

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Bojana M. Rankov Petrović

**PRENATALNA HIPERANDROGENIZACIJA ŽENKI
PACOVA TESTOSTERON UNDEKANOATOM:
KOGNITIVNE, ELEKTROENCEFALOGRAFSKE I
METABOLIČKE PROMENE**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Bojana M. Rankov Petrović

**PRENATAL ANDROGENIZATION OF FEMALE RATS WITH
TESTOSTERONE UNDECANOATE: COGNITIVE,
ELECTROENCEPHALOGRAPHIC I METABOLIC
CHANGES**

doctoral dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR doktorske disertacije je Prof. Dr ALEKSANDRA RAŠIĆ MARKOVIĆ, vanredni profesor na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR doktorske disertacije je Prof. Dr ĐURO MACUT, redovni profesor na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog Centra Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. Prof. dr OLIVERA STANOJLOVIĆ, predsednik, redovni profesor na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr NELA PUŠKAŠ, vanredni profesor na Institutu za histologiju i embriologiju “Aleksandar Đ. Kostić”, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr DRAGAN HRNČIĆ, docent na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. dr DANIJELA VOJNOVIĆ-MILUTINOVIĆ, viši naučni saradnik na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beograd
5. Prof. dr SONJA SMILJIĆ, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

Datum odbrane:

Ova doktorska teza je realizovana u:

- *Neurofiziološkoj laboratoriji Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Olivera Stanojlović,*
- *Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Nataše Petronijević,*
- *Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Tatjane Simić,*
- *Laboratoriji Instituta za histologiju i embriologiju “Aleksandar Đ. Kostić” Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Nele Puškaš.*

Doktorska teza je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br 175032 “Razvoj animalnih modela epilepsije i testiranje konvulzivnih i antikonvulzivnih supstanci”, čiji je rukovodilac Prof. dr Olivera Stanojlović.

Poštovanje i zahvalnost prema mojim profesorkama, koje su me mentorskim radom pratile na putu nastajanja doktorata, ogromno je. Na mudrosti i strpljenju kojim su mi osvetlile put i dale mi snagu, beskrajno sam zahvalna.

Porodici, na ljubavi i požrtvovanju.

Sari

PRENATALNA HIPERANDROGENIZACIJA ŽENKI PACOVA TESTOSTERON UNDEKANOATOM: KOGNITIVNE, ELEKTROENCEFALOGRAFSKE I METABOLIČKE PROMENE

Rezime

Razvoj ljudskog mozga podrazumeva visoko orkestriranu sekvencu događaja, koja je strogo kontrolisana kompleksnim odnosom različitih ćelijskih tipova kako u vremenu, tako i u prostoru. Započinje tokom embrionalnog perioda i do detinjstva prolazi kroz više kritičnih faza. Efekti uticaja gonadalnih hormona tokom moždanog razvoja oslikavaju se permanentnim strukturnim razlikama među polovima, a poremećaj fine homeostaze može uzrokovati pojavu psihijatrijskih i neuroloških poremećaja u odraslom dobu. Visok nivo androgena tokom gestacije (porekla majke ili fetusa), predstavlja prenatalni milje koji indukuje kardiovaskularne, metaboličke i druge bolesti u odraslom dobu. Prenatalno „programiranje“ ili modulacija prenatalnih uslova tokom „kritičnog perioda“ razvoja je preduslov za različite morfo-funkcionalne promene organskih sistema, posebno CNSa. Žene sa sindromom policističnih jajnika (PCOS) pokazuju visok nivo cirkulatornih androgena i tokom trudnoće. Egzogenom androgenizacijom ženki pacova u različitim periodima gestacije razvijeni su modeli policističnih jajnika kod potomaka. Mala težina na rođenju, povećanje telesne težine u adolescentnom periodu, povećanje visceralnog i subkutanog masnog tkiva, poremećen lipidni profil, insulinska rezistencija, poremećaj estrusnog ciklusa, predstavljaju najprominentnije morfološke i metaboličke karakteristike PCOS poremećaja. Razumevanje efekata prenatalne hiperandrogenemije veoma je važno jer predstavlja jednu od najprominentnijih karakteristika PCOSa, čija je prevalenca kod žena reproduktivnog doba oko ~15%.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj kasne prenatalne androgenizacije testosteron undekanoatom na: antropometrijske karakteristike, karakteristike reproduktivnog fenotipa, metaboličke karakteristike, i parametre oksidativnog stresa; ponašanje i bolnu osetljivost; bihevioralne i EEG karakteristike epilepsija izazvanih DL homocistein tiolaktonom i zastupljenost pojedinih ćelija i moždanog neurotrofnog faktora u korteksu i hipokampusu kod adultnih ženskih potomaka.

U eksperimentu su korišćene ženke Wistar albino pacova. U cilju ispitivanja efekata prenatalne androgenizacije 20. dana gestacije eksperimentalnoj grupi gravidnih ženki je subkutno administriran komercijalni depo preparat testosteron undekanoata (100mg/kg, s.c.), dok je kontrolnoj grupi majki s.c. administrirano ricinusovo ulje. Drugog postnatalnog dana prebrojan je broj potomaka oba legla, a 21. postnatalnog dana izdvojeni su samo ženski potomci eksperimentalne i kontrolne grupe koji su ušli u dalji tok eksperimenta. U daljem toku eksperimenta, merena je telesna masa i unos hrane a u cilju određivanja karakteristika reproduktivnog fenotipa utvrđeno je: vreme vaginalnog otvaranja, anogenitalna distanca, i karakteristike estrusnog ciklusa. Histomorfološka analiza jajnika izvršena je na preparatima obojenim hematoksilin-eozinom. U cilju određivanja metaboličkih parametara u periodu od 60.-70. dana starosti izmerene su koncentracije glikoze i triglicerida, izveden je intraperitonealni test tolerancije na glikozu i izmerene su koncentracije testosterona, estradiola, progesterona i kortikosterona u serumima pomoću komercijalnih ELISA eseja. Parametri oksidativnog stresa određeni su u korteksu i hipokampusu metodom spektrofotometrije. Za procenu anksioznog ponašanja korišćeni su test uzdignutog krstastog lavirinta i otvoreno polje, dok je bolna osetljivosti ispitivana pomoću električnog von Frey esteziometra. U cilju analize konvulzivnog ponašanja životinjama je 75-85. dana starosti, administriran D,L-homocistein tiolakton (5,5 mmol/kg, i.p.) i posmatrani su incidencija, latencija, broj i intenzitet konvulzivnih napada. Nivo proBDNF i BDNF proteina određen je Western blot tehnikom u dorzolateralnom frontalnom

korteksu i hipokampusu. Imunohistohemijskim bojenjem učinjena je kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija: imunoreaktivnih ćelija u proliferaciji (Ki67), neurona (NeuN), interneurona (PV, NPY) i glije (GFAP) u hipokampusima ispitivanih životinja.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da prenatalna androgenizacija ženki pacova u 20. danu gestacije smanjuje telesnu masu na rođenju, ali povećava telesnu masu u adultnom dobu. Prenatalni tretman testosteronom uticao je na smanjeno postnatalno preživljavanje potomaka, ali nije uticao na reproduktivnih fenotip i građu jajnika. Serumski nivo triglicerida bio je značajno veći, dok je intraperitonealni test tolerancije na glikozu pokazao značajno više vrednosti u eksperimentalnoj grup životinja. Prenatalna androgenizacija je smanjila koncentraciju serumskog kortikosterona, ali nije uticala na koncentracije testosterona, estradiola i progesterona u serumu. Antioksidativni enzimi superoksid-dizmutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GPx) bili su značajno povišeni u obe ispitivane strukture u eksperimentalnoj grupi životinja. Kvantifikacijom parametara ponašanja u uzdignutom plus lavirintu i otovrenom polju uočeno je anksioznosti slično ponašanje kod životinja eksperimentalne grupe. Primijenjeni testosteron u prenatalnom periodu nije imao uticaj na bolnu osetljivost kod odraslih ženskih potomaka. Prenatalni tretman testosteronom je ispoljio prokonvulzivno i proepileptičko dejstvo na modelu homocisteinske epilepsije kod adultnih ženskih potomaka. Ekspresija prekursora (eng. brain derived neurotrophic factor, proBDNF) i zrelog moždanog neurotrofičkog faktora rasta (mBDNF) bila je povećana u hipokampusu, dok je u korteksu bila povećana ekspresija mBDNF. Prenatalna androgenizacije je uticala na smanjenje markera proliferacije (Ki67) u dentatnom girusu, NPY i PV imunoreaktivnih ćelija u CA1 regiji hipokampusa u poređenju sa kontrolom. Ekspresija NeuN te broj neurona bili su značajno veća u CA1 regiji hipokampusa u poređenju sa kontrolom. Prenatalna androgenizacije nije uticala na ekspresiju GFAP + ćelija dentatnog girusa hipokampusa.

