

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Joko Lj. Poleksić

**MORFOLOŠKE, BIOHEMIJSKE I
BIHEJVIORALNE PROMENE U MEDIJALNOM
PREFRONTALNOM I ORBITOFRONTALNOM
KORTEKSU MOZGA PACOVA USLOVLJENE
MATERNALNOM DEPRIVACIJOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Joko Lj. Poleksić

**MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND
BEHAVIORAL CHANGES IN MEDIAL
PREFRONTAL AND ORBITAL FRONTAL
CORTEX OF RAT INDUCED BY MATERNAL
DEPRIVATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor: dr Milan Aksić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor: dr Branka Marković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja

Članovi komisije:

dr Dubravka Aleksić, docent
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Tatjana Nikolić, docent
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Maja Vulović, redovni profesor
Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet

Datum odbrane:

Zahvaljujem se

pok. prof. dr Branislavu Filipoviću, koji mi je omogućio ulazak u svet naučnog istraživanja i visokog obrazovanja, a poverenje koje mi je pružio predstavlja doživotnu inspiraciju i odgovornost.

prof. dr Milanu Aksiću, svom mentoru i učitelju na bezrezervnoj podršci, razumevanju i ukazanom poverenju tokom izrade doktorske disertacije.

prof. dr Branki Marković, čija je podrška i dostupnost u gotovo svakom trenutku imala veliki doprinos tokom izrade doktorske disertacije

prof. dr Adonisu Stamatakisu, svom učitelju i uzoru na prenesenom znanju, inspiraciji, strpljenju i stalnim usmerenjima koja su umnogome formirala moj odnos prema neuronaukama.

prof. dr Igoru Jakovčevskom, na dragocenim savetima, neumornom ohrabrivanju i ukazanim prilikama koja naš tim vode ka novim izazovima.

Članovima komisije doc. dr Dubravki Aleksić, doc. dr Tatjani Nikolić i prof. dr Maji Vulović na temeljnom čitanju i dobrim usmerenjima koji su podigli kvalitet ove disertacije

doc. dr Dubravki Aleksić i dr Slobodanu Kaporu na saradnji i pomoći, kao i njihovoj dobroti koja je ispunila prethodne godine.

prof. dr Aleksandru Malikoviću i prof. dr Katrin Amunts, koji su mi omogućili stručno usavršavanje u Nemačkoj, tokom kojeg su pripremljene fotomikrografije na Univerzitetu u Diseldorfu.

Slaviši Đukiću, na pomoći u laboratoriji, iskrenosti i prijateljstvu.

dr Mini Perić, na prenesenom znanju i ogromnoj pomoći u laboratorijskom radu.

dr Gorani Agatonović, Marini Radović i Aleksi Miciću na pomoći u laboratorijskom radu.

dr Tihomiru Stojkoviću i laboratoriji za Neuronauke, Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju.

Svim članovima Instituta za Anatomiju „Niko Miljanić“.

Svim članovima Centra za lasersku mikroskopiju.

dr Janjiću, dr Čegar, dr Dimitrijeviću i Klinici za Urologiju KCS.

Majci Vesni, ocu Ljubomiru i sestri Leni, na ljubavi koju ste mi pružili i vrednostima koje ste me naučili da cenim.

Svojim prijateljima, na podršci, motivaciji i svim godinama koje su iza nas.

Janji, jer i u dobru i u zlu ispunjavaš moj dan osmehom i ljubavlju...

mojim roditeljima

Morfološke, biohemijske i bihevioralne promene u medijalnom prefrontalnom i orbitofrontalnom korteksu mozga pacova uslovljene maternalnom deprivacijom

Sažetak

Traumatska iskustva proživljena tokom ranog životnog doba povećavaju mogućnost razvoja psihičkih oboljenja kasnije tokom života. Kako bi ispitali uticaj ranog traumatskog iskustva (RTI) na morfološke, biohemijske i funkcionalne osobine prefrontalne kore (PFC), moždanog regiona koji se odlikuje visokom osetljivošću na stres, Wistar pacove 9 dana starosti podvrgli smo 24 – časovnoj maternalnoj deprivaciji (MD). Kod mladih adultnih mužjaka pacova, detaljna anatomsko imunohistohemijska analiza subregiona PFC - a je pokazala smanjenje GAD67 i CCK imunopozitivnih ćelija u površinskim slojevima medijalne orbitalne kore (MO) dok je u rostralnom delu ventrolateralne orbitalne kore (roVLO) smanjena gustina GAD67 imunopozitivnih ćelija bila prisutna u celokupnoj debljini kore. Površinski slojevi rostralnog dela cingularne kore (roCg1) i duboki slojevi prelimbičke kore (PrL) takođe su bili pogođeni ranim odvajanjem mladunaca od majke, pri čemu je u ovim subregionima MD uzrokovala smanjenje gustine PV imunopozitivnih ćelija. Strukturne promene GABAergičkog sistema bile su praćene ushodnom regulacijom BDNF – a, uz odsustvo opšte mikroglijalne aktivacije kako u neoenatalnom tako i u mladom adultnom dobu, kako je utvrđeno metodom Western blot. Kada je kod mladih adultnih MD životinja ispitana kognitivna fleksibilnost u T – lavirintu, pronađeno je suptilno oštećenje reverznog učenja što ukazuje na blago oštećenje funkcije PFC – a. Sveukupno, rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da MD uzrokuje subregion zavisno smanjenje gustine interneurona, praćeno povećanjem sinaptičke plastičnosti i disfunkcijom PFC – a. Takođe, dobijeni rezultati ističu kompleksnu prirodu uticaja RTI na razvoj interneurona, ali i značaj očuvanosti GABAergičkog sistema u kognitivnom funkcionisanju.

Ključne reči: maternalna deprivacija, prefrontalna kora, interneuroni, parvalbumin, holecistokinin, sinaptička plastičnost, BDNF, mikroglija, kognitivna fleksibilnost

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Neuronauke

UDK broj:

Morphological, biochemical and behavioral changes in medial prefrontal and orbital frontal cortex of rat induced by maternal deprivation

Abstract

Stressful events experienced during early life are associated with increased vulnerability of developing psychopathology in adulthood. In the present study, we exposed 9 – day - old Wistar rats to 24 hour maternal deprivation (MD) with the aim to investigate the impact of early life stress (ELS) on morphological, biochemical and functional aspects of the prefrontal cortex (PFC), a brain region particularly sensitive to stress. We found that in superficial medial orbital cortex (MO), young adult male rats had reduced density of GAD67 and CCK immunopositive cells while the rostral part of ventral lateral orbital cortex (roVLO) showed a decrease in the density of GAD67 immunopositive cells in both superficial and deep layers. In addition, superficial rostral part of area 1 of the cingulate cortex (roCg1) and deep prelimbic cortex (PrL) were also affected by MD indicated by the reduction in PV immunopositive cellular density. Furthermore, MD induced an upregulation of BDNF, while it did not affect the overall expression of Iba1 in neonatal or young adult PFC as measured by Western blot. Interestingly, when young adult male rats were subjected to a behavioral flexibility test in a T-maze, MD rats showed a subtle impairment in reversal learning indicating a mildly affected PFC function. Taken together, our results demonstrate that MD reduces the density of interneurons in particular PFC areas at young adulthood and may alter synaptic plasticity accompanied by PFC dysfunction. These findings point out the complex effect of ELS on interneuron development as well as the importance of preserved GABAergic system on cognitive functioning.

Key words: maternal deprivation, prefrontal cortex, interneurons, parvalbumin, cholecystokinin, synaptic plasticity, BDNF, microglia, cognitive flexibility

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Neuroscience

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija ranog životnog stresa.....	2
1.2. Maternalna deprivacija kao animalni model ranog životnog stresa.....	3
1.3. Funkcionalna anatomija prefrontalne kore	4
1.4. Interneuroni.....	10
1.5. Sinaptička plastičnost.....	14
1.6. Kognitivna fleksibilnost.....	17
2. CILJEVI.....	20
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Životinje	23
3.2. Eksperimentalni postupak	24
3.3. Morfološka ispitivanja	25
3.3.1. Priprema tkiva za imunohistohemijsko bojenje.....	25
3.3.2. Imunohistohemija.....	27
3.3.3. Dobijanje digitalizovanih fotomikrografija i kvantifikacija	28
3.4. Ispitivanje ekspresije proteina.....	30
3.5. Ispitivanje učenja, radne memorije i kognitivne fleksibilnosti	33
3.6. Statistička analiza.....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Uticaj maternalne deprivacije na telesnu masu pacova	38
4.2. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na gustinu GAD67+ ćelija u prefrontalnom korteksu	39
4.3. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na gustinu PV+ i CCK+ ćelija u prefrontalnom korteksu.....	44
4.4. Kratkotrajni i dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na ekspresiju BDNF - a u prefrontalnom korteksu.....	52
4.5. Kratkotrajni i dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na ekspresiju Iba1 u prefrontalnom korteksu.....	54
4.6. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na učenje.....	56
4.7. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na radnu memoriju i reverzno učenje	57
4.8. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na broj istrajnih i regresivnih grešaka tokom reverzne faze BFFT -a	59
4.9. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na utrošeno vreme do izbora ručice.....	60
5. DISKUSIJA	63
6. ZAKLJUČCI.....	78
7. LITERATURA.....	81

1. UVOD

1.1. Epidemiologija ranog životnog stresa

Traumatska iskustva tokom ranog detinjstva kao što su smrt roditelja, zanemarivanje, fizičko i psihičko zlostavljanje kao i mnoga druga iskustva predstavljaju značajne činioce u povećanju rizika od razvoja mentalnih poremećaja u kasnijem životnom dobu (Kessler et al., 2010). U daljem toku teksta za različite oblike traumatskog iskustva tokom ranog detinjstva koristićemo termin rano traumatsko iskustvo (RTI). Dosadašnja istraživanja pokazuju da bilo koje RTI dvostruko povećava rizik od razvoja depresije u adultnom dobu (Li et al., 2016b). Među različitim tipovima RTI - a, emocionalno zlostavljanje i zanemarivanje, takozvani tihi oblici zlostavljanja, ističu se kao najjači socijalni faktori rizika za razvoj depresije (Mandelli et al., 2015; Infurna et al., 2016). Dodatno, kod depresije i anksioznog poremećaja prevalencija zanemarivanja i psihofizičkog zlostavljanja raste u sledećem smeru: bez bolesti, anksiozni poremećaj, depresija, komorbiditet depresije i anksioznog poremećaja. Prevalencija pomenutih oblika RTI - a pokazuje pozitivnu korelaciju sa hroničnim tokom anksioznog poremećaja i depresije (Hovens et al., 2012). Postoje čvrsti dokazi koji ukazuju da je RTI povezano sa pojavom psihotičnih epizoda u adultnom dobu (Varese et al., 2012). Takođe, pokazano je i postojanje kumulativnog efekta pri čemu povećan rizik od nastanka psihotične epizode raste sa povećanjem broja proživljenih trauma tokom detinjstva (Shevlin et al., 2007, 2008). Ispitivana je i povezanost različitih tipova RTI - a sa pojavom psihotičnih simptoma kod odraslih. Rezultati istraživanja ističu povezanost slušnih halucinacija sa seksualnim i fizičkim zlostavljanjem dok se sumanute ideje persekucije dovode u vezu sa odrastanjem u prihvatilištu, fizičkim zlostavljanjem i maltretiranjem (Bentall et al., 2012). Sve veći broj studija ukazuje na povezanost RTI - a i shizofrenije (Mohammadzadeh et al., 2019; Velikonja et al., 2019). Naime, proživljena trauma tokom detinjstva predstavlja nezavisni faktor rizika za pokušaj samoubistva kod osoba sa shizofrenijom, mada u aktuelnoj literaturi postoji neslaganje po pitanju snage navedenog faktora (Hassan et al., 2016; Alli et al., 2019). Međutim, u svom obimnom preglednom istraživanju, Brown ističe da i pored toga što traume u detinjstvu predstavljaju jedan od najvećih problema savremenog društva i verodostojan faktor rizika za razvoj psihotičnih simptoma, najverovatnije je prerano donositi čvrste zaključke o povezanosti traumatskih iskustava tokom detinjstva i shizofrenije (Brown, 2011).

Smatra se da RTI dovodi do modifikacije normalnog razvoja mozga uzrokujući morfološke, elektrofiziološke i biohemijske promene koje tokom perioda detinjstva i puberteta ne dovode do razvoja vidljive psihopatologije (period inkubacije). Međutim, ove promene čine mozak ranjivim na traumatske događaje koji nastaju kasnije tokom života čime se značajno povećava mogućnost nastanka psihičkih poremećaja (Maynard et al., 2001; Halligan et al., 2007). Značaj RTI - a ogleda se prevashodno u

biološkoj ranjivosti mozga u fazi postnatalnog razvoja tokom kojeg se nastavljaju brojni razvojni procesi iz prenatalnog perioda kako na molekularnom tako i na strukturnom nivou.

Prema istraživanju Kesslera-a i saradnika, eradikacija traumatskih iskustava tokom detinjstva dovela bi do smanjena poremećaja raspoloženja za 22,9%, poremećaja anksioznosti za 31%, kao i smanjenja zloupotrebe psihoaktivnih supstanci za 29,8% (Kessler et al., 2010). Ovi podaci ističu važnost za sprovođenjem istraživanja u oblasti RTI - a, kao i neophodnost u osmišljavanju preventivnih strategija.

1.2. Maternalna deprivacija kao animalni model ranog životnog stresa

Najveći doprinos u dosadašnjem razumevanju mehanizama na koji traumatska iskustva tokom ranog detinjstva doprinose razvoju psihopatologije pružili su animalni modeli. Na osnovu preglednog istraživanja Schmidt i sar. animalne modele RTI možemo podeliti na modele koji se baziraju na vrsti/intenzitetu interakcije između majke i mladunaca kao i farmakološke modele (Schmidt et al., 2011). Do danas, najčešće primenjivani model RTI - a zasnovan na interakciji između majke i mladunaca jeste model maternale deprivacije (MD). Ovaj model zasniva se na odvajanju mladunaca od majke tokom ranog postnatalnog perioda, usled kojeg postoji smanjena reaktivnost mozga na stres, koju nazivamo stres moždana hiporeaktivnost (*stress hyporesponsive period*, SHRP). Kod pacova, SHPR traje između 4 – 14 postnatalnog dana (PND) i odlikuje se minimalnom ili zanemarljivom reaktivnošću hipotalamo – hipofizno – adrenalne (HPA) osovine mladunaca. U fiziološkim uslovima, ovakvo stanje HPA osovine je strogo zavisno od prisustva majke unutar legla tačnije interakcije između mladunaca i majke (Levine, 2001). Dva najčešće korišćena oblika MD su repetitivna maternalna separacija pri čemu se mladunci odvajaju od majke 3 - 4h dnevno u trajanju od 2 – 3 nedelje (Baudin et al., 2012) kao i jednokratna maternalna separacija u trajanju od 24h, najčešće devetog postnatalnog dana (PND 9) (Ellenbroek et al., 1998, 2004). Noviji animalni model ovakvog tipa zasniva se na izazivanju stresa i haotičnog ponašanja majke koja mladuncima posledično pruža fragmentovanu i nedovoljnu negu čime se oponaša socijalno okruženje karakteristično za teško siromaštvo, zanemarivanje i zlostavljanje. U cilju izazivanja ovakvog oblika stresa, najčešće se majka zajedno sa mladuncima postavlja u kavez sa dnom od metalne rešetke umesto piljevine koja ga normalno ispunjava (Walker et al., 2017). Farmakološko izazivanje RTI može se postići postnatalnim davanjem glukokortikoida čime se oponaša aktivacija HPA osovine. Pored glukokortikoida, sve više se primenjuju modeli u kojima se simulira postnatalna infekcija. Najčešće se postnatalnom primenom lipopolisaharida oponaša bakterijska infekcija (Réus et al., 2017), a postnatalom primenom kombinacije poliinozinične i policitidilične kiseline virusna infekcija (Cunningham et al., 2007) čime se može izazvati RTI.

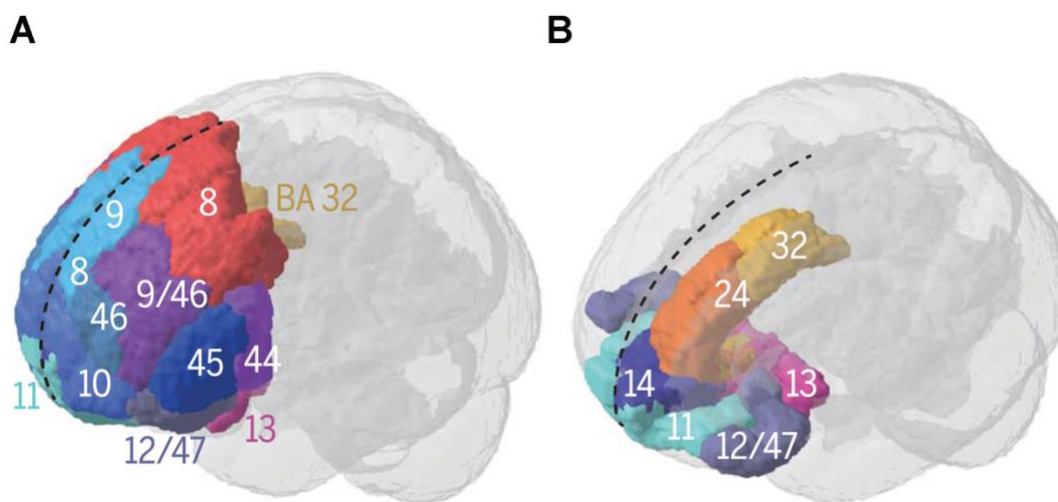
S obzirom na relativnu jednostavnost metodološkog procesa ne čudi široka upotreba MD kao animalnog modela širom sveta, naročito imajući u vidu mogućnost modifikacije vremenskog okvira stresa - dužine deprivacije i razvojne faze u kojoj se događa traumatsko iskustvo. Tako pojedina bihevioralna ispitivanja MD životinja pokazuju oštećenje određenih aspekata kognicije i emocija kao što su poremećaj radne memorije, pojava anhedonije i produženog perioda imobilnosti tokom testa prisilnog plivanja (Zamberletti et al., 2012; Ganguly et al., 2016; Wang et al., 2020). Pored bihevioralnih promena, rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju i na elektrofiziološke promene kod MD pacova (Janetsian-Fritz et al., 2018), poremećaj sinaptičke plastičnosti (Choy et al., 2008) i obrta serotonina i dopamina u pojedinim regionima centralnog nervnog sistema (CNS) (Rentesi et al., 2013). Rezultati iz naše laboratorije istakli su postojanje morfoloških promena unutar limbičkih struktura. Naime, pronađeno je da kod MD životinja dolazi do region specifičnih promena ćelijske u gustine (Aksić et al., 2013; Aleksić et al., 2016; Kapor et al., 2020) kao i smanjenja gustine kortikalnih holinergičkih vlakana (Marković et al., 2014). Smatra se da sam efekat stresa tokom perioda odvojenosti od majke nastaje delovanjem 3 mehanizma: odsustvo nege mladunaca od strane majke, nedostatak hranljivih materija (Viveros et al., 2010) i smanjenje telesne temperature mladunaca usled nerazvijenog termoregulacionog sistema. Nakon perioda separacije i vraćanja u leglo, dolazi do intenziviranja majčinske nege koje se ispoljava produženim vremenom lizanja, ušuškavanja i dojenja mladunaca (Llorente-Berzal et al., 2011; Chocyk et al., 2013).

Navedene činjenice, kao i sve veća količina naučne literature iz oblasti RTI - a sugerišu da MD predstavlja pogodan model za ispitivanje psihopatologije sa razvojnom osnovom kao što su depresija, shizofrenija i anksioznost. Pored toga, sa razvojnog aspekta, MD predstavlja model kojim možemo ispitati prirodu modifikacije moždanog razvoja nakon izlaganja traumi u postnatalnom razvoju (Marco et al., 2015). Sasvim prirodno, nameće se pitanje da li maternalna deprivacija predstavlja refleksiju zlostavljanja, zanemarivanja ili čak nekog trećeg tipa ranog traumatskog iskustva kod ljudi. Odgovor na ovo pitanje je važno kako bi se sa sigurnošću utvrdila translaciona validnost modela, imajući u vidu kategorizaciju RTI - a na zanemarivanje, fizičko, psihičko i seksualno zlostavljanje (Murthy and Gould, 2018), ali i sve veći broj dokaza koji ukazuju na postojanje veze između vrste traumatskog iskustva i razvoja simptoma bolesti (Young and Widom, 2014; Mandelli et al., 2015; Infurna et al., 2016).

1.3. Funkcionalna anatomija prefrontalne kore

Kako sa funkcionalnog tako i sa evolutivnog aspekta, prefrontalna kora (PFC) predstavlja jednu od najnaprednijih kortikalnih struktura. Kod ljudi, celokupni region PFC - a prostire se na 3 strane čeonog

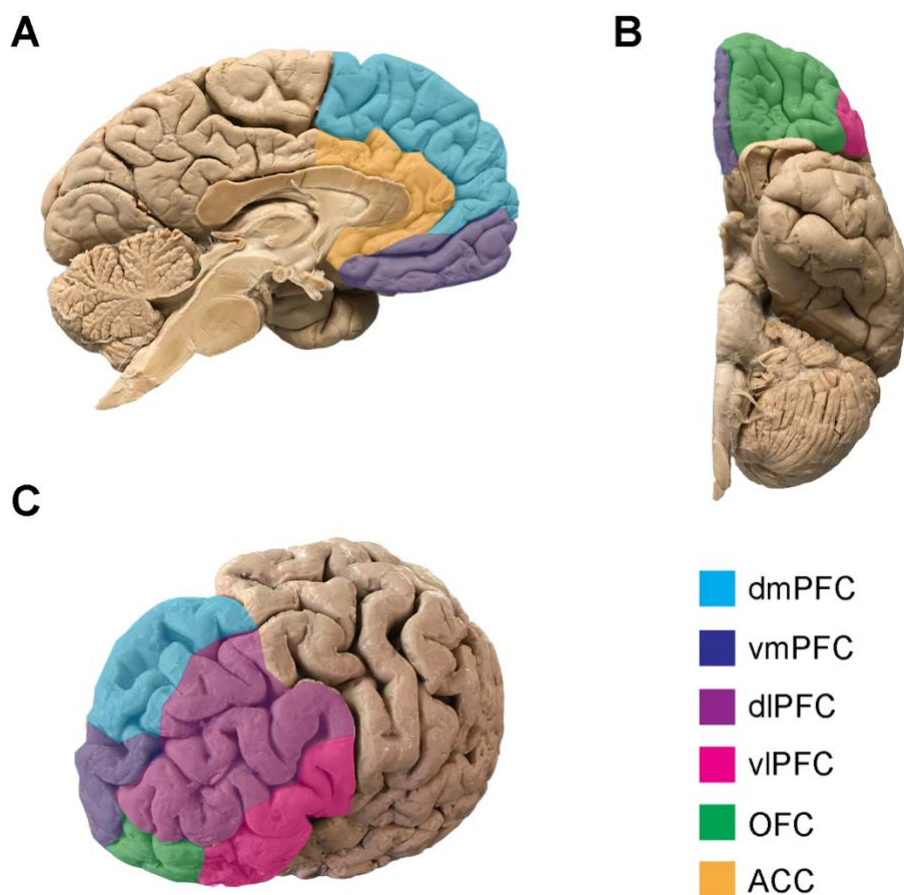
režnja pa tako razlikujemo orbitofrontalnu koru, dorzolateralnu i medijalnu prefrontalnu koru (Ongür et al., 2003). Prema Brodmanovoj podeli cerebralnog korteksa zasnovanoj na citoarhitektonskim karakteristikama, prefrontalnim Brodmanovim areama (BA) smatraju se BA8 do BA14 i BA44 do BA47. Pored navedenih area koje se odlikuju granularnom ćelijskom strukturom to jest prisustvom *laminae IV*, u prefrontalne BA mogu se uvrstiti još i BA24, 25 i 32 koje spadaju u agranularni (bez prisustva *laminae IV*) korteks (Fuster, 2015) (slika 1). Pored citoarhitektonske parcelacije PFC – a koja se najčešće koristi u bazičnim istraživanjima i komparativnoj anatomiji, studije strukturne i funkcionalne magnetne rezonance (fMRI) uglavnom se služe funkcionalnom podelom prefrontalne kore i to na: dorozmedijalnu (dmPFC), dorzolateralnu (dlPFC), ventromedijalnu (vmPFC), ventrolateralnu prefrontalnu koru (vlPFC), orbitofrontalnu (OFC) i prednju cingularnu koru (ACC) (Carlén, 2017) (slika 2). Navedene podele se stalno dopunjuju i koriguju, pre svega vođene novim naučnim saznanjima u pogledu citoarhitektonskih karakteristika, povezanosti sa drugim delovima mozga i funkcije pa samim tim zbog izrazite kompleksnosti, široko prihvaćena parcelacija PFC – a predstavlja svojevrstan izazov u neuroanatomiji.



Slika 1. Aree po Brodman - u na dorzolateralnoj (A), orbitalnoj i medijalnoj strani (B) prefrontalne kore. Adaptirano prema (Carlén, 2017).

Prefrontalni korteks, čija površina obuhvata čak 30% ukupne površine kortikalnog plašta igra ključnu ulogu u sprovođenju i kontroli egzekutivnih funkcija što se još naziva i kognitivna kontrola. U egzekutivne funkcije spadaju tzv. kognitivne funkcije višeg reda kao što su radna memorija, kognitivna fleksibilnost, kontrola inhibicije, rasuđivanje, planiranje i rešavanje problema (Cristofori et al., 2019).

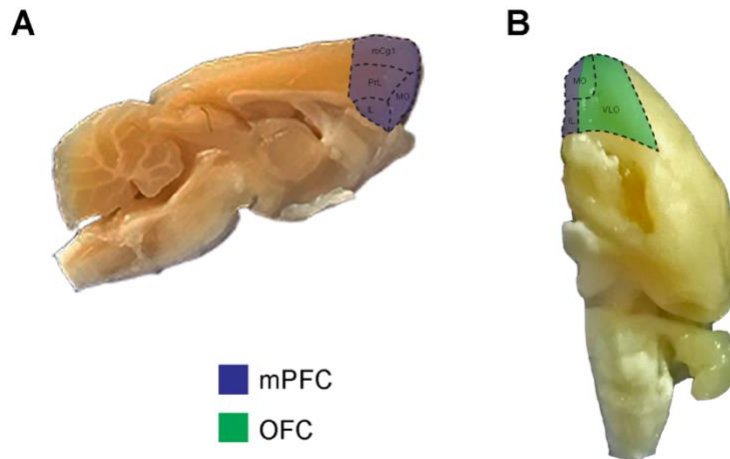
Važna karakteristika PFC-a jeste produžen postnatalni razvoj, neophodan zarad sticanja kompleksnih funkcija PFC-a (Schubert et al., 2015). Međutim, upravo produžen postnatalni razvoj čini ovu strukturu posebno osetljivom na RTI (Arnsten, 2009; Teicher et al., 2016). U prilog ovoj tvrdnji govore i rezultati kliničkih studija koje ukazuju da proživljena trauma tokom ranog detinjstva i odrastanje unutar institucija za zbrinjavanje može biti povezano sa oštećenjem kognitivne kontrole (Mueller et al., 2010; Saleh et al., 2017) i smanjenjem kortikalne debljine PFC-a (Gorka et al., 2014; Underwood et al., 2019). Studije funkcionalne magnetne rezonance omogućile su ispitivanje povezanosti između različitih struktura mozga, pa tako vidimo da sve veći broj istraživanja ukazuje na smanjenje funkcionalne povezanosti PFC - a sa bademastim telom (*amygdala*) i hipokampusom (Birn et al., 2014; Grant et al., 2014; Hakamata et al., 2021), ali i drugim delovima kore kao što je *precuneus* (Olson et al., 2019). Imajući u vidu morfološku i funkcionalnu kompleksnost, produžen postnatalni razvoj i dosadašnje podatke iz humanih studija, PFC se ističe kao primamljiva regija za ispitivanje mehanizama RTI - a.



Slika 2. Funkcionalne zone prefrontalne kore na medijalnoj (A), bazalnoj (B) i dorzolateralnoj strani (C) leve hemisfere humanog mozga. Adaptirano prema (Carlén, 2017).

Kod pacova i miševa, PFC se sastoji iz dve anatomske komponente i čine ga medijalni prefrontalni korteks (mPFC) koji obuhvata unutrašnju i orbitofrontalni korteks (OFC) koji obuhvata ventralnu stranu frontalnog režnja (Ongür and Price, 2000). Medjutim, unutar ove dve glavne komponente, nalaze se subregioni koji se međusobno razlikuju kako u pogledu veza koje ostvaruju sa drugim delovima CNS-a, tako i u pogledu strukturne građe. Ipak, pre nego što iznesemo pojedine razlike, treba reći da i mPFC i OFC ostvaruju snažne veze sa mediodorzalnim jedrom talamusa (MDN). Ova zajednička veza sa MDN - om predstavlja jednu od najstarijih definicija PFC - a, koja je danas u najvećoj meri prevaziđena (Price, 2007). Dorzalni delovi mPFC - a prevashodno ostvaruju veze sa senzornim i motornim kortikalnim područjima (Van Eden et al., 1992; Condé et al., 1995), dok ventromedijalnu komponentu mPFC - a odlikuje povezanost sa limbičkim strukturama poput hipokampusa, amigdale i hipotalamusa (Sesack et al., 1989; McDonald et al., 1996; Gabbott et al., 2002). Subregioni OFC-a su nehomogeni po pitanju veza. Tako medijalni delovi OFC - a ostvaruju slične kortiko – kortikalne veze kao i ventromedijalni mPFC, što podrazumeva povezanost sa temporalnom korom i agranularnom insulom. Ipak, medijalna komponenta OFC - a ostvaruje znatno slabije veze sa amigdalom, ventralnim striatumom i piriformnom korom u odnosu na mPFC (Hoover and Vertes, 2011). Glavna karakteristika lateralne komponente OFC - a je senzorna integracija, koju definiše povezanost sa olfaktivnom, gustativnom, somatosenzornom, auditivnom i vizuelnom korom (Price, 2007).

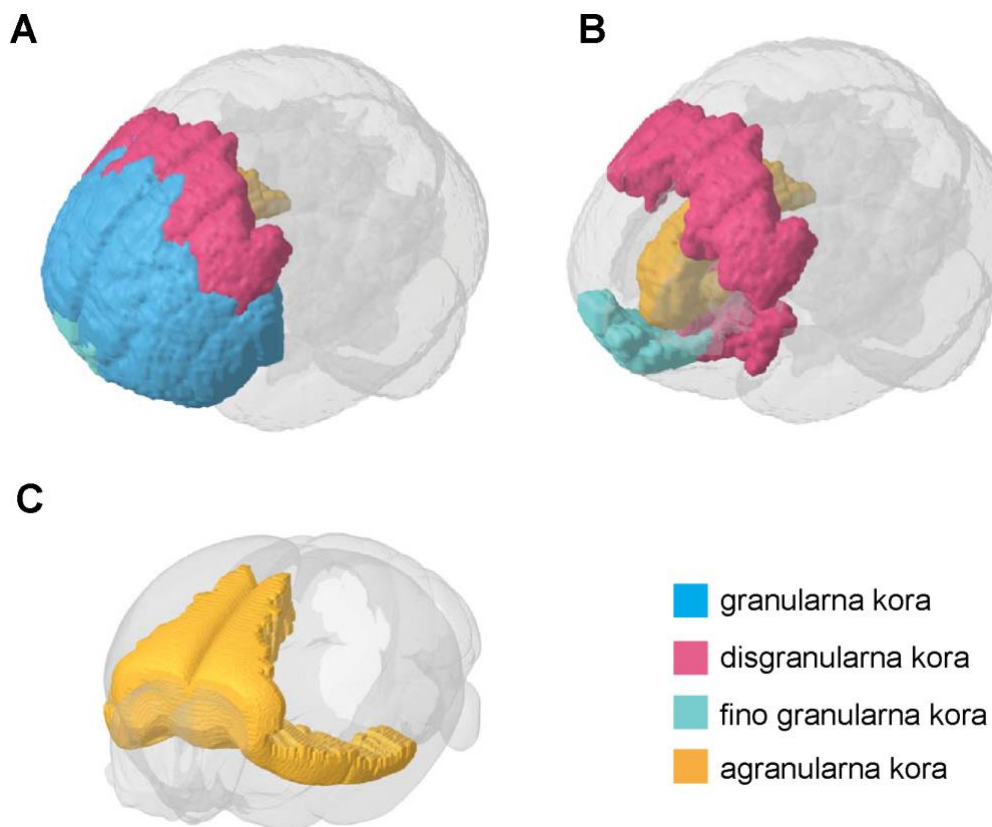
Što se tiče strukture, PFC glodara odlikuje se slabo razvijenim unutrašnjim granularnim slojem kore (*lamina IV*), što ga svrstava u takozvani agranularni korteks. Kao i u pogledu povezanosti, subregioni PFC - a se međusobno razlikuju u pogledu citoarhitektonske i neurohemijske građe, a najčešće korišćena podela upravo je ona prema Paxinosu i Watsonu po kojoj PFC čine: rostralni cingularni (roCg1), prelimbički (PrL), infralimbički (IL), medijalni orbitalni (MO) i rostralni ventrolateralni orbitalni korteks (roVLO) (Paxinos and Watson, 2007) (slika 3). Tako kada bismo preklapili subregione PFC - a, koji su prethodno opcertani prema povezanosti i strukturi mogli bismo zaključiti da roCg1 i dorzalni PrL pripadaju dorzalnog mPFC - u, dok ventralni PrL, IL i MO pripadaju ventromedijalnom mPFC - u, sa naznakom da MO pripada i OFC - u. Konačno roVLO, koji ispunjava gotovo ceo OFC karakteriše postepena medijalno - lateralna razlika u pogledu povezanosti, pri čemu su lateralni delovi više povezani sa senzornim kortikalnim područjima.



Slika 3. Subregioni medijalnog prefrontalnog (A) i orbitofrontalnog korteksa (B) pacova. Adaptirano prema (Paxinos and Watson, 2007).

U neuronaukama, komparativna anatomija PFC – a predstavlja veliki izazov, ali i uzrok podela među naučnicima u pogledu opravdanosti istraživanja na pacovima. Naime, postavlja se pitanje, da li strukturne i funkcionalne karakteristike pacovskog PFC – a imaju zadovoljavajući stepen homologije sa PFC – om primata? U kojoj meri se možemo osloniti na zaključke dobijene iz istraživanja na glodarima? Trenutno, stepen homologije moždane kore među vrstama uspostavlja se na bazi sledećih principa i to: (i) embrionalnog razvića, (ii) citoarhitektonske građe, (iii) povezanosti, (iv) distribucije neurotransmitera i receptora i (v) funkcionalnih karakteristika. Sa aspekta povezanosti na nivou neuronskog kruga kora - bazalna jedra – talamus – kora postoji zadovoljavajući stepen homologije između humanog i pacovskog PFC – a (Uylings et al., 2003). Međutim, u pogledu citoarhitektonske građe, najveći deo humanog PFC – a karakteriše već pomenuto prisustvo *laminae* IV, koje u zavisnosti od stepena izraženosti površinu PFC – a definiše kao granularnu, fino granularnu i disgranularnu (Ongür et al., 2003). Kod pacova pak i mPFC i OFC odlikuje agranularna građa, koja je kod ljudi prisutna samo u ACC - u i smatra se filogenetski primitivnijom formom građe u odnosu na granularnu koru (Heidbreder and Groenewegen, 2003) (slika 4). Zagovornici neopravdanosti ispitivanja PFC – a na pacovima su stava da je tokom ekspanzivnog evolutivnog razvoja kore kod primata došlo do diverzifikacije PFC – a, to jest pojave modifikacija njegove strukture i funkcije specifično za vrstu. Kao primer, uzima se pojava DIPFC - a, koga pojedini neuronaučnici smatraju isključivo karakteristikom primata zbog izrazite granularne građe i povezanosti sa dorzalnim striatumom koji nisu prisutni u frontalnom korteksu glodara (Carlén, 2017). Međutim, i pored pomenutih citoarhitektonskih razlika, na osnovu lezionih studija postoji izražena

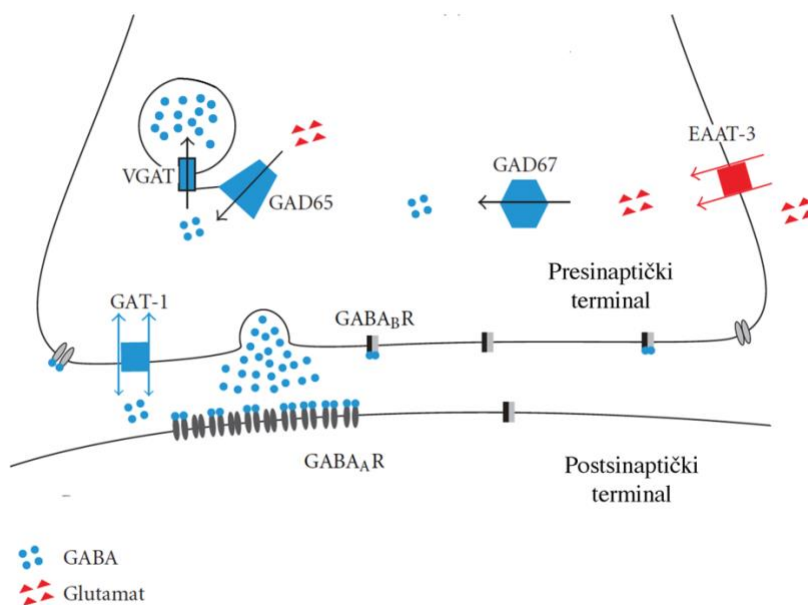
evolutivna očuvanost pojedinih funkcija koje se prepisuju upravo dlPFC – u kod ljudi (Birrell and Brown, 2000; McAlonan and Brown, 2003). Kao primer, uglavnom se ističe radna memorija, ali je pokazano da PFC pacova učestvuje u kontroli funkcija karakterističnim za dlPFC čoveka, kao što su kontrola impulsa, pažnja i kognitivna fleksibilnost (Carlén, 2017). Za sada, upravo navedene bihevioralne paralele predstavljaju najjači argument u odbrani evolutivne očuvanosti karakteristika PFC – a i ističu opravdanost u izučavanju strukturnih i funkcionalnih karakteristika PFC – a, kako u fiziološkim tako i u patofiziološkim uslovima.



