

**UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET**  
**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**  
**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

**Predmet:** Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata mast. biol. Anje Santrač

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 14.04.2022. godine, Odlukom broj 831/2 imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata mast. biol. Anje Santrač, pod naslovom:

**„Uticaj pozitivne modulacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu na promene ponašanja miševa i pacova u modelima autističnih poremećaja“.**

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Bojan Marković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, predsednik
2. Dr sc. Ivan Jančić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Bojan Batinić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Maja Lozić, Research Fellow, Deanery of Biomedical Sciences, Centre for Discovery Brain Sciences, The University of Edinburgh

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći:

## **IZVEŠTAJ**

### **A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija mast. biol. Anje Santrač, pod nazivom „Uticaj pozitivne modulacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu na promene ponašanja miševa i pacova u modelima autističnih poremećaja“, napisana je na 115 strana sa jednostrukim proredom i organizovana u sledećih 7 celina: Uvod (12 strana), Ciljevi rada (1 strana), Materijal i metode (15 strana), Rezultati (51 strana), Diskusija (16 strana), Zaključak (1 strana) i Literatura (19 strana). Na početku, doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku i sadržaj

poglavlja/potpoglavlja, a na kraju kratku biografiju kandidata i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije. Disertacija je napisana jasnim i preglednim stilom i sadrži 48 slika i 5 tabela. Pregled literature sadrži 344 navoda.

**Uvod** sadrži pregled informacija iz literaturnih izvora koji su od značaja za teorijsku osnovu istraživanja koja su sprovedena u okviru doktorske disertacije. U prvom delu opisana je specifična lokalizacija i funkcija  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptora, sa posebnim osvrtom na sazrevanje nervnog sistema i prelazak GABA-e iz ekcitatornog u inhibitorni neurotransmiter (eng. GABA *switch*). Nakon toga je dat pregled o dostupnim literaturnim podacima o ulozi  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptora u procesima kognicije, pre svega o efektu negativnih i pozitivnih alosternih modulatora (PAM) na učenje i pamćenje. Dat je kratak opis PAM-a, MP-III-022 (benzodiazepin čiji je pun hemijski naziv: (R)-8-etinil-6-(2-fluorofenil)-N,4-dimetil-4H-benzofimidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid), čija je selektivnost i bezbednost prethodno okarakterisana, a koji je bio korišćen u izradi disertacije. U drugom delu definisani su poremećaji iz spektra autizma (eng. *Autism spectrum disorders*, ASD), opisani su ključni kriterijumi za uspostavljanje dijagnoze (pre svega socijalni/komunikativni deficiti i restriktivni, repetitivni obrasci ponašanja, interesovanja ili aktivnosti), kao i najčešći komorbiditeti. Dat je pregled potencijalnih uzroka ASD-a, najčešće opisanih promena nervnog sistema kod pacijenata, sa posebnim osvrtom na poremećaje neurotransmitera, a pre svega fokusom na  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptore. Finalno, opisana su dva često korišćena animalna modela autizma, spontani genetički mišji soj BTBR T+ tf/J (BTBR), i animalni model izazvan sredinskim faktorom, pacovi prenatalno izloženi dejstvu valproata.

**Ciljevi rada** su bili da se ispita potencijalni povoljan efekat MP-III-022 u kogniciji, da se ustanovi nivo validnosti sličnosti testiranih animalnih modela, i da se potom primeni MP-III-022 u animalnom modelu koji je ispunio neophodne kriterijume. Konkretno, u svrhu realizacije istraživanja definisani su ciljevi koji su obuhvatali: 1) ispitivanje MP-III-022 u različitim testovima memorije i na nivo GABRA5 iRNK u odabranim regionima mozga; 2) ispitivanje validnosti sličnosti BTBR animalnog modela (i potencijalno konstruktivne validnosti); 3) ispitivanje validnosti sličnosti valproatnog animalnog modela (i potencijalno konstruktivne validnosti); 4) ispitivanje efekata primene MP-III-022 na izabrani model ASD-a u pogledu ponašanja, neuronske funkcije i ekspresije izabranih gena.

Ciljevi rada su dobro postavljeni.