Na osnovu iznetih rezultata možemo da zaključimo da kasna prenatalna androgenizacija ne izaziva promene u reproduktivnom fenotipu i građi jajnika. Adultni ženski potomci su ispoljili diskretne metaboličke promene u vidu povećanja koncentracije serumskih triglicerida i odgovora na intreritonealnu administraciju glikoze, ali nisu uočene značajne promene u serumskoj koncentraciji testosterona, estradiola i progesterona. Kasna prenatalna androgenizacije je ispoljila proanksiozno i prokonvulzivno dejstvo na adultne ženske potomke. Povećano anksiozno ponašanje i prokonvulzivni efekat je u korelaciji sa smanjenim brojem GABAergičkih inhibitornih interneurona (NPY i PV) u hipokampusu. Povećan broj neurona (NeuN) u hipokampusu mogao bi dati objašnjenje prokonvulzivnog dejstva prenatalnog tretmana testosteronom. Aktivna proliferativna aktivnost bila je snižena dok je nivo moždanih neurotrofičkih faktora bio viši, potencijalno kao kompenzatorni mehanizam u korteksu i hipokampusu.

Ključne reči: prenatalna androgenizacija, ženski potomci pacova, metabolički sindrom, anksioznost, bol, homocistein tiolakton, EEG, neurogeneza, oksidativni stress.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Neuronauke

PRENATAL ANDROGENIZATION OF FEMALE RATS WITH TESTOSTERONE UNDECANOATE: COGNITIVE, ELECTROENCEPHALOGRAPHIC I METABOLIC CHANGES

Abstract

Human brain development involves a highly orchestrated sequence of events, which is strictly controlled by complex interference between different cell types, which is time and region specific. It begins during the embryonic period and goes through several critical stages until childhood. The effects of gonadal hormones during brain development are reflected by permanent structural differences between the sexes, and disruption of fine homeostasis can cause the genesis of psychiatric and neurological disorders in adulthood. High levels of androgens during gestation (maternal or fetal origin), forms prenatal condition which can induce cardiovascular, metabolic and other diseases in adulthood. Prenatal "programming" or modulation of prenatal conditions during the "critical periods" of development is a prerequisite for various morpho-functional changes in organ systems. Women with polycystic ovary syndrome (PCOS) have high levels of circulatory androgens during pregnancy. By exogenous androgenization of female rats in different gestational periods model of polycystic ovaries have been developed in the offspring. Low birth weight, weight gain in adolescence, increase in visceral and subcutaneous adipose tissue, impaired lipid profile, insulin resistance, estrous cycle disorder, represent the most prominent morphological and metabolic characteristics of the PCOS disorder. Understanding the effects of prenatal hyperandrogenemia is very important as it represents one of the most prominent features of PCOS, with a prevalence of about ~15% in women of reproductive age.

The aims of this dissertation were to examine the effects of late prenatal androgenization with testosterone undecanoate on: anthropometric characteristics, reproductive phenotype characteristics, ovarian structure, metabolic characteristics, serum steroid hormone concentration, oxidative stress parameters; anxiety-like behavior, pain sensitivity, behavioral and EEG characteristics of epilepsies induced by DL homocysteine thiolactone; expression of markers of neuro, gliogenesis and inhibitory interneurons, in adult female offspring

Female *Wistar* albino rats were used in the experiment. In order to examine the effects of prenatal androgenization on the 20th day of gestation, depot preparation of testosterone undecanoate (100mg / kg) was administered subcutaneously to the experimental group of pregnant females, while control group of mothers was administered castor oil (s.c.). On the second postnatal day, the number of offspring of both litters was counted, and on the 21st postnatal day only female offspring of the experimental and control group entered the further course of the experiment. Through the time of the experiment, body weight and food intake were measured and in order to determine the characteristics of the reproductive phenotype, the time of vaginal opening, anogenital distance, and the characteristics of the estrous cycle were determined. Ovarian histomorphological analysis was performed on haematoxylin-eosin stained preparations. In order to determine metabolic parameters, glucose and triglyceride concentrations were measured, an intraperitoneal glyucose tolerance test was performed in the period from 60-70. days of age. Testosterone, estradiol, progesterone, and corticosterone concentrations in sera were measured using commercial ELISA assays. Oxidative stress parameters were determined in the cortex and hippocampus by spectrophotometry. An elevated plus maze test and open field were used to evaluate anxiety-like behavior, while pain sensitivity was examined using an electric von Frey estesiometer. In order to analyze convulsive behavior of animals, D, L-homocysteine thiolactone (5.5 mmol / kg, i.p.) was administered in 75-85. days old female offspring and incidence, latency, number and intensity of seizures were observed.

Western blot technique was used for assessment of precursor form of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) and mature brain-derived neurotrophic growth factor (mBDNF) in the dorsolateral frontal cortex and hippocampus. Immunohistochemical staining quantified immunoreactive cells: immunoreactive cells in proliferation (Ki67), neurons (NeuN), interneurons (PV, NPY) and glia (GFAP) in the hippocampus of the animals tested.

The results of this study showed that pre-natal androgenization of female rats on 20th day of gestation reduced body weight at birth but increased body weight in adulthood. Prenatal treatment with testosterone affected reduced postnatal progeny survival but did not affect reproductive phenotype and ovarian structure. Serum triglyceride levels were significantly higher, whereas the intraperitoneal glucose tolerance test showed significantly higher values in the experimental group of animals. Prenatal androgenization decreased serum corticosterone concentrations but did not affect serum testosterone, estradiol, and progesterone concentrations. The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were significantly elevated in both test structures in the experimental group of animals. By quantifying the behavioral parameters in the elevated plus maze and open field, anxiety-like behavior was observed in the animals of the experimental group. Testosterone administered in the prenatal period had no effect on pain sensitivity in adult female offspring. Prenatal treatment with testosterone exerted a pro-convulsive and proepileptic effect on a model of homocysteine epilepsy in adult female offspring. Expression of proBDNF and mBDNF were increased in the hippocampus, whereas mBDNF expression was increased in the cortex. Prenatal androgenization affected the reduction of proliferation markers (Ki67) in dentate gyrus, NPY, and PV immunoreactive cells in the CA1 region of the hippocampus compared with controls. NeuN expression and number of neurons were significantly higher in the CA1 region of the hippocampus compared to controls. Prenatal androgenization did not affect the expression of GFAP + cells of the dentate hippocampal gyrus.

Based on the presented results, we can conclude that late prenatal androgenization does not cause changes in the reproductive phenotype and ovarian structure. Adult female offspring exhibited discrete metabolic changes in the form of an increase in serum triglyceride concentration and disturbed responses to intraperitoneal glucose administration, but no significant changes in serum testosterone, estradiol, and progesterone concentrations were observed. Late prenatal androgenization has shown a pro-anxiogenic and pro-convulsive effect on adult female offspring. Increased anxiety behavior and pro-convulsive effect are correlated with decreased numbers of GABAergic inhibitory interneurons (NPY and PV) in the hippocampus. The increased number of neurons (NeuN) in the hippocampus could explain the pro-convulsive effect of prenatal testosterone treatment. Active proliferative activity was reduced while the level of brain neurotrophic factors was higher, potentially as a compensatory mechanism in the cortex and hippocampus.

Key words: prenatal androgenisation, female rats, metabolic syndrome, anxiety, pain, homocysteine thiolactone, EEG, neurogenesis, oxidative stress.