Slika 4. Citoarhitektonske zone humane (A i B) i pacovske prefrontalne kore (C). Adaptirano prema (Carlén, 2017).

1.4. Interneuroni

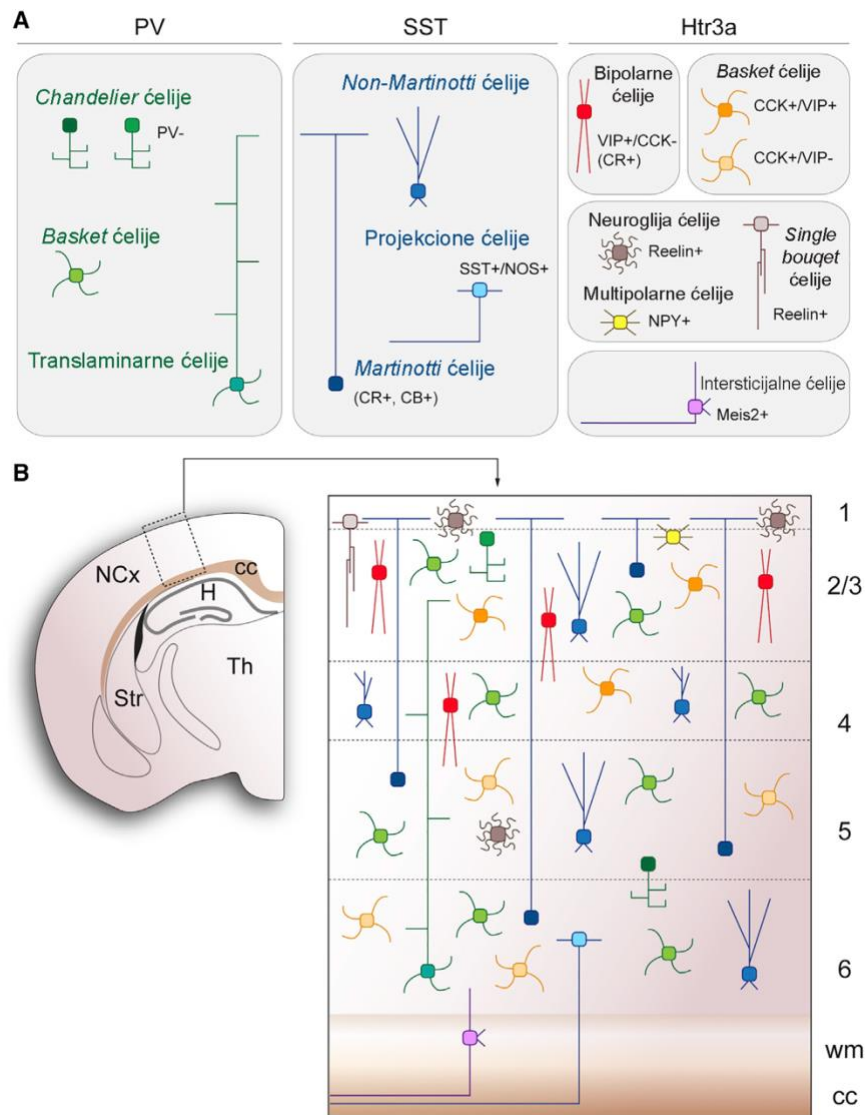
U centralnom nervnom sistemu sisara, neuronska inhibicija sprovodi se posredstvom gama aminobuterne kiseline (GABA) i glicina. Iako u moždanoj kori čine svega 10 - 15% ukupne ćelijske populacije GABAergički interneuroni igraju presudnu ulogu u uspostavljanju i održavanju ekscitatorno/inhibitornog (E/I) balansa inhibicijom susednih piramidalnih ćelija, ali i drugih interneurona (Ali et al., 2007). Ova ćelijska populacija, veoma heterogena po pitanju morfofunkcionalnih karakteristika, svojom orkestriranom inhibitornom aktivnošću vrši selekciju i modifikaciju protoka signala u kori velikog mozga (*gating*). Samim tim, procesuiranje informacija u kori neizbežno zavisi od očuvane funkcije GABAergičkih ćelija (Tremblay et al., 2016). GABA nastaje konverzijom glutamata pomoću enzima glutamat dekarboksilaze (GAD) koji se u interneuronima nalazi u dve izoforme, GAD65 i GAD67. U moždanom korteksu, ali i u ostatku mozga, GAD65 je prevashodno lokalizovan u presinaptičkim terminalima, dok je u telima neurona dominantna GAD67 izoforma (Esclapez et al., 1994). Transmembranski transporteri (GAT1 - 4) vrše transport GABA – e između vanćelijskog i unutarćelijskog prostora, a pored interneurona lokalizovani su i na membranama glija ćelija. Vezikularni transporteri (VGAT) pak, zaduženi su za pakovanje neurotransmitera u vezikule sinaptičkih terminala (Zhou and Danbolt, 2013). Svoje efekte, GABA ostvaruje vezivanjem za dve vrste receptora, jonotropne (GABA_AR) i metabotropne (GABA_BR). Vezivanjem za postsinaptičke GABA_AR dolazi do otvaranja jonskog kanala za Cl⁻, što uzrokuje hiperpolarizaciju membrane i inhibiciju postsinaptičke ćelije. S druge strane, metabotropni GABA_BR predstavljaju transmembranske proteine vezane za G – protein. Nakon vezivanja GABA – e, dolazi do dimerizacije receptora i pokretanja složene unutarćelijske kaskade. Na presinaptičkim terminalima, aktivacijom GABA_BR smanjuje se oslobađanje GABA – e, čime se negativnom povratnom spregom reguliše intenzitet GABAergičke sinapse (Roth and Draguhn, 2012). Postsinaptički GABA_BR svojom aktivacijom dovode do takozvane “kasne” inhibicije koja nastaje nakon “brze” GABA_AR posredovane inhibicije (Isaacson et al., 1993) (slika 5).



Slika 5. Metabolizam gama aminobuterne kiseline (GABA). Sinteza konverzijom glutamata posredstvom glutamat dekarboksilaze (GAD65 i 67) i pakovanje u vezikule posredstvom vezikularnih transportera (VGAT). Ostvarivanje efekata vezivanjem za jonotropne GABA_A i metabotropne GABA_B receptore. Adaptirano prema (Roth and Draguhn, 2012).

Sveobuhvatna i opšteprihvaćena klasifikacija interneurona i dalje ne postoji s obzirom da se vrste GABAergičkih ćelija pored porekla razlikuju i po pitanju morfoloških, neurohemisjskih i elektrofizioloških karakteristika (Ascoli et al., 2008). Zbog mogućnosti lokalizacije nezavisnih podrupa ćelija imunohistohemijskim metodama, najpragmatičnija i najčešće korišćena jeste neurohemisjska podela. Prema ovoj podeli, GABAergičke ćelije se dele u 3 glavne podgrupe i to na parvalbumin (PV+), somatostatin (SST+) i serotoniniski receptor tip 3A (5-HT3AR+) imunopozitivne ćelije. Dodatno, 5-HT3AR+ ćelije predstavljaju heterogenu grupu gde spadaju holecistokinin (CCK+), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), kalretinin (CR+), neuropeptid Y (NPY+) i *reelin* imunopozitivne ćelije (Lim et al., 2018). Neurohemisjska kompleksnost dodatno je zakomplikovana činjenicom da se jedna grupa imunopozitivnih ćelija često javlja u više morfoloških oblika i obratno. Primera radi, oko 75% SST+ neurona čine multipolarne *Martinotti* ćelije, koje se odlikuju ovoidnim ili vretenastim telom i bogatom aksonskom arborizacijom. Ostatak čine *non – Martinotti* ćelije i ovde se svrstavaju između ostalih projekcioni interneuroni čiji dugi aksoni dospevaju do susednih moždanih regiona, kao i *double – bouquet* ćelije čiji su aksoni zaduženi za translaminarnu i transkolumnarnu inhibiciju (Riedemann, 2019). Suprotno opisanom fenomenu u kome jedna neurohemisjska grupa ćelija egzistira u više morfoloških oblika, košaraste (*basket*) ćelije, koje se odlikuju poligonalnim oblikom ćelijskog tela i perisomatskom

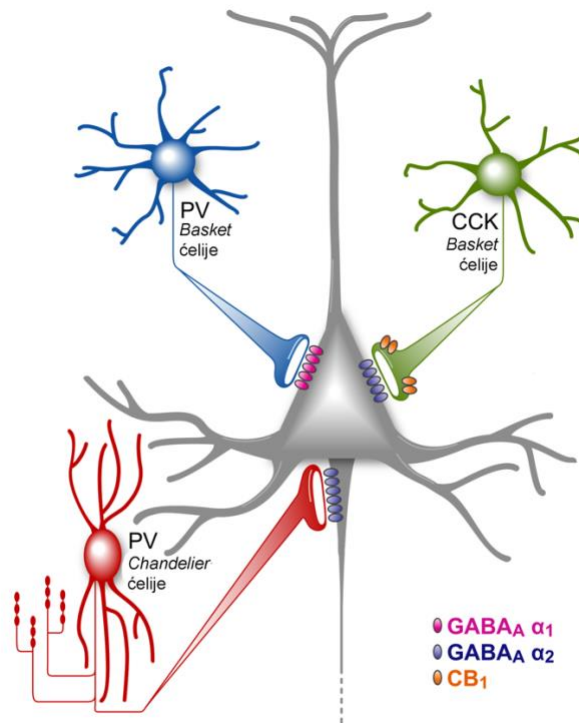
inhibicijom susjednih glutamatergičkih ćelija mogu biti PV+ i CCK+ pa tako predstavljaju dve nezavisne populacije GABAergičkih neurona (Lim et al., 2018) (slika 6).



Slika 6. (A) Shematski prikaz podele interneurona moždane kore. U 3 glavne podklase GABAergičkih ćelija razlikujemo PV+, SST+ i 5HT3AR+ ćelije. (B) Shematski prikaz distribucije interneurona u različitim slojevima moždane kore. Adaptirano prema (Lim et al., 2018).

Izuzev morfoloških sličnosti i činjenici da su rasprostranjene u svim slojevima moždane kore PV+ i CCK+ ćelije značajno se razlikuju po pitanju porekla, električne aktivnosti i ekspresije pojedinih receptora (Kawaguchi and Kondo, 2002). PV+ ćelije potiču iz medijalne ganglijske eminencije, a električna aktivnost odlikuje se akcionim potencijalima brzog otklona (*fast spiking*) (Kawaguchi and Kubota, 1997; Xu et al., 2004). Takođe, poznato je da PV+ ćelije generišu gama-oscilacije (30 - 80 Hz),

tako da se smatra da aktivnost ove ćelijske populacije u poređenju sa ostalim GABAergicima ima najveći uticaj na regulaciju E/I balansa (Buzsáki and Draguhn, 2004). Sa druge strane *non – fast spiking* CCK+ ćelije nastaju iz kaudalne ganglijske eminencije (Tricoire et al., 2011) i unutar ove subpopulacije razlikujemo dve podgrupe: male *basket* CCK+ ćelije koje koeksprimiraju VIP i velike *basket* CCK+ ćelije. Male CCK+ su nešto brojnije i one čine oko 60% svih CCK+ ćelija (Kubota and Kawaguchi, 1997). Dodatno, PV+ i CCK+ ćelije razlikuju se i po pitanju ekspresije receptora. Naime, CCK+ ćelije ekspresiraju kanabinoidni receptor tip 1 (CB1R) na aksonskim terminalima i već pomenuti jonotropni serotoninški receptor tip 3A (5-HT3AR) na telu ćelije za razliku od PV+ ćelija koje ne poseduju ove receptore (Katona et al., 1999; Vucurovic et al., 2010; Armstrong and Soltesz, 2012) (slika 7). Iako je funkcija CCK+ ćelija do danas i dalje nepoznata, novije studije ukazuju da njihova aktivnost učestvuje u regulaciji raspoloženja i radne memorije (Whissell et al., 2015; Nguyen et al., 2020). Za razliku od CCK+ ćelija, znatno više se zna o fiziološkoj i patofiziološkoj ulozi PV+ ćelija. Bitna odlika ovih ćelija, bar kada je u pitanju izloženost stresu, jeste visok nivo ekspresije glukokortikoidnog receptora (GR) na ćelijskim membranama (McKlveen et al., 2016). Posledično, smatra se da PV+ ćelije PFC-a igraju centralnu ulogu u procesuiranju suvišnog oslobađanja glukokortikoida i regulaciji neuroendokrine i bihevioralne adaptacije na stres (McKlveen et al., 2019). Takođe, dokazano je da radna memorija, kognitivna fleksibilnost i pažnja u potpunosti zavise od očuvane aktivnosti PV+ neurona PFC-a (Murray et al., 2015; Kim et al., 2016). Važno je napomenuti da PV+ ćelije čine jedinu podklasu GABAergicima ćelija kore koja dobija direktnu ekscitatornu talamičku inervaciju, poput piramidalnih ćelija (Delevich et al., 2015). Imajući u vidu da su PV+ ćelije od presudnog značaja u regulaciji električne aktivnosti piramidalnih ćelija, kao i učestale nalaze njihove disfunkcije kod shizofrenije, smatra se da poremećaj PV+ neurona predstavlja glavni substrat kognitivne disfunkcije u shizofreniji (Lewis et al., 2012).

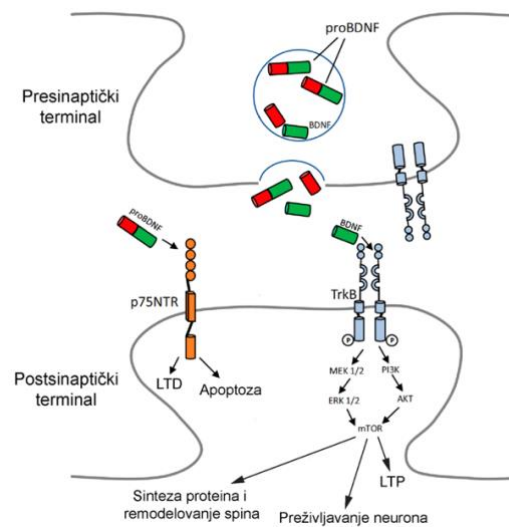


Slika 7. Ilustrativni prikaz perisomatske inhibicije piramidalne ćelije od strane PV+ i CCK+ basket ćelija. Primećuje se i prisustvo PV+ ćelije *Chandelier* tipa koja vrši akso - dendritsku inhibiciju piramidalne ćelije. Na aksonskom terminalu CCK+ ćelije zapaža se ekspresija CB1R. Adaptirano prema (Fish et al., 2011).

1.5. Sinaptička plastičnost

Sinaptička plastičnost se definiše kao sposobnost sinapse da modifikuje stepen transmisije u odnosu na električnu aktivnost. Pored toga, smatra se da sinaptička plastičnost ima presudni značaj tokom moždanog razvoja i ranog sazrevanja neuronskih krugova, a sve veći broj dokaza ističe poremećaj sinaptičke plastičnosti u patogenezi mentalnih poremećaja. Prvobitno otkrivena u hipokampusu, dugoročna sinaptička potencijacija (*long term potentiation*, LTP) predstavlja do danas najčešće i najviše ispitivan fenomen sinaptičke plastičnosti. Ovaj fenomen podrazumeva da ponavljana aktivacija nervne sinapse dovodi do potencijacije tj. pojačanja eskcitabilnosti sinapse koja traje od nekoliko sati pa i do nekoliko dana (Citri and Malenka, 2008). Suprotno, smanjenje sinaptičke eskcitabilnosti kao posledica smanjene transmisije predstavlja fenomen dugoročne sinaptičke depresije (*long term depression*, LTD). Mehanizam ova dva fenomena zasniva se promenama u gustini ekspresije jonotropnih NMDA i AMPA receptora na postsinaptičkom terminalu (Lüscher and Malenka, 2012).

Brojna istraživanja hemijskih i fizičkih svojstava sinapasi tokom proteklih nekoliko decenija dovela su do mišljenja da istaknuti član familije neurotrofina *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), predstavlja važan medijator sinaptičke plastičnosti. U odgovoru na sinaptičku aktivnost, BDNF se oslobađa iz aksona i dendrita što dovodi do modifikacije brojnih aspekata sinaptičke funkcije (Kuczewski et al., 2010). Signalna kaskada pokreće se vezivanjem BDNF-a za TrkB kinazu. Po vezivanju, dolazi do dimerizacije TrkB, aktivacije kinazne aktivnosti i pokretanja kompleksne intraćelijske signalne kaskade koja uključuje Pi3K/Akt put, MAP kinaze, mTOR signalizaciju, oslobađanje intracelularnog kalcijuma i aktivacije CaMKII. Kao rezultat, dolazi do indukcije LTP, pokretanja sinteze proteina i remodelovanja dendritskih spina (Sasi et al., 2017). Smatra se da prekursor BDNF – a (proBDNF) vezivanjem za p75 neurotrofinski receptor ostvaruje efekte suprotne BDNF – u. Primera radi, proBDNF dovodi do LTD i stimulacije apoptoze (slika 8). Tako BDNF/TrkB kinaza sa jedne i proBDNF/p75 neurotrofin receptor sa druge strane najverovatnije predstavljaju primer funkcionalnog antagonizma. Pretpostavlja se da odnos BDNF/proBDNF određuje da li ciklus nervne ćelije teži preživljavanju ili programiranoj ćelijskoj smrti (Tang et al., 2021).



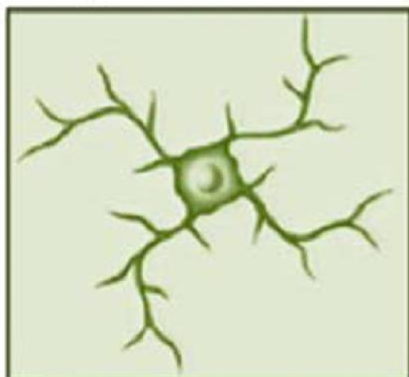
Slika 8. Shematski prikaz efekata BDNF - a i njegovog prekursora proBDNF - a. Vezivanjem za TrkB kinazu, BDNF pokreće signalnu kaskadu koja generiše LTP, stimuliše sinaptičko remodelovanje i preživljavanje ćelije. Suprotne efekte u vidu generisanja LTD i apoptoze ostvaruje proBDNF vezivanjem za p75NTR. Adaptirano prema (Licznerski and Jonas, 2018).

I pored brojnih istraživanja o uticaju RTI - a na biologiju BDNF - a, brojna pitanja su i dalje nerazjašnjena. Roceri i saradnici, prvi su ukazali na važnost uzrastnog doba u kome se ispituje ekspresija BDNF-a, ali i na nedoslednost rezultata kod raličitih MD modela. U studiji u kojoj je korišćen 24 - časovni model maternalne deprivacije nije primećeno odstupanje ekspresije BDNF - a u PFC-u adultnih pacova (Roceri et al., 2002). Ista grupa istraživača primenila je model 3 - časovane dnevne separacije

tokom neonatalnog perioda što je rezultiralo u smanjenoj ekspresiji BDNF-a u PFC-u adultnih MD životinja, dok je ekspresija BDNF-a na PND 17 bila povećana (Roceri et al., 2004). Uticaj MD na BDNF ispitan je i u drugim moždanim regionima. U hipokampusu, dolazi do nishodne regulacije BDNF - a kod MD pacova na PND 40, što kod ljudi odgovara periodu adolescencije (Marco et al., 2013). Slično kao i kod PFC - a, objavljeni rezultati pokazuju smanjenje ili odsustvo promene ekspresije BDNF - a u hipokampusu adultnih MD pacova (Réus et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Pored PFC - a i hipokampusa, promene u ekspresiji BDNF-a pronađene su i u amigdali, *nc. accumbens* - u i hipotalamusu MD životinja (Berman et al., 2014; García-Gutiérrez et al., 2016). Navedene studije ukazale su da različiti modeli maternalne deprivacije daju raznolike rezultate po pitanju ekspresije proteina, čime se dodatno komplikuje sveukupno zaključivanje zbog velikog broja tehničkih razlika među laboratorijama u primeni modela RTI - a.

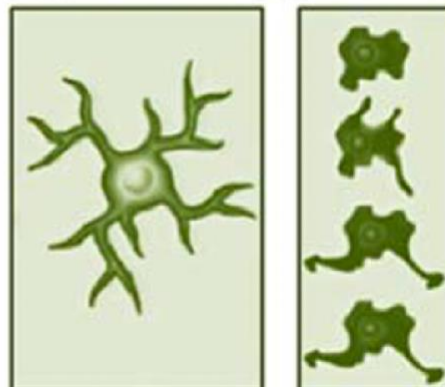
Mikroglia, ćelijska komponenta takozvanog urođenog imunskog odgovora, predstavlja populaciju stalno nastanjenih fagocita u mozgu. Pored tradicionalno poznate uloge mikroglie u neuroinflamaciji pri odgovoru na oštećenje, poznata je i uloga mikroglie u sinaptičkoj plastičnosti i remodelovanju (Wu et al., 2015). Postoje dva funkcionalna oblika mikroglialnih ćelija, mirujuća (*resting state*) i aktivacijski. U zavisnosti od prisustva okolnih faktora stimulacije, ćelije mogu prelaziti iz jednog oblika u drugi. Mirujuća, *resting state* mikroglia se morfološki odlikuje razgranatošću nastavaka i takozvanom “stražarskom” ulogom koja podrazumeva nadzor i stabilizaciju sinapsi (Kabba et al., 2018). Ovu ulogu, mirujuća mikroglia ostvaruje kako putem direktne fizičke interakcije sa sinapsama, tako i putem sekrecije BDNF - a, ali i drugih neurotrofičkih faktora kao što su insulinu sličan faktor rasta (*insulin-like growth factor*) i nervni faktor rasta (*nerve growth factor*) što dodatno doprinosi procesu sinaptičkog remodelovanja (Saijo and Glass, 2011; Ferrini and De Koninck, 2013). S druge strane, postoje dva fenotipa aktivirane mikroglie koja se za razliku od razgranate mirujuće mikroglie odlikuje pokretnom ameboidnom građom i fagocitoznom aktivnošću (Ferrini and De Koninck, 2013). Proces transformacije mikroglie iz faze mirovanja u aktivacijsku, fagocitnu mikrogliju, odvija se kroz tzv. reakcijsku fazu u kojoj dolazi do povećanja zapremine ćelijskog tela zajedno sa skraćanjem i zadebljanjem nastavaka (Walker et al., 2013) (slika 9). Tako razlikujemo “klasično” aktiviranu mikrogliju koja eksprimira pro - inflamatorne faktore (M1 fenotip) i remeti normalnu sinaptičku plastičnost (Singhal and Baune, 2017) i “alternativno” aktiviranu mikrogliju koja eksprimira anti - inflamatorne faktore (M2 fenotip) neuroprotektivnog dejstva (Orihuela et al., 2016). Takođe, važno je napomenuti i ulogu mikroglie u fagocitozi viška sinapsi tokom razvoja mozga, što ističe važnost funkcije mikroglie u sazrevanju neuronskih krugova (Schafer et al., 2012).

Resting state mikroglija



Aktivirana mikroglija

reakcijska faza fagocitna faza



Slika 9. Ilustrativni prikaz mirujuće (*resting state*) mikroglije koju morfološki karakterišu tanki nastavci i izrazita razgranatost i aktivirane mikroglije koja nakon reakcijske faze zadebljanja i skraćena nastavaka dobija ameboidni izgled. Adaptirano prema (Walker et al., 2013).

U pogledu uticaja stresa na mikrogliju, akutni i subhronični stres dovode do aktivacije mikroglije u strukturama za koje je poznato da učestvuju u procesuiranju stresa kao što su hipokampus, amigdala i PFC (Frank et al., 2007; Wohleb et al., 2012). Ipak, teško je sa sigurnošću utvrditi samu prirodu aktivacije u pogledu ispoljavanja M1 i/ili M2 fenotipa naročito imajući u vidu metodološke razlike između pojedinih studija (Walker et al., 2013). Uticaj RTI na mikrogliju do sada je temeljno ispitan samo u hipokampusu gde su pokazane promene Iba-1 imunopozitivnih (Iba-1+) ćelija u vidu povećanja ćelijske gustine i promene obrasca arborizacije nakon izlaganja RTI - u (Roque et al., 2016; Banqueri et al., 2019b; Réus et al., 2019; Wang et al., 2020). Ipak, ostaje da se razjasni kratkoročni i dugoročni uticaj RTI - a na mikrogliju PFC - a.

1.6. Kognitivna fleksibilnost

Kognitivna fleksibilnost se definiše kao sposobnost individue da prilagodi način donošenja odluka u odnosu na promenu uslova sredina. S praktične strane, ovakva sposobnost podrazumeva spremnost jedinke da prihvati nove okolnosti to jest takozvana nova “pravila igre” u cilju sopstvene dobrobiti. Visok nivo kognitivne fleksibilnosti povezan je sa boljim kvalitetom života i većom otpornošću na negativne životne okolnosti i stresne događaje u odrasлом dobu (Dajani and Uddin, 2015). Osnovni parametri kognitivne fleksibilnosti, merljivi bihevioralnim testovima su reverzno učenje

(*reversal learning*) i kvalitativna promena seta pažnje (*attention set shift*) (Logue and Gould, 2014). Pri obavljanju nekog zadatka, potrebno je da jedinka prati relevantne, a ignoriše nerelevantne senzorne modalitete (stimuluse). Primera radi, od ispitanika se zahteva da donosi odluke na osnovu vidnih senzacija, a da ignoriše auditivne. Ukoliko radi postizanja cilja priroda zadatka zahteva od jedinke da zameni do tog trenutka relevantni za do tog trenutka nerelevantni stimulus, sposobnost ovakve adaptacije je mera kognitivne fleksibilnosti i naziva se *attention set shift* (Tait and Brown, 2010). Reverzno učenje s druge strane zasniva se na sposobnosti jedinke da adaptira odgovor na promenu (tačno vs netačno) koja nastaje unutar istog senzornog modaliteta. Primera radi, od ispitanika se zahteva da odabere između karata različitih boja (vidne senzacije), od kojih jedna predstavlja tačan izbor, da bi se u određenom trenutku ispitivanja zamenila karta tačnog izbora drugom bojom. U zavisnosti od vrste senzornog modaliteta razlikuju se i vrste reverznog učenja kao na primer vizuelno, senzorno, spacijalno i olfaktivno (Izquierdo et al., 2017).

Najčešće korišćeni test za ispitivanje kognitivne fleksibilnosti je *Wisconsin Card Sorting Task*. Deficitarni skor na ovom testu govori u prilog postojanja kognitivne nefleksibilnosti i lezije PFC - a (Lange et al., 2017). Kognitivna nefleksibilnost predstavlja prilično čest nalaz u kliničkim studijama. Tako su do danas objavljene različite forme deficita reverznog učenja kod pacijenata obolelih od mentalnih poremećaja kao što su shizofrenija, bipolarni poremećaj, depresija i anksioznost (McKirby et al., 2009; Dickstein et al., 2010; Zhu et al., 2020; Xia et al., 2021). Kognitivno oštećenje prisutno je u preko 80% obolelih od shizofrenije (Keefe and Fenton, 2007) i danas se smatra centralnim patološkim entitetom ove bolesti. Dodatni značaj predstavlja slaba uspešnost lečenja to jest farmakorezistencija (Green, 2016). Da li je kognitivna nefleksibilnost osnova ili samo deo kognitivnog spektra kod shizofrenije ostaje da se razjasni. U svakom slučaju oštećenje reverznog učenja prisutno je kod različitih kliničkih tipova shizofrenije i prema fMRI istraživanjima predstavlja pokazatelj PFC disfunkcije (Waltz and Gold, 2007). Imajući u vidu povećanu učestalost RTI kod mentalnih poremećaja, primena animalnih modela kao što je maternalna deprivacija figurira kao relevantno oruđe koje nam može pomoći u razjašnjavanju odgovora na pitanja: Da li proživljeno iskustvo traume tokom detinjstva dovodi ili olakšava razvoj kognitivnog deficita u vidu kognitivne nefleksibilnosti? Na kojim morfološkim i funkcionalnim mehanizmima se temelji ovaj potencijalan uticaj?

PFC obavlja centralnu ulogu u regulaciji reverznog učenja, iako ne sam već u sadejstvu sa drugim strukturama kao što su amigdala, striatum i hipokampus (Bissonette and Powell, 2012). Studije na animalnim modelima dodatno ističu povezanost očuvane GABAergičke funkcije PFC - a i reverznog učenja. Rezultati ovih istraživanja pokazali su prisustvo GABAergičke disfunkcije u mPFC - u i OFC - u pacova i miševa kojima je indukovano oštećenje reverznog učenja (Bissonette et al., 2010; Li et al.,

2016a; Yang et al., 2021). Zanimljivo, hipofunkcija PV+ i somatostatin imunopozitivnih (SST+) ćelija u mPFC - u pacova, izazvana lokalnom injekcijom lentivirusa dovodi do deficita reverznog učenja (Perez et al., 2019). BDNF takođe, zauzima važno mesto u kognitivnom funkcionisanju. Ovaj neurotrofički faktor neophodan je za sazrevanje i uspostavljanje fiziološkog inhibitornog tonusa u PFC - u. Poremećaj u sintezi i ekspresiji BDNF - a dovodi do disfunkcije GABAergičkih ćelija i slabljenja hipokamplano - prefrontalne kontrole kognitivne fleksibilnosti i oštećenja reverznog učenja (Sakata et al., 2009, 2013). Pored toga, poznato je da očuvana kognitivna fleksibilnost zahteva očuvanost sinaptičke plastičnosti u PFC-u (Kroener et al., 2012; Jett et al., 2017).

2. CILJEVI

Ciljevi ove doktorske teze su bili sledeći:

1. Ispitati dugotrajni uticaj MD na gustinu i distribuciju ukupne interneuronske populacije (GAD67+ ćelije), kao i *basket* interneurona (PV+ i CCK+ ćelije) u subregionima mPFC - a i OFC - a mozga pacova
2. Ispitati kratkotrajni i dugotrajni uticaj MD na pokazatelje sinaptičke plastičnosti PFC – a metodom *Western blot* (BDNF, Iba1)
3. Ispitati dugotrajni uticaj MD na funkciju PFC - a bihevioralnom analizom sposobnosti učenja, radne memorije i kognitivne fleksibilnosti

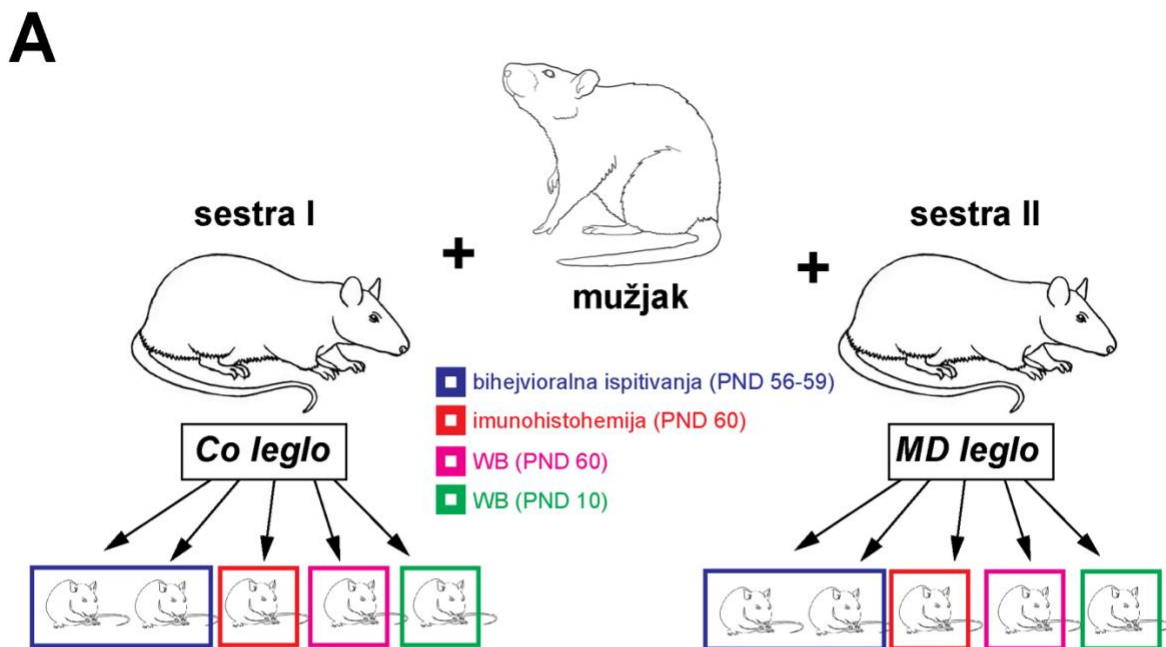
3. MATERIЈAL I METODE

U eksperimentima su korišćeni pacovi oba pola, soja Wistar koji su uzeti iz uzgajališta Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju u Beogradu. Imunohistohemijska i bihejvioralna ispitivanja sprovedena su na Institutu za anatomiju „Niko Miljanić“ Medicinskog fakulteta u Beogradu. Digitalizovane fotokomografije dobijene su na Institutu za istraživanja na mozgu *Cecile & Oscar Vogt, Heinrich Heine* Univerziteta u Diseldorfu. Biohemijska ispitivanja sprovedena su na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu i Laboratoriji za biologiju i biohemiju, Univerziteta u Atini. Maksimalan napor je uložen u cilju smanjivanja patnje i broja eksperimentalnih životinja tokom ispitivanja. Svi eksperimenti su sprovedeni u skladu sa *National Institute for Health* (NIH) Vodičem za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja i odobreni su od strane Etičke komisije za dobrobit laboratorijskih životinja.

3.1. Životinje

Kontrolna (Co) i MD legla dobijena su sparivanjem po jednog mužjaka sa dve ženke poreklom iz istog legla (sestre) pri čemu je randomno okot jedne ženke bio predodređen za MD, a okot druge ženke za kontrolno leglo. Životinje su čuvane u kavezima od pleksiglasa (26 × 42 × 15 cm) sa piljevinom u uslovima kontrolisane temperature (23 ±1°C) i vlažnosti vazduha (40-70%). Ciklus svetlo/tama smenjivan je na svakih 12 časova (upaljena svetla od 7:00 do 19:00). Hrana i voda bili su dostupni *ad libitum*. Nakon dve nedelje i potvrde trudnoće, skotne ženke su pojedinačno smeštane u kaveze, a dan porođaja, označen kao nulti postnatalni dan (PND 0) je strogo kontrolisan dva puta dnevno, ujutru i uveče. Osim za rutinsko čišćenje kaveza, merenje telesne mase i MD postupak (videti 2. Eksperimentalni postupak), nismo uznemiravali životinje sve do dana žrtvovanja. U eksperimentima smo koristili ukupno 15 legala, 7 Co i 8 MD pri čemu smo radi izbegavanja seksualnog dimorfizma za istraživanje koristili samo mužjake. Dvadeset drugog postnatalnog dana (PND 22) životinje su klasifikovane prema polu i grupi, a zatim premeštene u nove kaveze u grupama od 2-4 životinje u zavisnosti od ispitivanja za koje su bile predodređene daljim tokom eksperimenta (Co vs. MD).