Poglavlje **Materijal i metode** daje detaljan opis korišćene metodologije i organizovano je u četiri potpoglavlja: 1) Ispitivanje uticaja MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju  $\alpha 5$  podjedinice; 2) Karakterizacija mišjeg modela ASD-a; 3) Karakterizacija pacovskog modela ASD-a; 4) Ispitivanje uticaja primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a.

Tokom istraživanja upotrebljeno je oko 40 miševa BTBR soja, oko 50 miševa C57BL/6J (C57BL) soja i oko 550 pacova *Wistar* soja. Sve eksperimentalne procedure sprovedene su u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod naslovom „Bihejvioralni efekti ponavljane primene nosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove GABA<sub>A</sub> receptora: poređenje sa standardnim psihofarmakološkim lekovima” (2011-2019). Prilikom rada sa eksperimentalnim životinjama primenjavani su etički principi definisani Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i EU direktivom 2010/63/EU.

Ispitivanje efekata MP-III-022 na kogniciju zdravih životinja realizovano je kroz testiranje adultnih *Wistar* mužjaka u testovima memorije koji ne uključuju uslovljavanje (da bi se izbegli dodatni efekti nagrade ili kazne). Ispitivanje je uključivalo ispitivanje prostorne memorije Morisovim vodenim lavirintom, ispitivanje pre svega vizuelne memorije testom prepoznavanja novog objekta i ispitivanje socijalne memorije testom socijalne diskriminacije. Svaki test je sproveden u dve modifikacije; jedna sa fokusom na kratkotrajnu memoriju, druga na dugotrajnu memoriju. U svim paradigmama ispitivana je akutna primena doza koje su prethodno ustanovljene kao bezbedne i selektivne (Stamenić i sar., 2016): 1 mg/kg, 2,5 mg/kg i 10 mg/kg. Jedino je efekat ponavljane primene najmanje doze testiran u varijantama za ispitivanje dugotrajne memorije sva tri testa (kao posledica dobijenih rezultata u dugotrajnom Morisovom vodenom lavirintu). Na osnovu bihevioralnih rezultata, odabrane su kombinacije doza i vreme testiranja koje su primenjene na posebnu kohortu životinja. Ovi pacovi su nakon toga žrtvovani i njihov prefrontalni korteks i CA1 i CA2 region hipokampusa je uzet i čuvan na -80 °C do izolacije RNK, njene konverzije u komplementarnu DNK i naknadnog sprovođenja *Real-time* PCR testa sa prajmerima za GABRA5 i  $\beta$ -aktin. Dobijeni rezultati su analizirani jednofaktorskim ANOVA testom, a gde je pored tretmana i vreme postojalo kao faktor, jednofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem.

U drugom setu eksperimenata ispitana je validnost sličnosti BTBR soja miševa kao potencijalnog modela ASD-a poređenjem sa C57BL sojem kao kontrolom. Testirani su miševi oba pola, u dva uzrasta: juvenilnom/prepubertetskom (oko 30. postnatalnog dana, P30) i odraslom (oko 90. postnatalnog dana, P90). Sve životinje su prošle neurološke testove po zalučivanju od majki. Ukoliko se nije otkrio neurološki defekt, miševi su ulazili u bihevioralnu bateriju u jednom od dva pomenuta perioda. Bihevioralna baterija se sastojala iz: testa socijalne interakcije, uzdignutog plus lavirinta, testa spontane lokomotorne aktivnosti, testa tri prostorije, Morisovog vodenog lavirinta, testa olfaktorne diskriminacije, testa obeležavanja teritorije kao odgovor na miris (samo za adultne miševe). Iste životinje nisu prolazile testiranje u oba perioda, da ne bi iskustvo stečeno u prvom setu testova uticalo na naredni (eng. *carryover effect*). Dobijeni rezultati su analizirani dvofaktorskim ANOVA testom, a gde je pored soja i pola i vreme postojalo kao faktor, dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem.

