusi su bili C57BL miševi, upareni po polu i uzrastu sa test-miševima, ali iz drugih legala i bez prethodnog kontakta sa njima. Njihova habituacija na žičane kaveze je započinjala 2 dana pred test. Miševi su tokom ta 2 dana držani u kavezima 3 puta po 15 min. Arena i žičani kavezi su brisani 70% alkoholom između svake životinje. Praćeni parametri bili su vreme u svakoj od 3 prostorije tokom sva tri dela testa i diskriminacioni indeks (razlika vremena provedenog sa mišem/novim mišem i sa objektom/starim mišem, podeljena sa zbirom ta dva vremena).

3.2.6. Morisov vodeni lavirint

Testiranje u Morisovom vodenom lavirintu je sprovedeno po istom principu kao u 3.1.1., sa tom razlikom da je korišćen bazen bele boje, manjih dimenzija (prečnika 170 cm) i sa providnom platformom (prečnika 15 cm). Voda je takođe bila toplija (24 °C) i prekrivala je platformu oko 0,5 cm. Vrlo bitne razlike u protokolu su uvođenje faze označene platforme (eng. *cue*) prvog dana, kao i protokola standardnog i reverznog Morisovog vodenog lavirinta. Faza označene platforme je prvi dan testa, koji se odvijao po protokolu dana akvizicije (3.1.1.) s tim što se na platformi nalazio objekat kako bi životinje lakše pronašle platformu i ispitale se njihova sposobnost vida i plivanja. Sledeća faza, standardni test, odvijao se kao što je opisano u 3.1.1., s time što je ustanovljeno da je miševima neophodno 6 dana akvizicije, nakon čega je usledio jedan dan probnog testa. Nakon toga, devetog dana testiranja, započinjao je reverzni test, za koji je platforma bila pomerena u naspramni kvadrant

u odnosu na onaj gde je bila primarno pozicionirana. Ovaj poslednji deo protokola se sastojao od 4 akviziciona dana i probnog testa finalnog dana. Praćeni parametri su bili: latencija, efikasnost puta, procenat puta pređenog u periferiji za sve faze testa sem probni; broj ulazaka u ciljni region za oba probna testa; i broj ulazaka u prethodni ciljni region za oba dela reverznog testiranja.

3.2.7. Olfaktorna diskriminacija

Test olfaktorne diskriminacije se sprovodio u aparaturi za test tri prostorije pod crvenim svetlom (20 lx). Pre sprovođenja testa miševi su držani u istoj šuški tokom 5 dana. Ta šuška je potom korišćena kao izvor poznatog mirisa legla, a potpuno čista šuška kao izvor stranog mirisa. Poznata šuška je stavljana u jednu lateralnu prostoriju arene, dok je u drugu stavljana čista šuška. Miš je spuštán u centralnu prostoriju i ostavljan da istražuje 2 min. Nakon svakog miša su 70% alkoholom uklanjani mirisni tragovi, a po puštanju svih miševa iz jednog legla, sva korišćena šuška je bacana, aparatura je detaljno brisana i stavljana je šuška sledećeg kaveza i nova čista šuška. Između svakog legla je menjana strana čiste i prljave šuške. Praćeni su sledeći parametri: razlika u latenciji ulaska u čistu i poznatu šušku i odnos vremena provedenog u poznatoj nasuprot čistoj šuški.

3.2.8. Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris

Test obeležavanja se sprovodio samo na adultnim životinjama, pod crvenim svetlom (20 lx) u kutijama od pleksigasa (40 cm × 25 cm × 35 cm) na papiru koji je stavljan na dno kutije. Za donore urina su se uzimale životinje istog soja, pola i uzrasta. Donori su stavljeni na ravnu čistu površinu, hvatanjem za rep im je izdizan zadnji deo tela, i primenjivan nežni pritisak na leđa. Ako ovo postupanje nije izazvalo uriniranje, ventralni deo je lagano stimulisan u anteriorno-posteriorno smeru. Urin je sakupljan pipetom sa podloge i stavljan u tube od 0,5 ml. U najkraćem mogućem roku kap urina (10 µl) je stavljana na centar papira u zonu iscertanu pre toga. Životinja se potom puštala na 5 min u arenu. Nakon toga, životinja se vraćala u kavez, papir je vađen i prskan 1% ninhidrinom (Sigma Aldrich) rastvorenim u apsolutnom alkoholu i ostavljen da se osuši. Ninhidrin reaguje na prisustvo aminokiselina u urinu i boji papir u ljubičasto. Arena je prebrisana 70% alkoholom, ostavljena par minuta da se osuši i stavljan je novi papir, nov uzorak urina i puštana sledeća životinja. Papir je sledećeg dana skeniran i korišćenjem Adobe Photoshop softvera (Adobe Inc., SAD) određena je površina papira sa oznakama obeležavanja teritorije. Tragovi ostali od uriniranja nisu uzimani u obzir.

3.2.9. Statistika

Za skoro sve testove je korišćena dvofaktorska ANOVA (faktori: soj i pol), sem za Morisov vodeni lavirint koji je analiziran koristeći dvofaktorski ANOVA test sa ponavljanjem (faktori: soj, pol i vreme – uzimana je srednja vrednost četiri pokušaja po *cue*/jednom akvizicionom danu po jednoj životinji). U slučaju značajnih interakcija za dugotrajni Morisov vodeni lavirint, odvojene jednofaktorske ANOVA-e su sprovedene da bi se ustanovio uticaj tretmana na nivou pojedinačnog dana. Uticaj samog faktora vremena nije prikazivan. Za poređenje dva različita smerá rotacija za test spontane lokomotorne aktivnosti korišćen je upareni t-test za svaku grupu. Takođe je korišćena MANOVA za test socijalne interakcije i test tri prostorije. Za test socijalne memorije u testu tri prostorije dodatno je korišćen *One sample* t-test za diskriminacioni indeks gde je bilo potrebe. Gde su bili potrebni *post-hoc* testovi, rađeni su koristeći Holm-Sidak test.

Svi numerički podaci prezentovani na slikama dati su kao srednja vrednost ± standardna greška. Razlike su smatrane značajnim za $p < 0,05$, dok je $0,05 < p < 0,1$ smatrano statističkim trendom. Statistička analiza je odrađena u softverima SigmaPlot 14 (Systat Software Inc., Richmond, SAD) i

SPSS 23 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, SAD), a grafičko predstavljanje u GraphPad 9 (GraphPad Software, La Jolla California, SAD).

3.3. Karakterizacija pacovskog modela ASD-a

Pacovi su sparivani u posebnoj sobi vivarijuma Farmaceutskog fakulteta i svakog jutra je proveravano da li je došlo do koitusa uzorkovanjem vaginalnog brisa. Dan kada je mikroskopski nalaz bio pozitivan označen je kao nulti dan gestacije, odnosno nulti embrionalni dan (E0). Ženke su nakon toga odvajane od mužjaka i grupisane 2 – 3 po kavezu do E19, kad su odvajane kako bi bile same dan – dva neposredno pred porođaj.

Ženke su E12,5 tretirane jednom intraperitonealnom dozom (2 ml/kg) od 500 mg/kg natrijum valproata (VPA grupa). Natrijum valproat (Sigma Aldrich) je rastvoren u fiziološkom rastvoru (0,9 % NaCl) u koncentraciji 250 mg/mL. Istovremeno je ženkama iz kontrolne grupe (eng. *control*, CTRL) primenjen fiziološki rastvor u istoj zapremini. Tretirano je 10 ženki po grupi.

Mladunci su ostajali sa svojim majkama sve do 21. dana od rođenja, kada su bili zalučeni i razvrstani na mužjake i ženke. U kavezu je držano 4 – 5 životinja, sve potekle iz istog legla. Kavezi sa mužjacima i kavezi sa ženkama su smešteni u odvojenim sobama. Mladunci oba pola, i to dve do tri životinje po leglu, podvrgnuti su bihevioralnom testiranju u dva perioda: P30 i P90. Ove dve vremenske tačke su odabrane zato što P30 odgovara prepubertetskom periodu, dok P90 predstavlja odraslo doba.

Mladunci su podvrgnuti nizu neuroloških testova (P7-16), a par dana nakon toga je započela bihevioralna baterija sa testom socijalne interakcije (P28/29), posle koje su pacovi odvojeni u dve kohorte (Slika 9). Prva kohorta je prošla test spontane lokomotorne aktivnosti (P29/30) i Morisov vodeni lavirint (P31/32 – 42/43), a druga uzdignuti plus lavirint (P29/30) i test tri prostorije (P31/32). Životinje su opet ušle u testiranje kao adulti, prvo sve zajedno u testu socijalne interakcije (P89±1), a potom su se kohorte opet odvojile. Prva kohorta je sad bila ta koja je testirana u uzdignutom plus lavirintu (P91±1) i u testu tri prostorije (P92±1), a potom i u testu obeležavanja teritorije kao odgovor na miris (P98±1). Druga kohorta je prošla testove spontane lokomotorne aktivnosti (P91±1) i Morisovog vodenog lavirinta (P92±1 – P103±1). Nakon toga su sve životinje prošle test olfaktorne diskriminacije. Na ovaj način životinje nisu prolazile iste testove u oba perioda, čime se obezbedilo da iskustvo stečeno u prvom setu testova ne utiče na naredni (eng. *carryover effect*), sem za socijalnu interakciju za koju smo smatrali da će socijalnost pacova da prevagne nad bilo kakvim *carryover* efektom, a nama je pružilo veći broj parova za analizu.

Iz većine legala je izdvojena po jedna životinja svakog pola koja je ostala bihevioralno naivna i korišćena je za analizu koncentracije neurotransmitera u određenim delovima mozga.

3.3.1. Neurološki testovi i masa trudnih ženki

Pored praćenja mase majki tokom trudnoće i mase mladunaca P7 i P21, takođe su sprovedeni sledeći neurološki testovi da bi se utvrdilo da valproat nije naneo oštećenja koja bi dovela u pitanje dalje testiranje ovih životinja u bihevioralnim testovima:

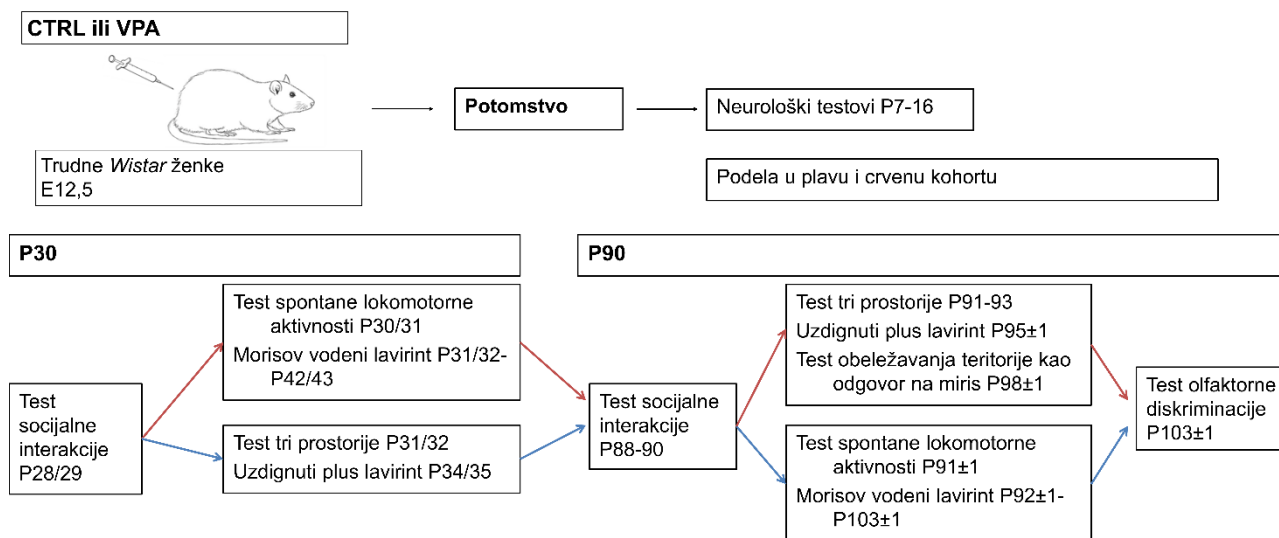
Refleks uspravljanja (P7): Mladunci su nežno okretani na leđa i beleženo je vreme potrebno da stanu na podlogu na sva četiri ekstremiteta.

Olfaktorna diskriminacija (P10): Mladunci su stavljeni na sredinu manjih kaveza (35 cm × 21 cm × 13 cm) dok je na jednu stranu kaveza bila postavljena njihova šuška, a na drugu stranu čista, nepoznata šuška. Mereno je vreme potrebno da dođu i uđu u poznatu šušku. Vreme dato za pronalazak šuške je iznosilo 2 min, i to vreme je upisivano ukoliko životinja ne bi našla svoju šušku ili ako bi ušla u nepoznatu.

Negativna geotaksija (P12): Mladunci su postavljeni na ravnu podlogu prekrivenu peškirom pod uglom od 45°, glavom na dole. Praćeno je vreme potrebno da se u potpunosti okrenu glavom okrenutom ka podignutom kraju (maksimalno 120 s).

Otvaranje očiju (P12, 14, 16): Praćeno je otvaranje kapaka mladunaca i dodeljivane su ocene: 0 – nijedno oko otvoreno, 1 – otvoreno 1 oko, 2 – otvorena oba oka.

Odgovor na taktilnu stimulaciju (P16): Vrhovi ušiju pacova su nežno dodirivani štapićima za uši i reakcija je ocenjivana na sledeći način: 0 – nije bilo reakcije, 1 – pomeranje uveta, 2 – potpuno izbegavanje.



Slika 9. Redosled testiranja kontrolnih (eng. *control*, CTRL) i valproatnih (VPA) pacova u bihejvioralnoj bateriji po postnatalnim danima (P); embrionalni dan 12, 5 (E12,5).

3.3.2. Test socijalne interakcije

Test socijalne interakcije je izvođen od 18 h do 21 h, pod crvenim svetlom (20 lx) u tamnoj fazi, kada su pacovi najaktivniji. Prvog dana, pacovi su bili izolovani u individualnim kavezima: juvenilni 3,5 h (Schneider i Przewłocki, 2005), odrasli pacovi 24 h. Nakon toga su bili habituirani 10 min u kutijama od neprovidnog pleksiglasa manjih dimenzija (40 cm × 25 cm × 35 cm) za juvenilne pacove, odnosno većih (40 cm × 60 cm × 35 cm) za odrasle pacove. Sledećeg dana, životinje su prošle istu proceduru, ali su ovaj put bile u parovima istog pola, prenatalnog tretmana i što sličnijoj težini, iz različitih legala. Dno i zidovi kutija su bili prebrisani 70% etanolom između svake životinje/para.

Parametri koji su pritom praćeni bili su:

- parametri socijalnog ponašanja nevezanog za igru: njušenje i timarenje uparene životinje, provlaćenje preko/ispod uparene životinje i između pacova i zida i praćenje uparene životinje (Schneider i Przewłocki, 2005), manipulacija repom (hvatanja i griženje repa uparene životinje) (Schneider i Koch, 2005),

- parametri socijalnog ponašanja vezanog za igru: tuš, rvanje i boks (Auger i Olesen, 2009).

Kod odraslih životinja nije praćeno ponašanje tuš i manipulacija repom, pošto je ono karakteristično za juvenilne životinje (Schneider i Koch, 2005).

Pored toga je praćen i ne-socijalni parametar, vreme provedeno u timarenju.

3.3.3. Uzdignuti plus lavirint

Dimenzije aparature korišćene za uzdignuti plus lavirint su: 50 cm × 10 cm, sa ivicom od 0,3 cm za otvorene krake, 50 cm × 10 cm × 40 cm za zatvorene krake i 10 cm × 10 cm za središnji deo koji ih povezuje. Ponašanje životinja je praćeno tokom 5 min pod crvenim svetlom (20 lx) u opisanom lavirintu i analizirani su isti parametri kao u 3.2.3.

3.3.4. Test spontane lokomotorne aktivnosti

Test spontane lokomotorne aktivnosti je sproveden kao u 3.2.4. Slobodno kretanje pacova je praćeno tokom 20 min u manjim (40 cm × 25 cm × 35 cm) ili većim kutijama (40 cm × 60 cm × 35 cm) od neprozirnog pleksiglasa u zavisnosti od starosti ispitivanih životinja.

3.3.5. Test tri prostorije

Test tri prostorije se odvijao na isti način opisan u 3.2.5 za miševе, sem što je prvi deo testa, habituacija, trajao 10 min. Korišćena aparatura za pacove je bila veća (opštih dimenzija 95 cm × 50 cm × 35 cm), kao i žičani kavezi (prećnika 10 cm i visine 24 cm za juvenilne, prećnika 14 cm i visine 26 cm za odrasle pacove). Pacovi koji nisu istraživali sve tri prostorije tokom sva tri dela testa su isključeni iz analize.

3.3.6. Morisov vodeni lavirint

Morisov vodeni lavirint je sproveden kao u 3.1.1. Sastojao se iz standardnog i reverznog testa, oba sprovedena po istoj procedure: 5 dana akvizicije i jedan dan za probni test. Jedina razlika je bila u tome da je za reverzni test platforma (kao i sve pozicije puštanja životinja) pomerena dijagonalno suprotno u odnosu na poziciju koju je imala tokom standardnog testa,. Analizirani su parametri isti kao u 3.2.6.

3.3.7. Olfaktorna diskriminacija

Test olfaktorne diskriminacije je sproveden kao što je opisano u sekciji 3.2.7. za miševе. Razlika je bila u korišćenoj većoj aparaturi tri testa za pacove i da je poznata šuška uzimana iz kaveza koji nisu bili presvućeni 2 dana.

3.3.8. Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris

Test obeležavanja se sprovodio kao u 3.2.8. uz određene modifikacije. Test je sproveden u noćnoj fazi i korišćena je veća arena (lateralne prostorije arene za test 3 prostorije). Velika razlika je bilo korišćenje dve staklene pepeljare (10,5 cm × 6,5 cm × 1,5 cm), koje su držane na jednom i drugom kraju arene (po dućini). Razlog za ovu modifikaciju je nalaz da se kod pacova pojaćava obeležavanje teritorije u slućaju prisustva objekata odgovarajućih velićina (Birke i Sadler, 1984). Jedna od pepeljara je nosila miris životinje-donora (duće ivice su se trljale o anogenitalni region pacova-donora i potom se tu nanosilo 7 μ l –10 μ l urina). Obe pepeljare su imale nalepnice na svojoj gornjoj površini (otvor je bio okrenut na dole) i površina njihovog obeležavanja je sabirana sa površinom obelećenog papira – podloge.

3.3.9. Neurohemija

Izolacija i kvantifikacija neurotransmitera iz mozga pacova je odrađena na bazi protokola opisanog u radu (Huang i sar., 2014). Pojedinačni rastvori neurotransmitera (500 µg/ml) su pripremani rastvaranjem 2,5 mg neurotransmitera u 5 ml metanola (0,1% mravlje kiseline), odnosno vode za glutamat. Rastvori su čuvani na -20 °C, sem glutamata koji je čuvan na 4 °C do 72 h. Serija kalibracionih rastvora za serotonin, dopamin, noradrenalin, acetilholin (0,001 µg/ml, 0,005 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5, 1 µg/ml) i GABA i glutamat (0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) je pripremana razblaživanjem početnog rastvora mobilnom fazom (0,1% mravlje kiseline u vodi/acetonitrilu, 98:2, v/v). U svaki rastvor je dodat benzilamin rastvoren u metanolu (0,1% mravlje kiseline) kao interni standard (finalna koncentracija 3 µg/ml). Sve supstance su kupljene od Sigma Aldrich.

Životinje su žrtvovane P30 i P90, dekapitovane i njihovi mozgovi su bili izvađeni i na ledu su disektovane sledeće strukture: olfaktorni bulbus, frontalni korteks, striatum, dorzalni i ventralni hipokampus i cerebelum. Uzorci su odmah bili mereni na analitičkoj vagi, zamrznuti u tečnom azotu i držani na -80 °C do analize. Prvi korak u pripremi uzoraka je bio dodavanje hladnog metanola (0,1% mravlje kiseline) u odnosu 1:12,5 (tkivo (mg): metanol (µl)). Nakon toga je uzorak homogenizovan ultrazvučnom sonifikacijom i 100 µl homogenata je razblaženo 3,2 puta (ukupno razblaženje je bilo 40 puta) sa 175,2 µl hladnog metanola (0,1% mravlje kiseline) i 44,8 µL internog standarda (30 µg/ml benzilamina). Uzorci su zatim bili vorteksovani i centrifugirani tokom 10 min na 18.000 g, 4 °C. Supernatant je potom bio uparen pod mlazom azota, a suvi ostatak rekonstituisan sa 350 µl mobilne faze. Posle ponovnog centrifugiranja pod istim uslovima, supernatant je prebačen u vijalice za sistem tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (eng. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS).

Za analizu je korišćen Accela LC system opremljen trostrukim kvadrupolskim masenim spektrometrom (Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max). Jonizacija analita je izvršena na elektrosprej jonizatoru sa zagrevanjem (eng. *heated electrospray ionization*, HESI). Detekcija na masenom analizatoru je izvršena u pozitivnom modu uz primenu sledećih optimizovanih uslova: napon spreja 4000 V; temperatura isparivača 325 °C; linearni pritisak azota – gasa nosača (eng. *sheath gas*) 30 jedinica; kružni pritisak azota – gasa nosača (eng. *auxiliary gas*) 10 jedinica; pritisak azota – gasa čistača jona (eng. *ion sweep gas*) 1,0 jedinica; temperature kapilare 300 °C; vreme skeniranja 0,2 s; rezolucija na prvom kvadrupolu 0,70 Da; pritisak argona – kolizionog gasa 1,5 mTorr. Detekcija analita izvršena je metodom praćenja izabrane jonske tranzicije (eng. *selected reaction monitoring*, SRM) na sledeći način: GABA m/z 104 → 87 (CE, 10 V), acetilholin m/z 146 → 87 (CE, 14 V), glutamat m/z 148 → 84 (CE, 16 V), dopamin m/z 154 → 137 (CE, 8 V), noradrenalin m/z 170 → 152 (CE, 5 V), serotonin 177 → 160 (CE, 8 V) i benzilamin m/z 108 → 91 (CE, 10 V). Automatska optimizacija parametara izvršena je programom TSQ Tune. Kontrola rada instrumenta i obrada podataka izvršena je primenom računarskog programa Xcalibur 1.3.

3.3.10. Statistika

Pošto je eksperimentalni tretman primenjen trudnim ženjkama, samim tim celom leglu, za statističku analizu korišćena je jedna vrednost po leglu, tj. srednja vrednost za bihevioralne podatke svih životinja istog pola iz istog legla (Lazic i Essioux, 2013). Za neurološke testove je korišćen Studentov t-test sa jedinim faktorom prenatalnim tretmanom; pošto su neurološki testovi izvođeni u prvih 16 dana života mladunaca, određivanje pola nije moglo da se smatra preciznim, stoga pol nije postojao kao faktor. Pored toga, statistika je odrađena kao što je opisano u 3.2.9 sem što je faktor soj bio zamenjen prenatalnim tretmanom.

3.4. Ispitivanje uticaja primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a

Wistar pacovi su spareni, trudne ženke tretirane valproatom i mladunci zalučivani i gajeni kao što je opisano u 3.3.

3.4.1. Farmakokinetika MP-III-022

Odvojena kohorta pacova je korišćena da bi se odabrala odgovarajuća doza MP-III-022. Tokom 7 dana, P21-27, CTRL mužjaci su intraperitonealno tretirani (5 mg/kg) sa 0,33 mg/kg ili 1 mg/kg ili 2 mg/kg MP-III-022. Tri životinje su žrtvovane za svaku od četiri vremenske tačke (24 h posle 1. doze, 20 min posle 3. doze, 20 min posle 7. doze, i 24 h posle 7. doze). Da bi se ustanovilo da li postoji razlika među polovima, isti eksperiment je urađen sa ženkama koristeći doze 0,33 mg/kg ili 1 mg/kg. Dodatno, doza od 1 mg/kg je ispitivana i u VPA pacovima, da bi se ustanovile potencijalne farmakokinetičke razlike između CTRL i VPA pacova, pošto je prethodna studija pokazala da prenatalni tretman valproatom dovodi do poremećene ekspresije enzima jetre (Bambini-Junior i sar., 2011).

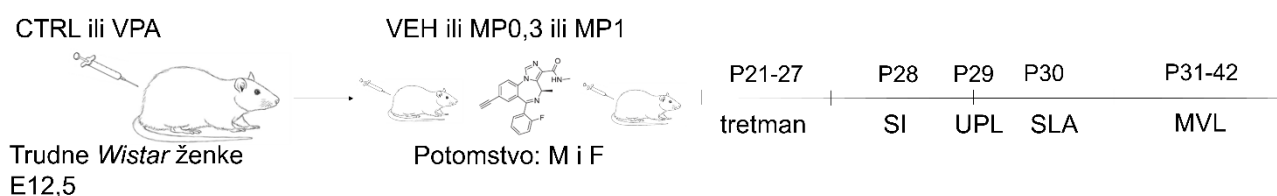
U navedenim vremenskim tačkama, pacovi su anestezirani ketaminom, dekapitirani i njihovi mozgovi su vađeni, odmeravani u ependorficama i ultrazvučno homogenizovani u 1,25 ml metanola. Zatim je homogenat centrifugiran (3400 x g, 20 min), a supernatant dalje pripreman tečno-čvrstom ekstrakcijom (eng. *solid-phase extraction*, SPE) i potom analiziran LC-MS/MS analitičkom metodom. Kao interni standard korišćen je SH-I-048A ((S,E)-7-bromo-5-(2-fluorofenil)-3-metil-1Hbenzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-on), neselektivni agonist za benzodiazepinsko mesto GABA_A receptora visokog afiniteta i efikasnosti (Obradović i sar., 2014).

SPE je izvođen uz pomoć Oasis® HLB kertridža (Waters, Milford, MA, SAD), prethodno kondicioniranih metanolom i destilovanom vodom. Kao uzorci su nanošeni supernatant homogenata mozga, a kertridži su ispirani sa 1 ml 5% metanola. Kertridži su zatim sušeni pod vakuumom, a supstanca od interesa je eluirana sa 1 ml metanola. Takvi uzorci su onda injektovani u LC sistem. Za separaciju jedinjenja korišćena je kolona XTerra RP18 (Waters). Koncentracije MP-III-022 u moždanom tkivu određivane su pomoću Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Waters ZQ 2000 kvadrupolnog analizatora koji koristi jonizaciju u elektrospreju (eng. *the electrospray ionization interface*, ESI-MS; Waters), a podaci su dobijeni praćenjem izabranog jona (eng. *selected ion monitoring*, SIM) jonske mase m/z 237 i skeniranjem opsega jonskih masa m/z 100–400 (eng. *full-scan ESI+mode*).

3.4.2. Tretman sa MP-III-022

I VPA i CTRL pacovi oba pola tretirani su svakog dana oko 10 h ujutru od P21 do P27 sa 0,33 mg/kg (MP0,3) ili 1 mg/kg (MP1) ili vehikulumom (VEH). Ovo je činilo 12 test grupa. Samo jedan ili dva mladunca istog pola po leglu su dobijali isti tretman. Za razliku od prethodnih eksperimenata za uspostavljanje valproatnog modela, za ovaj segment testova nije uzimana srednja vrednost više životinja iz legla, već je analizirana pojedinačna vrednost svake životinje. Ovakav pristup je odbran zato što je svaka životinja ovde direktno dobijala svoj pojedinačni tretman.

U svakom testu je testirano 9 – 12 životinja. Bihevioralna baterija se sastojala od socijalne interakcije (P27), uzdignutog plus lavirinta (P28), testa spontane lokomotorne aktivnosti (P30) i Morisovog vodenog lavirinta (P31–42), (Slika 10). Za bateriju su odabrani testovi i parametri iz odeljka 3.3. koji su se pokazali relevantnima u demonstriranju razlike između valproatnog modela autizma i kontrolne grupe i/ili koje je tehnički/logistički bilo moguće sprovesti tako da sve životinje prođu isti test svaki dan.



Slika 10. Shematski prikaz prenatalnog tretmana (kontrola (eng. *control*, CTRL) ili valproata (VPA)) primenjenog 12,5 embrionalnog dana (E12,5) i postnatalnog tretmana (vehikulum (VEH), MP-III-022 0,33 mg/kg (MP0,3) ili 1 mg/kg (MP1)) datog životinjama oba pola (muškog (lat. *masculinum*, M) i ženskog (lat. *femininum*, F)) tokom postnatalnih dana (P) i ispitivanje u sledećim testovima: test socijalne interakcije (SI), uzdignuti plus lavirint (UPL), test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA) i Morisov vodeni lavirint (MVL).

3.4.2.1. Test socijalne interakcije

Test socijalne interakcije je rađen kao što je opisano u 3.3.2.

3.4.2.2. Uzdignuti plus lavirint

Uzdignuti plus lavirint je rađen kao što je opisano u 3.3.3.

3.4.2.3. Test spontane lokomotorne aktivnosti

Test spontane lokomotorne aktivnosti je rađen kao što je opisano u 3.3.4.

3.4.2.4. Morisov vodeni lavirint

Morisov vodeni lavirint je rađen kao što je opisano u 3.3.6.

3.4.3. Primarna ćelijska kultura i oslikavanje kalcijuma (eng. *calcium imaging*)

Primarne hipokampalne ćelijske kulture su izolovane iz novorođenih (P0) Wistar pacova čije su majke bile tretirane fiziološkim rastvorom (CTRL ćelije) ili valproatom (VPA ćelije). Prvo je izolovan ceo mozak, onda su moždane hemisfere otklonjene, kao i ovojnice koje okružuju hipokampus. Nakon toga je hipokampus izvađen i stavljen u tube od 2 ml napunjene hladnim sterilnim fiziološkim rastvorom sa fosfatnim puferom (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM). Kombinovani su hipokampusi 3 mladunca oba pola istog prenatalnog tretmana. Izolovani hipokampusi su isprani PBS-om i inkubirani zajedno sa sveže rastvorenim tripsinom iz svinjskog pankreasa (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) tokom 10 min na 37 °C uz povremeno mešanje. Potom je usledilo ispiranje i resuspenzija u medijumu za sađenje ćelija (medijum Neurobasal sa dodatkom 10% seruma fetalnog govečeta i 1% GlutaMAX-I, sve kupljeno od Gibco, Invitrogen, SAD, i gentamicin 10 µg/ml, Sigma-Aldrich). Suspenzija je propušтана par puta kroz nastavke za pipetu od 1 ml, pa potom od 200 µl. Preostalom debrisu je ostavljeno da se slegne tokom 1 min – 3 min. Nakon toga je suspenzija sada pojedinačnih ćelija prebačena u novu tubu od 2 ml. Ćelije su prebrojane i 12.000 – 15.000 ćelija su zasađene na pokrovna stakla od 7 mm (#1, Menzel Glasser, Nemačka), prethodno prekrivena poli-D-lizinom (10 µg/ml, Sigma-Aldrich). Pošto su se ćelije prilepile (~30 min), u Petrijeve posude sa pokrovnim staklima je

dodato po 2 ml medijuma za rast (medijum Neurobasal sa dodatim 2% B27, 1% GlutaMAX-I sve kupljeno od Gibco, Invitrogen, i gentamicin 10 µg/ml, Sigma-Aldrich). Neuronu su gajeni u vlažnoj atmosferi od 5% CO₂/95% vazduha na 37 °C. Polovina medijuma je menjana svaki drugi dan i citozin β-D-arabinofuranozid hidrohlorid (AraC, Sigma-Aldrich) je dodavan u medijum po potrebi da bi se suprimirao preteran rast glija.

Bazirano na prethodno objavljenoj studiji (Ganguly i sar., 2001) i našem pilot eksperimentu (testirali smo ćelije počevši od 3 dana u kulturi (eng. *day in vitro*, DIV)) kod većine neurona GABA postaje ekscitatorna tokom DIV 13. Stoga je ta vremenska tačka izabrana za uspostavljanje osnovne razlike između VPA i CTRL neurona u frekvenciji i amplitudi spontanijih kalcijumovih oscilacija, kao i u amplitudi i površini ispod krive GABA-indukovanih kalcijumovih oscilacija. Sledeći deo eksperimenta je bio primena tretmana (30 nM MP-III-022, što odgovara najvišoj slobodnoj koncentraciji u mozgu procenjenoj kao selektivnoj za α₅ GABA_A receptore) rastvorenog u fiziološkom rastvoru (eng. *saline*, SAL; ista zapremina SAL-a dodata za kontrolu) i praćenje njegovih efekata na DIV 15. Time smo imali 4 eksperimentalna uslova (CTRL SAL, CTRL MP, VPA SAL, VPA MP).

Postupak oslikavanja kalcijuma je bio isti za sve eksperimente. Korišćen je ćelijski-propusan indikator acetoksimetil (AM) estar Fluo-4 (Fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, OR, SAD). Ćelije su inkubirane sa 5 µM Fluo-4 AM tokom 30 min na 37 °C. Pre snimanja, ćelije su isprane 3 puta i držane u vanćelijskom rastvoru (eng. *extracellular solution*, ECS) dodatnih 10 min – 15 min na sobnoj temperaturi da bi se omogućila de-esterifikacija indikatora. Pokrovna stakla su potom prebačena u komoru za snimanje sa 1 ml radnog rastvora, stavljena na invertovani epifluorescentni mikroskop (AxioObserver A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Nemačka) opremljen objektivom LD LCI Plan-Apochromat 25×/0,8 (Carl Zeiss) u kombinaciji sa sistemom za vizualizaciju VisiFluor Calcium Ratio Imaging System. Izvor ekscitacionog svetla je bila Xenon Short Arc lampa (Ushio, Japan) zajedno sa polihromatorskim sistemom visoke brzine (VisiChrome, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Nemačka). Ekscitaciono svetlo (480 nm) i emisiono svetlo su prolazili kroz FITC set filtera (Chroma Technology Inc., VT, SAD). Uzastopni snimci su dobijeni upotrebom digitalne kamere Evolve 512 EMCCD Digital Camera System (Photometrics, Tucson, AZ, SAD) svakog sekunda tokom 280 s – 300 s uz pomoć softvera VisiView high-performance imaging software (Visitron Systems, Nemačka). Osnovna fluorescencija je snimana tokom 3 min pod stalnom perfuzijom ECS-a. Potom je dodato 10 µM GABA rastvorene u ECS-u pomoću prilagođenog sistema za unos, preko staklenih pipeta (0,8 mm unutrašnji prečnik, pozicionirane ~350 µm dalje i ~1 mm iznad ćelije, pod uglom od 45°) povezanih sa sistemom za razmenu rastvora velike brzine, High Speed Solution Exchange System (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, SAD) sa propusnim ventilima i VC3 električnim kontrolerom za ventile. Zapremina u komori za snimanje je držana na ~1 ml usisavanjem sa površine rastvora. Odgovor ćelija je sniman narednih 100 s, posle čega je usledilo ispiranje konstantnom perfuzijom radnog rastvora. Na kraju svakog eksperimenta je dodavano 50 mM KCl da bi se zabeležio odgovor neurona na depolarizaciju. Za svaki eksperimentalni uslov korišćeno je 3 – 5 kultura. U proseku, broj regiona od interesa (soma neurona) je bio 13±2 (srednja vrednost ± standardna greška) po snimku.

ECS se sastojao od NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, D-glukoze 10 mM i HEPES 10 mM (pH 7,4; podešen sa NaOH). Za depolarizacioni rastvor NaCl je smanjen na 95 mM, a KCl je povećan na 50 mM. Sve korišćene hemikalije (Sigma-Aldrich) su imale rang najveće čistoće i rastvarane su u dejonizovanoj vodi (18,2 MΩ). Osmolalnost svakog rastvora je bila ~300 mOsm, merena osmometrom po principu pritiska pare (Vapro 5520, Wescor Inc., Logan, UT, SAD).

3.4.4. Real-time PCR

Odvojena kohorta životinja je žrtvovana nakon sedmodnevnog tretmana, na P28. Životinje su dekapitovane, njihov hipokampus izolovan i držan na -80 °C do izolacije RNK. Izolacija RNK je rađena kao u 3.1.4. s tim što nije korišćen glikogen i natrijum acetat. Finalna koncentracija dobijene

RNK je bila oko 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNK po uzorku. DNazni tretman i Real-time PCR su izvođeni kao u 3.1.4., s tim što je korišćen master miks EvaGreen (Biotium, SAD) i dva dodatna prajmera: NKCC1 *forward* 5'- GGTTCTCCAAACTCACGG-3', *reverse* 5'- GTCTTGCCATCCTCTTCCTC-3' (Nejsun i sar., 2005); KCC2 *forward* 5'- GCGGGATGCCCAGAAGTCTA-3', *reverse* 5'- GATGCAGGCTCCAAACAGAACA-3' (Barmashenko i sar., 2011).

3.4.5. Statistika

Trofaktorska ANOVA (faktori: pol, prenatalni tretman i postnatalni tretman) je korišćena za socijalnu interakciju, uzdignuti plus lavirint, test spontane lokomotorne aktivnosti, probni test vodenog Morisovog lavirinta i Real-time PCR. Za akvizicionu fazu Morisovog vodenog lavirinta, uzimana je srednja vrednost sva četiri pokušaja po danu za svakog pacova i potom je korišćena trofaktorska ANOVA sa ponavljanjem (faktori: pol, prenatalni tretman postnatalni tretman i dani). Uticaj samog faktora vremena nije prikazivan. Za poređenje dva različita smeru rotacija korišćen je upareni t-test za svaku grupu. Nivoi RNK su analizirani poređenjem ΔCt vrednosti i grafičko predstavljanje je odrađeno kao u (Biasin i sar., 2017). Holm-Sidak test je korišćen za *post-hoc* poređenja, u testovima u kojima su sprovedena. Studentov t-test ili Mann-Whitney U test (za podatke koje nisu imale normalnu raspodelu i/ili jednaku varijansu), korišćeni su za farmakokinetiku i rezultate dobijene oslikavanjem kalcijuma.

Svi numerički podaci prikazani na slikama su dati kao srednja vrednost \pm standardna greška, sem rezultata oslikavanja kalcijuma koji su predstavljeni upotrebom kutijastog dijagrama (eng. *box and whisker*). Razlike su smatrane značajnim kad je $p < 0,05$, dok je $0,05 < p < 0,1$ smatran statističkim trendom. Za obradu podataka korišćeni su SigmaPlot 14 (Systat Software Inc., Richmond, SAD) i SPSS 23 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, SAD), a za grafičko predstavljanje GraphPad 9 (GraphPad Software, La Jolla California, SAD).

4. Rezultati

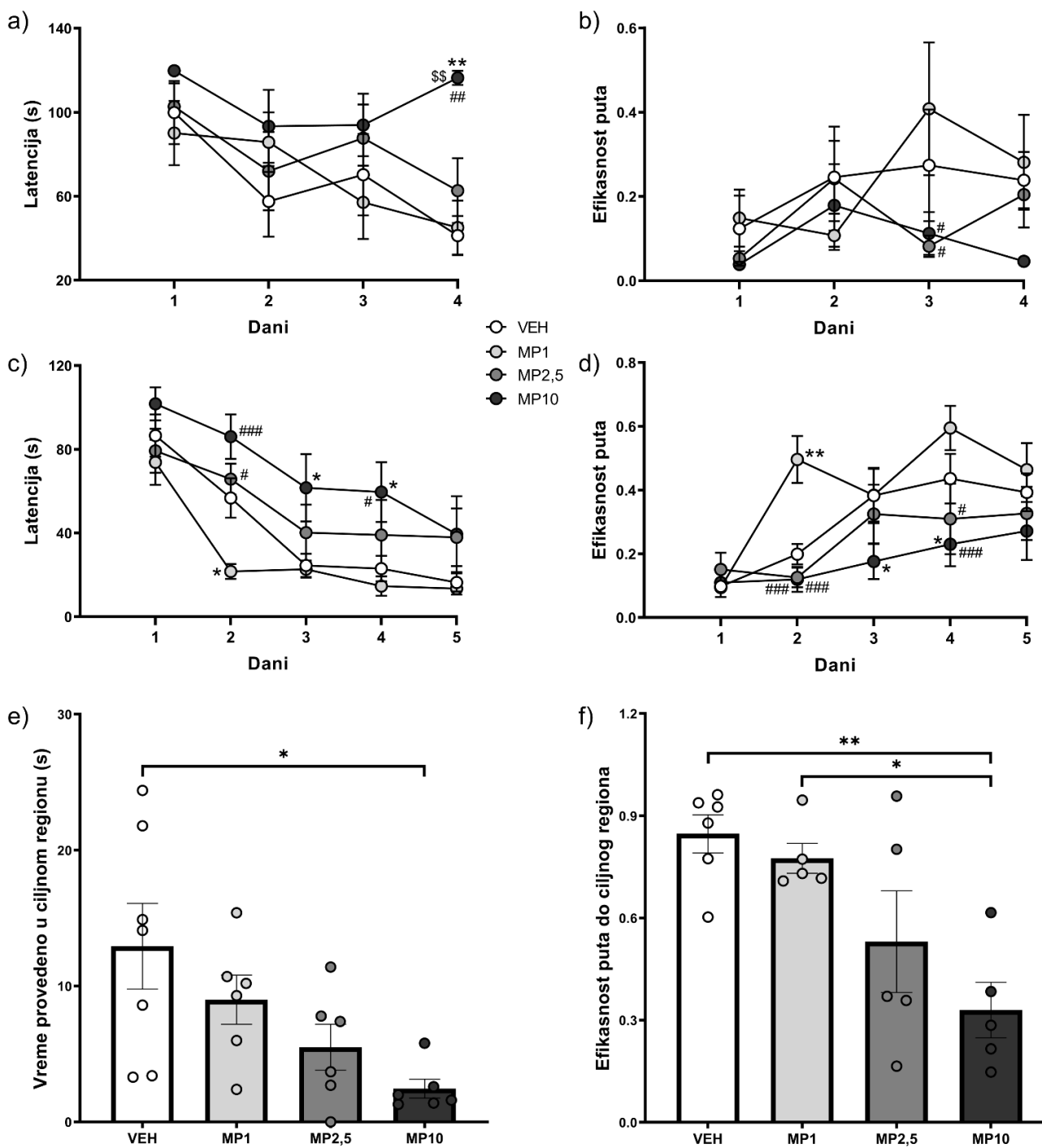
4.1. Uticaj MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju $\alpha 5$ podjedinice

4.1.1. Morisov vodeni lavirint

Za test kratkotrajne memorije, jednofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan uticaj tretmana ($F(3, 27)=6,661$, $p=0,002$) na latenciju testiranjem efekata između subjekata (Slika 11a); *post-hoc* test je otkrio da je MP10 značajno povećao latenciju u poređenju sa svim ostalim grupama ($p=0,003$ u poređenju sa VEH; $p=0,002$ u poređenju sa MP1; $p=0,016$ u poređenju sa MP2,5). Slični rezultati su dobijeni sa parametrom efikasnost puta (Slika 11b): uticaj tretmana je bio značajan ($F(3,27)=3,414$, $p=0,032$), sa najvišom dozom koja je smanjila efikasnost puta na nivou bliskom statističkoj značajnosti ($p=0,056$) i statistički značajno u poređenju sa MP1 ($p=0,041$).

Rezultati petodevne akvizicione faze su predstavljeni na Slici 11c i d. Primećeni su značajni uticaji faktora tretmana ($F(3, 20)=4,092$, $p=0,020$) testiranjem efekata između subjekata i dana ($F(4, 80)=42,432$, $p<0,001$) testiranjem efekata unutar subjekata na latenciju. Naši rezultati su pokazali da najviša doza MP-III-022 dovodi do oštećenja prostornog učenja u poređenju sa VEH grupom na nivou trenda ($p=0,062$) i statistički značajno u poređenju sa najnižom dozom ($p=0,015$). Slični rezultati su dobijeni sa drugim parametrom, efikasnošću puta. Jednofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajne efekte faktora tretmana ($F(3, 20)=5,664$, $p=0,006$) testiranjem efekata između subjekata, dana ($F(4, 80)=12,283$, $p<0,001$) i njihove interakcije ($F(4, 12)=2,173$, $p=0,021$) testiranjem efekata unutar subjekata. *Post-hoc* testovi su pokazali da MP10 ima tendenciju da snizi efikasnost puta u poređenju sa VEH ($p=0,062$). Dodatno, pokazano je da se efikasnost puta MP1 grupe razlikovala od ili imala tendenciju da se razlikuje od svih ostalih grupa ($p=0,004$ u poređenju sa MP10; $p=0,040$ u poređenju sa MP2,5; $p=0,087$ u poređenju sa VEH). Povoljan uticaj MP1 je posebno bio izražen drugog dana.

Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat tretmana ($F(3, 17)=4,504$, $p=0,014$) na vreme provedeno u ciljnom regionu u probnom testu (Slika 11e). Slično rezultatima akvizicione faze, MP10 je smanjio vreme provedeno u ciljnom regionu u poređenju sa VEH ($p=0,011$). Srednja doza, 2,5 mg/kg, takođe je smanjila vreme provedeno u ciljnom regionu, ali u manjoj meri ($p=0,056$ u poređenju sa VEH). Drugi parameter analiziran za probni test, efikasnost puta do ciljnog regiona (Slika 11f) takođe je pokazao značajan efekat tretmana ($F(3, 17)=6,053$, $p=0,005$), uz posebno nepovoljan uticaj MP10. Najviša doza je smanjila efikasnost puta do ciljnog regiona u poređenju sa VEH ($p=0,007$) i MP1 ($p=0,015$). MP2,5 je pokazao trend takvog efekta ($p=0,063$ u poređenju sa VEH; $p=0,088$ u poređenju sa MP1).



Slika 11. Efekat vehikuluma (VEH) ili MP-III-022 1 mg/kg (MP1) ili 2,5 mg/kg (MP2,5) ili 10 mg/kg (MP10) na a) latenciju i b) efikasnost puta u kratkotrajnom Morisovom vodenom lavirintu; c) latenciju i d) efikasnost puta u fazi akvizicije dugotrajnog Morisovog vodenog lavirinta; e) vreme provedeno u ciljnom regionu i f) efikasnost puta do ciljnog regiona pacova u probnom testu Morisovog vodenog lavirinta; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.1.2. Test prepoznavanja novog objekta

Tretman je imao značajan uticaj ($F(3, 25)=11,092$, $p<0,001$) na pamćenje objekta u kratkotrajnom testu prepoznavanja novog objekta (Slika 12a). Najviša doza MP-III-022 je značajno povećala diskriminacioni indeks u poređenju sa svim ostalim grupama ($p=0,044$ u poređenju sa VEH; $p<0,001$ u poređenju sa MP1; $p=0,049$ u poređenju sa MP2,5). Sa druge strane, najniža doza je oštetila pamćenje objekta ($p=0,009$ u poređenju sa VEH; $p=0,002$ u poređenju sa MP2,5).

Jednofaktorska ANOVA je pokazala značaj uticaj tretmana ($F(3, 29)=2,979$, $p=0,048$) na dugotrajni test prepoznavanja novog objekta. Kao što se može videti na Slici 12b, diskriminacioni indeks je pokazao trend smanjivanja pod uticajem MP10 ($p=0,060$ u poređenju sa VEH; $p=0,054$ u poređenju sa MP1).

Efekat tretmana je takođe bio značajan ($F(3, 31)=6,617$, $p=0,001$) u dodatnom dugotrajnom testu prepoznavanja objekta (Slika 12c). Dupla doza MP1 je snizila diskriminacioni indeks u poređenju sa ostalim grupama ($p=0,046$ u poređenju sa VEH/VEH; $p=0,020$ u poređenju sa VEH/MP1; $p<0,001$ u poređenju sa MP1/VEH). Nasuprot tome, kada je data samo jedna doza prvog dana (MP1/VEH grupa), životinje su pokazivale tendenciju da poboljšaju svoju memoriju u poređenju sa VEH/VEH grupom ($p=0,061$).

4.1.3. Test socijalne diskriminacije

Kratkotrajni test socijalne interakcije je pokazao značajan efekat tretmana ($F(3, 28)=3,389$, $p=0,032$) na socijalnu memoriju (Slika 13a). Slično kao u kratkotrajnom testu prepoznavanja objekta, najviša doza MP-III-022 je povisila diskriminacioni indeks, statistički značajno u poređenju sa VEH ($p=0,027$) i na nivou statističkog trenda u poređenju sa MP1 ($p=0,068$).

Obrnuto, efekat tretmana ($F(3, 31)=3,123$, $p=0,040$) na dugotrajnu socijalnu memoriju može da se vidi u snižavanju diskriminacionog indeksa od strane MP10, u poređenju sa VEH ($p=0,039$) i, na samoj ivici značajnosti, u poređenju sa MP1 ($p=0,052$), prikazano na Slici 13b.