Prva grupa životinja koje su korišćene za *Western blot* (WB) žrtvovane su desetog postnatalnog dana (PND 10). Druga i treća grupa životinja žrtvovane su PND 60, pri čemu je druga grupa korišćenja za morfološka ispitivanja, a treća grupa za WB. U cilju izbegavanja efekta legla za morfološka ispitivanja i WB korišćene su životinje poreklom iz 3 - 4 legla po grupi (Co vs MD). Četvrtu grupu činile su po dve životinje iz svakog legla, a korišćene su za ispitivanje sposobnosti učenja, radne memorije i kognitivne fleksibilnosti između PND 56 – 59 (slika 10).



Slika 10. (A) Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna i načina odabira životinja za morfološka, biohemijska i bihevioralna ispitivanja. (B) Vremenski tok eksperimenta

3.2. Eksperimentalni postupak

Postupak maternalne deprivacije je izveden devetog postnatalnog dana (PND 9) odvajanjem mladunaca od majke na period od 24 časa prema prethodno ustanovljenom protokolu (Ellenbroek et al., 1998, 2004). S obzirom da su period sparivanja sa mužjakom provele dve ženke poreklom iz istog legla,

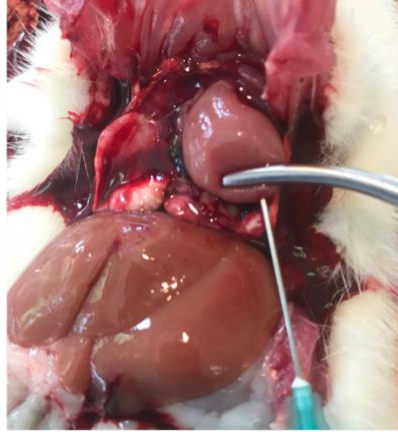
metodom slučajnog izbora, mladunci jedne ženke bili su određeni za buduće Co leglo, dok su mladunci druge ženke bili određeni za buduće MD leglo. Na PND 9 u 10:00, nakon merenja telesna mase, svi mladunci iz MD legala odvojeni su od majke na 24 časa, pri čemu je majka premeštena u susednu prostoriju uzgajališta u zaseban kavez radi eliminisanja zvukova koji bi ukazali na njeno prisustvo kao što su lupanje o kavez, grebanje i skičanje. Co legla nisu odvajana od majke izuzev za period tokom kojeg im je merena telesna masa (3 minuta). Nakon isteka 24 časa separacije, desetog postnatalnog dana (PND 10) u 10:00, majke su vraćene svojim leglima pri čemu je mladuncima obe ispitivane grupe ponovo izmerena telesna masa. Postupak maternalne deprivacije uvek je vršen tako što su svi mladunci iz legla, uključujući i mužjake i ženke odvajani od majke.

3.3. Morfološka ispitivanja

3.3.1. Priprema tkiva za imunohistohemijsko bojenje

Kako bi ispitali dugotrajni uticaj MD na morfologiju interneurona u PFC - u, po 6 životinja iz Co i MD grupe su žrtvovane šezdesetog postnatalnog dana (PND 60). Ovaj uzrast odgovara mladom adultnom dobu u životnom veku pacova (McCutcheon and Marinelli, 2009). Životinje, telesne mase 220 - 270 g, su anestetizirane letalnom dozom kombinacije ketamina i ksilazina (100mg/kg telesne mase; 33mg/kg telesne mase), intraperitonealnom injekcijom u donji levi kvadrant prednjeg trbušnog zida. Nakon što je kod životinja ustanovljena duboka anestezija pristupljeno je fiksaciji ekstremiteta za podlogu od stiropora, pažljivom preparisanju prednjeg trbušnog zida, podizanju prednjeg zida grudnog koša i transkardijalnoj aplikaciji sistema za perfuziju. Nakon što je uz pomoć kleme igla pričvršćena u levoj komori i presečen zid desne pretkomore usledilo je ispiranje sa 150 - 200 ml fiziološkog rastvora (0,9% NaCl), a potom i fiksacija sa 220 - 250 ml rastvora 4% paraformaldehida u 0,1M fosfatnom puferu (PB) pH 7,4. Uspešnost fiksacije je proveravana na osnovu stepena krutosti korena repa. Po izvršenoj dekapitaciji, mozgovi su izvađeni (slika 11) i naknadno fiksirani preko noći potapanjem u isti fiksativ kojim je vršena perfuzija, nakon čega su prebačeni u 30% rastvor saharoze u 0,1M PB pH=7,4 do njihovog potonuća u cilju sprečavanja formiranja kristala leda u tkivu (krioprezervacija). Mozgovi su zatim duboko zamrznuti i čuvani na -80°C sve do sečenja na kriotomu. Serijski frontalni koronalni preseci debljine 25µm dobijeni su korišćenjem kriotoma (*Leica CM1850, Nussloch, Nemačka*) na -25°C. Prethodno je kaudalni pol mozga fiksiran za kriostatski nosač korišćenjem kriostatskog medijuma (*Killik, Milano, Italija*) tako da je ventralni pol orjentisan prema sečivu. Smrznuti preseci su sakupljani na pozitivno naelektrisana *Super Frost Ultra Plus* predmetna stakla (*Thermo Fischer Scientific, Waltham,*

SAD) uz poštovanje standardnih stereoloških principa tako da se nakon završene serije sečenja na jednoj pločici nalazilo 6 frontalnih preseka međusobne udaljenosti 250 μ m (slika 12). Preseci su čuvani na -20°C do imunohistohemijskog bojenja.

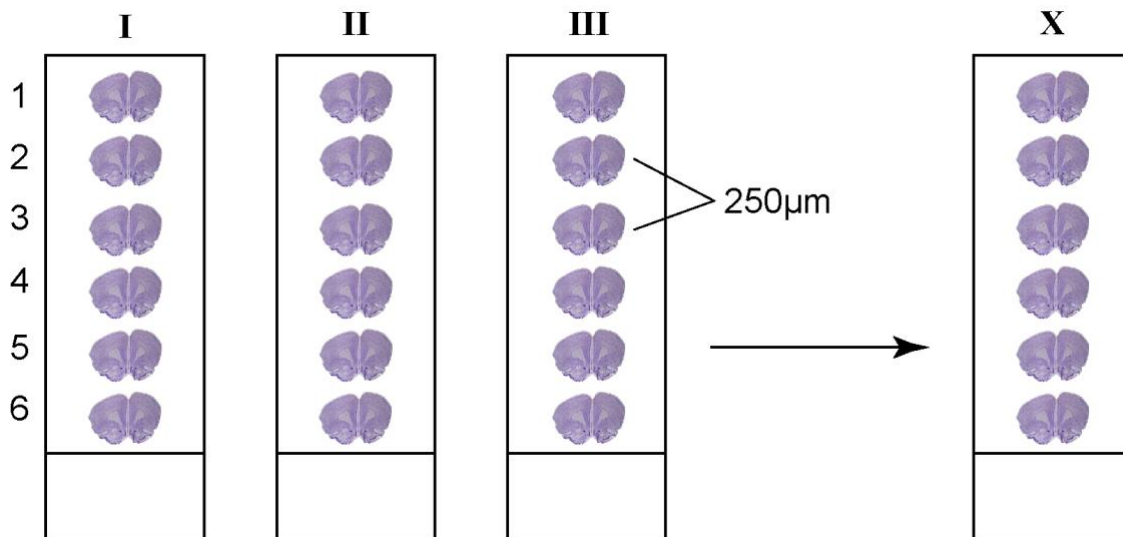


1. OTVARANJE GRUDNOG KOŠA

2. TRANSKARDIJALNA PERFUZIJA

3. VAĐENJE MOZGA

Slika 11. Prikaz transkardijalne perfuzije i ekstrakcije mozga. Nakon resekcije prednjeg trbušnog zida, bočnih zidova grudnog koša i pripoja dijafragme pristupa se srcu i postavljanju vrha injektione igle u levu komoru uz pomoć kleme. Nakon ispiranja fiziološkim rastvorom i perfuzije sa 4% PFA sledi dekapitacija, kraniotomija i vađenje mozga.



Slika 12. Standardizovani stereološki način sakupljanja smrznutih preseka na predmetna stakla. Adaptirano prema (Paxinos and Watson, 2007)

3.3.2. Imunohistohemija

Nakon odmrzavanja i 30 - minutne adaptacije na sobnu temperaturu, preseći su rehidrirani u 0,01M fosfatnom puferu sa 0,9% NaCl (PBS) (3 x 10 min). Preseći koji su bojani na GAD67 i CCK dodatno su ispirani u 0,5% *Triton X-100* PBS - u (3 x 5 min). Ostatak slobodnih aldehidnih grupa u presecima blokirani su primenom 0,1% glicina u PBS - u (10 min), nakon čega je usledilo blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela primenom 10% goveđeg seruma (BSA) (*Serva, Heidelberg*, Nemačka) u 0,3% *Triton X-100* PBS - u (za PV) ili 0,5% *Triton X-100* PBS - u (za GAD67 i CCK) tokom jednog časa na sobnoj temperaturi. Sva primarna antitela rastvorena su u 0,5% *Triton X-100* PBS - u sa 2% BSA, a zatim naneta na preseke u vlažnoj komori na +4°C tokom 24 - 48h. Korišćena primarna antitela, njihova razblaženja i period inkubacije prikazani su u tabeli 1. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, preseći su ispirani u PBS - u (3 x 5 min) i inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (tabela 1) rastvorenim u PBS - u sa 2% BSA tokom 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi. Preseći su zatim temeljno isprani u PBS - u (5 x 5 min), a nuklearno bojenje izvršeno dodavanjem diamidino-2-fenilindola (DAPI) (1:10000, *Serva, Heidelberg*, Nemačka) tokom 10 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Preseći su ponovo temeljno isprani u PBS - u (5 x 5 min), nakon čega su naneti *Mowiol* (*Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*) i pokrovno staklo. Nakon sušenja preko noći, preseći su čuvani na +4°C u mraku.

Tabela 1. Primarna i sekundarna antitela korišćena za detekciju imunopozitivnih ćelija

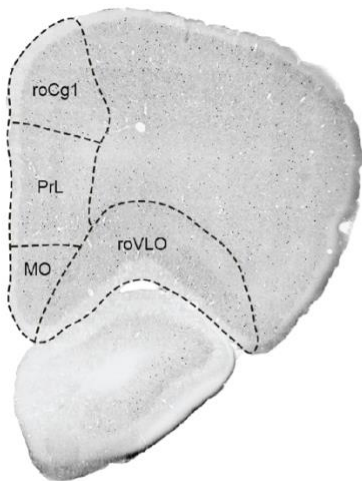
antitelo	vrsta	kataloški broj i proizvođač	razblaženje	period inkubacije
anti – GAD67	primarno mišje monoklonsko	MAB5406 <i>MilliporeSigma</i> SAD	1:1000	48h
anti – PV	primarno mišje monoklonsko	MAB1572 <i>MilliporeSigma</i> SAD	1:2000	24h
anti - CCK	primarno, zečji antiserum	C2581 <i>MilliporeSigma</i> SAD	1:1000	48h
anti - miš	sekundarno kozje, <i>Alexa Fluor</i> ® 488	A-11001 <i>Invitrogen</i> SAD	1:200	2h
anti - zec	sekundarno kozje, <i>Alexa Fluor</i> ® 488	A-21428 <i>Invitrogen</i> SAD	1:200	2h

3.3.3. Dobijanje digitalizovnih fotomikrografija i kvantifikacija

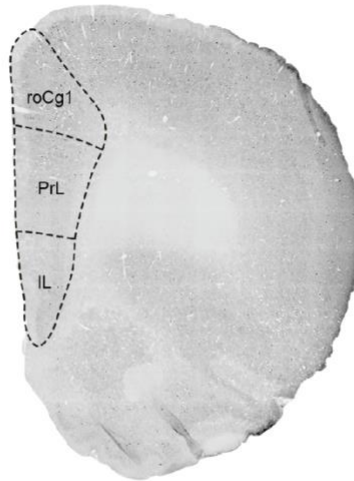
U cilju kvantifikacije gustine ispitivanih imunopozitivnih ćelija, digitalizovane fotomikrografije subregiona PFC - a dobijene su korišćenjem fluorescentnog sistema za skeniranje (*Axio Scan. Z1, Zeiss, Nemačka*) pri uveličanju 20x (*Plan Aplanachromat 20x/0.8 M27*). Ovaj sistem daje mogućnost snimanja celokupnih frontalnih preseka pacovskog mozga i dobijanja slika u visokoj rezoluciji što zatim omogućuje relativno laku parcelaciju PFC-a na subregione na osnovu citoarhitektonskih karakteristika. Kvantifikacija imunopozitivnih ćelija je sprovedena u 4 subregiona mPFC - a i jednom subregionu OFC - a koje smo prethodno ograničili na digitalizovanim slikama koristeći anatomske atlas pacovskog mozga Paxinos i Watson (Paxinos and Watson, 2007). Imena, skraćenice i prostorne koordinate subregiona PFC - a u kojima je vršena kvantifikacija imunopozitivnih ćelija prikazani su u tabeli 2. Za svaki pojedinačni subregion, ćelije su brojane na 5 sistematski randomno izabranih preseka korišćenjem FIJI - ja, javno dostupnog softvera za obradu biomedicinskih slika koji je baziran na programu ImageJ (*ImageJ v.1.46R, NIH, SAD*). Svaki subregion je prvo digitalno opcertan i izolovan kako bi ćelije bile brojane na izolovanoj slici. Nakon toga, izolovani subregion je prekriven rešetkastom mrežom korišćenjem alatke *grid overlay*, sa pojedinačnom površinom kvadratića od $53056\mu\text{m}^2$. Gustina imunopozitivnih ćelija određivana je unutar randomno izabranih kvadratića. Takođe, broj imunopozitivnih ćelija po kvadratiću posebno je kvantifikovan za površinske i duboke slojeve kore u svakoj od ispitivanih subregiona. Tako su slojevi 1 i 2/3 zajedno analizirani kao površinski slojevi, dok su slojevi 5 i 6 zajedno analizirani kao duboki slojevi kore. U zavisnosti od površine ispitivanog subregiona, ćelije su brojane u 5 - 15 kvadratića. Slojevi PFC - a prepoznati su i razlikovani na osnovu gustine ćelijskih jedara na DAPI obojenim presecima i gustine nervnih ćelija na dodatnoj grupi preseka obojenim po *Nissl* – u (Vogt and Paxinos, 2014) (slika 13).

Tabela 2. Prostorne koordinate ispitivanih subregiona PFC – a

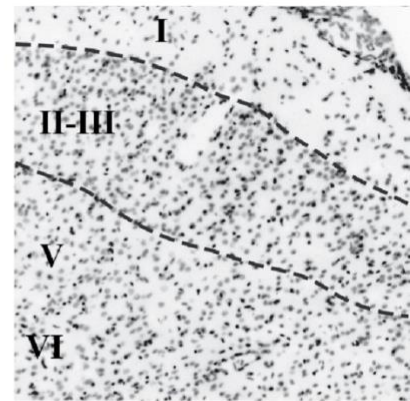
region	skraćenica	koordinate (u odnosu na bregmu)
rostralni deo cingularne kore	roCg1	4,20 do 2,52mm
prelimbička kora	PrL	5,16 do 2,52mm
infralimbička kora	IL	3,72 do 2,52mm
medijalna orbitalna kora	MO	5,64 do 4,20mm
rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore	roVLO	5,64 do 4,20mm



1. PFC - ROSTRALNI PRESEK



2. PFC - KAUDALNI PRESEK



3. NUKLEARNO BOJENJE (DAPI) - PRIKAZ SLOJEVA

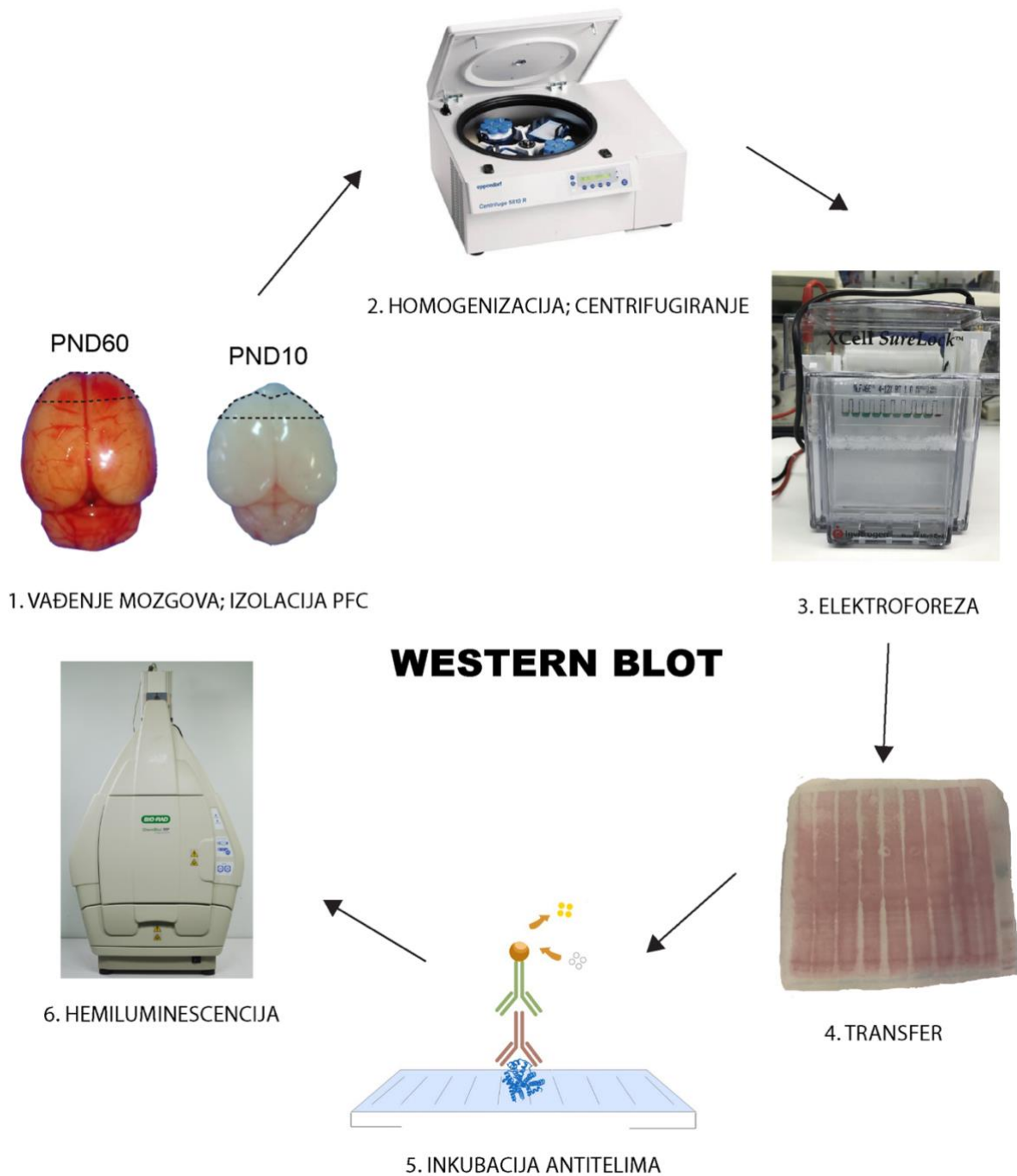
Slika 13. Reprezentativni prikaz subregiona u rostralnoj i kaudalnoj polovini PFC - a i nuklearnog bojenja (DAPI) na osnovu kojeg je izvršena identifikacija slojeva kore.

3.4. Ispitivanje ekspresije proteina

Ekspresija pokazatelja sinaptičke plastičnosti kvantifikovana je metodom *Western Blot*. U cilju ispitivanja kratkotrajnog uticaja ranog životnog stresa na pokazatelje sinaptičke plastičnosti u PFC - u, desetog postnatalnog dana (PND 10) smo žrtvovali 4 životinje iz Co i 5 životinja iz MD grupe. Isti broj životinja po grupi žrtvovan je šezdesetog postnatalnog dana (PND 60) radi ispitivanja dugotrajnog uticaja MD. Životinje su žrtvovane rapidnom cervikalnom dislokacijom nakon čega su mozgovi brzo izvađeni i na ledu izolovani frontalni režnjevi. Kako bi precizno i sa sigurnošću izolovali frontalni režanj, prvo je na ventralnoj strani mozga identifikovana olfaktorna kvrga, a zatim učinjen brz koronalni rez kriostatskim nožem u nivou rostralnog kraja identifikovane strukture. Odsecci su zatim brzo izmereni na analitičkoj vagi i trenutno smrznuti uranjanjem u tečni azot. Do daljeg procesuiranja uzorci su čuvani na -80°C . Homogenizacija uzoraka izvršena je korišćenjem ledeno - hladnog *RIPA* pufera (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 137 mM NaCl, 48 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 1% SDS, i 10% glicerol, 1:250 *Protease Inhibitor Cocktail*, *Sigma-Aldrich*, *St. Louis*, SAD), nakon čega su dobijeni homogenati centrifugirani 20 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ pri brzini od 14000 obrtaja u minuti. Ukupna koncentracija proteina u supernatantu određivana je metodom po *Bradford*-u. Denaturacija proteina izvršena je dodavanjem *loading* pufera (*LDS Sample buffer*, *Invitrogen*, *Waltham*, SAD) i inkubacijom u vodenom kupatilu tokom 20 minuta na $+70^{\circ}\text{C}$. Korišćenjem fabričkog 4 - 12% NuPAGE® Bis-Tris poliakrilamidnog gela (*Invitrogen*, *Waltham*, SAD), proteini su razdvojeni prema težini metodom elektroforeze pri konstantnom naponu od 200V tokom 55 minuta. Prethodno je u svaki bunarić dodato 20 μg ukupnog proteina. Nakon elektroforeze, proteini su prebačeni na 0,45 μm poroznu nitroceluloznu membranu (*Whatman*, *Maidstone*, UK) metodom polu – suvog transfera. Nespecifično vezivanje je blokirano uranjanjem membrana u 5% nemasno suvo mleko rastvoreno u Tris-puferu koji sadrži 0.05% *Tween 20* (TBST) tokom 2 sata na sobnoj temperaturi. Sva primarna antitela rastvorena su u istom rastvoru u kojem je prethodno izvršeno blokiranje, a zatim inkubirana sa membranama preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$. Korišćena primarna antitela i njihova razblaženja prikazana su u tabeli 3. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su isprane u TBST - u (3 x 5 min), a zatim inkubirane sa odgovarajućim HRP - konjugovanim sekundarnim antitelima (tabela 3) tokom 2 sata na sobnoj temperaturi. Usledilo je temeljno ispiranje u TBST-u (5 x 5 min) i detekcija proteinskih tračica metodom pojačane hemiluminescencije korišćenjem radiografskog sistema za automatsko oslikavanje (*ChemiDoc XRS+*, *Bio-Rad*, *Hercules*, SAD) (slika 14). Denzitometrijska kvantifikacija izvršena je automatski u programu *ImageLab*.

Tabela 3. Primarna i sekundarna antitela korišćena za detekciju pokazatelja sinaptičke plastičnosti

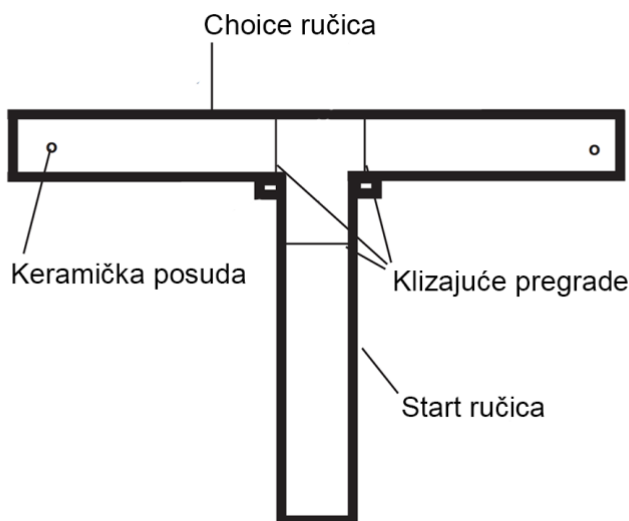
antitelo	vrsta	kataloški broj i proizvođač	razblaženje
anti – BDNF	primarno rekombinantno zečje monoklonsko	ab108319 <i>Abcam</i> UK	1:1000
anti – Iba1	primarno kozje poliklonsko	ab5076 <i>Abcam</i> UK	1:2000
anti - GAPDH	primarno mišje monoklonsko	sc-396062 <i>Santa Cruz</i> SAD	1:1000
anti - zec	sekundarno mišje	4030-05 <i>Southern Biotech</i> SAD	1:1000
anti - koza	sekundarno mišje	sc-2354 <i>Santa Cruz</i> SAD	1:1000
anti - miš	IgG <i>kappa</i> laki lanac vezujući protein	sc-516102 <i>Santa Cruz</i> SAD	1:1000



Slika 14. Shematski prikaz biohemijškog ispitivanja metodom *Western blot*. Odsečki frontalnih režnjeva su homogenizovani i centrifugirani, nakon čega su proteini razdvojeni metodom elektroforeze i izvršen transfer na nitroceluloznu membranu. Usledila je inkubacija membrana sa odgovarajućim primarnim i sekundarnim antitelima i detekcija proteinskih tračica metodom hemiluminescencije

3.5. Ispitivanje učenja, radne memorije i kognitivne fleksibilnosti

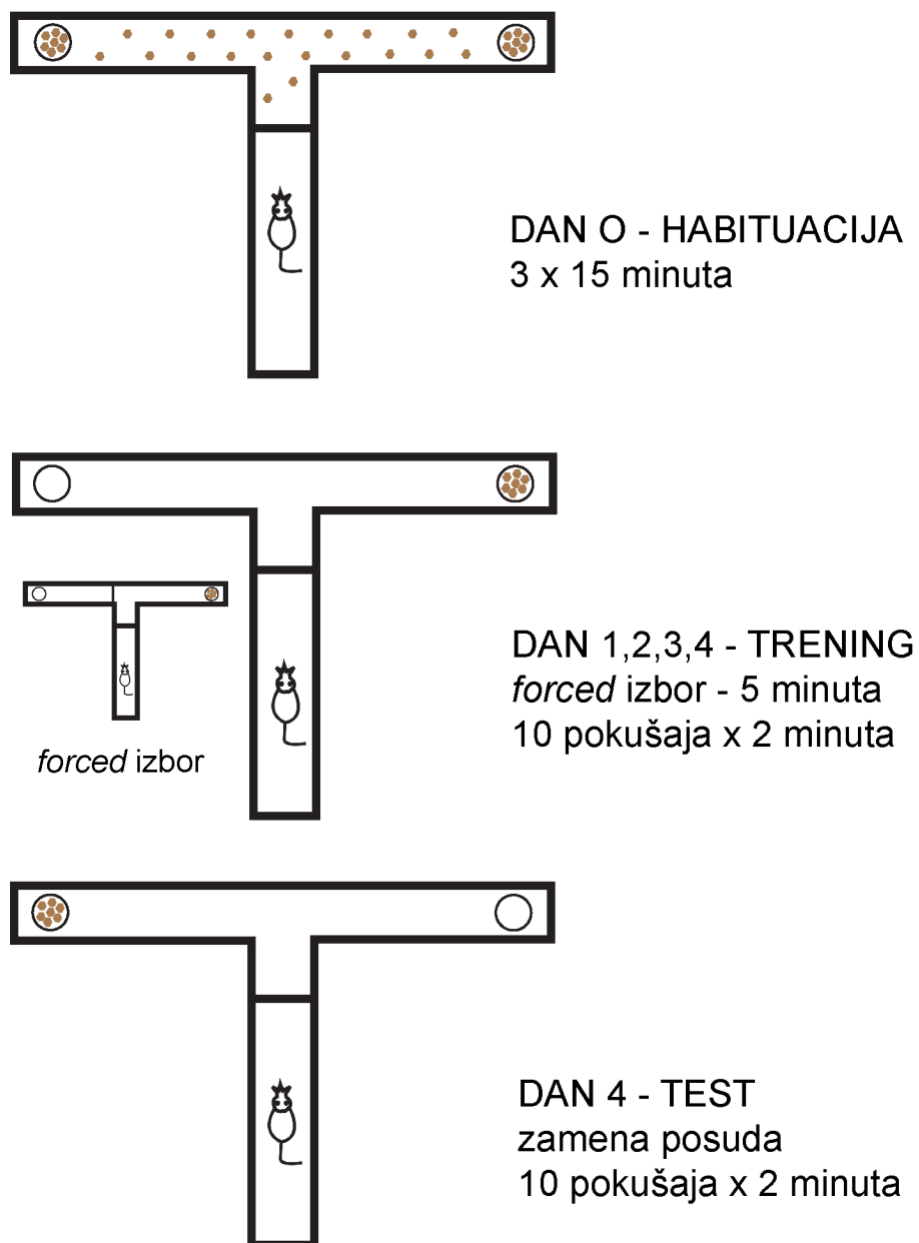
U nameri da ispitamo da li RTI dovodi poremećaja funkcije PFC - a, životinje u ranom adultnom dobu smo podvrgli kognitivnom testu – *Behavioral flexibility in a T-maze task* (BFTMT) prema prethodno ustanovljenom protokolu (Wenk, 2001). Koristili smo ukupno 15 legala pri čemu su po dva mužjaka iz svakog legla korišćena za ispitivanje ($n = 7$ za Co, $n = 8$ za MD). Sva ispitivanja su sprovedena u svetloj fazi ciklusa između 10:00 – 12:00 i snimljena video kamerom. Kako bi ih motivisali za testiranje, životinje su podvrgnute restriktivnom režimu ishrane (7g/2 životinje - kavez) 3 dana pred početak habituacije. Restriktivni režim je trajao sve do kraja ispitivanja, pri čemu su kao hrana, a ujedno i nagrada tokom testiranja korišćene čokoladne pahuljice (370kcal/100g). Habituacija, trening i testiranje životinja sprovedeno je u drvenom T – lavirintu, koja se sastoji iz jedne *start* ručice (50 x 16 x 30 cm) i dve ručice izbora (*choice* ručice, leve i desne, 50 x 10 x 30 cm). *Start* ručica je dodatno pregrađena klizajućom pregradom koja se podiže na početku svakog pokušaja tokom treninga i testiranja. Na kraju obe *choice* ručice nalazila se po jedna keramička posuda: popunjena nagradnim čokoladnim pahuljicama ili prazna (slika 15).



Slika 15. T – lavirint. Adaptirano prema (Deacon and Rawlins, 2006).

Tokom habituacije (PND 55) životinje su puštane u T - lavirint u trajanju od 15 minuta (3 x 5 min). Prvo su obe ručice izbora i keramičke posude posute čokoladnim pahuljicama, nakon čega je životinji dozvoljeno da se slobodno kreće i istražuje T - lavirint. Posle habituacije, usledio je četvorodnevni trening (PND 56 - 59, faza akvizicije). Kako bi bili sigurni da se životinje ne koriste čulom

mirisa pri odlučivanju, van T – lavirinta su postavljene čokoladne pahuljice na jednakoj udaljenosti (~10cm). Svaki dan treninga započinjao je *forced* izborom (5 min) tokom kojeg se ručica izbora sa praznom keramičkom posudom (bez nagrade) blokira dodatnom pregradom. Na taj način, životinja se usmeravala u nagradnu ručicu izbora, u cilju stimulacije radne memorije ispitivane životinje. Po završetku *forced* izbora, dodatna pregrada se uklanjala, a životinja dobijala 10 pokušaja od po 2 minuta da napravi izbor između leve i desne ručice izbora, od kojih jedna sadrži punu (tačan izbor), a druga praznu (pogrešan izbor) keramičku posudu. Kao parametar izbora, podrazumevalo se da životinja mora jasno proturiti njušku u keramičku posudu. U slučaju tačnog izbora, životinji se dozvoljavalo da pojede uzeti čokoladni keks, pre nego što se vrati u *start* ručicu i započne novi pokušaj. U slučaju pogrešnog izbora, životinja se odmah vraćala u *start* ručicu, kao i ukoliko životinja nije napravila izbor tokom 2 predviđena minuta. Četvrtog dana treninga (PND 60) koji je ujedno označen i kao dan testa, sprovedeno je testiranje radne memorije i kognitivne fleksibilnosti. Kriterijum da životinja pristupi testiranju bio je da tokom trećeg dana treninga napravi minimum 8 izbora, nezavisno od odnosa tačnih i pogrešnih. Kvantifikacijom tačnih izbora tokom prvih deset pokušaja (test faza) ispitana je radna memorija. Nakon desetog pokušaja, umesto završetka testa i povratka u kavez, ispitivana životinja je vraćena u *start* ručicu, pri čemu su krišom zamenjena mesta keramičkim posudama. Usledilo je novih 10 pokušaja (reverzna faza) u novonastalim uslovima čime je sprovedeno testiranje kognitivne fleksibilnosti. Tokom reverzne faze, pored broja tačnih odgovora dodatno je kvantifikovan i broj istrajnih grešaka – pogrešni izbori u nizu nakon zamene tačne ručice izbora, kao i broj regresivnih grešaka – pogrešni izbori koje životinja napravi nakon prvog tačnog izbora u reverznoj fazi. Utrošeno vreme za donošenje odluke mereno je tokom testiranja radne memorije i reverzne faze testiranja kao vremenski interval od podizanja klizajuće pregrade (početka pokušaja) i proturivanja nosa eksperimentalne životinje (trenutak izbora) (slika 16).



Slika 16. Ilustrativni prikaz ispitivanja sposobnosti učenja, radne memorije i kognitivne fleksibilnosti. Nakon habituacije usledio je četvorodnevni trening. Svaki dan treninga počinjao je petominutnim *forced* izborom posle kojeg je životinja dobijala 10 pokušaja da napravi izbor između desne i leve ručice. Četvrtog dana treninga koji je označen kao dan testa, životinjama je tokom 10 pokušaja (test faza) ispitana radna memorija, nakon čega su posude zamenjene i u novih 10 pokušaja (reverzna faza) ispitano reverzno učenje.