Treći set eksperimenata je podrazumevao ispitivanje validnosti sličnosti valproatnog modela ASD-a. Ovaj model je generisan tako što su trudne *Wistar* ženke 12,5 embrionalnog dana tretirane jednom intraperitonealnom dozom (2 ml/kg) od 500 mg/kg natrijum valproata (VPA grupa). Istovremeno je ženkama iz kontrolne grupe (eng. *control*, CTRL) primenjen fiziološki rastvor u istoj zapremini. Kao i za ispitivanje mišjeg modela, mladunci oba pola podvrgnuti su bihevioralnom testiranju u dva perioda: P30 i P90. Razlika je bila u tome što su testirane 2-3 životinje istog pola po jednom leglu. Svi mladunci su podvrgnuti nizu neuroloških testova (P7-16), a par dana nakon toga je započela bihevioralna baterija sa testom socijalne interakcije posle koje su pacovi odvojeni u dve kohorte. Prva kohorta je prošla test spontane lokomotorne aktivnosti i Morisov voden lavirint, a druga uzdignuti plus lavirint i test tri prostorije. Životinje su opet ušle u testiranje kao adulti, prvo sve zajedno u testu socijalne interakcije, a potom su se kohorte opet odvojile. Nakon odvajanja, prva kohorta je testirana u uzdignutom plus lavirintu i u testu tri prostorije, a potom i u testu obeležavanja teritorije kao odgovor na miris. Druga kohorta je prošla testove spontane lokomotorne aktivnosti i Morisovog vodenog lavirinta. 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 se smatralo da će

socijalnost pacova da prevagne nad bilo kakvim *carryover* efektom, a pružilo je veći broj parova za analizu. Za pacovski model ASD-a je dodatno ispitana i konstruktivna validnost, na nivou neurotransmitera, analiziranjem GABA-e, glutamata, serotonina, dopamina, noradrenalina i acetilholina u olfaktornom bulbusu, frontalnom korteksu, strijatumu, dorzalnom i ventralnom hipokampusu i cerebelumu. Korišćena je ista statistika kao za mišji model ASD-a.

Finalno, ispitan je uticaj subakutne primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a, tako što je prvo sprovedeno farmakokinetičko ispitivanje. Posebnoj kohorti životinja koje su obuhvatale i VPA i CTRL mladunce oba pola, MP-III-022 je primenjivan tokom 7 dana (P21-27) u 3 doze. Ove životinje su žrtvovane u izabrane 4 vremenske tačke, i njihovi celi mozgovi su obrađivani i merena je koncentracija liganda. Ekstrapolacijom ovih rezultata na prethodno dobijene (Stamenić i sar., 2016) dobijena je aproksimacija elektrofiziološkog odgovora procenjene slobodne koncentracije MP-III-022. Nakon odabira doza, i VPA i CTRL pacovi oba pola tretirani su svakog dana (P21-27) 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 odabran zato što je svaka životinja u ovom slučaju direktno dobijala svoj pojedinačni tretman. Po završetku tretmana životinje su ulazile u bihevioralnu bateriju, koja se sastojala od socijalne interakcije, uzdignutog plus lavirinta, testa spontane lokomotorne aktivnosti i Morisovog vodenog lavirinta. Za bateriju su odabrani testovi i parametri iz prethodnog seta eksperimenata 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. Pored toga, primarne hipokampalne ćelijske kulture su izolovane iz novorođenih (P0) *Wistar* pacova čije su majke bile tretirane fiziološkim rastvorom (CTRL ćelije) ili valproatom (VPA ćelije). Ćelije su testirane metodom oslikavanja kalcijuma (eng. *calcium imaging*) 13. dana u kulturi (eng. *day in vitro*, DIV), DIV 13, i ispitivana je osnovna razlika 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  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptore) rastvorenog u fiziološkom rastvoru (eng. *saline*, SAL; ista zapremina SAL-a dodata za kontrolu) na DIV 13. Ćelije su isprane na DIV 15 i ispitane metodom oslikavanja kalcijuma. Pored toga, odvojena kohorta životinja je žrtvovana nakon sedmodnevnog tretmana, njihov hipokampus izolovan i korišćen za *Real-time* PCR kojim je analiziran nivo iRNK GABRA5, NKCC1, KCC2 i  $\beta$ -aktina. Dobijeni rezultati su analizirani trofaktorskim ANOVA testom (faktori: prenatalni tretman, pol i postnatalni tretman), a gde je i vreme postojalo kao faktor, trofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem. 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.

Što se tiče korišćenih softvera, ponašanje životinja u *in vivo* testovima praćeno je kamerom na plafonu povezanom sa ANY–maze softverom (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD), a aktivnost ćelija VisiView high-performance imaging softverom (Visitron Systems, Nemačka). 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).

Primenjena metodologija je adekvatna za realizaciju postavljenih ciljeva.