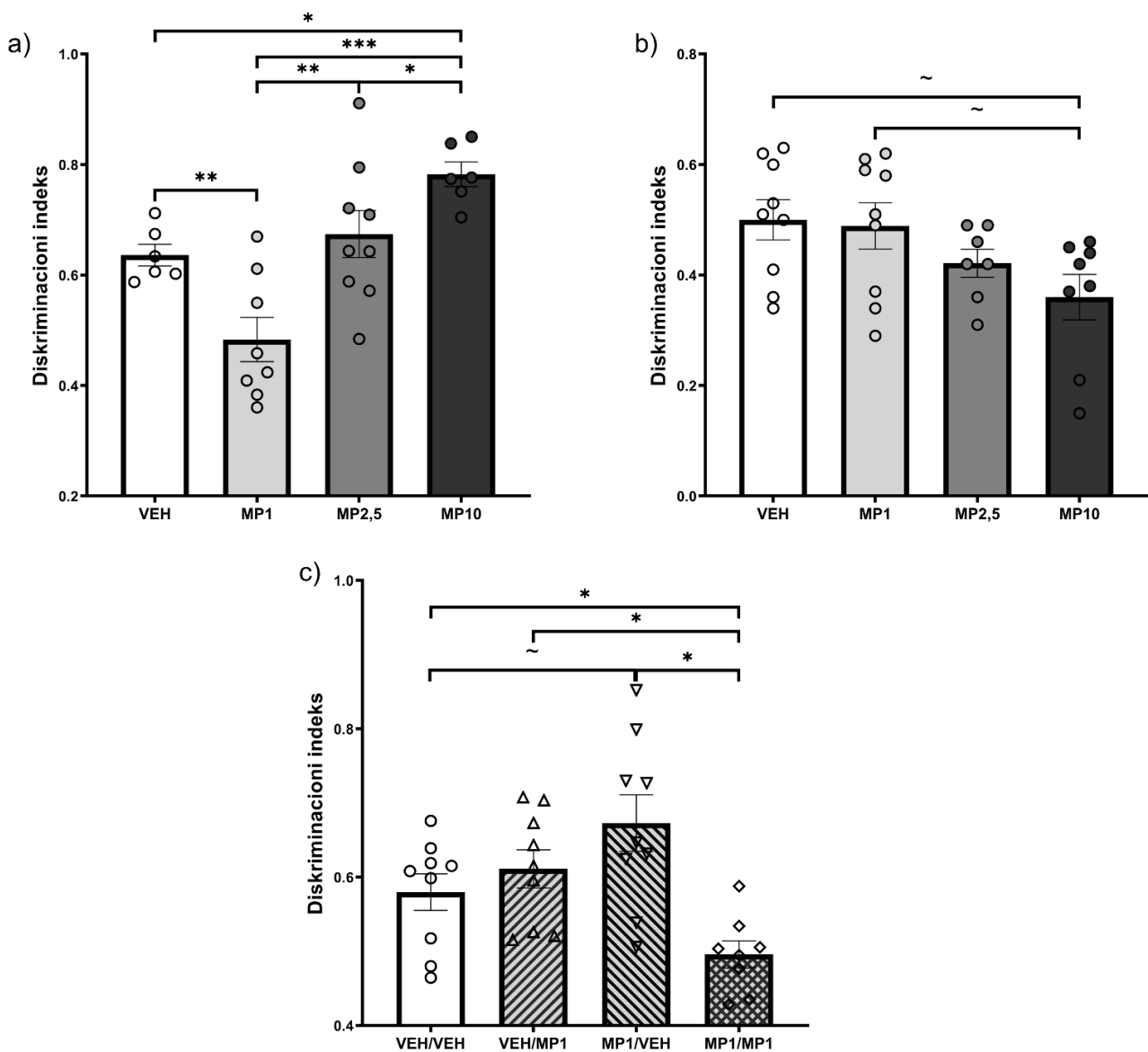
Opet, slično kao u testu prepoznavanja objekta, dodatni dugotrajni test socijalne diskriminacije je pokazao značajan efekat tretmana ($F(3, 45)=5,127$, $p=0,004$), takav da je dupla doza MP1 oštetila, ili pokazala trend da šteti, socijalnu memoriju u poređenju sa ostalim grupama ($p=0,076$ u poređenju sa VEH/VEH; $p=0,049$ u poređenju sa VEH/MP1; $p=0,003$ u poređenju sa MP1/VEH). Sa druge strane, jedna doza data prvog dana je povećala diskriminacioni nivo u poređenju sa VEH/VEH grupom na nivou trenda ($p=0,063$), (Slika 13c).

4.1.4. Real-time PCR

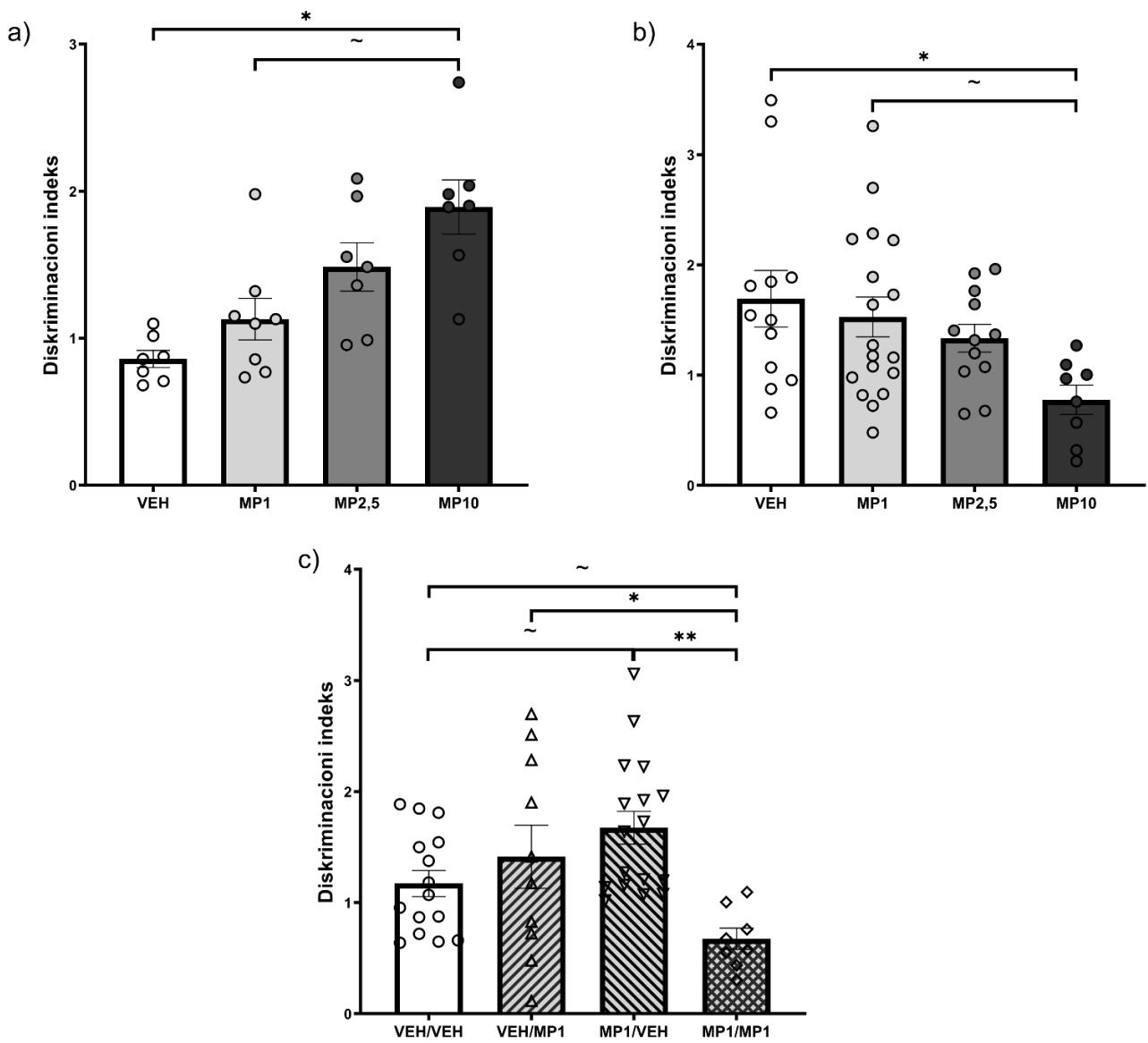
Životinje koje su primile MP-III-022 su posle 24 h imale povećanu ekspresiju iRNK GABRA5 u prefrontalnom korteksu (Slika 14a), statistički značajnu za najnižu dozu ($p=0,013$) i malo ispod statističke značajnosti za najvišu dozu ($p=0,057$).

U CA1 regionu hipokampusa (Slika 14b) detektovan je smanjen nivo GABRA5 iRNK 24 h posle MP10 ($p=0,022$). Trend smanjivanja GABRA5 ekspresije je primećen posle tretmana sa MP1, 30 min posle jedne ($p=0,072$) i dve doze ($p=0,068$).

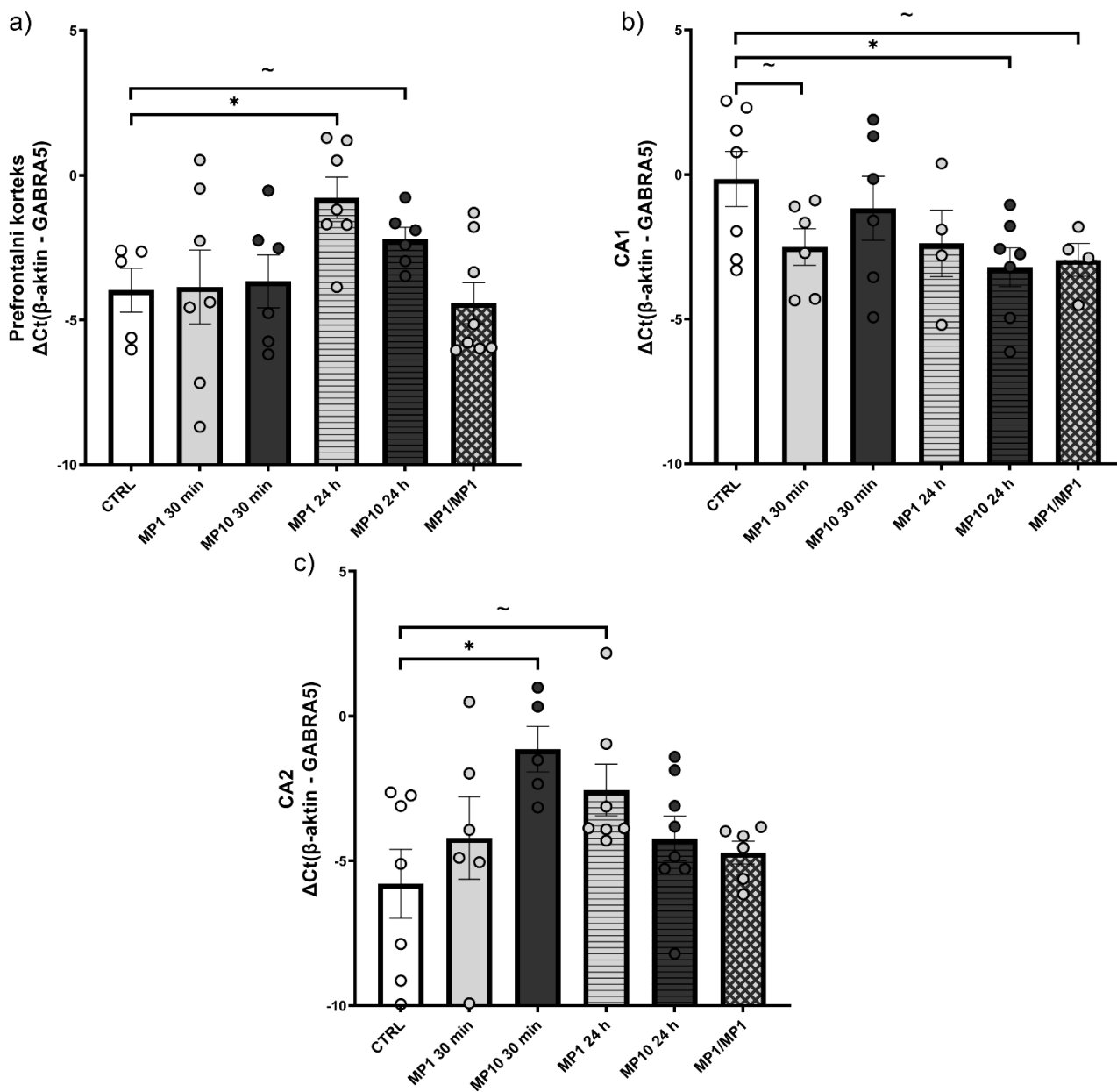
Finalno, u CA2 regionu hipokampusa (Slika 14c), MP10 je povećao nivo GABRA5 iRNK 30 min posle tretmana ($p=0,023$), dok je MP1 pokazao trend istog efekta 24 h posle tretmana ($p=0,056$).



Slika 12. Efekat vehikuluma (VEH) ili MP-III-022 1 mg/kg (MP1) ili 2,5 mg/kg (MP2,5) ili 10 mg/kg (MP10) na diskriminacioni indeks pacova u a) kratkotrajnom testu prepoznavanja novog objekta; b) dugotrajnom testu prepoznavanja novog objekta. c) Efekat različite vremenske kombinacije VEH ili MP1 na diskriminacioni indeks pacova u dugotrajnom testu prepoznavanja novog objekta. ~ 0,05<p<0,1, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.



Slika 13. Efekat vehikuluma (VEH) ili MP-III-022 1 mg/kg (MP1) ili 2,5 mg/kg (MP2,5) ili 10 mg/kg (MP10) na diskriminacioni indeks pacova u a) kratkotrajnom testu socijalne diskriminacije; b) dugotrajnom testu socijalne diskriminacije. Efekat različite vremenske kombinacije VEH ili MP1 na diskriminacioni indeks pacova u dugotrajnom testu socijalne diskriminacije. ~ 0,05<p<0,1, * p<0,05, ** p<0,01.



Slika 14. Nivo GABRA5 iRNK posle primene MP-III-022 1 mg/kg (MP1) ili 10 mg/kg (MP10) u prikazanim vremenskim tačkama u a) prefrontalnom korteksu, b) CA1 regiji hipokampusa, c) CA2 regiji hipokampusa. $\sim 0,05 < p < 0,1$, $* p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom (eng. *control*, CTRL).

4.2. Mišji model ASD-a

4.2.1. Neurološki testovi

Sve životinje su uspešno prošle testove refleksa i nije otkrivena razlika između sojeva. Dvofaktorska ANOVA je pokazala jasan uticaj i soja ($F(1, 58)=506,473$, $p<0,001$) i pola ($F(1, 58)=65,796$, $p<0,001$) na masu ispitivanih životinja. BTBR miševi su teži od C57BL miševa i to kod oba pola (mužjaci: $p<0,001$, ženke: $p<0,001$); i mužjaci su teži od ženki oba soja (BTBR: $p<0,001$, C57BL: $p<0,001$). Njihove mase su bile sledeće (srednja vrednost \pm standardna greška): C57BL mužjaci – 16,27 g \pm 0,29 g, C57BL ženke – 14,21 g \pm 0,30 g, BTBR mužjaci – 23,8 g \pm 0,32 g, BTBR ženke – 20,63 g \pm 0,29 g.

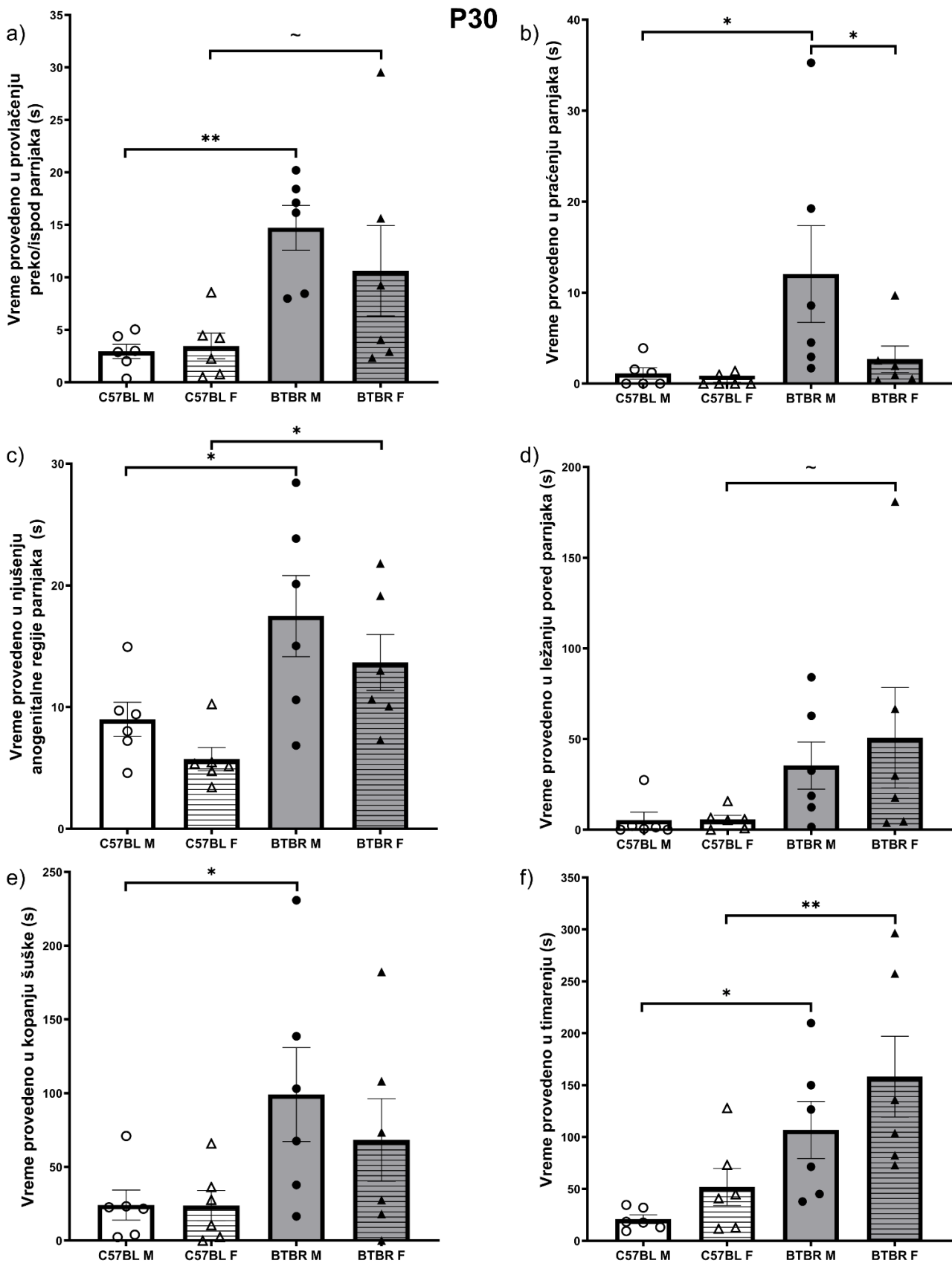
4.2.2. Test socijalne interakcije

P30: MANOVA je pokazala značaj generalan uticaj soja ($F(5, 16)=8,713$, $p<0,001$; Wilks' $\Lambda=0,269$) na parametre socijalne interakcije. Analizirajući svaki parameter zasebno, pokazano je da su BTBR miševi proveli više vremena u provlačenju preko/ispod parnjaka ($F(1, 20)=14,322$, $p=0,001$), što je bilo više izraženo kod mužjaka ($p=0,003$) i manje kod ženki (na nivou trenda, $p=0,057$), (Slika 15a). Slično, BTBR miševi su proveli više vremena u praćenju uparene životinje ($F(1, 20)=5,030$, $p=0,036$); pre svega su BTBR mužjaci više pratili parnjaka u odnosu na C57BL mužjake ($p=0,015$) i BTBR ženke ($p=0,033$), (Slika 15b). Vreme provedeno u njušenju anogenitalne regije parnjaka (ali ne i njušenju prednjeg dela tela) takođe se pokazalo kao značajno ($F(1, 20)=13,960$, $p=0,001$), gde su BTBR provodili više vremena u ovoj aktivnosti u odnosu na C57BL soj, što je pokazano i kod mužjaka ($p=0,013$) i kod ženki ($p=0,019$), (Slika 15c). BTBR pacovi su takođe više vremena ležali jedno pored drugog ($F(1, 20)=5,208$, $p=0,034$), što je pokazano kod ženki na nivou trenda ($p=0,059$), (Slika 15d).

Pored parametara socijalne interakcije, praćeno je i vreme provedeno u kopanju šuške, gde je pokazano da su BTBR miševi provodili više vremena u ovoj aktivnosti u odnosu na C57BL miševe ($F(1, 20)=6,804$, $p=0,017$), što je bilo izraženo kod mužjaka ($p=0,028$), (Slika 15e). Slično, pokazan je uticaj soja na vreme provedeno u timarenju ($F(1, 20)=14,175$, $p=0,001$), po kome je BTBR provodio više vremena timareći se, kako mužjaci ($p=0,027$), tako i ženke ($p=0,008$), (Slika 15f).

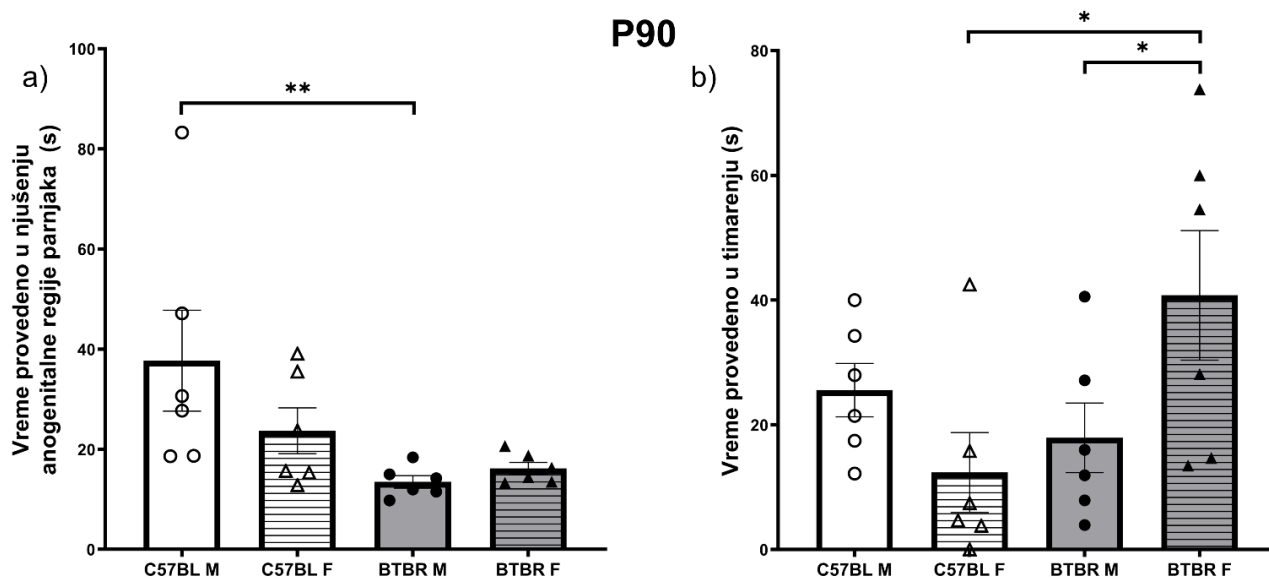
P90: Analiza socijalne interakcije MANOVA testom je otkrila značaj uticaj soja ($F(5, 16)=2,985$, $p=0,043$; Wilks' $\Lambda=0,517$). Na nivou pojedinačnog parametra, soj je imao značajan uticaj samo na vreme provedeno u njušenju anogenitalne regije parnjaka ($F(1, 20)=7,135$, $p=0,015$) gde su BTBR miševi proveli manje vremena u ovoj aktivnosti u odnosu na C57BL soj, pre svega mužjaci ($p=0,008$), (Slika 16a).

Nije pokazana razlika u vremenu provedenom u kopanju šuške. Ispitivanje parametra timarenja je pokazalo značajan uticaj interakcije soja i pola ($F(1, 20)=6,555$, $p=0,19$), gde su BTBR ženke provele više vremena timareći se u odnosu na C57BL ženke ($p=0,010$) i BTBR mužjake ($p=0,033$), (Slika 16b).



Slika 15. Ponašanje BTBR T+ *tf/J* (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u testu socijalne interakcije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u provlačenju preko/ispod parnjaka, b) vreme provedeno u praćenju parnjaka, c) vreme provedeno u njušenju anogenitalne regije

parnjaka, d) vreme provedeno u ležanju pored parnjaka, e) vreme provedeno u kopanju šuške, f) vreme provedeno u timarenju. $\sim 0,05 < p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Slika 16. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u testu socijalne interakcije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u njušenju anogenitalne regije parnjaka, b) vreme provedeno u timarenju. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

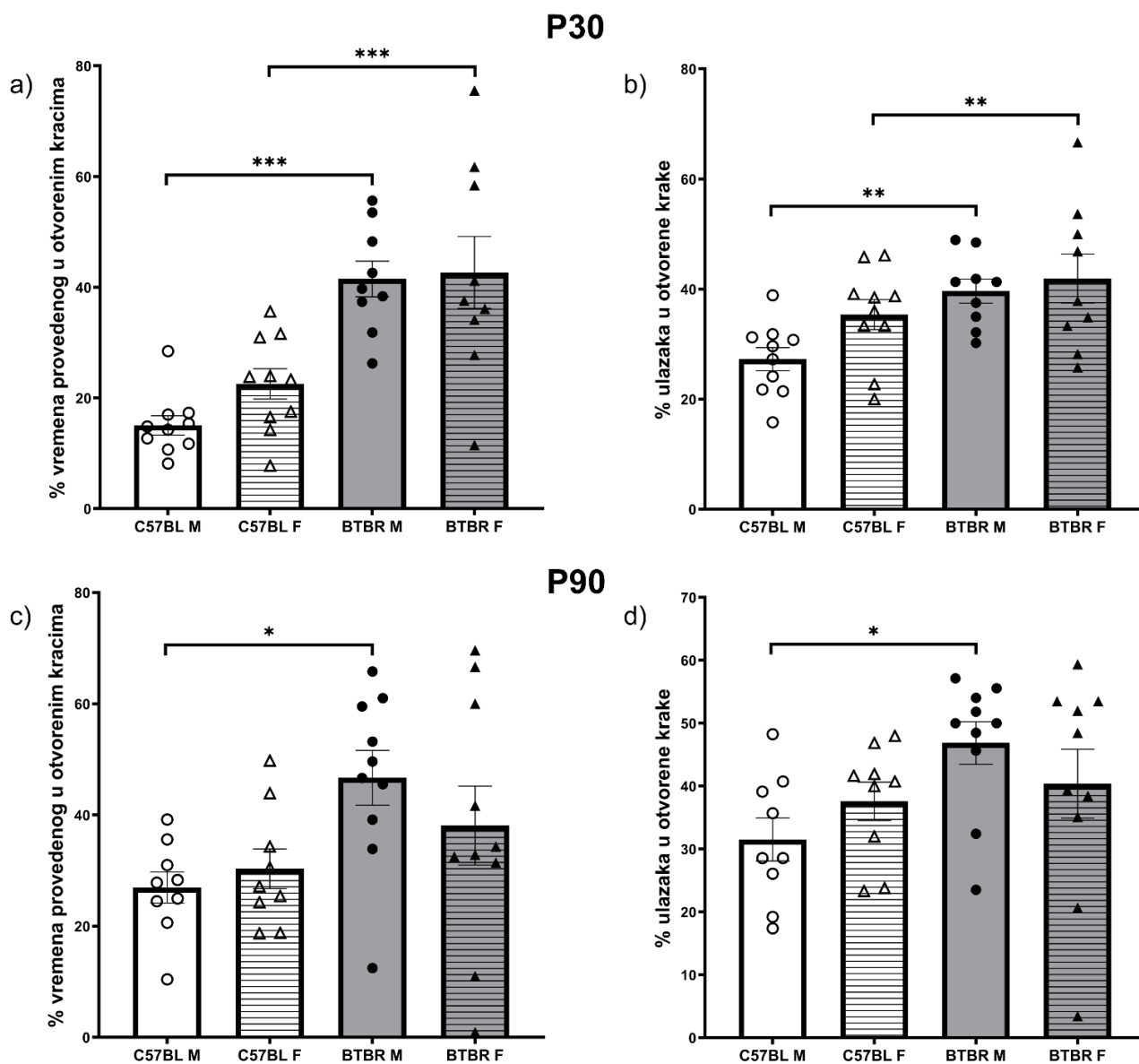
4.2.3. Uzdignuti plus lavirint

P30: Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj soja na procenat vremena provedenog u otvorenim kracima ($F(1, 34)=39,961$, $p < 0,001$). Generalno, BTBR miševi su proveli više vremena u otvorenim kracima u poređenju sa C57BL životinjama; takođe pokazano i na nivou oba pola (mužjaci $p < 0,001$, ženke $p < 0,001$), (Slika 17a).

Slično, BTBR miševi su imali veći procenat ulazaka u otvorene krake ($F(1, 34)=10,168$, $p=0,003$) u odnosu na C57BL soj, što je takođe pokazano kod mužjaka ($p=0,006$), (Slika 17b).

P90: Otkriven je značajan uticaj soja na procenat vremena provedenog u otvorenim kracima ($F(1, 34)=6,981$, $p=0,012$), gde su BTBR miševi provodili više vremena u otvorenim kracima u poređenju sa C57BL miševima, pogotovo izraženo kod mužjaka ($p=0,012$), (Slika 17c).

Isti rezultat je dobijen i sa drugim parametrom, procenat ulazaka u otvorene krake: BTBR soj je imao više ulazaka u odnosu na C57BL ($F(1, 34)=5,067$, $p=0,031$), takođe demonstrirano i kod mužjaka ($p=0,011$), (Slika 17d).



Slika 17. Ponašanje BTBR T+ *tf/J* (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u uzdignutom plus lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) % vremena provedenog u otvorenim kracima, b) % ulazaka u otvorene krake u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30); a) % vremena provedenog u otvorenim kracima, b) % ulazaka u otvorene krake u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.4. Test spontane lokomotorne aktivnosti

P30: Soj je pokazao značajan uticaj na vreme provedeno u aktivnosti ($F(1, 34)=6,380$, $p=0,016$), pošto su BTBR miševi provodili manje vremena u aktivnosti u odnosu na C57BL miševe, statistički značajno izraženo kod mužjaka ($p=0,037$), (Slika 18a).

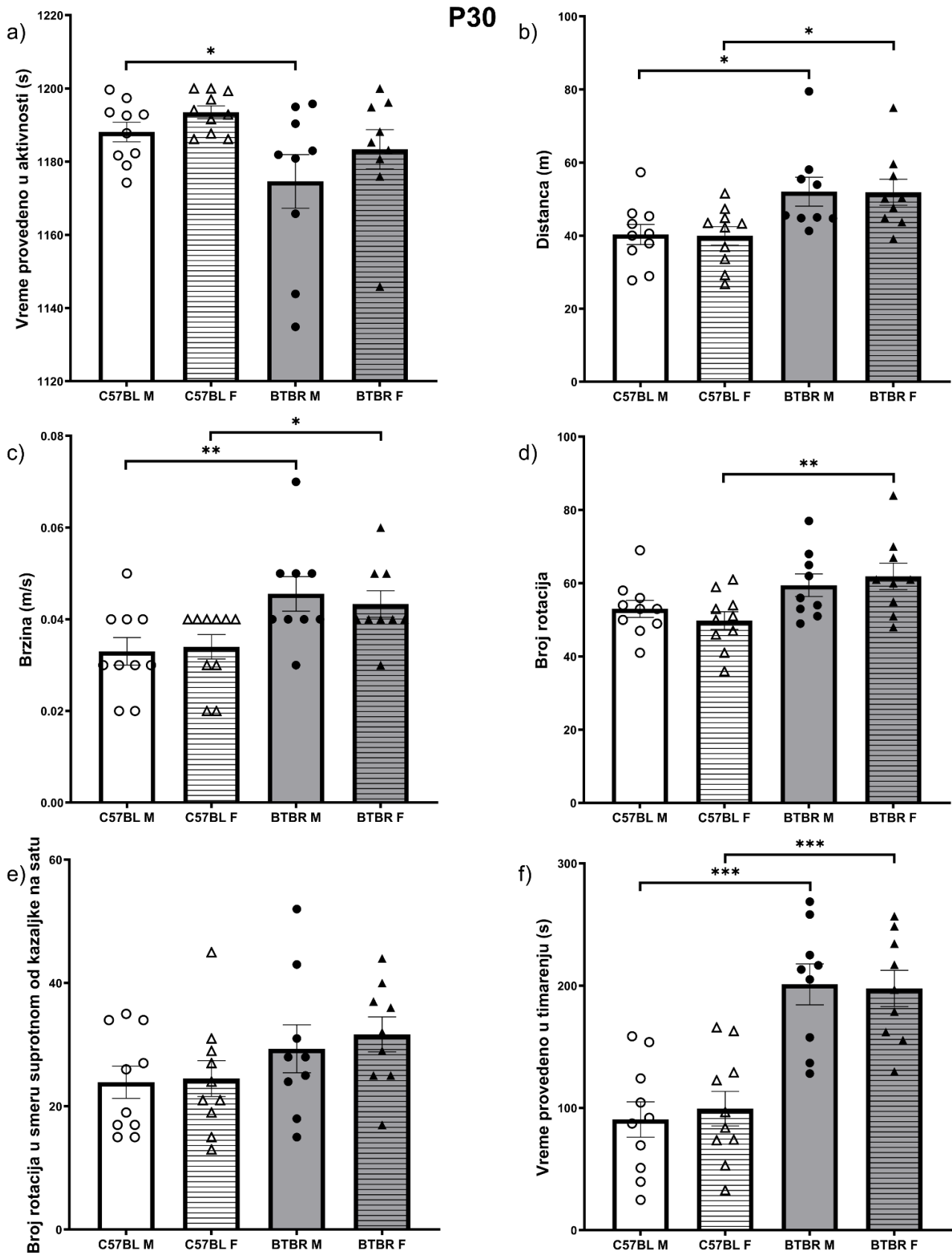
Nasuprot tome, dvofaktorska ANOVA je otkrila značajan uticaj soja ($F(1, 34)=13,738$, $p<0,001$) na pređenu distancu. BTBR miševi su prelazili veću distancu od C57BL soja i kod mužjaka ($p=0,014$) i kod ženki ($p=0,012$), (Slika 18b).

Isti rezultati su dobijeni i sa trećim praćenim parametrom, brzinom, gde je opet BTBR soj pokazao veću brzinu ($F(1, 34)=12,558$, $p=0,001$) u odnosu na C57BL, i kod mužjaka ($p=0,007$) i kod ženki ($p=0,040$), (Slika 18c).

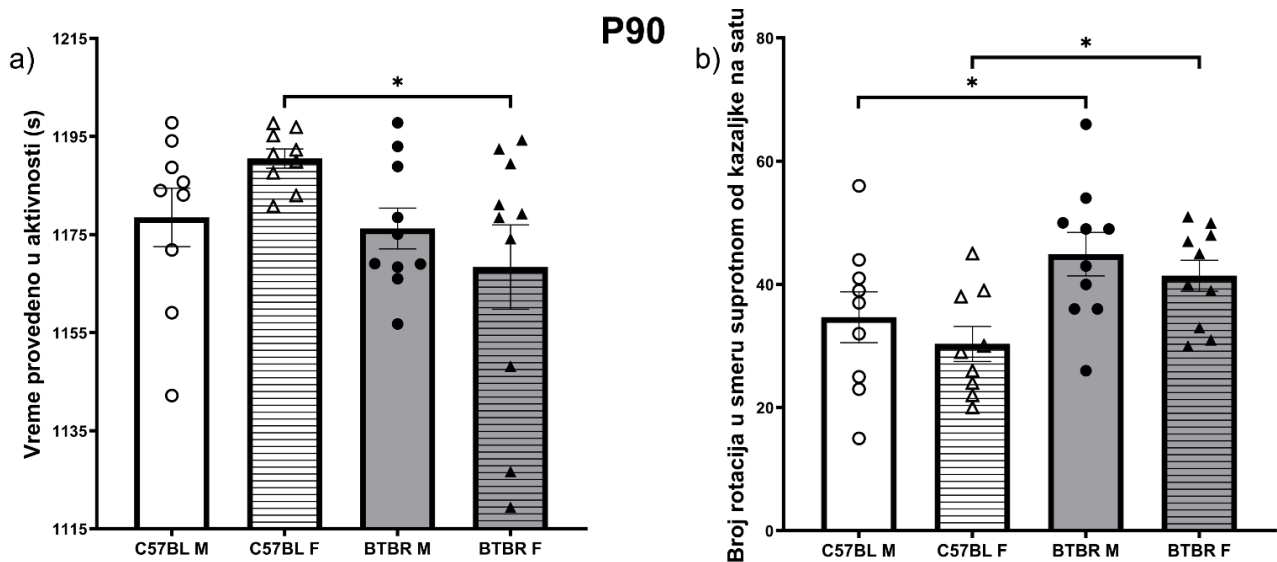
BTRB je takođe demonstrirao povećan broj rotacija ($F(1, 34)=10,427$, $p=0,003$) u odnosu na C57BL soj, pre svega kod ženki ($p=0,005$), (Slika 18d). Nije bilo razlika u broju rotacija u smeru kazaljke na satu, ali soj jeste imao značajan uticaj na broj rotacije u smeru suprotnom kazaljka na satu ($F(1, 34)=4,187$, $p=0,049$), sa povećanim brojem kod BTBR miševa u odnosu na C57BL (Slika 18e). Nije bilo razlike u odnosu dva tipa rotacija ni u jednoj ispitivanoj grupi.

Finalno, BTBR miševi su provodili više vremena u timarenju u odnosu na C57BL miševe ($F(1, 34)=48,167$, $p<0,001$), što je pokazano i kod mužjaka ($p<0,001$) i kod ženki ($p<0,001$), (Slika 18f).

P90: Dvofaktorska ANOVA je pokazala da BTBR miševi provode manje vremena u aktivnosti u poređenju sa C57BL miševima ($F(1, 34)=4,288$, $p=0,046$), što je pre svega bila pokazano kod ženki ($p=0,012$), (Slika 19a). Nisu nađene razlike za sledeće parametre: distanca, brzina, broj rotacija, broj rotacija u smeru kazaljke na satu i vreme provedeno u timarenju. Demonstrirano je da BTBR miševi imaju veći broj rotacija u smeru suprotnom kazaljci na satu ($F(1, 34)=10,387$, $p=0,003$), i to kod oba pola (mužjaci $p=0,036$, ženke $p=0,024$), (Slika 19b). Upareni t-test nije pokazao razliku između broja dva tipa rotacija ni za jednu grupu.



Slika 18. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u testu spontane lokomotorne aktivnosti prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u aktivnosti, b) pređena distanca, c) brzina kretanja, d) broj rotacija, e) broj rotacija u smeru suprotnom kazaljci na satu, f) vreme provedeno u timarenju. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Slika 19. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u testu spontane lokomotorne aktivnosti prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u aktivnosti, b) broj rotacija u smeru suprotnom kazaljci na satu. * $p < 0,05$.

4.2.5. Test tri prostorije

P30: Analiza vremena provedenog tokom habituacije u lateralnim prostorijama označenim kao A i B je pokazala da nije bilo preferencije za stranu, sem kod BTBR ženki, koje su više vremena provodile u A strani ($p=0,006$), (rezultati nisu grafički predstavljeni).

MANOVA je pokazala značaj uticaj soja ($F(3, 32)=6,631$, $p=0,001$; Wilks' $\Lambda=0,617$), što je bilo izraženo u pogledu vremena provedenog u prostoriji sa mišem ($F(1, 34)=8,409$, $p=0,007$), i u centralnoj prostoriji ($F(1, 34)=16,436$, $p < 0,001$), gde su BTBR miševi provodili više vremena sa mišem, a manje u centralnoj prostoriji, u odnosu na C57BL miševe. Ove razlike su bile demonstrirane i kod mužjaka (prostorija sa mišem $p=0,048$, centralna prostorija $p=0,001$) i nešto manje kod ženki (prostorija sa mišem $p=0,049$, centralna prostorija $p=0,060$, statistički trend), (Slika 20a).

Analizirajući diskriminacioni indeks, videli smo da je BTBR soj imao veći indeks u odnosu na C57BL/6 ($F(1, 34)=9,503$, $p=0,004$), dodatno pokazano kod ženki ($p=0,008$), (Slika 20b).

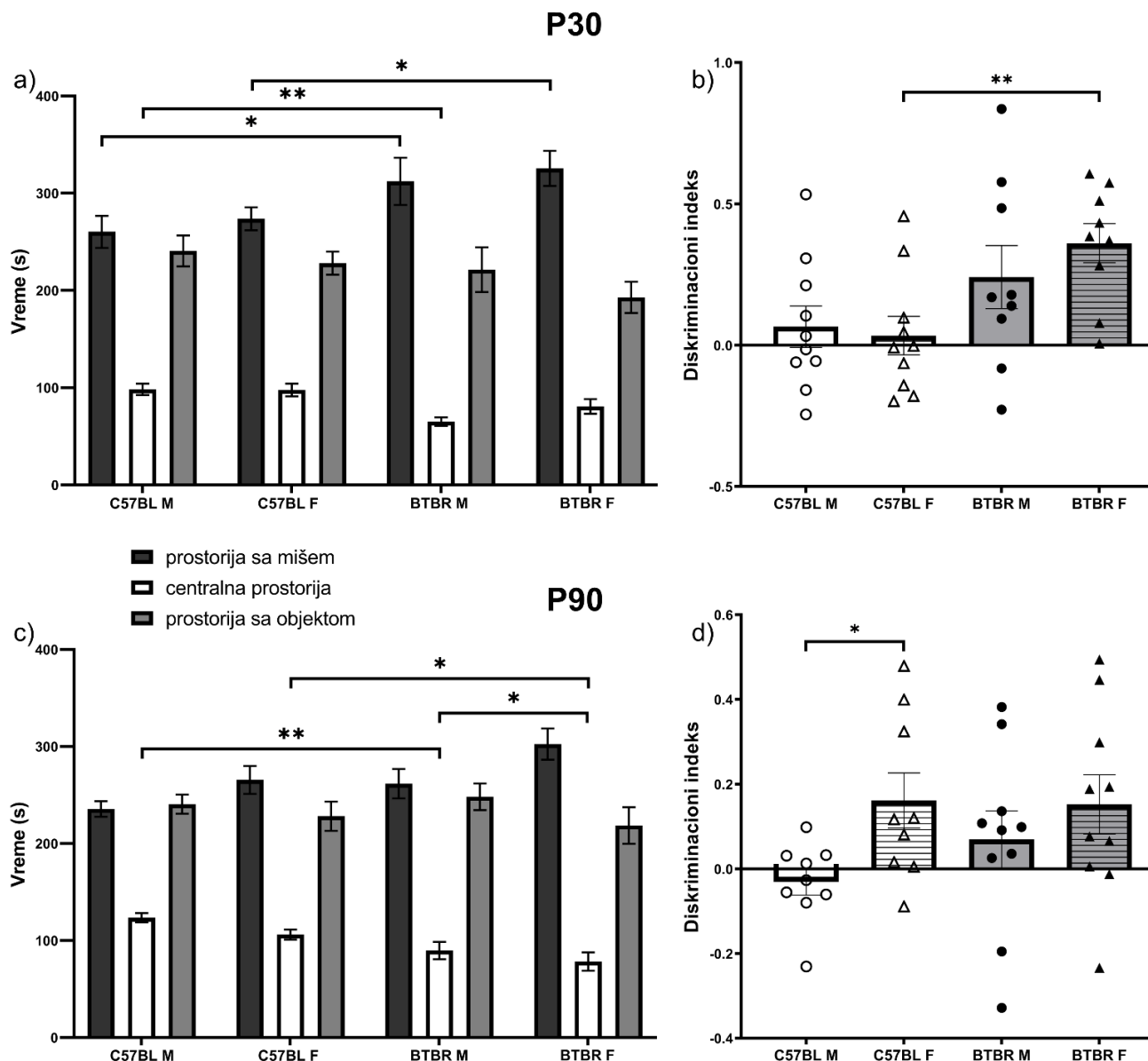
Nije bilo razlike u testu socijalne memorije. *One sample t-test* je pokazao da sve grupe provode podjednako vremena sa poznatim i novim mišem, sem C57BL mužjaka, koji su provodili više vremena sa poznatim mišem ($p=0,017$), (rezultati nisu grafički predstavljeni).

P90: Nije bilo preferencije za A ili B prostoriju ni u jednoj grupi.

MANOVA je pokazala značaj opšti uticaj soja ($F(3, 32)=7,247$, $p=0,001$; Wilks' $\Lambda=0,595$), kao i na vreme provedeno u prostoriji sa mišem ($F(1, 34)=5,043$, $p=0,031$) i centralnoj prostoriji ($F(1, 34)=16,329$, $p < 0,001$), kao i pola na vreme provedeno u prostoriji sa mišem ($F(1, 34)=6,353$, $p=0,017$). Generalno, BTBR soj je proveo više vremena u prostoriji sa mišem, a manje u centralnoj prostoriji u odnosu na C57BL soj. Takva razlika u vremenu u centralnoj prostoriji je takođe pokazana i kod mužjaka ($p=0,003$) i kod ženki ($p=0,015$). Dodatno, mužjaci su proveli manje vremena u prostoriji sa mišem u odnosu na ženke, a BTBR mužjaci su proveli manje vremena u centralnoj prostoriji u odnosu na BTBR ženke ($p=0,042$), (Slika 20c).

Analizirajući diskriminacioni indeks, videli smo da je ženski pol imao veći indeks u odnosu na muški ($F(1, 34)=4,988$, $p=0,032$), dodatno pokazano kod C57BL soja ($p=0,039$), (Slika 20d).

Nije bilo razlike u testu socijalne memorije, niti je ijedna grupa pokazala da provodi više vremena bilo sa starim ili sa novim mišem.



Slika 20. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u testu tri prostorije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u svakoj prostoriji, b) diskriminacioni indeks tokom testa socijalnosti u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30); a) vreme provedeno u svakoj prostoriji, b) diskriminacioni indeks testa socijalnosti u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.2.6. Morisov vodeni lavirint

P30: Nije bilo razlike u latenciji, efikasnosti puta i procentu puta pređenog u perifernom prstenu u *cue* fazi.

Što se tiče akvizicije, pokazan je značajan uticaj interakcije dana, pola i soja ($F(4,297, 146,102)=2,447, p=0,045$) testiranjem efekata unutar subjekata na latenciju. Što se tiče efekata između subjekata, otkriven je značajan uticaj soja ($F(1, 34)=53,972, p<0,001$). BTBR su imali veću latenciju u odnosu na C57BL soj, što je pokazano i kod mužjaka ($p<0,001$) i kod ženki ($p<0,001$). Pored toga, BTBR mužjaci su imali veću latenciju u odnosu i na BTBR ženke ($p=0,038$), (Slika 21a). U pogledu drugog parametra, efikasnosti puta, testiranjem efekata unutar subjekata otkriven je značajan uticaj interakcije dana i soja ($F(5, 170)=6,261, p=0,001$). Slično, testiranjem efekata između subjekata otkriven je uticaj soja na efikasnost puta ($F(1, 34)=104,884, p<0,001$). BTBR je imao manju efikasnost puta u odnosu na C57BL miševe, što je bilo izraženo i kod mužjaka ($p<0,001$) i kod ženki ($p<0,001$). Dodatno, BTBR mužjaci su imali nižu efikasnost puta i u odnosu na BTBR ženke ($p=0,042$), (Slika 21b).

Testiranjem efekata unutar subjekata pokazan je značajan uticaj interakcije dana i soja na procenat perifernog puta ($F(4,534, 154,166)=4,695, p=0,001$). Dodatno, testiranjem efekata između subjekata otkriven je uticaj i pola ($F(1, 34)=12,724, p=0,001$) i soja ($F(1, 34)=98,460, p<0,001$) na procenat puta pređenog u perifernom prstenu. Mužjaci su imali veći procenat perifernog puta od ženki, i kod BTBR ($p=0,008$) i kod C57BL soja ($p=0,035$). BTBR miševi su imali veći procenat puta provedenog u perifernom prstenu u poređenju sa C57BL sojem i kod mužjaka ($p<0,001$) i kod ženki ($p<0,001$), (Slika 21c).

Što se tiče probnog testa, pokazan je značajan uticaj soja ($F(1, 34)=10,745, p=0,002$) i interakcije pola i soja ($F(1, 34)=7,864, p=0,008$) na broj ulazaka u ciljni region. BTBR soj je manje puta ušao u ciljni region u poređenju sa C57BL sojem, što je takođe bilo izraženo kod mužjaka ($p<0,001$). BTBR mužjaci su takođe ušli manji broj puta u ciljni region u odnosu na BTBR ženke ($p=0,013$), (Slika 21d).

U reverznom testu, pokazan je značajan uticaj interakcije dana i soja ($F(2,322, 78,939)=4,421, p=0,011$) na latenciju testiranjem efekata unutar subjekata. Slično, otkriven je značajan uticaj soja ($F(1, 34)=33,136, p<0,001$) i testiranjem efekata između subjekata. BTBR soj je imao veću latenciju u odnosu na C57BL soj, što je takođe demonstrirano i kod mužjaka ($p<0,001$) i kod ženki ($p=0,004$), (Slika 22a).