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Neurosciences

SADRŽAJ

1. UVOD	
1.1. Prenatalni razvoj centralnog nervnog Sistema.....	1
1.2. Sinteza polnih steroida i neurosteroida.....	3
1.3. Polni dimorfizam centralnog nervnog sistema.....	8
1.4. Endokrinopatija reproduktivnog doba: sindrom policističnih jajnika.....	10
1.5. Polni hormoni i anksioznost.....	10
1.6. Uticaj polnih hormona na nociocepciju.....	12
1.7. Polni hormoni i Epilepsija.....	13
1.8. Moždani neurotrofinski faktor rasta.....	14
1.9. Polni hormoni i neurogeneza.....	17
1.10. Oksidativni stres.....	18
2. CILJEVI.....	22
3. MATERIJAL I METODE.....	23
3.1. Eksperimentalne životinje.....	23
3.2. Eksperimentalni protocol.....	23
3.3. Eksperimentalne metode.....	24
3.3.1. Telesna masa i unos hrane.....	24
3.3.2. Karakteristike reproduktivnog fenotipa.....	24
3.3.2.1. <i>Karakteristike legal</i>	24
3.3.2.2. <i>Parametri maskulinizacije</i>	24
3.3.3.3. <i>Karakteristike estrusnog ciklusa</i>	24
3.3.3.4. <i>Histološka analiza jajnika</i>	25
3.3.3. Metabolički parameter.....	25
3.3.3.1. <i>Serumski nivo glikože i triglicerida</i>	25
3.3.3.2. <i>Intraperitonealni test tolerancije na glikožu (eng. IPTTG)</i>	26
3.3.4. Određivanje koncentracije hormona u serumu.....	26
3.3.5. Oksidativni stres.....	26
3.3.6. Bihevioralni testovi.....	27
3.3.6.1. <i>Uzdignuti krstasti lavirint</i>	27
3.3.6.2. <i>Otvoreno polje</i>	28
3.3.7. Test bolne osetljivosti.....	29
3.3.8. Bihevioralne i elektroencefalografske osobine konvulzivnih napada.....	30
3.3.8.1. <i>Bihevioralne karakteristike konvulzivnih napada</i>	30
3.3.8.2. <i>Elektroencefalografsko registrovanje</i>	31
3.3.9. <i>Western blot</i> : proBDNF i BDNF.....	32
3.3.10. Imunohistohemijska bojenja i kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija mozga.....	32
3.4. Korišćene supstance.....	35
3.5. Statistička analiza.....	35
4. REZULTATI.....	36
4.1. Uticaj prenatalne androgenizacije na antropometrijske karakteristike.....	37
4.2. Uticaj prenatalne androgenizacije na karakteristike reproduktivnog fenotipa.....	38
4.2.1. Karakteristike legla.....	38
4.2.2. Parametri maskulinizacije.....	38
4.2.3. Estrusni ciklus.....	39
4.2.4. Uticaj prenatalne androgenizacije na histološke karakteristike jajnika.....	41

4.3. Uticaj prenatalne androgenizacije na metaboličke parametre	41
4.3.1. Serumski nivo glikoze i triglicerida.....	41
4.3.2. Intraperitonealni test tolerancije na glikozu (IPGTT).....	42
4.4. Uticaj prenatalne androgenizacije na koncentraciju hormona u serumu.....	43
4.5. Uticaj prenatalne androgenizacije na oksidativni stress.....	45
4.6. Uticaj prenatalne androgenizacije na parametre anksioznog ponašanja.....	46
4.6.1. Ponašanje u uzdignutom plus lavirintu.....	46
4.6.2. Ponašanje u otvorenom polju.....	47
4.7. Uticaj prenatalne androgenizacije na bolnu osetljivost.....	49
4.8. Uticaj prenatalne androgenizacije na bihevioralne i elektroencefalografske osobine konvulzivnih napada	50
4.8.1. Parametri konvulzivnog ponašanja.....	50
4.8.2. EEG nalaz.....	52
4.9. Uticaj prenatalne androgenizacije na nivo proBDNF i BDNF protein	55
4.10. Uticaj prenatalne androgenizacije na na ekspresiju imunoreaktivnih ćelija hipokampusu..	56
5. DISKUSIJA.....	65
6. ZAKLJUČCI.....	73
7. LITERATURA.....	75

1. UVOD

1.1. Prenatalni razvoj centralnog nervnog sistema

Ljudski mozak je bezkompromisno najsloženiji biološki sistem u prirodi. Mozak odraslog čoveka sačinjava oko 100 biliona neurona i verovatno isto toliko drugih vrsta neneuronskih ćelija (Azevedo i sar., 2009; Stiles i sar., 2015), koje formiraju trilione veza i stoje u osnovi ljudskih misli, emocija, aktivnosti i ponašanja (Vasung i sar., 2019). Fundamentale teme moderne neuronauke tiču se pitanja kako ovako kompleksan sistem nastaje, da li se razvoj nastavlja i nakon rođenja i kakve su posledice poremećaja istog? Pored veoma značajnog napretka radioloških tehnika prikaza nervnih struktura, histološke analize humanog mozga u razvoju i dalje su nezamenljiv metod karakterizacije moždanih struktura i identifikacije neurogenih procesa koji se dešavaju tokom prenatalnog i postnatalnog perioda razvoja (O’Rahilly i Müller, 2006; Paredes i sar., 2016). Zahvaljujući preciznosti komparativne neuroanatomije odgovori i/ili pretpostavke mnogih odgovora neurorazvoja dobijeni su zahvaljujući istraživanjima na životinjama (Semple i sar., 2013).

Tokom prve dve gestacione nedelje ljudski embrion se razvija u veoma jednostavnu strukturu ovalnog oblika, sačinjenu iz dva sloja ćelija: sloja epiblasta i hipoblasta (Stiles, 2008; Stiles i Jernigan, 2010). Tokom treće gestacione nedelje dolazi do procesa gastrulacije kada se embrion formira u troslojnu strukturu (Stiles, 2008; Stiles i Jernigan, 2010). Gornji sloj ćelija (epiblast) se raslojava u tri sloja stem ćelija koje predstavljaju izvor endodermalnih, mezodermalnih i ektodermalnih struktura embriona, tj fetusa (Stiles, 2008; Stiles i Jernigan, 2010). Jedan deo ćelija ektoderma formiraće strukture kože, kose, noktiju i znojnih žlezda, dok će se drugi sloj diferencirati u neuroektoderm. Stem ćelije neuroektoderma predstavljaju neuralne progenitorske ćelije od kojih će se formirati svi delovi centralnog (CNS) i perifernog nervnog sistema (Bayer i Altman, 2005). Kompleksno genetsko signaliziranje među ćelijama stvorene notohorde i paraksijalnog mezenhima omogućava diferencijaciju naležućeg sloja ćelija epiderma u neuralne progenitorske ćelije i formiranje nervne ploče (Zembrzycki i sar., 2007). Molekularna mikroklima među ćelijama nervne ploče indukuje potom pravilnu rostrokaudalnu migraciju primitivnom trakom i formiranje neuralne cevi zadebljanjem lateralnih ivica ploče, uzdizanjem i spajanjem, u periodu između 20 - 27. gestacionog dana (Stiles, 2008; Stiles i Jernigan, 2010). Neuralne progenitorske ćelije ostaju u unutrašnjosti neuralne cevi, iz koje će se razviti ventrikularni sistem mozga i centralni kanal kičmene moždine (Nadarajah i Parnavelas, 2002). Prilikom neuralne tubulacije dolazi do segmentacije i formiranja tri primarne moždane vezikule: proencefalona, mezencefalona i rombencefalona (Stiles, 2008; Ishikawa i sar., 2012). Proencefalon će se dalje podeliti na telencefalon i diencefalon, mezencefalon ostaje intaktan i iz njega će se razviti srednji mozak, a rombencefalon se deli na metencefalon i mijelencefalon (Ishikawa i sar., 2012). Pomenute strukture predstavljaju osnov budućih kompleksnih moždanih struktura te njihovo formiranje predstavlja jednu od kritičnih tačaka prenatalnog razvoja (Gilbert, 2000). Iz telencefalona će se razviti moždane hemisfere i moždana kora, dok će se iz diencefaličnog mehurića razviti talamus, hipotalamus, subtalamus, epitalamus i globus palidus. Iz delova rombencefalona (metencefalon i mijelencefalon) formiraće se pons, mali mozak i produžena moždina (Stiles i Jernigan, 2010).

Embrionalno oblikovanje svih moždanih regiona, počevši od prednjeg mozga do kičmene moždine, završava se do 8. gestacione nedelje, kada je već uočena primitivna forma senzomotoričkih regiona neokorteksa (Bishop i sar., 2002), diferencirani su glavni odeljci diencefalona i srednjeg mozga (Nakamura i sar., 2002; Kiecker i Lumsden, 2004) i uočava se segmentna organizacija zadnjeg mozga i kičmene moždine (Lumsden i Keynes, 1989; Gavalas, 2003). Nakon osme nedelje pa sve do završetka gestacije mozak prolazi kroz neverovatnu strukturnu diferencijaciju u cilju visoke funkcionalne specijalizacije pojedinih regiona (Kostovic i sar., 2006). Krajem 8. gestacijske nedelje formira se kortikalna ploča koja se razvija do 15. gestacijske nedelje kada u fetalnom telencefalonu uočavamo šest privremenih

zona moždane kore: ventrikularna zona, subventrikularna zona, intermedijarna zona, „subplate“ zona, kortikalna ploča i marginalna zona (Silbereis i sar., 2016). Svi neuroni nastaju u ventrikularnoj i subventrikularnoj zoni gde su smeštene neuralne progenitorske ćelije – neuroblasti (Bystron i sar., 2008; Zecevic i sar., 2005). Do 42. gestacijskog dana neuronalna progenitorska proliferacija je simetrična: jedna neuronalna progenitorska ćelija se deli na dve ćerke ćelije sa istim osobinama i mogućnošću dalje proliferacije (Silbereis i sar., 2016). Nakon toga, proliferacija postaje asimetrična, te se prilikom deobe formira jedna progenitorska ćelija i jedan neuron koji nije sposoban za dalju mitozu (Bystron i sar., 2008). Iz ventrikularne zone, nezreli postmitotski neuroni migriraju ka površinskim slojevima moždane kore prateći matricu radijalne glijne (Duque i sar., 2016) te na taj način formirajući budući korteks (Zecevic, 2004). Spacio-temporalno specifična proliferacija i migracija neurona subventrikularne zone formira subkortikalna jedra i ostale delove sive mase budućeg mozga i kičmene moždine (Silbereis i sar., 2016; Duque i sar., 2016). Postoje dve vrste migracije, radijalna i transverzalna.