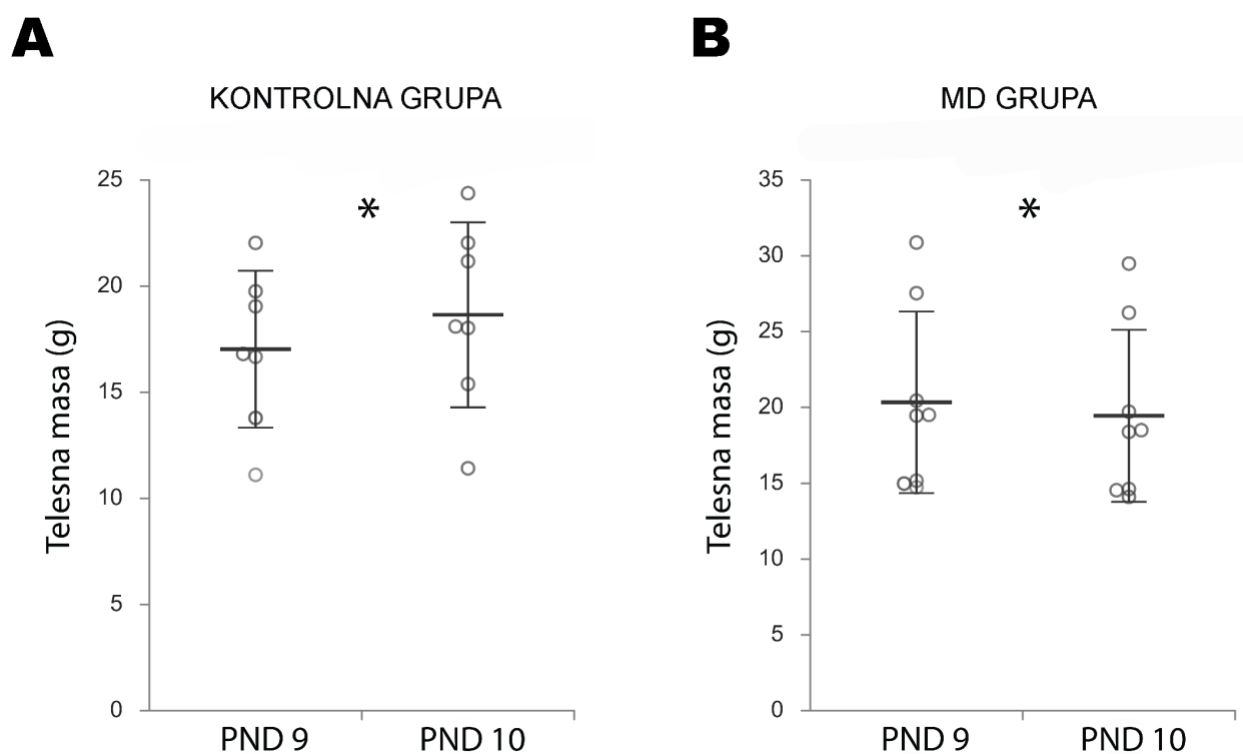
3.6. Statistička analiza

Dobijeni podaci telesne mase, ćelijske gustine, ekspresije proteina, kao i podaci dobijeni tokom ispitivanja radne memorije i kognitivne fleksibilnosti analizirani su korišćenjem statističke metode *generalized linear model* (GLM) i grafički su prikazani *dot plot* dijagramima. Dobijeni podaci tokom ispitivanja učenja i utrošenog vremena za donošenje odluke tokom četvrtog dana treninga i reverzne faze obrađeni su upotrebom statističke metode *generalized estimated equations* (GEE), grafički su prikazani dijagramom razbijanja i *dot plot* dijagramom. Za sve podatke statistička značajnost definisana je na nivou verovatnoće nulte hipoteze od $p \leq 0.0015$. (0.05/33, ukupan broj statističkih poređenja). Korigovani nivo statističke značajnosti je korišćen radi smanjenja mogućnosti greške prvog tipa pri multiplim testiranjima. Navedeni testovi su obrađeni upotrebom softvera SPSS (*Release 21, SPSS, SAD*). Grafički prikaz dobijenih rezultata izvršen je u programu *Interactive Dotplot* (Weissgerber et al., 2017).

4. REZULTATI

4.1. Uticaj maternalne deprivacije na telesnu masu pacova

Kod kontrolnih mladunaca, telesna masa je bila statistički značajno veća (GEE, efekat dana: $W_{1,36}=42.533$, $p<0.0015$) na PND 10 ($18.64 \pm 4.36g$) u odnosu na PND 9 ($17.03 \pm 3.7g$). Suprotno, kod MD mladunaca, telesna masa bila je statistički značajno manja ($W_{1,31}=20.562$, $p<0.0015$) nakon odvajanja od majke (PND 10, $19.45 \pm 5.67g$ vs. PND 9, $20.33 \pm 5.99g$) (slika 17; tabela 4).



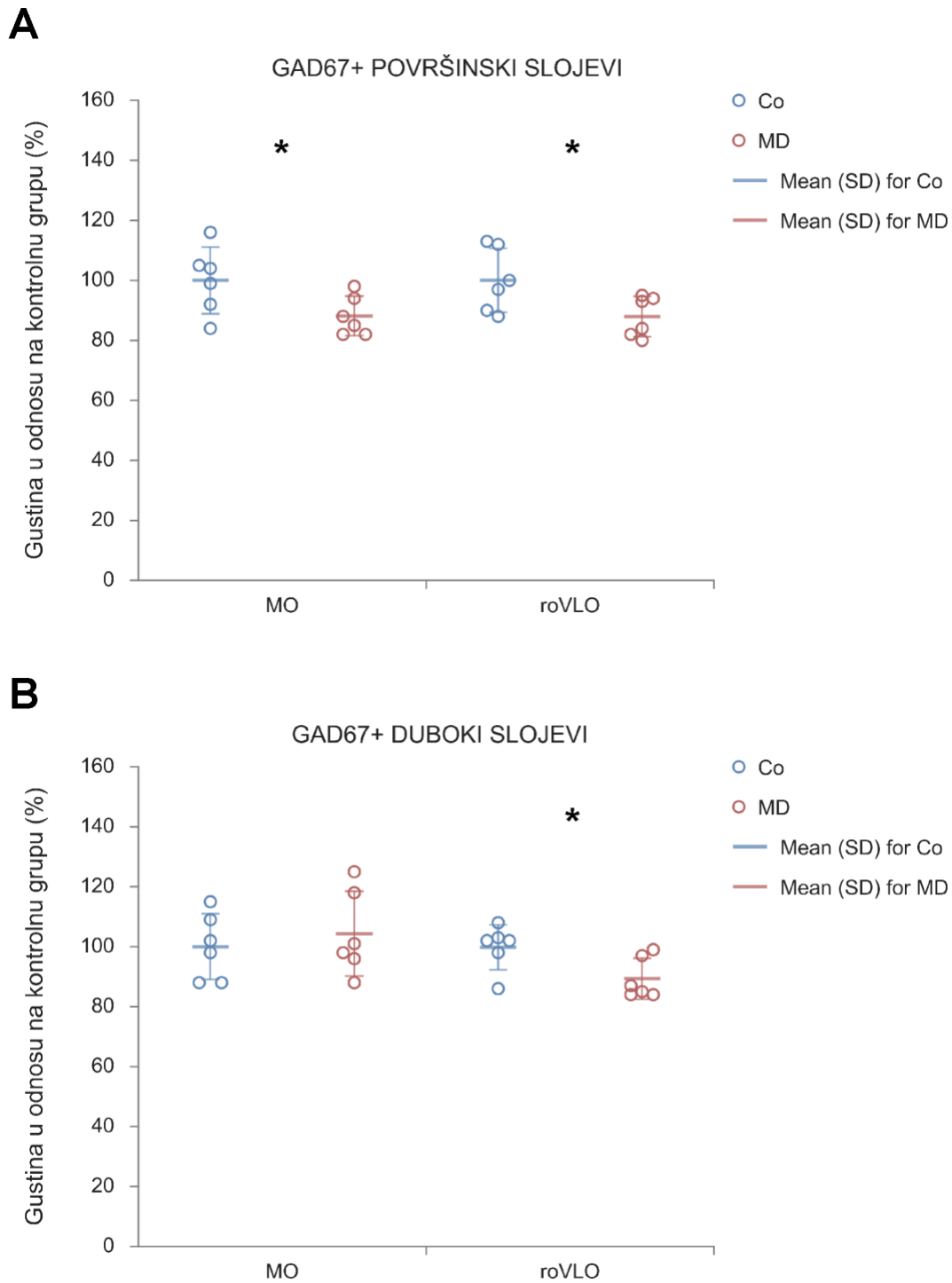
Slika 17. Telesna masa merena na PND 9 i PND 10 u Co (A) i MD grupi (B). Dot plot grafikoni u panelima A i B predstavljaju kvantifikaciju dobijenih rezultata kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice). Jedinice posmatranja predstavljaju prosečne vrednosti telesne mase legala (kružići), $n = 7$ za Co, $n = 8$ za MD. Na PND 10, telesna masa kontrolnih legala bila je statistički značajno viša (A), a MD legala značajno niža u odnosu na PND 9 (B). $*p < 0.0015$ PND 9 vs PND 10. PND 9 deveti postnatalni dan, PND 10 deseti postnatalni dan.

Tabela 4. Telesna masa Co i MD legala na PND 9 i PND 10. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa, PND 9 deveti postnatalni dan, PND 10 deseti postnatalni dan.

<i>leglo</i>	<u>Co</u>			<u>MD</u>		
	broj životinja	PND 9	PND 10	broj životinja	PND9	PND 10
1	13	13,79	15,39	7	19,46	18,39
2	7	22,04	24,38	10	14,73	14,10
3	/	/	/	12	15,17	14,62
4	10	19,76	22,04	9	27,54	26,25
5	10	16,81	18,10	9	19,51	18,50
6	10	16,67	18,03	3	30,88	29,49
7	10	19,05	21,17	7	14,98	14,54
8	12	11,11	11,42	9	20,45	19,72
<i>Središnja vrednost</i>	10,29	17,03	18,65	8,25	20,34	19,45
<i>SD</i>	1,89	3,70	4,36	2,66	5,99	5,67

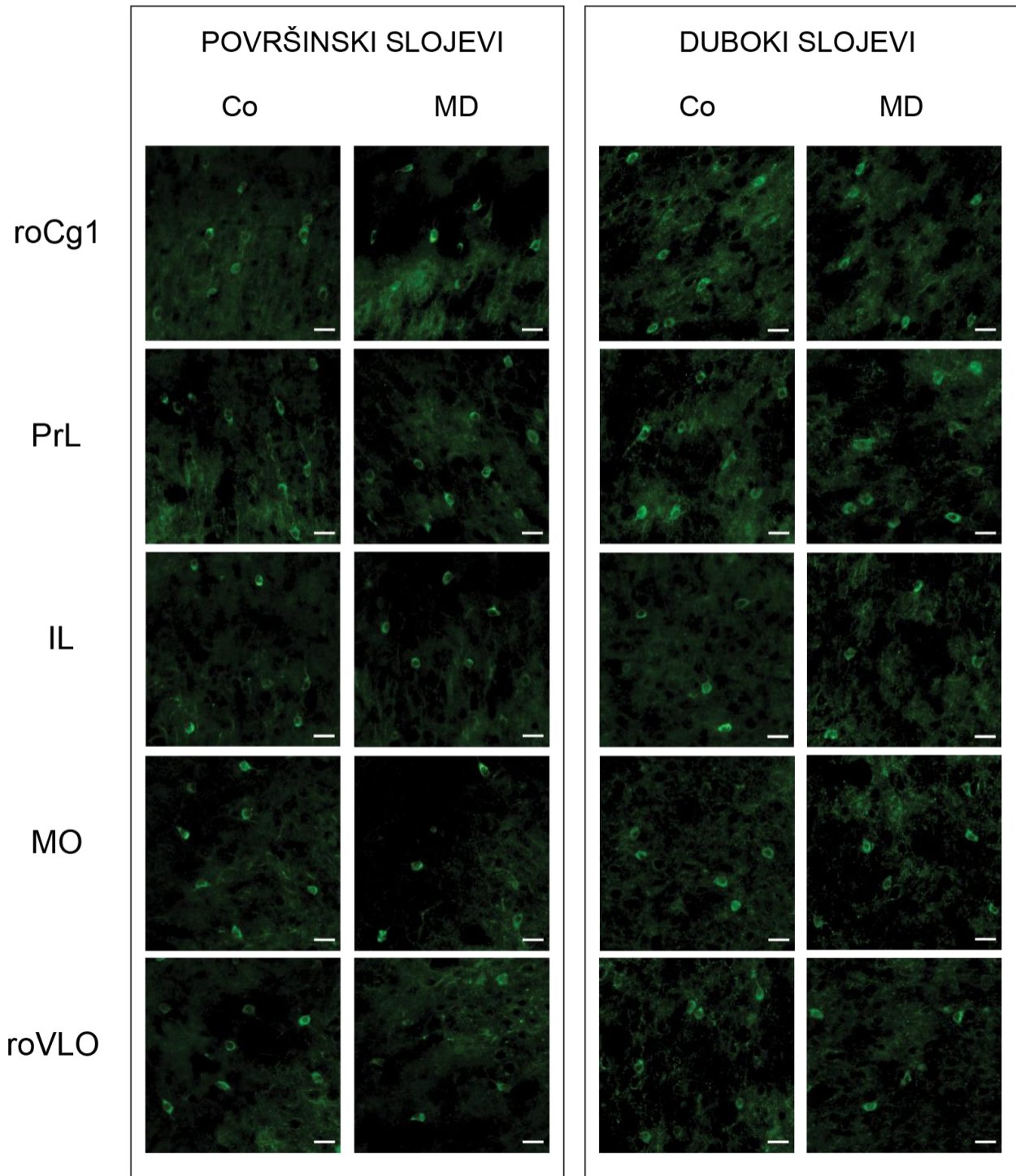
4.2. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na gustinu GAD67+ ćelija u prefrontalnom korteksu

Kako bi ispitali gustinu i distribuciju ukupne populacije interneurona kod MD životinja, brojali smo GAD67+ ćelije (interneuroni) u 5 subregiona PFC - a, posebno za površinske i duboke kortikalne slojeve. Maternalna deprivacija uzrokovala je statistički značajno smanjenje gustine GAD67+ ćelija kako u površinskim (GLM: $W_{1,11}=15.890$, $p<0.0015$), tako i u dubokim slojevima roVLO (GLM: $W_{1,11}=42.360$, $p<0.0015$) mladih adultnih pacova. Statistički značajno smanjenje gustine GAD67+ ćelija pronađeno je i u površinskim slojevima MO (GLM: $W_{1,11}=10.327$, $p<0.0015$) dok u dubokim slojevima MO i celokupnoj kortikalnoj debljini roCg1, PrL i IL mladih adultnih pacova nije pronađena statistički značajna razlika (slike 18 - 20; tabele 5 i 6).



Slika 18. Uticaj MD na gustinu GAD67+ ćelija u MO i roVLO mladih adultnih (PND 60) mužjaka. *Dot plot* grafikoni u panelima **A** i **B** predstavljaju kvantifikaciju dobijenih rezultata kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 6$ po grupi, za površinske i duboke slojeve MO i roVLO. Kod MD životinja, pronađena je smanjena gustina GAD67+ ćelija u površinskim i dubokim slojevima roVLO (**A**, **B**), kao i u površinskim slojevima MO (**A**). $*p < 0.0015$ Co vs MD. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa, MO medijalna orbitalna kora, roVLO rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.

GAD67+ ćelije



Slika 20. Reprezentativne fotomikrografije GAD67+ imunohistohemijskog bojenja u površinskim (levo) i dubokim slojevima (desno) PFC – a. *roCg1* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore. Barovi predstavljaju dužunu 25 μ m

Tabela 5. Gustina GA67+ ćelija u površinskim slojevima PFC – a mladih adultnih (PND 60) mužjaka u odnosu na središnje vrednosti kontrolne grupe. Rezultati su prikazani u procentima (%). *roCgI* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.

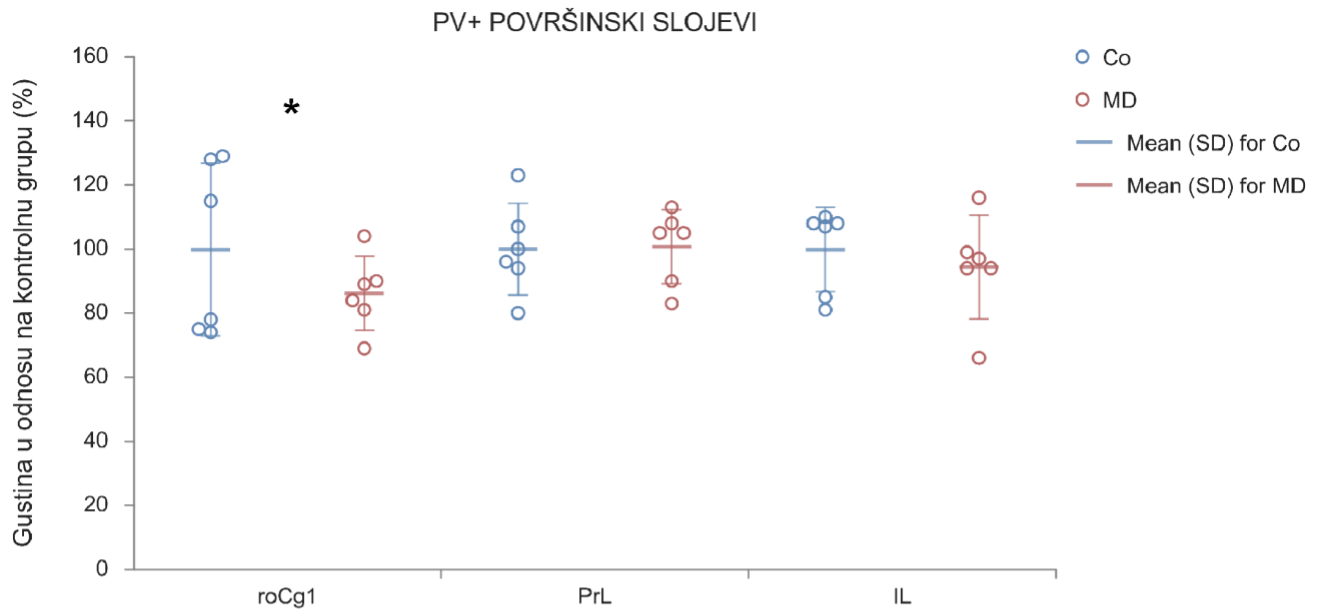
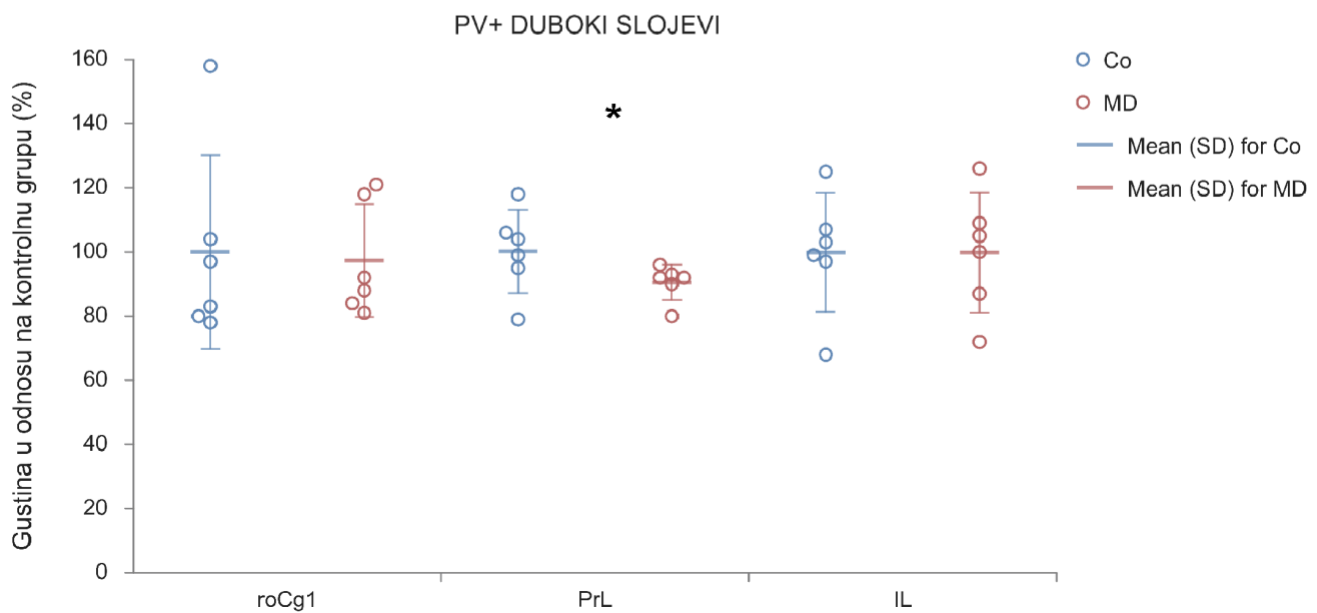
<i>br. životinje</i>	<u><i>roCgI</i></u>		<u><i>PrL</i></u>		<u><i>MO</i></u>		<u><i>roVLO</i></u>		<u><i>IL</i></u>	
	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>
1	106,79	105,34	104,12	100,21	83,72	81,63	88,34	79,53	84,47	97,25
2	107,81	100,27	126,59	88,88	116,41	87,88	100,25	93,93	99,95	86,45
3	117,80	91,96	99,43	86,23	104,75	98,09	112,83	84,05	108,06	104,75
4	88,60	122,00	84,16	88,30	104,17	94,46	111,90	92,82	103,38	93,20
5	92,32	81,68	90,37	102,56	92,04	84,97	96,61	81,99	114,81	85,55
6	86,66	91,70	95,33	83,02	98,92	81,84	90,07	95,50	89,33	92,75
<i>Središnja vrednost</i>	100	98,82	100	91,53	100	88,14	100	87,97	100	93,32
<i>SD</i>	12,58	13,95	14,76	7,94	11,30	6,80	10,51	6,90	11,41	7,13

Tabela 6. Gustina GA67+ ćelija u dubokim slojevima PFC – a mladih adultnih (PND 60) mužjaka u odnosu na središnje vrednosti kontrolne grupe. Rezultati su prikazani u procentima (%). *roCgI* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.

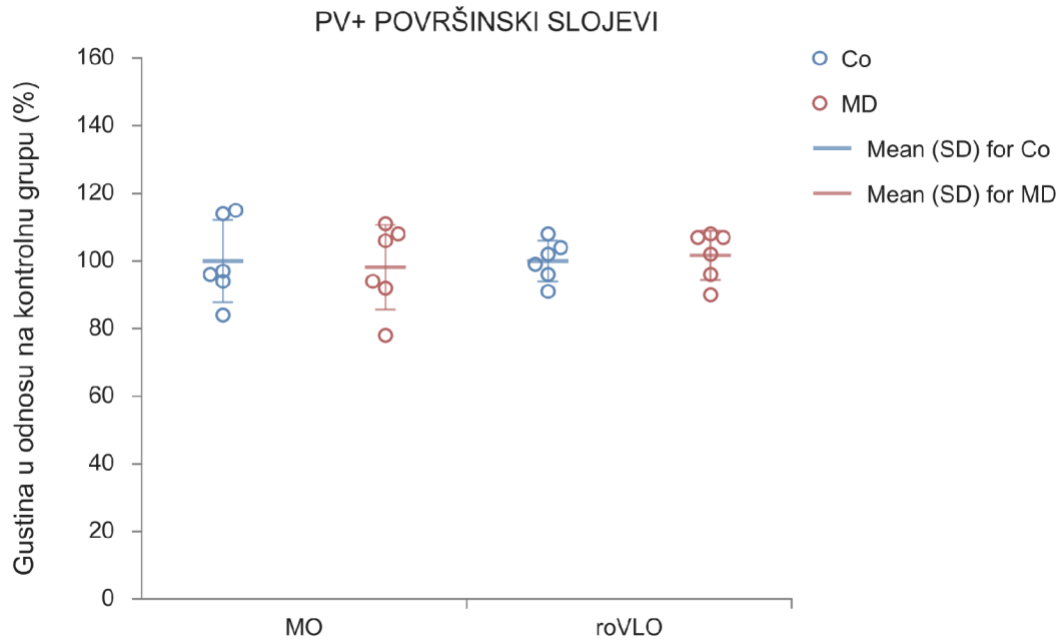
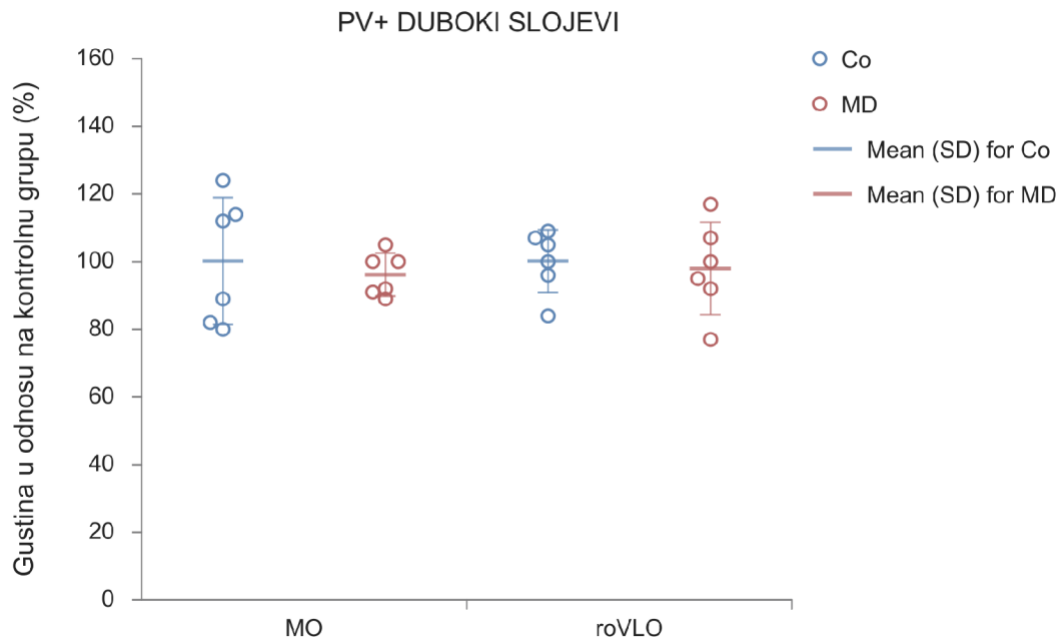
<i>br. životinje</i>	<u><i>roCgI</i></u>		<u><i>PrL</i></u>		<u><i>MO</i></u>		<u><i>roVLO</i></u>		<u><i>IL</i></u>	
	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>
1	98,85	96,89	98,93	125,67	87,69	100,92	98,48	85,11	96,16	103,18
2	117,37	123,04	111,65	114,25	108,76	124,92	86,36	87,38	95,20	91,48
3	117,24	96,57	112,38	104,64	114,64	96,02	102,21	83,86	97,60	100,63
4	74,10	103,76	89,32	99,08	98,47	117,58	107,73	84,41	110,63	122,86
5	98,43	92,83	92,18	116,84	102,27	88,18	102,21	99,21	108,50	88,82
6	94,01	90,97	95,55	83,30	88,18	98,47	103,01	97,34	91,91	84,04
<i>Središnja vrednost</i>	100	100,68	100	107,3	100	104,35	100	89,55	100	98,50
<i>SD</i>	16,18	11,80	9,85	15,02	10,86	13,97	7,31	6,89	7,67	13,94

4.3. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na gustinu PV+ i CCK+ ćelija u prefrontalnom korteksu

U cilju ispitivanja promena gustine i distribucije *basket* ćelija kod MD životinja, pristupili smo brojanju PV+ i CCK+ ćelija u 5 subregiona PFC - a, posebno za površinske i duboke kortikalne slojeve. Kod mladih adultnih MD životinja, pronađeno je statistički značajno smanjenje gustine PV+ ćelija u površinskim slojevima roCg1 (GLM: $W_{1,11}=25,871$, $p<0.0015$) i dubokim slojevima PrL (GLM: $W_{1,11}=14.514$, $p<0.0015$). Gustina PV+ ćelija nije se razlikovala između kontrolne i MD grupe u dubokim slojevima roCg1, površinskim slojevima PrL i celokupnoj kortikalnoj debljini MO, IL i roVLO (slike 21 - 23; tabele 7 i 8).

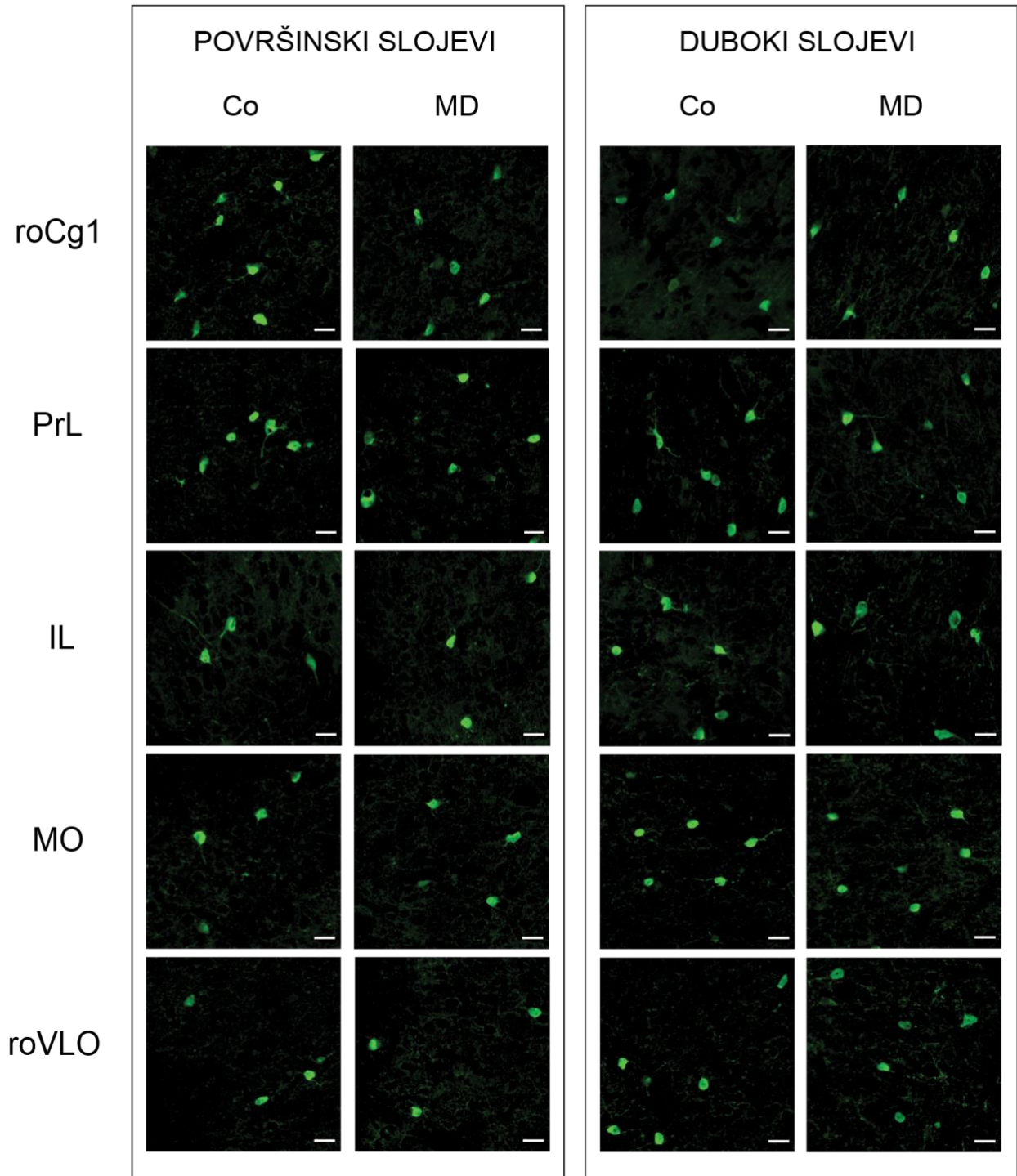
A**B**

Slika 21. Uticaj MD na gustinu PV+ ćelija u roCg1, PrL i IL mladih adultnih (PND 60) mužjaka. *Dot plot* grafikoni u panelima **A** i **B** predstavljaju kvantifikaciju dobijenih rezultata kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 6$ po grupi, za površinske i duboke slojeve roCg1, PrL i IL. Kod MD životinja, pronađena je smanjena gustina PV+ ćelija u površinskim slojevima roCg1 (**A**), kao i u dubokim slojevima PrL (**B**). $*p < 0.0015$ Co vs MD. roCg1 rostralni deo cingularne kore, Co kontrolna grupa, IL infralimbička kora, MD maternalno deprivirana grupa, PrL prelimbička kora.

A**B**

Slika 22. Uticaj MD na gustinu PV+ ćelija u MO i roVLO mladih adultnih (PND 60) mužjaka. *Dot plot* grafikoni u panelima **A** i **B** predstavljaju kvantifikaciju dobijenih rezultata kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 6$ po grupi, za površinske i duboke slojeve MO i roVLO. *Co* kontrolna grupa, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.

PV+ ćelije



Slika 23. Reprezentative fotomikrografije PV+ imunohistohemijskog bojenja u površinskim (levo) i dubokim slojevima (desno) PFC – a. *roCg1* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore. Barovi predstavljaju dužinu 25 μ m

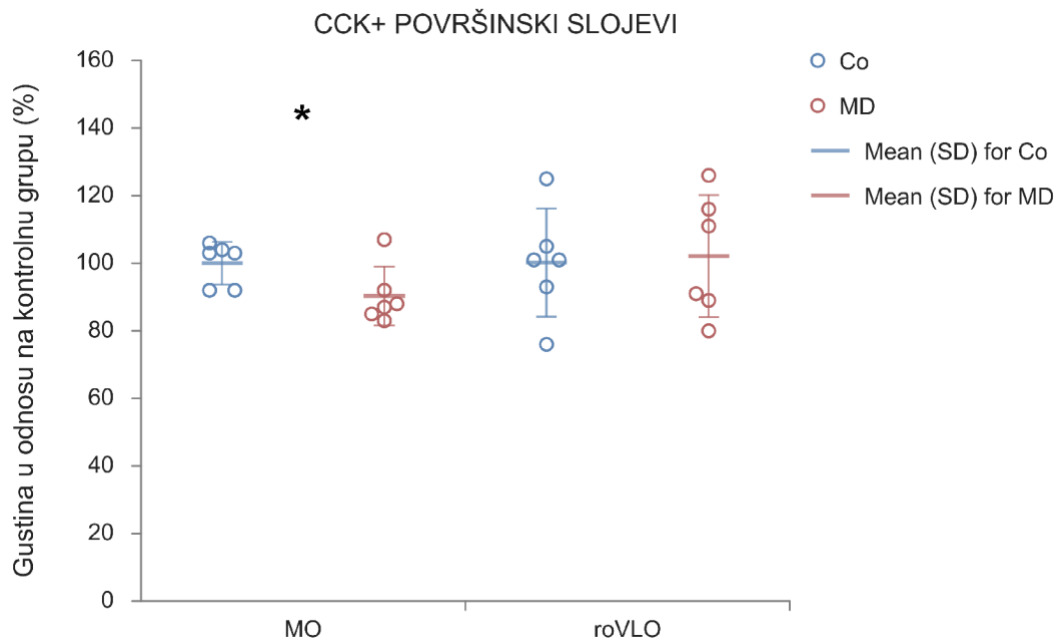
Tabela 7. Gustina PV+ ćelija u površinskim slojevima PFC – a mladih adultnih (PND 60) mužjaka u odnosu na središnje vrednosti kontrolne grupe. Rezultati su prikazani u procentima (%). *roCgI* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.

<i>br. životinje</i>	<u><i>roCgI</i></u>		<u><i>PrL</i></u>		<u><i>MO</i></u>		<u><i>roVLO</i></u>		<u><i>IL</i></u>	
	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>
1	73,78	89,20	80,20	113,11	83,72	81,63	96,07	107,48	108,21	94,03
2	75,50	83,89	94,25	90,49	116,41	87,88	91,17	108,47	110,45	97,16
3	78,21	69,39	99,98	104,54	104,75	98,09	101,83	90,22	85,07	94,48
4	127,69	80,95	107,20	82,97	104,17	94,46	103,74	107,08	80,60	98,51
5	129,45	103,95	95,58	104,82	92,04	84,97	108,40	101,51	108,21	115,86
6	115,38	89,82	122,79	107,58	98,92	81,84	98,79	95,72	107,46	65,67
<i>Središnja vrednost</i>	100	86,20	100	100,59	100	97,99	100	101,74	100	94,28
<i>SD</i>	26,96	11,43	14,25	11,42	12,01	12,65	6,05	7,43	13,41	16,19

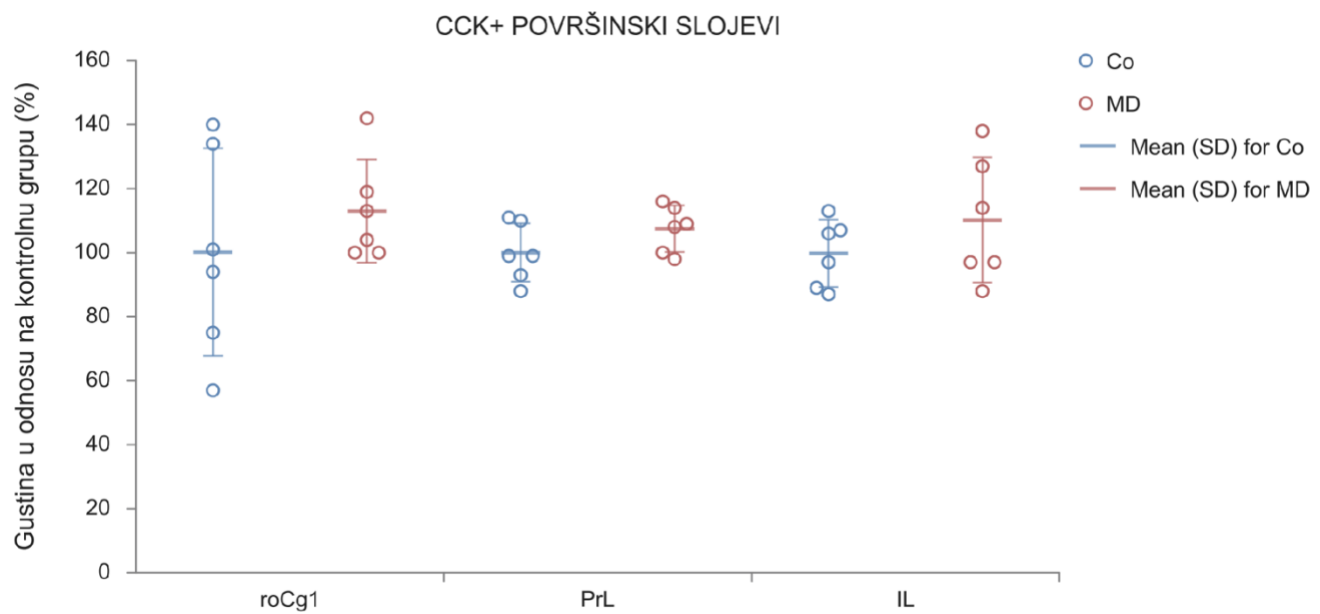
Tabela 8. Gustina PV+ ćelija u dubokom slojevima PFC – a mladih adultnih (PND 60) mužjaka u odnosu na središnje vrednosti kontrolne grupe. Rezultati su prikazani u procentima (%). *roCgI* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.