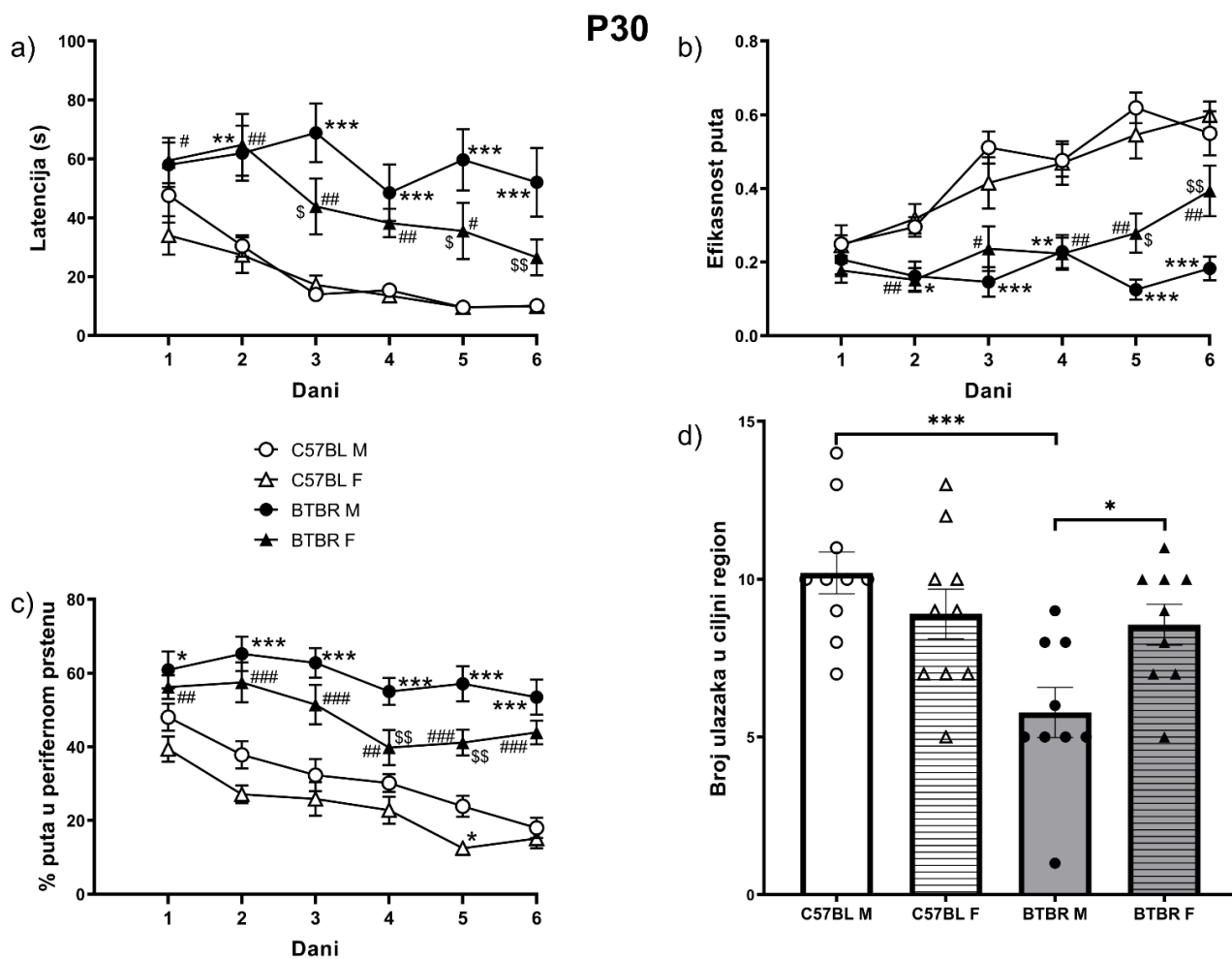
Slično je dobijeno i sa parametrom efikasnost puta – značajan uticaj interakcije dana i soja ($F(3, 102)=7,155, p<0,001$) testiranjem efekata unutar subjekata. Dodatno, testiranjem efekata između subjekata pokazan je značajan efekat soja ($F(1, 34)=35,713, p<0,001$) i interakcije soja i pola ($F(1, 34)=4,227, p=0,048$). BTBR miševi su imali manju efikasnost puta, pokazano i kod mužjaka ($p<0,001$) i kod ženki ($p=0,009$), u odnosu na C57BL miševe, (Slika 22b).

Što se tiče procenta perifernog puta u reverznoj akviziciji, testiranjem efekata unutar subjekata otkriven je uticaj interakcije dana, pola i soja ($F(2,790, 94,875)=2,953, p=0,040$). Takođe je pokazan značaj uticaj soja ($F(1, 34)=44,543, p<0,001$) na isti parametar testiranjem efekata između subjekata. BTBR miševi su prešli veći procenat puta u perifernom prstenu u odnosu na C57BL miševe, kako kod mužjaka ($p<0,001$), tako i kod ženki ($p=0,001$), (Slika 22c).

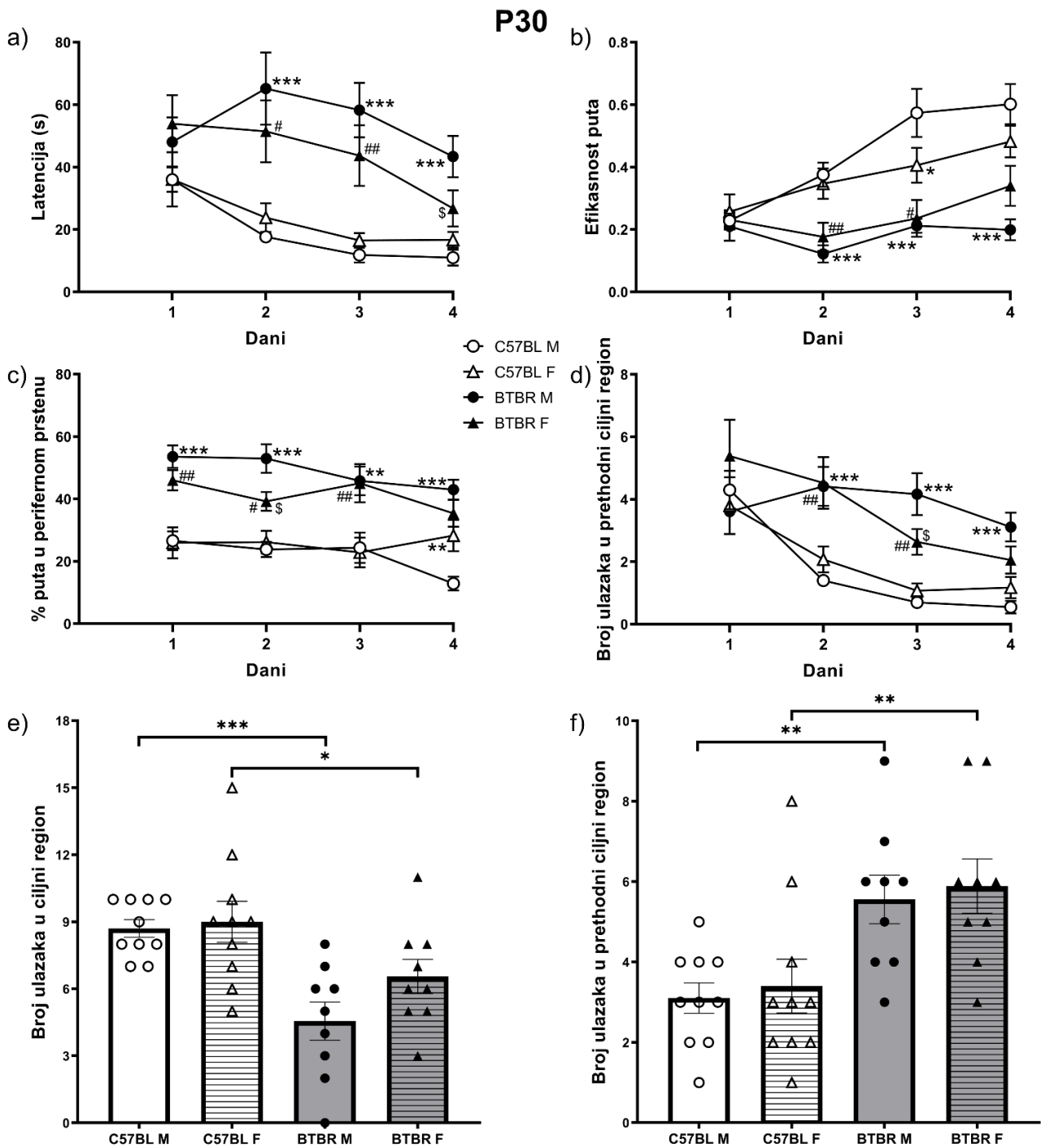
Analiza broja ulazaka u prethodni ciljni region testiranjem efekata unutar subjekata je pokazala značajan uticaj interakcije dana i soja ($F(1,604, 54,529)=3,889, p=0,035$). Značajan uticaj soja je dobijen i testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 34)=26,505, p<0,001$). BTBR miševi, i mužjaci ($p<0,001$) i ženke ($p=0,003$), imali su veći broj ulazaka u prethodni ciljni region u odnosu na C57BL miševe, (Slika 22d).

Na kraju, reverzni probni test je pokazao značajan uticaj soja na broj ulazaka u ciljni region ($F(1, 34)=18,247, p<0,001$). BTBR soj je ušao manji broj puta u ciljni region od C57BL soja, i kod mužjaka ($p<0,001$) i kod ženki ($p=0,028$), (Slika 22e). Faktor soj je takođe imao značajan uticaj i na broj ulazaka u prethodni ciljni region ($F(1, 34)=17,513, p<0,001$). BTBR miševi su imali veći broj ulazaka

u prethodni ciljni region u odnosu na C57BL miševe, i to je pokazano i kod mužjaka ($p=0,006$) i kod ženki ($p=0,005$), (Slika 22f).



Slika 21. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u standardnom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta, c) % puta pređen u perifernom prstenu tokom akvizicije; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ u odnosu na C57BL M, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ u odnosu na C57BL F, \$ $p<0,05$, \$\$ $p<0,01$ u odnosu na BTBR M; d) broj ulazaka u ciljni region tokom probnog testa; * $p<0,05$, *** $p<0,001$.



Slika 22. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u reverznom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta, c) % puta pređen u perifernom prstenu, d) broj ulazaka u prethodni ciljini region tokom akvizicije; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u odnosu na C57BL M, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ u odnosu na C57BL F, \$ $p < 0,05$ u odnosu na BTBR M; e) broj ulazaka u ciljini region i f) broj ulazaka u prethodni ciljini region tokom probnog testa; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

P90: Pokazana je razlika u sva tri praćena parametra u *cue* fazi Morisovog vodenog lavirinta. BTBR životinje su imale povećanu latenciju do penjanja na platformu ($F(1, 34)=4,907, p=0,034$), što je bilo izraženo kod ženki na nivou trenda ($p=0,094$). Dodatno je pokazan i uticaj pola na nivou trenda ($F(1, 34)=4,097, p=0,051$) sa tendencijom ženki da im treba više vremena da dođu do platforme, (Slika 23a).

Slično je dobijeno analizom parametra efikasnost puta. BTBR miševi su pokazali nižu efikasnost puta ($F(1, 34)=5,631, p=0,023$), kao i ženke u odnosu na mužjake ($F(1, 34)=7,253, p=0,011$). BTBR mužjaci su demonstrirali manju efikasnost puta u odnosu na C57BL mužjake na nivou trenda ($p=0,061$) i C57BL ženke su bile manje efikasne u odnosu na mužjake ($p=0,042$), (Slika 23b).

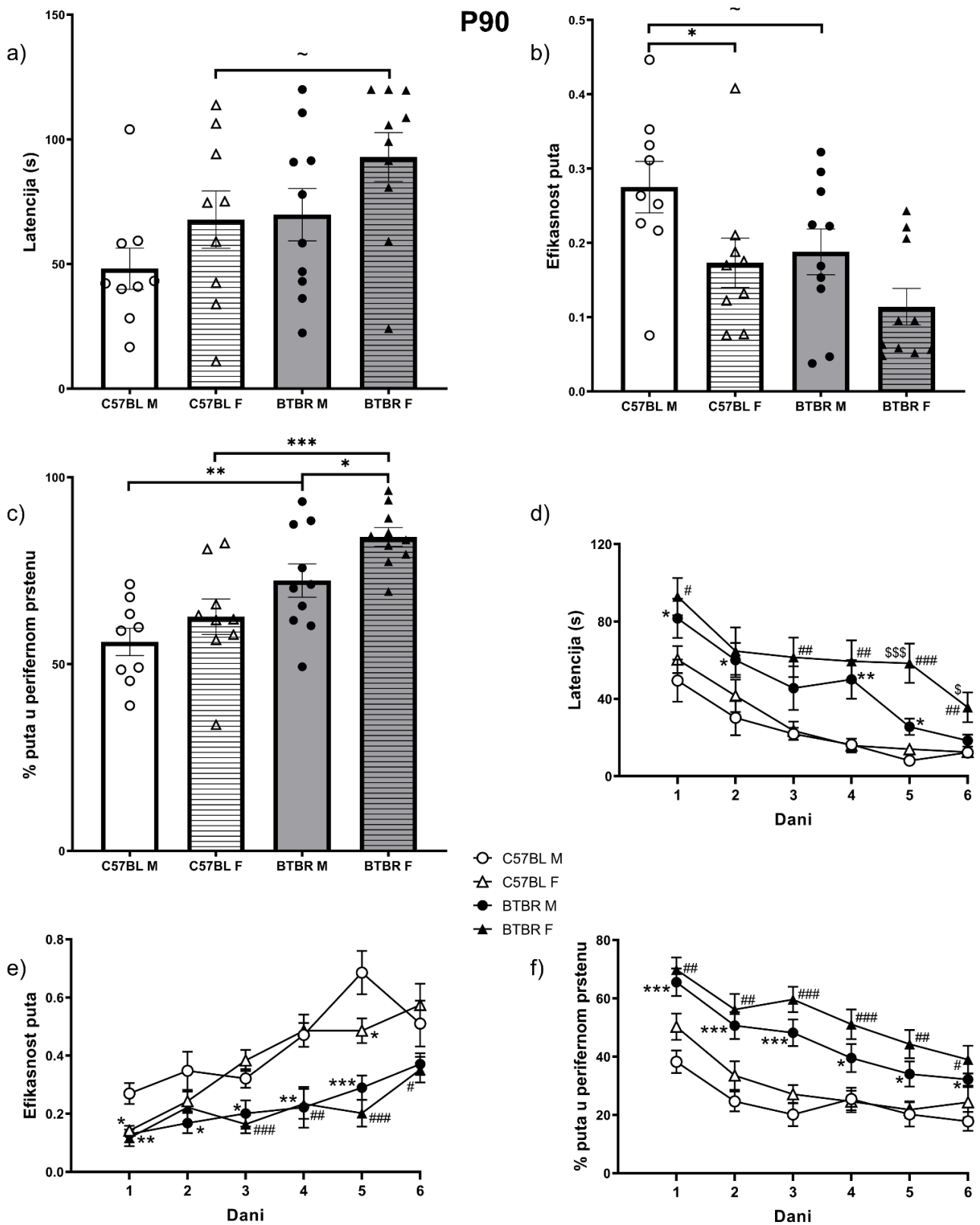
Analiza procenta puta pređenog u perifernom prstenu je pokazao značajan uticaj i soja ($F(1, 34)=23,207, p<0,001$) i pola ($F(1, 34)=5,520, p=0,025$). BTBR miševi su prelazili veći deo puta u perifernom prstenu, i mužjaci ($p=0,006$) i ženke ($p<0,001$). BTBR ženke su imale veći procenat puta pređenog u perifernom prstenu u odnosu na BTBR mužjake ($p=0,038$), (Slika 23c).

Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala da je tokom akvizicije ostvaren značajan uticaj soja ($F(1, 34)=36,700, p<0,001$) i pola ($F(1, 34)=4,433, p=0,043$) testiranjem efekata između subjekata. BTBR životinje su imale veću latenciju u odnosu na C57BL miševе, kako mužjaci ($p=0,001$), tako i ženke ($p<0,001$). Pored toga, BTBR ženke su iskazale veću latenciju u odnosu na BTBR mužjake ($p=0,027$), (Slika 23d).

Analiza efikasnosti puta je pokazala značajnu interakciju dana i soja testiranjem efekata unutar subjekata ($F(4,929, 167,577)=4,383, p=0,001$), kao i značajan efekat soja testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 34)=58,421, p<0,001$). BTBR životinje su demonstrirale manju efikasnost puta, kako mužjaci ($p<0,001$), tako i ženke ($p<0,001$), u odnosu na C57BL životinje (Slika 23e).

Slični rezultati su dobijeni i analizom procenta puta u periferiji: značajan uticaj interakcije dana i soja testiranjem efekata unutar subjekata ($F(4,469, 151,942)=2,734, p=0,026$) i značajan uticaj soja ($F(1, 34)=49,869, p<0,001$) i pola ($F(1, 34)=5,244, p=0,028$) dobijenih testiranjem efekata između subjekata. BTBR i mužjaci ($p<0,001$) i ženke ($p<0,001$) imali su veći procenat puta u periferiji u poređenju sa C57BL životinjama istog pola. BTBR ženke su takođe pokazale tendenciju da veći procenat puta prelaze u periferiji u odnosu na BTBR mužjake ($p=0,059$), (Slika 23f).

Analiziranjem broja ulazaka u ciljni region u probnom testu ustanovljeno je da nema razlike među testiranim grupama.



Slika 23. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u standardnom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta, c) % puta pređen u perifernom prstenu u *cue* fazi (sa obeleženom platformom); ~ 0,05<p<0,01, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001; d) latencija;; e) efikasnost puta i f) % puta pređen u perifernom prstenu tokom akvizicije; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 u odnosu na C57BL M, # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 u odnosu na C57BL F, \$ p<0,05, \$\$\$ p<0,001 u odnosu na BTBR M.

Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala da je tokom reverzne akvizicije soj imao značajan uticaj na latenciju testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 34)=18,373$, $p<0,001$), gde su BTBR ženke imale veću latenciju od C57BL ženki ($p<0,001$), ali i od BTBR mužjaka ($p=0,020$), (Slika 24a).

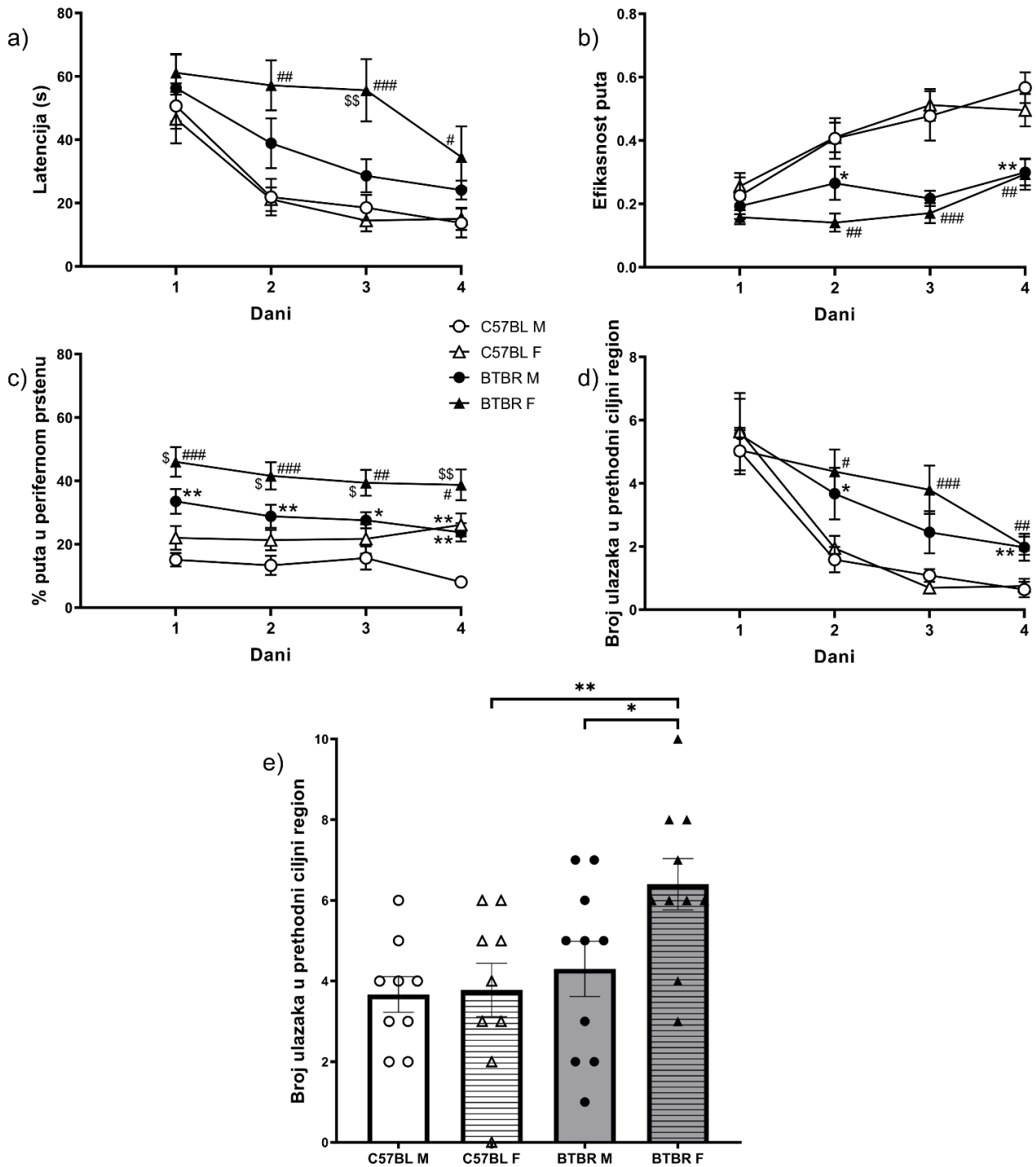
Soj je pokazao značaj uticaj i na efikasnost puta, analizirajući interakciju dana i soja testiranjem efekata unutar subjekata ($F(3, 102)=5,703$, $p=0,001$), i samog soja testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 34)=45,052$, $p<0,001$). BTBR i mužjaci ($p<0,001$) i ženke ($p<0,001$) su imali manju efikasnost puta u odnosu na C57BL životinje istog pola (Slika 24b).

I soj ($F(1, 34)=37,153$, $p<0,001$) i pol ($F(1, 34)=16,611$, $p<0,001$) značajno su uticali na procenat puta pređenog u perifernom prstenu, dobijeno testiranjem efekata između subjekata. BTBR miševi su bili veći deo puta u periferiji u odnosu na C57BL miševe, i mužjaci ($p<0,001$) i ženke ($p<0,001$). Takođe, ženke oba soja (BTBR: $p=0,002$, C57BL: $p=0,022$) pokazale su isto ponašanje u odnosu na mužjake (Slika 24c).

Soj je imao uticaj i na broj ulazaka u prethodni ciljni region ($F(1, 34)=10,941$, $p=0,002$) što je dobijeno testiranjem efekata između subjekata, i kao interakcija dana i soja testiranjem efekata unutar subjekata ($F(2,335, 79,391)=3,624$, $p=0,025$). BTBR miševi oba pola (mužjaci: $p=0,038$, ženke: $p=0,017$) više su se puta vraćali u prethodni ciljni region u odnosu na C57BL miševe (Slika 24d).

Slično kao i u probnom testu, analiziranje reverznog probnog testa je pokazalo da nema razlike u broju ulazaka u ciljni region. Takođe je pokazan značajan uticaj soja na broj ulazaka u prethodni ciljni region ($F(1, 34)=6,880$, $p=0,013$), pošto su BTBR miševi više puta ulazili u prethodni ciljni region, pre svega ženke ($p=0,005$). Pored toga, BTBR ženke su imale više ulazaka i u odnosu na BTBR mužjake ($p=0,019$), (Slika 24e).

P90

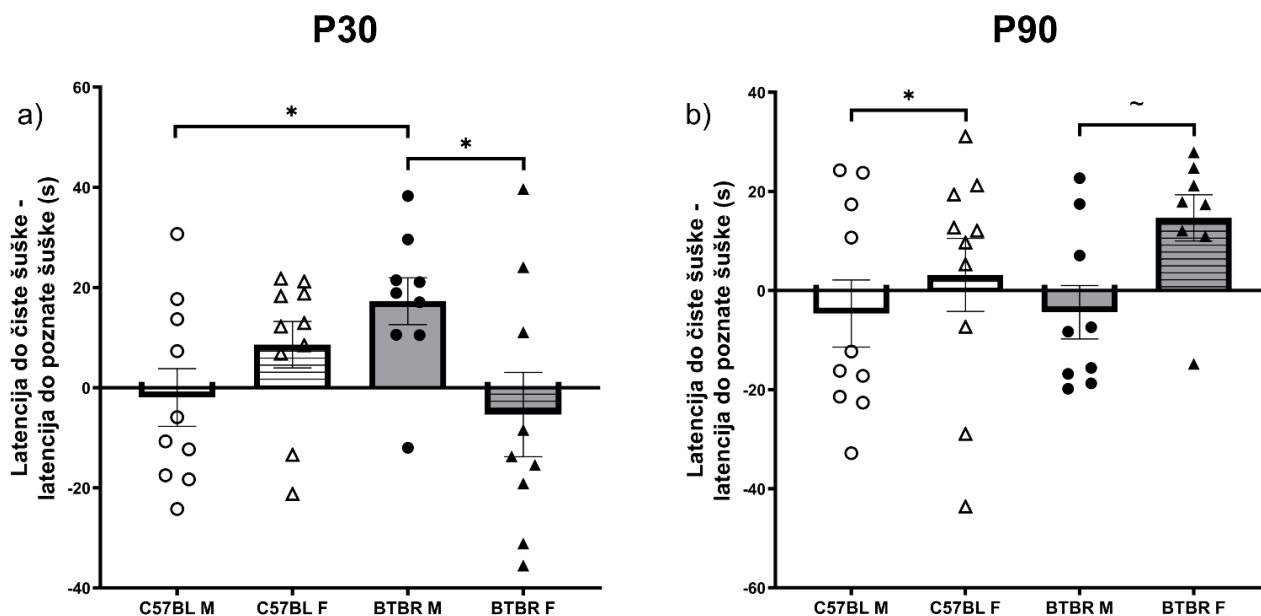


Slika 24. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u reverznom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta, c) % puta pređen u perifernom prstenu, d) broj ulazaka u prethodni ciljini region tokom akvizicije; * p<0,05, ** p<0,01 u odnosu na C57BL M, # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 u odnosu na C57BL F, \$ p<0,05, \$\$ p<0,01 u odnosu na BTBR M; d) broj ulazaka u prethodni ciljini region tokom probnog testa; * p<0,05, ** p<0,01.

4.2.7. Olfaktorna diskriminacija

P30: Dvofaktorska ANOVA je pokazala da je interakcija pola i soja imala značajan uticaj na razliku u latenciji u ulasku u čistu i prljavu šušku ($F(1, 34)=7,644, p=0,009$). BTBR mužjaci su imali veću razliku, tj. pre su ulazili u svoju šušku, u poređenju sa C57BL mužjacima ($p=0,030$) i BTBR ženka ($p=0,014$), (Slika 25a). Nije bilo razlike u odnosu vremena provedenog u poznatoj nasuprot nepoznatoj šušci.

P90: Pokazana je značajan uticaj pola ($F(1, 34)=8,039, p=0,008$) na razliku u latenciji ulaska u čistu i prljavu šušku. Ženke su imale veću latenciju, tj. ulazile su pre u prljavu šušku, u poređenju sa mužjacima, i to je dobijeno i u C57BL soju ($p=0,043$) in a nivou trenda u BTBR soju ($p=0,066$), (Slika 25b). Kao i za P30, nije bilo razlike u odnosu vremena provedenog u dve šuške.



Slika 25. Ponašanje BTBR T+ tf/J (BTBR) i C57BL/6J (C57BL) miševa oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u testu olfaktorne diskriminacije prikazano kroz praćenje razlike u latencijama ulaska u čistu i poznatu šušku u postnatalnom periodu oko a) 30. (P30) i b) 90. dana (P90). $\sim 0,05 < p < 0,1$, * $p < 0,05$.

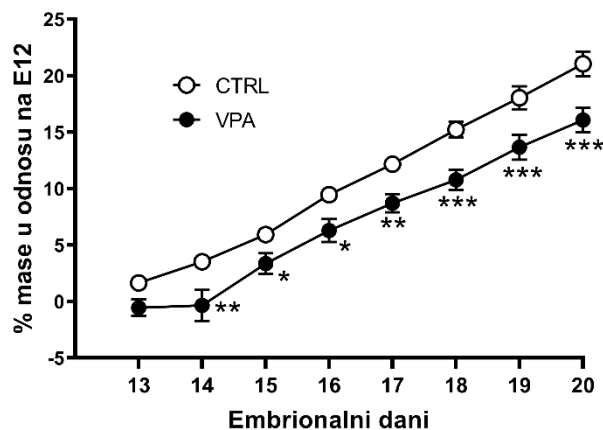
4.2.8. Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris

Premali broj životinja je obeležio teritoriju da bi statistička analiza bila moguća. Zapravo, jedini koji jesu obeležili teritoriju su 3 (od ukupno 9) C57BL mužjaka.

4.3. Pacovski model ASD-a

4.3.1. Neurološki testovi i masa trudnih ženki

Jednofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajnu razliku u procentu mase koji su dobijale ženke tokom trudnoće počevši od dana nakon primanja tretmana. Trudne ženke koje su bile tretirane valproatom su dobijale manje na masi tokom trudnoće u odnosu na ženke koje su bile tretirane fiziološkim rastvorom ($F(1, 112)=16,051, p=0,001$), (Slika 26). Međutim, nakon toga nije bilo razlike u broju mladunaca po leglu između ove dve grupe, niti su mladunci različitih prenatalnih tretmana imali razlike u masi i u ispitivanim refleksima.



Slika 26. Razlika u procentu dobijanja mase valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) ženki u odnosu na embrionalni dan 12 (E12); * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

4.3.2. Test socijalne interakcije

P30: MANOVA test je otkrila značajan uticaj prenatalnog tretmana na parametre socijalnog ponašanja ($F(5, 26)=4,049, p=0,008$; Wilks' $\lambda=0,562$). Analizirajući pojedinačne parametre uticaj prenatalnog tretmana je pokazan za vreme provedeno u provlačenju preko/ispod parnjaka ($F(1, 30)=6,235, p=0,018$), kao i na vreme provedeno u rvanju i boks u ($F(1, 30)=8,451, p=0,007$). I pol je pokazao značajan uticaj na vreme provedeno u rvanju i boks u ($F(1, 30)=8,854, p=0,006$). VPA životinje su provele manje vremena u provlačenju preko/ispod parnjaka, što je na nivou trenda pokazano kod ženki ($p=0,063$), (Slika 27a). VPA životinje su takođe provele manje vremena u rvanju i boks u, što je pre svega pokazano kod mužjaka ($p=0,010$). Dodatno je pokazano da su mužjaci oba prenatalna tretmana provodili više vremena u ovom ponašanju, što je statistički značajno pokazano u CTRL grupi ($p=0,007$), (Slika 27b). Parametar tuš je praćen kroz broj ovih događaja (ne kroz provedeno vreme) stoga je analiziran posebno. Opet, prenatalni tretman je pokazao značajan uticaj ($F(1, 30)=4,546, p=0,041$) u pogledu toga da su VPA životinje manje puta pokazale ovakav vid ponašanja u odnosu na CTRL životinje, što je značajno pokazano kod mužjaka ($p=0,045$), (Slika 27c). Nije pokazana razlika u ostalim socijalnim parametrima.

Pored parametara socijalnog ponašanja praćeno je i vreme provedeno u timarenju, gde je pokazan značajan efekat prenatalnog tretmana ($F(1, 30)=21,045, p<0,001$). VPA životinje su provodile više vremena timareći se u odnosu na CTRL pacove, što je pokazano i kod mužjaka ($p=0,002$) i kod ženki ($p=0,004$), (Slika 27d).

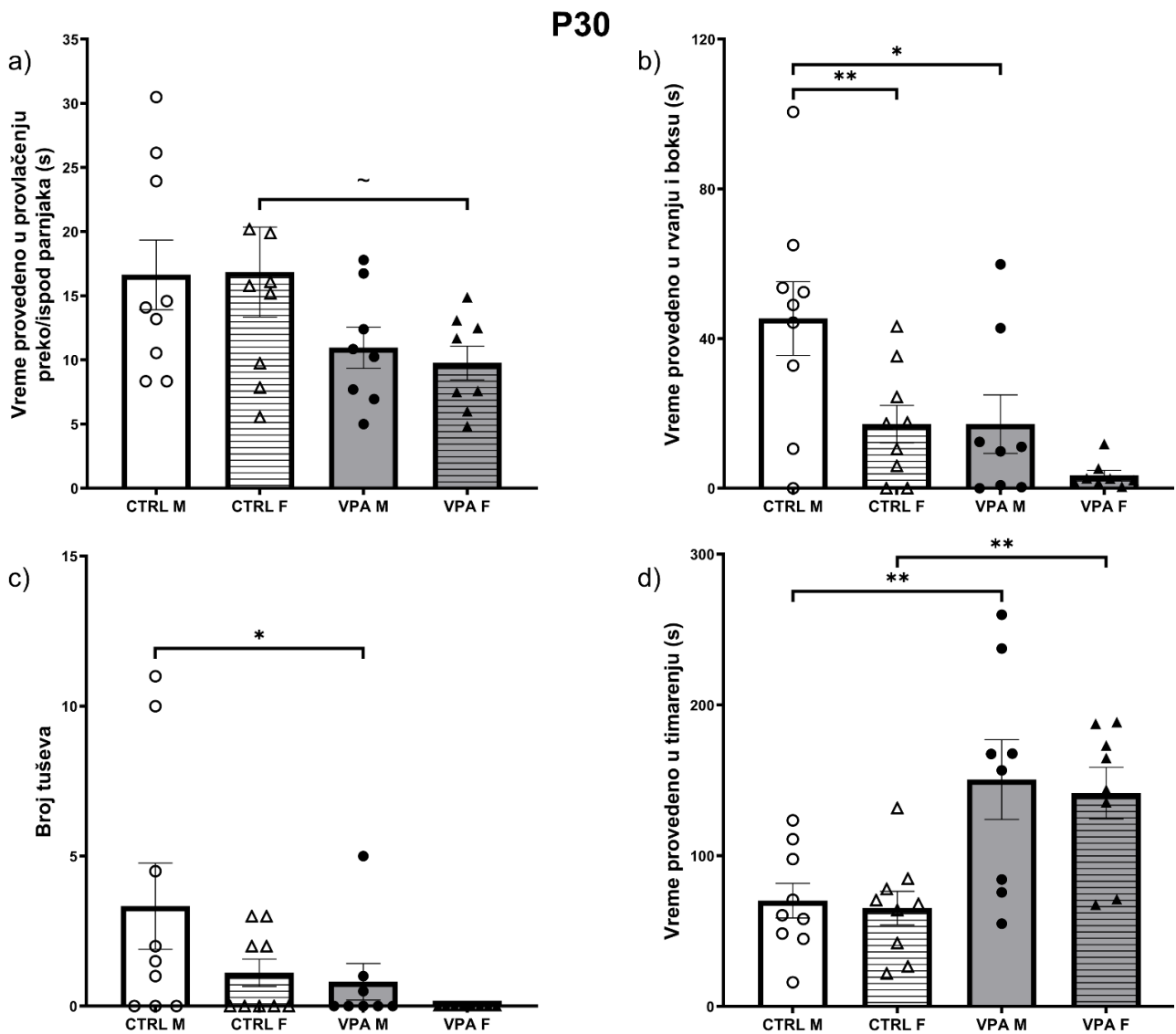
P90: Analizirajući socijalno ponašanje odraslih životinja, MANOVA je otkrila opšti uticaj prenatalnog tretmana ($F(4, 27)=3,837, p=0,014$; Wilks' $\lambda=0,638$) i pola ($F(4, 27)=4,040, p=0,011$; Wilks' $\lambda=0,626$). Gledajući pojedinačne parametre, značajan uticaj prenatalnog tretmana je

demonstriran analizom vremena provedenog u provlačenju preko/ispod parnjaka ($F(1, 30)=6,360$, $p=0,017$), njuškanju i timarenju parnjaka ($F(1, 30)=8,467$, $p=0,007$), rvanju i boksu ($F(1, 30)=6,611$, $p=0,015$) i praćenju parnjaka na nivou trenda ($F(1, 30)=4,016$, $p=0,054$). Značajan uticaj pola je demonstriran analizom vremena provedenog u njuškanju i timarenju parnjaka ($F(1, 30)=5,352$, $p=0,028$) i rvanju i boksu ($F(1, 30)=8,360$, $p=0,007$). Pored toga, pokazan je i značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana i pola na vreme provedeno u rvanju i boksu ($F(1, 30)=7,018$, $p=0,013$). VPA životinje su provele manje vremena u provlačenju preko/ispod parnjaka u odnosu na kontrolne. VPA mužjaci ($p=0,007$) i CTRL ženke ($p=0,045$) provele su manje vremena u ovom ponašanju u odnosu na CTRL mužjake (Slika 28a). VPA životinje su provele manje vremena u njuškanju i timarenju parnjaka u odnosu na CTRL; dodatno, ženke su provele više vremena u ovom ponašanju u odnosu na mužjake. VPA ženke ($p=0,020$) i CTRL mužjaci ($p=0,045$) provedli su manje vremena u njušenju i timarenju druge životinje u odnosu na CTRL ženke (Slika 28b). Što se tiče vremena provedenog u rvanju i boksu, VPA mužjaci ($p<0,001$) i CTRL ženke ($p<0,001$) demonstrirali su manje vremena provedenog u ovom ponašanju u odnosu na CTRL mužjake (Slika 28c). Finalno, VPA životinje su pokazale trend ka smanjenom praćenju parnjaka, ali je to dostiglo statističku značajnost na nivou pojedinačnog pola, konkretno mužjaka ($p=0,018$), (Slika 28d). Analiza ne-socijalnog parametra timarenja je pokazala značajan uticaj pola ($F(1, 30)=11,029$, $p=0,002$), sa mužjacima koji su provedli više vremena timareći se u odnosu na ženke, pre svega u CTRL grupi ($p=0,009$), (Slika 28e).

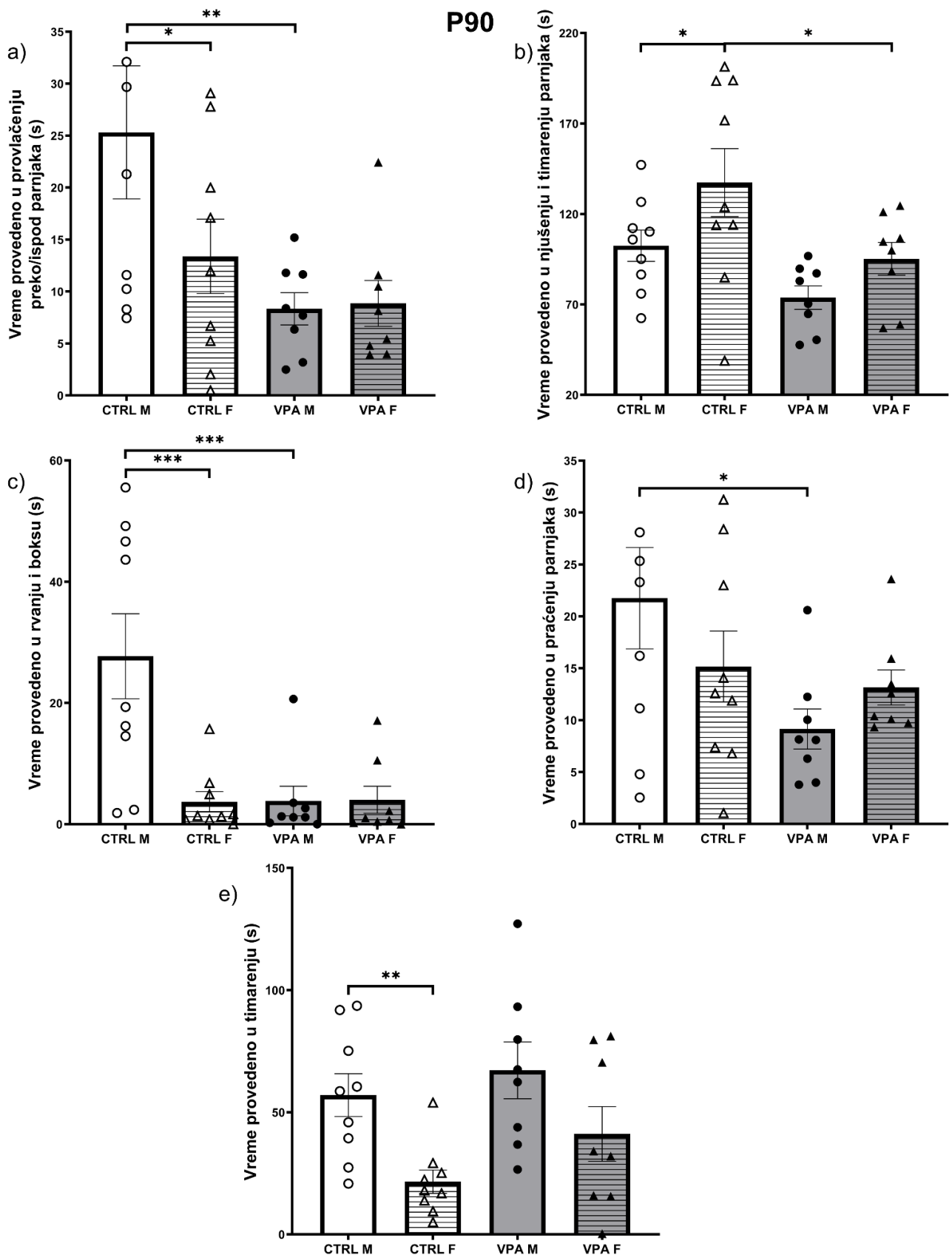
4.3.3. Uzdgnuti plus lavirint

P30: Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana na procenat vremena provedenog u otvorenim kracima uzdignutog plus lavirinta. VPA pacovi su provedli manji procenat vremena u otvorenim kracima u odnosu na CTRL pacove ($F(1, 34)=8,702$, $p=0,006$), pre svega mužjaci ($p=0,002$), (Slika 29a). Analiza drugog parametra, procenta broja ulazaka u otvorene krake pokazala je značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana i pola ($F(1, 34)=5,250$, $p=0,028$). VPA mužjaci su manji broj puta ulazili u otvorene krake u poređenju sa CTRL mužjacima ($p=0,005$) i VPA ženkama ($p=0,040$), (Slika 29b).

P90: Odrasle VPA životinje su provele manji procenat vremena u otvorenim kracima ($F(1, 36)=12,741$, $p=0,001$) u odnosu na CTRL pacove, što je pokazano i kod mužjaka ($p=0,029$) i kod ženki ($p=0,009$), (Slika 29c). Analiza drugog ispitivanog parametra je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 36)=14,093$, $p<0,001$) i pola ($F(1, 36)=5,284$, $p=0,028$). VPA životinje su manji broj puta ulazile u otvorene krake u odnosu na kontrolne, što je pokazano i kod mužjaka ($p=0,016$) i kod ženki ($p=0,009$). Ženke su veći broj puta ulazile u otvorene krake, ali ta razlika nije dostigla značajnost na nižem nivou (Slika 29d).

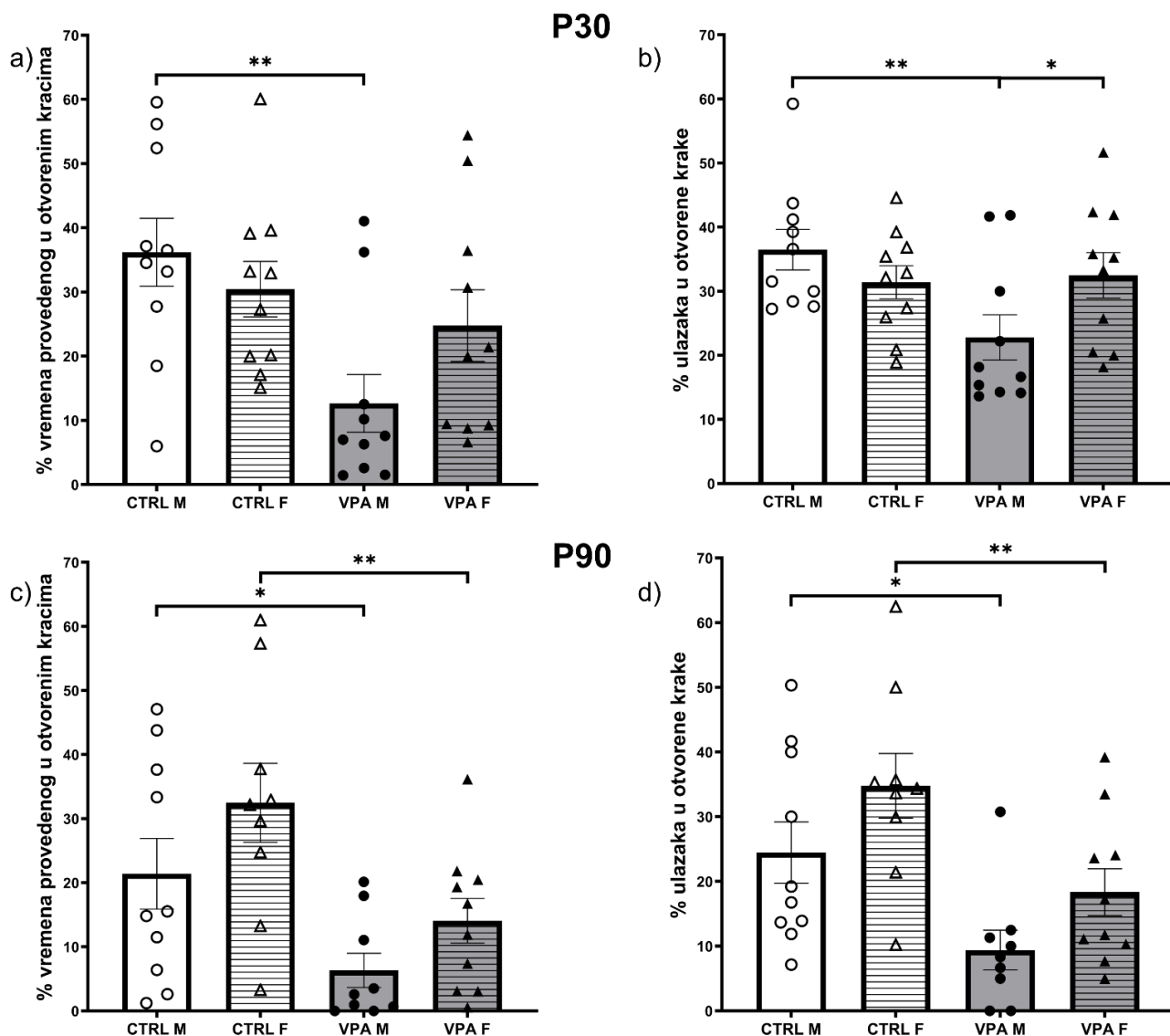


Slika 27. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u testu socijalne interakcije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u provlačenju preko/ispod parnjaka, b) vreme provedeno u rvanju i boksu, c) broj tuševa, d) vreme provedeno u timarenju; ~ $0,05 < p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Slika 28. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u testu socijalne interakcije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u provlačenju preko/ispod parnjaka, b) vreme provedeno u njušenju i timarenju parnjaka, c) vreme provedeno u rvanju i boksu, d)

vreme provedeno u praćenju parnjaka, e) vreme provedeno u timarenju; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Slika 29. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u uzdignutom plus lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) % vremena provedenog u otvorenim kracima, b) % ulazaka u otvorene krake u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30); a) % vremena provedenog u otvorenim kracima, b) % ulazaka u otvorene krake u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.4. Test spontane lokomotorne aktivnosti

P30: Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj pola na pređenu distancu ($F(1, 34)=5,167$, $p=0,029$), gde su ženke prelazile veću distancu u odnosu na mužjake, pre svega u CTRL grupi ($p=0,024$), (Slika 30a). Nije bilo razlike u vremenu provedenom u aktivnosti, ni u prosečnoj brzini.

Analizirajući parametar broja rotacija demonstrirana je značajna interakcija prenatalnog tretmana i pola ($F(1, 34)=5,918$, $p=0,021$), sa VPA mužjacima koji su imali povećan broj rotacija u odnosu na CTRL mužjake ($p=0,026$), (Slika 30b). Slično, značajan efekat interakcije je dobijen i za broj rotacija u smeru kazaljke na satu ($F(1, 34)=4,311$, $p=0,046$), gde su VPA mužjaci imali veći broj ovih rotacija u odnosu na CTRL mužjake ($p=0,018$) i VPA ženke ($p=0,011$), (Slika 30c).

Upareni t-test je pokazao da nema razlika u broju rotacija u smeru kazaljke na satu nasuprot onima u smeru suprotnom kazaljci na satu kod kontrolnih životinja i VPA ženki, ali da VPA mužjaci imaju izraženije rotiranje u smeru kazaljke na satu ($p=0,026$), (Slika 30d).

Takođe je pokazano da VPA životinje provode više vremena u timarenju ($F(1, 34)=9,587$, $p=0,004$), pre svega ženke ($p=0,003$), (Slika 30e).

P90: Analiza pređene distance je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 36)=14,293$, $p<0,001$), pola ($F(1, 36)=33,296$, $p<0,001$) i njihove interakcije ($F(1, 36)=4,526$, $p=0,040$). VPA pacovi su prešli veću distancu u odnosu na CTRL životinje, pre svega izraženo kod ženki ($p<0,001$). Dodatno, ženke su prešle veću distancu u odnosu na mužjake i to u slučaju i jednog i drugog prenatalnog tretmana (CTRL: $p=0,014$, VPA: $p<0,001$), (Slika 31a). Kao i u P30, analiza vremena provedenog u aktivnosti nije pokazala razlike.

Što se tiče prosečne brzine, ispitivanje je pokazalo značajan uticaj soja ($F(1, 36)=5,954$, $p=0,020$) i pola ($F(1, 36)=19,771$, $p<0,001$). VPA životinje su imale veću brzinu u odnosu na CTRL životinje, što je pokazano značajnim kod ženki ($p=0,008$). Takođe, ženke su bile brže od mužjaka i kod CTRL ($p=0,048$) i kod VPA životinja ($p<0,001$), (Slika 31b).