Radijalna migracija se odvija uz pomoć radijalnih glijalnih ćelija koje se poput užadi pružaju od ventrikularne zone do površine mozga, a ovakva migracija obezbeđuje migraciju ekscitacijskih neurona ili njihovih prekursora (Duque i sar., 2016). Radijalna migracija neurona obezbeđuje slojevitou građu korteksa formirajući II – VI sloja i to tako da oni koji su prvi počeli da migriraju naseljavaju najdublji sloj, dok mlađi neuroni migriraju prema površini (Van Essen, 2018). Tokom formiranja korteksa uočeno je da se u migratornim trakama nalazi više različitih tipova postmitotskih neurona kao i intermedijernih progenitorskih ćelija (de Azevedo i sar., 2003).

Tangencionalnom migracijom unipolarnih, nezrelih GABA-ergičkih neurona se iz proliferativnih zona, tzv. ganglijskog brežuljka, paralelno s pijalnom površinom, formiraju delovi kore velikog mozga (Racic, 1988). Na ovaj način i svi hipokampalni GABA-ergički interneuroni doalaze do svojih konačnih lokacija. Iako malobrojni, GABA-ergički neuroni imaju ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti neuronske mreže (Skaggs i sar., 2007). Obzirom da se tangencijalna migracija odvija duže, to dovodi do produženog perioda ranjivosti tih neurona. Poremećaji migracije se događaju krajem prvog i tokom drugog trimestra trudnoće, a rani klinički znak su epileptički napadi (Kostović i Judas, 2007). Interesantan fenomen opisan sam o kod ljudi, je da i radijalna glijna može biti neuronski prekursor i da učestvuje u formiranju neokorteksa (Hansen i sar., 2010). Prilikom migracija radijalne glijne van ventrikularne zone u parenhim, bazalni ćelijski nastavak ostaje vezan za ventrikularnu površinu (Hansen i sar., 2010; Mo Z. i sar., 2007). Nakon pozicioniranja u parenhimu radijalna glijna proliferiše i potom migrira nazad ka ventrikularnoj zoni, pre procesa diferencijacije (Mo i sar., 2007). Tokom srednjeg perioda gestacije ćelije radijalne glijne se diferencijuju u GFAP+ astrocite (Marin i Rubenstein, 2003), dok neke od njih zadržavaju neurogeni potencijal (Mo i sar., 2007).

Do 27. gestacione nedelje, ventrikularna zona biva redukovana na jednoslojan epitel čije ćelije ne poseduju dalju mitotsku aktivnost (Bystron i sar., 2008). Kada je neuronska migracija skoro završena, kortikalni neuroni započinju stvaranje konekcija sa ostalim neuronima. Tokom preterminalnog perioda, između 26. i 36. gestacione nedelje, kortikalna ploča se uobličava u cerebralni korteks sa svojom klasičnom šestoslojnom strukturom (Bystron i sar., 2008).

Tek u 3. godini života citoarhitektonika neokortikalnih zona dostiže zrelost (Silbereis i sar., 2016). Ovaj proces podrazumeva rast neuronskih dendrita i aksona, stvaranje i rast astrocita, oligodendrocita i ćelija mikroglije, formiranje sinapsi, kao i razvoj vaskularnog sistema (Judas i Cepanec, 2007). Posrednici daljeg kortikalnog i subkortikalnog rasta su postanatalna sinaptogeneza, grananje spina i mijelinizacija, (Raznahan i sar., 2012). Postmortem studije mijelinizacije ljudskog mozga našle su da ona počinje prenatalno i da je prisutna u mnogim regionima prilikom rođenja, posebno primarnim senzornim i motornim putevima, uključujući optičku radijaciju i unutrašnju kapsulu (Hasegawa i sar., 1992). Tehnike neuroimidžinga rasvetlele su trend razvojne mijelinizacije koja postanatalno prati generalni princip: senzorno pre motornog, projekcione regije pre asocijativnih i zadnje regije pre prednjih (Kinney i sar., 1988). U neokorteksu, obrasci zrele mijelinizacije dosegnuti su tek u odrasloj dobi, ukazujući time na

produženo sazrevanje ovih delova mozga kod ljudi u poređenju sa ostalim primatima (Miller i sar., 2012). U humanom hipokampusu, mijelinizacija počinje u 20. nedelji gestacije i do 2. godine najveći broj regiona dostiže nivo adultne mijelinizacije (Abraham i sar., 2010; Arnold i Trojanowski, 1996). Ipak, neke regije kao što je hilus dentatnog girusa, nastavljaju mijelinizaciju kroz detinjstvo sve do odraslog doba (Benes i sar., 1994).

Sveukupni rast mozga veoma je izražen tokom prve godina života. Dve do tri nedelje po rođenju volumen mozga čini 35% adultnog volumena, duplira se potom do kraja prve i raste još dodatnih 15% u drugoj godini života, sve do prosečnih 80% veličine kod odrasle jedinke (Semple i sar., 2013; Stiles, 2008). Nakon 2. godine rast mozga biva usporen. Siva i bela masa imaju različite trajektorije rasta ubrzo po rođenju, te je uočen brz razvoj i rast volumena sive mase u poređenju sa belom čiji rast biva postepen (Stiles, 2008). Od rođenja do 1. godine, volume kortikalne sive mase se uveća za 108–149%, dok za isto vreme rast bele mase biva oko 11%; od 1. do 2. godine života, siva masa raste 14–19%, dok bela masa raste za 19% (i Capanec, 2007). Postnatalni rast globalnog volumena tkiva i subkortikalnih struktura najbrži je u prva tri meseca po rođenju. Nakon 2. godine, rast sive mase biva minimalan u apsolutnom vrednostima tokom detinjstva i adolescencije, dok volumen bele mase konstantno raste do odraslog doba, dostižući svoj pik oko 30. godine života (Semple i sar., 2013; Sanai i sar., 2011).

1.2. Sinteza polnih steroida i neurosteroida

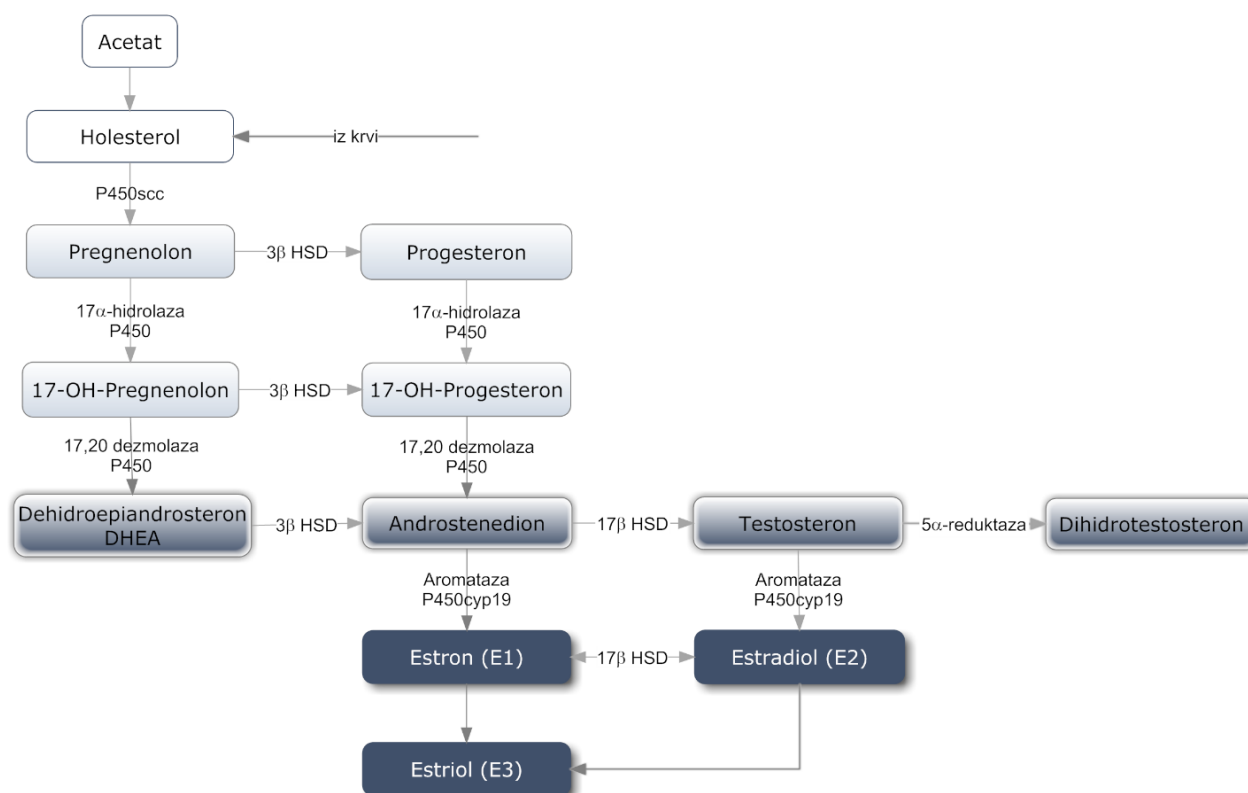
Polne razlike u ponašanju mogu se uočiti kod svih životinjskih vrsta koje se razmnožavaju, i posledica su finih razlika u građi i funkciji CNSa. Hormonski milje utiče na strukturu i organizaciju mozga u razvoju (McCarthy i Konkle, 2005). Genetski pol zavisi od prisustva *Sry* gena na Y hromozomu i on uslovljava razvoj gonada koje sekretuju polne steroide. Kod sisara se polna diferencijacija mozga u najvećoj meri odvija pod kontrolom polnih steroida koji se sintetišu u gonadama (Levitt, 2013). Polni steroidi su snažni neuroregulatori koji deluju na subcelularnom i celularnom nivou, kao i neuronskim mrežama. Oni regulišu sintezu neurotransmitera i neurosteroida, utiču na neuroplastičnost, neuroprotekciju, aktivnost i sinhronizaciju neuronskih mreža (Carver i Reddy, 2013).