<i>br. životinje</i>	<u><i>roCgI</i></u>		<u><i>PrL</i></u>		<u><i>MO</i></u>		<u><i>roVLO</i></u>		<u><i>IL</i></u>	
	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>	<i>Co</i>	<i>MD</i>
1	82,94	120,54	104,47	95,67	81,52	100,23	107,02	116,59	124,97	100,29
2	79,96	83,59	94,66	80,48	114,12	89,06	100,07	106,56	68,45	71,64
3	97,10	88,31	117,53	91,57	88,56	92,08	83,71	92,45	98,70	87,24
4	158,36	118,33	78,67	93,06	80,31	99,63	104,51	95,34	106,98	104,67
5	103,68	91,79	99,14	92,48	123,78	90,57	109,12	99,87	103,48	126,29
6	77,97	80,73	105,53	89,81	111,71	105,07	95,57	77,36	97,43	108,65
<i>Središnja vrednost</i>	100	97,22	100	90,51	100	96,11	100	98,03	100	99,80
<i>SD</i>	30,35	17,64	12,98	5,28	18,77	6,42	9,36	13,31	18,37	18,73

U površinskim slojevima MO došlo je do statistički značajnog smanjenja gustine CCK+ ćelija kod mladih adultnih MD pacova (GLM: $W_{1,11}=12.316$, $p<0.0015$). U površinskim slojevima roCg1, PrL, roVLO i IL nije pronađena statistički značajna razlika između kontrolne i MD grupe (slike 24 - 26; tabela 9).

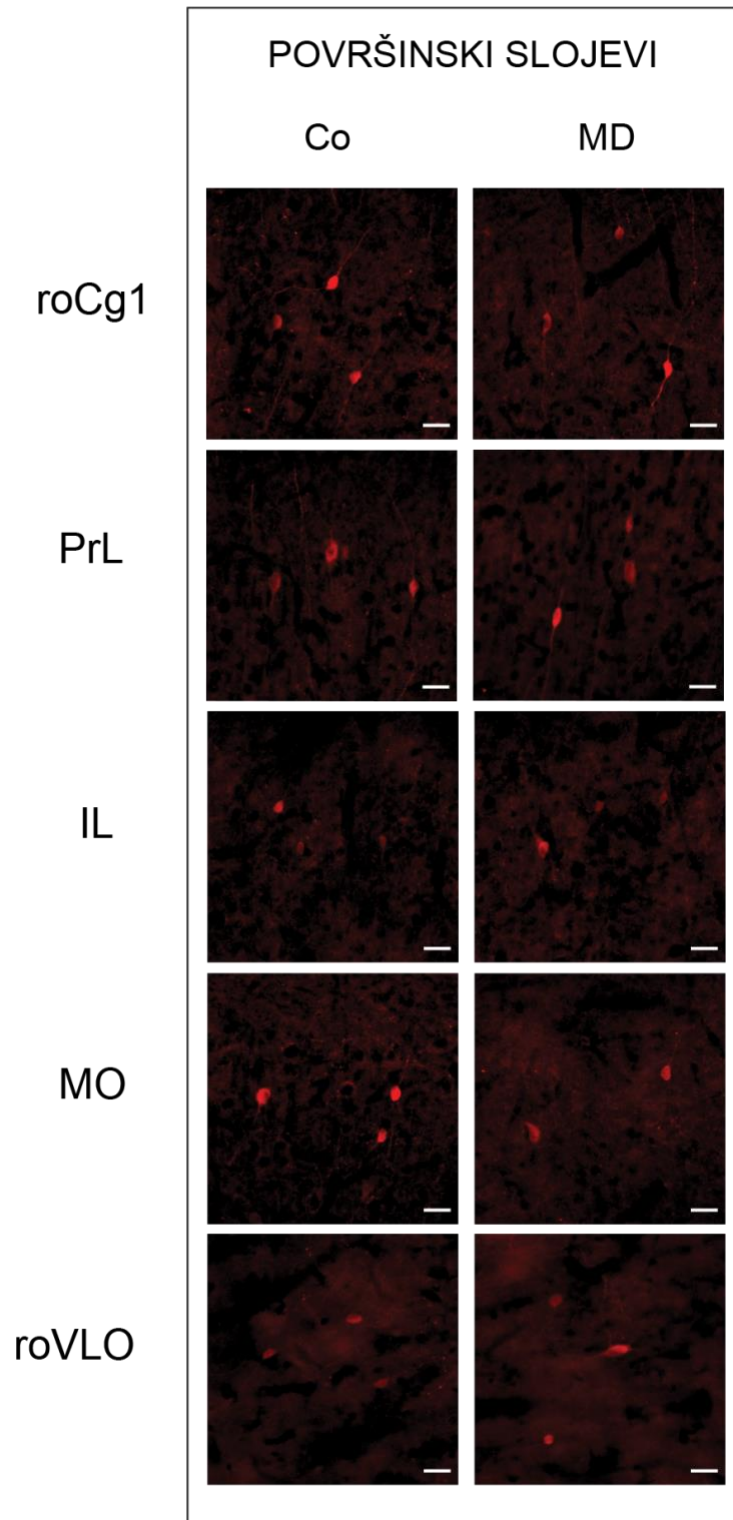


Slika 24. Uticaj MD na gustinu CCK+ ćelija u MO i roVLO mladih adultnih (PND 60) mužjaka. *Dot plot* grafikom predstavlja kvantifikaciju dobijenih rezultata kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 6$ po grupi, za površinske slojeve MO i roVLO. Kod MD životinja, pronađena je smanjena gustina CCK+ ćelija u površinskim slojevima MO. $*p < 0.0015$ Co vs MD. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa, MO medijalna orbitalna kora, roVLO rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.



Slika 25. Uticaj MD na gustinu CCK+ ćelija u roCg1, PrL i IL mladih adultnih (PND 60) mužjaka. *Dot plot* grafikon predstavlja kvantifikaciju dobijenih rezultata kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 6$ po grupi, za površinske slojeve roCg1, PrL i IL. *roCg1* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *PrL* prelimbička kora.

CCK+ ćelije



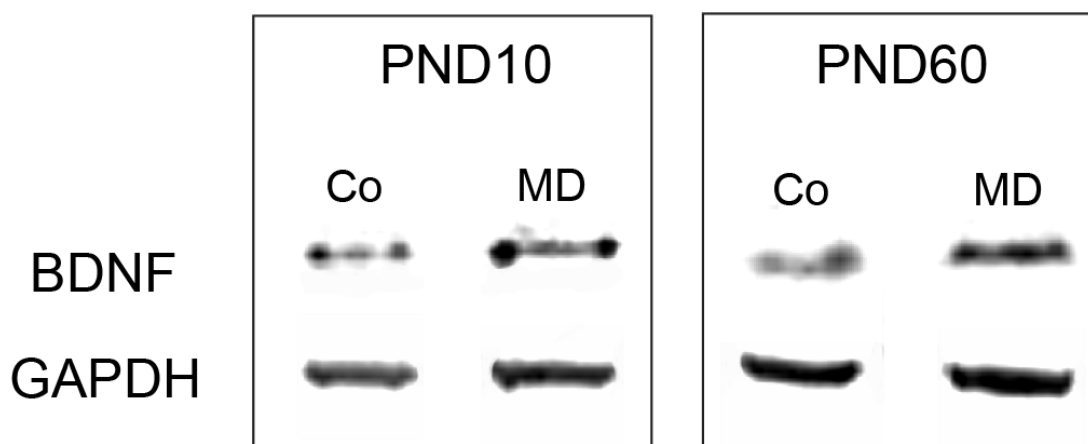
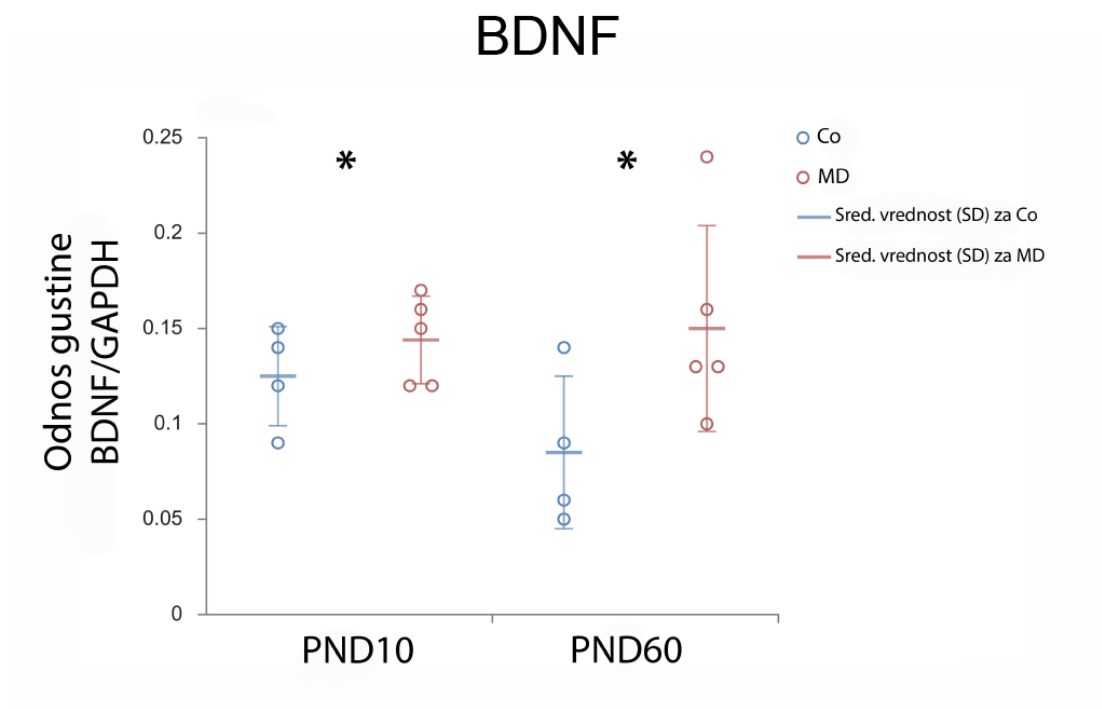
Slika 26. Reprezentative fotomikrografije CCK+ imunohistochemijskog bojenja u površinskim slojevima PFC – a. *roCg1* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore. Barovi predstavljaju dužinu 25 μ m

Tabela 9. Gustina CCK+ ćelija u površinskim slojevima PFC – a mladih adultnih (PND 60) mužjaka u odnosu na središnje vrednosti kontrolne grupe. Rezultati su prikazani u procentima (%). *roCgI* rostralni deo cingularne kore, *Co* kontrolna grupa, *IL* infralimbička kora, *MD* maternalno deprivirana grupa, *MO* medijalna orbitalna kora, *PrL* prelimbička kora, *roVLO* rostralni deo ventrolateralne orbitalne kore.

<i>br. životinje</i>	<u><i>roCgI</i></u>		<u><i>PrL</i></u>		<u><i>MO</i></u>		<u><i>roVLO</i></u>		<u><i>IL</i></u>	
	Co	MD	Co	MD	Co	MD	Co	MD	Co	MD
1	56,51	99,89	99,16	98,20	102,56	91,89	105,06	125,97	89,22	137,72
2	100,73	113,02	111,03	107,93	103,68	106,66	100,71	88,88	113,09	126,67
3	94,06	119,21	87,86	113,65	103,18	86,71	100,71	91,37	106,50	114,45
4	74,82	99,69	92,53	115,85	91,99	84,58	124,80	116,29	107,44	97,07
5	140,28	142,13	99,14	109,09	92,30	82,98	92,61	110,86	87,24	88,36
6	133,60	104,13	110,28	99,86	106,29	88,01	76,10	79,96	96,51	97,07
<i>Središnja vrednost</i>	100	113,01	100	107,43	100	90,14	100	102,22	100	110,22
<i>SD</i>	32,60	16,21	9,30	7,14	6,21	8,65	15,92	18,04	10,58	19,33

4.4. Kratkotrajni i dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na ekspresiju BDNF - a u prefrontalnom korteksu

Da bi ispitali kratkoročki i dugoročni uticaj MD na sinaptičku plastičnost, merili smo nivo ekspresije BDNF - a metodom *Western Blot* i to na PND 10, odmah nakon deprivacije što odgovara neonatnom dobu kao i na PND 60, što odgovara mladom adultnom dobu. Pronađena je statistički značajna razlika u ekspresiji BDNF - a u PFC - u između dve ispitivane grupe (GLM: $W_{1,17} = 11,920$, $p < 0.0015$, *Co vs. MD; slika 27; tabela 10). Nije pronadana statistički značajna razlika između ispitivanih uzrasta (PND 10 vs. PND 60). Takođe, nije došlo do statistički značajnog efekta interakcije. Dakle, MD je uzrokovala statistički značajno povećanje ekspresije BDNF - a koje nije povezano sa uzrastom životinja.



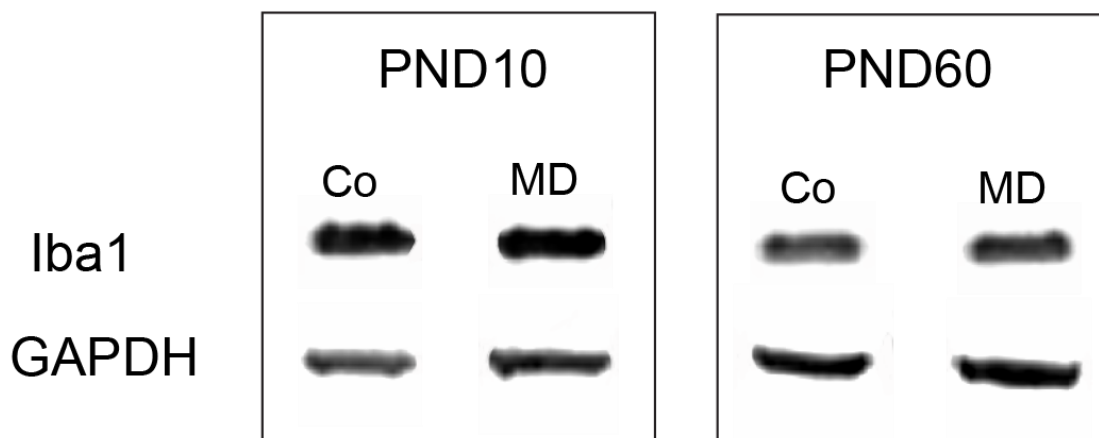
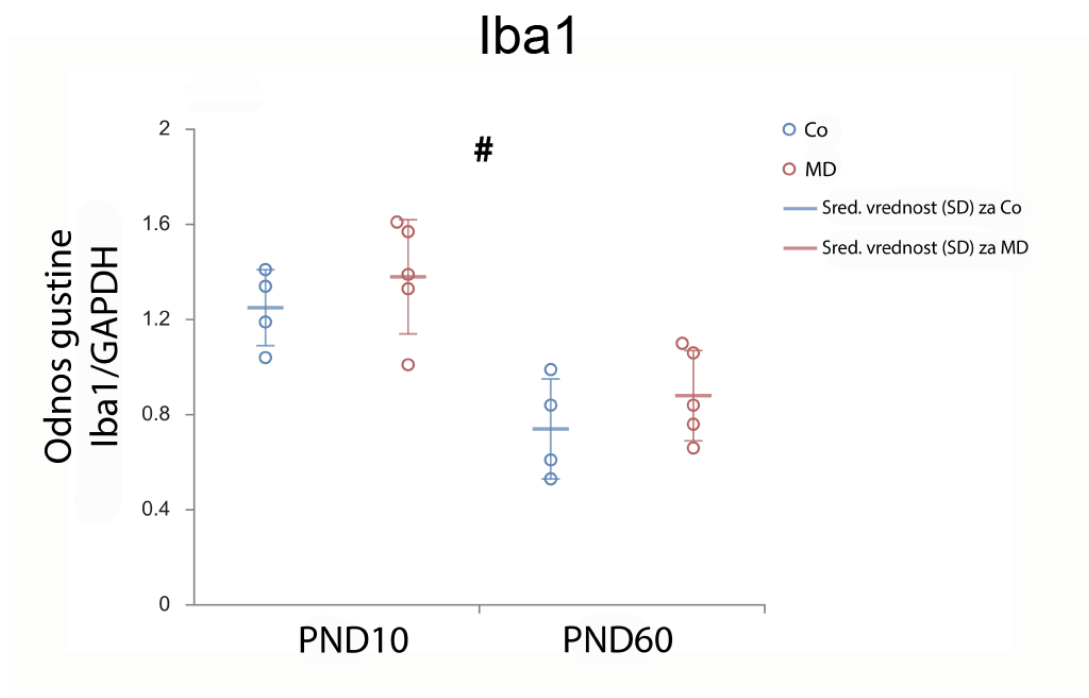
Slika 27. Uticaj MD na ekspresiju BDNF – a u PFC - u neonatalnih (PND 10) i mladih adultnih (PND60) mužjaka pacova. *Dot plot* grafikon predstavlja kvantifikaciju odnosa ekspresije BDNF/GAPDH kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 4$ za Co, $n = 5$ za MD u oba ispitivana uzrasta. Uz grafikon, priloženi su i reprezentativni imunoblotovi. Kod MD životinja, pronađeno je povećanje ekspresije prefrontalnog BDNF – a nezavisno od ispitivanog uzrasta. $*p < 0.0015$ Co vs. MD nezavisno od uzrasta. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

Tabela 10. Relativna ekspresija BDNF – a u odnosu na GAPDH u PFC – u neonatalnih (PND10) i mladih adultnih (PND60) mužjaka pacova. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

<i>br. životinje</i>	<u><i>BDNF/GAPDH – PND 10</i></u>		<u><i>BDNF/GAPDH – PND 60</i></u>	
	Co	MD	Co	MD
<i>1</i>	0,12	0,12	0,06	0,13
<i>2</i>	0,09	0,17	0,05	0,24
<i>3</i>	0,15	0,16	0,14	0,10
<i>4</i>	0,14	0,15	0,09	0,13
<i>5</i>	/	0,12	/	0,16
<i>Središnja vrednost</i>	0,12	0,15	0,08	0,15
<i>SD</i>	0,03	0,02	0,04	0,05

4.5. Kratkotrajni i dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na ekspresiju Iba1 u prefrontalnom korteksu

Ekspresija Iba1 u PFC - u neonatalnih (PND 10) i mladih adultnih (PND 60) pacova merena je u cilju ispitivanja kratkoročnog i dugoročnog uticaja MD na aktivaciju mikroglije. Za razliku od uticaja na ekspresiju BDNF - a, MD nije uzrokovala razliku u ekspresiji Iba1 u PFC - u ni u neonatalnom ni u mladom adultnom dobu. Međutim, pronađena je statistički značajna razlika između ispitivanih uzrasta (GLM: $W_{1,17}=52.345$, $p<0.0015$, #P10 vs. P60; slika 28; tabela 11). Efekat interakcije nije bio statistički značajan, što ukazuje na odsustvo kombinovanog efekta grupe i uzrasta na ekspresiju Iba1 u PFC - u. Dakle, došlo je do statistički značajnog smanjenja ekspresije Iba1 u PFC - u mladih adultnih pacova koje nije povezano sa maternalnom deprivacijom.



Slika 28. Uticaj MD na ekspresiju Iba1 u PFC - u neonatalnih (PND 10) i mladih adultnih (PND 60) mužjaka pacova. *Dot plot* grafikon predstavlja kvantifikaciju odnosa ekspresije Iba1/GAPDH kao središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 4$ za Co, $n = 5$ za MD u oba ispitivana uzrasta. Uz grafikon, priloženi su i reprezentativni imunoblotovi. Nije pronađena razlika u ekspresiji Iba1 u PFC – u između Co i MD grupe ni u jednom od ispitivanih uzrasta. Ekspresija prefrontalnog Iba1 proteina bila je smanjena u mladom adultnom dobu nezavisno od neonatalnog stresa. $\#p < 0.0015$ PND 10 vs. PND 60 nezavisno od neonatalnog stresa. Co kontrolna grupa MD maternalno deprivirana grupa.

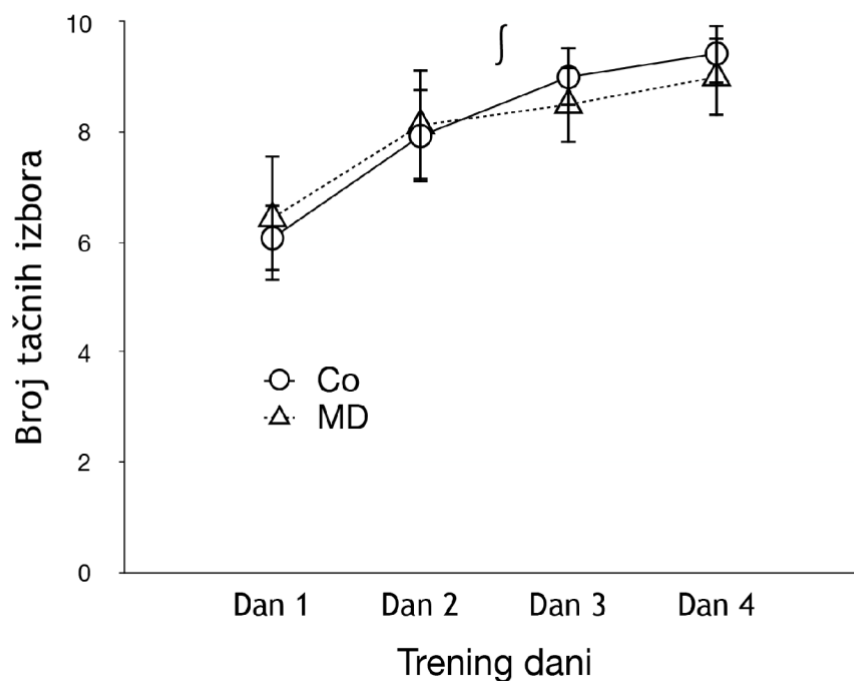
Tabela 11. Relativna ekspresija Iba1 proteina u odnosu na GAPDH u PFC – u neonatalnih (PND10) i mladih adultnih (PND60) mužjaka pacova. *Co* kontrolna grupa, *MD* maternalno deprivirana grupa

<i>br. životinje</i>	<u><i>Iba1/GAPDH – PND10</i></u>		<u><i>Iba1/GAPDH – PND60</i></u>	
	Co	MD	Co	MD
1	1,04	1,33	0,99	0,66
2	1,19	1,39	0,84	1,06
3	1,41	1,61	0,61	0,76
4	1,34	1,57	0,53	0,84
5	/	1,01	/	1,1
<i>Središnja vrednost</i>	1,24	1,38	0,74	0,89
<i>SD</i>	0,17	0,24	0,21	0,19

4.6. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na učenje

Kako bi ispitali da li MD utiče na sposobnost učenja, koristili smo BFTMT. Sve ispitivane životinje uspešno su kompletirale četvorodnevni trening pri čemu su i Co i MD grupa dostigle visok stepen učinka tokom 4 dana treninga BFTMT - a. Takođe, obe ispitivane grupe pokazale su statistički značajno poboljšanje učinka tokom trajanja treninga (GEE: $W_{4,26}=108.572$, $p<0.0015$; slika 29). Ipak, statistički značajna razlika u učenju između Co i MD grupe nije pronađena.

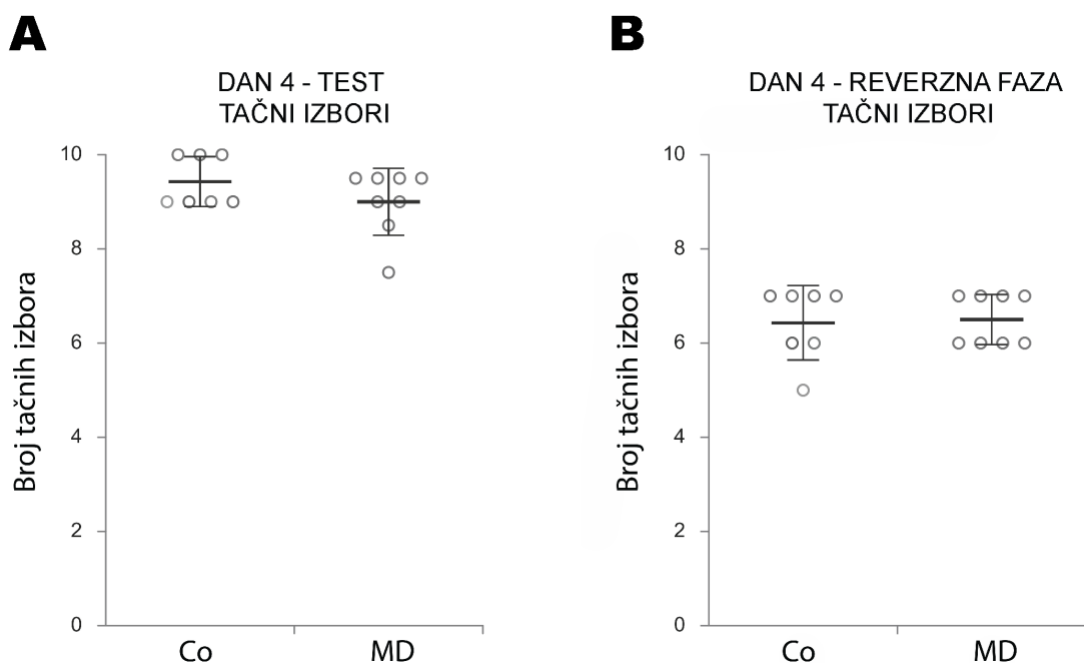
T - MAZE UČENJE



Slika 29. Uticaj MD na učenje. Horizontalne crtice u grafikonu predstavljaju središnju vrednost \pm SD, $n = 7$ za Co, $n = 8$ za MD. Tokom 4 dana treninga obe ispitivane grupe su značajno poboljšale svoj učinak, što je pokazano rastućim brojem tačnih izbora kako je trening odmicao. Sposobnost učenja se nije razlikovala između Co i MD. $[p < 0.0015$ poboljšanje u sposobnosti učenja tokom treninga nezavisno od neonatalnog stresa. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

4.7. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na radnu memoriju i reverzno učenje

Četvrtog dana treninga (dan testa), ispitana je radna memorija MD životinja kvantifikacijom tačnih izbora u prvih 10 pokušaja – test faza. Broj tačnih izbora nije se razlikovao između dve ispitivane grupe (slika 30A; tabela 12). Reverzno učenje, kao mera kognitivne fleksibilnosti kod MD životinja ispitana je tokom reverzne faze BFTMT - a u kojoj je svaka životinja dobila 10 novih pokušaja nakon zamene (reverzije) pravila testa koja je postignuta zamenom nagradne ručice izbora. Nije pronađena razlika u broju tačnih odgovora između kontrolne i MD grupe u ovoj fazi ispitivanja (slika 30B; tabela 12).



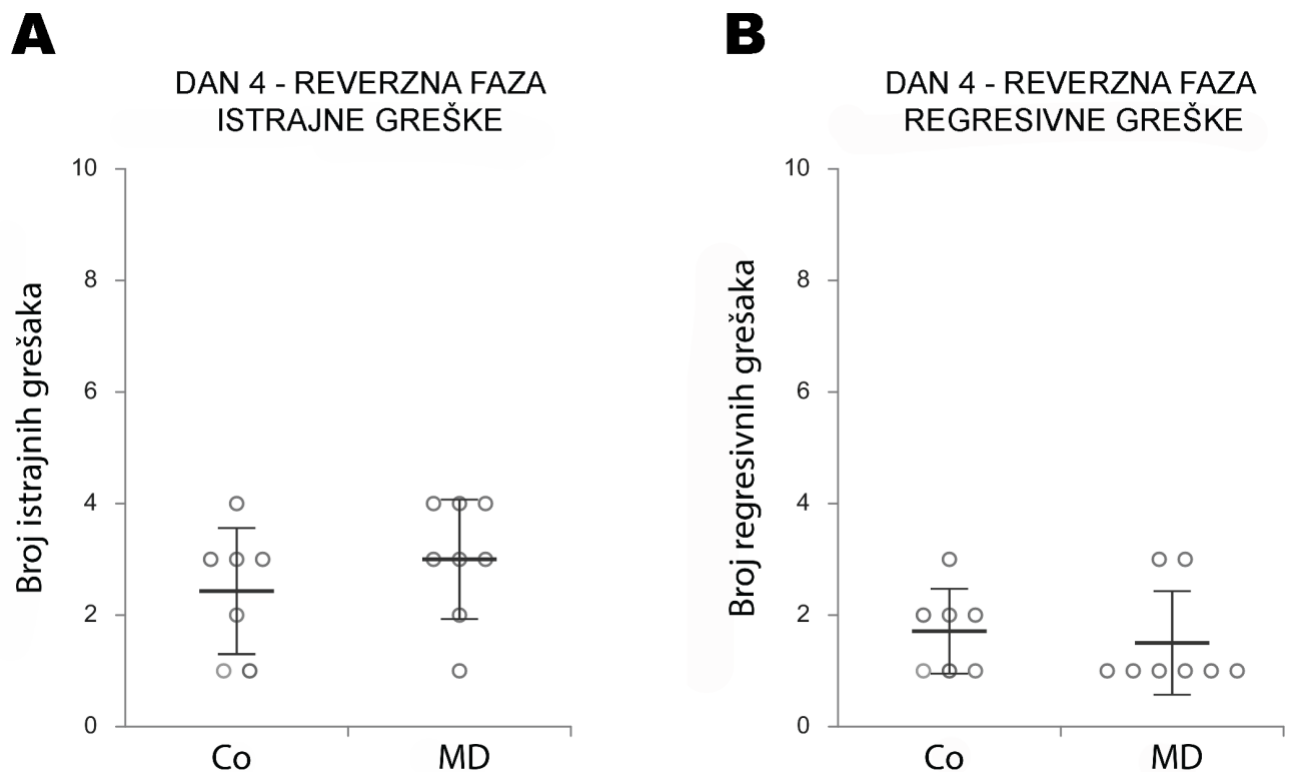
Slika 30. Uticaj MD na radnu memoriju (A) i reverzno učenje (B). Dot plot grafikoni u panelima A i B predstavljaju središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 7$ za Co, $n = 8$ za MD (u cilju izrade grafikona korišćena je središnja vrednost dve životinje poreklom iz istog legla). Među ispitivanim grupama, nije pronađena statistički značajna razlika u broju tačnih izbora tokom test faze (A), kao ni tokom reverzne faze ispitivanja (B). Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

Tabela 12. Broj tačnih izbora četvrtog dana treninga (dan testa) tokom test i reverzne faze ispitivanja. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

leglo	<u>dan 4, test faza – tačni izbori</u>				<u>dan 4, reverzna faza - tačni izbori</u>			
	Co		MD		Co		MD	
1	10	10	9	8	7	6	7	7
2	10	10	6	9	8	6	8	4
3	/	/	10	9	/	/	8	5
4	10	8	10	9	7	7	4	7
5	8	10	9	9	5	6	6	7
6	10	10	10	8	6	4	7	5
7	9	9	10	9	5	7	5	6
8	8	10	9	10	8	5	7	6
Središnja vrednost	9,43		9,00		6,21		6,19	
SD	0,85		1,03		1,19		1,28	

4.8. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na broj istrajnih i regresivnih grešaka tokom reverzne faze BFFT -a

U reverznoj fazi BFTMT – a, kvantifikovan je broj istrajnih (uzastopne greške nakon zamene nagradne ručice izbora) i regresivnih (greške nakon prvog tačnog izbora) grešaka. MD nije uzrokovala statistički značajne promene u broju istrajnih (slika 31A; tabela 13) i regresivnih (slika 31B; tabela 13) grešaka tokom reverzne faze testa.



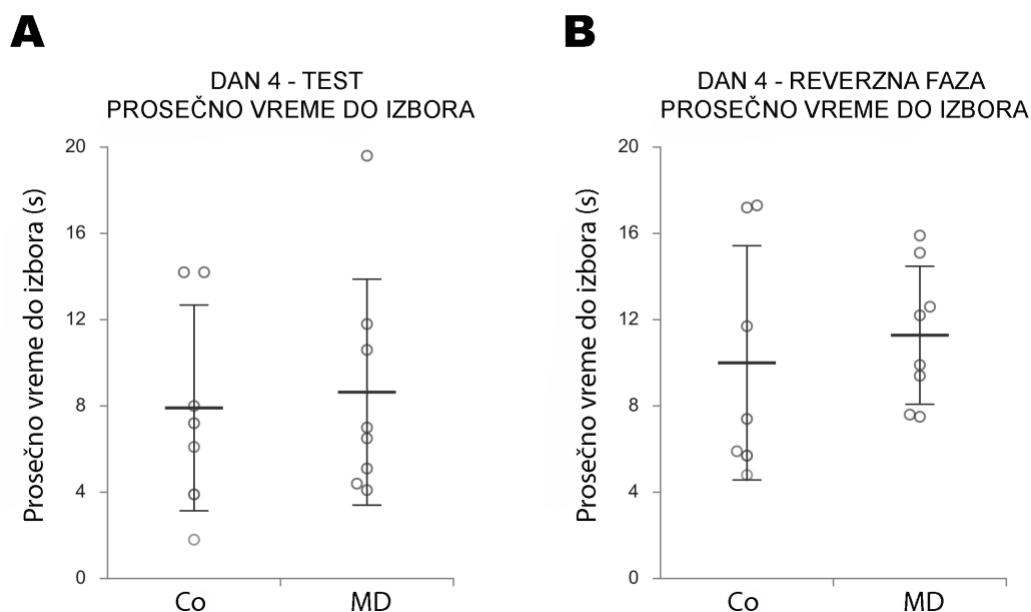
Slika 31. Uticaj MD na broj istrajnih (A) i regresivnih grešaka (B) tokom reverzne faze ispitivanja. Dot plot grafikoni u panelima A i B predstavljaju središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 7$ za Co, $n = 8$ za MD (u cilju izrade grafikona korišćena je središnja vrednost dve životinje poreklom iz istog legla). Među ispitivanim grupama, nije pronađena statistički značajna razlika ni u broju istrajnih (A), ni u broju regresivnih grešaka (B). Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

Tabela 13. Broj istrajnih i regresivnih grešaka tokom reverzne faze ispitivanja. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

leglo	<u>dan 4, reverzna faza - istrajne greške</u>				<u>dan 4, reverzna faza - regresivne greške</u>			
	Co		MD		Co		MD	
1	0	2	1	0	3	2	2	3
2	1	2	2	5	1	2	0	1
3	/	/	0	5	/	/	2	0
4	1	1	2	1	2	2	4	2
5	4	1	3	2	1	3	1	1
6	2	6	3	4	2	0	0	1
7	4	2	5	2	1	1	0	2
8	2	4	3	2	0	1	0	2
Središnja vrednost	2,29		2,50		1,50		1,31	
SD	1,64		1,63		0,94		1,20	

4.9. Dugotrajni uticaj maternalne deprivacije na utrošeno vreme do izbora ručice

Potrebno vreme za donošenje odluke o izboru nagradne ručice mereno je na dan testiranja (4. dan treninga) tokom test i reverzne faze. Nije pronađena statistički značajna razlika u prosečnom vremenu do izbora ručice između Co i MD ni u test, ni u reverznoj fazi (slika 32; tabela 14). Takođe, u test fazi, vreme do izbora tokom 10 pojedinačnih pokušaja nije se razlikovalo između kontrolne i MD grupe. Ipak, tokom reverzne faze uočena je statistički značajna tretman x pokušaj interakcija (GEE, $W_{9,29}=41.595$, $p<0.0015$); *post hoc* analizom utvrđeno je da tokom 3. pokušaja reverzne faze ispitivanja MD životinje utroše statistički značajno više vremena do izbora ručice u odnosu na Co životinje ($p<0.0015$), što ukazuje na kognitivnu nefleksibilnost (slika 33; tabela 15).