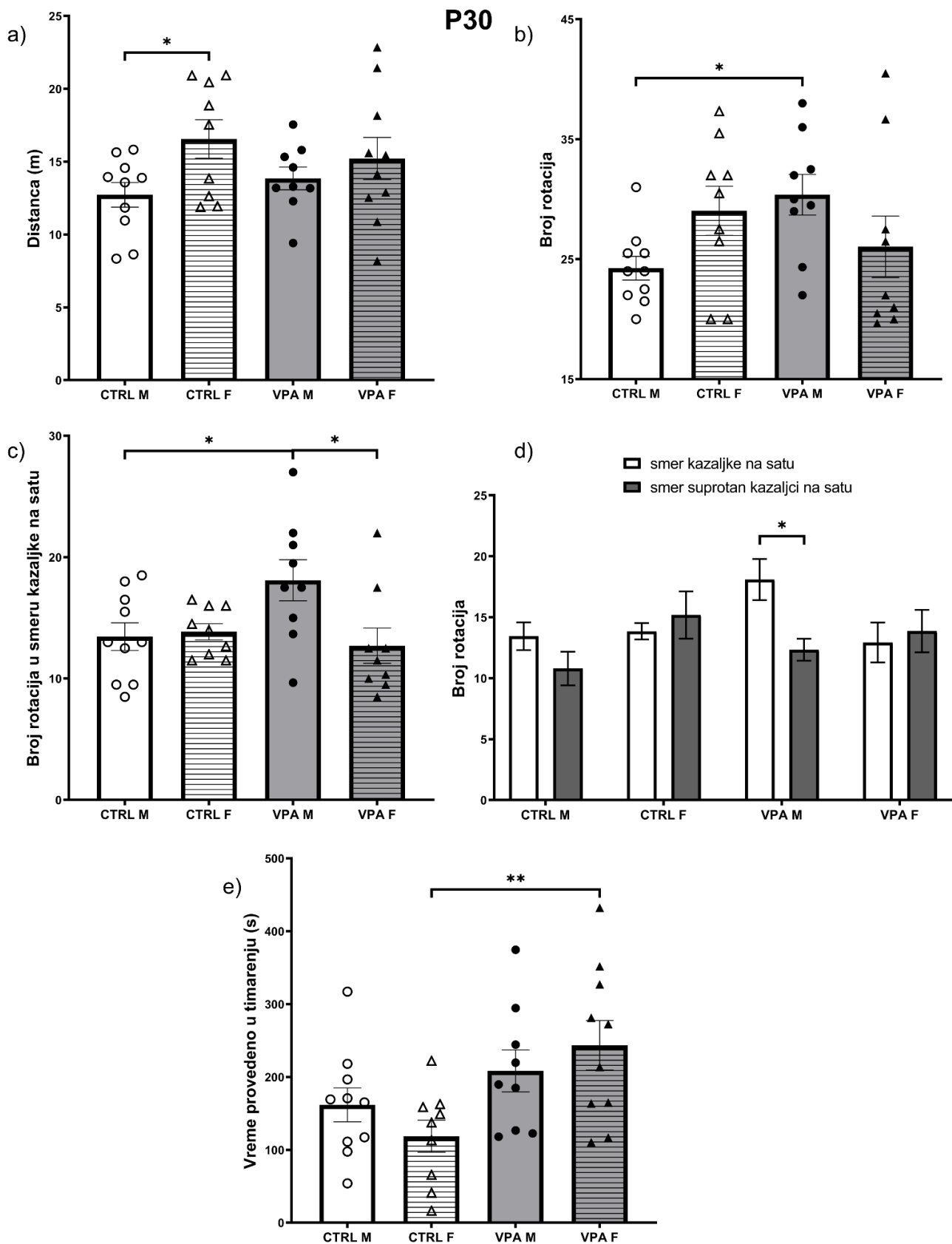
Dvofaktorska ANOVA je demonstrirala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 36)=15,530$, $p<0,001$) i pola ($F(1, 36)=13,391$, $p<0,001$) na broj rotacija. VPA pacovi su imali veći broj rotacija u odnosu na CTRL životinje, pokazano kod oba pola (mužjaci: $p=0,023$, ženke: $p=0,003$). Takođe, ženke su imale veći broj rotacije u odnosu na mužjake i u CTRL ($p=0,037$) i u VPA grupi ($p=0,005$), (Slika 31c).

Isti obrazac je dobijen analizom broja rotacija u smeru kazaljke na satu: značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 36)=10,669$, $p=0,002$) i pola ($F(1, 36)=20,072$, $p<0,001$), sa VPA životinjama (mužjaci: $p=0,048$, ženke: $p=0,014$) koje su imale povećan ovaj parametar u odnosu na CTRL životinje, kao i ženke sa povećanim brojem rotacija u smeru kazaljke na satu u odnosu na mužjake (CTRL: $p=0,006$, VPA: $p=0,002$), (Slika 31d).

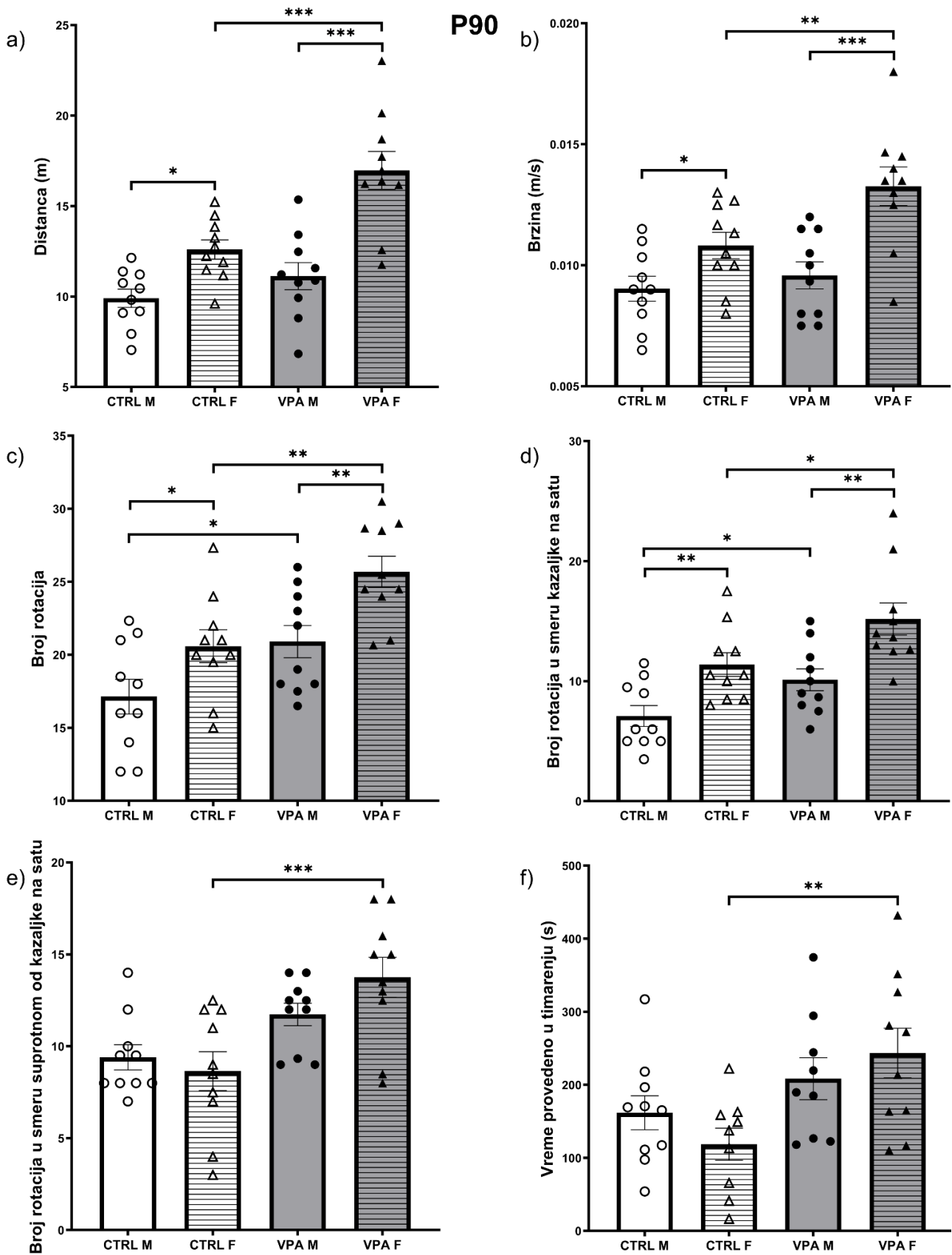
Što se tiče broja rotacija u smeru suprotnom kazaljke na satu, pokazan je značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 36)=16,488$, $p<0,001$), gde su VPA životinje imale povećan ovaj parametar, ali je statistička značajnost na nižem nivou analize dostignuta samo kod ženki ($p<0,001$), (Slika 31e).

Upareni t-test nije pokazao razlike između broja rotacija različitih smerova ni u jednoj grupi.

Praćenje i analiza vremena provedenog u timarenju je pokazala značajan uticaj pola ($F(1, 36)=19,603$, $p<0,001$), gde su ženke provodile manje vremena u ovom ponašanju, i to u obe grupe prenatalnog tretmana (CTRL: $p<0,001$, VPA: $p=0,013$). Što se tiče soja, pokazano je da su VPA životinje imale tendenciju ka povećanom timarenju ($F(1, 36)=3,751$, $p=0,061$), koja je posebno iskazana kod ženki ($p=0,069$), (Slika 31f).



Slika 30. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u testu spontane lokomotorne aktivnosti prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) pređena distanca, b) broj rotacija, c) broj rotacija u smeru kazaljke na satu, d) poređenje dva smera rotacija za svaku grupu, e) vreme provedeno u timarenju. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



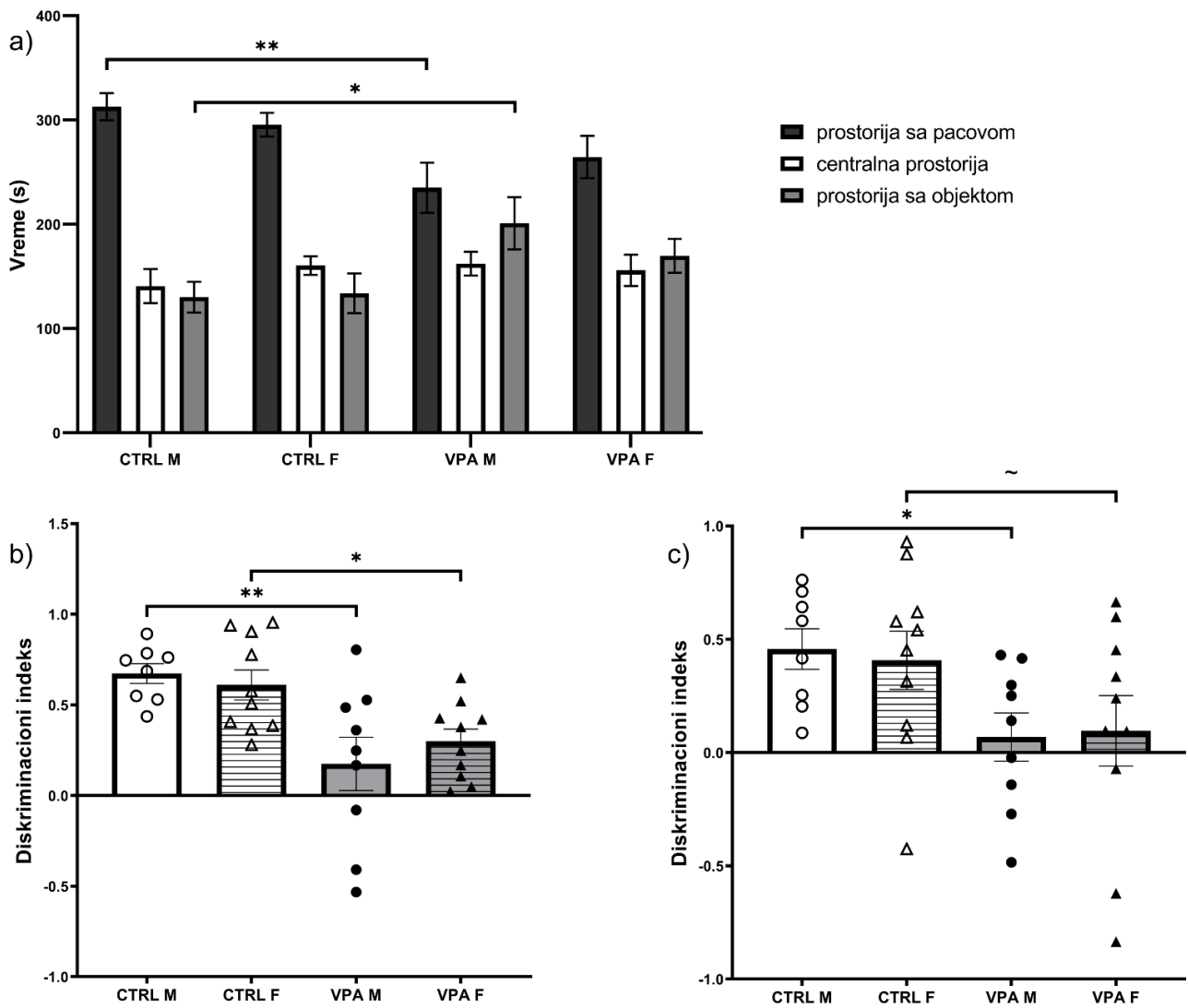
Slika 31. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u testu spontane lokomotorne aktivnosti prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) pređena distanca, b) brzina kretanja, c) broj rotacija, d) broj rotacija u smeru kazaljke na satu, e) broj rotacija u smeru suprotnom od kazaljke na satu, f) vreme provedeno u timarenju; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.5. Test tri prostorije

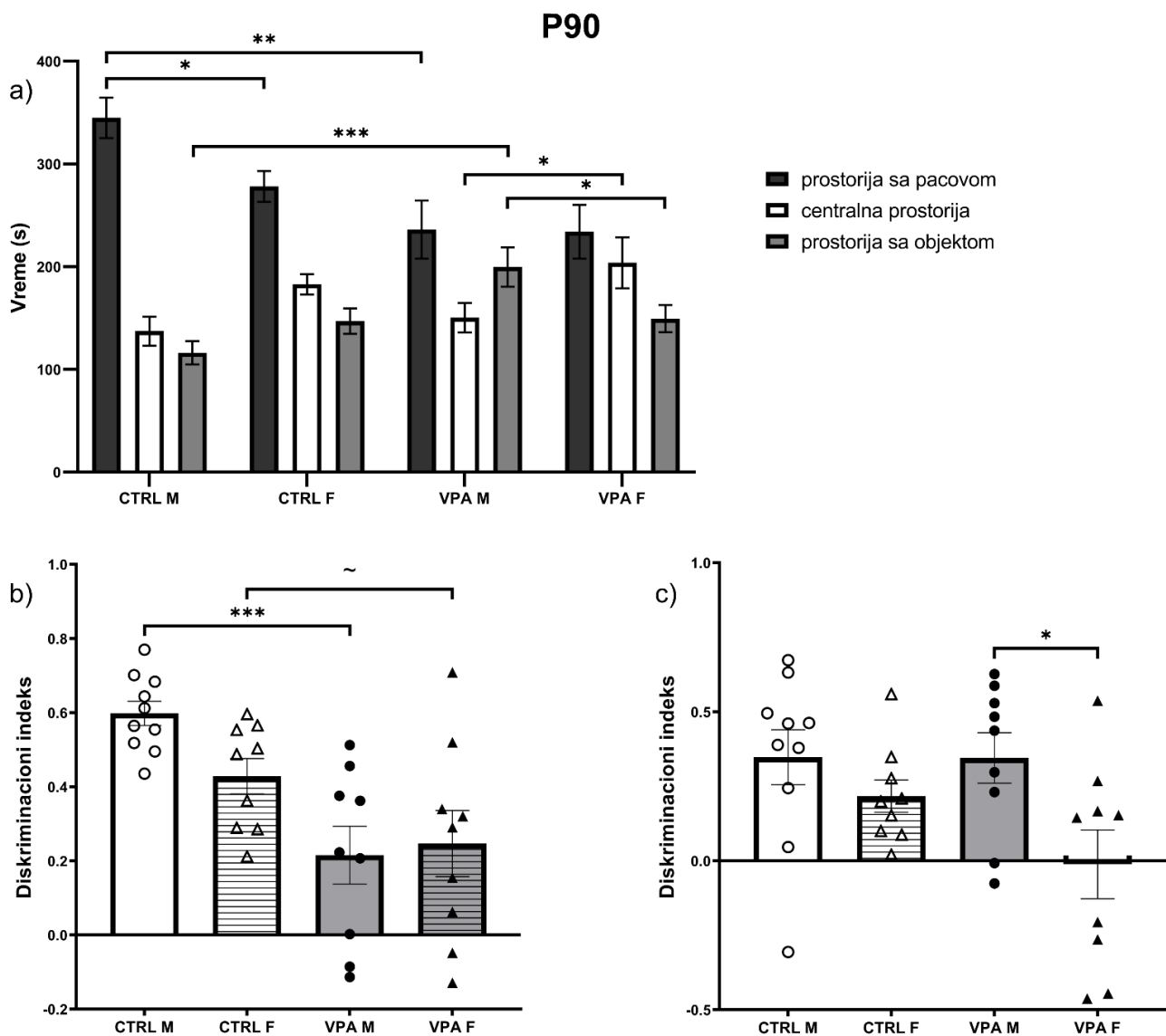
P30: Nije demonstrirana preferencija za prostoriju tokom habituacije ni u jednoj grupi. MANOVA je otkrila opšti uticaj prenatalnog tretmana ($F(3, 31)=3,500, p=0,027$; Wilks' $\lambda=0,747$), kao i na vreme provedeno u prostoriji sa pacovom ($F(1, 33)=8,916, p=0,005$) i provedeno u prostoriji sa objektom ($F(1, 33)=7,542, p=0,010$). VPA pacovi su provodili manje vremena u prostoriji sa pacovom, a više u prostoriji sa objektom u odnosu na CTRL pacove, što je pre svega bilo izraženo kod mužjaka (prostorija sa pacovom: $p=0,007$, prostorija sa objektom $p=0,018$), (Slika 32a). Analizirajući diskriminacioni indeks takođe je pokazan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 33)=18,069, p<0,001$), pošto su VPA životinje imale manji indeks u odnosu na CTRL životinje oba pola (mužjaci: $p=0,001$, ženke: $p=0,022$), (Slika 32b). Ispitivanje socijalne memorije je otkrilo značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 33)=7,506, p=0,010$). VPA životinje su provodile manje vremena sa novim pacovom u poređenju sa CTRL životinjama, statistički značajno pokazano kod mužjaka ($p=0,047$) i na nivou trenda kod ženki ($p=0,081$), (Slika 32c).

P90: Kao i u P30, nisu nađene razlike u prvom delu paradigme. Analiza vremena provedenog u tri prostorije MANOVA testom je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(3, 31)=4,969, p=0,006$; Wilks' $\lambda=0,675$) i pola ($F(3, 31)=3,095, p=0,041$; Wilks' $\lambda=0,770$). Prenatalni tretman je pokazao značajan uticaj na vreme provedeno u prostoriji sa pacovom ($F(1, 33)=11,278, p=0,002$) i sa objektom ($F(1, 33)=9,082, p=0,005$); pol je pokazao značajan uticaj na vreme provedeno u centralnoj prostoriji ($F(1, 33)=8,845, p=0,005$), a interakcija prenatalnog tretmana i pola je imala značajan uticaj na vreme provedeno u prostoriji sa objektom ($F(1, 33)=8,091, p=0,008$). VPA životinje su provele manje vremena u prostoriji sa pacovom, a više vremena u prostoriji sa objektom u odnosu na CTRL životinje, i to pogotovo izraženo kod mužjaka (prostorija sa pacovom: $p=0,002$, prostorija sa objektom: $p<0,001$). Ženke su provele više vremena u centralnoj prostoriji u odnosu na mužjake, pogotovo izraženo u VPA grupi ($p=0,032$). Pored toga, CTRL ženke su provele manje vremena u prostoriji sa pacovom u odnosu na CTRL mužjake ($p=0,043$) i VPA ženke su provele manje vremena u prostoriji sa objektom u odnosu na VPA mužjake ($p=0,019$), (Slika 33a). Diskriminacioni indeks je otkrio značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 33)=19,062, p<0,001$) sa VPA životinjama koje su imale manji diskriminacioni indeks u odnosu na CTRL pacove, što je pre svega bilo značajno izraženo kod mužjaka ($p<0,001$) i na nivou trenda kod ženki ($p=0,058$), (Slika 33b). Ispitivanje socijalne memorije je otkrilo značajan uticaj pola ($F(1, 33)=6,850, p=0,013$), gde su ženke imale manji indeks u poređenju sa mužjacima, što je imalo statističku značajnost kod VPA životinja ($p=0,010$), (Slika 33c). *One sample* t-test je otkrio da su VPA ženke jedina grupa koja nije pravila razliku između novog i starog pacova; ostale grupe su provodile više vremena sa novim pacovom (CTRL mužjaci: $p=0,007$, CTRL ženke: $p=0,004$, VPA mužjaci: $p=0,004$), (rezultati nisu grafički predstavljeni).

P30



Slika 32. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u testu tri prostorije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u svakoj prostoriji, b) diskriminacioni indeks tokom testa socijalnosti, c) diskriminacioni indeks tokom testa socijalne memorije; ~ 0,05<p<0,1, * p<0,05, ** p<0,01.



Slika 33. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u testu tri prostorije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) vreme provedeno u svakoj prostoriji, b) diskriminacioni indeks tokom testa socijalnosti, c) diskriminacioni indeks tokom testa socijalne memorije; $\sim 0,05 < p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.6. Morisov vodeni lavirint

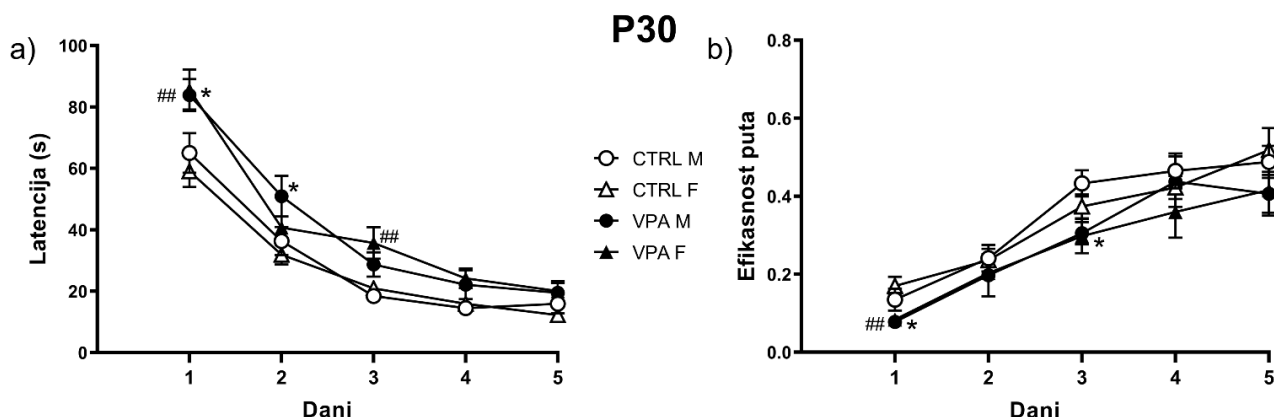
P30: Analiza akvizicije dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem je pokazala značajan uticaj interakcije dana i prenatalnog tretmana dobijen testiranjem efekata unutar subjekata ($F(3,537, 116,730)=2,837, p=0,033$). Prenatalni tretman je pokazao značajan uticaj i testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 33)=23,588, p<0,001$). VPA pacovi su imali veću latenciju u odnosu na CTRL pacove i kod mužjaka ($p=0,003$) i kod ženki ($p=0,001$), (Slika 34a).

Slično, testiranjem efikasnosti između subjekata je pokazan i značajan uticaj prenatalnog tretmana na efikasnost puta ($F(1, 33)=8,882, p=0,005$), gde su VPA i mužjaci ($p=0,046$) i ženke ($p=0,039$) imali manju efikasnost puta u odnosu na CTRL pacove istog pola, (Slika 34b).

Analiza procenta puta pređenog u perifernom prstenu je pokazala opšti uticaj prenatalnog tretmana testiranjem efekata između subjekata, gde su VPA životinje imale veći procenat puta pređenog u

periferiji ($F(1, 33)=4,252, p=0,047$), ali razlike na nižim nivoima nisu iskazane, (rezultati nisu grafički predstavljeni).

Nije bilo razlika u broju ulazaka u ciljni region u probnom testu.



Slika 34. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u standardnom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta tokom akvizicije; * $p<0,05$ u odnosu na CTRL M, ## $p<0,01$ u odnosu na CTRL F.

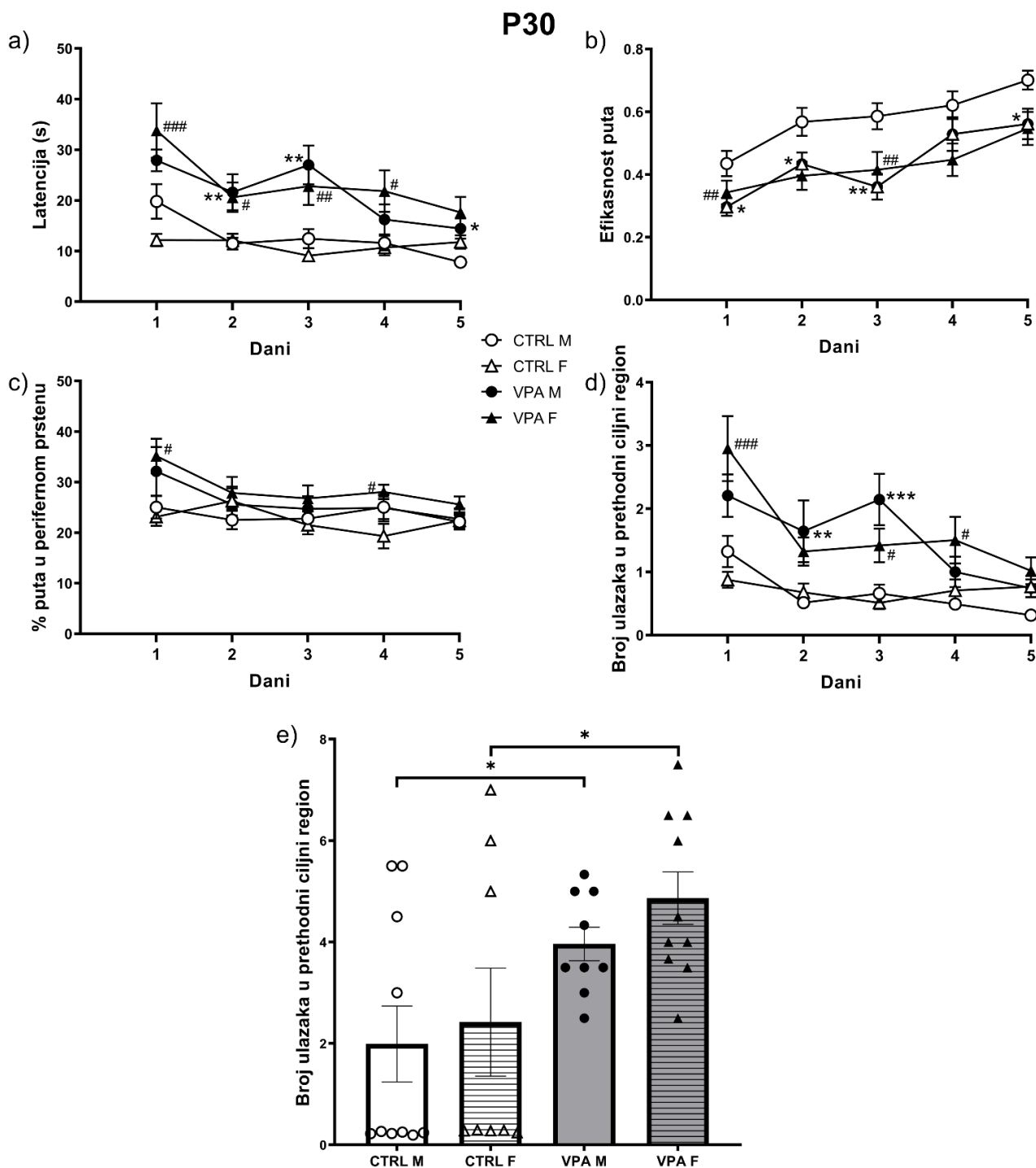
Analiza reverzne akvizicije je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana na latenciju ($F(1, 33)=38,576, p<0,001$). VPA životinje su imale veću latenciju u odnosu na CTRL životinje, što je bilo značajno pokazano kod oba pola (mužjaci: $p=0,001$, ženke: $p<0,001$), (Slika 35a).

Interakcija pola i dana je imala značajan uticaj na efikasnost puta pokazano testiranjem efekata unutar subjekata ($F(4, 132)=3,239, p=0,014$), dok je prenatalni tretman imao značajan uticaj iskazan testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 33)=23,177, p<0,001$). VPA životinje su imale manju efikasnost puta, i mužjaci ($p=0,001$) i ženke ($p=0,003$), (Slika 35b).

Ispitivanje parametra procenta puta u perifernom prstenu je pokazalo značajan efekat interakcije prenatalnog tretmana i dana testiranjem efekata unutar subjekata ($F(4, 132)=2,459, p=0,049$). I testiranje efekata između subjekata je pokazao značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 33)=5,974, p=0,020$), gde su VPA životinje imale veći procenat puta pređenog u periferiji, ali pokazano značajnim samo kod ženki ($p=0,021$), (Slika 35c).

Slično, testiranjem efekata unutar subjekata je dobijen značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana i dana na broj ulazaka u prethodni ciljni region ($F(3,851, 127,083)=3,131, p=0,018$). Značajan efekat prenatalnog tretmana je demonstriran i testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 33)=40,703, p<0,001$), gde su i VPA mužjaci ($p<0,001$) i VPA ženke ($p<0,001$) imali veći broj ulazaka u prethodni ciljni region u odnosu na CTRL životinje istog pola (Slika 35d).

Dvofaktorska ANOVA je pokazala da nije bilo razlike u broju ulazaka u ciljni region u reverznom probnom testu, ali da prenatalni tretman jeste imao značajan uticaj na broj ulazaka u prethodni ciljni region ($F(1, 33)=10,119, p=0,003$). VPA životinje su više puta ulazile u prethodni ciljni region, što je bilo iskazano i na nivou oba pola (mužjaci: $p=0,049$, ženke: $p=0,020$), (Slika 35e).



Slika 35. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 30. dana (P30) u reverznom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta, c) % puta pređen u perifernom prstenu, d) broj ulazaka u prethodni ciljini region tokom akvizicije; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u odnosu na CTRL M, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ u odnosu na CTRL F; e) broj ulazaka u prethodni ciljini region tokom probnog testa; * $p < 0,05$.

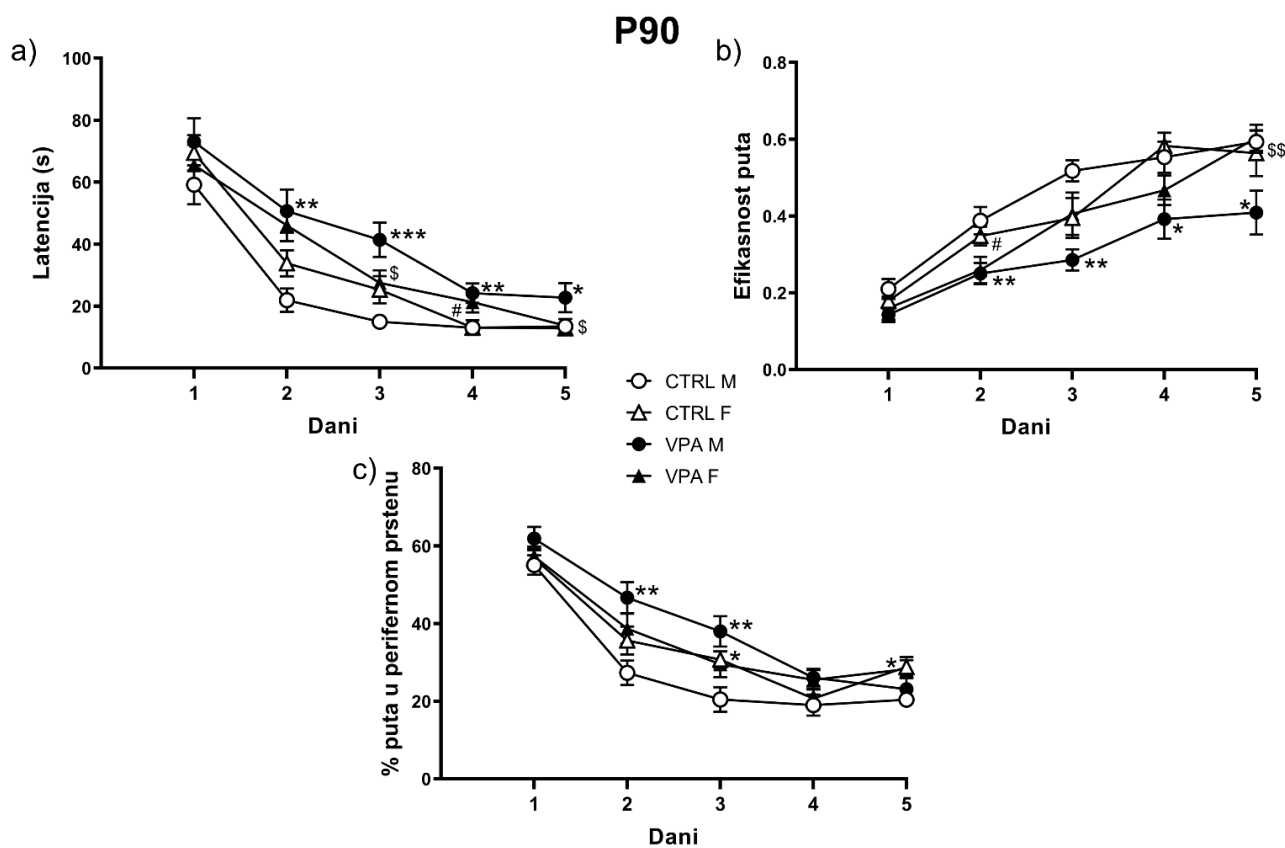
P90: Analiza akvizicije odraslih životinja pokazala je značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana i dana ($F(3,281, 114,821)=3,532, p=0,014$) dobijen testiranjem efekata unutar subjekata. Dodatno, testiranjem efekata između subjekata je demonstriran značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 35)=10,346, p=0,003$) i interakcije prenatalnog tretmana i pola ($F(1, 35)=4,240, p=0,047$) na

latenciju. VPA životinje su imale veću latenciju od CTRL životinja, što je pokazano statistički značajno kod mužjaka ($p=0,001$), (Slika 36a).

Slično, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 35)=15,233, p<0,001$) i interakcije prenatalnog tretmana i pola ($F(1, 35)=6,170, p=0,018$) na efikasnost puta, dobijenih testiranjem efekata između subjekata. Smanjena efikasnost puta VPA pacova u odnosu na CTRL pacove je posebno iskazana kod mužjaka ($p<0,001$). Pored toga, VPA ženke su imale veću efikasnost puta u odnosu na VPA mužjake ($p=0,020$), (Slika 36b).

Ispitivanje parametra % puta pređenog u periferiji testiranjem efekata unutar subjekata otkrilo je značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana i dana ($F(3,476, 121,651)=2,947, p=0,029$), kao i interakcije sva tri faktora ($F(3,476, 121,651)=2,798, p=0,036$). Testiranje efekata između subjekata je pokazalo značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 35)=8,140, p=0,007$) i interakcije prenatalnog tretmana i pola ($F(1, 35)=4,952, p=0,033$). VPA životinje su veći deo puta prelazile u perifernom prstenu, pre svega mužjaci ($p=0,001$), u odnosu na CTRL pacove (Slika 36c).

Analiza probnog testa nije pokazala razlike u broju ulazaka u ciljni region.



Slika 36. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u standardnom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta, c) % puta pređen u perifernom prstenu tokom akvizicije; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ u odnosu na CTRL M, # $p<0,05$ u odnosu na CTRL F, \$ $p<0,05$, \$\$ $p<0,01$ u odnosu na VPA M.

Ispitivanje latencije u reverznoj akviziciji testiranjem efekata unutar subjekata je pokazalo značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana, pola i dana ($F(2,298, 80,414)=4,078, p=0,016$) na latenciju. Testiranjem efekata između subjekata je otkriven i značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 35)=7,481, p=0,010$). VPA pacovi su imali veću latenciju u odnosu na CTRL pacove, posebno iskazano kod mužjaka ($p=0,003$), (Slika 37a).

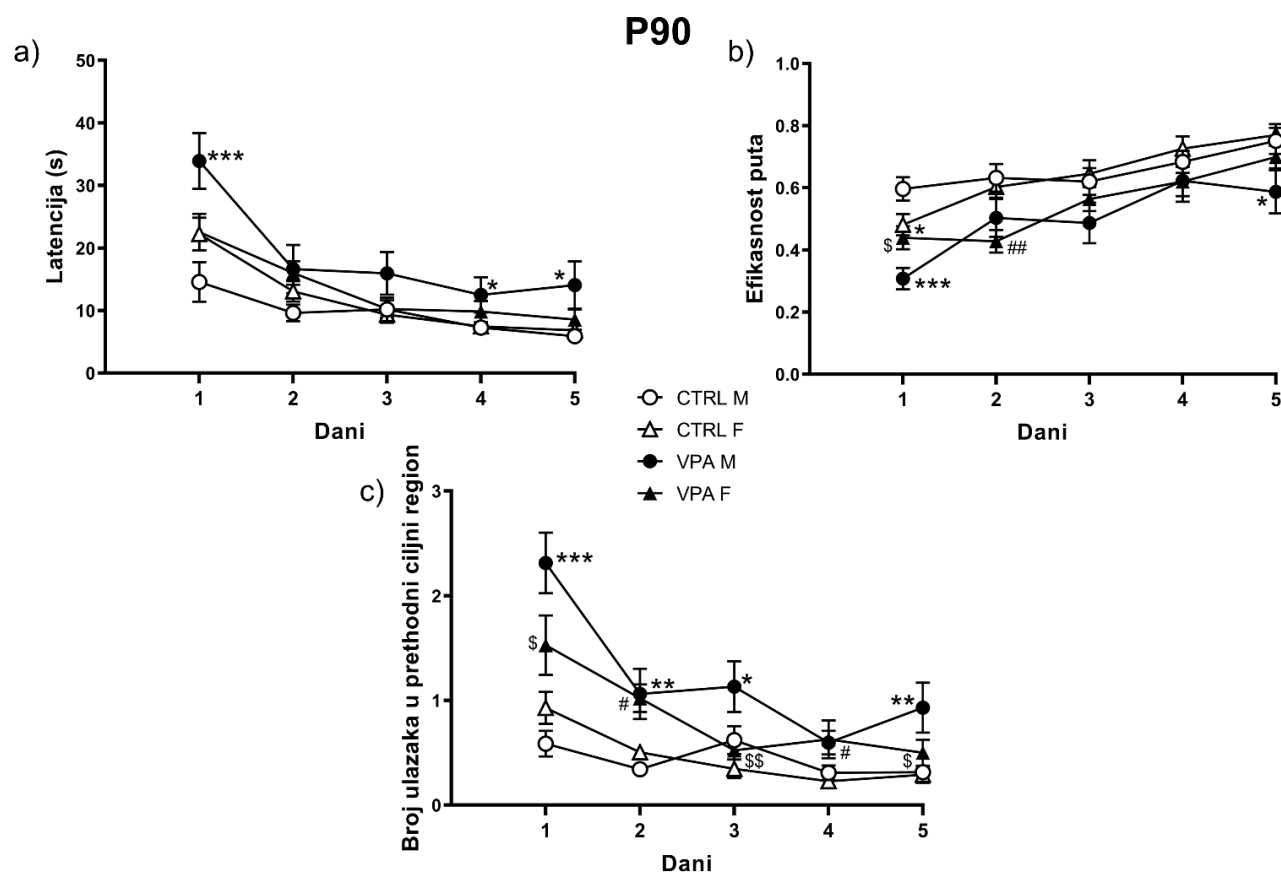
Analiza efikasnosti puta testiranjem efekata unutar subjekata je takođe pokazala značaj uticaj interakcije svih faktora ($F(4, 140)=3,369, p=0,011$), a testiranje efekata između subjekata je otkrilo

značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 35)=12,749$, $p=0,001$). VPA životinje su imale manju efikasnost puta u odnosu na CTRL životinje, što je statistički značajno pokazano kod mužjaka ($p=0,004$) (Slika 37b).

Nije pokazana razlika u procentu puta pređenog u perifernom prstenu.

Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana i dana ($F(3,233, 113,172)=6,226$, $p<0,001$), kao i interakcije sva tri faktora ($F(3,233, 113,172)=2,725$, $p=0,044$) dobijenih testiranjem efekata unutar subjekata. Dodatno je pokazan značajan uticaj prenatalnog tretmana testiranjem efekata između subjekata ($F(1, 35)=29,180$, $p<0,001$). VPA životinje su imale veći broj ulazaka u prethodni ciljni region u odnosu na CTRL životinje, i to kod oba pola (mužjaci: $p<0,001$, ženke: $p=0,015$). Pored toga, VPA mužjaci su imali veći broj ulazaka u prethodni ciljni region u odnosu na VPA ženke ($p=0,019$), (Slika 37c).

Nije bilo razlike u broju ulazaka u ciljni region ni u prethodni ciljni region u reverznom probnom testu.



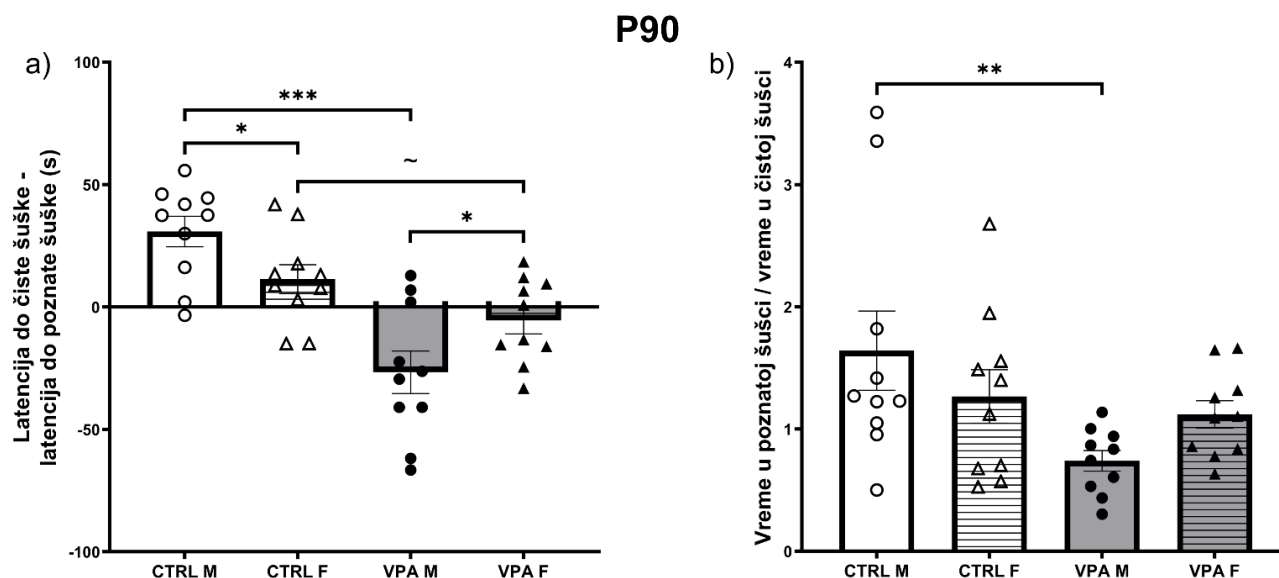
Slika 37. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u reverznom Morisovom vodenom lavirintu prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) latencija, b) efikasnost puta, c) broj ulazaka u prethodni ciljni region tokom akvizicije; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ u odnosu na CTRL M, # $p<0,05$, ## $p<0,01$ u odnosu na CTRL F, \$ $p<0,05$, \$\$ $p<0,01$ u odnosu na VPA M.

4.3.7. Olfaktorna diskriminacija

Analiza razlike latencije ulaska u čistu i poznatu šušku je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 36)=30,886$, $p<0,001$) i interakcije prenatalnog tretmana i pola ($F(1, 36)=9,239$, $p=0,004$). VPA životinje su pokazale manju razliku u latenciji, tj. da su prvo ulazile u čistu, a potom u poznatu šušku, i to je pokazano statistički značajno za mužjake ($p<0,001$) i na nivou trenda za ženke

($p=0,083$). CTRL ženke su imale povećanu razliku u latencijama u odnosu na CTRL mužjake ($p=0,047$), što znači da su kasnije ulazile u sopstvenu šušku (ili pre u čistu). Nasuprot tome, VPA ženke su imale smanjenu razliku u odnosu na VPA mužjake, tj. pre su ulazile u sopstvenu /kasnije u čistu šušku u odnosu na VPA mužjake ($p=0,032$), (Slika 38a).

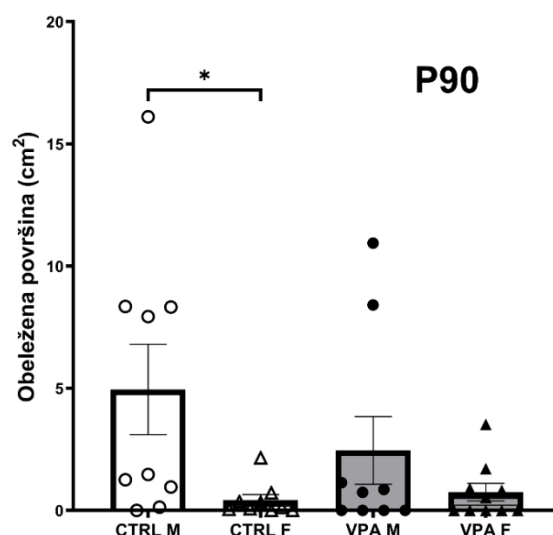
Što se tiče odnosa vremena provedenog u sopstvenoj i vremena provedenog u čistoj šuški, takođe je pokazan značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 36)=6,194$, $p=0,018$). VPA životinje su imale manji odnos u poređenju sa CTRL pacovima, tj. više vremena su provodile u čistoj šuški, a manje u sopstvenoj. Ovo je pogotovo demonstrirano kod mužjaka ($p=0,005$), (Slika 38b).



Slika 38. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u testu olfaktorne diskriminacije prikazano kroz praćenje sledećih parametara: a) razlika u latencijama ulaska u čistu i poznatu šušku, b) odnos vremena provedenog u čistoj i poznatoj šušci; $\sim 0,05 < p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.8. Test obeležavanja teritorije kao odgovor na miris

Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj pola ($F(1, 33)=6,410$, $p=0,016$), sa mužjacima koji obeležavaju više od ženki, pre svega u CTRL grupi ($p=0,012$). Iako su VPA mužjaci pokazali manje obeležavanje od CTRL mužjaka, razlika nije pokazala statističku značajnost ($p=0,115$), (Slika 39).



Slika 39. Ponašanje valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnom periodu oko 90. dana (P90) u testu obeležavanja teritorije kao odgovor na miris prikazano kroz praćenje površine obeležene površine. * $p < 0,05$.

4.3.9. Neurohemija

Statistički značajni rezultati su prikazani u Tabelama 3 i 4.

P30: Ispitujući koncentraciju neurotransmitera kod juvenilnih pacova, pokazano je da su VPA životinje imale: manju koncentraciju GABA u cerebelumu, oba pola; manje glutamata u olfaktornom bulbusu i cerebelumu, pre svega kod mužjaka; manje dopamina u cerebelumu kod oba pola, ali više u frontalnom korteksu, pogotovo kod ženki; više serotonina u ventralnom hipokampusu, značajno kod mužjaka; manje dopamina u olfaktornom bulbusu i dorzalnom hipokampusu samo na opštem nivou; manje noradrenalina u frontalnom korteksu, pre svega kod mužjaka. Pored toga, pokazane su sledeće razlike među polovima: ženke su imale više dopamina u frontalnom korteksu na opštem nivou, razlika koja je poticala od VPA grupe; VPA ženke su imale manje serotonina u ventralnom hipokampusu u odnosu na VPA mužjake; CTRL ženke su imale manje noradrenalina u frontalnom korteksu u poređenju sa CTRL mužjacima.

P90: VPA životinje su pokazale sledeće promene: više GABA-e u frontalnom korteksu i ventralnom hipokampusu, pogotovo kod mužjaka; više glutamata u frontalnom korteksu pre svega kod mužjaka i ventralnom hipokampusu izraženo kod ženki; više dopamina u cerebelumu, pogotovo kod mužjaka; više serotonina u frontalnom korteksu i strijatumu, pre svega kod mužjaka; više acetilholina u frontalnom korteksu, značajno kod mužjaka; više noradrenalina u frontalnom korteksu, značajno kod mužjaka, na nivou trenda kod ženki. Analiza glutamata je dodatno pokazala da su ženke imale manje glutamata u frontalnom korteksu i više u ventralnom hipokampusu u odnosu na mužjake, i da je ta razlika pre svega poticala od VPA grupe. Pored toga, VPA ženke su imale manje GABA-e, serotonina i noradrenalina u frontalnom korteksu i manje dopamina u cerebelumu.