Steroidogeneza predstavlja sintezu steroidnih hormona i odvija se u jajnicima, testisima, nadbubrežnim žlezdama i posteljici. Prekursor za sintezu steroidnih hormona je holesterol i on može nastati endocitozom lipoproteina male gustine (*eng.* low density lipoproteins, LDL), *de novo* sintezom iz holesterol estra deponovanih u lipidnim kapljicama ili transportom lipoproteina velike gustine (*eng.* high density lipoproteins, HDL). U ovarijumima i testisima primarni izvor holesterola su lipoproteini. U ćeliji, holesterol se transportuje u mitohondrije pomoću molekulskog kompleksa koga čine: translokatorski protein 18 kDa (*TSPO*), steroidni akutni regulatorni protein (*StAR*), voltažno-zavisni jonski kanal (VDAC) i adenin nukleotidni transporterski protein (ANT). U mitohondrijama, holesterol se pretvara u pregnenolon pomoću citohroma P450 (*P450_{sc}*), enzima koji cepa bočni lanac. Pregnenolon se pod dejstvom 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaze (3 β -HSD) konvertuje u progesteron. Pregnenolon i progesteron su prekursori za sintezu svih drugih steroidnih hormona te je stoga progesteron od fundamentalnog značaja za održavanje homeostaze u sintezi steroidnih hormona. Sinteza steroidnih hormona iz pregnenolona se može odvijati na dva načina: u Δ_5 ili Δ_4 putu.

U **Δ_5 ili dihidroepiandrosteronskom putu** pregnenolon se pod dejstvom 17 α -hidroksilaze i C_{17/20} liaze, konvertuje najpre u 17OH-pregnenolon a zatim u dihidroepiandrosteron (DHEA). DHEA se zatim konvertuje u androstenedion a ovaj u testosteron delovanjem enzima 3 β -HSD i 17 β -HSDhidroksisteroid dehidrogenaze (17 β -HSD).

Progesteron je prva komponenta **Δ_4 puta**. Pod dejstvom 17 α -hidroksilaze progesteron se konvertuje u 17OH progesteron koji je prekursor androstenediona. Androstenedion se pod uticajem enzima 17 β -HSD može konvertovati u testosteron, ali je ovaj proces dvosmeran tj. testosteron se može

konvertovati ponovo u androstenedion (Slika1). Estradiol nastaje iz testosterona dejstvom aromataza ili iz androstenediona preko estrona. Glavni metabolit progesterona je 17α -hidroksiprogesteron koji se delovanjem 21-hidroksilaze može konvertovati najpre u 11-deoksikortizol, a zatim u kortizol (Miller i Auchus, 2011; Oettel i Mukhopadhyay., 2007). Testosteron može da podleže redukciji pod dejstvom 5α -reduktaze pri čemu nastaje dihidrotestosteron (DHT) ili može podleći aromatizaciji pri čemu nastaje estradiol. U ovarijumima, za steroidogenezu je neophodno kooperativno dejstvo teka i granuloza ćelija i koordinaciju između folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg (LH) hormona.



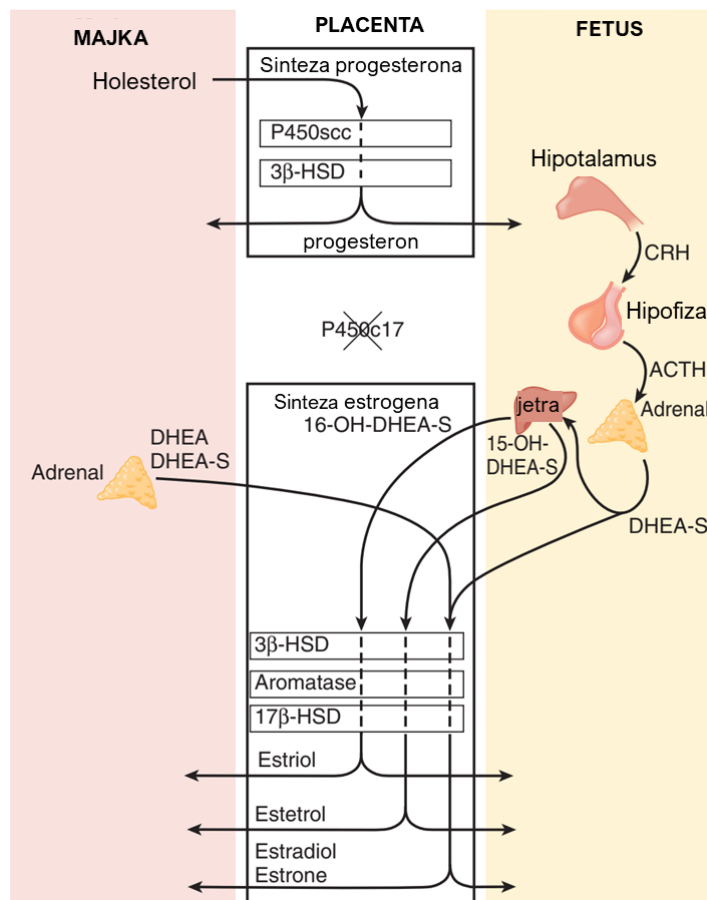
Slika 1.1. Sinteza steroidnih hormona.
(Preuzeto iz Rašić-Marković, 2013)

Tokom trudnoće, placenta vrši sintezu i metabolizam steroidnih hormona. Tokom prvih 7 nedelja, ključnu ulogu u održavanju trudnoće ima humani horionski gonadotropin (hCG) koga luče ćelije sinciotrofoblasta. hCG održava žuto telo koje sintetiše progesteron (i estrogen) koji je neophodan za održavanje trudnoće u ovom periodu. Nakon 7. nedelje placenta počinje da sintetiše progesteron, a oko 10. nedelje placenta postaje glavni izvor steroidnih hormona. Pored progesterone i estrogena, placenta produkuje i druge hormone: inhibin, gonadotropin oslobađajući hormon, kortikotropin oslobađajući hormon, tireotropin oslobađajući hormon, humani placentarni laktogen, placentarni hormone rasta i brojne druge.

Glavni prekursor u sintezi progesterona je holesterol koji nastaje iz LDL-a koji se u najvećoj meri preuzima iz krvotoka majke. Holesterol se konvertuje u progesteron pod dejstvom $P450_{scc}$ i 3β -HSD (Slika 1.2). Humana placenta ne poseduje 17α -hidroksilazu, niti C_{17-20} liazu, enzime neophodne za konverziju progesterona u 17OH progesteron. Pred termin porođaja sintetiše se oko 250 mg/dan

progesterona, od toga 75 mg odlazi u fetus gde se koristi za sintezu adrenalnih steroidnih hormona (Tal i sar., 2015).

Placentarni estrogene se sintetisu iz C19 steroida. Obzirom da humana placenta ne poseduje 17 α -hidroksilazu, niti C_{17/20} liazu, enzime koji su neophodni za *de novo* sintezu estrogena, glavni precursor za sintezu estrogena je DHEA-S koji se sintetise u fetalnim adrenalnim žlezdama (Slika 1.2).