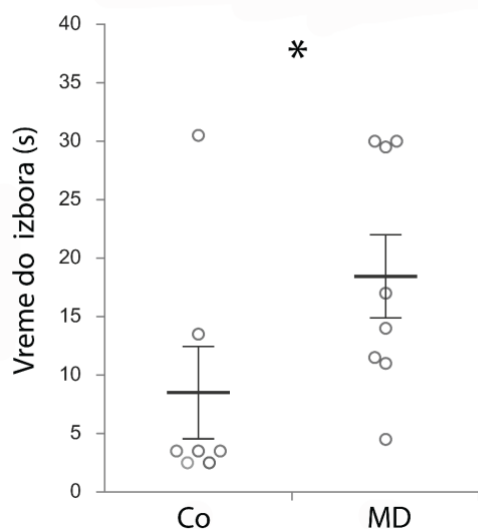


Slika 32. Uticaj MD na prosečno vreme do izbora na dan testa tokom test faze (A) i tokom reverzne faze ispitivanja (B). Dot plot grafikoni u panelima A i B predstavljaju središnje vrednosti \pm SD (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 7$ za Co, $n = 8$ za MD (u cilju izrade grafikona korišćena je središnja vrednost dve životinje poreklom iz istog legla). Među ispitivanim grupama, nije pronađena statistički značajna razlika u prosečnoj dužini vremenskog intervala potrebnog za izbor ručice tokom test faze (A), kao ni tokom reverzne faze ispitivanja (B). Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa.

Tabela 14. Prosečno vreme potrebno za izbor ručice četvrtog dana treninga (dan testa) tokom test i reverzne faze ispitivanja. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa

leglo	<u>dan 4, test faza –</u> <u>prosečno vreme do izbora (s)</u>				<u>dan 4, reverzna faza –</u> <u>prosečno vreme do izbora (s)</u>			
	Co		MD		Co		MD	
1	1,9	1,6	11,8	4,1	6,6	3	11,3	7,6
2	3,9	3,8	32,4	6,7	6,2	5,1	15,9	15,9
3	/	/	8,1	4,8	/	/	7	17,4
4	9,6	6,4	9	4,9	9,8	5,2	13,5	5,3
5	17,7	10,7	8,9	12,2	17,2	6,1	16,4	8,7
6	6,5	7,9	13,3	10,3	13,2	21,4	9,3	10,4
7	15,5	12,8	6	4,1	23,3	9,6	6,7	23,4
8	7,2	4,9	5,1	3,7	4	7,8	10	4,9
Središnja vrednost	7,9		9,1		9,9		11,5	
SD	4,9		7		6,5		5,2	

DAN 4 - REVERZNA FAZA
3. POKUŠAJ - VREME DO IZBORA



Slika 33. Uticaj MD na vreme do izbora ručice tokom 3. pokušaja reverzne faze ispitivanja. *Dot plot* grafikom predstavlja središnje vrednosti \pm SEM (horizontalne crtice) i vrednosti jedinica posmatranja (kružići), $n = 7$ za Co, $n = 8$ za MD (u cilju izrade grafikona korišćena je središnja vrednost dve životinje poreklom iz istog legla). Tokom 3. pokušaja u reverznoj fazi ispitivanja MD životinjama je bilo potrebno statistički značajno više vremena za izbor ručice (proturivanje nosa u činiju) u odnosu na Co grupu, čime je pokazan blagi deficit reverznog učenja. $*p < 0.0015$ Co vs MD. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa

Tabela 15. Vreme potrebno za izbor ručice tokom 3. pokušaja reverzne faze ispitivanja. Co kontrolna grupa, MD maternalno deprivirana grupa

**3. pokušaj, reverzna faza –
vreme do izbora (s)**

<i>leglo</i>	Co		MD	
	1	2	5	19
2	2	3	22	6
3	/	/	7	16
4	3	2	7	2
5	15	12	21	38
6	4	3	16	44
7	21	40	4	56
8	3	7	23	11
<i>Središnja vrednost</i>	8,7		18,9	
<i>SD</i>	10,7		15,3	

5. DISKUSIJA

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da RTI uzrokuje kompleksne promene prefrontalnog GABAergičkog sistema. Maternalna deprivacija dovela je do smanjenja gustine GAD67+, PV+ i CCK+ ćelija u različitim subregionima PFC - a. Takođe, neonatalni stres je uzrokovao ushodnu regulaciju BDNF-a kako u neonatalnom tako i u mladom adultnom dobu, bez propratnih promena u ekspresiji pokazatelja mikroglijalne aktivacije. Navedene strukturne i biohemijske promene u PFC - u bile su praćene blagim funkcionalnim deficitom kada je kod MD životinja ispitana kognitivna fleksibilnost.

Kvantitativna morfološka analiza GAD67+ ćelija pokazala je smanjenje gustine ukupnih interneurona u MO i roVLO, što ukazuje na zahvaćenost ventralnih delova PFC - a kod MD životinja. U studiji u kojoj je korišćen 24 - časovni MD model, neonatalni stres nije uzrokovao promene u ekspresiji prefrontalnog GAD67 enzima, iako je smanjenje ekspresije pronađeno u temporalnoj kori (Janetsian-Fritz et al., 2018). Uzrok ovakvog neslaganja najverovatnije se krije u značajnoj metodološkoj razlici. Naime, u našoj studiji, smanjenje GAD67+ ćelijske gustine bilo je ograničeno samo na roVLO (cela debljina) i površinske slojeve MO, dok je u gore navedenoj studiji ekspresija GAD67 proteina bila ispitivana u celokupnim homogenatima PFC - a bez prethodne parcelacije na pojedinačne subregione. Iz navedenih rezultata proizilazi da jednokratna 24 - časovna MD dovodi do subregion zavisnih promena GAD67+ ćelija, bez narušavanja ekspresije na nivou celokupnog PFC - a. Takođe, razlike u rezultatima između naše i pomenute studije ističu značaj sprovođenja detaljnih anatomskih ispitivanja pre donošenja čvrstih zaključaka o ćelijskim efektima RTI - a. Ovakvo stanovište dodatno učvršćuje činjenica da je PFC nehomogena regija, kako strukturno tako i funkcionalno. Za razliku od GABAergičkih promena u našem eksperimentu, u animalnom modelu zanemarivanja, u kome je sprovedena detaljna anatomska evaluacija ćelijske gustine PFC - a pokazana je pogođenost glutamatergičkih ćelija u ventralnom delu mPFC - a (Stamatakis et al., 2016). Zanimljivo, smanjenje ekspresije GAD67 u OFC - u pronađeno je i kod mladih odraslih ženki miševa koje su bule izložene fragmentovanoj nezi majke u neonatlnom dobu tokom 7 dana (Goodwill et al., 2018).

Smanjenje gustine PV+ ćelija u PrL maternalno depriviranih mužjaka potvrđuje prethodno objavljene rezultate iz naše laboratorije (Aksic et al., 2021). Ovaj rezultat je u skladu i sa studijama u kojima su mladunci bili odvajani od majke 3 časa dnevno od PND 1 - 21 (Leussis et al., 2012; Ganguly et al., 2016; Grassi-Oliveira et al., 2016). Interesantno, u ispitivanju u kojem su korišćeni pacovi soja *Octogon degus*, neonatalni stres doveo je do povećanja gustine PV+ interneurona u dorzalnom delu mPFC - a (Helmeke et al., 2008). Ovakav rezultat se značajno razlikuje od nalaza u našem istraživanju gde je gustina PV+ ćelija u roCg1 MD životinja smanjena. Pored razlika u načinu izvođenja separacije majke od mladunaca (24 – časovna vs. 3 – časovna separacija od PND 1 – PND 14), radi objašnjenja pomenutih nesaglasnosti u rezultatima ovde je bitno naglasiti da je u studiji Helmeke - a i saradnika

korišćen relativno specifičan soj pacova - *Octogon degus*. Ovaj soj pacova, za razliku od Wistar soja koji je korišćen u našem eksperimentu, poseduje nekoliko važnih karakteristika kao što su vezanost za oba roditelja unutar legla, relativna zrelost senzornog sistema na rođenju, kao i produžen neonatalni i juvenilni period u odnosu na druge sojeve (Colonnello et al., 2011). Promena u gustini PV+ ćelija u našoj studiji zahvatila je roCg1 i PrL, koji predstavljaju subregione dorzalne komponente mPFC – a. Kao i kod GAD67+ ćelija, MD je uzrokovala lokalizovane morfološke promene u PFC – u i zajedno sa drugim ispitivanjima iz oblasti ovi rezultati govore u prilog tvrdnji da PV+ ćelije mPFC – a zauzimaju centralnu ulogu u procesuiranju RTI - a (McKlveen et al., 2019). Međutim, PV+ neuroni nisu pogođeni samo nakon izlaganja stresu u neonatalnom periodu, već i pri izlaganju hroničnom umerenom stresu. Ova eksperimentalna paradigma predstavlja jedan od najčešće primenjivanih animalnih modela depresije. U detaljnoj anatomskej evaluaciji GABAergičkih ćelija mPFC – a, Czeh i sar. su pronašli smanjen broj PV+ ćelija u IL anhedoničnih životinja izloženim hroničnom umerenom stresu (Czéh et al., 2018). U prilog ovim rezultatima govori i pretpostavka da se anhedonija, kao jedan od glavnih simptoma depresije temelji upravo na nedovoljnom nivou parvalbumina u PFC – u i amigdali (Lukkes et al., 2018). Još jedna studija u kojoj je korišćen animalni model depresije, ovog puta zasnovan na izlaganju socijalnom stresu ukazuje na pogođenost PV+ ćelija i to u ventralnom palidumu. Zanimljivo, kod miševa depresivnog fenotipa koji su bili izloženi socijalnom stresu u adolescentnom periodu pronađena je hiperaktivnost PV+ ćelija ventralnog paliduma (Knowland et al., 2017). I animalni modeli shizofrenije bavili su se promenama PV+ interneurona prefrontalne kore. U razvojnom modelu shizofrenije, pokazano je da prenatalna primena metilazoksimetanol acetata (MAM) dovodi do smanjenja broja PV+ neurona u adultnom mPFC – u potomaka (Lodge et al., 2009). Postnatalna primena antagonista NMDA receptora, fenciklidina i MK801 takođe rezultuje u smanjenju broja PV+ ćelija u mPFC – u adultnih pacova (Radonjić et al., 2013; Murueta-Goyena et al., 2018).

Na osnovu dosadašnjih podataka iz literature, uticaj RTI na CCK+ ćelije do danas nije ispitivan za razliku od PV+ ćelija koje su analizirane na više različitih RTI modela. Samim tim, rezultati sprovedenog istraživanja predstavljaju prve podatke o uticaju RTI - a na CCK+ ćelije u nekom moždanom regionu. Jedan od mogućih razloga za ovaj relativno iznenađujući podatak najverovatnije leži u činjenici da je imunohistohemijska detekcija ovih ćelija najblaže rečeno veoma zahtevna (Calvigioni et al., 2017). Međutim, značaj lokalizacije CCK+ ćelija je veliki imajući u vidu da i piramidalne ćelije sintetišu mRNK holecistokinina tako da je selektivna lokalizacija CCK+ interneurona moguća samo primenom imunohistohemije (Morino et al., 1994; Morozov and Freund, 2003). Nemogućnost validne kvantifikacije CCK+ ćelija u dubokim slojevima kore potvrđuje pomenute metodološke poteškoće, ali i ističe značaj dobijenih rezultata u oblasti ispitivanja ranog životnog stresa. Za razliku od druge grupe

basket ćelija, pozitivnih na PV, koje su bile pogođene u dorzalnem delu mPFC-a, zahvaćenost CCK+ ćelija od strane MD, bila je izražena u MO, regionu koji pripada ventralnom delu mPFC - a (Heidbreder and Groenewegen, 2003). Ovi rezultati još jednom ukazuju na subregion zavisnu prirodu osetljivosti različitih GABAergičkih populacija na neonatalni stres, makar kada je u pitanju PFC. Uticaj stresa na CCK+ neurone do sada je detaljno ispitivano na animalnom modelu hroničnog stresa i to u prefrontalnoj kori i hipokampusu. Rezultati ovih istraživanja ukazuju na promene koje su specifično vezane za subregione PFC - a. U subregionima mPFC - a (roCg1, PrL i IL), hronični stres je doveo do smanjenja, a u ventralnoj orbitalnoj kori do povećanja gustine CCK+ ćelija (Varga et al., 2017; Czéh et al., 2018). Moguće je da razlike u ćelijskim ishodima između poređenih studija nastaju usled drugačijeg obrasca u procesuiranju stresa u PFC - u kod jednog i drugog animalnog modela (hronični vs. akutni neonatalni). Pored vremenskog intervala izloženosti stresu, važno je istaći i značajne razlike u razvojnom periodu u kome se životinje nalaze u trenutku delovanja stresa (neonatalni vs. adolescentni).

Kao i prefrontalna kora, kortikalni interneuroni, uključujući i *basket* GABAergičke ćelije nastavljaju sazrevanje nakon rođenja (Morozov and Freund, 2003; Nowicka et al., 2009; Boksa et al., 2016; Larsen et al., 2019). Poznato je da glukokortikoidi u velikim koncentracijama uzrokuju neurodegenerativne efekte. Primena deksametazona, sintetičkog glukokortikoida tokom neonatalnog perioda mogu dovesti do apoptoze neurona koji se nalaze u takozvanim osetljivim fazama razvoja (Sandau and Handa, 2007; Bhatt et al., 2013). Takođe, glukokortikoidi usporavaju radijalnu migraciju i diferencijaciju nervnih ćelija u kori koja sazreva, tako da ćelije kasnije stiču zreli fenotip (Fukumoto et al., 2009; Baier et al., 2014). U neonatalnom periodu, zaštitu od neurodegenerativnog efekta glukokortikoida predstavlja smanjena reaktivnost hipotalamo – hipofizno – adrenalne (HPA) osovine tokom SHRP - a, koja štiti nervno tkivo u procesu kompleksnog i osetljivog toka razvoja (Levine, 2001). Međutim, odsustvo majke u leglu tokom 24 časa uzrokuje kod mladunaca nagli skok cirkulišućeg kortikosterona u prvih 36 časova od početka separacije (Viveros et al., 2010). Dodatno, kortikosteron ostaje povišen najmanje do PND 13 (Llorente et al., 2008) čime se mozak, uključujući i PFC hronično izlaže citotoksičnom dejstvu glukokortikoida u neonatalnom dobu. Efekti kortikosterona ispoljavaju se vezivanjem za glukokortikoidne receptore (GR), za koje je poznato da su gusto rasprostranjeni u PFC - u (Ahima and Harlan, 1990; Cintra et al., 1994). Stabilna ekspresija kortikalnog GR je od velikog značaja za razvoj mozga. Naime, kako smanjena tako i prekomerna ekspresija GR dovodi do ozbiljnog poremećaja radijalne migracije i maturacije kortikalnih neurona praćene dendritskim malformacijama (Yu et al., 2019). Kada su u pitanju efekti RTI - a, u frontalnom korteksu MD životinja dolazi do nishodne regulacije GR već nakon 24 časa separacije od majke (Avishai-Eliner et al., 1999). Zanimljivo je da PV+ neuroni ekspresiraju GR više nego bilo koja druga podklasa GABAergičkih ćelija, što ih čini posebno

osetljivim na promene u ekspresiji GR i koncentraciji cirkulišućeg kortikosterona tokom SHRP - a (McKlveen et al., 2016). Na osnovu navedenih činjenica, pretpostavlja se da smanjenje gustine PV+ neurona u dorzalnoj komponenti mPFC - a nastaje kao posledica slabljenja inhibitorne kontrole mozga nad nezrelom HPA osovinom.

U neonatalnom periodu, N – metil – D – aspartat (NMDA) receptori su od presudnog značaja za razvoj PV+ ćelija i GABAergičke transmisije. Selektivna ablacija/disfunkcija NMDA receptora u kori i hipokampusu tokom ranog postnatalnog perioda života dovodi do poremećaja u sazrevanju PV+ neurona, oštećenja sinaptičke transmisije i radne memorije (Belforte et al., 2009; Korotkova et al., 2010). Ovaj mehanizam predstavlja jedan od ključnih argumenata u razvojnoj teoriji shizofrenije, a ujedno i objašnjava smanjenje broja PV+ interneurona kore i hipokampusa koje je pokazano u fenciklidinskom modelu shizofrenije (Radonjić et al., 2013). NMDA receptor je hetero – tetramer i sastoji se iz dve NR1 subjedinice i uglavnom dve NR2 subjedinice, koje se javljaju u dve forme – NR2A i NR2B (Paoletti, 2011). U neonatalnom dobu, pod uticajem senzornih iskustava dolazi do razvojne konverzije takozvane nezrele NR2B forme u zreliju NR2A formu, što za posledicu ima nastanak kinetički bržih NR2A dominantnih NMDA receptora (Matta et al., 2011). Važno je istaći da faza u kojoj se događa pomenuta fiziološka konverzija odgovara osetljivom stadijumu razvoja PV+ ćelija koje u ovom periodu stiču svoj zreli fenotip brzo – inhibitornih GABAergičkih ćelija (Doischer et al., 2008). Kod izlaganja životinja 24 – časovnoj maternalnoj deprivaciji, u hipokampusu dolazi do narušavanja fiziološke konverzije NR2B u NR2A koja se ispoljava kao poremećaj NR2A/NR2B odnosa (Viviani et al., 2014). U animalnom modelu zanemarivanja, smanjen odnos NR2A/NR2B u PFC – u detektovan je već u unutar prvih nekoliko sati od završetka delovanja neonatalnog stresa (Manatos et al., 2016). Tako možemo pretpostaviti da MD remeti konverziju NR2B u NR2A u kritičnom periodu razvoja što dovodi do aberantne maturacije NMDA receptora i posledičnih morfoloških promena PV+ interneurona prefrontalne kore.

Iako CCK+ neuroni ne ekspimiraju GR, ne možemo isključiti ulogu HPA osovine u smanjenju ćelijske gustine u ventralnoj komponenti mPFC - a, naročito ukoliko znamo da ove ćelije ekspimiraju kortikotropin oslobađajući hormon – vezujući protein (CRH – BP) (Ketchesin et al., 2017). Kortikotropin oslobađajući hormon (CRH) se sintetise i lokalno oslobađa u moždanim strukturama koje su van paraventrikularnog jedra uključujući korteks, amigdale, hipokampus i bazalni telencefalon što zajedno čini takozvani ekstrahipotalamički CRH sistem. Populacija ćelija koja u PFC – u sintetise CRH, pripada grupi GABAergičkih neurona, a pronalazimo ih u celokupnoj debljini kore to jest u svim slojevima. Smatra se da prefrontalni CRH ima ulogu u patogenezi stresom izazvanog kognitivnog oštećenja (Hupalo et al., 2019). Vazquez i saradnici ispitivali su kratkoročni efekat neonatalnog stresa na CRH sistem. Pokazano je da MD smanjuje ekspresiju mRNK – CRH u paraventrikularnom jedru nakon 24 časa

separacije, što je i očekivano s obzirom na negativnu povratnu spregu izazvanu povećanjem koncentracije cirkulišućih ACTH i kortikosterona. Međutim, u prefrontalnoj kori MD životinja zabeležen je suprotan rezultat u vidu povećanja ekspresije mRNA – CRH (Vázquez et al., 2003). Iako MD ne uzrokuje promenu ekspresije prefrontalnog CRH – BP (Vazquez et al., 2006), povećanje ekspresije CRH kod neonatalnih MD pacova može biti dovoljan jak argument za ispitivanje potencijalne uloge ovog faktora u nastanku CCK+ ćelijskog deficita, s obzirom da CRH negativno utiče na razvoj dendritske mreže kortikalnih neurona (Curran et al., 2017). Interesantan podatak je dobijen iz studije Seidel – a i saradnika u kojoj je paternalna deprivacija bila povezana sa povećanjem broja CRH+ neurona u OFC – u *Octodon degus* juvenilnih mužjaka (Seidel et al., 2011). Ipak, ove rezultate treba prihvatiti sa rezervom, zbog već pomenutih metodoloških razlika u odabiru soja životinja i vremenskog okvira separacije koja je pride u navedenoj studiji podrazumevala odvajanje mladunaca od oca.

Ako pogledamo prirodu dobijenih promena gustina GABAergičkih ćelija u ovom istraživanju, videćemo da ih kod MD životinja u svim ispitivanim neuronskim populacijama karakteriše smanjenje. Samim tim, nameće se logično pitanje, da li smanjenje gustine GABAergičkih ćelija nastaje zbog nekog oblika ćelijske smrti ili dolazi do smanjenja/gubitka ekspresije antigena što bi ukazalo na smanjenje/gubitak funkcije? U moždanoj kori, od ranog neonatalnog do adultnog doba, apoptozom dolazi do redukcije broja ćelija za koji se smatra da iznosi oko 30%. Ovaj proces dostiže pik između PND 5 i 10, nakon čega se nastavlja, ali slabijim intenzitetom do periadolescentnog perioda (Nikolić et al., 2013). Pored toga, postoje naznake da između perioda adolescencije i adultnog doba nastaje drugi talas apoptoze koji je region specifičan (Markham et al., 2007). Prvu obimnu analizu ćelijske smrti kod MD životinja sproveli su Zhang i saradnici u studiji u kojoj je izvršena kvantifikacija apoptoza – pozitivnih ćelija u kortikalnim i subkortikalnim regionima mladunaca posle 24 časa odvojenosti od majke. Povećana ćelijska smrt kod MD životinja pronađena je u većem broju regiona uključujući parijetalni korteks, hipokampus i cerebelarni korteks, ali ne i PFC (Zhang et al., 2002). Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima ispitivanja iz naše laboratorije u kojoj broj ćelija u procesu apoptoze i neurodegeneracije u prefrontalnoj kori MD životinja na PND 15 nije bio povećan (Aksic et al., 2021). Interesantno, RTI utiče na pomenuti adolescentni talas apoptoze tako što ga usporava u mPFC – u (Majcher-Mašlanka et al., 2019), a ubrzava u *gyrus dentatus* – u hipokampusa (Baek et al., 2012). Iako nije potpuno isključeno, na osnovu dosadašnjih doduše limitiranih rezultata, ne postoje dokazi da apoptoza predstavlja mehanizam nastanka morfoloških promena pronađenih u našem istraživanju. S tim u vezi, možemo pretpostaviti da navedene promene nastaju usled smanjene ekspresije GAD67, PV i CCK u specifičnim subregionima PFC – a. Ipak, čvrste zaključke o tome da li smanjenje ćelijske gustine kod MD životinja uzrokuje apoptoza ili smanjena antigenska ekspresija u ispitivanim neuronima mogle bi da

daju morfološke ko – lokalizacione studije bazirane na principu dvostrukog imunohistohemijskog bojenja markera GABAergicčkih ćelija i ćelijske smrti nakon maternalne deprivacije. Dodatno, zbog razlika u intenzitetu postnatalnih apoptopskih promena između razvojnih faza, ali i polova (Willing and Juraska, 2015), potrebno je ovakvo ispitivanje sprovesti kod oba pola i to u različitim vremenskim prozorima moždanog razvoja - neonatalom, juvenilnom, ranom i kasnom adolescentnom, kao i adultnom dobu.

Iako uvek treba imati visoku dozu obazrivosti kada je u pitanju komparativna anatomija PFC - a, potrebno je, uz dozu obazrivosti uporediti rezultate sprovedenog istraživanja sa nalazima *post mortem* studija u kojima su korišćeni subjekti oboleli od depresije i shizofrenije. Na osnovu sličnosti u citoarhitektonskoj građi i povezanosti smatra se da mPFC pacova u najvećoj meri odgovara dorzolateralnoj prefrontalnoj kori (area 9 i 46 po Brodmanu) i prednjem cingularnom korteksu (area 24, 25 i 32) kod ljudi (Uylings et al., 2003; Seamans et al., 2008). Do danas, najveći broj *post mortem* istraživanja se bavio ispitivanjem ekspresije PV, najverovatnije zbog dokazane povezanosti sa shizofrenijom, ali i dostupnosti solidnog broja antitela koja sa visokom pouzdanošću detektuju ovaj protein. U dve studije u kojima su ispitivani pacijenti oboleli od shizofrenije pronađeno je smanjenje broja PV+ ćelija u dlPFC – u, što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja (Reynolds et al., 2002; Sakai et al., 2008). Tako možemo pretpostaviti da RTI može dovesti do poremećaja E/I balansa u PFC - u sličan onome za koji se smatra da postoji u shizofreniji pri čemu centralnu patofiziološku ulogu najverovatnije igra disfunkcija PV+ neurona (Gonzalez-Burgos et al., 2015). Iako zvuči primamljivo, ovo je i dalje samo pretpostavka, a važno je istaći i istraživanje Enwright i sar. u kome je broj PV+ ćelija dlPFC – a ispitanika obolelih od shizofrenije ostao nepromenjen, iako je intenzitet imunoreaktivnosti bio smanjen (Enwright et al., 2016). Ipak, neslaganja u rezultatima među *post mortem* istraživanja nisu retkost, a obrazloženje uglavnom leži u prisutnim komorbiditetima, razlika u godinama, životnih navika ispitanika i veličine uzorka koji mogu uticati na krajnje ishode. Potrebno je sprovesti dodatne *post mortem* studije sa većim uzorkom koje bi uzele u obzir iskustvo traume proživljene tokom detinjstva kako bi se doneli čvrsti zaključci o ulozi disfunkcije PV+ ćelija i RTI - a u patogenezi shizofrenije. Zanimljivo je da iako rezultati dobijeni iz animalnih modela depresije ukazuju na povezanost smanjenja prefrontalnog PV i anhedonije, ova povezanost nije potvrđena u dlPFC – u i OFC - u pacijenata obolelih od depresije i bipolarnog poremećaja (Rajkowska et al., 2007; Alcaide et al., 2019).

Kada su u pitanju rezultati ispitivanja GAD67 u *post mortem* studijama većina ne ukazuje na postojanje promena ni u ekspresiji GAD67 ni u broju GAD67+ ćelija u PFC – u pacijenata obolelih od depresije (Pehrson and Sanchez, 2015). Međutim, važno je pomenuti da su dve *post mortem* studije do danas uspele da pokažu smanjenje ekspresije GAD67 u PFC - u (Gos et al., 2009; Karolewicz et al.,

2010). S druge strane, *post mortem* istraživanja ukazuju da u shizofreniji postoji poremećaj u regulaciji/ekspresiji GAD. Naime, u BA9 obolelih od shizofrenije postoji značajno smanjenje ekspresije GAD67 mRNA (Guidotti et al., 2000; Volk et al., 2000). GABAergičke promene pronađene su i u drugim limbičkim strukturama kao što su CA1 sektor hipokampusa i gornja temporalna vijuga, u kojima je kod pacijenata obolelih od shizofrenije pronađeno smanjenje gustine GAD65/67+ neuropila (Förster et al., 2021).

Iako se kortikalni CCK uglavnom vezuje za regulaciju raspoloženja, u literaturi nema mnogo podataka kada su u pitanju *post mortem* studije. Perry i saradnici (1981) ističu odsustvo promena u ekspresiji entorinalnog CCK kod pacijenata obolelih od depresije (Perry et al., 1981). S druge strane, interesantno je da rezultati *post mortem* istraživanja na uzorku shizofrenije ukazuju uglavnom na smanjenje ekspresije CCK u više limbičkih regiona uključujući i frontalnu koru (Ferrier et al., 1983; Virgo et al., 1995). Iako je u pitanju cirkulišući, a ne moždani CCK, zanimljivo zvuči podatak da je kod osoba koje su preživeli pokušaj samoubistva povišen pa autori ovog istraživanja smatraju da bi CCK mogao da predstavlja verodostojni biomarker za pokušaje suicida (Jahangard et al., 2018).

U ovoj studiji, mimo naših prethodnih očekivanja, MD je uzrokovala ushodnu regulaciju prefrontalnog BDNF – a. Ovaj efekat neonatalnog stresa zapažen je kako u neonatalnom tako i u adultnom dobu. Dobijeni rezultati su u najvećoj meri u suprotnosti sa rezultatima istraživačkih grupa koje su ispitivale ekspresiju BDNF - a na 24 – časovnom MD modelu. Rezultati ovih istraživanja pokazali su smanjenju ekspresiju BDNF - a kod adolescentnih (Marco et al., 2013) i nepromenjenju ekspresiju kod adultnih MD mužjaka pacova (Roceri et al., 2002; Mela et al., 2015). Slično je i sa rezultatima dobijenim na modelu 3 – časovne dnevne separacije mladunaca od majke tokom neonatalnog perioda gde je MD dovela do smanjenja ekspresije prefrontalnog BDNF – a u adolescentnom (PND 35) (Majcher-Mašlanka et al., 2018) i mladom adultnom dobu (PND 60) (Xue et al., 2013), dok u zreлом adultnom dobu (PND 90) nisu zapažene promene u ekspresiji ispitivanog proteina (Réus et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Ipak, i pored neslaganja sa navedenim rezultatima iz oblasti pojedina istraživanja pokazuju određeni nivo saglasnosti sa našim rezultatima. Tako je u studiji Roceri i saradnika, povišena ekspresija mRNA BDNF - a u prefrontalnoj kori MD životinja pronađena u kasnom neonatalnom dobu, mada treba istaći da je ovaj parametar bio snižen u adultnom dobu kod iste ispitivane grupe (Roceri et al., 2004). Ushodna regulacija BDNF – a uslovljena maternalnom deprivacijom zapažena je i u hipokampusu juvenilnih i mladih adultnih mužjaka, koja je, zanimljivo, bila praćena nishodnom regulacijom i oštećenjem kognitivne fleksibilnosti u poznom adultnom dobu (Suri et al., 2013).

Na prvi pogled, dobijeni rezultati vezani za ekspresiju BDNF – a teško se uklapaju u postojeću literaturu o ispitivanju posledica RTI - a na sinaptičku plastičnost. Iako bi se moglo protumačiti da jedan

ovakav neočekivani nalaz samo dodatno unosi konfuziju u već slabo razjašnjenu problematiku, objašnjenju možemo prići posmatranjem šire slike naročito u kontekstu povezanosti sa GABAergičkim promenama u ovoj studiji. Pored glutamatergičkih ćelija, za koje se dugo smatralo da predstavljaju jedini izvor sinteze BDNF - a u neuronima, sa sigurnošću je utvrđeno da i interneuroni eksprimiraju mRNK BDNF - a, kako u korteksu tako i u hipokampusu (Barreda Tomás et al., 2020). Takođe, obe subpopulacije *basket* neurona eksprimiraju TrkB kinazu, pri čemu je pokazano da BDNF smanjuje ukupnu ekscitabilnost GABAergičkih ćelija i ovaj mehanizam svakako uključuje PV+ ćelije (Holm et al., 2009; Geibel et al., 2014). Možda i od presudnog značaja je činjenica da tokom postnatalnog razvoja BDNF igra ključnu ulogu u razvoju GABAergičkih ćelija u korteksu i hipokampusu. Do perioda adolescencije, a vrlo verovatno i kasnije uspostavljanje adekvatne interneuronske gustine kao i ekspresije neuropeptida prisutnih u GABAergičkim ćelijama u kori i hipokampusu, nedvosmisleno zavisi od očuvane ekspresije BDNF - a, na šta ukazuju podaci iz studija sprovedenim na *knockout* i heterozigotnim modelima (Grosse et al., 2005; Du et al., 2018). Na isti način, kod transgenih miševa koje karakteriše prevremeni postnatalni skok BDNF - a dolazi do ranijeg sazrevanja GABAergičke transmisije (Huang et al., 1999). U našoj studiji, smanjenje interneuronske gustine koegzistira sa ushodnom regulacijom BDNF - a i u neonatalnom i u mladom adultnom dobu. Koje je potencijalno objašnjenje ovakvog nalaza? Promena u ekspresiji prefrontalnog BDNF - a u vidu povećanja svakako ne može biti pripisana postnatalnom povećanju kortikosterona s obzirom na obrnutu korelaciju između ova dva navedena jedinjenja kako kod životinja tako i kod ljudi (Issa et al., 2010). Međutim, s obzirom na iznesene činjenice o važnosti postnatalnog nivoa BDNF - a u razvoju GABAergičkog sistema, naša pretpostavka je da povećana sinaptička plastičnost, izmerena povećanom ekspresijom BDNF - a predstavlja kompenzatorni odgovor na smanjenje gustine GABAergičkih ćelija u PFC - u. Ovakav zaključak se temelji na pretpostavci da oštećenje postnatalnog razvoja interneurona nastaje već tokom perioda odvojenosti mladunaca od majke što dovodi do kompenzacijskog odgovora BDNF - a koji perzistira sve do mladog adultnog doba. Slične zaključke izneli su Rankov Petrović i sar. u studiji u kojoj ispitivali ekspresiju BDNF - a zajedno sa gustinom PV+ i *neuropeptide Y* imunopozitivnih (NPY+) neurona u hipokampusu prenatalno hiperandrogenizovanih ženki pacova. Ukratko, smanjena gustina PV+ i NPY+ ćelija u hipokampusu pronađena je istovremeno sa povećanim nivoom BDNF - a u hipokampusu, ali i PFC - u (Rankov Petrovic et al., 2019). U prilog pretpostavci o kompenzacijskom porastu sinaptičke plastičnosti govori i podatak da BDNF stimuliše sintezu glutamat dekarboksilaze i povećava volumen GABAergičkih neurona u kulturi ćelija hipokampusa (Yamada et al., 2002).

Iako u istraživanjima iz oblasti ranog traumatskog iskustva kortikalno zapaljenje često figurira kao predloženi mehanizam oštećena i nastanka promena (López-Gallardo et al., 2012; Wang et al., 2020)

dobijeni rezultati nisu pokazali da MD uzrokuje opštu aktivaciju mikroglije u PFC – u kako u neonatalnom tako ni u mladom adultnom dobu. Zanimljivo, značajna razlika u ekspresiji Iba1 pronađena je između različitih razvojnih stadijuma (neonatalni vs. mladi adultni) nezavisno od izloženosti maternalnoj separaciji. Smanjena ekspresija Iba-1 u PFC – u mladih adultnih pacova je najverovatnije razvojnog porekla. Naime, preko 90% ukupne mikroglije se stvori tokom prve dve postnatalne nedelje, a nakon ovog perioda mozak nastavlja proces ekspanzije i povećanja zapremine što dovodi do smanjenja gustine Iba-1 proteina po jedinici zapremine tkiva (Harry, 2013).

Povećanje u broju mikroglijalnih ćelija prethodno je pronađeno u PFC – u životinja, koje su bile izložene 3 – časovnoj dnevnoj separaciji od majke tokom SHRP – a (Wang et al., 2020). Nedavno, Yilu Ye i saradnici pokazali su postojanje morfoloških promena u prefrontalnoj kori MD životinja koje su karakteristične za mikroglijalnu aktivaciju kao što su porast zapremine ćelijskih tela, smanjena ramifikacija nastavaka i povećan udeo ćelija sa ameboidnom morfologijom (Ye et al., 2019). U još jednoj studiji, aktivacija mikroglije nastala je tek nakon što su životinje nakon izlaganja umerenoj formi RTI - a bile dodatno podrvgnute hroničnom stresu u adultnom dobu (Ferle et al., 2020).