Tabela 3. Koncentracija GABA-e, glutamata i serotonina merena u navedenim regionima mozga valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnim periodima 30. (P30) i 90. dana (P90). Date su izmerene srednje vrednosti \pm standardna greška ($\mu\text{g/g}$), i rezultati dvofaktorske ANOVA analize. *vs=versus*=u poređenju sa

	P30			P90		
	M	F	Dvofaktorska ANOVA	M	F	Dvofaktorska ANOVA
	Dvofaktorska ANOVA					
GABA	frontalni korteks			CTRL 27,42 \pm 1,60 VPA 33,17 \pm 2,29 p=0,013	CTRL 28,53 \pm 0,88 VPA 27,88 \pm 0,84 VPA M vs F p=0,021	Interakcija: F(1, 28)=4,406, p=0,045
	ventralni hipokampus			CTRL 89,01 \pm 3,50 VPA 105,57 \pm 5,48 p=0,038	CTRL 93,12 \pm 3,61 VPA 101,99 \pm 7,62	Prenatalni tretman: F(1, 24)=5,704, p=0,025
	cerebelum	CTRL 173,31 \pm 6,68 VPA 146,95 \pm 5,23 p=0,010	CTRL 184,82 \pm 8,5 VPA 154,44 \pm 5,43 p=0,004	Prenatalni tretman: F(1, 20)=18,532, p<0,001		
glutamat	olfaktorni bulb	CTRL 1214,9 \pm 92,48 VPA 1003,66 \pm 28,71 p=0,010	CTRL 1174,68 \pm 31,41 VPA 1128,25 \pm 32,42	Prenatalni tretman: F(1, 21)=6,126, p=0,022		
	frontalni korteks			CTRL 1353,15 \pm 18,71 VPA 1808,64 \pm 121,34 p<0,001	CTRL 1353,77 \pm 48,80 VPA 1494,95 \pm 74,49 VPA M vs F p=0,007	Prenatalni tretman: F(1, 28)=5,803, p<0,001 Pol: F(1, 28)=4,737, p=0,048 Interakcija: F(1, 28)=6,874, p=0,048
	ventralni hipokampus			CTRL 458,49 \pm 6,88 VPA 437,41 \pm 10,68 VPA M vs F p<0,001	CTRL 461,86 \pm 10,22 VPA 537,61 \pm 37,93 p=0,007	Pol: F(1, 25)=8,489, p=0,007 Interakcija: F(1, 25)=7,420, p=0,012
serotonin	cerebelum	CTRL 1151,52 \pm 69,21 VPA 976,780 \pm 11,62 p=0,007	CTRL 1091,85 \pm 36,13 VPA 1035,54 \pm 25,55	Prenatalni tretman: F(1, 22)=8,250, p=0,009		
	frontalni korteks			CTRL 0,18 \pm 0,03 VPA 0,55 \pm 0,19 p=0,008	CTRL 0,18 \pm 0,03 VPA 0,23 \pm 0,02 VPA M vs F p=0,019	Prenatalni tretman: F(1, 27)=5,529, p=0,026
	striatum			CTRL 0,25 \pm 0,01 VPA 0,43 \pm 0,10 p=0,023	CTRL 0,23 \pm 0,02 VPA 0,33 \pm 0,03	Prenatalni tretman: F(1, 22)=7,397, p=0,013
	ventralni hipokampus	CTRL 0,24 \pm 0,01 VPA 0,30 \pm 0,03 p=0,032	CTRL 0,28 \pm 0,02 VPA 0,24 \pm 0,01 VPA M vs F p=0,018	Interakcija: F(1, 22)=7,853, p=0,010		

Tabela 4. Koncentracija dopamina, acetilholina i noradrenalina merena u navedenim regionima mozga valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacova oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F) u postnatalnim periodima 30. (P30) i 90. dana (P90). Date su izmerene srednje vrednosti \pm standardna greška ($\mu\text{g/g}$), i rezultati dvofaktorske ANOVA analize. *vs=versus*=u poređenju sa

	P30			P90		
	M	F	Dvofaktorska ANOVA	M	F	Dvofaktorska ANOVA
dopamin	frontalni korteks	CTRL 0,55 \pm 0,00 VPA 0,54 \pm 0,00 VPA M vs F p=0,002	CTRL 0,54 \pm 0,00 VPA 0,60 \pm 0,02 p=0,002	Prenatalni tretman: F(1, 23)=5,803, p=0,024 Pol: F(1, 23)=4,737, p=0,040 Interakcija: F(1, 23)=6,874, p=0,015		
	cerebelum	CTRL 0,78 \pm 0,01 VPA 0,76 \pm 0,00 p=0,025	CTRL 0,78 \pm 0,01 VPA 0,76 \pm 0,01 p=0,024	Prenatalni tretman: F(1, 21)=11,691, p=0,003	CTRL 0,28 \pm 0,01 VPA 0,41 \pm 0,07 p=0,011	Prenatalni tretman: F(1, 21)=4,372, p=0,049
	olfaktorni bulbus	CTRL 1,60 \pm 0,16 VPA 1,33 \pm 0,09	CTRL 1,62 \pm 0,11 VPA 1,30 \pm 0,04 p=0,053	Prenatalni tretman: F(1, 22)=6,988, p=0,015		
acetilholin	frontalni korteks			CTRL 1,73 \pm 0,10 VPA 2,23 \pm 0,10 p=0,008	CTRL 1,80 \pm 0,10 VPA 1,99 \pm 0,16	Prenatalni tretman: F(1, 26)=8,335, p=0,008
	dorzalni hipokampus	CTRL 3,29 \pm 0,25 VPA 2,81 \pm 0,18	CTRL 3,07 \pm 0,27 VPA 2,61 \pm 0,11	Prenatalni tretman: F(1, 21)=4,576, p=0,044		
noradrenalin	frontalni korteks	CTRL 16,52 \pm 0,64 VPA 14,63 \pm 0,30 p=0,011	VPA 14,60 \pm 0,50 CTRL 14,94 \pm 0,36 CTRL M vs F p=0,025	Prenatalni tretman: F(1, 22)=5,725, p=0,026	CTRL 9,37 \pm 0,27 VPA 10,93 \pm 0,73 p=0,068 VPA M vs F p=0,016	Prenatalni tretman: F(1, 24)=19,017, p<0,001

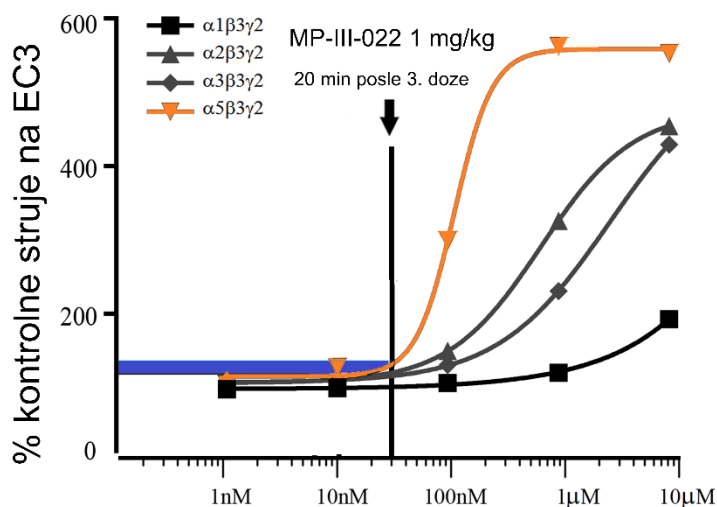
4.4. Uticaj primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a

4.4.1. Farmakokinetika MP-III-022

Nisu detektovane razlike između VPA i CTRL pacova, niti između mužjaka i ženki, u pogledu ukupne i slobodne koncentracije MP-III-022 u mozgu (Tabela 5). Maksimalna slobodna koncentracija u mozgu je izmerena 20 min posle 3. doze od 2 mg/kg. Izmerena koncentracija od oko 80 nM je mogla dovesti do blage pozitivne modulacije $\alpha 2$ i $\alpha 3$ GABA_A receptora (Stamenić i sar., 2016), tako da nije korišćena u daljim ispitivanjima. Najviša izmerena koncentracija za dozu od 1 mg/kg, od oko 30 nM, dobijena je u istoj vremenskoj tački i smatrana je selektivnom za $\alpha 5$ GABA_A receptore (Slika 40). Finalno, doza od 0,33 mg/kg, najniža testirana doza, rezultovala je u procenjenoj slobodnoj koncentraciji u mozgu od 10 nM, što bi trebalo da dovede do slabije selektivne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora.

Tabela 5. Ukupna i slobodna koncentracija (konc.) MP-III-022 (nmol/kg) izmerena u mozgu i prikazana kao srednja vrednost \pm standardna greška. Korišćeni valproatni (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL) pacovi oba pola (muškog, lat. *masculinum*, M i ženskog, lat. *femininum*, F). n. d. – nije dostupno.

Vremenska tačka	Pol	CTRL 0,33 mg/kg		CTRL 1 mg/kg		VPA 1 mg/kg		CTRL 2 mg/kg	
		Ukupna konc.	Slobodna konc.	Ukupna konc.	Slobodna konc.	Ukupna konc.	Slobodna konc.	Ukupna konc.	Slobodna konc.
24 h posle 1. dana	M	46.38 \pm 1.05	3.07 \pm 0.07	45.81 \pm 9.51	3.03 \pm 0.63	44.89 \pm 1.83	2.97 \pm 0.12	n.d.	n.d.
	F	45.87 \pm 2.07	3.03 \pm 0.14	48.49 \pm 1.90	3.20 \pm 0.13	49.70 \pm 6.01	3.28 \pm 0.40	n.d.	n.d.
20 min posle 3. dana	M	199.02 \pm 30.85	13.16 \pm 2.04	472.37 \pm 61.56	31.22 \pm 4.07	427.71 \pm 31.66	28.27 \pm 2.09	1180.52 \pm 219.62	78.03 \pm 14.52
	F	159.62 \pm 6.29	10.55 \pm 0.42	281.26 \pm 59.06	18.59 \pm 3.90	377.76 \pm 3.94	24.97 \pm 0.26	n.d.	n.d.
20 min posle 7. dana	M	74.65 \pm 10.67	4.93 \pm 0.70	172.04 \pm 91.54	11.27 \pm 6.05	270.85 \pm 59.41	17.90 \pm 3.93	802.04 \pm 144.10	53.01 \pm 9.52
	F	120.37 \pm 23.65	7.96 \pm 1.56	260.41 \pm 53.35	17.21 \pm 3.53	270.66 \pm 52.82	17.89 \pm 3.49	n.d.	n.d.
24 h posle 7. dana	M	45.27 \pm 1.9	2.99 \pm 0.13	42.31 \pm 0.52	2.80 \pm 0.03	43.92 \pm 3.19	2.90 \pm 0.21	n.d.	n.d.
	F	42.96 \pm 3.79	2.84 \pm 0.25	43.10 \pm 2.16	2.85 \pm 0.14	40.20 \pm 3.28	2.66 \pm 0.22	n.d.	n.d.



Slika 40. Aproksimativni elektrofiziološki odgovor procenjene slobodne koncentracije MP-III-022 u mozgu izmerene 20 min nakon 3. doze od 1 mg/kg, prikazan na krivama % modulacije EC3 GABA (koncentracija GABA-e koja postiže 3% maksimalnog efekta) dobijenim na rekombinantnim GABA_A receptorima koji sadrže $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - i $\alpha 5$ -podjedinicu. Preuzeto i prilagođeno iz (Stamenić i sar., 2016)

4.4.2. Bihevioralni rezultati posle tretmana sa MP-III-022

4.4.2.1. Test socijalne interakcije

Ispitivanje vremena provedenog u njušenju i timarenju uparene životinje je pokazalo značajan efekat interakcije prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 70)=3,241, p=0,045$), kao i pola, prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 70)=3,619, p=0,032$). VPA VEH mužjaci su proveli manje vremena u ovom ponašanju u poređenju sa CTRL VEH mužjacima ($p=0,029$). Nasuprot tome, VPA mužjaci su proveli više vremena njušeći i timareći drugu životinju u odnosu na CTRL mužjake u MP0,3 ($p=0,023$) i MP1 grupi na nivou trenda ($p=0,063$). Dodatno, VPA MP0,3 mužjaci su imali izraženije praćeno ponašanje u odnosu na VPA VEH mužjake ($p=0,027$), (Slika 41a).

Što se tiče vremena provedenog u provlačenju preko/ispod parnjaka, svi faktori i njihove interakcije su pokazali značajnost: pol ($F(1, 70)=11,920, p=0,001$), prenatalni tretman ($F(1, 70)=4,982, p=0,047$), postnatalni tretman ($F(2, 70)=8,281, p=0,001$), interakcija pola i prenatalnog tretmana ($F(1, 70)=8,005, p=0,006$), interakcija pola i postnatalnog tretmana ($F(2, 70)=4,451, p=0,015$), interakcija prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 70)=4,303, p=0,017$), interakcija pola, prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 70)=8,521, p<0,001$). Mužjaci su proveli više vremena u ovom ponašanju u odnosu na ženke, pre svega u VPA VEH grupi ($p<0,001$). VPA pacovi su se više provlačili preko/ispod parnjaka u poređenju sa CTRL životinjama, što je značajno bilo pokazano kod VEH mužjaka ($p<0,001$). Tretman sa MP-III-022 je smanjio vreme provedeno u ovom ponašanju u odnosu na VEH (MP0,3: $p=0,002$, MP1: $p=0,003$), pre svega kod VPA mužjaka (MP0,3: $p<0,001$, MP1: $p<0,001$), (Slika 41b).

Analiza je otkrila značajan uticaj prenatalnog tretmana na vreme provedeno u praćenju uparene životinje ($F(1, 70)=2,894, p=0,008$), gde su VPA životinje provodile manje vremena u ovom ponašanju. Ovo je pokazano kod VEH ($p=0,029$) i MP0,3 ženki ($p=0,046$) i VEH mužjaka na nivou trenda ($p=0,091$), (Slika 41c).

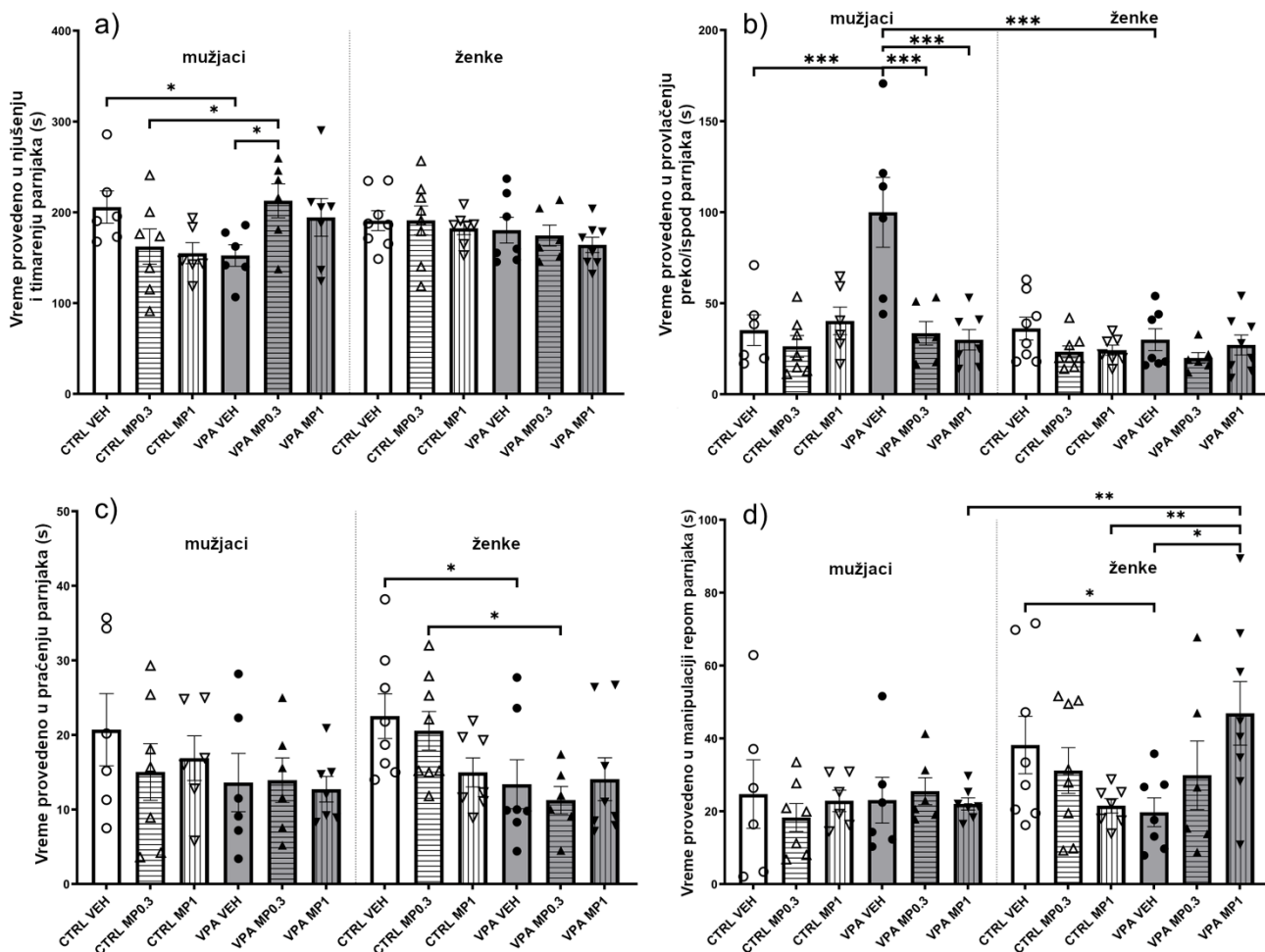
Ženke su provele više vremena u manipulaciji repom parnjaka u poređenju sa mužjacima ($F(1, 70)=4,066, p=0,048$), pre svega u VPA MP1 grupi ($p=0,009$). Dodatno, pokazana je značajna interakcija između sva tri faktora ($F(2, 70)=3,419, p=0,038$). VPA VEH ženke su provele manje vremena u manipulaciji repom u poređenju sa VPA CTRL ženkama ($p=0,043$). Međutim, došlo je do obrnute situacije posle primanja MP1: VPA MP1 ženke su provele više vremena u ovom ponašanju u poređenju sa CTRL MP1 ženkama ($p=0,007$), kao i u poređenju sa VPA VEH ženkama ($p=0,013$), (Slika 41d).

Nije bilo razlike u broju tuševa i vremenu provedenom u rvanju i boksu.

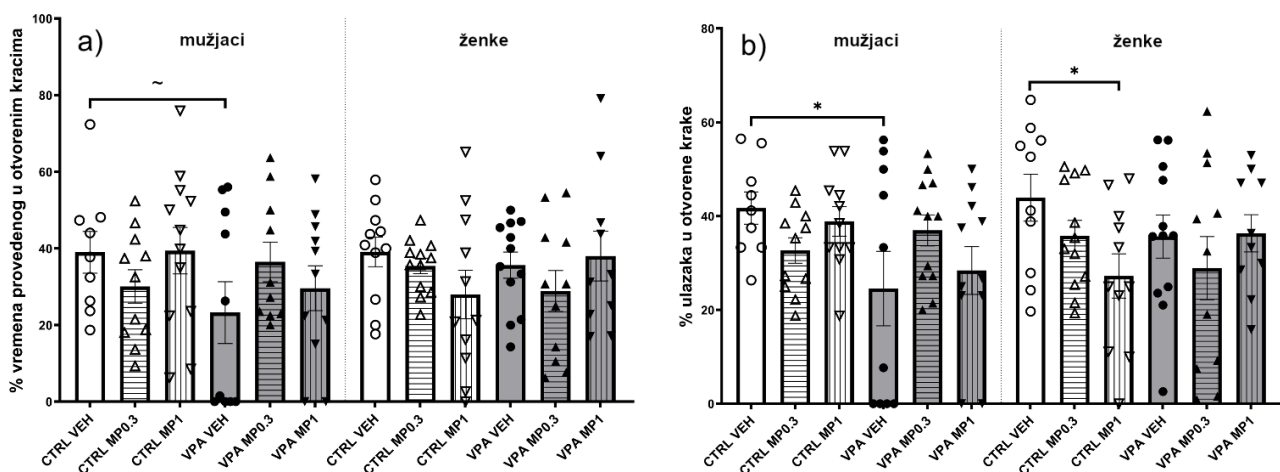
4.4.2.2. Uzdignuti plus lavirint

Trofaktorska ANOVA je otkrila interakciju na nivou trenda između pola, prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana za procenat vremena provedenog u otvorenim kracima ($F(2, 118)=2,614, p=0,077$), gde je najjasnija razlika pokazana na nivou tek ispod statističke značajnosti ($p=0,053$) u prenatalnom tretmanu za VEH mužjake: VPA su proveli manje vremena u otvorenim kracima u poređenju sa CTRL (Slika 42a).

Ispitivanje drugog parametra, procenta ulazaka u otvorene krake, otkrilo je uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 118)=2,905, p=0,073$) i interakcije pola, prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 118)=2,858, p=0,061$), oba uticaja na nivou trenda. VPA životinje su imale tendenciju da manje ulaze u otvorene krake u odnosu na CTRL pacove, što je statistički značajno pokazano jedino kod VEH mužjaka ($p=0,017$). Dodatno, CTRL MP1 ženke su imale manji broj ulazaka u otvorene krake u poređenju sa CTRL VEH ženkama ($p=0,043$), (Slika 42b).



Slika 41. Socijalno ponašanje pod uticajem tretmana (vehikulum (VEH), MP-III-022 0,33 mg/kg (MP0,3) ili 1 mg/kg (MP1)) primenjenih na prenatalno tretirane pacove (valproatne (VPA) i kontrolne (eng. *control*, CTRL)): a) vreme provedeno u njušenju i timarenju parnjaka, b) vreme provedeno u provlačenju preko/ispod parnjaka, c) vreme provedeno u praćenju parnjaka, d) vreme provedeno u manipulaciji repom parnjaka; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Slika 42. Ponašanje u uzdignutom plus lavirintu pod uticajem tretmana (vehikulum (VEH), MP-III-022 0,33 mg/kg (MP0,3) ili 1 mg/kg (MP1)) primenjenih na prenatalno tretirane pacove (valproatne (VPA) i kontrolne (eng. *control*, CTRL)): a) % vremena provedenog u otvorenim kracima, b) % ulazaka u otvorene krake; ~ $0,05 < p < 0,1$, * $p < 0,05$.

4.4.2.3. Test spontane lokomotorne aktivnosti

Ispitivanje vremena provedenog u aktivnosti je otkrilo značajan efekat interakcije prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 111)=8,278, p<0,001$). VPA mužjaci su proveli više vremena u aktivnosti u poređenju sa CTRL mužjacima u VEH grupi ($p=0,002$), dok je obrnuto dobijeno posle tretmana sa MP0,3 na nivou trenda (VPA MP0,3 < CTRL MP0,3, $p=0,072$), zbog efekta smanjena aktivnosti koji je MP0,3 imao na VPA mužjake u poređenju sa VPA VEH mužjacima ($p=0,042$). Sa druge strane, MP-III-022 dat CTRL mužjacima je povećao njihovu aktivnost u poređenju sa CTRL VEH mužjacima (MP0,3: $p=0,039$, MP1: $p=0,011$). VPA VEH ženke su takođe pokazale povećano vreme u aktivnosti u poređenju sa CTRL VEH ženkama ($p=0,030$), (Slika 43a).

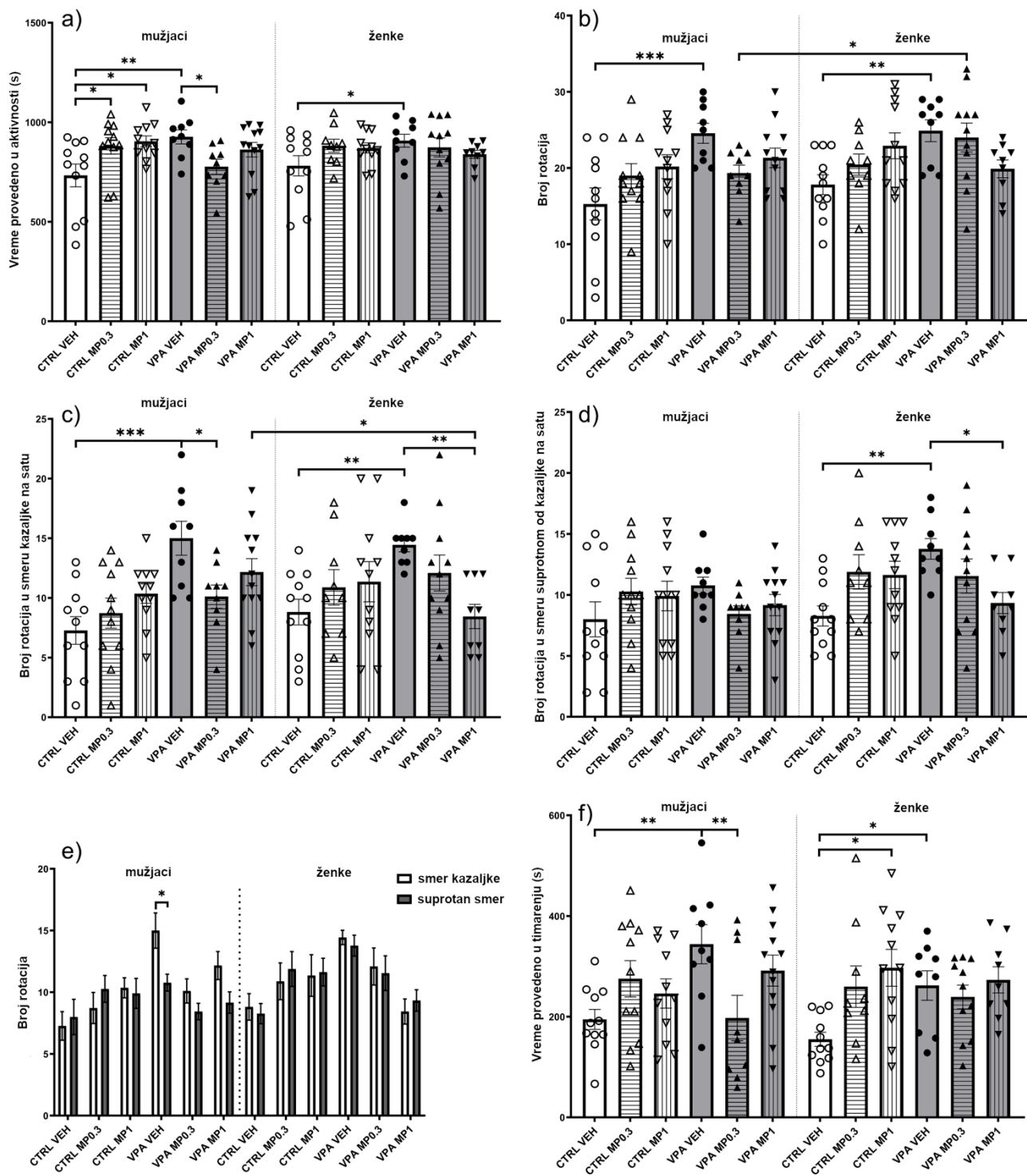
Trofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 111)=11,245, p=0,001$) i interakcije prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana na broj rotacija ($F(2, 111)=8,970, p<0,001$). VPA životinje su imale više rotacija u poređenju sa CTRL životinjama, što je statistički značajno pokazano kod VEH mužjaka ($p<0,001$) i ženki ($p=0,002$). CTRL MP1 pacovi su pokazali tendenciju povećanog broja rotacija u poređenju sa CTRL VEH životinjama, i mužjacima ($p=0,062$) i ženkama ($p=0,053$). Nasuprot tome, MP0,3 dat VPA mužjacima je smanjio njihov broj rotacija na nivou statističkog trenda u poređenju sa VPA VEH mužjacima ($p=0,081$) i statistički značajno u odnosu na VPA MP0,3 ženke ($p=0,039$), (Slika 43b).

Analiza broja rotacija u smeru kazaljke na satu je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 111)=10,494, p=0,002$) i interakcije prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 111)=9,335, p<0,001$). VPA pacovi su imali veći broj rotacija u smeru kazaljke na satu u odnosu na CTRL pacove, pre svega u VEH grupi kod oba pola (mužjaci: $p<0,001$, ženke: $p=0,002$). Tretman sa MP-III-022 je smanjio ovaj broj kod VPA životinja u poređenju sa VPA VEH životinjama, s tim što je opisan efekat ispoljen kod mužjaka posle tretmana sa MP0,3 ($p=0,046$), a kod ženki posle MP1 ($p=0,004$). Dodatno, mužjaci su imali veći broj rotacija u smeru kazaljke na satu u odnosu na ženke u VPA MP1 grupi ($p=0,035$), (Slika 43c).

Pol je imao značajan uticaj na broj rotacija suprotan od smera kretanja kazaljke na satu ($F(1, 111)=5,988, p=0,016$), gde su ženke imale veći broj ovih rotacija u poređenju sa mužjacima, pokazano na nivou trenda u VPA VEH ($p=0,087$) i VPA MP0,3 grupi ($p=0,054$). Takođe je demonstriran uticaj interakcije prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 111)=8,245, p<0,001$). VPA životinje su imale veći broj ovih rotacija u poređenju sa CTRL životinjama u VEH grupi (mužjaci na nivou trenda: $p=0,067$, ženke: $p=0,001$). Tretman sa MP-III-022 dat CTRL ženkama je imao tendenciju da povećava broj rotacija obrnutog smera od kazaljke na satu u odnosu na CTRL VEH ženke (MP0,3: $p=0,074$, MP1: $p=0,094$). Nasuprot tome, VPA ženke tretirane sa MP1 su imali smanjeni broj ovih rotacija u poređenju sa VPA VEH ($p=0,024$), (Slika 43d).

Upareni t-test je pokazao da razlika u broju rotacija u smeru kazaljke na satu nasuprot onima u smeru suprotnom kazaljci na satu postoje samo kod VPA VEH mužjaka koji imaju izraženije rotiranje u smeru kazaljke na satu ($p=0,011$), (Slika 43e).

Trofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj interakcije prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana na vreme provedenu u timarenju ($F(2, 111)=7,769, p=0,001$). VPA životinje su provele više vremena u timarenju u odnosu na CTRL životinje, pre svega kod VEH mužjaka ($p=0,001$) i ženki ($p=0,027$). MP0,3 dat VPA mužjacima je smanjio ovo vreme u poređenju sa VPA VEH mužjacima ($p=0,006$) i VPA MP1 mužjacima na nivou trenda ($p=0,093$). Obrnuto, MP-III-022 dat CTRL ženkama je doveo do povećanja vremena provedenog u timarenju u poređenju sa CTRL VEH ženkama (MP0,3: na nivou trenda: $p=0,088$, MP1: $p=0,010$), (Slika 43f).



Slika 43. Spontana lokomotorna aktivnost pod uticajem tretmana (vehikulum (VEH), MP-III-022 0,33 mg/kg (MP0,3) ili 1 mg/kg (MP1)) primenjenih na prenatalno tretirane pacove (valproatne (VPA) i kontrolne (eng. *control*, CTRL)): a) vreme provedeno u aktivnosti, b) broj rotacija, c) broj rotacija u smeru kazaljke na satu, d) broj rotacija u smeru suprotnom od kazaljke na satu, e) poređenje dva smera rotacija za svaku grupu, f) vreme provedeno u timarenju; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

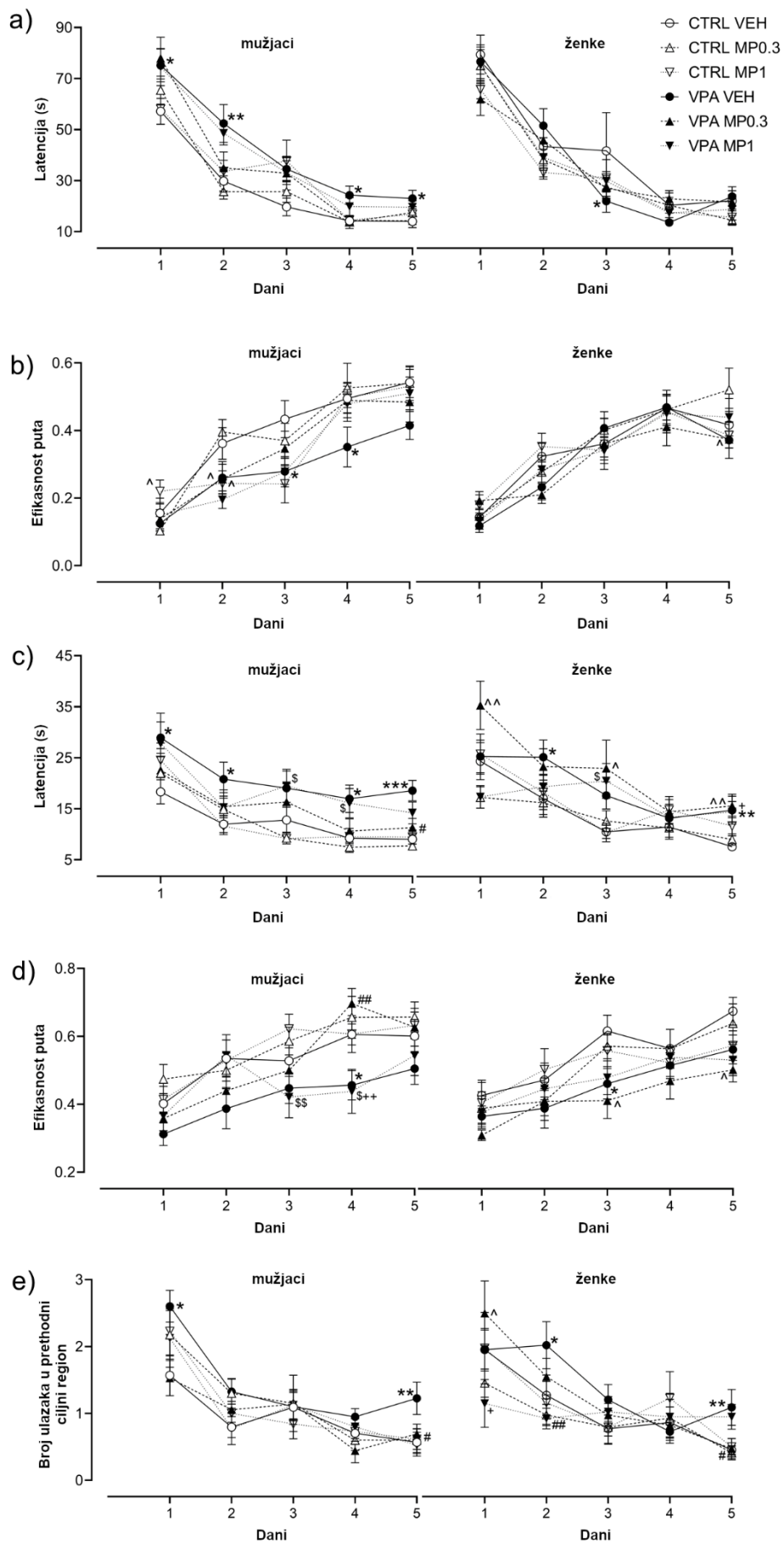
4.4.2.4. Morisov vodeni lavirint

Trofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan uticaj interakcije dana i prenatalnog tretmana ($F(3,720, 416,656)=2,810, p=0,029$), dobijen testiranjem efekata unutar subjekata, na latenciju. Testiranjem efekata između subjekata je takođe otkriven značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 112)=6,704, p=0,011$) i interakcije pola i prenatalnog tretmana ($F(1, 112)=6,467, p=0,012$). VPA životinje su imale veću latenciju u odnosu na CTRL životinje, što je pogotovo pokazano kod VEH mužjaka ($p=0,001$). Dodatno je otkriveno da su CTRL VEH ženke imale veću latenciju od CTRL VEH mužjaka (Slika 44a). Što se tiče parametra efikasnost puta, analiza je pokazala značajnu interakciju dana i pola ($F(4, 448)=3,523, p=0,008$) i interakciju dana, pola i postnatalnog tretmana ($F(8, 448)=2,020, p=0,043$), pokazano testiranjem efekata unutar subjekata. Pored toga, testiranjem efekata između subjekata pokazan je i značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 112)=13,574, p<0,001$). VPA pacovi su imali manju efikasnost puta od CTRL pacova, što je značajno bilo izraženo kod VEH mužjaka ($p<0,001$), (Slika 44b).

Nije pokazana razlika u broju ulazaka u ciljni region u probnom testu.

Analiza latencije u reverznoj akviziciji je pokazala značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 112)=38,836, p<0,001$) i interakcije pola, prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 112)=3,955, p=0,022$) dobijenih testiranjem efekata između subjekata. VPA životinje su imale veću latenciju u odnosu na CTRL životinje, što je statistički značajno pokazano kod VEH mužjaka ($p<0,001$), MP1 mužjaka ($p=0,009$), VEH ženki ($p=0,016$) i MP0,3 ženki ($p<0,001$). MP0,3 dat VPA mužjacima je uspeo da značajno smanji latenciju u poređenju sa VPA VEH mužjacima ($p=0,035$). Pored toga, VPA MP1 ženke su imale veću latenciju u odnosu na VPA MP0,3 ženke ($p=0,042$), dok su VPA MP0,3 ženke imale veću latenciju u odnosu na VPA MP0,3 mužjake ($p=0,002$), (Slika 44c). Testiranje efekata između subjekata je pokazalo i značajan uticaj prenatalnog tretmana ($F(1, 112)=26,129, p<0,001$) i interakcije pola i postnatalnog tretmana ($F(2, 112)=3,978, p=0,021$) na efikasnost puta. VPA životinje su imale smanjenu efikasnost puta u odnosu na CTRL životinje, što je pokazano kod VEH mužjaka ($p=0,004$), MP1 mužjaka ($p=0,014$), VEH ženki ($p=0,016$) i MP0,3 ženki ($p=0,015$). MP0,3 dat VPA mužjacima je uspeo da poveća efikasnost puta u odnosu na VPA VEH mužjake ($p=0,034$). Takođe je postojala razlika u polu u VPA MP0,3 grupi, gde su mužjaci imali veću efikasnost puta od ženki ($p=0,011$), (Slika 44d). Analiza trećeg ispitivanog parametra, broja ulazaka u prethodnu ciljnu zonu, pokazala je značajan efekat prenatalnog tretmana ($F(1, 112)=4,363, p=0,039$) i interakcije prenatalnog tretmana i postnatalnog tretmana ($F(2, 112)=4,175, p=0,018$), dobijeno testiranjem efekata između subjekata. VPA pacovi su imali povećan broj ulazaka u prethodni ciljni region u odnosu na CTRL pacove, pokazano kod VEH mužjaka ($p=0,004$), VEH ženki ($p=0,044$) i MP03 ženki ($p=0,040$). Tretman sa MP-III-022 dat VPA životinjama je uspeo da smanji broj ovih ulazaka, sa MP0,3 u slučaju mužjaka ($p=0,029$) i sa MP1 u slučaju ženki na nivou trenda ($p=0,058$), (Slika 44e).

Nije bilo razlike u broju ulazaka u ciljni region i prethodni ciljni region u reverznom probnom testu.



Slika 44. Ponašanje u Morisovom vodenom lavirintu pod uticajem tretmana (vehikulum (VEH), MP-III-022 0,33 mg/kg (MP0,3) ili 1 mg/kg (MP1)) primenjenih na prenatalno tretirane pacove (valproatne

(VPA) i kontrolne (eng. *control*, CTRL)): a) latencija, b) efikasnost puta u akviziciji standardnog dela testa, c) latencija, d) efikasnost puta, e) broj ulazaka u prethodni ciljni region u akviziciji reverznog dela testa; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u poređenju sa CTRL VEH; ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$ u poređenju sa CTRL MP0,3, \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ u poređenju sa CTRL MP1, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ u poređenju sa VPA VEH, + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ u poređenju sa VPA MP0,3.

4.4.3. Oslikavanje kalcijuma

Nakon inicijalnih merenja, uvideli smo da je većina DIV 13 kultura uspostavila spontanu aktivnost. CTRL kulture koje su spadale u tu grupu, ujedno nisu imale povećanje $[Ca^{2+}]_i$ na dodatak GABA-e (Slika 45e). Što se tiče VPA kultura, primećena je razlika: kulture koje su imale oscilacije male amplitude, pokazivale su povećanje kalcijumovog signala pri dodatku GABA-e; sa druge strane, VPA kulture koje su imale veću frekvenciju i amplitudu spontanijih oscilacija, ujedno nisu ispoljavale kalcijumsku prolaznu struju (eng. *transient*) na dodatak GABA-e. VPA neuroni su imali smanjenu frekvenciju ($U=0,000$, $p < 0,001$), (Slika 45a) i amplitudu ($U=570,000$, $p=0,029$), (Slika 45b) spontanijih oscilacija u poređenju sa CTRL neuronima. Neuroni koji nisu ispoljili spontanu aktivnost takođe su imali ekscitatornu reakciju na GABA (GABA reaktivni). VPA neuroni koji su spadali u ovu grupu (38 od analiziranih 65) imali su veću amplitudu odgovora izazvanog GABA-om (Slika 45c) u odnosu na istu grupu CTRL neurona (17 od analiziranih 49).

Petnaestog dana sve CTRL kulture (35 neurona) su razvile spontanu aktivnost i nisu imale povećanje $[Ca^{2+}]_i$ kao odgovor na GABA-u; GABA dodata tokom spontane oscilacije dovođila je do njenog trenutnog prekida (Slika 45e). Što se tiče VPA kultura, nalaz je bio sličan kao DIV 13; raspon od nedostatka spontane aktivnosti zajedno sa malim povećanjima kalcijuma izazvanim GABA-om (23 od 51), do spontane aktivnosti manje amplitude u poređenju sa CTRL neuronima ($U=101,000$, $p < 0,001$), (Slika 45d) zajedno sa nedostatkom povećanja $[Ca^{2+}]_i$ nakon dodatka GABA-e. CTRL kulture tretirane sa MP-III-022 su demonstrirale smanjenu amplitudu spontanijih oscilacija ($U=399,000$, $p=0,044$) u poređenju sa CTRL SAL kulturama. Dodatno, neki CTRL MP neuroni su imali povećanje $[Ca^{2+}]_i$ kao odgovor na GABA-u (14 od 32 neurona). Obrnuto, VPA MP (24 neurona) neuroni nisu imali povećanje kalcijuma, nego inhibiciju spontane aktivnosti kao odgovor na GABA-u; kao i povećanu amplitudu spontanijih oscilacija ($p=0,012$) u poređenju sa VPA SAL neuronima.

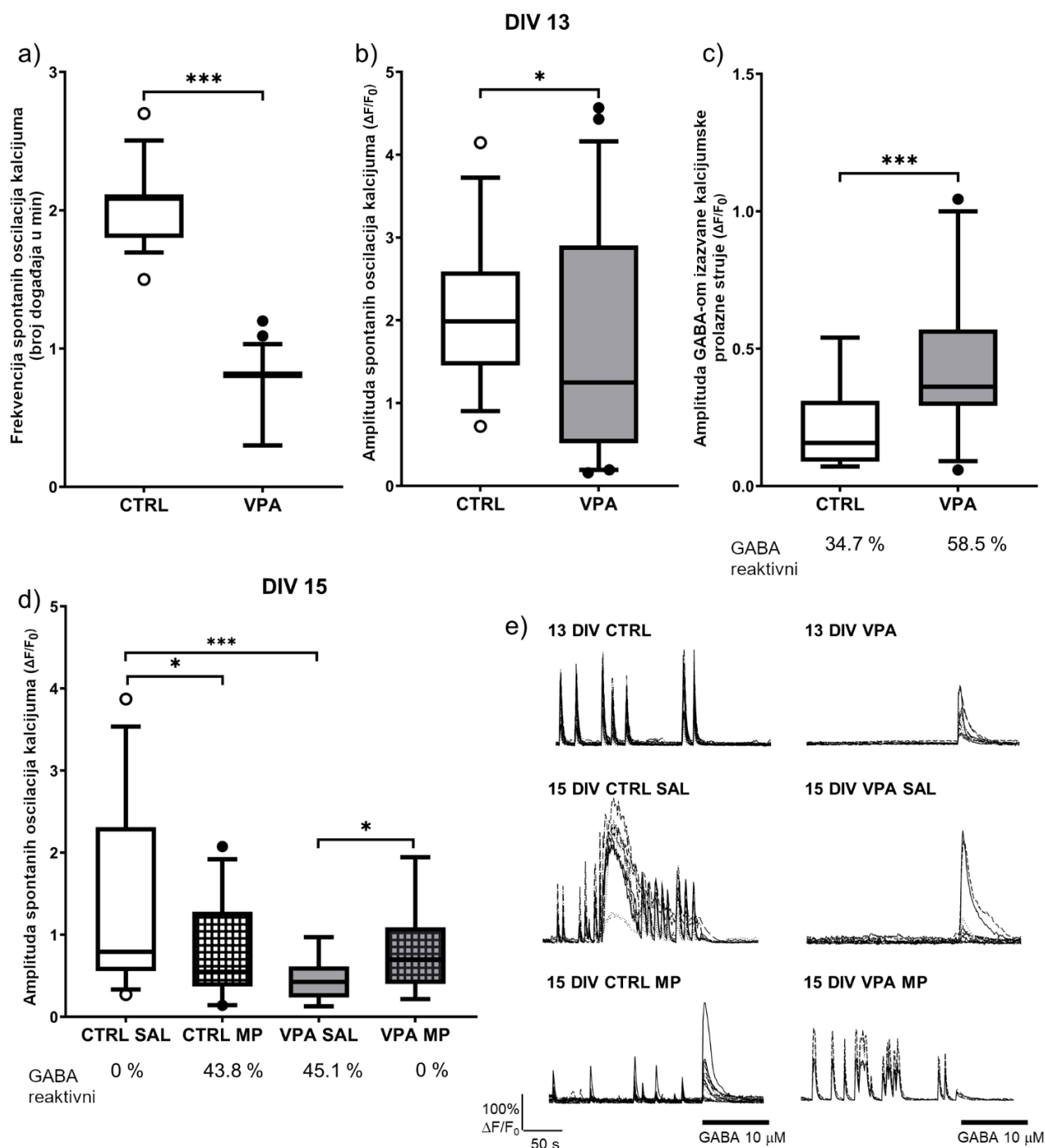
4.4.4. Real-time PCR

Analiza nivoa GABRA5 iRNK je otkrila značajan efekat postnatalnog tretmana ($F(2, 63)=5,539$, $p=0,006$) i interakcije prenatalnog i postnatalnog tretmana ($F(2, 63)=5,391$, $p=0,007$). U celini, tretman sa MP-III-022 je smanjio ekspresiju u poređenju sa VEH (MP0,3: $p=0,011$ i MP1: $p=0,031$). Ovo je pogotovo pokazano analizom hipokampus kontrolnih životinja; kod MP0,3 mužjaka na nivou trenda ($p=0,086$), MP1 mužjaka ($p=0,024$), MP0,3 ženki ($p=0,026$) i MP1 ženki ($p=0,017$). VPA VEH ženke su imale smanjenu ekspresiju GABRA5 iRNK u odnosu na CTRL VEH ženke na samoj granici značajnosti ($p=0,050$). Obrnuto, VPA MP1 ženke su imale veću ekspresiju u poređenju sa CTRL MP1 ženkama ($p=0,010$), VPA MP0,3 ženkama na nivou trenda ($p=0,074$) i VPA MP1 mužjacima ($p=0,015$), (Slika 46a).

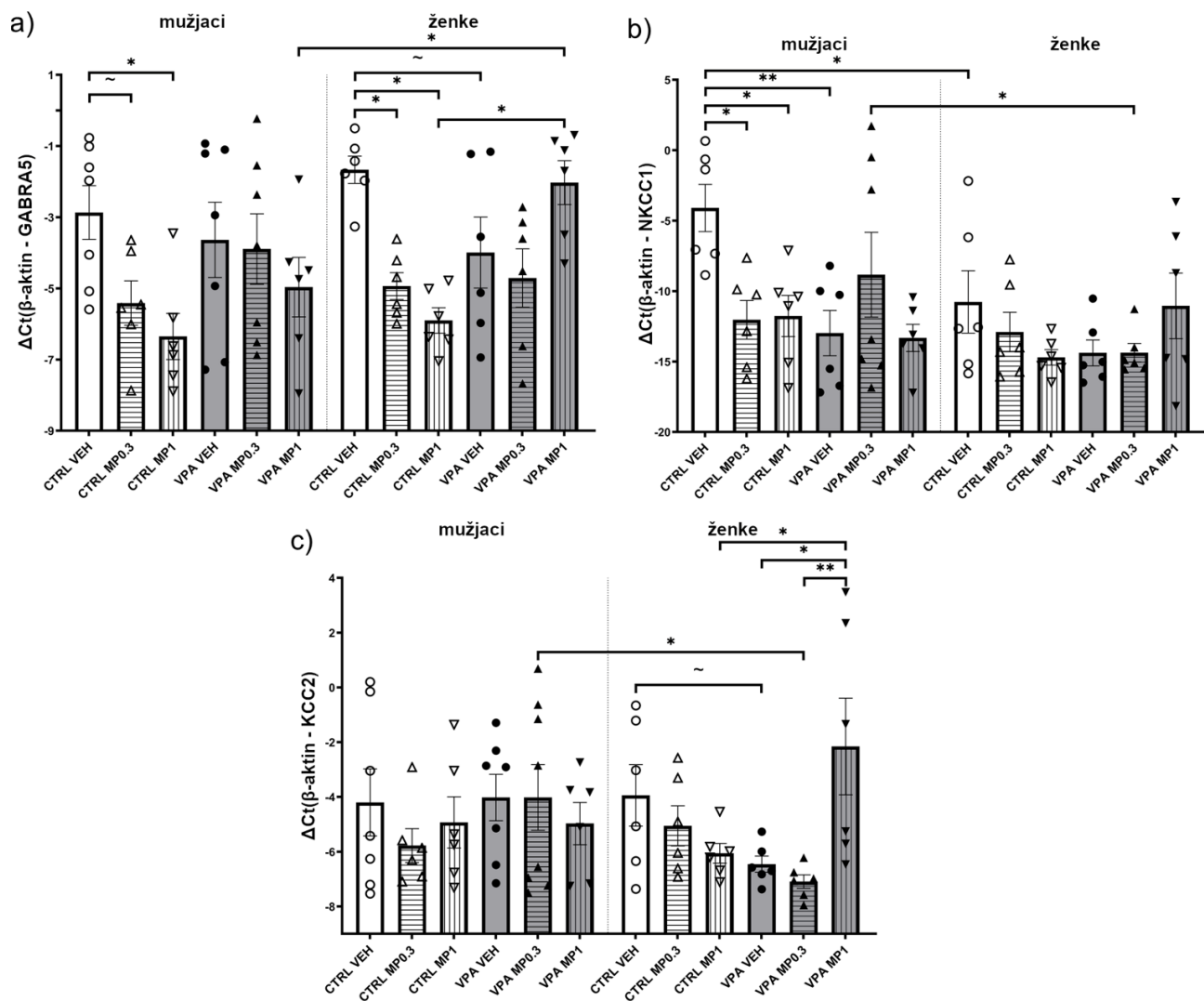
Pol je imao značajan uticaj na NKCC1 ekspresiju ($F(1, 61)=6,005$, $p=0,017$), sa ženkama koje su imale manju ekspresiju u poređenju sa mužjacima, što je pogotovo pokazano u CTRL VEH ($p=0,010$) i VPA MP0,3 grupi ($p=0,032$). Dodatno je otkriven značajan uticaj interakcije prenatalnog i postnatalnog tretmana ($F(2, 61)=4,835$, $p=0,011$). VPA VEH ($p=0,001$), CTRL MP0,3 ($p=0,012$) i CTRL MP1 ($p=0,010$) mužjaci su svi imali manju NKCC1 ekspresiju u poređenju sa CTRL VEH mužjacima, (Slika 46b).

Testiranje nivoa KCC2 iRNK je otkrila značajan efekat interakcije sva tri faktora ($F(2, 64)=3,679$, $p=0,031$). VPA ženke su imale smanjenu ekspresiju u poređenju sa VPA mužjacima u VEH grupi (na nivou trenda, $p=0,091$) i MP0,3 grupi ($p=0,042$), a obrnuto, povećanu ekspresiju, u MP1 grupi (na

nivou trenda, $p=0,067$). Dodatno, smanjen nivo KCC2 iRNK je pronađen kod VPA ženki u poređenju sa CTRL ženkama u VEH grupi (na nivou trenda, $p=0,095$), dok je obrnuto zapaženo u MP1 grupi ($p=0,017$). Dodatno, VPA ženke tretirane sa MP1 su imale povećanu ekspresiju KCC2 u hipokampusu u poređenju sa VPA VEH ($p=0,018$) i VPA MP0,3 ($p=0,008$) ženkama (Slika 46c).