Slika 1.2. Sinteza progesterona i estrogena u placenti.

P450 scc – citohrom P450; 3 β -HSD - 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza; CRH – kortikotropin oslobađajući hormon; ACTH – adenokortikotropni hormon; DHEA – dihidroepiandrosteron; DHEA-S – dihidroepiandrosteron sulfat; 15-OH-DHEA-S – 15 hidroksi dihidroepiandrosteron sulfat (Preuzeto iz Kuo i sar., 2016.)

U fetalnoj jetri i adrenalnoj žlezdi, DHEA-S podleže 16 α -hidroksilaciji i nastaje 16 α -hidroksi DHEA-S koji zatim placentarne sulfataze prevode u 16 α -hidroksi DHEA. DHEA se pod dejstvom 3 β -HSD konvertuje u androstenedion koji se zatim aromatizuje u estron. 17 β -HSD pretvara estron u estradiol. Koncentracija estriola u krvi majke reflektuje steroidogenu aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine fetusa. Sinteza estriola se povećava tokom gestacije i u 36. nedelji gestacije iznosi 35mg/24h. U jetri majke, estriol se konjuguje i nastaje estriol-sulfat i estriol-glukuronid koji se izlučuju urinom. Estetriol je još jedan placentarni estrogen koji nastaje 15 i 16 α -hidroksilacijom DHEA-S (Tal i sar., 2015). Placentarna sinteza estrogena je vrlo intenzivna i koncentracije estrogena u gravidnih žena su nekoliko puta veće od normalnih fizioloških vrednosti kod negravidnih žena. Smanjena koncentracija placentarnih estrogena ne dovodi do značajnijih poremećaja u fetalnom razvoju i dužini gestacije, izuzev u

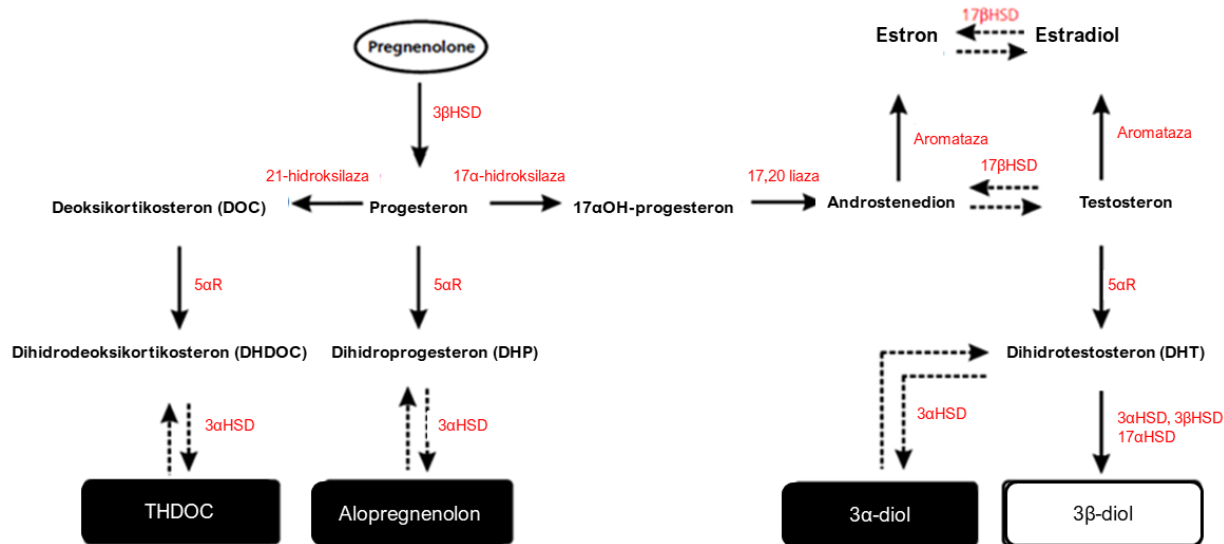
slučaju deficita placentarnih aromataza koji je praćen znacima virilizacije ženskih fetusa usled izloženosti većim koncentracijama androgena (Harada i sar., 1992).

Tokom većeg dela gestacije placenta eksprimira enzim 11β -OH dehidrogenazu tip 2 (11β -HSD-2) koja inaktivira kortizol i prevodi ga u kortizon. Inaktivacija kortizola se intenzivno odvija tokom kasne faze gestacije. Obzirom da su koncentracije kortizola u majke tri puta veće nego u fetusu, ova reakcija ima zadatak da spreči povećanje koncentracije kortizola u fetusu. Ovo je od velikog značaja jer izlaganje fetusa visokim koncentracijama kortizola narušava HPA osovinu i udružena je sa smanjenom težinom neonatusa i hipertenzijom (Pepe i sar., 1995). Sa druge strane, placenta primata ima sposobnost da sintetise kortizol iz kortizona, što se odigrava tokom rane faze i sredinom gestacije, kada fetus i fetalne adrenalne žlezde nisu u stanju samostalno da sintetisu kortizol (Pepe i sar., 1988). Smatra se da estrogen reguliše placentarni metabolizam kortizol-kortizon, putem ushodne regulacije 11β -HSD-2 koja se odvija tokom kasne gestacije. Za placentarnu sintezu estrogena neophodni su fetalni adrenalni androgeni prekursori koji nastaju prod dejstvom adrenokortikotropnog hormona (ACTH). Tokom rane gestacije kada je koncentracija estrogena niska, dominira konverzija kortizona u kortizol, dok tokom kasne gestacije sa povećanje koncentracije estrogena dominira inaktivacija kortizola i njegova konverzija u kortizon (Albrecht i Pepe., 1999).

Za razliku od humane placente koja ne poseduje 17α -hidroksilazu, niti C_{17-20} liazu, placenta pacova poseduje ove enzime zbog čega se u placenti pacova sintetisu progesteron i testosteron (Payne i Hales, 2004). Takođe, placenta pacova ne eksprimira aromataze, već one postoje isključivo u žutom telu jajnika u kojima se placentarni androgeni aromatizuju u estrogen, tokom graviditeta. Početkom graviditeta, steroidogeza u žutim telima je stimulisana prolaktinom i LH, dok se sredinom graviditeta smanjuje aktivnost LH i prolaktina te se pojačano sintetisu androgeni. Uočeno je da se serumska koncentracija LH smanjuje od 12. – 18. gestacijskog dana, što je praćeno porastom koncentracije testosterona koja dostiže maskimalne vrednosti oko 18. gestacijskog dana. Sinteza testosterona nije pod kontrolom hipofize, već se kontrola vrši putem estradiola za koji se zna da inhibira sintezu testosterona u ovarijumima i testisima (Sridaran i Gibori, 1987). Testosteron koji se tokom graviditeta pacova sintetise u posteljici je značajan za održavanje funkcije žutog tela tokom kasnog graviditeta.

Kod pacova, ovarijumi nisu aktivni tokom fetalnog i infantilnog perioda, a merljive koncentracije estrogena se detektuju tek posle 5. postnatalnog dana (Weniger, 1993). Za razliku od ovarijuma, sinteza testosterona u testisima je intenzivna i tokom fetalnog perioda. U fetalnim testisima glodara, aromataze se ekspimiraju 17. gestacijskog dana (Payne i Hales, 2004), što izaziva skok koncentracije testosterona koji se održava i tokom prvih dana života. Zanimljivo je da se aromataze ekspimiraju i u mozgu glodara tokom fetalnog i ranog postnatalnog perioda. Oko 12. gestacijskog dana uočava se ekspresija aromataza, koja raste i dostiže maksimum oko 4. postnatalnog dana, a nakon toga kontinuirano opada do postizanja adultnih vrednosti (Payne i Hales, 2004).

Zbog svoje lipofilne prirode steroidi koji su proizvedeni u različitim endokrinim organima lako prolaze krvno-moždanu barijeru i služe kao prekursori za sintezu neurosteroida. Ipak mnogi neuroaktivni steroidi mogu biti sintetisani u samom mozgu bez pomoći perifernih izvora. Steroidi koji se mogu sintetisati *de novo* u CNS-u zovemo neurosteroidima. Progesteron i testosteron su prekursori za sintezu neurosteroida: dihidroprogesterona (DHP), tetrahidroprogesterona (THP), DHT i 3 α -diola. *5 α -reduktaza* katalizuje konverziju progesterona i deoksikortikosterona u 5α -pregnan steroide: 5α -dihidroprogesteron (5α -DHP) i 5α -dihidrideoksikortikosteron (5α -DHDOC), dok *5 β -reduktaza* dovodi do pretvaranja progesterona u 5β -dihidroprogesteron (5β -DHP). Ovo su ireverzibilne reakcije u ćelijama sisara (Slika 1.3).