Koja su potencijalna objašnjenja za postojanje suptilnih, region/sloj specifičnih promena bez prateće generalizovane aktivacije mikroglije? Prema našoj pretpostavci, postoje dva moguća objašnjenja. Prvi pretpostavljeni mehanizam podrazumevao bi “klasični pristup” što bi podrazumevalo da traumatsko iskustvo u ranom postnatalnom periodu uzrokuje subregion specifično oštećenje u kome i nastaje mikroglijalna aktivacija. Drugi, nazovimo “alternativni pristup” zasniva se na interakciji između mikroglije i GABAergičkog sistema, to jest činjenici da ćelije mikroglije eksprimiraju GABA_B receptore. GABAergičke ćelije, svojim aksonima dosežu do susednih mikroglijalnih ćelija, ali i onih udaljenih koje se nalaze u dubljim ili površnijim slojevima kore s obzirom na postojanje translaminarnih veza (Thomson and Bannister, 2003). Pretpostavlja se da u takozvanoj fazi mirovanja interneuroni orkestriranim aktivnošću vrše anti – inflamatorni efekat na mikrogliju tako što sprečavaju aktivaciju to jest ekspresiju pro – inflamacijskih citokina (Kuhn et al., 2004; Lee et al., 2011). Gubitak neuroprotektivnog dejstva GABA na ćelije mikroglije može proisteći kao posledica maternalne deprivacije s obzirom na smanjenje gustine interneurona u PFC – u koji je pronađen u našoj studiji (Mead et al., 2012).

U sprovedenom istraživanju, 24 – časovna maternalna deprivacija uzrokovala je blagu kognitivnu nefleksibilnost u mladom adultnom dobu uz očuvanu radnu memoriju i sposobnost učenja. Ovaj suptilni deficit reverznog učenja kod MD životinja se manifestovao kao produženo vreme za donošenje odluke o izboru ručice (proturanje njuške keramičku posudu izbora) u trećem pokušaju reverzne faze ispitivanja. Dobijeni rezultat možemo protumačiti kao prisustvo povećane odbojnosti kod MD životinja ka donošenju odluka i započinjanju radnje koja je usmerena prema cilju. Samim tim, moguće je da MD

pacove karakteriše smanjenja efikasnost u rešavanju situacija u kojima postoji neslaganje između prethodno naučene i novozadate prostorne lokalizacije nagrade, čime se ispoljava blag oblik kognitivne nefleksibilnosti.

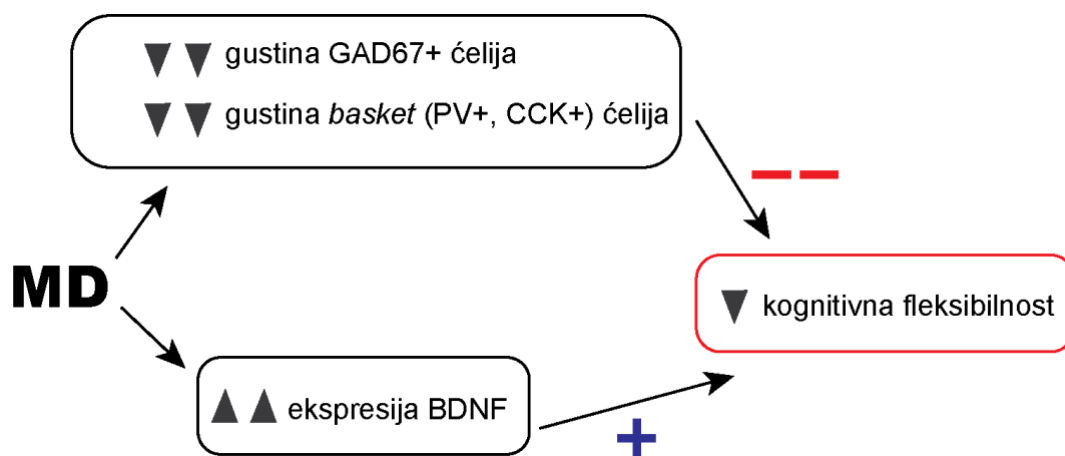
Do sada je uticaj RTI - a na sposobnost učenja i kognitivnu fleksibilnost ispitivana kod dva najčešće upotrebljavana MD modela i to uglavnom korišćenjem bihejvioralne paradigme *Morris Water Maze* (MWM). Većina ovih studija pokazuje postojanje deficita reverznog učenja u mladom i zreloom adultnom dobu bez pratećih promena u sposobnosti učenja što je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja (Enthoven et al., 2008; Fabricius et al., 2008; Xue et al., 2013; Banqueri et al., 2019a; Menezes et al., 2020). Ipak, trebalo bi napomenuti da je i poremećaj u sposobnosti učenja kod MD životinja pronađen u pojedinim studijama (Garner et al., 2007; Wang et al., 2015). Pored MWM – a, kognitivna fleksibilnost kod pacova podvrgnutim neonatalnom traumatskom iskustvu ispitivana je i PFC – zavisnim testom *attention set shifting task* (ASST). Ovaj test smatra se ekvivalentom *Wisconsin card sorting test* – a koji se kod ljudi koristi u dijagnostici lezija frontalnog režnja. Snaga ovog testa jeste da pored visoke senzitivnosti u otkrivanju oštećenja reverznog učenja, ispituje i sposobnost promene seta pažnje što predstavlja drugi merljivi parametar kognitivne fleksibilnosti (Tait et al., 2014). U skladu sa dobijenim rezultatima našeg istraživanja, blago traumatsko iskustvo u neonatalnom periodu uzrokovalo je oštećenje reverznog učenja (Stamatakis et al., 2016), dok je 3 – časovna dnevna MD dovela do oštećenja sposobnosti za promenu seta fokusa (Baudin et al., 2012). Tako možemo primetiti da modifikacije u RTI protokolu utiču na kvalitet kognitivnog deficita. Pored bihejvioralne nefleksibilnosti, bitno je napomenuti da MD dovodi do još jedne vrste kognitivnog deficita – oštećenja memorije prepoznavanja (Mela et al., 2015; Janetsian-Fritz et al., 2018). Memorija prepoznavanja predstavlja meru sposobnosti za mentalnim oživljavanjem događaja iz prošlosti i kod životinja se meri kao sposobnost razlikovanja novih od poznatih objekata. Zanimljivo, ovakav deficit javlja se kod pacijenata obolelih od shizofrenije, gde novija shvatanja patofiziološku srž ove bolesti vide upravo u kognitivnom oštećenju (Bacon and Izaute, 2014). U svakom slučaju, pored metodoloških razlika između pojedinih RTI protokola, najmanji zajednički sadržalac većine ovih studija, makar u bihejvioralnom smislu predstavlja postojanje kognitivnog deficita. Shodno našim mogućnostima, potrudili smo se da ispitamo koja potencijalna morfološka i/ili biohemijska promena predstavlja temelj blagog deficita reverznog učenja koji je pronađen u našoj studiji.

Pre svega, polazimo od činjenice da je intenzitet kognitivnog deficita koji je zapažen kod MD mladih adultnih mužjaka blag i da je poremećaj reverznog učenja uočen tek pošto smo kod životinja ispitali vreme potrebno za donošenje odluke mereno od početka svakog pojedinačnog pokušaja tokom reverzne faze testiranja. Tokom ove faze testiranja, MD životinje nisu pravile više grešaka u izboru ručice

od kontrolnih, tako da je njihov opšti skor ostao nepromenjen. Takođe, broj uzastopnih grešaka nakon promene pravila nagrađivanja, kao i broj grešaka nakon akvizicije novog pravila u reverznoj fazi testiranja ostao je nepromenjen u MD grupi. Čime možemo objasniti deficit reverznog učenja i blag intenzitet zabeležene kognitivne promene? Smatra se da MO i VO, iako se razlikuju u pojedinim morfološkim karakteristikama, kao što je na primer povezanost sa amigdalom i *nc. accumbens* - om, čine jednu funkcionalnu celinu, čija se aktivnost ogleda u sposobnosti donošenja odluka koje su u vezi sa nagrađivanjem (Izquierdo, 2017). Prostorno i vizuelno reverzno učenje kontrolišu MO i VO (Boulougouris et al., 2007; Hervig et al., 2020), regioni PFC – a u kojima smo pronašli smanjenje gustine interneurona, kao i *basket* ćelija imunopozitivnih na CCK. Zanimljivo, Stamatakis i saradnici, pokazali su da je morfološki deficit u MO, doduše glutamatergičkih ćelija povezan sa oštećenjem reverznog učenja kod stresiranih životinja (Stamatakis et al., 2016). Deficit reverznog učenja pronađen je i kod adultnih ženki koje su bile izložene fragmentovanoj maternalnoj nezi tokom neonatalnog perioda zajedno sa smanjenem gustine PV+ ćelija i ekspresije GAD67 u OFC – u (Goodwill et al., 2018). Iako se protokoli među istraživanjima razlikuju, kao i tip pogođenih ćelija u određenoj meri, zajedničko za naše i navedena istraživanja je zahvaćenost OFC – a i ventralne komponente mPFC – a. Na osnovu ovih činjenica, naša pretpostavka je da osnovni kognitivni deficit u našoj studiji nastaje usled ćelijskih promena interneurona u MO i roVLO stresiranih mužjaka. Očuvana kognitivna fleksibilnost zavisi od normalnog balansa između ekscitacije i inhibicije, koji se još izražava kao E/I odnos (Page et al., 2018; Chaussenot et al., 2019). GABAerگیčke promene kod MD životinja mogu predstavljati osnov narušene E/I ravnoteže koja dovodi do kognitivnog deficita. U prethodnom istraživanju iz naše laboratorije MD je dovela do smanjenja ukupnog broja neurona u PFC – u (Aksić et al., 2013). Ipak, navedeno smanjenje u broju prefrontalnih neurona može nastati zbog smanjenja broja GABAerگیčkih, ali zbog smanjenja broja glutamatergičkih ćelija. U već pomenutoj studiji, pokazana je pogođenost glutamatergičkih ćelija PFC – a blagim neonatalnim traumatskim iskustvom (Stamatakis et al., 2016). Imajući u vidu da u našoj studiji nismo ispitivali gustinu prefrontalnih glutamatergičkih ćelija, ne možemo sa sigurnošću zaključiti da li je u pogođenim regionima zaista postoji gubitak E/I ravnoteže. U datom slučaju, adekvatnije je pretpostaviti da MD dovodi do ometanja unutar neuronskih krugova PFC – a koji nastaju kao posledica smanjenja gustine GABAerگیčkih ćelija.

Diskutujući o povećanju ekspresije BDNF – a iznesena je i pretpostavka da jedan ovakav nalaz može predstavljati kompenzacijski odgovor na GABAerگیčki deficit. U skladu sa tom hipotezom, kao i činjenicom da ekspresija BDNF – a stimulirana sinaptičkom aktivnošću predstavlja jedan od molekularnih osnova reverznog učenja moglo bi se pretpostaviti da upravo kompenzatorni porast prefrontalnog BDNF – a u MD grupi objašnjava blag intenzitet kognitivnog deficita (Sakata et al., 2013).

Slično stanovište izneli su Murueta-Goyena i saradnici u studijama u kojima je broj GABAergičkih ćelija i reverzno učenje ispitivano na animalnom modelu shizofrenije blokadom NMDA receptora. Blokada NMDA receptora dovela je do smanjena broja interneurona u PFC – u i hipokampusu praćeno kognitivnim deficitom. Međutim, izlaganje adultnih životinja uslovima obogaćenog okruženja dovela je do restauracije ovih deficita mehanizmom zavisnim od povećane BDNF – TrkB kinaza signalizacije (Murueta-Goyena et al., 2018, 2020). Iako se ovi eksperimentalni modeli značajno razlikuju u svojoj osnovi, povećana ekspresija BDNF – a u oba slučaja figurira kao manje ili više uspešan “spasilački faktor” u situaciji u kojoj postoji kognitivni deficit povezan sa oštećenjem GABAergičkog sistema (slika 34).



Slika 34. Shematski prikaz pretpostavljenog mehanizma nastanka blagog kognitivnog oštećenja kod MD životinja.

Po sličnom principu kao i kod predložene kompezacijske uloge BDNF – a u reverznom učenju, trebalo bi spomenuti i moguću ulogu serotonina za koji je pretpostavljeno da utiče na kontrolu reverznog učenja putem afektivnog procesuiranja u PFC – u (Clarke et al., 2004). Interesantno, kod adultnih MD mužjaka postoji povećana serotoninergička aktivnost u PFC – u (Rentesi et al., 2013). Međutim, i pored toga što je u ovoj studiji korišćen identičan MD protokol kao i u našoj, ne bi bilo primereno iznositi čvrste zaključke o uticaju serotonina na kognitivnu fleksibilnost MD životinja, pre svega imajući u vidu da serotonin nije bio ispitivan u eksperimentu.

Kao kortikalni region koji poslednji sazreva, PFC je osetljiv na različite faktore sredine zbog produženog postnatalnog sazrevanja. U prilog ovoj tezi o ranjivosti prefrontalne kore svedoče rezultati dosadašnjih ispitivanja na brojnim animalnim modelima kao što su 3 – časovna MD tokom prve 3 nedelje života (Ganguly et al., 2016), umereni neonatalni stres u T – lavirintu (Stamatakis et al., 2016), socijalna

izolacija (Wall et al., 2012), fragmentovana majčinska nega mladunaca (Goodwill et al., 2018) i prenatalni stres (Marchisella et al., 2021).

Na osnovu dosadašnjih saznanja sazrevanje moždane kore odvija se prema vremenskom obrascu u kaudalno – rostralnom smeru. Ovaj obrazac podrazumeva da prvo dolazi do sazrevanja okcipitalog, parijetalnog i kaudalne polovine temporalnog režnja, dok frontalni, rostralna polovina temporalnog režnja i insula sazrevaju u kasnijem postnatalnom dobu. PFC zauzima krajnje rostralni položaj u odnosu na neuralnu osovinu (*neuroaxis*) i samim tim prema na navedenom obrascu sazreva najkasnije od svih kortikalnih struktura. Brojni razvojni procesi kao što su maturacija ćelija, sinaptogeneza, formiranje nervnih krugova i mijelinizacija nastavljaju da se odvijaju postnatalno u PFC-u (Kolb et al., 2012; Oga et al., 2013). Prekomerna produkcija sinapsi je tako primera radi najmasovnija upravo u PFC-u, dok je proces eliminacije viška sinapsi najsporiji u celom CNS-u (Elston et al., 2009). Radi boljeg razumevanja, navedeni tok možemo uporediti sa vremenskim prozorom eliminacije sinapsi u auditivnom korteksu, koji predstavlja čisto senzorno područje. U slušnoj kori eliminacija viška sinapsi počinje krajem detinjstva i dostiže adultni nivo oko 12 – te godine (Huttenlocher and Dabholkar, 1997). U PFC - u eliminacija počinje u pubertetu i traje sve do sredine treće decenije života (Petanjek et al., 2011). Iako su ove razlike vrlo upečatljive, ne bi trebalo da čude s obzirom na stepen integracije koji zahteva adekvatni razvoj kognitivnih sposobnosti. Jednostavnije rečeno, potrebno je da se PFC razvija „dovoljno sporo“ za šta je potrebno vreme u toku kojeg je ovaj moždani region ranjiv na efekte stresa. Traumatska iskustva tokom ranog postnatalnog života narušavaju osetljivi postepeni proces sazrevanja PFC – a postupkom ubrzavanja, čime neuronski krugovi dostižu zrelost pre predviđenog vremenskog roka. Primera radi, MD dovodi do povećanja dendritske arborizacije i gustine dendritskih spina (Muhammad et al., 2012), a u prilog navedenoj tezi govori i povećanje ekspresije BDNF – a, nalaz koji ukazuje na ubrzanje procesa sazrevanja. Međutim, ovakvoj zrelosti koja se dostiže u nekontrolisano ubrzanim uslovima nedostaje kapacitet neophodan za procesuiranje stresova koji neminovno nastaju u kasnijem životnom dobu. Time se objašnjava činjenica da do razvoja simptoma i znakova psihičkog oboljenja dolazi nakon izlaganja traumatskom iskustvu visokog intenziteta u ranom adultnom dobu ili čak kasnije, iako su strukturne promene nastale mnogo godina ranije (McEwen and Morrison, 2013).

Pre iznošenja zaključaka, potrebno je izneti ograničenja izvršene studije, koja nesumnjivo postoje. Prva, verovatno i najkrupnija limitacija ovog istraživanja jeste korišćenje isključivo mužjaka pacova. Glavni razlog za ovakvu odluku leži u rezultatima pilot istraživanja u kome su ženke pokazale visok stepen varijabilnosti u ponašanju tokom BFTMT – a. Najverovatnije, ova varijabilnost nastaje kao posledica promena u koncentraciji polnih hormona tokom menstrualnog ciklusa (Jaric et al., 2019). Drugo, kognitivna fleksibilnost MD životinja ispitivana je upotrebom samo jednog testa. Ispitivanje

dodatnim testovima nije rađeno pre svega zbog ograničenih kapaciteta u našoj laboratoriji, kao i činjenice da smo u postojećim okolnostima po prvi put sprovodili kognitivno ispitivanje životinja koje samo po sebi iziskuje korišćenje velikog broja legala i životinja, ali i dugotrajnu pripremu za testiranje. Treće, nije ispitivana gustina glutamatergičkih ćelija i ćelijska smrt, parametri koji bi najverovatnije pružili jasniji uvid u mehanizme pronađenih ćelijskih promena. Konačno, naša studija je reakciju glije na neonatalni stres ispitivala samo kroz mikrogliju, iako su do sada otkrivne i promene astroglije nakon izlaganja RTI - u.

Prefrontalni interneuroni nesumnjivo igraju važnu ulogu u neuronskim krugovima koji kontrolišu kognitivne procese i emocionalno procesuiranje. Zbog morfofunkcionalne raznolikosti GABAergičkih ćelija, postoji veliki prostor u ispitivanju čitavog anatomskeg pula GABAergičkih ćelija kod stresiranih životinja i utvrđivanju prirode potencijalnih promena u različitim delovima mozga. Ne treba zaboraviti da je pored ispitanih *basket* ćelija, uticaj MD na morfologiju somatostatin, VIP i NPY imunopozitivnih ćelija i dalje nepoznat. Rezultati ovog istraživanja trebalo bi da makar u metodološkom pogledu stimulišu istraživače u detaljnom anatomskeg pristupu pri evaluaciji region/sloj zavisnih promena. Pored interneurona, u oblasti RTI - a, morfofunkcionalni status različitih neurotransmiterskih sistema, kao što su serotoninergički, dopaminerfički, adrenergički i holinergički sistem, i dalje je u najvećoj meri neistražen. Kombinacija morfoloških i metaboličkih ispitivanja primenom metoda poput likvidne hromatografije ima obećavajući potencijal u razotkrivanju region specifičnih promena neurotransmiterskih sistema. Kao što je već pomenuto dvostruka bojenja ćelijskih populacija i faktora ćelijske smrti, mogu dati vredne informacije o mehanizmu nastanka promena sa osvrtom na značaj razvojnog vremenskog prozora u kome se vrši ispitivanje zbog prirodnih apoptotskih procesa u razvijajućem mozgu. U pogledu sinaptičke plastičnosti verovatno će biti potrebna još čitava baterija istraživanja ne bi li se sa sigurnošću ustanovio detaljan vremenski tok ekspresije BDNF – a nakon izlaganja RTI - u. Posebnu pažnju trebalo bi posvetiti glijalnoj reakciji na RTI. Naime, dubinska snimanja savremenim konfokalnim mikroskopima daju mogućnost prostorne 3D analize mikroglijalne i astroglijalne razgranatosti što pruža značajne informacije pogledu preciznog sagledavanja aktivacionog statusa ovih ćelija.

6. ZAKLJUČCI

1. Rano traumatsko iskustvo u obliku 24 – časovnog odvajanja mladunaca od majke devetog postnatalnog dana uzrokuje promenu gustine ukupne interneuronske populacije, kao i subpopulacija *basket* interneurona PFC – a
2. Promene gustina GABAergičkih subpopulacija su specifične za različite delove PFC – a
3. U celoj debljini OFC – a, kao i u površinskim slojevima ventralne komponente mPFC - a postoji smanjenje gustine ukupne interneuronske populacije (GAD67+)
4. U površinskim slojevima roCg1 i dubokim slojevima PrL, subregionima dorzalne komponente mPFC – a postoji smanjenje gustine PV+ *basket* interneurona
5. U površinskim slojevima ventralne komponente mPFC – a postoji smanjenje gustine CCK+ *basket* interneurona
6. Neonatalni stres dovodi do povećanja sinaptičke plastičnosti u neonatalnom i mladom adultnom PFC – u, iskazanu kroz pojačanu ekspresiju BDNF – a
7. Povećana ekspresija prefrontalnog BDNF – a potencijalno predstavlja kompenzacijsku reakciju na promene u GABAergičkom sistemu MD životinja
8. Neonatalni stres ne uzrokuje opštu aktivaciju mikroglije u neonatalnom i mladom adultnom dobu
9. Maternalna deprivacija u mladom adultnom dobu dovodi do blagog kognitivnog deficita koji rezultira suptilnim oštećenjem reverznog učenja
10. Blag intenzitet kognitivnog deficita i pored značajnih morfoloških promena u GABAergičkom sistemu prefrontalne kore mogao bi se pripisati ushodnoj regulaciji BDNF - a

Na osnovu svega iznetog, rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da rano traumatsko iskustvo u formi 24 – časovne maternalne deprivacije uzrokuje dugoročne promene u GABAergicikom sistemu prefrontalne kore, koje je praćeno ushodnom regulacijom BDNF – a i blagim kognitivnim deficitom. S obzirom da interneuroni igraju ključnu ulogu u kognitivnom funkcionisanju neophodno je bolje razumevanje načina na koji promene kortikalnog inhibitornog sistema uzrokovane traumama u ranom životnom dobu mogu oblikovati kogniciju u zreom dobu i uticati na razvoj mentalnih poremećaja sa razvojnom osnovom.

7. LITERATURA

- Ahima, R. S., and Harlan, R. E. (1990). Charting of Type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39, 579–604.
- Aksic, M., Poleksic, J., Aleksic, D., Petronijevic, N., Radonjic, N. V, Jakovcevski, M., et al. (2021). Maternal Deprivation in Rats Decreases the Expression of Interneuron Markers in the Neocortex and Hippocampus. *Front. Neuroanat.* 15, 41.
- Aksić, M., Radonjić, N. V, Aleksić, D., Jevtić, G., Marković, B., Petronijević, N., et al. (2013). Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 73, 394–403.
- Alcaide, J., Guirado, R., Crespo, C., Blasco-Ibáñez, J. M., Varea, E., Sanjuan, J., et al. (2019). Alterations of perineuronal nets in the dorsolateral prefrontal cortex of neuropsychiatric patients. *Int. J. bipolar Disord.* 7, 24.
- Aleksić, D., Aksić, M., Radonjić, N. V, Jovanović, A., Marković, B., Petronijević, N., et al. (2016). Long-term Effects of Maternal Deprivation on the Volume, Number and Size of Neurons in the Amygdala and Nucleus Accumbens of Rats. *Psychiatr. Danub.* 28, 211–219.
- Ali, A. B., Bannister, A. P., and Thomson, A. M. (2007). Robust correlations between action potential duration and the properties of synaptic connections in layer 4 interneurons in neocortical slices from juvenile rats and adult rat and cat. *J. Physiol.* 580, 149–169.
- Alli, S., Tasmim, S., Adanty, C., Graff, A., Strauss, J., Zai, C., et al. (2019). Childhood trauma predicts multiple, high lethality suicide attempts in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 281, 112567.
- Armstrong, C., and Soltesz, I. (2012). Basket cell dichotomy in microcircuit function. *J. Physiol.* 590, 683–694.
- Arnsten, A. F. T. (2009). Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 410–422.
- Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn2402>.
- Avishai-Eliner, S., Hatalski, C. G., Tabachnik, E., Eghbal-Ahmadi, M., and Baram, T. Z. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor messenger RNA (GR-mRNA) by maternal deprivation in immature rat hypothalamus and limbic regions. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 114, 265–268.
- Bacon, E., and Izaute, M. (2014). “Chapter 5 - Memory-Related Metacognition in Patients with

- Schizophrenia,” in, eds. P. H. Lysaker, G. Dimaggio, and M. B. T.-S. C. and M. in S. Brüne (San Diego: Academic Press), 83–97.
- Baek, S.-S., Jun, T.-W., Kim, K.-J., Shin, M.-S., Kang, S.-Y., and Kim, C.-J. (2012). Effects of postnatal treadmill exercise on apoptotic neuronal cell death and cell proliferation of maternal-separated rat pups. *Brain Dev.* 34, 45–56.
- Baier, C. J., Franco, D. L., Gallegos, C. E., Mongiat, L. A., Dionisio, L., Bouzat, C., et al. (2014). Corticosterone affects the differentiation of a neuronal cerebral cortex-derived cell line through modulation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience* 274, 369–382.
- Banqueri, M., Martínez, J. A., Prieto, M. J., Cid-Duarte, S., Méndez, M., and Arias, J. L. (2019a). Photobiomodulation rescues cognitive flexibility in early stressed subjects. *Brain Res.* 1720, 146300.
- Banqueri, M., Méndez, M., Gómez-Lázaro, E., and Arias, J. L. (2019b). Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. *Stress* 22, 563–570.
- Barreda Tomás, F. J., Turko, P., Heilmann, H., Trimbuch, T., Yanagawa, Y., Vida, I., et al. (2020). BDNF Expression in Cortical GABAergic Interneurons. *Int. J. Mol. Sci.* 21.
- Baudin, A., Blot, K., Verney, C., Estevez, L., Santamaria, J., Gressens, P., et al. (2012). Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98, 207–214.
- Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E. R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., et al. (2009). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat. Neurosci.* 13, 76. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2447>.
- Bentall, R. P., Wickham, S., Shevlin, M., and Varese, F. (2012). Do specific early-life adversities lead to specific symptoms of psychosis? A study from the 2007 the Adult Psychiatric Morbidity Survey. *Schizophr. Bull.* 38, 734–740.
- Berman, A. K., Lott, R. B., and Donaldson, S. T. (2014). Periodic maternal deprivation may modulate offspring anxiety-like behavior through mechanisms involving neuroplasticity in the amygdala. *Brain Res. Bull.* 101, 7–11.
- Bhatt, A. J., Feng, Y., Wang, J., Famuyide, M., and Hersey, K. (2013). Dexamethasone induces apoptosis of progenitor cells in the subventricular zone and dentate gyrus of developing rat brain. *J. Neurosci. Res.* 91, 1191–1202.
- Birn, R. M., Patriat, R., Phillips, M. L., Germain, A., and Herringa, R. J. (2014). Childhood maltreatment and combat posttraumatic stress differentially predict fear-related fronto-subcortical connectivity.

Depress. Anxiety 31, 880–892.

- Birrell, J. M., and Brown, V. J. (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J. Neurosci.* 20, 4320–4324.
- Bissonette, G. B., Bae, M. H., Suresh, T., Jaffe, D. E., and Powell, E. M. (2010). Astrocyte-mediated hepatocyte growth factor/scatter factor supplementation restores GABAergic interneurons and corrects reversal learning deficits in mice. *J. Neurosci.* 30, 2918–2923.
- Bissonette, G. B., and Powell, E. M. (2012). Reversal learning and attentional set-shifting in mice. *Neuropharmacology* 62, 1168–1174.
- Boksa, P., Zhang, Y., Nouel, D., Wong, A., and Wong, T. P. (2016). Early Development of Parvalbumin-, Somatostatin-, and Cholecystinin-Expressing Neurons in Rat Brain following Prenatal Immune Activation and Maternal Iron Deficiency. *Dev. Neurosci.* 38, 342–353.
- Boulougouris, V., Dalley, J. W., and Robbins, T. W. (2007). Effects of orbitofrontal, infralimbic and prelimbic cortical lesions on serial spatial reversal learning in the rat. *Behav. Brain Res.* 179, 219–228.
- Brown, A. S. (2011). The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* 93, 23–58.
- Buzsáki, G., and Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926–1929.
- Calvigioni, D., Máté, Z., Fuzik, J., Girach, F., Zhang, M.-D., Varro, A., et al. (2017). Functional Differentiation of Cholecystinin-Containing Interneurons Destined for the Cerebral Cortex. *Cereb. Cortex* 27, 2453–2468.
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science* 358, 478–482.
- Chaussonot, R., Amar, M., Fossier, P., and Vaillend, C. (2019). Dp71-Dystrophin Deficiency Alters Prefrontal Cortex Excitation-Inhibition Balance and Executive Functions. *Mol. Neurobiol.* 56, 2670–2684.
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maślanka, I., Hess, G., et al. (2013). Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2089–2107.
- Choy, K. H. C., De Visser, Y., Nichols, N. R., and Van Den Buuse, M. (2008). Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: Effects on learning and memory. *Hippocampus*.
- Cintra, A., Bhatnagar, M., Chadi, G., Tinner, B., Lindberg, J., Gustafsson, J. A., et al. (1994). Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 746, 42–43.

- Citri, A., and Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 18–41.
- Clarke, H. F., Dalley, J. W., Crofts, H. S., Robbins, T. W., and Roberts, A. C. (2004). Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* 304, 878–880.
- Colonnello, V., Iacobucci, P., Fuchs, T., Newberry, R. C., and Panksepp, J. (2011). Octodon degus. A useful animal model for social-affective neuroscience research: basic description of separation distress, social attachments and play. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1854–1863.
- Condé, F., Maire-Lepoivre, E., Audinat, E., and Crépel, F. (1995). Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 352, 567–593.
- Cristofori, I., Cohen-Zimmerman, S., and Grafman, J. (2019). Executive functions. *Handb. Clin. Neurol.* 163, 197–219.
- Cunningham, C., Champion, S., Teeling, J., Felton, L., and Perry, V. H. (2007). The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain. Behav. Immun.* 21, 490–502.
- Curran, M. M., Sandman, C. A., Poggi Davis, E., Glynn, L. M., and Baram, T. Z. (2017). Abnormal dendritic maturation of developing cortical neurons exposed to corticotropin releasing hormone (CRH): Insights into effects of prenatal adversity? *PLoS One* 12, e0180311.
- Czéh, B., Vardya, I., Varga, Z., Febraro, F., Csabai, D., Martis, L.-S., et al. (2018). Long-Term Stress Disrupts the Structural and Functional Integrity of GABAergic Neuronal Networks in the Medial Prefrontal Cortex of Rats. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 148.
- Dajani, D. R., and Uddin, L. Q. (2015). Demystifying cognitive flexibility: Implications for clinical and developmental neuroscience. *Trends Neurosci.* 38, 571–578.
- Deacon, R. M. J., and Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 1, 7–12.
- Delevich, K., Tucciarone, J., Huang, Z. J., and Li, B. (2015). The mediodorsal thalamus drives feedforward inhibition in the anterior cingulate cortex via parvalbumin interneurons. *J. Neurosci.* 35, 5743–5753.
- Dickstein, D. P., Finger, E. C., Brotman, M. A., Rich, B. A., Pine, D. S., Blair, J. R., et al. (2010). Impaired probabilistic reversal learning in youths with mood and anxiety disorders. *Psychol. Med.* 40, 1089–1100.
- Doischer, D., Hosp, J. A., Yanagawa, Y., Obata, K., Jonas, P., Vida, I., et al. (2008). Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *J. Neurosci.* 28, 12956–12968.
- Du, X., Serena, K., Hwang, W. J., Grech, A. M., Wu, Y. W. C., Schroeder, A., et al. (2018). Prefrontal cortical parvalbumin and somatostatin expression and cell density increase during adolescence and

- are modified by BDNF and sex. *Mol. Cell. Neurosci.* 88, 177–188.
- Ellenbroek, B. A., de Bruin, N. M. W. J., van Den Kroonenburg, P. T. J. M., van Luijtelaar, E. L. J. M., and Cools, A. R. (2004). The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult Wistar rats. *Biol. Psychiatry* 55, 701–707.
- Ellenbroek, B. A., van den Kroonenburg, P. T. J. M., and Cools, A. R. (1998). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr. Res.* 30, 251–260.
- Elston, G. N., Oga, T., and Fujita, I. (2009). Spinogenesis and pruning scales across functional hierarchies. *J. Neurosci.* 29, 3271–3275.
- Enthoven, L., de Kloet, E. R., and Oitzl, M. S. (2008). Effects of maternal deprivation of CD1 mice on performance in the water maze and swim stress. *Behav. Brain Res.* 187, 195–199.
- Enwright, J. F., Sanapala, S., Foglio, A., Berry, R., Fish, K. N., and Lewis, D. A. (2016). Reduced Labeling of Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 2206–2214.
- Esclapez, M., Tillakaratne, N. J., Kaufman, D. L., Tobin, A. J., and Houser, C. R. (1994). Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J. Neurosci.* 14, 1834–1855.
- Fabricius, K., Wörtwein, G., and Pakkenberg, B. (2008). The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 212, 403–416.
- Ferle, V., Repouskou, A., Aspiotis, G., Raftogianni, A., Chrousos, G., Stylianopoulou, F., et al. (2020). Synergistic effects of early life mild adversity and chronic social defeat on rat brain microglia and cytokines. *Physiol. Behav.* 215, 112791.
- Ferrier, I. N., Roberts, G. W., Crow, T. J., Johnstone, E. C., Owens, D. G., Lee, Y. C., et al. (1983). Reduced cholecystinin-like and somatostatin-like immunoreactivity in limbic lobe is associated with negative symptoms in schizophrenia. *Life Sci.* 33, 475–482.
- Ferrini, F., and De Koninck, Y. (2013). Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast.* 2013, 429815.
- Fish, K. N., Sweet, R. A., and Lewis, D. A. (2011). Differential distribution of proteins regulating GABA synthesis and reuptake in axon boutons of subpopulations of cortical interneurons. *Cereb. Cortex* 21, 2450–2460.
- Förster, A., Model, V., Gos, T., Frodl, T., Schiltz, K., Dobrowolny, H., et al. (2021). Reduced GABAergic neuropil and interneuron profiles in schizophrenia: Complementary analysis of disease

- course-related differences. *J. Psychiatr. Res.* 145, 50–59.
- Frank, M. G., Baratta, M. V., Sprunger, D. B., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2007). Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain. Behav. Immun.* 21, 47–59.
- Fukumoto, K., Morita, T., Mayanagi, T., Tanokashira, D., Yoshida, T., Sakai, A., et al. (2009). Detrimental effects of glucocorticoids on neuronal migration during brain development. *Mol. Psychiatry* 14, 1119–1131.
- Fuster, J. M. (2015). “Chapter 2 - Anatomy of the Prefrontal Cortex,” in *The Prefrontal Cortex (Fifth Edition)*, ed. J. M. Fuster (San Diego: Academic Press), 9–62.
- Gabbott, P., Headlam, A., and Busby, S. (2002). Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat. *Brain Res.* 946, 314–322.
- Ganguly, P., Holland, F. H., and Brenhouse, H. C. (2016). Functional Uncoupling NMDAR NR2A Subunit from PSD-95 in the Prefrontal Cortex: Effects on Behavioral Dysfunction and Parvalbumin Loss after Early-Life Stress. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 1188.
- García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., Aracil, A., Bartoll, A., Martínez-Gras, I., Lanciego, J. L., et al. (2016). Increased vulnerability to ethanol consumption in adolescent maternally separated mice. *Addict. Biol.* 21, 847–858.
- Garner, B., Wood, S. J., Pantelis, C., and van den Buuse, M. (2007). Early maternal deprivation reduces prepulse inhibition and impairs spatial learning ability in adulthood: no further effect of post-pubertal chronic corticosterone treatment. *Behav. Brain Res.* 176, 323–332.
- Geibel, M., Badurek, S., Horn, J. M., Vatanashevanopakorn, C., Koudelka, J., Wunderlich, C. M., et al. (2014). Ablation of TrkB signalling in CCK neurons results in hypercortisolism and obesity. *Nat. Commun.* 5, 3427.
- Gonzalez-Burgos, G., Cho, R. Y., and Lewis, D. A. (2015). Alterations in cortical network oscillations and parvalbumin neurons in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 77, 1031–1040.
- Goodwill, H. L., Manzano-Nieves, G., LaChance, P., Teramoto, S., Lin, S., Lopez, C., et al. (2018). Early Life Stress Drives Sex-Selective Impairment in Reversal Learning by Affecting Parvalbumin Interneurons in Orbitofrontal Cortex of Mice. *Cell Rep.* 25, 2299–2307.e4.
- Gorka, A. X., Hanson, J. L., Radtke, S. R., and Hariri, A. R. (2014). Reduced hippocampal and medial prefrontal gray matter mediate the association between reported childhood maltreatment and trait anxiety in adulthood and predict sensitivity to future life stress. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 4, 12.