Slika 45. Uticaj MP-III-022 30 nM (MP) ili fiziološkog rastvora (eng. *saline*, SAL) na GABA switch i spontanu neuronalnu aktivnost ćelija dobijenih iz prenatalno tretiranih neonatalnih pacova (valproatnih (VPA) i kontrolnih (eng. *control*, CTRL)) pokazano na: a) frekvenciji i b) amplitudi spontanijih oscilacija kalcijuma i c) amplitudi GABA-om izazvane kalcijumske prolazne struje tokom dana *in vitro* 13 (DIV13) i d) amplitudi spontanijih oscilacija kalcijuma tokom DIV 15. e) Reprezentativni snimci svih eksperimentalnih grupa tokom konstantne perfuzije i aplikacije GABA. Ćelije su inkubirane sa 5 μM Fluo-4 AM i onda snimane na frekvenciji od 1 Hz; * $p<0,05$, *** $p<0,001$.



Slika 46. Ekspresija hipokampalne iRNK pod uticajem tretmana (vehikulum (VEH), MP-III-022 0,33 mg/kg (MP0,3) ili 1 mg/kg (MP1)) primenjenih na prenatalno tretirane pacove (valproatne (VPA) i kontrolne (eng. *control*, CTRL)): a) GABRA5, b) NKCC1, c) KCC2 nivo; ~ 0,05<p<0,1, * p<0,05, ** p<0,01.

5. Diskusija

5.1. Uticaj MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju $\alpha 5$ podjedinice

Ispitali smo uticaj blage, umerene i izražene aktivacije $\alpha 5$ GABA_A receptora na ponašanje u testovima memorije i ekspresiju iRNK kod zdravih, odraslih pacova. Otkrivena je određena vrsta dvojnog obrasca dozne zavisnosti efekata na kognitivne procese i gensku ekspresiju u raznim moždanim regionima (sumirano na Slici 47). U zavisnosti od korišćenog testa i protokola, doze koje dovode do blage ili izražene aktivacije $\alpha 5$ GABA_A receptora izazvale su efekte slične hormezi (efekti u obliku slova J ili invertnog slova J). Sa druge strane, umerena doza MP-III-022 nije izazvala nikakve bihevioralne efekte sem statističkog trenda u probnom testu dugotrajnog Morisovog vodenog lavirinta. Efekti u obliku slova J ili invertnog slova J su bili prepoznati u kratkotrajnom Morisovom vodenom lavirintu i probnom testu dugotrajnog Morisovog vodenog lavirinta, kao i u dugotrajnim testovima prepoznavanja objekta i socijalne diskriminacije, gde je visoka doza izazvala pogoršanje memorije, kao i u kratkotrajnom testu socijalne diskriminacije, gde je visoka doza dovela do poboljšanja memorije. Efekti nalik na hormezu su primećeni u kratkotrajnom testu prepoznavanja objekta, gde su niska i visoka doza izazvale oštećenje, odnosno poboljšanje memorije, kao i u akviziciji dugotrajnog Morisovog vodenog lavirinta, samo sa obrnutim uticajem ovih doza.

Doze i vreme	Ponašanje – testovi memorije			Nivo GABRA5 iRNK		
	Prostorna	Objekta	Socijalna	PFC	CA1	CA2
MP1 30 min		↓			↓	
MP10 30 min	↓	↑	↑			↑
MP1 24 h		+VEH ↑	+VEH ↑	↑		↑
MP10 24 h	↓	↓	↓	↑	↓	
MP1 24 h MP1 30 min	↑	↓	↓		↓	

Slika 47. Pregled bihevioralnih i Real-time PCR rezultata. MP=MP-III-022; 1=1 mg/kg; 10=10 mg/kg; VEH=vehikulum; PFC=prefrontalni korteks; tamnije strelice=statistički značajna razlika; svetlije strelice=razlike na nivou statističkog trenda.

U celini možemo videti da je dihotomija između blage i izražene pozitivne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora prepoznata u nekoliko šablona. Ovi nalazi jasno pokazuju da PAM-ovi mogu imati ili nepovoljan ili povoljan efekat na memorijske procese, u zavisnosti od korišćene doze i upotrebene procedure. Iako retki, podaci o takvim bifaznim efektima postoje u literaturi. Niska doza agoniste serotoninskog 1A receptora, 8-OH-DPAT, reverzirala je deficite u prepulsnoj inhibiciji i hiperlokomociji kod pacova tretiranih sa MK-801, dok je visoka doza ovog liganda smanjila prepulsnu inhibiciju, ali i povećala lokomociju (Bubeníková-Valesová i sar., 2007). Antagonist receptora za peptid oslobađanja gastrina (eng. *gastrin-releasing peptide receptor*, GRPR) posle injektovanja u dorzalni hipokampus u niskoj dozi je ošteti, a u visokoj dozi poboljšao memoriju u testu inhibitornog izbegavanja (Dantas i sar., 2006).

Rezultati dobijeni u akvizicionoj fazi Morisovog vodenog lavirinta su nas naveli da dodatno ispitamo efekte niske doze MP-III-022. Dugotrajni testovi prepoznavanja objekta i socijalne diskriminacije su imali primenu 1 mg/kg MP-III-022 ili rastvarača, ili kombinaciju oba u dve vremenske tačke. U ovim dodatnim testovima dupla doza MP-III-022 je dovela do oštećenja memorije. Ovakvi rezultati znače da je ponovljena slaba aktivacija $\alpha 5$ GABA_A receptora dovela do efekta koji je zavisio od tipa memorija – poboljšanje prostorne, ali pogoršanje memorije vezane za predmete i socijalne memorije. Dobijeni nalaz je u suprotnosti sa blagim poboljšanjem memorije primećenim kod grupa koje su primile 1 mg/kg MP-III-022 prvog dana, a potom rastvarač pre pozivanja memorije u dugotrajnim testovima prepoznavanja objekta i socijalne diskriminacije. Ove promene nisu primećene u

dugotrajnim verzijama ovih testova u kojima životinje drugog dana nisu primile nikakvu injekciju (posle 1 mg/kg MP-III-022 prvog dana). Stoga, deluje da je primećeno blago poboljšanje memorije u dugotrajnim testovima prepoznavanja objekta i socijalne diskriminacije posledica primene rastvarača životinjama koje su 24 h pre toga primile nisku dozu liganda. Postoji teorija da isti, specifičan stres koji se dogodio tokom učenja može da aktivira iste puteve koji su bili aktivirani prvi put i na taj način olakša pozivanje memorije (Joëls i sar., 2006). Primena injekcije može da se tumači kao stres koji je bio prisutan u ovim okolnostima. Međutim, ovaj efekat je moguće primetiti samo u MP-III-022 1/VEH grupi, tako da bi mogao biti povezan sa aktivacijom $\alpha 5$ GABA_A receptora.

Moguća hipoteza je da združeni efekat stresa i otiska prethodne slabe aktivacije $\alpha 5$ GABA_A receptora dovodi do poboljšanja memorije. Na primer, noradrenalin izazvan stresom dovodi do oslobađanja vazopresina iz paraventricularnog nukleusa hipotalamusa (Vacher i sar., 2002) u CA2 region, za šta je pokazano da dovodi do depolarizacije CA2 piramidalnih neurona i za posledicu ima poboljšanje socijalne memorije (Smith i sar., 2016). Poboljšanje pamćenja objekta i životinja je prikazano u našim rezultatima zajedno sa povećanjem GABRA5 nivoa u CA2. Stiče se utisak da, sami za sebe, stres od injekcije rastvarača i niska doza PAM-a, nisu dovoljni da izazovu promenu, ali možemo da postuliramo da oni rade zajedno u istom pravcu.

Za ovu teoriju su uzeti u obzir rezultati koji su na nivou statističkog trenda, ali nisu dostigli nivo statističke značajnosti. Tokom godina je bilo mnogo diskusije da p vrednosti iznad nivoa praga (0,05) zaista nude dokaz protiv nulte hipoteze, i da se ne mogu uzimati kao dokaz da nema efekta (Amrhein i sar., 2017). Dodatno, postoji uniforman obrazac dobijene aktivnosti MP-III-022 u svim testovima prepoznavanja objekta i socijalne diskriminacije, samo je kod nekih p vrednost bila iznad, a kod nekih malo ispod praga od 0,05. Ovo su razlozi zbog kojih smo odlučili da ne zanemarimo dobijene rezultate i posmatramo ih kao koherentan nalaz.

Pored testova memorije, ispitivali smo otisak iRNK GABRA5 u tri odabrana regiona mozga uzeta posle primene liganda (dobijene promene su prikazane na Slici 47). Opšta opservacija je da je osnovni nivo GABRA5 bio relativno nizak u prefrontalnom korteksu i CA2, i pokazivao je tendenciju da se poveća u okolnostima pozitivne modulacije $\alpha 5$ GABA_A receptora, dok je bazalni nivo u CA1 bio relativno visok i sklon smanjenju posle tretmana sa MP-III-022. Detektovani osnovni nivo ekspresije se slaže sa podacima u literaturi (Hörtnagl i sar., 2013), sem za CA2, ali naši rezultati se moraju uzeti sa rezervom u tom pogledu, s obzirom da smo uzimali samo deo celog regiona.

Promene u GABRA5 iRNK u prefrontalnom korteksu su se desile isključivo posle 24 h i samo u sprezi sa promenama u jednom od dva ispitivana regiona hipokampusu. Promene GABRA5 u prefrontalnom korteksu i CA2 se podudaraju sa normalizacijom prostorne memorije, dok se kombinacija promene ekspresije u prefrontalnom korteksu i CA1 dešavala kad i oštećenje prostorne memorije. Efekat promene nivoa iRNK u prefrontalnom korteksu, dodat na promene u hipokampusu, nije imao uticaja na pamćenje objekata i životinja. Uticaj prefrontalnog korteksa na prostornu memoriju nije iznenađujući kada se uzme u obzir da je prefrontalni korteks zadužen za donošenje odluka, dok hipokampus ima ključnu ulogu u kodiranju i pozivanju memorije. Za pacove kao vrstu, ova funkcija je neophodna za preživljavanje, pošto oni moraju da imaju izuzetnu prostornu memoriju i da koriste uskladištene podatke za uspešnu potragu za hranom i bežanje od neprijatelja, tj. da se brzo adaptiraju i donose blagovremene odluke (Yu i Frank, 2015).

Što se tiče naših nalaza u hipokampusu, promene u CA1 i CA2 se nikad nisu događale u isto vreme i bile su suprotne jedna drugoj u pogledu vremena i doze. Povećanje ekspresije GABRA5 u CA2 se dogodilo 30 min posle jake aktivacije i 24 h posle slabe aktivacije $\alpha 5$ GABA_A receptora. Sa druge strane, smanjenje iRNK GABRA5 u CA1 regionu je primećeno 30 min posle niske doze i 24 h posle visoke doze.

Ekspresione promene $\alpha 5$ GABA_A podjedinice detektovane u CA2 događale su se pod istim uslovima kao poboljšanje memorije za objekte i socijalne memorije, i pogoršanje prostorne memorije. Nasuprot tome, obrnute promene u CA1 su se desile kad i oštećenje memorije za objekte i socijalne memorije, i poboljšanje prostorne memorije. Naši rezultati se slažu sa poznatom ulogom CA2 u socijalnoj memoriji (Tzakis i Holahan, 2019). Kako je objekat jedina stvar koja se menja u našem testu prepoznavanja objekta, moguća veza između promena u CA2 i memorije za objekte može da bude

povezana sa otkrićem da je CA2 region osetljiv na male promene u opštem kontekstu okruženja (Alexander i sar., 2016, Wintzer i sar., 2014). Smatra se da CA1 region ima ulogu u pamćenju predmeta (Kersten i sar., 2019, Rampon i sar., 2000), dok je njegov uticaj na socijalnu memoriju otkriven skorije (Almeida-Santos i sar., 2019, Okuyama i sar., 2016, Zhang i sar., 2019). Što se tiče prostorne memorije, uloga CA1 je dobro poznata (Tsien i sar., 1996), dok funkcija CA2 nije smatrana toliko bitnom. Ipak, Donegan i saradnici (2020) su pokazali da hiperpolarizacija CA2 neurona kod Df(16)A^{+/-} miševa dovodi do deficita u socijalnom i kontekstualnom kodiranju, zajedno sa poboljšanom prostornom memorijom. Obrnuto, ponovno uspostavljanje normalne aktivnosti CA2 neurona, spašava socijalnu i kontekstualnu memoriju, uz vraćanje na manje precizne prostorne signale (Donegan i sar., 2020). Ovo razdvajanje prostorne i memorije za predmete/životinje pruža dodatnu podršku našim rezultatima, pošto smo mi otkrili sličan fenomen u našim eksperimentima.

Jedno od ograničenja naše studije je činjenica da nismo određivali nivo proteina, i još bitnije sa tačke gledišta funkcije, nivo receptora. Imajući u vidu da su iste doze i vremenske tačke primene i ispitivanja dovodile do promena i u ponašanju i ekspresiji GABRA5, možemo da pretpostavimo da je promena iRNK bila prenetna na promenu u količini proteina, a potom i u nivou receptora. Ovu hipotezu podržavaju studije koje su pokazale da nivoi $\alpha 5$ podjedinice i $\alpha 5$ GABA_A receptora u ćelijskoj membrani prate promene u ekspresiji iRNK GABRA5 (Luscher i sar., 2011, Provenzano i sar., 2020, Tan i sar., 2011). Dodatno, skorašnja studija (Lorenz-Guertin i sar., 2019) je pokazala da primena benzodiazepina dovodi do modifikacije sastava GABA_A receptora i specifičnog povećana $\alpha 5\beta\gamma 2$ receptora u korteksu. Ovo pruža dodatnu podršku ideji da naš ligand, koji se vezuje za benzodiazepinsko mesto vezivanja i selektivan je za $\alpha 5\beta\gamma 2$ receptore, može da dovede do promena u nivou receptora istog podtipa.

Imajući u vidu naše rezultate i postojeću literaturu, možemo izneti teoriju koja bi objasnila i povezala dobijene bihejvioralne i molekularne rezultate. Pokazano je da su $\alpha 5$ GABA_A receptori prisutni na piramidalnim neuronima i interneuronima u prefrontalnom korteksu i CA1 regionu (Hu i sar., 2018, Magnin i sar., 2019). Što se tiče CA2 regiona, može se pretpostaviti da je opšta ćelijska lokalizacija $\alpha 5$ GABA_A receptora slična onoj u CA1 regionu (Mercer i sar., 2007). Pošto je aktivacija CA2 piramidalnih neurona neophodna za socijalnu memoriju (Meira i sar., 2018, Smith i sar., 2016) i da ide ruku pod ruku sa pogoršanjem prostorne memorije (Donegan i sar., 2020), možemo pretpostaviti da se i u našem eksperimentu dešava ekscitacija ovih neurona. Ukoliko je primećen porast GABRA5 u CA2 regionu doveo do povećanog nivoa $\alpha 5$ GABA_A receptora, takva promena na interneuronima bi dovela do njihove inhibicije. Samim tim, inhibicija piramidalnih neurona od strane interneurona bi bila smanjena, što bi omogućilo njihovu lakšu depolarizaciju. Nasuprot tome, depolarizacija CA1 regiona dovodi do poboljšanja prostorne memorije (Epsztein i sar., 2011). Pošto se to događa u našem eksperimentu pod istim uslovima kad i smanjenje nivoa iRNK GABRA5, možemo pretpostaviti da je nivo $\alpha 5$ GABA_A receptora smanjen kod piramidalnih neurona, što dovodi do supresije inhibicije i posledično do olakšane depolarizacije. Međutim, dok ovo može da objasni efekat na prostornu memoriju, za sad nema objašnjenja kako promena u CA1 regionu može negativno da utiče na socijalnu i memoriju za objekte.

Ova studija je pokazala da je varijabilnost uloge $\alpha 5$ GABA_A receptora velika i zavisi od njihovog nivoa ekspresije i lokalizacije, od tipa i protokola kognitivnog zadatka, i od vremena farmakološkog testiranja i modulacije. Dobijeni rezultati su dokaz potencijalnog povoljnog dejstva MP-III-022, te smo stoga odlučili da ispitamo efekte ovog liganda na animalni model autizma.

5.2. Mišji model ASD-a

Ispitali smo validnost sličnosti spontanog genetičkog modela ASD-a, BTBR soja miševa. Pregled rezultata i njihova paralela sa karakteristikama primećenim kod ASD-a je data na Slici 48.

Po zalučivanju miševa ustanovili smo da ispunjavaju neurološke predušlove da uđu u dalje testiranje. Ustanovljena razlika u masi je dobro poznata i u skladu sa literaturom, da su BTBR miševi veći od C57BL miševa (Reed i sar., 2007), kao i da su mužjaci veći od ženki (Reed i sar., 2007).

U prvom testu, ispitivanju socijalne interakcije, dobijen je neočekivan rezultat: juvenilni BTBR miševi su pokazali izrazitu socijabilnost, veću od kontrolnog soja, što nije u skladu sa prethodnim nalazima (McFarlane i sar., 2008). Iako opisane procedure za ovu paradigmu veoma variraju, u pogledu potrebe i dužine socijalne izolacije, habituacije, vremena izvođenja testa, praćenja para nasuprot praćenja jedinke, ispitivanih parametara, itd., smatramo da bi sama modifikacija protokola eventualno mogla da prikrije postojeći deficit, ali ne i da dâ potpuno suprotne rezultate. Dodatno, naš protokol je sličan prethodno korišćenim (Bales i sar., 2014, Yang i sar., 2012), a autori ovih radova su dobili smanjenu socijabilnost BTBR miševa. Međutim, upotreba istog protokola tokom P90 je pokazala socijalne deficite BTBR mužjaka, konkretno, smanjeno vreme u njušenju anogenitalne regije, što je u skladu sa prethodno pomenutom studijom (Yang i sar., 2012), ali u suprotnosti sa objavljenim nalazom da je upravo ovaj parametar povećan kod adultnih BTBR mužjaka (Defensor i sar., 2011). Jasno je da rezultati o socijabilnosti BTBR miševa nisu jednoznačni i da zahtevaju još ispitivanja. Sa stanovišta naših rezultata, BTBR miševi nisu ispunili validnost sličnosti za kriterijum A ASD-a, socijalne deficite, kao ni za kriterijum C, a to je da su deficiti prisutni od detinjstva.

Što se tiče praćenih ne-socijalnih parametara, povećano timarenje juvenilnih BTBR miševa, odraslih BTBR ženki i sinhrono ponavljajuće kopanje juvenilnih BTBR mužjaka (ponašanje nazvano kao gusenično kretanje, eng. *inchworming*) u skladu je sa postojećom literaturom (Pobbe i sar., 2010, Smith i sar., 2014), i odgovara kriterijumu B ASD-a, repetitivnim oblicima ponašanja. Što se tiče smanjene prisutnosti ovih ponašanja kod adultnih miševa, postavlja se pitanje da li to odgovara opservacijama u humanoj populaciji sa ASD-om. Nedostatak istraživanja humane populacije je što najveći broj studija ima decu kao ispitanike, a mali broj studija koje jesu ispitivale adultnu i/ili stariju populaciju, veoma varira u broju i uzrastu ispitanika. Za sada, postojeće studije jesu pokazale da pacijenti tokom života razvijaju strategije kojim umanjuju manifestacije simptoma ASD-a (Happé i sar., 2016, Howlin i sar., 2013), pogotovo odrasli pacijenti u pogledu repetitivnih i restriktivnih ponašanja (Seltzer i sar., 2003), tako da bi se moglo reći da se opisani nalaz kod BTBR miševa slaže sa onim u humanoj populaciji.

BTBR miševi oba uzrasta su pokazali da su manje anksiozni u odnosu na kontrolne miševe u testu uzdignutog plus lavirinta. Ovaj nalaz jeste u skladu sa prethodno objavljenim studijama (Chadman, 2011, Moy i sar., 2007), ali ne odgovara činjenici da je anksioznost veoma čest komorbiditet (oko 40%) u populaciji ljudi sa ASD-om (Zaboski i Storch, 2018).

Daljim ispitivanjem ustanovljeno je da juvenilni BTBR miševi prelaze veće distance zahvaljujući većoj brzini u testu spontane lokomotorne aktivnosti. Dobijeni rezultat je u skladu sa prethodnim studijama (McFarlane i sar., 2008, Zhang i sar., 2019). Potencijalni problem je nalaz da je samo vreme provedeno u aktivnosti manje kod BTBR mužjaka. Ovaj parametar je retko ispitivan kod BTBR miševa, pa ne postoji veliki broj studija sa kojima možemo da poredimo svoje nalaze. Ono što jeste prisutno u literaturi ukazuje na povećano vreme provedeno u aktivnosti kod BTBR miševa (Zhang i sar., 2019), što je u suprotnosti sa našim nalazom. Ako ovaj parametar gledamo kao način da ispitamo primećenu hiperaktivnost kod dece sa ASD-om (Yerys i sar., 2009), možemo onda zaključiti da BTBR miševi ne ispunjavaju taj uslov. Međutim, činjenica da se BTBR miševi brže kreću tokom vremena kada jesu aktivni (iako ne provode više vremena u aktivnosti u poređenju sa C57BL miševima) upućuje da poseduju određenu pojačanu reaktivnost, koja bi se mogla smatrati osobinom koju poseduju pacijenti sa ASD-om kao posledicom otežane emocionalne regulacije (Mazefsky i White, 2014). Naše dalje ispitivanje je pokazalo da, kada odrastu, BTBR miševi više nemaju izraženu ovu osobinu, što je u skladu sa prethodnim zapažanjem ublažavanja simptoma odrasle populacije (Happé i sar., 2016, Howlin i sar., 2013), ali nije sa dostupnom literaturom o adultnim BTBR

miševima, pogotovo naš nalaz da je kod BTBR ženki čak došlo do smanjene aktivnosti (Amodeo i sar., 2019, Jasien i sar., 2014, O'Connor i sar., 2021).

Sličan nalaz je dobijen i sa praćenjem parametra vremena provedenog u timarenju: juvenilni BTBR miševi provode više vremena u timarenju, što se slaže sa prethodno objavljenim radovima (McFarlane i sar., 2008), dok ta razlika nije pokazana kod odraslih miševa, što ne odgovara literaturi (Amodeo i sar., 2019, O'Connor i sar., 2021). Ovo je svojevrsna potvrda rezultata dobijenih praćenjem istog parametra u testu socijalne interakcije, sem što u toj paradigmi odrasle BTBR ženke i dalje pokazuju povećano timarenje. Takav rezultat pokazuje da je moguće da bi modifikacija procedure (svetla, trajanja itd.) mogla da otkrije povećano timarenje i kod odraslih BTBR mužjaka. U svakom slučaju, prisustvo pojačanog timarenja kod juvenilnih pacova je paralela repetitivnom obliku ponašanja kao pacijenata sa ASD-a, a ublažavanje simptoma kod odraslih jedinki može da odgovora prethodno pomenutim nalazima u ljudskoj populaciji.

Što se tiče drugog praćenog oblika repetitivnog ponašanja, još jednom je potvrđena prisutnost ove karakteristike: juvenilne BTBR ženke su pravile više rotacija, i BTBR soj je generalno imao više rotacija u smeru suprotnom od kazaljke na satu u istom periodu, dok su u adultnom periodu oba pola BTBR soja imala više rotacija ponovo u smeru suprotnom od kazaljke na satu. Ovakav rezultat, razlika u broju rotacija određenog smera, i to baš smera suprotnom kazaljci sata, odgovara nalazu dobijenom tokom ispitivanja drugog mišjeg modela autizma (Grabrucker i sar., 2017). Autori te studije tvrde da ta osobina predstavlja posledicu povećane asimetrije među hemisferama, koja je prisutna kod pacijenata sa ASD-om (Floris i sar., 2013, Lindell i Hudry, 2013). Međutim, direktnim poređenjem zastupljenosti ova dva tipa rotacija među ispitivanim grupama, oba uzrasta, otkriveno je da nijedna grupa, pa ni BTBR mužjaci i ženke, nisu imali preferenciju ka jednoj strani.

Test tri prostorije je sproveden da bismo istu karakteristiku ispitali kroz dve paradigme, kako se i savetuje za uspostavljanje validnosti sličnosti animalnog modela: ako je isti smer poremećaja zastupljen u oba testa, onda je interpretacija rezultata veoma jaka (Crawley, 2007). Ovaj test je potvrdio naše nalaze dobijene u juvenilnom testu socijalne interakcije, da su BTBR miševi socijalniji od C57BL miševa. Šta više, u testu tri prostorije ovaj nalaz je potvrđen i kod adultnih životinja, za razliku od testa socijalne interakcije. Ovakvi rezultati uopšte nisu u skladu sa postojećom literaturom (McFarlane i sar., 2008, Moy i sar., 2007, Cope i sar., 2021). Iako postoje razlike u proceduri između prethodnih studija i naše (prisustvo praznih kaveza tokom habituacije i stavljanje igračkice tokom testiranja socijalnosti), kao i za test socijalne interakcije, ovo ne bi moglo da bude jedino objašnjenje za dobijanje potpuno suprotnih rezultata od očekivanih. Dodatno, čak i u pomenutoj studiji (Moy i sar., 2007) poređenjem samog vremena koje su BTBR miševi provodili njušeci miša nasuprot predmetu, dobijeno je da su više vremena njušili miša. Takođe, kad su se za miša-objekta upotrebljavali C57BL miševi, kao što je bilo u našem slučaju, BTBR miševi su provodili više vremena sa njima nego sa predmetom (Ryan i sar., 2019, Yang i sar., 2012). Dodatno, BTBR miševi su provodili više vremena pored žičanog kaveza koji je imao samo miris miša u poređenju sa kavezom bez mirisa (Yang i sar., 2012). Sve ovo pruža validnost našim rezultatima. Izražena socijalnost juvenilnih BTBR miševa, potvrđena kroz dve potpuno različite paradigme u našoj studiji, definitivno dovodi do zaključka da BTBR soj ne ispunjava kriterijume A i C za uspostavljanje dijagnoze ASD-a.

Što se tiče socijalne memorije, nije pokazano da BTBR miševi raspoznaju starog od novog miša. Tu se ni podaci u literaturi ne slažu, pošto ima pokazatelja da BTBR miševi imaju intaktnu socijalnu memoriju (Zilkha i sar., 2017), ali i da im je oštećena (Cope i sar., 2021, O'Connor i sar., 2021). Međutim, u našem eksperimentu ni C57BL miševi ne prave razliku između starog i novog miša, sasvim moguće zbog naših modifikacija procedure, tako da se ne mogu iznositi tvrdnje o socijalnoj memoriji BTBR soja.

Što se tiče prostornog učenja, juvenilni BTBR miševi su pokazali podjednako dobro izvođenje u *cue* fazi kao i C57BL životinje, čime možemo da potvrdimo da BTBR miševi nisu imali problema sa vidom ili motornim funkcijama. U nastavku testa se jasno pokazalo da BTBR miševi, pre svega mužjaci, sporije uče od C57BL životinja, i da čak i u probnom testu nisu dostigli nivo C57BL miševa. Takvo ponašanje se nastavilo i tokom reverznog dela testa, i akvizicije i probnog testa. Što se tiče

odraslih životinja, dobijeni rezultati ukazuju na lošije izvođenje BTBR životinja i u *cue* fazi. Međutim, testiranje je nastavljeno, i pored pokazanog lošijeg učenja, pogotovo ženki, u obe akvizicije, i BTBR životinje su uspevale da dostignu nivo C57BL životinja u probnim testovima. Time se pokazalo da BTBR miševi nemaju vizuelni i/ili motorni deficit. Mora se spomenuti da su BTBR miševi imali tendenciju da skaču sa obeležene platforme nazad u vodu, a test se nije zaustavljao dok nisu stajali na njoj bar 5 s, što je moglo da utiče na ovakav rezultat u *cue* fazi. I juvenilne i odrasle BTBR životinje su se više puta vraćale u zonu prethodnog ciljnog regiona.

Naš nalaz o generalno lošem prostornom učenju je u suprotnosti sa nekim radovima koji ukazuju da BTBR miševi imaju normalnu sposobnost za prostorno učenje (Moy i sar., 2007, Yang i sar., 2012). Međutim, njihovi rezultati pokazuju da je BTBR soju trebalo više vremena da nađe platformu. Takođe postoje neslaganja u njihovim nalazima što se tiče reverznog učenja, što otežava da se dođe do jasnog zaključka povodom ove sposobnosti kod BTBR miševa. Sa druge strane su studije koje su potvrdile naše nalaze, da je prostorno snalaženje navođeno ciljem značajno oštećeno kod BTBR soja miševa po nizu parametara (Faraji i sar., 2018). Slično ovoj studiji, Stover i saradnici su pokazali nešto što je primećeno i u našem eksperimentu, a to je da je BTBR soj koristio proceduralne strategije za pronalazak platforme više nego drugi sojevi, uključujući i C57BL (Stover i sar., 2012). Proceduralna strategija podrazumeva da miševi prave petlje, odnosno kružne putanje na razdaljini od zida bazena sličnoj onoj gde je platforma pozicionirana, prolazeći kroz najmanje dva susedna kvadranta pre pronalaska željene platforme. S time se možda može uvezati i dobijena tendencija BTBR miševa da plivaju duž ivice bazena, odnosno pojava tigmotaksije, koja je pokazatelj da životinja ne rešava problem. Učestala tigmotaksija ukazuje da eksperimentalna životinja nije fokusirana na zadatak na odgovarajući način, pošto jedna od prvih stvari koje životinja treba da nauči je da ne postoji izlaz iz bazena duž njegovih zidova. Kada nauče da je tako, većina životinja otpliva od ivice bazena tražeći drugi izlaz i na kraju pronalazi platformu. Neshvatanje da je ovo potreban pristup ukazuje da eksperimentalna životinja nije na odgovarajući način svesna svog okruženja. Ovo, kao i skakanje sa platforme u vodu, upućuje da životinja ima problem sa senzomotornom interferencijom, koji bi uticao na to da životinja uopšte prepozna da je platforma cilj (Vorhees i Williams, 2006). I drugi istraživači (Wahlsten i sar., 2005) su takođe dobili da BTBR miševi dobro plivaju i da često skaču sa platforme ili urone nazad u vodu bez uticaja eksperimentatora. Ovaj soj ne pokazuje „divlje ponašanje“ niti je težak za rukovanje. Podaci upućuju da je njihova motivacija za izbegavanje kontakta sa vodom niža nego kod ostalih sojeva, ili kao što je prethodno naglašeno, moguće je da imaju potrebu za konstantnom aktivnošću i da ne mogu dugo da se zadrže na jednom mestu.

Literatura daje nejasne odgovore oko toga da li BTBR miševi pokazuju deficit u učenju; rađeni su različiti testovi sa različitim zahtevima od eksperimentalnih životinja i teško je pronaći odgovarajuću vezu i doći do definitivnih zaključaka. Pored pomenutih rezultata dobijenih u Morisovom vodenom lavirintu, koji je test instrumentalnog ili operantnog učenja (asociranje bega sa platformom) i prostornog učenja zavisnog od hipokampusu (učenje lokacije platforme), rađeni su i drugi testovi. Grupa istraživača (McTighe i sar., 2013) je testirala vreme serijske reakcije u zadatku 5 izbora (eng. *5-choice serial reaction time task*), što je test koji je motivisan apetitom i ima značajno manju lokomotornu komponentu, za razliku od Morisovog vodenog lavirinta. Autori su našli da je moguće da BTBR miševi imaju blage deficite u instrumentalnom učenju, lošije održavaju pažnju u odnosu na C57BL, kao i to da imaju opšti motivacioni deficit. Do istog zaključka su došle i druge grupe (Martin i sar., 2014). Moguće je da ovo donekle može da objasni i njihovo pomenuto ponašanje u Morisovom vodenom lavirintu, koje izgleda kao nedostatak motivacije da pobegnu iz bazena. Dodatno, pomenute grupe (McTighe i sar., 2013, Wahlsten i sar., 2005) su dobile da su BTBR miševi imali znatno veća variranja nalaza u populaciji u poređenju sa C57BL miševima, što se slaže i sa našim rezultatima. Time se povećava mogućnost da se dokazi za značajne deficite u učenju maskiraju zbog varijabilnosti.

Sve pomenuto čini veoma otežanim tumačenje rezultata dobijenih u reverziji (povećano vraćanje u zonu prethodnog ciljnog regiona, kao potvrda kognitivne rigidnosti i restriktivnih obrazaca ponašanja). Uz postojanje drugih deficita koji bi mogli da bar delimično doprinesu ovakvom nalazu, nije moguće sa sigurnošću tvrditi da je dobijeni rezultat potvrda kriterijuma B za dijagnozu ASD-a.

Međutim, iako je teško dati uniformnu sliku prostornog snalaženja i pamćenja kod pacijenata sa ASD-om, postoje dokazi da je ta sposobnost oštećena u ovoj grupaciji (Lind i sar., 2013). U tom aspektu može se reći da ponašanje BTBR miševa odgovara onom u humanoj populaciji pacijenata.

Što se tiče razlike u polu, zanimljivo je da su juvenilne ženke imale bolje izvođenje zadatka od mužjaka, dok je obrnuto bilo pokazano u adultnom periodu, pre svega kod BTBR soja. Ovakav rezultat je u skladu sa tim da nivo estradiola kod ženki miševa postepeno raste, ali da adultni nivo dostiže tek posle 48. dana starosti (Vetter-O'Hagen i Spear, 2012). Pokazano je da tokom proestrusa, ili nakon davanja injekcija estradiola, ženke miševa imaju lošije rezultate u testovima prostornog učenja koji se zasnivaju na begu iz vode, a koji zavise od funkcije hipokampusu. Čak su anatomija i fiziologija hipokampusu izmenjene nivoima estradiola ili estrogenskim tretmanima, što upućuje na mogući neurobiološki supstrat za efekte estrogena na prostorno učenje i pamćenje (Fugger i sar., 1998).

Naši rezultati ukazuju da BTBR miševi nemaju poremećenu olfaktornu diskriminaciju, čak je i bolja kod juvenilnih BTBR mužjaka u odnosu na C57BL mužjake. Rezultati dostupni u literaturi su opet pomešani: da miševi mogu da nađu zakopanu hranu (Moy i sar., 2007), ali da ne razlikuju socijalne mirise različitih miševa partnera (Yang i sar., 2012). Iako ovo nije ključna karakteristika bolesti, naš nalaz ipak nije u skladu sa nalazima dobijenim ispitivanjem populacije sa ASD-om koji ukazuju na poremećenu percepciju mirisa (Koehler i sar., 2018, Rozenkrantz i sar., 2015).

Na kraju, vid socijalne komunikacije, obeležavanje teritorije, pokazao je da je od svih ispitivanih životinja samo trećina C57BL mužjaka obeležila teritoriju. Sasvim je moguće je da bi se primenom procedure koja se najčešće primenjuje za ispitivanje ovog ponašanja (Wöhr i sar., 2011), tj. izlaganje suprotnom polu, otkrile izraženije razlike. No, za ovo validiranje animalnog modela nismo hteli da dovodimo životinje u kontakt sa suprotnim polom, pošto je to dodatni nivo socijalnog ponašanja; hteli smo da vidimo kako bi se životinje ponašale takve kakve jesu i u slučaju da naiđu na tragove životinje istog pola. Međutim, činjenica da su jedino C57BL obeležavali teritoriju, iako je taj procenat relativno mali, a da nijedna BTBR životinja nije obeležila teritoriju, upućuje da je moguće postojanje poremećaja socijalne komunikacije, što je u skladu sa prethodno objavljenim studijama (Wöhr i sar., 2011), i takođe odgovara kriterijumu A za dijagnozu ASD-a.

Ispoljeni poremećaji kod BTBR soja su generalno posmatrano bili zastupljeni podjednako u oba pola, tj. nisu pokazana brojnija ili izraženija oštećenja kod mužjaka, kao što je to prisutno u ljudskoj populaciji (Baron-Cohen i sar., 2011).

Uzimajući sve dobijene rezultate u obzir, smatrali smo da BTBR soj ne ispunjava dovoljno kriterijuma da bi zadovoljio validnost sličnosti sa ASD-om i odlučili smo da ga nećemo dalje koristiti.

Karakteristika	Test	BTBR model						Valproatni model									
		P30			P90			P30			P90						
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F				
Socijalni deficiti	Socijalna interakcija	×	×	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	
	Socijalna komunikacija	×	×	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	
Repetitivni i restriktivni oblici ponašanja	Timarenje	✓	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓
	Rotacije	—	✓	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	
	Kopanje	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Restriktivni	Reverzni Morisov vodeni lavirint	✓?	✓?	✓?	—	✓?	—	✓?	—	✓?	—	✓?	—	✓?	—	✓?	
	Uzdignuti plus lavirint	×	×	×	—	×	—	×	—	×	—	×	—	×	—	×	
Anksioznost		×	×	×	—	×	—	×	—	×	—	×	—	×	—	×	
Hiperaktivnost	Test spontane lokomotorne aktivnosti	×/✓	×/✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Smanjena olfaktorna diskriminacija	Test olfaktorne diskriminacije	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Preterana nejednakost u hemisferama	Odnos rotacija	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Oštećeno prostorno učenje	Standardni Morisov vodeni lavirint	✓	✓	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	✓	
Oštećeno socijalno učenje	Test tri prostorije	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Jača pogodnost mužjaka		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Slika 48. Pregled i upoređivanje bihevioralnih rezultata dobijenih ispitivanjem dva modela ASD-a po njihovoj sličnosti sa karakteristikama ovog poremećaja. P=postnatalni dan, M=mužjaci, F=ženke.

5.3. Pacovski model ASD-a

Rezultati ispitivanja validnosti sličnosti valproatnog animalnog modela sa ASD-om dati su na Slici 48.

Pokazano je da je ubrizgavanje natrijum valproata u dozi od 500 mg/kg tokom trudnoće ženki dovelo do njihovog manjeg dobijanja na masi, ali uprkos tome nije dovelo da statistički značajnog gubitka broja mladunaca. Takođe, nije bile razlike ni u masi ni u neurološkom razvoju između mladunaca prenatalno tretiranih valproatom i kontrolnih mladunaca, što znači da te karakteristike nisu mogle da maskiraju dobijene efekte u testovima ponašanja. Naši rezultati su potvrđeni studijom koja je poredila prenatalnu primenu doze od 600 mg/kg, kao prvo uvedene za ovaj animalni model (Schneider i

Przewłocki, 2005) i manje doze, od 500 mg/kg, i došli su do istih zaključaka kao i mi: dok je 600 mg/kg dovelo do značajne resorpcije fetusa i oštećenja mladunaca, 500 mg/kg nije dovelo ni do jedne statistički značajne razlike između tretirane i kontrolne grupe (Favre i sar., 2013). Dodatno, ova studija nije našla ni razliku u masi trudnih ženki, ali ova diskrepanca može biti objašnjena njihovim analiziranjem apsolutne mase (a ne procenta dobijene) i to samo 3 dana tokom trudnoće, za razliku od nas.

Praćenje socijalne interakcije je pokazalo da se juvenilni VPA mužjaci manje igraju u odnosu na CTRL mužjake. Drugi socijalni parametri nisu pokazali razlike. Ovo je u skladu sa pređašnjom literaturom (Schiavi i sar., 2019, Schneider i Przewłocki, 2005). Nalaz da ženke provode manje vremena u igranju se takođe slaže sa prethodnim studijama (Argue i McCarthy, 2015). VPA ženke nisu pokazale tako jasne razlike u odnosu na kontrolne, kao što je to bio slučaj sa mužjacima. Ispitivanje u adultnom periodu je pokazalo produblјivanje razlika, gde su sad VPA životinje, pre svega mužjaci, ispolјjavali smanjeno socijalno ponašanje po većem broju parametara, što odgovara prethodnim studijama (Markram i sar., 2008). Dobijeni socijalni deficit odgovara kriterijumu A za uspostavlјanje dijagnoze ASD-a, a nalaz da su se javili u juvenilnom dobu odgovara kriterijumu C. Dodatno, iako je prethodno rečeno da postoji ublažavanje simptoma tokom života pacijenata sa ASD-om (Happé i sar., 2016), čak i socijalnih (Piven i sar., 1996), takođe postoje studije koje tvrde da u ovom konkretnom domenu, pacijenti mogu čak da imaju više problema kao odrasli ljudi u poređenju sa time kada su bili adolescenti (Howlin i sar., 2013, Seltzer i sar., 2003). Naši rezultati pokazuju izvesnu sličnost sa ovim nalazima.

Što se tiče ne-socijalnog parametra, vremena provedenog u timarenju, juvenilni VPA pacovi i odrasli VPA mužjaci su pokazali ovo ponašanje izraženije, što odgovara prethodnim studijama (Zamberletti i sar., 2019), i takođe predstavlјa paralelu sa repetitivnim ponašanjem kod pacijenata sa ASD-om (kriterijum B).

Dobijena povećana anksioznost i juvenilnih i odraslih VPA pacova je u skladu sa prethodnim radovima (Chen i sar., 2014, Markram i sar., 2008, Servadio i sar., 2016), kao i sa studijama sa pacijentima sa ASD-om (Zaboski i Storch, 2018).

Praćenje spontane aktivnosti nije otkrilo promenu u vremenu provedenom u aktivnosti, pređenoj distanci i brzini, sem kod VPA adultnih ženki koje su imale veću brzinu i pređenu distancu u odnosu na kontrolne ženke. Ovde je postojeća literatura podeljena, jer postoje studije koje pokazuju povećanu lokomociju VPA životinja (Bringas i sar., 2013, Kumar i Sharma, 2016, Wu i sar., 2018), ali i oni koji kao i mi nisu dobili razlike (Banerjee i sar., 2014), ili čak dobili smanjenu lokomociju (Kerr i sar., 2013). Dobijeni rezultat se ne slaže sa nalazima u ljudskoj populaciji, koji ukazuju na hiperaktivnost pacijenata sa ASD-om (Yerys i sar., 2009). Međutim, nalazi kod VPA adultnih ženki potencijalno upućuju na pojačanu reaktivnost, što jeste odlika ASD pacijenata (Mazefsky i White, 2014). Dodatno, test spontane lokomotorne aktivnosti je otkrio povećano timarenje samo kod VPA ženki (oba uzrasta), za razliku od testa socijalne interakcije koji ga je otkrio kod oba pola. Ovo jasno ukazuje na poremećaje kod VPA ženki, ali i potencijal da bi se modifikacijom protokola oni otkrili i kod VPA mužjaka. Što se tiče drugog praćenog parametra, broja rotacija, i pogotovo broja rotacija u smeru kazaljke na satu, pokazano je da VPA juvenilni mužjaci i VPA odrasle životinje oba pola imaju ovo ponašanje izraženije u odnosu na CTRL pacove; pored toga, VPA odrasle ženke imaju i povećani broj rotacija u smeru suprotnom kazaljci na satu. Dobijeni rezultati u pogledu timarenja (u testu socijalne interakcije i testu spontane lokomotorne aktivnosti) i broja rotacija, nedvosmisleno pokazuju prisustvo repetitivnog ponašanja kod VPA životinja, što ispunjava kriterijum B dijagnoze ASD-a, i to u oba perioda, što ispunjava kriterijum C. Dodatno, preferencija za smer rotacija je pokazana isključivo kod juvenilnih VPA mužjaka, i može se objasniti pojačanom asimetrijom hemisfera prisutnom kod ASD pacijenata (Grabrucker i sar., 2017).

Rezultati dobijeni u testu socijalne interakcije su potvrđeni u testu tri prostorije i zajedno daju jak dokaz manje socijalnosti VPA životinja oba uzrasta, što je u skladu sa prethodno objavlјenim studijama (Bambini-Junior i sar., 2011, Dai i sar., 2018) i, kao što je već rečeno, odgovara kriterijumu A i kriterijumu C.

Što se tiče socijalne memorije, otkriveno je da je ona oštećena kod juvenilnih VPA mužjaka i donekle ženki, dok kod odraslih životinja jedino VPA ženke nisu pravile razliku između poznatog i novog pacova. Prethodne studije daju raznolike rezultate: kod nekih juvenilni VPA pacovi prepoznaju novog pacova (Dai i sar., 2018), dok se drugi slažu sa našim nalazima smanjene socijalne memorije (Bambini-Junior i sar., 2014). Zanimljivo, ali ista grupa je u drugom radu potvrdila i naš drugi nalaz, da adultni VPA mužjaci prepoznaju novog pacova (Bambini-Junior i sar., 2011). Kao što je pre spomenuto, poboljšanje simptoma tokom odrastanja, pre svega kognitivnih (Happé i sar., 2016), ali čak i socijalnih (Piven i sar., 1996), ima uporišta u humanoj populaciji.

Teško je sa sigurnošću iznositi zaključke o specifično socijalnoj memoriji pacijenata sa ASD-om, s obzirom na neujednačen profil generalne sposobnosti pamćenja u ovoj populaciji, kao i ozbiljnosti njihovih simptoma. Od više različitih parametara socijalne memorije koji su praćeni, može se reći da je pamćenje lica bar u nekoj meri oštećeno kod pojedinaca sa ASD-om (Webb, 2008). Ovakav nalaz donekle može da predstavlja sličnost sa našim rezultatima sa valproatnim animalnim modelom.

Morisov vodeni lavirint je otkrio da VPA juvenilne životinje i VPA odrasli mužjaci sporije i teže uče u odnosu na kontrolne pacove. Međutim, po manje izraženoj razlici u perifernom putu u odnosu na onu pokazanu kod BTBR miševa, kao i po rezultatima u probnom testu koji pokazuju da dostižu nivo CTRL životinja, možemo zaključiti da VPA životinje imaju sposobnost prostornog učenja. Oštećeno prostorno učenje jeste i pre pokazano kod VPA pacova (Hou i sar., 2018, Rajizadeh i sar., 2019) i prisutno je u populaciji sa ASD-om (Southwick i sar., 2012). Ipak, s obzirom da VPA pacovi imaju razumevanje šta je cilj testa i vremenom izlaze iz periferije i traže platformu, možemo zaključiti da je nalaz povećanog vraćanja u prethodnu ciljnu regiju u reverznom testu (u oba uzrasta i oba pola) bar delimično posledica restriktivnog obrasca ponašanja. Tako da možemo zaključiti da ispunjavaju drugi deo kriterijuma B, kognitivnu rigidnost, i pošto je takvo ponašanje prisutno od juvenilnog perioda, ispunjavaju i kriterijum C. Sličan nalaz kognitivne rigidnosti je dobijen ispitivanjem VPA pacova u Y/T lavirintu (Kumar i Sharma, 2016, Mirza i Sharma, 2019, Wang i sar., 2019).

Nije ustanovljena razlika u olfaktornoj diskriminaciji tokom P10, što nije u skladu sa prethodnim ispitivanjem (Favre i sar., 2013) po kojoj je VPA mužjacima trebalo više vremena da dođu do svoje šuške. Moguće je da razlika nije otkrivena u našem slučaju pošto u tom periodu nismo razdvajali životinje po polovima i uzimali smo jednu prosečnu vrednost za celo leglo. Razlika je jasno pokazana kod adultnih pacova, i to pogotovo smanjena olfaktorna diskriminacija VPA mužjaka. Nije bilo moguće naći radove koji su ispitivali ovu karakteristiku kod VPA odraslih pacova. Jedna studija, rađena na valproatnom mišjem modelu, pokazala je da odrasli VPA miševi imaju poremećaj u olfakciji socijalnih mirisa (Campolongo i sar., 2018), što je svojevrsna potvrda naših rezultata, a predstavlja i sličnost sa poremećenom percepcijom mirisa pacijenata sa ASD-om (Koehler i sar., 2018, Rozenkrantz i sar., 2015).

Pored smanjenog obeležavanja teritorije od strane ženki u odnosu na mužjake, što je donekle očekivano s obzirom na razvijeniji vid ovog ponašanja kod mužjaka (Brown, 1977), nismo dobili razliku između pacova različitih prenatalnih tretmana, što nije u skladu sa već objavljenim radovima (Harding i sar., 2021). VPA mužjaci potencijalno pokazuju tendenciju, bližeći se statističkom trendu. Možda bi modifikovanje protokola pomoglo da se otkriju potencijalne razlike. Za sada, nema potvrde poremećaja u socijalnoj komunikaciji, delu kriterijuma A.

Posmatrajući u celini prisutnost karakteristika ASD-a koje su bile zastupljene samo kod jednog pola, vidimo da VPA adultne ženke pokazuju hiperlokomociju i oštećenu socijalnu memoriju, dok se juvenilni VPA mužjaci manje igraju i imaju preferenciju u smeru rotacija, a odrasli VPA mužjaci imaju oštećeno prostorno učenje i olfaktornu diskriminaciju. Jasno je da mužjaci imaju povećan broj ASD karakteristika, kao i to da se samo kod njih određeni poremećaji javljaju u juvenilnom periodu. Ovi rezultati se donekle slažu sa nalazom da VPA mužjaci imaju više stereotipija i usporeno izvođenje zadatka u T lavirintu (Mychasiuk i sar., 2012, Raza i sar., 2015). Sve zajedno ovo implicira da postoji određena tendencija mužjaka u odnosu na ženke da više razviju fenotip koji liči ASD-u u valproatnom animalnom modelu. Ovo je u skladu sa poznatom činjenicom da je autizam zastupljeniji kod dečaka u odnosu na devojčice (Baron-Cohen i sar., 2011).

Zbog svega prethodno navedenog smatrali smo da je valproatni model dovoljno dobar animalni model ASD-a i odlučili smo da na njemu sprovedemo dalja ispitivanja.

5.3.1. VPA i neurotransmiteri

Da bismo ispitali konstruktivnu validnost valproatnog prenatalnog modela, odlučili smo da ispitamo razliku u koncentraciji neurotransmitera između VPA i CTRL životinja. Decenijama se već spekulira o narušenom ekscitatorno-inhibitornom balansu u mozgu pacijenata sa autizmom, tako da je bilo neizostavno ispitati koncentraciju GABA-e i glutamata.