**Rezultati** istraživanja prikazani su na pregledan način, tekstualno i grafički, korišćenjem 39 slika i 3 tabele. Grupisani su u četiri celine: 1) Uticaj MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju  $\alpha 5$  podjedinice; 2) Mišji model ASD-a; 3) Pacovski model ASD-a; 4) Uticaj primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a.

**Diskusija** sadrži analizu dobijenih eksperimentalnih rezultata na bazi koje su doneti odgovarajući zaključci istraživanja, uz pregled i poređenje sa rezultatima koji su dostupni u literaturi. Poglavlje Diskusija napisano je analogno rezultatima u četiri celine: 1) Uticaj MP-III-022 na učenje, pamćenje i gensku ekspresiju  $\alpha 5$  podjedinice; 2) Mišji model ASD-a; 3) Pacovski model ASD-a; 4) 5.4. Uticaj primene MP-III-022 na pacovski model ASD-a.

Poglavlje **Zaključak** sadrži sažeto prikazane najvažnije zaključke proistekle iz rezultata istraživanja i njihove analize, a koji su u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 344 referenci koje su korišćene u doktorskoj disertaciji, citirane Harvardskim stilom.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u četiri celine, u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja.

U **prvom delu** je otkrivena određena vrsta dvojnog obrasca dozne zavisnosti efekata na kognitivne procese i gensku ekspresiju u raznim moždanim regionima. U zavisnosti od korišćenog testa i protokola, doze koje dovode do blage ili izražene aktivacije  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> 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 bihejvioralne 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. Dodatno je pokazano da je ponovljena primena najniže doze 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.

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<sub>A</sub> receptora, dok je bazalni nivo u CA1 bio relativno visok i sklon smanjenju posle tretmana sa MP-III-022. 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 hipokampusa. Što se tiče 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<sub>A</sub> receptora. Sa druge strane, smanjenje iRNK GABRA5 u CA1 regionu je primećeno 30 min posle niske doze i 24 h posle visoke doze.

U **drugom delu** predstavljeni su rezultati ispitivanja validnosti sličnosti BTBR miševa. Bihejvioralni testovi su pokazali: povećanu socijabilnost juvenilnih BTBR miševa i to u dva različita testa, povećanu socijabilnost odraslih BTBR mužjaka u testu tri prostorije, ali smanjenu socijabilnost odraslih BTBR mužjaka u testu socijalne interakcije; povećano timarenje juvenilnih BTBR miševa u dva različita testa, povećano timarenje odraslih BTBR ženki u testu socijalne interakcije i povećano kopanje šuške juvenilnih BTBR mužjaka; manju anksioznost BTBR miševa u oba uzrasta; veće brzine i veće pređene distance juvenilnih BTBR miševa, ali i smanjenu lokomotornu aktivnost odraslih BTBR ženki; povećan broj rotacija juvenilnih BTBR ženki, povećan broj rotacija u smeru suprotnom od kazaljke na satu BTBR soja u juvenilnom periodu i oba pola adultnih BTBR miševa; oštećeno prostorno učenje i snalaženje BTBR miševa oba uzrasta po nizu parametara; normalnu olfaktornu diskriminaciju BTBR miševa, čak i bolju kod juvenilnih BTBR mužjaka u odnosu na C57BL mužjake.

U **trećem delu** predstavljeni su rezultati ispitivanja validnosti sličnosti i konstruktivne validnosti VPA pacova. Bihejvioralni testovi su pokazali: manju socijabilnost, pre svega manje igranja juvenilnih VPA mužjaka i manju socijabilnost adultnih VPA životinja, pre svega mužjaka u testu socijalne interakcije, i slično, smanjenu socijabilnost oba pola i oba uzrasta u testu tri prostorije; povećano timarenje juvenilnih VPA pacova i odraslih VPA mužjaka u testu socijalne interakcije, ali povećano timarenje samo kod VPA ženki oba uzrasta u testu sponatne lokomotorne aktivnosti; povećanu anksioznost i juvenilnih i odraslih VPA pacova; povećanu brzinu i pređenu distancu VPA adultnih ženki; povećan broj rotacija, pogotovo broja rotacija u smeru kazaljke na satu VPA juvenilnih mužjaka i VPA odraslih životinja, povećan broj rotacija u smeru suprotnom kazaljci na satu VPA odraslih ženki; oštećenu socijalnu memoriju kod juvenilnih VPA mužjaka i donekle ženki i odraslih VPA ženki; sporije prostorno učenje VPA juvenilnih životinja i VPA odraslih mužjaka, ali sa dostizanjem nivoa CTRL životinja, povećano vraćanje u prethodnu ciljnu regiju u reverznom testu (u oba uzrasta i oba pola); smanjena olfaktorna diskriminacija adultnih VPA mužjaka. Analiza nivoa neurotransmitera je pokazala razlike između VPA i CTRL životinja oba pola i uzrasta u svim ispitivanim molekulima i regionima mozga, u različitim kombinacijama.