- Gos, T., Günther, K., Biela, H., Dobrowolny, H., Mawrin, C., Trübner, K., et al. (2009). Suicide and depression in the quantitative analysis of glutamic acid decarboxylase-Immunoreactive neuropil. *J. Affect. Disord.* 113, 45–55.
- Grant, M. M., White, D., Hadley, J., Hutcheson, N., Shelton, R., Sreenivasan, K., et al. (2014). Early life trauma and directional brain connectivity within major depression. *Hum. Brain Mapp.* 35, 4815–4826.
- Grassi-Oliveira, R., Honeycutt, J. A., Holland, F. H., Ganguly, P., and Brenhouse, H. C. (2016). Cognitive impairment effects of early life stress in adolescents can be predicted with early biomarkers: Impacts of sex, experience, and cytokines. *Psychoneuroendocrinology* 71, 19–30.
- Green, M. F. (2016). Impact of cognitive and social cognitive impairment on functional outcomes in patients with schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry* 77 Suppl 2, 8–11.
- Grosse, G., Djalali, S., Deng, D. R., Höltje, M., Hinz, B., Schwartzkopff, K., et al. (2005). Area-specific effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) genetic ablation on various neuronal subtypes of the mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156, 111–126.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J. M., Di-Giorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D. R., et al. (2000). Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 1061–1069.
- Hakamata, Y., Mizukami, S., Izawa, S., Moriguchi, Y., Hori, H., Matsumoto, N., et al. (2021). Childhood trauma affects autobiographical memory deficits through basal cortisol and prefrontal-extrastriate functional connectivity. *Psychoneuroendocrinology* 127, 105172.
- Halligan, S. L., Herbert, J., Goodyer, I., and Murray, L. (2007). Disturbances in morning cortisol secretion in association with maternal postnatal depression predict subsequent depressive symptomatology in adolescents. *Biol. Psychiatry* 62, 40–46.
- Harry, G. J. (2013). Microglia during development and aging. *Pharmacol. Ther.* 139, 313–326.
- Hassan, A. N., Stuart, E. A., and De Luca, V. (2016). Childhood maltreatment increases the risk of suicide attempt in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 176, 572–577.
- Heidbreder, C. A., and Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 555–579.
- Helmeke, C., Ovtscharoff, W. J., Poeggel, G., and Braun, K. (2008). Imbalance of immunohistochemically characterized interneuron populations in the adolescent and adult rodent medial prefrontal cortex after repeated exposure to neonatal separation stress. *Neuroscience* 152, 18–28.

- Hervig, M. E., Fiddian, L., Piilgaard, L., Božič, T., Blanco-Pozo, M., Knudsen, C., et al. (2020). Dissociable and Paradoxical Roles of Rat Medial and Lateral Orbitofrontal Cortex in Visual Serial Reversal Learning. *Cereb. Cortex* 30, 1016–1029.
- Holm, M. M., Nieto-Gonzalez, J. L., Vardya, I., Vaegter, C. B., Nykjaer, A., and Jensen, K. (2009). Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 29, 12412–12418.
- Hoover, W. B., and Vertes, R. P. (2011). Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 519, 3766–3801.
- Hovens, J. G. F. M., Giltay, E. J., Wiersma, J. E., Spinhoven, P., Penninx, B. W. J. H., and Zitman, F. G. (2012). Impact of childhood life events and trauma on the course of depressive and anxiety disorders. *Acta Psychiatr. Scand.* 126, 198–207.
- Huang, Z. J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M. F., et al. (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98, 739–755.
- Hupalo, S., Bryce, C. A., Bangasser, D. A., Berridge, C. W., Valentino, R. J., and Floresco, S. B. (2019). Corticotropin-Releasing Factor (CRF) circuit modulation of cognition and motivation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 103, 50–59.
- Huttenlocher, P. R., and Dabholkar, A. S. (1997). Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 387, 167–178.
- Infurna, M. R., Reichl, C., Parzer, P., Schimmenti, A., Bifulco, A., and Kaess, M. (2016). Associations between depression and specific childhood experiences of abuse and neglect: A meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 190, 47–55.
- Isaacson, J. S., Solís, J. M., and Nicoll, R. A. (1993). Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10, 165–175.
- Issa, G., Wilson, C., Terry, A. V. J., and Pillai, A. (2010). An inverse relationship between cortisol and BDNF levels in schizophrenia: data from human postmortem and animal studies. *Neurobiol. Dis.* 39, 327–333.
- Izquierdo, A. (2017). Functional Heterogeneity within Rat Orbitofrontal Cortex in Reward Learning and Decision Making. *J. Neurosci.* 37, 10529–10540.
- Izquierdo, A., Brigman, J. L., Radke, A. K., Rudebeck, P. H., and Holmes, A. (2017). The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience* 345, 12–26.
- Jahangard, L., Solgy, R., Salehi, I., Taheri, S. K., Holsboer-Trachsler, E., Haghghi, M., et al. (2018). Cholecystokinin (CCK) level is higher among first time suicide attempters than healthy controls,

- but is not associated with higher depression scores. *Psychiatry Res.* 266, 40–46.
- Janetsian-Fritz, S. S., Timme, N. M., Timm, M. M., McCane, A. M., Baucum Ii, A. J., O'Donnell, B. F., et al. (2018). Maternal deprivation induces alterations in cognitive and cortical function in adulthood. *Transl. Psychiatry* 8, 71.
- Jaric, I., Rocks, D., Cham, H., Herchek, A., and Kundakovic, M. (2019). Sex and Estrous Cycle Effects on Anxiety- and Depression-Related Phenotypes in a Two-Hit Developmental Stress Model. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 74.
- Jett, J. D., Bulin, S. E., Hatherall, L. C., McCartney, C. M., and Morilak, D. A. (2017). Deficits in cognitive flexibility induced by chronic unpredictable stress are associated with impaired glutamate neurotransmission in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 346, 284–297.
- Kabba, J. A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., et al. (2018). Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 53–71.
- Kapor, S., Aksić, M., Puškaš, L., Jukić, M., Poleksić, J., Milosavljević, F., et al. (2020). Long-Term Effects of Maternal Deprivation on the Volume of Dopaminergic Nuclei and Number of Dopaminergic Neurons in Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area in Rats. *Front. Neuroanat.* 14, 578900.
- Karolewicz, B., Maciag, D., O'Dwyer, G., Stockmeier, C. A., Feyissa, A. M., and Rajkowska, G. (2010). Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 411–420.
- Katona, I., Sperlág, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., et al. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19, 4544–4558.
- Kawaguchi, Y., and Kondo, S. (2002). Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J. Neurocytol.* 31, 277–287.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486.
- Keefe, R. S. E., and Fenton, W. S. (2007). How should DSM-V criteria for schizophrenia include cognitive impairment? *Schizophr. Bull.* 33, 912–920.
- Kessler, R. C., McLaughlin, K. A., Green, J. G., Gruber, M. J., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., et al. (2010). Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *Br. J. Psychiatry* 197, 378–385.
- Ketchesin, K. D., Huang, N. S., and Seasholtz, A. F. (2017). Cell Type-Specific Expression of

- Corticotropin-Releasing Hormone-Binding Protein in GABAergic Interneurons in the Prefrontal Cortex. *Front. Neuroanat.* 11, 90.
- Kim, H., Ährlund-Richter, S., Wang, X., Deisseroth, K., and Carlén, M. (2016). Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention. *Cell* 164, 208–218.
- Knowland, D., Lilascharoen, V., Pacia, C. P., Shin, S., Wang, E. H.-J., and Lim, B. K. (2017). Distinct Ventral Pallidal Neural Populations Mediate Separate Symptoms of Depression. *Cell* 170, 284–297.e18.
- Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D. O., and Gibb, R. (2012). Experience and the developing prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 Suppl, 17186–17193.
- Korotkova, T., Fuchs, E. C., Ponomarenko, A., von Engelhardt, J., and Monyer, H. (2010). NMDA Receptor Ablation on Parvalbumin-Positive Interneurons Impairs Hippocampal Synchrony, Spatial Representations, and Working Memory. *Neuron* 68, 557–569.
- Kroener, S., Mulholland, P. J., New, N. N., Gass, J. T., Becker, H. C., and Chandler, L. J. (2012). Chronic alcohol exposure alters behavioral and synaptic plasticity of the rodent prefrontal cortex. *PLoS One* 7, e37541.
- Kubota, Y., and Kawaguchi, Y. (1997). Two distinct subgroups of cholecystinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Res.* 752, 175–183.
- Kuczewski, N., Porcher, C., and Gaiarsa, J.-L. (2010). Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1239–1244.
- Kuhn, S. A., van Landeghem, F. K. H., Zacharias, R., Färber, K., Rappert, A., Pavlovic, S., et al. (2004). Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 312–322.
- Lange, F., Seer, C., and Kopp, B. (2017). Cognitive flexibility in neurological disorders: Cognitive components and event-related potentials. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 496–507.
- Larsen, R., Proue, A., Scott, E. P., Christiansen, M., and Nakagawa, Y. (2019). The Thalamus Regulates Retinoic Acid Signaling and Development of Parvalbumin Interneurons in Postnatal Mouse Prefrontal Cortex. *eNeuro* 6.
- Lee, M., Schwab, C., and McGeer, P. L. (2011). Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 59, 152–165.
- Leussis, M. P., Freund, N., Brenhouse, H. C., Thompson, B. S., and Andersen, S. L. (2012). Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. *Dev. Neurosci.* 34, 210–217.
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--

- pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.* 73, 255–260.
- Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R., and Volk, D. W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci.* 35, 57–67.
- Li, J.-T., Su, Y.-A., Wang, H.-L., Zhao, Y.-Y., Liao, X.-M., Wang, X.-D., et al. (2016a). Repeated Blockade of NMDA Receptors During Adolescence Impairs Reversal Learning and Disrupts GABAergic Interneurons in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 17.
- Li, M., D’Arcy, C., and Meng, X. (2016b). Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. *Psychol. Med.* 46, 717–730.
- Licznerski, P., and Jonas, E. A. (2018). BDNF signaling: Harnessing stress to battle mood disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3742–3744.
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., and Marín, O. (2018). Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 100, 294–313.
- Llorente-Berzal, A., Fuentes, S., Gagliano, H., López-Gallardo, M., Armario, A., Viveros, M.-P., et al. (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict. Biol.* 16, 624–637.
- Llorente, R., Llorente-Berzal, A., Petrosino, S., Marco, E.-M., Guaza, C., Prada, C., et al. (2008). Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Dev. Neurobiol.* 68, 1334–1347.
- Lodge, D. J., Behrens, M. M., and Grace, A. A. (2009). A loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia. *J. Neurosci.* 29, 2344–2354.
- Logue, S. F., and Gould, T. J. (2014). The neural and genetic basis of executive function: attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 123, 45–54.
- López-Gallardo, M., López-Rodríguez, A. B., Llorente-Berzal, Á., Rotllant, D., Mackie, K., Armario, A., et al. (2012). Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion. *Neuroscience* 204, 90–103.
- Lukkes, J. L., Meda, S., Norman, K. J., and Andersen, S. L. (2018). Anhedonic behavior and γ -amino butyric acid during a sensitive period in female rats exposed to early adversity. *J. Psychiatr. Res.* 100, 8–15.
- Lüscher, C., and Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

- Majcher-Maślanka, I., Solarz, A., and Chocyk, A. (2019). Maternal separation disturbs postnatal development of the medial prefrontal cortex and affects the number of neurons and glial cells in adolescent rats. *Neuroscience* 423, 131–147.
- Majcher-Maślanka, I., Solarz, A., Wędzony, K., and Chocyk, A. (2018). Previous Early-life Stress Modifies Acute Corticosterone-induced Synaptic Plasticity in the Medial Prefrontal Cortex of Adolescent Rats. *Neuroscience* 379, 316–333.
- Manatos, V., Stylianopoulou, F., and Stamatakis, A. (2016). The levels of the GluN2A NMDA receptor subunit are modified in both the neonatal and adult rat brain by an early experience involving denial of maternal contact. *Neurosci. Lett.* 612, 98–103.
- Mandelli, L., Petrelli, C., and Serretti, A. (2015). The role of specific early trauma in adult depression: A meta-analysis of published literature. Childhood trauma and adult depression. *Eur. Psychiatry* 30, 665–680.
- Marchisella, F., Creutzberg, K. C., Begni, V., Sanson, A., Wearick-Silva, L. E., Tractenberg, S. G., et al. (2021). Exposure to Prenatal Stress Is Associated With an Excitatory/Inhibitory Imbalance in Rat Prefrontal Cortex and Amygdala and an Increased Risk for Emotional Dysregulation. *Front. cell Dev. Biol.* 9, 653384.
- Marco, E. M., Llorente, R., López-Gallardo, M., Mela, V., Llorente-Berzal, Á., Prada, C., et al. (2015). The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 51, 151–163.
- Marco, E. M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M. J., et al. (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology* 68, 223–231.
- Markham, J. A., Morris, J. R., and Juraska, J. M. (2007). Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. *Neuroscience* 144, 961–968.
- Marković, B., Radonjić, N. V., Aksić, M., Filipović, B., and Petronijević, N. (2014). Long-term effects of maternal deprivation on cholinergic system in rat brain. *Biomed Res. Int.* 2014, 636574.
- Matta, J. A., Ashby, M. C., Sanz-Clemente, A., Roche, K. W., and Isaac, J. T. R. (2011). mGluR5 and NMDA receptors drive the experience- and activity-dependent NMDA receptor NR2B to NR2A subunit switch. *Neuron* 70, 339–351.
- Maynard, T. M., Sikich, L., Lieberman, J. A., and LaMantia, A. S. (2001). Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 27, 457–476.
- McAlonan, K., and Brown, V. J. (2003). Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behav. Brain Res.* 146, 97–103.

- McCutcheon, J. E., and Marinelli, M. (2009). Age matters. *Eur. J. Neurosci.* 29, 997–1014.
- Mcdonald, A. J., Mascagni, F., and Guo, L. (1996). Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71, 55–75.
- McEwen, B. S., and Morrison, J. H. (2013). The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 79, 16–29.
- McKirdy, J., Sussmann, J. E. D., Hall, J., Lawrie, S. M., Johnstone, E. C., and McIntosh, A. M. (2009). Set shifting and reversal learning in patients with bipolar disorder or schizophrenia. *Psychol. Med.* 39, 1289–1293.
- McKlveen, J. M., Moloney, R. D., Scheimann, J. R., Myers, B., and Herman, J. P. (2019). “Braking” the Prefrontal Cortex: The Role of Glucocorticoids and Interneurons in Stress Adaptation and Pathology. *Biol. Psychiatry* 86, 669–681.
- McKlveen, J. M., Morano, R. L., Fitzgerald, M., Zoubovsky, S., Cassella, S. N., Scheimann, J. R., et al. (2016). Chronic Stress Increases Prefrontal Inhibition: A Mechanism for Stress-Induced Prefrontal Dysfunction. *Biol. Psychiatry* 80, 754–764.
- Mead, E. L., Mosley, A., Eaton, S., Dobson, L., Heales, S. J., and Pocock, J. M. (2012). Microglial neurotransmitter receptors trigger superoxide production in microglia; consequences for microglial-neuronal interactions. *J. Neurochem.* 121, 287–301.
- Mela, V., Díaz, F., Borcel, E., Argente, J., Chowen, J. A., and Viveros, M.-P. (2015). Long Term Hippocampal and Cortical Changes Induced by Maternal Deprivation and Neonatal Leptin Treatment in Male and Female Rats. *PLoS One* 10, e0137283.
- Menezes, J., Souto das Neves, B.-H., Gonçalves, R., Benetti, F., and Mello-Carpes, P. B. (2020). Maternal deprivation impairs memory and cognitive flexibility, effect that is avoided by environmental enrichment. *Behav. Brain Res.* 381, 112468.
- Mohammadzadeh, A., Azadi, S., King, S., Khosravani, V., and Sharifi Bastan, F. (2019). Childhood trauma and the likelihood of increased suicidal risk in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 275, 100–107.
- Morino, P., Herrera-Marschitz, M., Castel, M. N., Ungerstedt, U., Varro, A., Dockray, G., et al. (1994). Cholecystokinin in cortico-striatal neurons in the rat: immunohistochemical studies at the light and electron microscopical level. *Eur. J. Neurosci.* 6, 681–692.
- Morozov, Y. M., and Freund, T. F. (2003). Postnatal development and migration of cholecystokinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 120, 923–939.
- Mueller, S. C., Maheu, F. S., Dozier, M., Peloso, E., Mandell, D., Leibenluft, E., et al. (2010). Early-life stress is associated with impairment in cognitive control in adolescence: an fMRI study.

Neuropsychologia 48, 3037–3044.

- Muhammad, A., Carroll, C., and Kolb, B. (2012). Stress during development alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. *Neuroscience* 216, 103–109.
- Murray, A. J., Woloszynowska-Fraser, M. U., Ansel-Bollepalli, L., Cole, K. L. H., Foggetti, A., Crouch, B., et al. (2015). Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. *Sci. Rep.* 5, 16778.
- Murthy, S., and Gould, E. (2018). Early Life Stress in Rodents: Animal Models of Illness or Resilience? *Front. Behav. Neurosci.* 12, 157.
- Murueta-Goyena, A., Ortuzar, N., Gargiulo, P. Á., Lafuente, J. V., and Bengoetxea, H. (2018). Short-Term Exposure to Enriched Environment in Adult Rats Restores MK-801-Induced Cognitive Deficits and GABAergic Interneuron Immunoreactivity Loss. *Mol. Neurobiol.* 55, 26–41.
- Murueta-Goyena, A., Ortuzar, N., Lafuente, J. V., and Bengoetxea, H. (2020). Enriched Environment Reverts Somatostatin Interneuron Loss in MK-801 Model of Schizophrenia. *Mol. Neurobiol.* 57, 125–134.
- Nguyen, R., Venkatesan, S., Binko, M., Bang, J. Y., Cajanding, J. D., Briggs, C., et al. (2020). Cholecystokinin-Expressing Interneurons of the Medial Prefrontal Cortex Mediate Working Memory Retrieval. *J. Neurosci.* 40, 2314–2331.
- Nikolić, M., Gardner, H. A. R., and Tucker, K. L. (2013). Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* 254, 369–378.
- Nowicka, D., Soulsby, S., Skangiel-Kramska, J., and Glazewski, S. (2009). Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 30, 2053–2063.
- Oga, T., Aoi, H., Sasaki, T., Fujita, I., and Ichinohe, N. (2013). Postnatal development of layer III pyramidal cells in the primary visual, inferior temporal, and prefrontal cortices of the marmoset. *Front. Neural Circuits* 7, 31.
- Olson, E. A., Kaiser, R. H., Pizzagalli, D. A., Rauch, S. L., and Rosso, I. M. (2019). Regional Prefrontal Resting-State Functional Connectivity in Posttraumatic Stress Disorder. *Biol. psychiatry. Cogn. Neurosci. neuroimaging* 4, 390–398.
- Ongür, D., Ferry, A. T., and Price, J. L. (2003). Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *J. Comp. Neurol.* 460, 425–449.
- Ongür, D., and Price, J. L. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb. Cortex* 10, 206–219.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., and Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic

- states. *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665.
- Page, C. E., Alexander, J., Shepard, R., and Coutellier, L. (2018). Npas4 deficiency interacts with adolescent stress to disrupt prefrontal GABAergic maturation and adult cognitive flexibility. *Genes. Brain. Behav.* 17, e12459.
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1351–1365.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). “The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates BT - 123Library,” in (Academic Press). Available at: <https://www.123library.org>.
- Pehrson, A. L., and Sanchez, C. (2015). Altered γ -aminobutyric acid neurotransmission in major depressive disorder: a critical review of the supporting evidence and the influence of serotonergic antidepressants. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 603–624.
- Perez, S. M., Boley, A., and Lodge, D. J. (2019). Region specific knockdown of Parvalbumin or Somatostatin produces neuronal and behavioral deficits consistent with those observed in schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 9, 264.
- Perry, R. H., Dockray, G. J., Dimaline, R., Perry, E. K., Blessed, G., and Tomlinson, B. E. (1981). Neuropeptides in Alzheimer’s disease, depression and schizophrenia. A post mortem analysis of vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin in cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* 51, 465–472.
- Petanjek, Z., Judaš, M., Šimic, G., Rasin, M. R., Uylings, H. B. M., Rakic, P., et al. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13281–13286.
- Pinheiro, R. M. C., de Lima, M. N. M., Portal, B. C. D., Busato, S. B., Falavigna, L., Ferreira, R. D. P., et al. (2015). Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J. Neural Transm.* 122, 709–719.
- Price, J. L. (2007). Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1121, 54–71.
- Radonjić, N. V., Jakovcevski, I., Bumbaširević, V., and Petronijević, N. D. (2013). Perinatal phencyclidine administration decreases the density of cortical interneurons and increases the expression of neuregulin-1. *Psychopharmacology (Berl)*. 227, 673–683.
- Rajkowska, G., O’Dwyer, G., Teleki, Z., Stockmeier, C. A., and Miguel-Hidalgo, J. J. (2007). GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 32, 471–482.

- Rankov Petrovic, B., Hrcic, D., Mladenovic, D., Simic, T., Suvakov, S., Jovanovic, D., et al. (2019). Prenatal Androgenization Induces Anxiety-Like Behavior in Female Rats, Associated with Reduction of Inhibitory Interneurons and Increased BDNF in Hippocampus and Cortex. *Biomed Res. Int.* 2019, 3426092.
- Rentesi, G., Antoniou, K., Marselos, M., Syrrou, M., Papadopoulou-Daifoti, Z., and Konstandi, M. (2013). Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav. Brain Res.* 244, 29–37.
- Réus, G. Z., Dos Santos, M. A. B., Abelaira, H. M., Ribeiro, K. F., Petronilho, F., Vuolo, F., et al. (2013). Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. *Behav. Brain Res.* 242, 40–46.
- Réus, G. Z., Silva, R. H., de Moura, A. B., Presa, J. F., Abelaira, H. M., Abatti, M., et al. (2019). Early Maternal Deprivation Induces Microglial Activation, Alters Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity and Indoleamine 2,3-Dioxygenase during the Development of Offspring Rats. *Mol. Neurobiol.* 56, 1096–1108.
- Réus, G. Z., Simões, L. R., Colpo, G. D., Scaini, G., Oses, J. P., Generoso, J. S., et al. (2017). Ketamine potentiates oxidative stress and influences behavior and inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) exposure in early life. *Neuroscience* 353, 17–25.
- Reynolds, G. P., Beasley, C. L., and Zhang, Z. J. (2002). Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *J. Neural Transm.* 109, 881–889.
- Riedemann, T. (2019). Diversity and Function of Somatostatin-Expressing Interneurons in the Cerebral Cortex. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Roceri, M., Cirulli, F., Pessina, C., Peretto, P., Racagni, G., and Riva, M. A. (2004). Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol. Psychiatry* 55, 708–714.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B. A., and Riva, M. A. (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psychiatry* 7, 609. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001036>.
- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., and Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain. Behav. Immun.* 55, 39–48.
- Roth, F. C., and Draguhn, A. (2012). GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. *Neural Plast.* 2012, 805830.

- Saijo, K., and Glass, C. K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 775–787.
- Sakai, T., Oshima, A., Nozaki, Y., Ida, I., Haga, C., Akiyama, H., et al. (2008). Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology* 28, 143–150.
- Sakata, K., Martinowich, K., Woo, N. H., Schloesser, R. J., Jimenez, D. V., Ji, Y., et al. (2013). Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal-prefrontal cortical regulation of behavioral perseverance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15103–15108.
- Sakata, K., Woo, N. H., Martinowich, K., Greene, J. S., Schloesser, R. J., Shen, L., et al. (2009). Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5942–5947.
- Saleh, A., Potter, G. G., McQuoid, D. R., Boyd, B., Turner, R., MacFall, J. R., et al. (2017). Effects of early life stress on depression, cognitive performance and brain morphology. *Psychol. Med.* 47, 171–181.
- Sandau, U. S., and Handa, R. J. (2007). Glucocorticoids exacerbate hypoxia-induced expression of the pro-apoptotic gene Bnip3 in the developing cortex. *Neuroscience* 144, 482–494.
- Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., and Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch.* 469, 593–610.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705.
- Schmidt, M. V., Wang, X.-D., and Meijer, O. C. (2011). Early life stress paradigms in rodents: potential animal models of depression? *Psychopharmacology (Berl)*. 214, 131–140.
- Schubert, D., Martens, G. J. M., and Kolk, S. M. (2015). Molecular underpinnings of prefrontal cortex development in rodents provide insights into the etiology of neurodevelopmental disorders. *Mol. Psychiatry* 20, 795–809.
- Seamans, J. K., Lapish, C. C., and Durstewitz, D. (2008). Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotox. Res.* 14, 249–262.
- Seidel, K., Poeggel, G., Holetschka, R., Helmeke, C., and Braun, K. (2011). Paternal deprivation affects the development of corticotrophin-releasing factor-expressing neurones in prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of the biparental *Octodon degus*. *J. Neuroendocrinol.* 23, 1166–1176.
- Sesack, S. R., Deutch, A. Y., Roth, R. H., and Bunney, B. S. (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study

- with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 290, 213–242.
- Shevlin, M., Dorahy, M. J., and Adamson, G. (2007). Trauma and psychosis: an analysis of the National Comorbidity Survey. *Am. J. Psychiatry* 164, 166–169.
- Shevlin, M., Houston, J. E., Dorahy, M. J., and Adamson, G. (2008). Cumulative traumas and psychosis: an analysis of the national comorbidity survey and the British Psychiatric Morbidity Survey. *Schizophr. Bull.* 34, 193–199.
- Singhal, G., and Baune, B. T. (2017). Microglia: An Interface between the Loss of Neuroplasticity and Depression. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 270.
- Stamatakis, A., Manatos, V., Kalpachidou, T., and Stylianopoulou, F. (2016). Exposure to a mildly aversive early life experience leads to prefrontal cortex deficits in the rat. *Brain Struct. Funct.* 221, 4141–4157.
- Suri, D., Veenit, V., Sarkar, A., Thiagarajan, D., Kumar, A., Nestler, E. J., et al. (2013). Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol. Psychiatry* 73, 658–666.
- Tait, D. S., and Brown, V. J. (2010). “Attentional Set,” in *Encyclopedia of Psychopharmacology*, ed. I. P. Stolerman (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 181–182.
- Tait, D. S., Chase, E. A., and Brown, V. J. (2014). Attentional set-shifting in rodents: a review of behavioural methods and pharmacological results. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5046–5059.
- Tang, J.-J., Feng, S., Chen, X.-D., Huang, H., Mao, M., Wang, H.-Y., et al. (2021). The Effects of P75NTR on Learning Memory Mediated by Hippocampal Apoptosis and Synaptic Plasticity. *Curr. Pharm. Des.* 27, 531–539.
- Teicher, M. H., Samson, J. A., Anderson, C. M., and Ohashi, K. (2016). The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 652–666.
- Thomson, A. M., and Bannister, A. P. (2003). Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb. Cortex* 13, 5–14.
- Tremblay, R., Lee, S., and Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–292.
- Tricoire, L., Pelkey, K. A., Erkkila, B. E., Jeffries, B. W., Yuan, X., and McBain, C. J. (2011). A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J. Neurosci.* 31, 10948–10970.
- Underwood, M. D., Bakalian, M. J., Escobar, T., Kassir, S., Mann, J. J., and Arango, V. (2019). Early-Life Adversity, but Not Suicide, Is Associated With Less Prefrontal Cortex Gray Matter in Adulthood. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 22, 349–357.

- Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., and Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* 146, 3–17.
- Van Eden, C. G., Lamme, V. A. F., and Uylings, H. B. M. (1992). Heterotopic Cortical Afferents to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. A Combined Retrograde and Anterograde Tracer Study. *Eur. J. Neurosci.* 4, 77–97.
- Varese, F., Smeets, F., Drukker, M., Lieverse, R., Lataster, T., Viechtbauer, W., et al. (2012). Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective- and cross-sectional cohort studies. *Schizophr. Bull.* 38, 661–671.
- Varga, Z., Csabai, D., Miseta, A., Wiborg, O., and Czéh, B. (2017). Chronic stress affects the number of GABAergic neurons in the orbitofrontal cortex of rats. *Behav. Brain Res.* 316, 104–114.
- Vazquez, D. M., Bailey, C., Dent, G. W., Okimoto, D. K., Steffek, A., López, J. F., et al. (2006). Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation. *Brain Res.* 1121, 83–94.
- Vázquez, D. M., Eskandari, R., Phelka, A., and López, J. F. (2003). Impact of maternal deprivation on brain corticotropin-releasing hormone circuits: prevention of CRH receptor-2 mRNA changes by desipramine treatment. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 28, 898–909.
- Velikonja, T., Velthorst, E., McClure, M. M., Rutter, S., Calabrese, W. R., Rosell, D., et al. (2019). Severe childhood trauma and clinical and neurocognitive features in schizotypal personality disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 140, 50–64.
- Virgo, L., Humphries, C., Mortimer, A., Barnes, T., Hirsch, S., and de Belleruche, J. (1995). Cholecystokinin messenger RNA deficit in frontal and temporal cerebral cortex in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 37, 694–701.
- Viveros, M.-P., Díaz, F., Mateos, B., Rodríguez, N., and Chowen, J. A. (2010). Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm. Behav.* 57, 405–414.
- Viviani, B., Boraso, M., Valero, M., Gardoni, F., Marco, E. M., Llorente, R., et al. (2014). Early maternal deprivation immunologically primes hippocampal synapses by redistributing interleukin-1 receptor type I in a sex dependent manner. *Brain. Behav. Immun.* 35, 135–143.
- Vogt, B. A., and Paxinos, G. (2014). Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. *Brain Struct. Funct.* 219, 185–192.
- Volk, D. W., Austin, M. C., Pierri, J. N., Sampson, A. R., and Lewis, D. A. (2000). Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-

- aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 237–245.
- Vucurovic, K., Gallopin, T., Ferezou, I., Rancillac, A., Chameau, P., van Hooft, J. A., et al. (2010). Serotonin 3A receptor subtype as an early and protracted marker of cortical interneuron subpopulations. *Cereb. Cortex* 20, 2333–2347.
- Walker, C.-D., Bath, K. G., Joels, M., Korosi, A., Larauche, M., Lucassen, P. J., et al. (2017). Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential. *Stress* 20, 421–448.
- Walker, F. R., Nilsson, M., and Jones, K. (2013). Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr. Drug Targets* 14, 1262–1276.
- Wall, V. L., Fischer, E. K., and Bland, S. T. (2012). Isolation rearing attenuates social interaction-induced expression of immediate early gene protein products in the medial prefrontal cortex of male and female rats. *Physiol. Behav.* 107, 440–450.
- Waltz, J. A., and Gold, J. M. (2007). Probabilistic reversal learning impairments in schizophrenia: further evidence of orbitofrontal dysfunction. *Schizophr. Res.* 93, 296–303.
- Wang, Q., Li, M., Du, W., Shao, F., and Wang, W. (2015). The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behav. Brain Res.* 280, 16–23.
- Wang, R., Wang, W., Xu, J., Liu, D., Wu, H., Qin, X., et al. (2020). Jmjd3 is involved in the susceptibility to depression induced by maternal separation via enhancing the neuroinflammation in the prefrontal cortex and hippocampus of male rats. *Exp. Neurol.* 328, 113254.
- Weissgerber, T. L., Savic, M., Winham, S. J., Stanisavljevic, D., Garovic, V. D., and Milic, N. M. (2017). Data visualization, bar naked: A free tool for creating interactive graphics. *J. Biol. Chem.* 292, 20592–20598.
- Wenk, G. L. (2001). Assessment of spatial memory using the T maze. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 8, Unit 8.5B.
- Whissell, P. D., Cajanding, J. D., Fogel, N., and Kim, J. C. (2015). Comparative density of CCK- and PV-GABA cells within the cortex and hippocampus. *Front. Neuroanat.* 9, 124.
- Willing, J., and Juraska, J. M. (2015). The timing of neuronal loss across adolescence in the medial prefrontal cortex of male and female rats. *Neuroscience* 301, 268–275.
- Wohleb, E. S., Fenn, A. M., Pacent, A. M., Powell, N. D., Sheridan, J. F., and Godbout, J. P. (2012). Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1491–1505.
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., and Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of

Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* 36, 605–613.

- Xia, L., Xu, P., Yang, Z., Gu, R., and Zhang, D. (2021). Impaired probabilistic reversal learning in anxiety: Evidence from behavioral and ERP findings. *NeuroImage. Clin.* 31, 102751.
- Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J. L., and Anderson, S. A. (2004). Origins of cortical interneuron subtypes. *J. Neurosci.* 24, 2612–2622.
- Xue, X., Shao, S., Wang, W., and Shao, F. (2013). Maternal separation induces alterations in reversal learning and brain-derived neurotrophic factor expression in adult rats. *Neuropsychobiology* 68, 243–249.
- Yamada, M. K., Nakanishi, K., Ohba, S., Nakamura, T., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., et al. (2002). Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22, 7580–7585.
- Yang, Z., Wu, G., Liu, M., Sun, X., Xu, Q., Zhang, C., et al. (2021). Dysfunction of Orbitofrontal GABAergic Interneurons Leads to Impaired Reversal Learning in a Mouse Model of Obsessive-Compulsive Disorder. *Curr. Biol.* 31, 381-393.e4.
- Ye, Y., Yao, S., Wang, R., Fang, Z., Zhong, K., Nie, L., et al. (2019). PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway regulates behaviors in adolescent female rats following with neonatal maternal deprivation and chronic mild stress. *Behav. Brain Res.* 362, 199–207.
- Young, J. C., and Widom, C. S. (2014). Long-term effects of child abuse and neglect on emotion processing in adulthood. *Child Abuse Negl.* 38, 1369–1381.
- Yu, H., Guo, Y., Zhao, Y., Zhou, F., Zhao, K., Li, M., et al. (2019). Both insufficient and excessive glucocorticoid receptor-mediated signaling impair neuronal migration. *J. Endocrinol.* 242, 103–114.
- Zamberletti, E., Prini, P., Speziali, S., Gabaglio, M., Solinas, M., Parolaro, D., et al. (2012). Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience* 204, 245–257.
- Zhang, L. X., Levine, S., Dent, G., Zhan, Y., Xing, G., Okimoto, D., et al. (2002). Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 133, 1–11.
- Zhou, Y., and Danbolt, N. C. (2013). GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4, 165.
- Zhu, C., Kwok, N. T.-K., Chan, T. C.-W., Chan, G. H.-K., and So, S. H.-W. (2020). Inflexibility in Reasoning: Comparisons of Cognitive Flexibility, Explanatory Flexibility, and Belief Flexibility Between Schizophrenia and Major Depressive Disorder. *Front. psychiatry* 11, 609569.

Biografija

Dr Joko Poleksić rođen je 18. septembra 1989. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 23. septembra 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,57. Tokom studiranja, dr Poleksić je bio angažovan kao demonstrator na predmetu Anatomija.

Od januara 2016. godine zaposlen je na Institutu za anatomiju „Niko Miljanić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao suradnik u nastavi, a od februara 2018. godine izabran je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Anatomija. Od 2018. godine je saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj pod brojem III41020 „Morfološke promene u mozgu kod osoba sa transseksualizmom, drugim poremećajima polnog identiteta i razvojnih psihijatrijskih poremećaja. Tokom 2017. i 2018. godine boravio je na naučnom usavršavanju na *National and Kapodistrian University of Athens*. Tokom 2020. godine usavršavao se na *Institute of Neuroscience and Medicine, Forschungszentrum Juelich*.

Autor je više naučno istraživačkih radova od kojih je 4 publikovano u časopisima koji su sa JCR liste. Takođe, autor je više poglavlja u udžbenicima, kao i brojnih saopštenja sa naučnih skupova.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јоко Полексић

Број индекса 2016/5003

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Морфолошке, биохемијске и бихејвиоралне промене у медијалном префронталном и орбитофронталном кортексу мозга пацова условљене матерналном депривацијом

- 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, 15.7.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јоко Полексић

Број индекса 2016/5003

Студијски програм Неуронауке

Наслов рада Морфолошке, биохемијске и бихејвиоралне промене у медијалном префронталном и орбитофронталном кортексу мозга пацова условљене матерналном депривацијом

Ментор проф. др Милан Аксић

Коментор проф. др Бранка Марковић

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, 15.7.2022.

Изјава о коришћењу

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

Морфолошке, биохемијске и бихејвиоралне промене у медијалном префронталном и орбитофронталном кортексу мозга пацова условљене матерналном депривацијом

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, 15.7.2022.