Dobijena je manja koncentracija GABA-e u cerebelumu oba pola juvenilnih VPA pacova i povećanje koncentracije u frontalnom korteksu i ventralnom hipokampusu odraslih VPA mužjaka. Ovo je u skladu sa prethodnom studijom koja je pokazala da VPA pacovi imaju smanjenu ekspresiju glutamat dekarboksilaze 67 (GAD67 – enzim koji katalizuje dekarboksilaciju glutamata u GABA-u) u cerebelumu od detinjstva do adultnog perioda, a povećanu u prefrontalnom korteksu od adolescencije do adultnog perioda (Hou i sar., 2018). Otkrivena je smanjena koncentracija GABA-e u nekoliko moždanih regiona dece sa autizmom (pregled u (Horder i sar., 2018)), ali nijedan od ispitanih regiona nije bio cerebelum. Smanjeni nivo GAD67 i druge izoforme, GAD65, jeste bio detektovan u cerebelumu, ali mladih odraslih pacijenata (Fatemi i sar., 2002). Stoga, što se tiče nalaza kod pacijenata, publikovani radovi ukazuju na određenu, mada ne potpunu sličnost sa našim rezultatima. Ispitivanjem nivoa glutamata dobijena je manja koncentracija u cerebelumu i oflaktornom bulbusu juvenilnih VPA mužjaka, ali veća u frontalnom korteksu odraslih VPA mužjaka i ventralnom hipokampusu odraslih VPA ženki. U već publikovanim radovima pokazano je da VPA pacovi imaju povećanu koncentraciju glutamata u hipokampusu tokom P14 (Puig-Lagunes Á i sar., 2021), a da odrasli pacijenti i VPA miševi imaju smanjenu koncentraciju u strijatumu (Horder i sar., 2018). Ovi rezultati ne pokazuju sličnost sa našima, mada se ne mogu ni lako porediti usled razlika u samoj postavci eksperimenta. Nalazi koji pokazuju izvesnu paralelu sa našima su: smanjena koncentracija glutamata/glutamina u cerebelumu dečaka (DeVito i sar., 2007), smanjen odnos glutamata i kreatinina u frontalnim režnjevima autistične dece (Kubas i sar., 2012), povećan glutamat u auditornom frontalnom korteksu odraslih pacijenata (Brown i sar., 2013), veća koncentraciju glutamata/glutamina u regionu amigdale i hipokampusa odraslih pacijenata, doduše, muškaraca (Page i sar., 2006). Uloga glutamata u ASD-u je bila dosta ispitivana i došlo se do dve suprotne teorije: prva je predstavljala hipoglutamatergičko stanje, druga smanjenje GABAergičke inhibicije koja bi dovela da hiperglutamatergičkog stanja. Činjenica jeste da su nivoi glutamata i GABA-e povezani, i da će smanjenje glutamata, kao supstrata GAD enzima, verovatno dovesti do smanjenje GABA-e, i obrnuto (Cetin, 2015). Da pravac promene koncentracije ova dva neurotransmitera prati jedan drugi vidi se i u našim rezultatima. Od prvih nalaza iz 2006. godine do danas urađeno je više studija i dobijeni su kontradiktorni rezultati. U nekima je nivo glutamata povećan, u nekima nije bio razlike, u trećima je bio smanjen. Na osnovu toga neki istraživači smatraju da ove dve hipoteze nisu toliko u suprotnosti jedna sa drugom, koliko neki regioni mozga kod ASD pacijenata imaju povećan ekscitatorno/inhibitorni odnos, dok je obrnuto u drugim regionima (Cetin, 2015).

Identifikacija hiperserotonemije u krvi dece sa autizmom (Schain i Freedman, 1961), preciznije u trombocitima, bio je prvi biomarker za autizam, prisutan kod preko 25% bolesne dece. Pokazao je jaku i specifičnu asocijaciju sa autizmom, nevezanu sa intelektualnim deficitom ili drugim mentalnim poremećajem (pregled u (Muller i sar., 2016)), i stoga je bio neizostavan u našoj analizi. Naši rezultati su pokazali povećanu koncentraciju serotonina u ventralnom hipokampusu juvenilnih VPA mužjaka i frontalnom korteksu i strijatumu odraslih VPA mužjaka. Ovo nije u skladu sa studijom koja je pokazala smanjen nivo serotonina u hipokampusu adolescentnih VPA pacova, koji su doduše bili tretirani valproatom na E9 (Dufour-Rainfray i sar., 2010), ali se slaže sa studijom koja je takođe tretirala pacove E9, a dobila povećani serotonin u hipokampusu juvenilnih mužjaka (Narita i sar., 2002). Što se tiče pacijenata i koncentracije serotonina u mozgu, slično kao sa glutamatom, postoje dve hipoteze koje objašnjavaju poremećaj serotonina kod pacijenata sa ASD-om. Jedna je davno

prihvaćena i potvrđena i objašnjava hiperserotonično stanje (povećan nivo serotonina u krvi i smanjen nivo serotonina u mozgu), a druga koja je postala bitna u poslednjim godinama jeste hiposerotonična hipoteza (Cetin, 2015). U skladu sa prvom hipotezom, i u suprotnosti sa našim nalazima, pokazano je da manji unos triptofana, kao prekursora serotonina, dovodi do pogoršanja repetitivnog ponašanja kod adultnih pacijenata sa ASD-om (McDougle i sar., 1996). Takođe, skeniranje mozga pacijenata sa autizmom u raznim uzrastima je otkrilo smanjenje nivoa serotonina u različitim regionima mozga (Makkonen i sar., 2008, Nakamura i sar., 2010). Sa druge strane, pokazano je da tretmani koji povećavaju nivo serotonina mogu da dovedu do pogoršanja simptoma (King i sar., 2009). Dodatno, *post-mortem* analiza moždanog tkiva mladih pacijenata sa ASD-om pokazala je povećan broj serotonergičkih aksona (Azmitia i sar., 2011). Finalno, otkriveno je da je normalan razvoj serotonina u mozgu pacijenata sa ASD-om poremećen. Naime, zdrava deca između dve i pet godina starosti imaju povišen nivo serotonina, koji postepeno opada tokom odrastanja. Pacijenti sa autizmom kreću sa nižim nivoom serotonina na samom početku detinjstva, ali njegov nivo nastavlja da raste tokom celog odrastanja i dostiže 1,5 puta više nivoe kod adulta (Chugani i sar., 1999). Sve ovo ne može da objasni hiperserotonergička hipoteza i daje donekle potvrdu našim rezultatima. Koliko je situacija kompleksna demonstrira nalaz da je kod muškaraca sa ASD-om, u jednoj strani frontalnog regiona i talamusa sinteza serotonina bila smanjena, ali u drugoj strani cerebeluma i dentatnog nukleusa je bila povećana (Brasic i sar., 2020).

Par studija koje su ispitivale nivo serotonina, takođe su analizirale i nivo dopamina. U našem eksperimentu se pokazalo da je dopamin manje zastupljen u cerebelumu oba pola juvenilnih VPA životinja i više zastupljen u frontalnom korteksu juvenilnih VPA ženki i cerebelumu odraslih VPA mužjaka. Ovo je u skladu sa rezultatima već pomenute studije, u kojoj je pokazano da je dopamin bio povećan u frontalnom korteksu juvenilnih VPA mužjaka, iako tretiranih na E9 (Narita i sar., 2002). Što se tiče studija na pacijentima, dobijeni rezultati pokazuju i izvesne sličnosti i razlike sa našima: povećan nivo vezivanja za dopaminski transporter u frontalnom korteksu adultnih muškaraca sa ASD-om (Nakamura i sar., 2010), dok mi dobijamo komparabilan rezultat sa juvenilnim ženkama i u cerebelumu odraslih mužjaka; smanjena koncentracija dopamina u prefrontalnom korteksu dece sa autizmom (Ernst i sar., 1997), dok mi dobijamo suprotno kod juvenilnih ženki, ali i smanjenje u cerebelumu juvenilnih pacova, koji nije ispitivan u pomenutoj studiji.

Naše analize su otkrile smanjen opšti nivo acetilholina u olfaktornom bulbusu i dorzalnom hipokampusu kod VPA životinja i veću koncentraciju acetilholina u frontalnom korteksu odraslih VPA mužjaka. Što se tiče humanih studija, nije pronađena razlika između aktivnosti holin-acetiltransferaze i acetilholinesteraze u korteksu adultnih pacijenata sa ASD-om i kontrolnom grupom (Perry i sar., 2001). Međutim, otkriveno je smanjeno vezivanje za nikotinske receptore u parijetalnom i frontalnom korteksu, ali i da je nivo neurotrofičkog faktora iz mozga (eng. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) tri puta veći u bazalnom prednjem mozgu pacijenata sa ASD-om (Perry i sar., 2001). Povećan nivo BDNF-a je pod značajnim uticajem holinergičkog sistema i pokazano je da prati nivo acetilholina (Hachisu i sar., 2015). Jasno je da je potrebno još istraživanja da bi bilo moguće izvesti opštije zaključke.

Naši rezultati pokazuju da je koncentracija noradrenalina manja u frontalnom korteksu VPA juvenilnih mužjaka, ali veća u frontalnom korteksu adultnih VPA mužjaka i donekle ženki. Za sad postoje dokazi da je pojačana noradrenergička aktivnost kod ASD pacijenata, uključujući povećan nivo noradrenalina u plazmi i kod dece i kod odraslih, a postoje dokazi da bi potencijalno postojali povoljni efekti noradrenergičke blokade u ASD-u (Beverdorf, 2020). Ovo podržava naše rezultate dobijene kod adultnih životinja, ali je evidentno da je potrebno još istraživanja da bi se jasnije sagledalo stanje.

Što se tiče samih moždanih struktura i funkcija koje obavljaju, postoje indicije da je glutamat neophodan za ekscitaciju mitralnih ćelija i senzorni input u olfaktornom bulbusu (Tabor i Friedrich, 2008) i da blokada nikotinskih receptora dovodi do prestanka diskriminacije između različitih mirisa (Mandairon i sar., 2006), što ide u prilog našim rezultatima smanjenja glutamata i acetilholina u ovoj strukturi i oštećene olfaktorne diskriminacije.

Po broju razlika u nivou neurotransmitera koje smo pronašli na prvom mestu je frontalni korteks. Ovo nije iznenađujuće, s obzirom na ogromni broj uloga koje on obavlja, a za koje znamo da često jesu oštećene u ASD-u: radna memorija, donošenje odluka, planiranje, organizacija, kontrola pažnje, postupaka i emocija. Međutim, teško je doneti ikakve zaključke samo na bazi nivoa neurotransmitera, kad se zna da jedan neurotransmiter može da deluje na različite receptore različitih afiniteta i uloga (noradrenalin i serotonin), da postoje različite subpopulacije neurona jednog neurotransmitera koje mogu različito da reaguju na isti stimulus ili daju isti odgovor na različite stimulse (dopamin), kao i neuroni koji su aktivirani inhibicijom inhibicije, a da obe izaziva isti neurotransmitter (GABA) i, možda najbitnije, da menjanje nivoa bilo kog neurotransmitera u bilo koju stranu može da dovede do niza povezanih poremećaja (Cools i Arnsten, 2022).

Analizom strijatuma otkrili smo jedino povećanje serotonina. Pretpostavlja se da niži nivo serotonina u ventralnom strijatumu dovodi do povećane anksioznosti, što samo po sebi nije u skladu sa našim bihevioralnim rezultatima, ali ne možemo izostaviti potencijalni uticaj drugih struktura i neurotransmitera (Schwartz i sar., 1998). Socijalno ponašanje je veoma pogođeno kod pacijenata sa ASD-om. Zna se da serotonin u strijatumu ima veoma značajnu i složenu ulogu u socijalnom ponašanju, ali pokazano u aspektima koji se ne mogu ispitati kod glodara, kao što su osećaj za pravičnost (Crockett i sar., 2013), nagrađivanje (Tanaka i sar., 2007) i hedonizam (Virk i sar., 2016). Ipak, moguće je da je dobijeni izmenjeni nivo serotonina u strijatumu doveo do nekog aspekta socijalnog oštećenja koje smo utvrdili.

Što se tiče dorzalnog hipokampusa, jedini dobijeni nalaz smanjenja acetilholina slaže se sa studijama koje pokazuju da primena agoniste dopaminskih receptora u dorzalnom hipokampusu ima anksiolitički efekat (File i sar., 2000).

Analiza ventralnog hipokampusa je pokazala razlike u nivou GABA-e, glutamata i serotonina. Ove i bihevioralne promene koje smo dobili na prvi pogled nisu u skladu sa dosadašnjim studijama sprovedenim na ventralnom hipokampusu koje su pokazale da povećanje serotonina (Tu i sar., 2014), kao i glutamata (Marrocco i sar., 2012) može da dovede do smanjenja anksioznosti, i da antagonist GABA_A receptora u ventralnom hipokampusu povećava anksioznost (Rezvanfard i sar., 2009). Međutim, nasuprot tome takođe je otkriveno da agonista glutamatnih NMDA receptora može da dovede do povećanja anksioznosti (Rezvanfard i sar., 2009) što jeste u skladu sa našim rezultatima. Kao što je već prethodno diskutovano, nemoguće je izvoditi zaključke na bazi samo jednog neurotransmitera, u samo jednoj strukturi; čak ne uzimajući u obzir njihove veze i međusobne uticaje, situacija je dodatno zakomplikovana oprečnim podacima u literaturi.

Finalno, nije iznenađujuće da smo više abnormalnosti našli u cerebelumu, pošto je to region koji je do sada pokazao najviše neuroanatomskih razlika između pacijenata sa ASD-om i kontrolnih grupa. Veći broj afektovanih neurotransmitera, veliki broj veza i funkcija koje cerebelum ostvaruje čini nemogućim da lako i jednoznačno tumačimo naše rezultate. Opšte posmatrano, naši rezultati, i bihevioralni i nivoa neurotransmitera, slažu se sa nizom studija koje su pokazale da cerebelum kroz vezu sa drugim regionima daje potencijalnu osnovu za poremećenu motornu funkciju i dispraksiju u autizmu, a pored toga, igra ulogu u planiranju, određenim aspektima pažnje, afektivnom ponašanju, kontroli senzornih informacija i drugim ponašanjima za koje je pokazano da su afektovani u ASD-u (Fatemi i sar., 2012).

Posmatrajući celokupan set dobijenih rezultata možemo zaključiti da su VPA mužjaci više pogođeni od ženki, što liči na situaciju u ljudskoj populaciji (Baron-Cohen i sar., 2011). Na osnovu svega prethodnog, dobijeni rezultati pokazuju da valproatni animalni model ne u potpunosti, ali donekle ispunjava konstruktivnu validnost, koliko je to uopšte moguće zaključiti na osnovu heterogenih nalaza dobijenih ispitivanjem pacijenata sa ASD-om.

5.4. Uticaj primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a

Analizirali smo efekte subakutne primene MP-III-022, selektivnog PAM-a $\alpha 5$ GABA_A receptora, u valproatnom animalnom modelu ASD-a u periodu nakon zalučivanja. Pratili smo produžene efekte administracije liganda, bez akutnih farmakoloških dejstava, tako da smo testirali životinje i ćelije kad MP-III-022 više nije bio prisutan. Period posle zalučivanja je izabran kao period za davanje tretmana jer ugrubo odgovara uzrastu kad se najčešće dijagnostikuje autizam kod dece (Shattuck i sar., 2009). Nevezano za pol ili prenatalni tretman, nije bilo razlike u koncentraciji MP-III-022 u mozgu, što implicira da dobijeni bihevioralni i molekularni rezultati nisu bili posledica neujednačene prisutnosti liganda. Na prvi pogled deluje da je ovaj rezultat u suprotnosti sa promenama u propustljivosti krvno-moždane barijere koju izaziva prenatalna primena valproata (Kumar i Sharma, 2016). Međutim, u pomenutom radu je korišćen samo cerebelum, dok krvno-moždana barijera ima različite karakteristike i propustljivost u različitim regionima mozga (Wilhelm i sar., 2016). Samim tim, pošto smo mi koristili cele mozgove, moguće je da su potencijalne razlike u koncentraciji liganda u određenim moždanim regionima bile maskirane.

U ovom setu eksperimenata opet je dobijeno smanjeno socijalno ponašanje VPA pacova, samo drugih parametara u odnosu na prethodno pokazane. Konkretno, VPA mužjaci nisu ponovo demonstrirali smanjene parametre igranja, ali jesu imali smanjeno njuškanje i timarenje uparene životinje, dok su VPA ženke imale smanjenu manipulaciju repom i praćenje parnjaka, što je sve i dalje u skladu sa kriterijumom A dijagnoze ASD-a. Iznenadjući rezultat je povećano provlačenje preko/ispod uparene životinje iskazano kod VPA mužjaka. Moguće objašnjenje može da bude da su u ovom eksperimentu VPA mužjaci imali više naskakanja (eng. *mounting*) na parnjaka, što smo mi tokom pregleda snimaka socijalne interakcije računali kao provlačenje. Ovo bi bilo u skladu sa studijom koja je pokazala da VPA mužjaci imaju povećanu frekvenciju naskakanja (Raza i sar., 2015), što odgovara ubrzanom početku seksualne ekspresije kod dece sa ASD-om (Realmuto i Ruble, 1999). Tretman sa MP-III-022 je uspeo da vrati poremećaje u socijalnom ponašanju VPA životinja na kontrolni nivo za sve parametre sem praćenja. Niža doza je imala povoljni uticaj na VPA mužjake, dok je viša doza pomogla VPA ženkama.

Što se tiče anksioznosti, opet smo uspeali da dobijemo potvrdu ovog vida ponašanja, pre svega kod mužjaka, ali slabije statistički izraženu. Zanimljivo je takođe da je MP1 dat CTRL ženkama povećao njihovu anksioznost.

Za razliku od karakterizacije samog modela, u ovoj eksperimentalnoj proceduri smo uspeali da pokažemo hiperaktivnost VPA životinja, koja se slaže sa većinom studija (Bringas i sar., 2013, Kumar i Sharma, 2016, Wu i sar., 2018) i stanjem kod dece sa ASD-om (Yerys i sar., 2009). Ponovo je potvrđeno povećano vreme provedeno u timarenju i povećan broj rotacija, kao i preferencija za jednu stranu rotacija (u smeru kazaljke na satu) kod VPA mužjaka, što je već objašnjeno u odeljku 5.3. Još jednom je pokazano da MP-III-022 dat kontrolnim životinjama dovodi ili pokazuje tendenciju da izaziva isti tip promene kao i prenatalni tretman sa valproatom: hiperaktivnost (kod mužjaka), povećan broj rotacija (kod oba pola), povećan broj rotacija u smeru suprotnom kazaljci na satu i povećano timarenje (ženke). Nasuprot tome, kao što je dobijeno i u testu socijalne interakcije, MP0,3 je uspeo da poboljša deficite VPA mužjaka u svim praćenim parametrima (sem rotacija suprotnih smeru kazaljke) i MP1 je isto uradio za ženke i za jedan i za drugi smer rotacija.

Morisov vodeni lavirint je takođe dao prethodno diskutovane rezultate pogoršane prostorne memorije, samo što je u ovom slučaju pogoršanje bilo izraženo pre svega kod VPA mužjaka. Tretman sa MP-III-022 nije uspeo da poboljša ovaj deficit. Međutim, ponovo dobijeni restriktivni obrazac ponašanja je uspešno saniran tretmanom sa MP0,3 kod mužjaka, dok je MP1 delimično normalizovao izvođenje zadatka kod ženki.

Generalno posmatrano, dobijeni bihevioralni rezultati su potvrdili i naše pređašnje i mnoge dosadašnje objavljene nalaze (detaljno opisano u odeljku 5.3.) dobijene ispitivanjem ovog animalnog modela, svi potvrđujući da juvenilne VPA životinje pokazuju socijalne deficite i repetitivne i restriktivne obrasce ponašanja, što odgovara karakteristikama ASD-a u ljudskoj populaciji. Razlike u odnosu na naše prvobitno ispitivanje valproatnog animalnog modela (umanjeni drugi parametri

socijalnog ponašanja i povećano naskakanje, blago smanjena anksioznost, povećana hiperaktivnost, prostorno pamćenje pogođeno samo kod mužjaka) mogu se potencijalno objasniti na dva načina. Prvo, prilikom karakterizacije samog modela za statistiku su korišćene srednje vrednost 2 – 3 životinje istog pola po leglu, pošto su u tom slučaju bile tretirane samo majke. U ispitivanju uticaja liganda, bili su tretirani i sami mladunci i rezultati pojedinačne životinje su uzimani u obzir. Moguće je da bi statistika koja bi uzimala u obzir svaku životinju u prethodnom eksperimentu dala sličnije rezultate. Drugo, bitnije, u ovom eksperimentu životinje su bile izložene i prenatalnom dejstvu valproata i svakodnevnom stresu primanja injekcija tokom nedelju dana. Sasvim je moguće da je ovo služilo kao svojevrsan animalni model iz “dva udara” (eng. *two-hit*), koji je moguće da odgovara i stanju u ljudskoj populaciji. Prvi “udarac” bi bili rani poremećaju u neuralnom razvoju (izazvani valproatom u animalnom modelu), koji bi dali nervni sistem koji je podložniji uticaju drugog udara – stresa usled povećanih socijalnih zahteva, priliva hormona tokom adolescencije (Picci i Scherf, 2015), ili tokom svakodnevnog izlaganja bolu u animalnom modelu.

Da bi se bolje objasnili bihevioralni rezultati i analizirala razlika u GABA *switch*-u i spontanoj neuronalnoj aktivnosti, odrađene su studije oslikavanja kalcijuma. Tokom DIV 13, većina CTRL neurona je prošla GABA *switch*, dok je kod većine VPA neurona GABA i dalje dovodila do ekscitacije i posledičnog porasta $[Ca^{2+}]_i$. Dodatno, VPA neuroni nisu razvili spontane oscilacije kalcijuma u istoj meri kao CTRL neuroni, u pogledu njihove frekvencije i amplitude. Ove oscilacije predstavljaju promene u koncentracijama kalcijuma koje su usko povezane sa akcionim potencijalima i predstavljaju sinhronu umreženu aktivnost zrelih neurona, za koju se smatra da igra važnu ulogu u normalnom razvoju *in vivo* (Cohen i sar., 2008, Penn i sar., 2016). Stoga, oba nalaza dobijena kod VPA neurona, i reakcija na GABA i karakteristike spontanih oscilacija, ukazuju na njihovo sporije sazrevanje. Ove razlike su postale još izraženije tokom DIV 15, gde VPA neuroni i dalje nisu dostigli kontrolni nivo razvoja, u pogledu oba praćena tipa reakcije. Tretman ligandom je dao rezultate koji u potpunosti odgovaraju bihevioralnim nalazima: izlaganje VPA neurona ligandu je poboljšalo spontanu aktivnost i pojavu GABA *switch*-a, dok se obrnuto desilo po tretiranju CTRL neurona – njihovi kalcijumski signali su počeli da liče onima kod VPA neurona.

Dodatno smo analizirali otisak iRNK u hipokampusu tretiranih životinja. Fiziološki očekivano, tretman sa PAM je smanjio ekspresiju GABRA5 u CTRL životinjama. Ovo bi potencijalno moglo da bude deo razloga za promene nastale kod kontrolnih životinja i ćelija posle primene liganda i njihovu sličnost deficitima izazvanih valproatnim prenatalnim tretmanom. Dodatno, ovo je u skladu sa nizom studija koje su povezale ASD sa smanjenom ekspresijom $\alpha 5$ podjedinice (Blatt i sar., 2001, Fatemi i sar., 2009, Fatemi i sar., 2010). Dodatnu potvrdu pruža rezultat da su VPA ženke imale smanjeni nivo hipokampalnog GABRA5 na samoj ivici značajnosti ($p=0,05$). Sa druge strane, tretman sa MP1, za kojeg je pokazano da popravlja bihevioralne deficite i spontanu neuronalnu aktivnost, povećao je ekspresiju GABRA5 kod VPA ženki. Podrška našim rezultatima i zaključcima može se pronaći u povećanom influksu kalcijuma u dendrite i kratkotrajnoj sinaptičkoj plastičnosti koja sledi posle aktivacije $\alpha 5$ GABA_A receptora (Chiu i sar., 2020). Autori ovog rada su predložili da tonična struja GABA-e dovodi do hiperpolarizacije dendritske membrane, koja potom de-inaktivira kalcijumove kanale niskog praga i pojačava ulazak kalcijuma izazvan akcionim potencijalom.

VPA mužjaci i CTRL mužjaci tretirani sa MP-III-022 imali su sličan način ponašanja; ovaj nalaz prati isti smer promena u ekspresiji NKCC1. Neočekivano, pokazano je da se nivo NKCC1 smanjio u pomenutim grupama, što je zapravo povećalo KCC2/NKCC1 odnos. Od takvog odnosa se očekuje da dovede do normalnog GABA *switch*-a i zrelosti neurona; međutim, obrnuto je primećeno u našim eksperimentima. Moguće objašnjenje bi se moglo naći u oštećenom formiranju dugotrajne potencijacije u hipokampusu, do čega dovodi inhibicija NKCC1 (Ko i sar., 2014). Autori pomenute studije su predložili da, pošto NKCC1 utiče na oslobađanje glutamata, stimulacija NKCC1 bi mogla da aktivira NMDA receptore koji bi onda doveli do povećanja slobodnog $[Ca^{2+}]_i$ i aktivacije neke od protein kinaza, što bi uticalo na put transdukcije signala i samim tim na formiranje dugotrajne potencijacije. Naši rezultati koji povezuju smanjen nivo NKCC1 i smanjenu spontanu aktivnost neurona i bihevioralna oštećenja potvrđuju ovu hipotezu.

Naš nalaz nivoa NKCC1 se ne slaže sa smanjenim odnosom KCC2/NKCC1 koji je detektovan u animalnim modelima ASD-a i doveo do toga da se antagonist NKCC1, bumetanid, koristi prvo u animalnim modelima, a potom i u kliničkim ispitivanjima za ASD. Iz istog razloga je bumetanid testiran kao tretman za neonatalne epileptične napade, ali nije postigao zadovoljavajuće rezultate (Ben-Ari i sar., 2016). Koliko je situacija daleko od jasne, dokazuju studije koje podržavaju naše rezultate, povezujući mutacije u genu za NKCC1 koje dovode do gubitka ovog kotransportera, sa kohlearovestibularnim defektom (McNeill i sar., 2020). Taj nalaz je značajan, zato što gluva deca imaju 2 do 3 puta veći problem sa održavanjem pažnje/hiperaktivnošću i anksioznošću u poređenju sa decom normalnog sluha (Antoine i sar., 2017); dodatno, pacijenti sa ASD-om takođe imaju problema sa abnormalnom modulacijom vestibularnih signala (Leekam i sar., 2007).

Tyzio i sar. su prethodno pokazali da je nivo KCC2 manji kod VPA životinja (Tyzio i sar., 2014), i to je rezultat koji smo mi delimično uspeali da replikujemo (na nivou trenda) kod ženki. U skladu sa teorijom o GABA *switch*-u, MP1 je uspeo da povрати ovaj deficit, što odgovara i našim bihevioralnim rezultatima.

I u ovom setu eksperimenata dobili smo razliku u pogođenosti polova: pored razlike u parametrima socijalnog ponašanja, mužjaci su jedini pokazali anksioznost, preferenciju za smer rotacija i oštećeno učenje – ovo je veoma slično prethodno dobijenim rezultatima diskutovanim u odeljku 5.3. Pojava da polovi daju drugačiji odgovor posle primene selektivnog PAM $\alpha 5$ GABA_A receptora je takođe već bila demonstrirana (Batinić i sar., 2017, Piantadosi i sar., 2016). U ovim eksperimentima, MP-II-022 je imao izraženiji efekat na mužjake, sa tretmanom, pogotovo nižom dozom, koji je ublažio većinu otkrivenih bihevioralnih deficita. Kod ženki tretman nije bio tako uspešan: pomogao je kod nekih, ali ne svih poremećaja, i viša doza je imala bolji efekat. Polno zavisni obrasci profila ekspresije hloridnih kotransportera, kao i samog sazrevanja signalizacije GABA-e, dobro su poznati (Galanopoulou, 2008). Iako mi nismo uspeali da replikujemo uobičajene razlike u polovima u nivou KCC2/NKCC1 – verovatno jer smo koristili zrelije životinje u odnosu na vreme kada se uspostavljaju nivoi hloridnih kotransportera (P30 u poređenju sa P4-14 u pomenutim studijama) – jesmo primetili razliku između polova kod VPA životinja. Konkretno, rezultati dobijeni analizom nivoa GABRA5 i KCC2 se slažu sa prethodnim studijama i teorijama u vezi ASD-a (Blatt i sar., 2001, Fatemi i sar., 2009, Fatemi i sar., 2010, Tyzio i sar., 2014), ali su dobijeni samo kod ženki, dok su mužjaci pokazali promenu samo u nivou NKCC1.

Potencijalni nedostatak sprovedenih eksperimenata je što nismo pravili pojedinačne ćelijske kulture od muških i ženskih mladunaca. Međutim, kako su i mužjaci i ženke pokazali osobine koje odgovaraju ključnim simptomima autizma, može se spekulirati da i *in vitro* testiranje – da je bilo sprovedeno na neuronima koji bi poticali od muških i ženskih pacova odvojeno – ne bi pokazalo značajne razlike među polovima. Takođe, može da se vidi sličnost između nivoa testirane iRNK i bihevioralnih rezultata, koja bi mogla da implicira da je ekspresiona promena bila praćena i na nivou proteina, i dodatno, u nivou receptora i kotransportera. Ipak, potrebne su dalje analize da bi se utvrdila kvantitativna i kvalitativna promena pomenutih proteina. Dodatno, pošto je ASD stanje koje traje ceo život, trebalo bi ispitati i produženo tretiranje životinja i efekat tretmana na starije životinje.

6. Zaključci

Rezultati ove doktorske disertacije su dali značajan uvid o ulozi $\alpha 5$ GABA_A receptora u kognitivnim procesima i uputili na potencijalne korisne efekte primene PAM selektivnog za ove receptore. Pored toga, sprovedeno je opsežno testiranje i poređenje validnosti dva različita animalna modela, što do sada nije urađeno. Finalno, i najbitnije, na izabranom animalnom modelu ASD-a ispitan je potencijalni terapijski uticaj PAM za $\alpha 5$ GABA_A receptore. U skladu sa tim, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- 1) Kompleksnost dobijenih rezultata na normalnim životinjama pokazala je da bi pozitivna modulacija $\alpha 5$ GABA_A receptora mogla da pronađe specifične terapijske niše u sklopu individualizovanog pristupa kognitivnim poremećajima, u zavisnosti od prostornog, socijalnog i vizuelnog domena afektovanih kratkotrajnih i dugotrajnih kognitivnih procesa.
- 2) BTBR soj miševa nije pokazao ponašanje koje može da odgovara deficitima u humanoj populaciji koji bi ispunili kriterijum A, kriterijum C i donekle kriterijum B, što je neophodno za uspostavljanje dijagnoze ASD-a; stoga smo zaključili da ovaj animalni model ne ispunjava zahtev validnosti sličnosti, i stoga ne može da predstavlja model ASD-a odgovarajući za prediktivna istraživanja.
- 3) Pacovi prenatalno tretirani valproatom su najvećim delom pokazali ponašanje koje odgovara deficitima prisutnim kod pacijenata sa ASD-om, kako ključnih simptoma neophodnih za uspostavljanje dijagnoze, tako i sporednih. Kako za jedan animalni model psihijatrijskog poremećaja nije moguće da u potpunosti preslika simptome humane populacije, rezultati pokazuju da valproatni prenatalni model u dovoljnoj meri ispunjava validnost sličnosti, a donekle i konstruktivnu validnost za ASD.
- 4) Tretiranje kontrolnih životinja sa selektivnim PAM $\alpha 5$ GABA_A receptora dovelo je do smanjenja GABRA5 i do oštećenja sličnih onima kod ASD-a, čime se otkriva potencijalna uloga ovog receptora u patogenezi bolesti. Nasuprot, naši rezultati su pokazali potencijal ovakvih PAM u sekundarnoj prevenciji i tretmanu ASD-a, s time što bi program razvoja leka zahtevao elemente prilagođavanja koji bi uzimali u obzir i polne razlike.

7. Literatura

Alexander GM, Farris S, Pirone JR, Zheng C, Colgin LL, Dudek SM. Social and novel contexts modify hippocampal CA2 representations of space. *Nat Commun* 2016; 7: 10300.

Almeida-Santos AF, Carvalho VR, Jaimes LF, de Castro CM, Pinto HP, Oliveira TPD, Vieira LB, Moraes MFD, Pereira GS. Social isolation impairs the persistence of social recognition memory by disturbing the glutamatergic tonus and the olfactory bulb-dorsal hippocampus coupling. *Sci Rep* 2019; 9: 473.

Altman J, Bayer SA. Development of the brain stem in the rat. IV. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the pontine region. *J Comp Neurol* 1980; 194: 905-29.

Amodeo DA, Pahua AE, Zarate M, Taylor JA, Peterson S, Posadas R, Oliver BL, Amodeo LR. Differences in the expression of restricted repetitive behaviors in female and male BTBR T + tf/J mice. *Behav Brain Res* 2019; 372: 112028.

Amrhein V, Korner-Nievergelt F, Roth T. The earth is flat ($p > 0.05$): significance thresholds and the crisis of unreplicable research. *PeerJ* 2017; 5: e3544.

Andrews K, Josiah SS, Zhang J. The Therapeutic Potential of Neuronal K-Cl Co-Transporter KCC2 in Huntington's Disease and Its Comorbidities. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 9142.

Antoine MW, Vijayakumar S, McKeehan N, Jones SM, Hébert JM. The Severity of Vestibular Dysfunction in Deafness as a Determinant of Comorbid Hyperactivity or Anxiety. *J Neurosci* 2017; 37: 5144-54.

Argue KJ, McCarthy MM. Characterization of juvenile play in rats: importance of sex of self and sex of partner. *Biol Sex Differ* 2015; 6: 16.

Association AP. Autism Spectrum Disorder. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Washington, DC. 2013.

Atack JR. Preclinical and clinical pharmacology of the GABAA receptor alpha5 subtype-selective inverse agonist alpha5IA. *Pharmacol Ther* 2010; 125: 11-26.

Atack JR, Bayley PJ, Seabrook GR, Wafford KA, McKernan RM, Dawson GR. L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for alpha5-containing GABAA receptors. *Neuropharmacology* 2006; 51: 1023-9.

Auger AP, Olesen KM. Brain sex differences and the organisation of juvenile social play behaviour. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 519-25.

Azmitia EC, Singh JS, Whitaker-Azmitia PM. Increased serotonin axons (immunoreactive to 5-HT transporter) in postmortem brains from young autism donors. *Neuropharmacology* 2011; 60: 1347-54.

Babineau BA, Yang M, Berman RF, Crawley JN. Low home cage social behaviors in BTBR T+tf/J mice during juvenile development. *Physiol Behav* 2013; 114-115: 49-54.

Bader BM, Steder A, Klein AB, Frølund B, Schroeder OHU, Jensen AA. Functional characterization of GABAA receptor-mediated modulation of cortical neuron network activity in microelectrode array recordings. *PLoS One* 2017; 12: e0186147.

Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA. Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 814-24.

Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P. A clinicopathological study of autism. *Brain* 1998; 121 (Pt 5): 889-905.

Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Robinson Rosenberg C, White T, Durkin MS, Imm P, Nikolaou L, Yeargin-Allsopp M, Lee LC, Harrington R, Lopez M, Fitzgerald RT, Hewitt A, Pettygrove S, Constantino JN, Vehorn A, Shenouda J, Hall-Lande J, Van Naarden Braun K, Dowling NF. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 2018; 67: 1-23.

Bales KL, Solomon M, Jacob S, Crawley JN, Silverman JL, Larke RH, Sahagun E, Puhger KR, Pride MC, Mendoza SP. Long-term exposure to intranasal oxytocin in a mouse autism model. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e480.

Ballard TM, Knoflach F, Prinssen E, Borroni E, Vivian JA, Basile J, Gasser R, Moreau JL, Wettstein JG, Buettelmann B, Knust H, Thomas AW, Trube G, Hernandez MC. RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA alpha5 subunit-containing receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 2009; 202: 207-23.

Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res* 2011; 1408: 8-16.

Bambini-Junior V, Zanatta G, Della Flora Nunes G, Mueller de Melo G, Michels M, Fontes-Dutra M, Nogueira Freire V, Riesgo R, Gottfried C. Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci Lett* 2014; 583: 176-81.

Banerjee A, Engineer CT, Sauls BL, Morales AA, Kilgard MP, Ploski JE. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 387.

Barmashenko G, Hefft S, Aertsen A, Kirschstein T, Köhling R. Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. *Epilepsia* 2011; 52: 1570-8.

Barnby G, Abbott A, Sykes N, Morris A, Weeks DE, Mott R, Lamb J, Bailey AJ, Monaco AP. Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 950-66.

Barnea-Goraly N, Kwon H, Menon V, Eliez S, Lotspeich L, Reiss AL. White matter structure in autism: preliminary evidence from diffusion tensor imaging. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 323-6.

Baron-Cohen S, Lombardo MV, Auyeung B, Ashwin E, Chakrabarti B, Knickmeyer R. Why are autism spectrum conditions more prevalent in males? *PLoS Biol* 2011; 9: e1001081.

Baronio D, Castro K, Gonchoroski T, de Melo GM, Nunes GDF, Bambini-Junior V, Gottfried C, Riesgo R. Effects of an H3R Antagonist on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *PLoS One* 2015; 10: e0116363.

Batinić B, Santrač A, Jančić I, Li G, Vidojević A, Marković B, Cook JM, Savić MM. Positive modulation of $\alpha 5$ GABA(A) receptors in preadolescence prevents reduced locomotor response to amphetamine in adult female but not male rats prenatally exposed to lipopolysaccharide. *Int J Dev Neurosci* 2017; 61: 31-9.

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

Ben-Ari Y, Damier P, Lemonnier E. Failure of the Nemo Trial: Bumetanide Is a Promising Agent to Treat Many Brain Disorders but Not Newborn Seizures. *Front Cell Neurosci* 2016; 10: 90.

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 2007; 87: 1215-84.

Beversdorf DQ. The Role of the Noradrenergic System in Autism Spectrum Disorders, Implications for Treatment. *Semin Pediatr Neurol* 2020; 35: 100834.

Bhattacharyya A, McMillan E, Chen SI, Wallace K, Svendsen CN. A critical period in cortical interneuron neurogenesis in down syndrome revealed by human neural progenitor cells. *Dev Neurosci* 2009; 31: 497-510.

Biasin V, Wygrecka M, Marsh LM, Becker-Pauly C, Brcic L, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski A, Kwapiszewska G. Meprin β contributes to collagen deposition in lung fibrosis. *Sci. Rep* 2017; 7: 39969.

Birke LIA, Sadler D. Scent-marking behaviour in response to conspecific odours by the rat, *Rattus norvegicus*. *Anim Behav* 1984; 32: 493-500.

Blanchard DC, Summers CH, Blanchard RJ. The role of behavior in translational models for psychopathology: functionality and dysfunctional behaviors. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37: 1567-77.

Blatt GJ, Fitzgerald CM, Guptill JT, Booker AB, Kemper TL, Bauman ML. Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: an autoradiographic study. *J Autism Dev Disord* 2001; 31: 537-43.

Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 551-63.

Brady ML, Jacob TC. Synaptic localization of $\alpha 5$ GABA (A) receptors via gephyrin interaction regulates dendritic outgrowth and spine maturation. *Dev Neurobiol* 2015; 75: 1241-51.

Brasic JR, Syed AB, Farhadi F, Wong DF. PET Scanning in Autism Spectrum Disorder. *Medscape Drugs Dis* 2020.

Braudeau J, Delatour B, Duchon A, Pereira PL, Dauphinot L, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Dodd RH, Hérault Y, Potier MC. Specific targeting of the GABA-A receptor $\alpha 5$ subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J Psychopharmacol* 2011; 25: 1030-42.

Bringas ME, Carvajal-Flores FN, López-Ramírez TA, Atzori M, Flores G. Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. *Neuroscience* 2013; 241: 170-87.

Brodin J, Frank D, Grippo R, Hausfater M, Gulinello M, Achterholt N, Gutzen C. Validation and implementation of a novel high-throughput behavioral phenotyping instrument for mice. *J Neurosci Methods* 2014; 224: 48-57.

Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology* 2008; 71: 1923-4.

Brown MS, Singel D, Hepburn S, Rojas DC. Increased glutamate concentration in the auditory cortex of persons with autism and first-degree relatives: a (1)H-MRS study. *Autism Res* 2013; 6: 1-10.

Brown RE. Odor Preference and Urine-Marking Scales in Male and Female Rats - Effects of Gonadectomy and Sexual Experience on Responses to Conspecific Odors. *J Comp Physiol Psychol* 1977; 91: 1190-206.

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

Bubeníková-Valesová V, Votava M, Páleníček T, Horáček J. The opposite effect of a low and a high dose of serotonin-1A agonist on behavior induced by MK-801. *Neuropharmacology* 2007; 52: 1071-8.

Buescher AV, Cidav Z, Knapp M, Mandell DS. Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. *JAMA Pediatr* 2014; 168: 721-8.

Burgess NK, Sweeten TL, McMahon WM, Fujinami RS. Hyperserotoninemia and altered immunity in autism. *J Autism Dev Disord* 2006; 36: 697-704.

Campolongo M, Kazlauskas N, Falasco G, Urrutia L, Salgueiro N, Höcht C, Depino AM. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Mol Autism* 2018; 9: 36.

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

Casanova MF. The neuropathology of autism. *Brain Pathol* 2007; 17: 422-33.

Cavalli P. Prevention of Neural Tube Defects and proper folate periconceptional supplementation. *J Prenat Med* 2008; 2: 40-1.

CDC. Signs and Symptoms of Autism Spectrum Disorder: Centers for Disease Control and Prevention; 2022. Available from: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/signs.html>

Cetin FH, Tunca, H., Guney, E., & Iseri, E. Neurotransmitter Systems in Autism Spectrum Disorder. 2015. In: Autism Spectrum Disorder - Recent Advances. London, United Kingdom: IntechOpen Limited.

Chadman KK. Fluoxetine but not risperidone increases sociability in the BTBR mouse model of autism. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 97: 586-94.

Chadman KK GS. The BTBR T+tf/J (BTBR) Mouse Model of Autism. *Autism* 2012; S1:009.

Chambers MS, Atack JR, Broughton HB, Collinson N, Cook S, Dawson GR, Hobbs SC, Marshall G, Maubach KA, Pillai GV, Reeve AJ, MacLeod AM. Identification of a novel, selective GABA(A) alpha5 receptor inverse agonist which enhances cognition. *J Med Chem* 2003; 46: 2227-40.

Chambers MS, Atack JR, Carling RW, Collinson N, Cook SM, Dawson GR, Ferris P, Hobbs SC, O'Connor D, Marshall G, Rycroft W, MacLeod AM. An Orally Bioavailable, Functionally Selective Inverse Agonist at the Benzodiazepine Site of GABAA α 5 Receptors with Cognition Enhancing Properties. *J Med Chem* 2004; 47: 5829-32.

Chen X, van Gerven J, Cohen A, Jacobs G. Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. *Acta Pharmacologica Sinica* 2019; 40: 571-82.

Chen YW, Lin HC, Ng MC, Hsiao YH, Wang CC, Gean PW, Chen PS. Activation of mGluR2/3 underlies the effects of N-acetylcystein on amygdala-associated autism-like phenotypes in a valproate-induced rat model of autism. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 219.

Cheng VY, Martin LJ, Elliott EM, Kim JH, Mount HT, Taverna FA, Roder JC, Macdonald JF, Bhambri A, Collinson N, Wafford KA, Orser BA. Alpha5GABAA receptors mediate the amnestic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *J Neurosci* 2006; 26: 3713-20.

Chiu CQ, Morse TM, Nani F, Knoflach F, Hernandez M-C, Jadi M, Higley MJ. Tonic GABAergic activity facilitates dendritic calcium signaling and short-term plasticity. *bioRxiv* 2020; 2020.04.22.055137.

Cho IH, Yoo HJ, Park M, Lee YS, Kim SA. Family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT2A receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios. *Brain Res* 2007; 1139: 34-41.

Chomiak T, Karnik V, Block E, Hu B. Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. *BMC Neurosci* 2010; 11: 102.

Christianson AL, Chester N, Kromberg JGR. Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neuro-developmental Features in Two Sibling Pairs. *Dev Med Child Neurol* 1994; 36: 361-9.

Christie SB, de Blas AL. alpha5 Subunit-containing GABA(A) receptors form clusters at GABAergic synapses in hippocampal cultures. *Neuroreport* 2002; 13: 2355-8.

Chugani DC, Muzik O, Behen M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J, Chugani HT. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol* 1999; 45: 287-95.

Clayton T, Poe MM, Rallapalli S, Biawat P, Savić MM, Rowlett JK, Gallos G, Emala CW, Kaczorowski CC, Stafford DC, Arnold LA, Cook JM. A Review of the Updated Pharmacophore for the Alpha 5 GABA(A) Benzodiazepine Receptor Model. *Int J Med Chem* 2015; 2015: 430248.

Coe BP, Girirajan S, Eichler EE. The genetic variability and commonality of neurodevelopmental disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2012; 160c: 118-29.

Cohen E, Ivenshitz M, Amor-Baroukh V, Greenberger V, Segal M. Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus. *Brain Res* 2008; 1235: 21-30.

Collinson N, Atack JR, Laughton P, Dawson GR, Stephens DN. An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors improves encoding and recall but not consolidation in the Morris water maze. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 188: 619-28.

Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, Smith A, Otu FM, Howell O, Atack JR, McKernan RM, Seabrook GR, Dawson GR, Whiting PJ, Rosahl TW. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci* 2002; 22: 5572-80.

Cook EH, Jr., Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, Haas R, Courchesne E, Leventhal BL. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 247-50.

Cools R, Arnsten AFT. Neuromodulation of prefrontal cortex cognitive function in primates: the powerful roles of monoamines and acetylcholine. *Neuropsychopharmacology* 2022; 47: 309-28.

Cope EC, Zych AD, Katchur NJ, Waters RC, Laham BJ, Diethorn EJ, Park CY, Meara WR, Gould E. Atypical perineuronal nets in the CA2 region interfere with social memory in a mouse model of social dysfunction. *Mol Psychiatry* 2021.

Courchesne E. Brain development in autism: early overgrowth followed by premature arrest of growth. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004; 10: 106-11.

Courchesne E, Pierce K. Brain overgrowth in autism during a critical time in development: implications for frontal pyramidal neuron and interneuron development and connectivity. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 153-70.

Courchesne E, Redcay E, Kennedy DP. The autistic brain: birth through adulthood. *Curr Opin Neurol* 2004; 17: 489-96.

Coury D. Medical treatment of autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 2010; 23.

Coutinho AM, Sousa I, Martins M, Correia C, Morgadinho T, Bento C, Marques C, Ataíde A, Miguel TS, Moore JH, Oliveira G, Vicente AM. Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels. *Hum Genet* 2007; 121: 243-56.

Crawley JN. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol* 2007; 17: 448-59.

Crawley JN. Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 2012; 14: 293-305.

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U. Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8980-5.

Crockett MJ, Apergis-Schoute A, Herrmann B, Lieberman MD, Müller U, Robbins TW, Clark L. Serotonin modulates striatal responses to fairness and retaliation in humans. *J Neurosci* 2013; 33: 3505-13.

Dai YC, Zhang HF, Schön M, Böckers TM, Han SP, Han JS, Zhang R. Neonatal Oxytocin Treatment Ameliorates Autistic-Like Behaviors and Oxytocin Deficiency in Valproic Acid-Induced Rat Model of Autism. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 355.

Dantas AdS, Luft T, Henriques JAP, Schwartzmann G, Roesler R. Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: Possible involvement of the GABAergic system. *Peptides* 2006; 27: 2307-12.

Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, MacLeod AM, Choudhury HI, McDonald LM, Pillai G, Rycroft W, Smith AJ, Sternfeld F, Tattersall FD, Wafford KA, Reynolds DS, Seabrook GR, Atack JR. An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1335-45.

de la Torre-Ubieta L, Won H, Stein JL, Geschwind DH. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nat Med* 2016; 22: 345-61.

De Rubeis S, Buxbaum JD. Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity. *Hum Mol Genet* 2015; 24: R24-31.

Defensor EB, Pearson BL, Pobbe RL, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ. A novel social proximity test suggests patterns of social avoidance and gaze aversion-like behavior in BTBR T+ tf/J mice. *Behav Brain Res* 2011; 217: 302-8.

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 101-13.

Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol* 2005; 27: 515-24.

DeVito TJ, Drost DJ, Neufeld RWJ, Rajakumar N, Pavlosky W, Williamson P, Nicolson R. Evidence for Cortical Dysfunction in Autism: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging Study. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 465-73.

Devlin B, Cook EH, Coon H, Dawson G, Grigorenko EL, McMahon W, Minshew N, Pauls D, Smith M, Spence MA, Rodier PM, Stodgell C, Schellenberg GD, and the CGN. Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 1110-6.

Dodds L, Fell DB, Shea S, Armson BA, Allen AC, Bryson S. The role of prenatal, obstetric and neonatal factors in the development of autism. *J Autism Dev Disord* 2011; 41: 891-902.

Donegan JJ, Boley AM, Yamaguchi J, Toney GM, Lodge DJ. Modulation of extrasynaptic GABAA alpha 5 receptors in the ventral hippocampus normalizes physiological and behavioral deficits in a circuit specific manner. *Nat Commun* 2019; 10: 2819.

Donegan ML, Stefanini F, Meira T, Gordon JA, Fusi S, Siegelbaum SA. Coding of social novelty in the hippocampal CA2 region and its disruption and rescue in a 22q11.2 microdeletion mouse model. *Nat Neurosci* 2020; 23: 1365-75.

Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Le Guisquet AM, Garreau L, Ternant D, Bodard S, Jaumain E, Gulhan Z, Belzung C, Andres CR, Chalou S, Guilloteau D. Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism. *Neurosci Lett* 2010; 470: 55-9.