U **četvrtom delu** prikazani su efekti primene MP-III-022 na VPA animalni model. Nevezano za pol ili prenatalni tretman, nije bilo razlike u koncentraciji MP-III-022 u mozgu. VPA životinje su u određenoj meri pokazale deficite u svim bihejvioralnim testovima. MP-III-022 dat kontrolnim životinjama je dovodio ili pokazivao tendenciju da izaziva isti tip promene kao i prenatalni tretman sa valproatom u nizu praćenih parametara. Sa druge strane, primena ovog liganda u nižoj dozi VPA mužjacima je uspela da vrati poremećaje na kontrolni nivo za većinu parametara; viša doza je u potpunosti ili delimično pomogla VPA ženkama u nešto manjem broju deficita. Što se tiče razlika na ćelijskom nivou, GABA *switch* je kasnio kod VPA neurona, koji dodatno nisu razvili spontane oscilacije kalcijuma u istoj meri kao CTRL neuroni. Kao i sa bihejvioralnim 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. Ispitivanje ekspresije gena je pokazalo sledeće: tretman sa PAM je smanjio ekspresiju GABRA5 u CTRL životinjama, VPA ženke su imale blago smanjeni nivo hipokampalnog GABRA5, a tretman sa MP1 je povećao ekspresiju GABRA5 kod VPA ženki; VPA mužjaci i CTRL mužjaci tretirani sa MP-III-022 imali su smanjen nivo NKCC1; nivo KCC2 je blago smanjen kod VPA ženki, dok je viša doza uspela da povrati ovaj nivo na kontrolni.

### C. UPOREDNA ANALIZA POSTIGNUTIH REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

U okviru ove disertacije pokazana je dihotomija između blage i izražene pozitivne modulacije  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptora prepoznata u nekoliko šablona. Dobijeni nalazi pokazuju da PAM-ovi mogu imati ili nepovoljan ili povoljan efekat na memorijske procese, u zavisnosti od korišćene doze i upotrebljene procedure. Iako retki, podaci o takvim bifaznim efektima postoje u literaturi. Niska doza agoniste serotoninškog 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).

Dodatno, primećeno je blago poboljšanje memorije u dugotrajnim testovima prepoznavanja objekta i socijalne diskriminacije kao posledica primene rastvarača životinjama koje su 24 h pre toga primile nisku dozu liganda. Autor objašnjava ovakav nalaz teorijom 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.

Što se tiče analize ekspresije GABRA5, 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).

Ekspresione promene  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> 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. Dobijeni rezultati se slažu sa poznatom ulogom CA2 u socijalnoj memoriji (Tzakis i Holahan, 2019). Kako je objekat jedina stvar koja se menja u opisanom 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<sup>+/-</sup> 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 rezultatima doktorske disertacije koji su pokazali sličan fenomen.

U disertaciji se dalje ispitala validnost sličnosti spontanog genetičkog modela ASD-a, BTBR soja miševa. U testu ispitivanju socijalne interakcije, dobijen je neočekivan rezultat: juvenilni BTBR miševi su pokazali izrazitu socijalnost, veću od kontrolnog soja, što nije u skladu sa prethodnim nalazima (Bales i sar., 2014, McFarlane i sar., 2008, Yang i sar., 2012). 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 socijalnosti BTBR miševa nisu jednoznačni i da zahtevaju još ispitivanja. 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).

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).