Slika 1.3. Sinteza neurosteroida.

17β/3β-HSD - 17β/3β -hidroksisteroid dehidrogenaza; 3β-HSD - 3β-hidroksisteroid dehidrogenaza; 5αR - 5α reduktaza; THDOC – alotetrahidrodoksesikortikosteron

Pregnan neurosteroidi mogu biti redukovani u neuroaktivne steroide ($3\alpha,5\alpha$)-3-hidroksipregnan-20-one ($3\alpha,5\alpha$ -THP ili alopregnanolon) i THDOC ($3\alpha,5\alpha$)-3,21-dihidroksipregnan-20-one ($3\alpha,5\alpha$ - ili alotetrahidrodoksesikortikosteron) delovanjem *3 α -hidroksisteroid oksidoreduktaze* (*3 α -HSD*). Ova reakcija može biti oksidacijska ili redukcijaska u zavisnosti od prisutnih kofaktora. *17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza* tip 10 (*17 β -HSD*) katalizuje ponovnu oksidaciju neuroaktivnih steroida u mitohondrijama uz pomoć NAD^+ kao koenzima što je značajno za homeostazu neurosteroida koju kontrolišu ova dva enzima (*3 α -HSD* i *17 β -HSD*). Pregnenolon je prekursor dihidroepiandrosterona (DHEA) i ova dva neurosteroida postoje u vidu konjugovanih sulfatnih estera: PS i DHEAS. Progesteron i DHEA se mogu pretvoriti u androstenedion, koji je prekursor testosterona. Estradiol nastaje iz testosterona ili androstenediona pod dejstvom aromataza. *5 α -reduktaza* katalizuje reakciju prelaska androstenediona u androstenedion, a zatim pomoću *3 α -HSD* u 3α -androsteron. Testosteron pod dejstvom *5 α -reduktaze* prelazi u 5α -dihidrottestosteron (DHT), dok *3 α -HSD* konvertuje DHT u 3α -androstanediol (Agis-Balboa i sar., 2006).

Neurosteroidi su snažni modulatori brojnih receptora: GABA, NMDA, AMPA, σ_1 , serotoninских, nikotinskiх и glicinskiх и dr (Hosie i sar., 2006; Rupprecht, 2006). Neurosteroidi mogu da moduliraju funkciju neurona putem istovremenog uticaja na ekscitabilnost neurona i ekspresiju gena. Pionirska istraživanja Phoenixa i saradnika (1959), kao i novija istraživanja (Seckl i Holmes, 2007) otkrivaju da se efekti hormona ostvaruju putem dva mehanizma dejstva: organizacionog i aktivirajućeg (Barker, 1998; Gluckman i sar., 2008). Za ispoljavanje genomskog, organizacionog uticaja neurosteroida potrebni su dani i meseci, dok se brzi, aktivirajući negenomski uticaji ostvaruju tokom nekoliko minuta ili časova, a u osnovi ovog delovanja je promena aktivnosti membranskih receptora.

Organizacioni efekti nastaju usled delovanja polnih hormona tokom fetalnog i perinatalnog perioda i izazivaju trajne strukturne promene koje su odgovorne za polno dimorfno ponašanje jedinki. Ovako organizovane strukturne promene su podložne aktivirajućem delovanju polnih hormona tokom adultnog perioda (Seckl i Holmes, 2007). Organizacioni ili genomski efekti steroida su dugotrajni i nastaju kao posledica uticaja na ekspresiju gena. Steroidi su lipofilni i lako prolaze kroz ćelijsku membranu, ulaze u ćeliju gde se vezuju sa citoplazmatske ili nuklearne receptore. Steroidni receptori su transkripcioni faktori

koji se vezuju za DNK i regulišu ekspresiju gena, transkripciju i sintezu proteina. Aktivirani steroidni receptori se mogu vezati za druge intracelularne proteine poput ko-regulatora i ko-integratora (Lonard i O'Malley, 2012). Ko-regulatori mogu da stimulišu ili inhibiraju transkripciju gena, dok ko-integratori deluju kao posrednici koji omogućavaju vezivanja aktiviranih steroidnih receptora za transkripcioni faktor (Jun, Fos) koji se zatim vezuje za DNK. Lokalizacija ko-regulatora i ko-integratora je tkivno-specifična, što objašnjava pojavu da modulatori estrogenskih receptora u nekim tkivima deluju kao agonisti, dok u drugim tkivima deluju kao antagonisti.

Aktivirajući efekti steroida su brzi i ostvaruju se vezivanjem za membranske receptore koji regulišu aktivnost jonskih kanala i aktiviraju sistem sekundarnih glasnika. Ranije zanimarivani, danas im se pripisuje veliki fiziološki značaj, naročito u regulaciji ponašanja. S jedne strane, steroidi mogu delovati poput neurotransmitera koji brzo utiču na funkciju i ponašanje. Na primer, estradiol se može akutno sintetisati u nervnim terminalima i osloboditi lokalno u sinaptičku pukotinu u cilju regulisanja reproduktivnog ponašanja (Balthazart i Ball, 2006). S druge strane, estradiol i progesteron mogu aktivirati protein kinaze koje modulišu steroidne receptore u cilju povećanja transkripcije pri narednom izlaganju steroidima (Vasudevan i Pfaff, 2008). Pokazano je da je homeostaza neurotransmitera izmenjena kod anksioznih i depresivnih poremećaja, te da neki antidepresivi utiču na ponovno uspostavljanje ove homeostaze (Nus, 2015).

1.3. Polni dimorfizam centralnog nervnog sistema

Polne razlike ogledaju se u različitom ponašanju i metabolizmu kod jedinki različitih polova (Morford i Mauvais-Jarvis, 2016). Najuočljivije su razlike u ponašanju koje je povezano sa reprodukcijom, kao što je udvaranje, teritorijalna dominacija, parenje i briga za potomstvo, a posledica su razlika u građi i funkciji centralnog nervnog sistema. Najveći broj dosadašnje literature o razlikama u građi mozga se odnose na odrasle i stariju decu (Turano i sar., 2018; McCarthy, 2016). Iako su istraživanja koja ispituju razlike u ranom detinjstvu malobrojna, njihovi rezultati ukazuju da su mnoge razlike uočljive već pri rođenju (Levitt, 2013). Mozak muškog novorođenčeta prosečno je 6% veći u poređenju sa ženskim, a već na ovom nivou razvoja se uočava regionalni polni dimorfizam (Knickmeyer i sar., 2016). Medijalni temporalni korteks i Rolandov operkulum značajno su veći kod muškaraca, dok je dorzolateralni prefrontalni, motorni i vizuelni korteks veći kod ženske novorođenčadi (Pakkenberg i Gundersen, 1997). Uočeno je takođe da ženski neonatusi imaju veći volumen sive mase oko temporo-parijetalne granice, koja je značajna za socijalnu kogniciju (Lyll i sar., 2015).

Postnatalno povećanje volumena mozga je brže kod muške novorođenčadi u poređenju sa ženskom, zbog čega je volumen mozga muškarca veći i tokom adultnog perioda (Raznahan i sar., 2011; Stevens i Hamann, 2012). Žene imaju veću srednju kortikalnu debljinu i veću girifikaciju u frontalnom i parijetalnom korteksu, koja je kompenzatorna posledica manjeg volumena mozga. Muškarci imaju veći broj neokortikalnih neurona u odnosu na žene te se pretpostavlja da je ova razlika uzrok većeg intrakranijalnog volumena u muškaraca (Gilmore i sar., 2018). Tehnikama neurovizualizacije otkrivene su strukturne razlike i u regionima mozga relevantnim za anksioznost: amigdalama, prefrontalnom korteksu i hipokampusu (Duarte-Guterman i sar., 2015). Volumen amigdala i talamusa je veći u muškaraca, dok je hipokampus i caudatus veći u žena (Neufang i sar., 2009). Pored razlike u veličini, muškarci i žene se razlikuju po načinu aktivacije hipokampusa i amigdala pri upamćivanju (Hines, 2010). Morfološke razlike u hipokampusu ogledaju se i u broju GFAP + astrocita, naime žene imaju više astrocita u CA1, a muškarci u CA3 regionu hipokampusa (Keil i sar., 2017, Conejo i sar., 2003).

Neka istraživanja su utvrdila da žene imaju veći *corpus callosum* i bolju komunikaciju među hemisferama, zbog čega žene imaju manje izraženu asimetriju i lateralizaciju među hemisferama (Grabowska, 2017). Utvrđeno je da žene u bazalnim uslovima imaju veći cerebrosposinalni protok krvi i veću

brzinu iskrišćenja glikoze, što je uzrok brže distribucije lekova (Gur i sar., 1982; Baxter i sar., 1987). Najveće strukturne razlike uočene su u temporalnom korteksu, limbičkim i motornim zonama, što može biti značajno za temporalnu epilepsiju i neke oblike nasledne generalizovane epilepsije kao što su absansna epilepsija u detinjstvu i juvenilna mioklonička epilepsija.