Duncan LE, Keller MC. A critical review of the first 10 years of candidate gene-by-environment interaction research in psychiatry. *Am J Psychiatry* 2011; 168: 1041-9.

Eimerbrink MJ, Pendry RJ, Hodges SL, Wiles JD, Peterman JL, White JD, Hayes HB, Chumley MJ, Boehm GW. The $\alpha 5$ -GABA(A)R inverse agonist MRK-016 upregulates hippocampal BDNF expression and prevents cognitive deficits in LPS-treated mice, despite elevations in hippocampal A β . *Behav Brain Res* 2019; 359: 871-7.

Ellis H, Tordoff M, Parker M. Itpr3 Is Responsible for the Mouse Tufted (tf) Locus. *J Hered* 2012; 104: 295-7.

Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C, Yasamy MT, Fombonne E. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* 2012; 5: 160-79.

Engin E, Zarnowska ED, Benke D, Tsvetkov E, Sigal M, Keist R, Bolshakov VY, Pearce RA, Rudolph U. Tonic Inhibitory Control of Dentate Gyrus Granule Cells by $\alpha 5$ -Containing GABAA Receptors Reduces Memory Interference. *J Neurosci* 2015; 35: 13698-712.

Epsztein J, Brecht M, Lee AK. Intracellular determinants of hippocampal CA1 place and silent cell activity in a novel environment. *Neuron* 2011; 70: 109-20.

Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Pascualvaca D, Cohen RM. Low medial prefrontal dopaminergic activity in autistic children. *Lancet* 1997; 350: 638.

Faraji J, Karimi M, Lawrence C, Mohajerani MH, Metz GAS. Non-diagnostic symptoms in a mouse model of autism in relation to neuroanatomy: the BTBR strain reinvestigated. *Transl Psychiatry* 2018; 8: 234.

Faseleh Jahromi M, Shokryazdan P, Idrus Z, Ebrahimi R, Bashokouh F, Liang JB. Modulation of Immune Function in Rats Using Oligosaccharides Extracted from Palm Kernel Cake. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 2576921.

Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman ML, Blaha CD, Blatt GJ, Chauhan A, Chauhan V, Dager SR, Dickson PE, Estes AM, Goldowitz D, Heck DH, Kemper TL, King BH,

Martin LA, Millen KJ, Mittleman G, Mosconi MW, Persico AM, Sweeney JA, Webb SJ, Welsh JP. Consensus Paper: Pathological Role of the Cerebellum in Autism. *Cerebellum* 2012; 11: 777-807.

Fatemi SH, Halt AR, Stary JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry* 2002; 52: 805-10.

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Rooney RJ, Patel DH, Thuras PD. mRNA and protein levels for GABA α 4, α 5, β 1 and GABABR1 receptors are altered in brains from subjects with autism. *J Autism Dev Disord* 2010; 40: 743-50.

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Thuras PD. GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *J Autism Dev Disord* 2009; 39: 223-30.

Favre M, Barkat T, Mendola D, Khazen G, Markram H, Markram K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front Behav Neurosci* 2013; 7: 88.

File SE, Kenny PJ, Cheeta S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 65-72.

Floris DL, Chura LR, Holt RJ, Suckling J, Bullmore ET, Baron-Cohen S, Spencer MD. Psychological correlates of handedness and corpus callosum asymmetry in autism: the left hemisphere dysfunction theory revisited. *J Autism Dev Disord* 2013; 43: 1758-72.

Fombonne E. The prevalence of autism. *JAMA* 2003; 289: 87-9.

Fugger HN, Cunningham SG, Rissman EF, Foster TC. Sex differences in the activational effect of ER α on spatial learning. *Horm Behav* 1998; 34: 163-70.

Galanopoulou AS. Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. *Epilepsy Res* 2008; 80: 99-113.

Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry* 2010; 68: 1100-6.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 2001; 105: 521-32.

Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics* 2011; 128: 344-55.

Ge S, Goh ELK, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming G-I, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 2006; 439: 589-93.

Geschwind DH, Levitt P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 103-11.

Ghosh A, Michalon A, Lindemann L, Fontoura P, Santarelli L. Drug discovery for autism spectrum disorder: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 777-90.

Gill KM, Grace AA. The role of α 5 GABA receptor agonists in the treatment of cognitive deficits in schizophrenia. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 5069-76.

Gill KM, Lodge DJ, Cook JM, Aras S, Grace AA. A Novel α 5GABAAR-Positive Allosteric Modulator Reverses Hyperactivation of the Dopamine System in the MAM Model of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 1903-11.

Glykys J, Mann EO, Mody I. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci* 2008; 28: 1421-6.

Grabrucker S, Haderspeck JC, Sauer AK, Kittelberger N, Asoglu H, Abaei A, Rasche V, Schön M, Boeckers TM, Grabrucker AM. Brain Lateralization in Mice Is Associated with Zinc Signaling and Altered in Prenatal Zinc Deficient Mice That Display Features of Autism Spectrum Disorder. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 450.

Guinchat V, Thorsen P, Laurent C, Cans C, Bodeau N, Cohen D. Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012; 91: 287-300.

Hachisu M, Konishi K, Hosoi M, Tani M, Tomioka H, Inamoto A, Minami S, Izuno T, Umezawa K, Horiuchi K, Hori K. Beyond the Hypothesis of Serum Anticholinergic Activity in Alzheimer's Disease: Acetylcholine Neuronal Activity Modulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Production and Inflammation in the Brain. *Neurodegener Dis* 2015; 15: 182-7.

- Han S, Tai C, Jones CJ, Scheuer T, Catterall WA. Enhancement of inhibitory neurotransmission by GABAA receptors having $\alpha 2,3$ -subunits ameliorates behavioral deficits in a mouse model of autism. *Neuron* 2014; 81: 1282-9.
- Han S, Tai C, Westenbroek RE, Yu FH, Cheah CS, Potter GB, Rubenstein JL, Scheuer T, de la Iglesia HO, Catterall WA. Autistic-like behaviour in *Scn1a*^{+/-} mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 2012; 489: 385-90.
- Happé FG, Mansour H, Barrett P, Brown T, Abbott P, Charlton RA. Demographic and Cognitive Profile of Individuals Seeking a Diagnosis of Autism Spectrum Disorder in Adulthood. *J Autism Dev Disord* 2016; 46: 3469-80.
- Harding SM, Masters EC, D'Agata CM, Agudelo Rivera AC, Smith EC. Prenatal exposure to valproic acid and treatment with intranasal oxytocin have sex-specific effects on behavior in Long Evans rats. *Behav Pharmacol* 2021; 32: 561-70.
- Herbert MR. Large brains in autism: the challenge of pervasive abnormality. *Neuroscientist* 2005; 11: 417-40.
- Herd MB, Haythornthwaite AR, Rosahl TW, Wafford KA, Homanics GE, Lambert JJ, Belelli D. The expression of GABAA beta subunit isoforms in synaptic and extrasynaptic receptor populations of mouse dentate gyrus granule cells. *J Physiol* 2008; 586: 989-1004.
- Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiol Dis* 2010; 38: 181-91.
- Horner J, Petrinovic MM, Mendez MA, Bruns A, Takumi T, Spooren W, Barker GJ, Künnecke B, Murphy DG. Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—a translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. *Transl Psychiatry* 2018; 8: 106.
- Hörtnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, Kirchmair E, Sieghart W, Sperk G. Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience* 2013; 236: 345-72.
- Hou Q, Wang Y, Li Y, Chen D, Yang F, Wang S. A Developmental Study of Abnormal Behaviors and Altered GABAergic Signaling in the VPA-Treated Rat Model of Autism. *Front Behav Neurosci* 2018; 12.
- Howlin P, Moss P, Savage S, Rutter M. Social outcomes in mid- to later adulthood among individuals diagnosed with autism and average nonverbal IQ as children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2013; 52: 572-81.e1.
- Hu X, Rocco BR, Fee C, Sibille E. Cell Type-Specific Gene Expression of Alpha 5 Subunit-Containing Gamma-Aminobutyric Acid Subtype A Receptors in Human and Mouse Frontal Cortex. *Complex Psychiatry* 2018; 4: 204-15.
- Huang F, Li J, Shi HL, Wang TT, Muhtar W, Du M, Zhang BB, Wu H, Yang L, Hu ZB, Wu XJ. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC-MS/MS. *J Neurosci Methods* 2014; 229: 8-14.
- Hyman SL, Levy SE, Myers SM. Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics* 2020; 145.
- Jacob TC. Neurobiology and Therapeutic Potential of $\alpha 5$ -GABA Type A Receptors. *Front Mol Neurosci* 2019; 12.
- Jain A, Marshall J, Buikema A, Bancroft T, Kelly JP, Newschaffer CJ. Autism occurrence by MMR vaccine status among US children with older siblings with and without autism. *JAMA* 2015; 313: 1534-40.
- Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T, and the Paris Autism Research International Sibpair S. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 302-10.
- Jasien JM, Daimon CM, Wang R, Shapiro BK, Martin B, Maudsley S. The effects of aging on the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 225.
- Jentink J, Loane MA, Dolk H, Barisic I, Garne E, Morris JK, de Jong-van den Berg LTW. Valproic Acid Monotherapy in Pregnancy and Major Congenital Malformations. *N Engl J Med* 2010; 362: 2185-93.

- Jessberger S, Nakashima K, Clemenson GD, Mejia E, Mathews E, Ure K, Ogawa S, Sinton CM, Gage FH, Hsieh J. Epigenetic Modulation of Seizure-Induced Neurogenesis and Cognitive Decline. *J Neurosci* 2007; 27: 5967-75.
- Jeste SS, Geschwind DH. Disentangling the heterogeneity of autism spectrum disorder through genetic findings. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 74-81.
- Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ. Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* 2006; 10: 152-8.
- Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev* 2003; 9: 199-216.
- Johnson CP. Recognition of autism before age 2 years. *Pediatr Rev* 2008; 29: 86-96.
- Karvat G, Kimchi T. Systematic autistic-like behavioral phenotyping of 4 mouse strains using a novel wheel-running assay. *Behav Brain Res* 2012; 233: 405-14.
- Kemper TL, Bauman ML. Neuropathology of infantile autism. *Mol Psychiatry* 2002; 7 Suppl 2: S12-3.
- Kerr DM, Downey L, Conboy M, Finn DP, Roche M. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism. *Behav Brain Res* 2013; 249: 124-32.
- Kersten M, Rabbe T, Blome R, Porath K, Sellmann T, Bien CG, Köhling R, Kirschstein T. Novel Object Recognition in Rats With NMDAR Dysfunction in CA1 After Stereotactic Injection of Anti-NMDAR Encephalitis Cerebrospinal Fluid. *Front Neurol* 2019; 10.
- Kim JW, Seung H, Kwon KJ, Ko MJ, Lee EJ, Oh HA, Choi CS, Kim KC, Gonzales EL, You JS, Choi DH, Lee J, Han SH, Yang SM, Cheong JH, Shin CY, Bahn GH. Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *PLoS One* 2014; 9: e104927.
- King BH, Hollander E, Sikich L, McCracken JT, Scahill L, Bregman JD, Donnelly CL, Anagnostou E, Dukes K, Sullivan L, Hirtz D, Wagner A, Ritz L. Lack of efficacy of citalopram in children with autism spectrum disorders and high levels of repetitive behavior: citalopram ineffective in children with autism. *Arch Gen Psychiatry* 2009; 66: 583-90.
- Klauck SM. Genetics of autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 714-20.
- Knust H, Achermann G, Ballard T, Buettelmann B, Gasser R, Fischer H, Hernandez MC, Knoflach F, Koblet A, Stadler H, Thomas AW, Trube G, Waldmeier P. The discovery and unique pharmacological profile of RO4938581 and RO4882224 as potent and selective GABA α 5 inverse agonists for the treatment of cognitive dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5940-4.
- Ko MC, Lee MC, Amstislavskaya TG, Tikhonova MA, Yang Y-L, Lu K-T. Inhibition of NKCC1 Attenuated Hippocampal LTP Formation and Inhibitory Avoidance in Rat. *PLoS One* 2014; 9: e106692.
- Koehler L, Fournel A, Albertowski K, Roessner V, Gerber J, Hummel C, Hummel T, Bensafi M. Impaired Odor Perception in Autism Spectrum Disorder Is Associated with Decreased Activity in Olfactory Cortex. *Chem Senses* 2018; 43: 627-34.
- Koh MT, Rosenzweig-Lipson S, Gallagher M. Selective GABA(A) α 5 positive allosteric modulators improve cognitive function in aged rats with memory impairment. *Neuropharmacology* 2013; 64: 145-52.
- Kozma C. Valproic acid embryopathy: report of two siblings with further expansion of the phenotypic abnormalities and a review of the literature. *Am J Med Genet* 2001; 98: 168-75.
- Krumm N, O'Roak BJ, Shendure J, Eichler EE. A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends Neurosci* 2014; 37: 95-105.
- Kubas B, Kułak W, Sobaniec W, Tarasow E, Lebkowska U, Walecki J. Metabolite alterations in autistic children: a 1H MR spectroscopy study. *Adv Med Sci* 2012; 57: 152-6.
- Kumar H, Sharma B. Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. *Brain Res Bull* 2016; 124: 27-39.
- Lai M-C, Lombardo M, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet* 2013; 383.

- Lam KS, Aman MG, Arnold LE. Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. *Res Dev Disabil* 2006; 27: 254-89.
- Lampi KM, Lehtonen L, Tran PL, Suominen A, Lehti V, Banerjee PN, Gissler M, Brown AS, Sourander A. Risk of autism spectrum disorders in low birth weight and small for gestational age infants. *J Pediatr* 2012; 161: 830-6.
- Landa RJ, Holman KC, Garrett-Mayer E. Social and communication development in toddlers with early and later diagnosis of autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64: 853-64.
- Lazic SE, Essioux L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci* 2013; 14: 37.
- Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CG, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA* 2014; 312: 1880-7.
- Lee V, Maguire J. The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front Neural Circuits* 2014; 8: 3.
- Leekam SR, Nieto C, Libby SJ, Wing L, Gould J. Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism. *J Autism Dev Disord* 2007; 37: 894-910.
- Leigh JP, Du J. Brief Report: Forecasting the Economic Burden of Autism in 2015 and 2025 in the United States. *J Autism Dev Disord* 2015; 45: 4135-9.
- Li J, Cai T, Jiang Y, Chen H, He X, Chen C, Li X, Shao Q, Ran X, Li Z, Xia K, Liu C, Sun ZS, Wu J. Genes with de novo mutations are shared by four neuropsychiatric disorders discovered from NPdenovo database. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 290-7.
- Li M, Long C, Yang L. Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 810548.
- Lind SE, Williams DM, Raber J, Peel A, Bowler DM. Spatial navigation impairments among intellectually high-functioning adults with autism spectrum disorder: exploring relations with theory of mind, episodic memory, and episodic future thinking. *J Abnorm Psychol* 2013; 122: 1189-99.
- Lindell AK, Hudry K. Atypicalities in cortical structure, handedness, and functional lateralization for language in autism spectrum disorders. *Neuropsychol Rev* 2013; 23: 257-70.
- Lingford-Hughes A, Hume SP, Feeney A, Hirani E, Osman S, Cunningham VJ, Pike VW, Brooks DJ, Nutt DJ. Imaging the GABA-benzodiazepine receptor subtype containing the alpha5-subunit in vivo with [¹¹C]Ro15 4513 positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 878-89.
- Lorenz-Guertin JM, Bambino MJ, Das S, Weintraub ST, Jacob TC. Diazepam Accelerates GABAAR Synaptic Exchange and Alters Intracellular Trafficking. *Front Cell Neurosci* 2019; 13.
- Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick Casey L. GABAA Receptor Trafficking-Mediated Plasticity of Inhibitory Synapses. *Neuron* 2011; 70: 385-409.
- Lyon MF. HEREDITARY HAIR LOSS IN THE TUFTED MUTANT OF THE HOUSE MOUSE. *J Hered* 1956; 47: 101-3.
- Ma DQ, Whitehead PL, Menold MM, Martin ER, Ashley-Koch AE, Mei H, Ritchie MD, DeLong GR, Abramson RK, Wright HH, Cuccaro ML, Hussman JP, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 377-88.
- Magnin E, Francavilla R, Amalyan S, Gervais E, David LS, Luo X, Topolnik L. Input-Specific Synaptic Location and Function of the $\alpha 5$ GABA_A Receptor Subunit in the Mouse CA1 Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 2019; 39: 788-801.
- Makkonen I, Riikonen R, Kokki H, Airaksinen MM, Kuikka JT. Serotonin and dopamine transporter binding in children with autism determined by SPECT. *Dev Med Child Neurol* 2008; 50: 593-7.

Mandairon N, Ferretti CJ, Stack CM, Rubin DB, Cleland TA, Linster C. Cholinergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous olfactory discrimination in adult rats. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 3234-44.

Mandy W, Lai MC. Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *J Child Psychol Psychiatry* 2016; 57: 271-92.

Manent JB, Represa A. Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *Neuroscientist* 2007; 13: 268-79.

Marchionni I, Omrani A, Cherubini E. In the developing rat hippocampus a tonic GABAA-mediated conductance selectively enhances the glutamatergic drive of principal cells. *J Physiol* 2007; 581: 515-28.

Markram K, Rinaldi T, Mendola DL, Sandi C, Markram H. Abnormal Fear Conditioning and Amygdala Processing in an Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 901-12.

Marotta R, Risoleo MC, Messina G, Parisi L, Carotenuto M, Vetri L, Roccella M. The Neurochemistry of Autism. *Brain Sci* 2020; 10.

Marques TR, Ashok AH, Angelescu I, Borgan F, Myers J, Lingford-Hughes A, Nutt DJ, Veronese M, Turkheimer FE, Howes OD. GABA-A receptor differences in schizophrenia: a positron emission tomography study using [¹¹C]Ro154513. *Mol Psychiatry* 2020.

Marrocco J, Mairesse J, Ngomba RT, Silletti V, Van Camp G, Bouwalder H, Summa M, Pittaluga A, Nicoletti F, Maccari S, Morley-Fletcher S. Anxiety-like behavior of prenatally stressed rats is associated with a selective reduction of glutamate release in the ventral hippocampus. *J Neurosci* 2012; 32: 17143-54.

Martin L, Sample H, Gregg M, Wood C. Validation of operant social motivation paradigms using BTBR T+tf/J and C57BL/6J inbred mouse strains. *Brain Behav* 2014; 4: 754-64.

Martin LJ, Bonin RP, Orser BA. The physiological properties and therapeutic potential of alpha5-GABAA receptors. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 1334-7.

Martin LJ, Oh GH, Orser BA. Etomidate targets alpha5 gamma-aminobutyric acid subtype A receptors to regulate synaptic plasticity and memory blockade. *Anesthesiology* 2009; 111: 1025-35.

Martin LJ, Zurek AA, MacDonald JF, Roder JC, Jackson MF, Orser BA. Alpha5GABAA receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory. *J Neurosci* 2010; 30: 5269-82.

Martínez-Cué C, Martínez P, Rueda N, Vidal R, García S, Vidal V, Corrales A, Montero JA, Pazos Á, Flórez J, Gasser R, Thomas AW, Honer M, Knoflach F, Trejo JL, Wettstein JG, Hernández MC. Reducing GABAA α 5 receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome. *J Neurosci* 2013; 33: 3953-66.

Mazefsky CA, White SW. Emotion regulation: concepts & practice in autism spectrum disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2014; 23: 15-24.

McCaffery P, Deutsch CK. Macrocephaly and the control of brain growth in autistic disorders. *Prog Neurobiol* 2005; 77: 38-56.

McCormick C, Hepburn S, Young GS, Rogers SJ. Sensory symptoms in children with autism spectrum disorder, other developmental disorders and typical development: A longitudinal study. *Autism* 2016; 20: 572-9.

McDougle CJ, Naylor ST, Cohen DJ, Aghajanian GK, Heninger GR, Price LH. Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1996; 53: 993-1000.

McFarlane HG, Kusek GK, Yang M, Phoenix JL, Bolivar VJ, Crawley JN. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes Brain Behav* 2008; 7: 152-63.

McNeill A, Iovino E, Mansard L, Vache C, Baux D, Bedoukian E, Cox H, Dean J, Goudie D, Kumar A, Newbury-Ecob R, Fallerini C, Renieri A, Lopercolo D, Mari F, Blanchet C, Willems

M, Roux AF, Pippucci T, Delpire E. SLC12A2 variants cause a neurodevelopmental disorder or cochleovestibular defect. *Brain* 2020; 143: 2380-7.

McTighe SM, Neal SJ, Lin Q, Hughes ZA, Smith DG. The BTBR mouse model of autism spectrum disorders has learning and attentional impairments and alterations in acetylcholine and kynurenic acid in prefrontal cortex. *PLoS One* 2013; 8: e62189.

Mehta MV, Gandal MJ, Siegel SJ. mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism. *PLoS One* 2011; 6: e26077.

Meira T, Leroy F, Buss EW, Oliva A, Park J, Siegelbaum SA. A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nat Commun* 2018; 9: 4163.

Mendez MA, Horder J, Myers J, Coghlan S, Stokes P, Erritzoe D, Howes O, Lingford-Hughes A, Murphy D, Nutt D. The brain GABA-benzodiazepine receptor alpha-5 subtype in autism spectrum disorder: a pilot [(11)C]Ro15-4513 positron emission tomography study. *Neuropharmacology* 2013; 68: 195-201.

Mendu SK, Bhandage A, Jin Z, Birnir B. Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes. *PLoS One* 2012; 7: e42959.

Menold MM, Shao Y, Wolpert CM, Donnelly SL, Raiford KL, Martin ER, Ravan SA, Abramson RK, Wright HH, Delong GR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, Gilbert JR. Association analysis of chromosome 15 gabaa receptor subunit genes in autistic disorder. *J Neurogenet* 2001; 15: 245-59.

Mercer A, Trigg HL, Thomson AM. Characterization of Neurons in the CA2 Subfield of the Adult Rat Hippocampus. *J Neurosci* 2007; 27: 7329-38.

Milić M, Timić T, Joksimović S, Biawat P, Rallapalli S, Divljaković J, Radulović T, Cook JM, Savić MM. PWZ-029, an inverse agonist selective for α_5 GABAA receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res* 2013; 241: 206-13.

Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol* 2007; 64: 945-50.

Mirza R, Sharma B. Beneficial effects of pioglitazone, a selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist in prenatal valproic acid-induced behavioral and biochemical autistic like features in Wistar rats. *Int J Dev Neurosci* 2019; 76: 6-16.

Mohiuddin S, Ghaziuddin M. Psychopharmacology of autism spectrum disorders: a selective review. *Autism* 2013; 17: 645-54.

Moreno-De-Luca D, Sanders SJ, Willsey AJ, Mulle JG, Lowe JK, Geschwind DH, State MW, Martin CL, Ledbetter DH. Using large clinical data sets to infer pathogenicity for rare copy number variants in autism cohorts. *Mol Psychiatry* 2013; 18: 1090-5.

Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, Barbaro JR, Wilson LM, Threadgill DW, Lauder JM, Magnuson TR, Crawley JN. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res* 2007; 176: 4-20.

Muller CL, Anacker AMJ, Veenstra-VanderWeele J. The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. *Neuroscience* 2016; 321: 24-41.

Murphy DG, Daly E, Schmitz N, Toal F, Murphy K, Curran S, Erlandsson K, Eersels J, Kerwin R, Ell P, Travis M. Cortical serotonin 5-HT_{2A} receptor binding and social communication in adults with Asperger's syndrome: an in vivo SPECT study. *Am J Psychiatry* 2006; 163: 934-6.

Mychasiuk R, Richards S, Nakahashi A, Kolb B, Gibb R. Effects of rat prenatal exposure to valproic acid on behaviour and neuro-anatomy. *Dev Neurosci* 2012; 34: 268-76.

Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, Tsujii M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Suda S, Sugiyama T, Takei N, Mori N. Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67: 59-68.

Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N. Increased Monoamine Concentration in the Brain and Blood of Fetal Thalidomide- and Valproic Acid-Exposed Rat: Putative Animal Models for Autism. *Pediatr Res* 2002; 52: 576-9.

Nejsum LN, Praetorius J, Nielsen S. NKCC1 and NHE1 are abundantly expressed in the basolateral plasma membrane of secretory coil cells in rat, mouse, and human sweat glands. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C333-40.

Nickl-Jockschat T, Habel U, Michel TM, Manning J, Laird AR, Fox PT, Schneider F, Eickhoff SB. Brain structure anomalies in autism spectrum disorder--a meta-analysis of VBM studies using anatomic likelihood estimation. *Hum Brain Mapp* 2012; 33: 1470-89.

Nishimura Y, Martin CL, Vazquez-Lopez A, Spence SJ, Alvarez-Retuerto AI, Sigman M, Steindler C, Pellegrini S, Schanen NC, Warren ST, Geschwind DH. Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 1682-98.

O'Connor R, van De Wouw M, Moloney GM, Ventura-Silva AP, O'Riordan K, Golubeva AV, Dinan TG, Schellekens H, Cryan JF. Strain differences in behaviour and immunity in aged mice: Relevance to Autism. *Behav Brain Res* 2021; 399: 113020.

Obradović A, Joksimović S, Poe MM, Ramerstorfer J, Varagic Z, Namjoshi O, Batinić B, Radulović T, Marković B, Roth BL, Sieghart W, Cook JM, Savić MM. Sh-I-048A, an in vitro non-selective super-agonist at the benzodiazepine site of GABAA receptors: the approximated activation of receptor subtypes may explain behavioral effects. *Brain Res* 2014; 1554: 36-48.

Okuyama T, Kitamura T, Roy DS, Itohara S, Tonegawa S. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science* 2016; 353: 1536.

Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 2009; 56: 141-8.

Page LA, Daly E, Schmitz N, Simmons A, Toal F, Deeley Q, Ambery F, McAlonan GM, Murphy KC, Murphy DG. In vivo 1H-magnetic resonance spectroscopy study of amygdala-hippocampal and parietal regions in autism. *Am J Psychiatry* 2006; 163: 2189-92.

Pardo CA, Eberhart CG. The neurobiology of autism. *Brain Pathol* 2007; 17: 434-47.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press; 2005.

Pearson BL, Pobbe RL, Defensor EB, Oasay L, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ. Motor and cognitive stereotypies in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *Genes Brain Behav* 2011; 10: 228-35.

Penn Y, Segal M, Moses E. Network synchronization in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113: 3341-6.

Perry EK, Lee ML, Martin-Ruiz CM, Court JA, Volsen SG, Merrit J, Folly E, Iversen PE, Bauman ML, Perry RH, Wenk GL. Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 1058-66.

Pescosolido MF, Gamsiz ED, Nagpal S, Morrow EM. Distribution of disease-associated copy number variants across distinct disorders of cognitive development. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2013; 52: 414-30.e14.

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

Picci G, Scherf KS. A Two-Hit Model of Autism: Adolescence as the Second Hit. *Clin Psychol Sci* 2015; 3: 349-71.

Piton A, Jouan L, Rochefort D, Dobrzeniecka S, Lachapelle K, Dion PA, Gauthier J, Rouleau GA. Analysis of the effects of rare variants on splicing identifies alterations in GABAA receptor genes in autism spectrum disorder individuals. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 749-56.

Piven J, Harper J, Palmer P, Arndt S. Course of behavioral change in autism: a retrospective study of high-IQ adolescents and adults. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1996; 35: 523-9.

- Pobbe RL, Pearson BL, Defensor EB, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ. Expression of social behaviors of C57BL/6J versus BTBR inbred mouse strains in the visible burrow system. *Behav Brain Res* 2010; 214: 443-9.
- Prenosil GA, Schneider Gasser EM, Rudolph U, Keist R, Fritschy JM, Vogt KE. Specific subtypes of GABAA receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2006; 96: 846-57.
- Prevot TD, Li G, Vidojevic A, Misquitta KA, Fee C, Santrac A, Knutson DE, Stephen MR, Kodali R, Zahn NM, Arnold LA, Scholze P, Fisher JL, Marković BD, Banasr M, Cook JM, Savic M, Sibille E. Novel Benzodiazepine-Like Ligands with Various Anxiolytic, Antidepressant, or Pro-Cognitive Profiles. *Mol Neuropsychiatry* 2019; 5: 84-97.
- Prevot TD, Sumitomo A, Tomoda T, Knutson DE, Li G, Mondal P, Banasr M, Cook JM, Sibille E. Reversal of Age-Related Neuronal Atrophy by $\alpha 5$ -GABAA Receptor Positive Allosteric Modulation. *Cereb Cortex* 2020; 31: 1395-408.
- Provenzano G, Gilardoni A, Maggia M, Pernigo M, Sgadò P, Casarosa S, Bozzi Y. Altered Expression of GABAergic Markers in the Forebrain of Young and Adult Engrailed-2 Knockout Mice. *Genes (Basel)* 2020; 11.
- Prut L, Prenosil G, Willadt S, Vogt K, Fritschy JM, Crestani F. A reduction in hippocampal GABAA receptor alpha5 subunits disrupts the memory for location of objects in mice. *Genes Brain Behav* 2010; 9: 478-88.
- Puig-Lagunes Á A, Rocha L, Morgado-Valle C, Beltrán-Parrázal L, López-Meraz ML. Brain and plasma amino acid concentration in infant rats prenatally exposed to valproic acid. *An Acad Bras Cienc* 2021; 93: e20190861.
- Purcell AE, Jeon OH, Zimmerman AW, Blue ME, Pevsner J. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology* 2001; 57: 1618-28.
- Rajizadeh MA, Afarinesh MR, Zarif M, Mirasadi A, Esmailpour K. Does caffeine therapy improve cognitive impairments in valproic acid rat model of autism? *Toxin Rev* 2019; 1-11.
- Ramos B, Lopez-Tellez JF, Vela J, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. Expression of alpha 5 GABAA receptor subunit in developing rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 2004; 151: 87-98.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 2000; 3: 238-44.
- Raymond GV, Bauman ML, Kemper TL. Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 117-9.
- Raza S, Harker A, Richards S, Kolb B, Gibb R. Tactile stimulation improves neuroanatomical pathology but not behavior in rats prenatally exposed to valproic acid. *Behav Brain Res* 2015; 282: 25-36.
- Raza S, Himmler BT, Himmler SM, Harker A, Kolb B, Pellis SM, Gibb R. Effects of prenatal exposure to valproic acid on the development of juvenile-typical social play in rats. *Behav Pharmacol* 2015; 26: 707-19.
- Realmuto GM, Ruble LA. Sexual Behaviors in Autism: Problems of Definition and Management. *J Autism Dev Disord* 1999; 29: 121-7.
- Reed DR, Bachmanov AA, Tordoff MG. Forty mouse strain survey of body composition. *Physiol Behav* 2007; 91: 593-600.
- Rezvafard M, Zarrindast MR, Bina P. Role of ventral hippocampal GABA(A) and NMDA receptors in the anxiolytic effect of carbamazepine in rats using the elevated plus maze test. *Pharmacology* 2009; 84: 356-66.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999; 397: 251-5.
- Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Croog VJ. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 417-22.

- Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol* 1996; 370.
- Rogers SJ, Hepburn S, Wehner E. Parent reports of sensory symptoms in toddlers with autism and those with other developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 2003; 33: 631-42.
- Rozenkrantz L, Zachor D, Heller I, Plotkin A, Weissbrod A, Snitz K, Secundo L, Sobel N. A Mechanistic Link between Olfaction and Autism Spectrum Disorder. *Curr Biol* 2015; 25: 1904-10.
- Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 685-97.
- Rudolph U, Möhler H. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014; 54: 483-507.
- Ryan K, Thompson L, Mendoza PA, Chadman KK. Inbred strain preference in the BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism spectrum disorder: Does the stranger mouse matter in social approach? *Autism Res* 2019; 12: 1184-91.
- Saft P, Toledo R, Coria-Avila G, Perez-Pouchoulen M, B B, Hernandez M, Manzo J. Characterization of four types of tail abnormalities in rats treated prenatally with valproic acid. *eNeurobiologia* 2014; 5.
- Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, Murtha MT, Bal VH, Bishop SL, Dong S, Goldberg AP, Jinlu C, Keaney JF, 3rd, Klei L, Mandell JD, Moreno-De-Luca D, Poultney CS, Robinson EB, Smith L, Solli-Nowlan T, Su MY, Teran NA, Walker MF, Werling DM, Beaudet AL, Cantor RM, Fombonne E, Geschwind DH, Grice DE, Lord C, Lowe JK, Mane SM, Martin DM, Morrow EM, Talkowski ME, Sutcliffe JS, Walsh CA, Yu TW, Ledbetter DH, Martin CL, Cook EH, Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, Roeder K, State MW. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* 2015; 87: 1215-33.
- Savić MM, Clayton T, Furtmüller R, Gavrilović I, Samardzić J, Savić S, Huck S, Sieghart W, Cook JM. PWZ-029, a compound with moderate inverse agonist functional selectivity at GABA(A) receptors containing alpha5 subunits, improves passive, but not active, avoidance learning in rats. *Brain Res* 2008; 1208: 150-9.
- Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T, Sr., Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 1179-93.
- Scattoni ML, Gandhi SU, Ricceri L, Crawley JN. Unusual Repertoire of Vocalizations in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism. *PLoS One* 2008; 3: e3067.
- Scattoni ML, Martire A, Cartocci G, Ferrante A, Ricceri L. Reduced social interaction, behavioural flexibility and BDNF signalling in the BTBR T+ tf/J strain, a mouse model of autism. *Behav Brain Res* 2013; 251: 35-40.
- Schain RJ, Freedman DX. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J Pediatr* 1961; 58: 315-20.
- Schiavi S, Iezzi D, Manduca A, Leone S, Melancia F, Carbone C, Petrella M, Mannaioni G, Masi A, Trezza V. Reward-Related Behavioral, Neurochemical and Electrophysiological Changes in a Rat Model of Autism Based on Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 479.
- Schneider M, Koch M. Deficient Social and Play Behavior in Juvenile and Adult Rats after Neonatal Cortical Lesion: Effects of Chronic Pubertal Cannabinoid Treatment. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 944-57.
- Schneider T, Przewlocki R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 80-9.

Schumann CM, Hamstra J, Goodlin-Jones BL, Lotspeich LJ, Kwon H, Buonocore MH, Lammers CR, Reiss AL, Amaral DG. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J Neurosci* 2004; 24: 6392-401.

Schwartz RKW, Thiel CM, Müller CP, Huston JP. Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport* 1998; 9: 1025-9.

Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 2007; 316: 445-9.

Seltzer MM, Krauss MW, Shattuck PT, Orsmond G, Swe A, Lord C. The symptoms of autism spectrum disorders in adolescence and adulthood. *J Autism Dev Disord* 2003; 33: 565-81.

Serajee FJ, Zhong H, Nabi R, Huq AH. The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism. *J Med Genet* 2003; 40: e42.

Servadio M, Melancia F, Manduca A, di Masi A, Schiavi S, Cartocci V, Pallottini V, Campolongo P, Ascenzi P, Trezza V. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. *Transl Psychiatry* 2016; 6: e902-e.

Servadio M, Vanderschuren LJ, Trezza V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist? *Behav Pharmacol* 2015; 26: 522-40.

Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL. Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA receptors containing the alpha5 subunit in the rat brain. *J Comp Neurol* 2006; 499: 458-70.

Shattuck PT, Durkin M, Maenner M, Newschaffer C, Mandell DS, Wiggins L, Lee LC, Rice C, Giarelli E, Kirby R, Baio J, Pinto-Martin J, Cuniff C. Timing of identification among children with an autism spectrum disorder: findings from a population-based surveillance study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2009; 48: 474-83.

Smith AS, Williams Avram SK, Cymerblit-Sabba A, Song J, Young WS. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 1137-44.

Smith JD, Rho JM, Masino SA, Mychasiuk R. Inchworming: a novel motor stereotypy in the BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism. *J Vis Exp* 2014.

Southwick JS, Bigler ED, Froehlich A, DuBray MB, Alexander AL, Lange N, Lainhart JE. Memory functioning in children and adolescents with autism. *Neuropsychology* 2011; 25: 702-10.

Stamenić TT, Poe MM, Rehman S, Santrač A, Divović B, Scholze P, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Ester to amide substitution improves selectivity, efficacy and kinetic behavior of a benzodiazepine positive modulator of GABA(A) receptors containing the $\alpha 5$ subunit. *Eur J Pharmacol* 2016; 791: 433-43.

Stoner R, Chow ML, Boyle MP, Sunkin SM, Mouton PR, Roy S, Wynshaw-Boris A, Colamarino SA, Lein ES, Courchesne E. Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism. *N Engl J Med* 2014; 370: 1209-19.

Stover K, O'Leary TP, Brown R. A computer-based application for rapid unbiased classification of swim paths in the morris water maze. *Proceedings of Measuring Behavior*; 28-31 August 2012; Utrecht, The Netherlands. p. 353-7.

Sur C, Fresu L, Howell O, McKernan RM, Atack JR. Autoradiographic localization of alpha5 subunit-containing GABAA receptors in rat brain. *Brain Res* 1999; 822: 265-70.

Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L, Feuk L, Qian C, Bryson SE, Jones MB, Marshall CR, Scherer SW, Vieland VJ, Bartlett C, Mangin LV, Goedken R, Segre A, Pericak-Vance MA, Cuccaro ML, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, Betancur C, Bourgeron T, Gillberg C, Leboyer M, Buxbaum JD, Davis KL, Hollander E, Silverman JM, Hallmayer J, Lotspeich L, Sutcliffe JS, Haines JL, Folstein SE, Piven J, Wassink TH, Sheffield V, Geschwind DH, Bucan M, Brown WT, Cantor RM,

Constantino JN, Gilliam TC, Herbert M, Lajonchere C, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Miller J, Nelson S, Samango-Sprouse CA, Spence S, State M, Tanzi RE, Coon H, Dawson G, Devlin B, Estes A, Flodman P, Klei L, McMahon WM, Minshew N, Munson J, Korvatska E, Rodier PM, Schellenberg GD, Smith M, Spence MA, Stodgell C, Tepper PG, Wijsman EM, Yu CE, Rogé B, Mantoulan C, Wittemeyer K, Poustka A, Felder B, Klauck SM, Schuster C, Poustka F, Bölte S, Feineis-Matthews S, Herbrecht E, Schmötzer G, Tsiantis J, Papanikolaou K, Maestrini E, Bacchelli E, Blasi F, Carone S, Toma C, Van Engeland H, de Jonge M, Kemner C, Koop F, Langemeijer M, Hijmans C, Staal WG, Baird G, Bolton PF, Rutter ML, Weisblatt E, Green J, Aldred C, Wilkinson JA, Pickles A, Le Couteur A, Berney T, McConachie H, Bailey AJ, Francis K, Honeyman G, Hutchinson A, Parr JR, Wallace S, Monaco AP, Barnby G, Kobayashi K, Lamb JA, Sousa I, Sykes N, Cook EH, Guter SJ, Leventhal BL, Salt J, Lord C, Corsello C, Hus V, Weeks DE, Volkmar F, Tauber M, Fombonne E, Shih A, Meyer KJ. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 2007; 39: 319-28.

Tabor R, Friedrich RW. Pharmacological Analysis of Ionotropic Glutamate Receptor Function in Neuronal Circuits of the Zebrafish Olfactory Bulb. *PLoS One* 2008; 3: e1416.

Tager-Flusberg H, Kasari C. Minimally verbal school-aged children with autism spectrum disorder: the neglected end of the spectrum. *Autism Res* 2013; 6: 468-78.

Tan S, Rudd JA, Yew DT. Gene expression changes in GABA(A) receptors and cognition following chronic ketamine administration in mice. *PLoS One* 2011; 6: e21328.

Tanaka SC, Schweighofer N, Asahi S, Shishida K, Okamoto Y, Yamawaki S, Doya K. Serotonin Differentially Regulates Short- and Long-Term Prediction of Rewards in the Ventral and Dorsal Striatum. *PLoS One* 2007; 2: e1333.

Taylor LE, Swerdfeger AL, Eslick GD. Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine* 2014; 32: 3623-9.

Terranova JP, Chabot C, Barnouin MC, Perrault G, Depoortere R, Griebel G, Scatton B. SSR181507, a dopamine D(2) receptor antagonist and 5-HT(1A) receptor agonist, alleviates disturbances of novelty discrimination in a social context in rats, a putative model of selective attention deficit. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 181: 134-44.

Timić Stamenić T, Joksimović S, Biawat P, Stanković T, Marković B, Cook JM, Savić MM. Negative modulation of $\alpha 5$ GABAA receptors in rats may partially prevent memory impairment induced by MK-801, but not amphetamine- or MK-801-elicited hyperlocomotion. *J Psychopharmacol* 2015; 29: 1013-24.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The Essential Role of Hippocampal CA1 NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in Spatial Memory. *Cell* 1996; 87: 1327-38.

Tu W, Cook A, Scholl JL, Mears M, Watt MJ, Renner KJ, Forster GL. Serotonin in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behavior during amphetamine withdrawal. *Neuroscience* 2014; 281: 35-43.

Tyzio R, Nardou R, Ferrari DC, Tsintsadze T, Shahrokhi A, Eftekhari S, Khalilov I, Tsintsadze V, Brouchoud C, Chazal G, Lemonnier E, Lozovaya N, Burnashev N, Ben-Ari Y. Oxytocin-Mediated GABA Inhibition During Delivery Attenuates Autism Pathogenesis in Rodent Offspring. *Science* 2014; 343: 675-9.

Tzakis N, Holahan MR. Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Front Behav Neurosci* 2019; 13: 233.

Vacher CM, Frérier P, Créminon C, Calas A, Hardin-Pouzet H. Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci* 2002; 22: 1513-22.

Vargas-Caballero M, Martin LJ, Salter MW, Orser BA, Paulsen O. $\alpha 5$ Subunit-containing GABA(A) receptors mediate a slowly decaying inhibitory synaptic current in CA1 pyramidal neurons following Schaffer collateral activation. *Neuropharmacology* 2010; 58: 668-75.

Vetter-O'Hagen CS, Spear LP. Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. *Dev Psychobiol* 2012; 54: 523-35.

- Virk MS, Sagi Y, Medrihan L, Leung J, Kaplitt MG, Greengard P. Opposing roles for serotonin in cholinergic neurons of the ventral and dorsal striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113: 734-9.
- Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006; 1: 848-58.
- Wagner GC, Reuhl KR, Cheh M, McRae P, Halladay AK. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord* 2006; 36: 779-93.
- Wahlsten D, Cooper SF, Crabbe JC. Different rankings of inbred mouse strains on the Morris maze and a refined 4-arm water escape task. *Behav Brain Res* 2005; 165: 36-51.
- Wang J, Feng S, Li M, Liu Y, Yan J, Tang Y, Du D, Chen F. Increased Expression of Kv10.2 in the Hippocampus Attenuates Valproic Acid-Induced Autism-Like Behaviors in Rats. *Neurochem Res* 2019; 44: 2796-808.
- Webb SJ. Impairments in social memory in autism? Evidence from behaviour and neuroimaging. In: Bowler D, Boucher J, editors. *Memory In Autism: Theory and Evidence*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 188-209.
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, Ma SY, Chauhan A, Chauhan V, Bobrowicz TW, de Leon M, Louis LA, Cohen IL, London E, Brown WT, Wisniewski T. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 755-70.
- Weiss LA, Kosova G, Delahanty RJ, Jiang L, Cook EH, Ober C, Sutcliffe JS. Variation in ITGB3 is associated with whole-blood serotonin level and autism susceptibility. *Eur J Hum Genet* 2006a; 14: 923-31.
- Weiss LA, Ober C, Cook EH, Jr. ITGB3 shows genetic and expression interaction with SLC6A4. *Hum Genet* 2006b; 120: 93-100.
- Werling DM, Geschwind DH. Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 2013; 26: 146-53.
- Wilhelm I, Nyúl-Tóth Á, Suciú M, Hermenean A, Krizbai IA. Heterogeneity of the blood-brain barrier. *Tissue Barriers* 2016; 4: e1143544.
- Williams G, King J, Cunningham M, Stephan M, Kerr B, Hersh JH. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev Med Child Neurol* 2001; 43: 202-6.
- Williams PG, Hersh JH. A male with fetal valproate syndrome and autism. *Dev Med Child Neurol* 1997; 39: 632-4.
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 1984; 83: 1-16.
- Wintzer ME, Boehringer R, Polygalov D, McHugh TJ. The Hippocampal CA2 Ensemble Is Sensitive to Contextual Change. *J Neurosci* 2014; 34: 3056.
- Wöhr M, Roullet FI, Crawley JN. Reduced scent marking and ultrasonic vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *Genes Brain Behav* 2011; 10: 35-43.
- Wu HF, Chen YJ, Chu MC, Hsu YT, Lu TY, Chen IT, Chen PS, Lin HC. Deep Brain Stimulation Modified Autism-Like Deficits via the Serotonin System in a Valproic Acid-Induced Rat Model. *Int J Mol Sci* 2018; 19.
- Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand* 2017; 135: 29-41.
- Yang M, Abrams DN, Zhang JY, Weber MD, Katz AM, Clarke AM, Silverman JL, Crawley JN. Low sociability in BTBR T+tf/J mice is independent of partner strain. *Physiol Behav* 2012; 107: 649-62.
- Yang S, Guo X, Dong X, Han Y, Gao L, Su Y, Dai W, Zhang X. GABA(A) receptor subunit gene polymorphisms predict symptom-based and developmental deficits in Chinese Han children and adolescents with autistic spectrum disorders. *Sci Rep* 2017; 7: 3290.

Yerys BE, Wallace GL, Sokoloff JL, Shook DA, James JD, Kenworthy L. Attention deficit/hyperactivity disorder symptoms moderate cognition and behavior in children with autism spectrum disorders. *Autism Res* 2009; 2: 322-33.

Yu JY, Frank LM. Hippocampal-cortical interaction in decision making. *Neurobiol Learn Mem* 2015; 117: 34-41.

Yu Y, Fuscoe JC, Zhao C, Guo C, Jia M, Qing T, Bannon DI, Lancashire L, Bao W, Du T, Luo H, Su Z, Jones WD, Moland CL, Branham WS, Qian F, Ning B, Li Y, Hong H, Guo L, Mei N, Shi T, Wang KY, Wolfinger RD, Nikolsky Y, Walker SJ, Duerksen-Hughes P, Mason CE, Tong W, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Shi L, Wang C. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nat Commun* 2014; 5: 3230.

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

Zaboski BA, Storch EA. Comorbid autism spectrum disorder and anxiety disorders: a brief review. *Future Neurol* 2018; 13: 31-7.

Zamberletti E, Gabaglio M, Woolley-Roberts M, Bingham S, Rubino T, Parolaro D. Cannabidiol Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 367.

Zarnowska ED, Keist R, Rudolph U, Pearce RA. GABAA receptor alpha5 subunits contribute to GABAA, slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. *J Neurophysiol* 2009; 101: 1179-91.

Zhang Q, Wu H, Zou M, Li L, Li Q, Sun C, Xia W, Cao Y, Wu L. Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+^{tf/J} mouse model of autism. *J Nutr Biochem* 2019; 71: 98-109.

Zhang TR, Larosa A, Di Raddo M-E, Wong V, Wong AS, Wong TP. Negative Memory Engrams in the Hippocampus Enhance the Susceptibility to Chronic Social Defeat Stress. *J Neurosci* 2019; 39: 7576.

Zilkha N, Kuperman Y, Kimchi T. High-fat diet exacerbates cognitive rigidity and social deficiency in the BTBR mouse model of autism. *Neuroscience* 2017; 345: 142-54.

Zimmerman AW, Connors SL. Neuroscience. Could autism be treated prenatally? *Science* 2014; 343: 620-1.

Zurek AA, Kemp SW, Aga Z, Walker S, Milenkovic M, Ramsey AJ, Sibille E, Scherer SW, Orser BA. α 5GABAA receptor deficiency causes autism-like behaviors. *Ann Clin Transl Neurol* 2016; 3: 392-8.

Biografija

Anja Santrač je rođena 14.05.1989. u Ljubljani. U Beogradu je završila osnovnu školu „Branko Ćopić“ i prirodno-matematički smer Trinaeste beogradske gimnazije kao nosilac diplome „Vuk Stefanović Karadžić”. Biološki fakultet, smer molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2008/09. i diplomirala 2012. sa prosečnom ocenom 9,61. Iste godine je upisala master studije, modul neurobiologija, i stekla stručni naziv master biolog 2013. sa prosečnom ocenom 9,86. Tokom studija, bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, grada Beograda i Fonda za mlade talente Srbije. Školske 2013/14. upisala je doktorske studije iz Farmakologije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Radila je kao istraživač pripravnik, a potom i kao istraživač saradnik na projektu „Bihejvioralni efekti ponavljane primene novosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora: poređenje sa standardnim psihofarmakološkim lekovima“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije od 2013. do 2019. a od 2019. na projektu H2020 "Preklinička predikcija neželjenih lekova na nervni sistem" u liniji Inicijative za inovativne lekove, oba projekta pod rukovodstvom prof. Miroslava Savića.

U okviru bilateralnog istraživačkog projekta između Austrije i Srbije 2016. boravila je u laboratoriji prof. Margot Ernst u Centru za istraživanje mozga Medicinskog Univerziteta u Beču.

Bila je član „Radne grupe COVID 19“ Direkcije za nacionalne referentne laboratorije Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije u toku 2020. gde je radila na dijagnostici ovog virusa.

Do sada je bila ko-autor 10 radova u međunarodnim časopisima i 18 saopštenja sa međunarodnih skupova.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ања Сантрач

Број индекса 5/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај позитивне модулације GABA_A рецептора који садрже $\alpha 5$ подјединицу на промене понашања мишева и пацова у моделима аутистичних поремећаја

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

Потпис аутора

У Београду, 03.05.2022.



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

Име и презиме аутора Ања Сантрач

Број индекса 5/13

Студијски програм Докторске академске студије, модул Фармакологија

Наслов рада Утицај позитивне модулације GABA_A рецептора који садрже $\alpha 5$
подјединицу на промене понашања мишева и пацова у моделима аутистичних
поремећаја

Ментор проф. др Мирослав Савић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 03.05.2022.



Изјава о коришћењу

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

Утицај позитивне модулације GABA_A рецептора који садрже $\alpha 5$ подјединицу на промене понашања мишева и пацова у моделима аутистичних поремећаја

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

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

Потпис аутора

У Београду, 03.05.2022.



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

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

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

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

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

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