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 mogu da se porede dobijeni nalazi. 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 dobijenim nalazom. Dalje ispitivanje je pokazalo da, kada odrastu, BTBR miševi više nemaju izraženu ovu osobinu, što nije u skladu dostupnom literaturom o adultnim BTBR miševima, pogotovo nalaz da je kod BTBR ženke 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). Što se tiče drugog praćenog oblika repetitivnog ponašanja, povećan broj rotacija određenog smera, i to baš smera suprotnom kazaljci sata, odgovara nalazu dobijenom tokom ispitivanja drugog mišjeg modela autizma (Grabrucker i sar., 2017).

Test tri prostorije je potvrdio 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 (Cope i sar., 2021, McFarlane i sar., 2008, Moy i sar., 2007). Međutim, čak i u pomenutoj studiji (Moy i sar., 2007) poređenjem samog vremena koje su BTBR miševi provodili njušeći 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 disertaciji, 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 rezultatima disertacije.

Dobijeni 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 takođe pokazuju da je BTBR soju trebalo više vremena da nađe platformu. Sa druge strane su studije koje su potvrdile nalaze disertacije, da je prostorno snalaženje navođeno ciljem značajno oštećeno kod BTBR soja miševa po nizu parametara (Faraji i sar., 2018). Takođe postoje neslaganja u literaturnim nalazima što se tiče reverznog učenja, što otežava da se dođe do jasnog zaključka povodom ove sposobnosti kod BTBR miševa.

Rezultati disertacije ukazuju da BTBR miševi nemaju poremećenu olfaktornu diskriminaciju. Nalazi 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).

Dobijen nalaz 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).

Uzimajući sve dobijene rezultate u obzir, autor je smatrao da BTBR soj ne ispunjava dovoljno kriterijume da bi zadovoljio validnost sličnosti sa ASD-om što je na adekvatan način diskutovano u okviru disertacije.

U disertaciji se dalje diskutuje o valproatnom animalnom modelu. Praćenje socijalne interakcije je pokazalo da se juvenilni VPA mužjaci manje igraju u odnosu na CTRL mužjake. Ovo je u skladu sa pređašnjom literaturom (Schiavi i sar., 2019, Schneider i Przewłocki, 2005). Ispitivanje u adultnom periodu je pokazalo produbljanje razlika, gde su sad VPA životinje, pre svega mužjaci, ispoljavali smanjeno socijalno ponašanje po većem broju parametara, što odgovara prethodnim studijama (Markram i sar., 2008). 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).

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).

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 autor nisu dobili razlike (Banerjee i sar., 2014), ili čak dobili smanjenu lokomociju (Kerr i sar., 2013). Dodatno, pokazana je preferencija za smer rotacija kod juvenilnih VPA mužjaka, što odgovara nalazu dobijenom tokom ispitivanja drugog modela autizma (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 objavljenim studijama (Bambini-Junior i sar., 2011, Dai i sar., 2018).

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 dobijenim nalazima smanjene socijalne memorije (Bambini-Junior i sar., 2014). Zanimljivo, ali ista grupa je u drugom radu potvrdila i drugi nalaz disertacije, da adultni VPA mužjaci prepoznaju novog pacova (Bambini-Junior i sar., 2011).

Morisov vodeni lavirint je otkrio da VPA juvenilne životinje i VPA odrasli mužjaci sporije i teže uče u odnosu na kontrolne pacove. Oštećeno prostorno učenje jeste i pre pokazano kod VPA pacova (Hou i sar., 2018, Rajizadeh i sar., 2019). Ipak, autor zaključuje da, s obzirom da VPA pacovi imaju razumevanje šta je cilj testa i vremenom izlaze iz periferije i traže platformu, nalaz povećanog vraćanja u prethodnu ciljnu regiju u reverznom testu je bar delimično posledica restriktivnog obrasca ponašanja. Dobijeni nalaz kognitivne rigidnosti (u oba uzrasta i oba pola) je potvrđen 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. Međutim, 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).

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), dobijeni rezultati nisu pokazali razliku između pacova različitih prenatalnih tretmana, što nije u skladu sa već objavljenim radovima (Harding i sar., 2021), a što autor objašnjava mogućom posledicom modifikacije protokola primenjenog u disertaciji.

Zbog svega prethodno navedenog autor zaključuje da je valproatni model dovoljno dobar animalni model ASD-a i odlučuje da na njemu sprovede dalja ispitivanja.

Analiza nivoa neurotransmitera valproatnog modela je dala rezultate koji su opširno diskutovani u okviru disertacije. Dat je pregled dostupne literature u pogledu svakog ispitivanog neurotransmitera i rezultata dobijenih u animalnim modelima i pacijentima sa ASD-om, kao i veze sa analiziranom moždanom strukturom. Dosadašnji radovi daju veoma oprečne podatke, tako da je teško doći do jasnih zaključaka, dodatno otežano činjenicom da je nemoguće izvoditi zaključke na bazi samo jednog neurotransmitera, u samo jednoj strukturi. U skladu sa tim, autor ističe da iako dobijeni rezultati pokazuju da valproatni animalni model donekle ispunjava konstruktivnu validnost, taj zaključan je upitan zbog heterogenih nalaza dobijenih ispitivanjem pacijenata sa ASD-om.

Poslednji deo disertacije se bavi analiziranjem efekata subakutne primene MP-III-022, selektivnog PAM-a  $\alpha 5$  GABAA receptora, u valproatnom animalnom modelu ASD-a u periodu nakon zalučivanja.

Dobijeni bihevioralni rezultati su potvrdili pređašnje nalaze u disertaciji i mnoge literaturne rezultate diskutovane u kontekstu tih nalaza. Svi potvrđuju da juvenilne VPA životinje pokazuju socijalne deficite i repetitivne i restriktivne obrasce ponašanja. Pojava da MP-III-022 dat VPA životinjama pomaže vraćanju njihovog ponašanja na kontrolni nivo, a primenjen CTRL pacovima dovodi do ponašanja sličnom onom kod VPA životinja, primećena je i ispitivanjem odgovora neurona i genske ekspresije. Rezultat da CTRL životinje tretirane ligandom i VPA ženke imaju manje GABRA5 je u skladu sa nizom studija koje su povezale ASD sa smanjenom

ekspresijom  $\alpha 5$  podjedinice (Blatt i sar., 2001, Fatemi i sar., 2010, Fatemi i sar., 2009). Sa druge strane, pojava da MP-III-022 1 mg/kg izaziva povećanje GABRA5 kod VPA ženki i popravljiva bihevioralne deficite i spontanu neuronalnu aktivnost, podržana je pokazanim povećanim prilivom kalcijuma u dendrite i kratkotrajnoj sinaptičkoj plastičnosti koja sledi posle aktivacije  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptora (Chiu i sar., 2020). Što se tiče nalaza da su VPA i CTRL mužjaci tretirani sa MP-III-022 imali sličan način ponašanja i isti smer promena u ekspresiji NKCC1, jeste neočekivano da se nivo NKCC1 smanjio u pomenutim grupama. To je dovelo do povećanja KCC2/NKCC1 odnosa, od čega bi se očekivalo da dovede do normalnog GABA *switch*-a i zrelosti neurona (Rivera i sar., 1999); međutim, obrnuto je primećeno u rezultatima disertacije. Moguće objašnjenje bi se moglo naći u radu koji je pokazao da inhibicija NKCC1 dovodi do oštećenog formiranja dugotrajne potencijacije u hipokampusu (Ko i sar., 2014). Ispitivanje KCC2 je pokazalo blago smanjen nivo kod VPA ženki, što je potvrda prethodne studije (Tyzio i sar., 2014). U skladu sa teorijom o GABA *switch*-u, MP-III-022 1 mg/kg je uspeo da povрати ovaj deficit, što odgovara i dobijenim bihevioralnim rezultatima.

U disertaciji je pokazano da je niža doza MP-II-022 imala izraženiji efekat na mužjake, a viša na ženke, međutim kod ženki tretman nije bio tako uspešan. Pojava da polovi daju drugačiji odgovor posle primene selektivnog PAM  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptora je takođe već bila demonstrirana (Batinić i sar., 2017, Piantadosi i sar., 2016). Dodatno, polno zavisni obrasci profila ekspresije hloridnih kotransportera, kao i samog sazrevanja signalizacije GABA-e, dobro su poznati (Galanopoulou, 2008). Iako u disertaciji nisu replikovane uobičajene razlike u polovima u nivou KCC2/NKCC1, autor daje objašnjenje u pogledu korišćenja zrelijih životinja u odnosu na vreme kada se uspostavljaju nivoi hloridnih kotransportera (P30 u poređenju sa P4-14 u pomenutim studijama).

## Citirana 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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, Schwartsmann 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.

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.

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.

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.

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Rooney RJ, Patel DH, Thuras PD. mRNA and protein levels for GABAA $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\beta$ 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.

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

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.

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.

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.

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.

Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ. Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* 2006; 10: 152-8.

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.

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.

Kumar H, Sharma B. Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. *Brain Res Bull* 2016; 124: 27-39.

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

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.

Rajizadeh MA, Afarinesh MR, Zarif M, Mirasadi A, Esmaeilpour K. Does caffeine therapy improve cognitive impairments in valproic acid rat model of autism? *Toxin Rev* 2019; 1-11.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 2000; 3: 238-44.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999; 397: 251-5.

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.

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 T, Przewłocki R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 80-9.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Wintzer ME, Boehringer R, Polygalov D, McHugh TJ. The Hippocampal CA2 Ensemble Is Sensitive to Contextual Change. *J Neurosci Res* 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.

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.

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

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.

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 Res* 2019; 39: 7576.

## **D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **Naučni radovi objavljeni u međunarodni časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)**

1. Santrač A, Bijelić D, Stevanović V, Banićević M, Arandžević J, Batinić B, Sharmin D, Cook JM, Savić MM. Postweaning positive modulation of  $\alpha 5$ GABAA receptors improves autism-like features in prenatal valproate rat model in a sex-specific manner. *Autism Res*. 2022. doi: 10.1002/aur.2699. Epub ahead of print. (IF 5,216 za 2020; 4/53 Behavioral Sciences)

### **Naučni radovi objavljeni u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)**

1. Santrač A, Batinić B, Stamenić TT, Arandžević J, Sharmin D, Knutson DE, Cook JM, Savić MM. Positive modulation of  $\alpha 5$ GABAA receptors leads to dichotomous effects in rats on memory pattern and GABRA5 expression in prefrontal cortex and hippocampus. *Behav*

**Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34)**

1. Santrač A, Timić Stamenić T, Batinić B, Divović Matović B, Stanković T, Poe M, Cook J, Savić M. Effects of MP III 022, positive modulator of alpha 5 containing GABAA receptors on learning and memory. European College of Neuropsychopharmacology, Copenhagen, Denmark, 07-10.09.2019.
2. Santrač A, Timić Stamenić T, Batinić B, Divović Matović B, Stanković T, Poe M, Cook J, Savić M. Effects of enhanced activation of alpha 5 containing GABAA receptors on learning and memory. FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, 10-13.07.2019.
3. Santrač A, Poe MM, Banicević M, Arandelović J, Cook J, Savić MM. The enhanced activation of alpha5GABAA receptor ameliorates repetitive and restricted behavior in rat model of autism. 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, Germany, 07-11.07.2018.
4. Santrač A, Savić M. M. Gender and age differences in sociability and resistance to change in a valproate model of autism in rats. 29th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP), Vienna, Austria, 17-20.10.2016. European Neuropsychopharmacology 2016; 26 (Suppl 2): S285-S286.

**Saopštenja na skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)**

1. Santrač A, Banićević M, Arandelović J, Marković B, Li G, Cook J, Savić M. The valproate rat model reveals positive modulation of alpha5GABAA receptors as a novel target for treatment of autism spectrum disorder. VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 10-14.10.2018.

**E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Rezultati ove doktorske disertacije su dali značajan uvid o ulozi  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> 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 ASD-a, što do sada nije urađeno. Dodatno, potvrđena je i produbljena slika o ulozi  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub> receptora u patogenezi bolesti. Najbitnije, disertacija je ukazala na 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.



## F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu pregleda doktorske disertacije mast. biol. Anje Santrač pod nazivom „**Uticaj pozitivne modulacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu na promene ponašanja miševa i pacova u modelima autističnih poremećaja**“ može se zaključiti da je kandidat ispunio postavljene ciljeve i da rezultati prikazani u disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos, što je potvrđeno njihovim objavljivanjem u obliku dva rada u međunarodnim časopisima.

Komisija, stoga, predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan Izveštaj i nakon dobijanja saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu odobri mast. biol. Anji Santrač javnu odbranu doktorske disertacije.

Beograd, 13.05.2022. god.

### Članovi Komisije:

---

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

---

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

---

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

---

Dr sc. Maja Lozić, Research Fellow  
Deanery of Biomedical Sciences, Centre for Discovery  
Brain Sciences, The University of Edinburgh