Iako su polne razlike u građi mozga brojne, kao najznačajnije polno dimorfne strukture u CNS-u glodara ubrajaju se: ventromedijalno jedro hipotalamusa (VMN), spinalno bulbokavernozno jedro, anteroventralno paraventrikularno jedro hipotalamusa (AVPV), polno dimorfno jedro medijalne preoptičke zone hipotalamusa (SDN-POA), medijalna amigdala (MeA) i jedro baze strije terminalis (*eng.* bed nucleus stria terminalis - BNST) (Morris i sar., 2004). SDN-POA kod pacova i intersticijalno jedro prednjeg hipotalamusa (INAH) koji predstavlja homolognu strukturu u ljudi, su 3-4 puta veći u muškaraca nego u žena, a veličina je direktno proporcionalna koncentraciji fetalnog testosterona (Hines, 2010). BNST je odgovoran za reproduktivno ponašanje i značajno je veći u mužjaka nego u ženki. BNST je preko MeA povezan sa hipotalamusom, te je i MeA veći kod mužjaka nego kod ženki. Pored razlike u veličini, SDN-POA, MeA i BNST mužjaka ekspimiraju značajno veći broj AR receptora (Shah i sar., 2004).

Studije na kičmenjacima pokazale su da je za tipično muško ponašanje i građu mozga neophodno sadejstvo estrogena i testosterona (Morford i Mauvais-Jarvis, 2016). Koncentracije estrogena u krvi muških jedinki su zanemarljivo male. S druge strane, serumski testosteron je prekursor izvor za sintezu estrogena i DHT u mozgu (Celotti i sar, 1992). Na ovaj način, testosteron ima dvostruku ulogu: preko DHT deluje na androgenske receptore (AR) (Celec, 2015) i služi kao izvor estrogena koji utiče na neuronske mreže preko estrogenskih receptora (ER). Po drugoj teoriji, jedina uloga testosterona u mozgu je da ima ulogu prohormona za estrogen, te da je muški obrazac ponašanja i građe posledica delovanja estrogena (Celotti i sar, 1992).

Tokom fetalnog perioda jajnici miruju, a testisi su vrlo aktivni i sekretuju velike količine testosterona koje dostižu maksimalnu koncentraciju oko 18. postnatalnog dana. Mozak pacova, a naročito hipotalamus, ekspimiraju 5 α -reduktazu i aromataze koje transformišu testosteron u DHT i estradiol koji se vezuju za AR ili ER receptore (Morford i Mauvais-Jarvis, 2016). U mozgu pacova, estradiol je ključni hormon koji vrši maskulinizaciju (Sakuma, 2009). Da je estrogen ključni hormon koji izaziva maskulinizaciju, govore u prilog eksperimenti u kojima je administracija estradiola ženskim neonatusima izazvala povećanje SDN-POA i APV koje je karakteristično za mužjake dok administracija blokatora aromataza mužjacima, sprečava razvoj SDN-POA (Sakuma, 2009). Takođe, genetski modifikovani mužjaci miševa koji ne poseduju ER receptore ne ispoljavaju tipično maskulino ponašanje - ne pare se i nisu agresivni, dok kastracija adultnih mužjaka dovodi do gubitka maskulinog ponašanja koje se može sprečiti istovremenom administracijom estrogena (Wu i Shah, 2011). Estradiol iz placente ili iz krvotoka majke se vezuje za α -fetoprotein AFP, uklanja iz cirkulacije i sprečava da dospe do mozga. AFP ne vezuje testosteron i on u mozgu podleže aromatizaciji do estradiola. U fetalnom mozgu se sintetiše i DHT ali on ne dovodi do maskulinizacije jer se ne vezuje za ER, a broj AR u tokom ovog perioda je zanemarljivo mali. Dakle, za maskulinizaciju mozga glodara, neophodna je ekspresija aromataza i ER tokom kasnog fetalnog i ranog postnatalnog perioda. Tokom ranih faza razvoja, estrogen stimuliše tipično mušku ekspresiju AR u mozgu, čime se stvara mogućnost da androgeni utiču na ponašanje u adultnom periodu. Za potpuno ispoljavanje maskulinog ponašanja tokom adultnog perioda, neophodno je prisustvo AR (Juntti i sar, 2010). Nedostatak AR receptora kod genetski modifikovanih miševa smanjuje ispoljavanje maskulinog ponašanja, mužjaci mogu da se pare i ispoljavaju agresivnost, ali je učestalost ovakvog ponašanja smanjena (Raskin i sar., 2009). Sa druge strane, sindrom androgene insenzitivnosti sa normalnim ili povećanim nivoom testosterona rezultuje ženskim ponašanjem kod jedinki muškog pola (Raskin i sar., 2009).

Novije studije ukazuju da neki aspekti polne diferencijacije nisu zavisni od dejstva hormona, već su genetski indukovani. Ispitivanja na miševima su otkrila postojanje genskog otiska koji je polno specifičan (Gregg i sar., 2010). S druge strane i hormoni primenjeni tokom kritičnih perioda razvoja mogu

epigenetski uticati na ekspresiju gena, što može biti značajno za identifikaciju markera nekih oboljenja (Nakachi i sar, 2015).

1.4. Endokrinopatija reproduktivnog doba: sindrom policističnih jajnika

Pored fizioloških aspekata uticaja endogenih hormona na neurorazvoj, uočeno je da hormonske promene kod majke tokom kritičnih perioda prenatalnog razvoja mogu izazvati dugoročne efekte na rast i razvoj mozga, što dalje može rezultirati izmenjenim ponašanjem i povećanom podložnošću hroničnim bolestima kao što su metaboličke i psihijatrijske (Kosidou i sar., 2016).

Sindrom policističnih jajnika (*eng.* polycystic ovary syndrome, PCOS) je najčešća endokrinopatija žena reproduktivnog doba, sa prevalencom od oko 15% (Amsterdam PCOS Consensus Workshop Group, 2012). Prema Roterdamskom konsenzusu, kriterijumi dijagnoze PCOS podrazumevaju postojanje dve od tri karakteristike: oligo/anovulatorni ciklusi; klinički i/ili biohemijski hiperandrogenizam; policistični jajnici u odsustvu drugih endokrinoloških i ginekoloških bolesti (Amsterdam PCOS Consensus Workshop Group, 2012). Sve je veći broj dokaza da žene sa PCOS i tokom trudnoće imaju visok nivo cirkulišućih androgena, te fetusu bivaju izloženi hiperandrogenoj sredini *in utero* (Ehrmann, 2005). Nivo testosterona izmeren u umbilikalnoj veni ženskih potomaka PCOS majki značajno je veći u odnosu na potomke zdravih majki, što je takođe uočeno i u amnionskoj tečnosti (Mehrabian i Kelishadi, 2012; Palomba, 2012). Ovakvi uslovi prenatalnog razvoja imaju reprogramirajuće dejstvo, čiji efekti bivaju doživotni (Kosidou i sar., 2016). Uočeno je da visok nivo androgena u serumu i amnionskoj tečnosti kod ženskih fetusa značajno pozitivno korelira sa muškim tipom ponašanja kod devojčica predškolskog uzrasta, poredeći sa devojčicama kontrolne grupe istog uzrasta (Hines i sar., 2002). Velikim populacionim studijama uočena je predominacija ranih neurorazvojnih poremećaja kod dečaka u odnosu na devojčice: autizma, hiperaktivnog poremećaja sa poremećajem pažnje (*eng.* attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) i drugih (Loomes i sar., 2017; Lai i sar., 2015). Uočeno je da se kod dečaka autizam dijagnostikuje tri puta češće nego kod devojčica (Lai i sar., 2015). Ovo je sugerisalo da najverovatniji etiološki faktor takođe leži u programirajućem efektu androgenih hormona (Seckl i Holmes, 2007). U prilog tome govore i rezultati velikih studija koji su potvrdili uzročno – posledičnu povezanost PCOS sa autističnim spektrom poremećaja ponašanja i ADHD kod ženskih potomaka (Kosidou i sar., 2016).

Poslednje dve decenije, u istraživanjima PCOSa sve više se ispituju prenatalni faktori koji mogu uticati na razvoj samog sindroma (Stener-Victorin i sar., 2010). U tom smislu razvijeni su prenatalni modeli metaboličkog sindroma/PCOSa kod glodara, ovaca i majmuna (Amalfi i sar., 2012).

1.5. Polni hormoni i anksioznost

Svakodnevne aktivnosti, odluke i odgovori na stresne situacije formiraju naše iskustvo, dok brojni endogeni faktori kao i faktori iz okoline modifikuju pomenute reakcije (Lahousen i Kapfhammer, 2018). Kompleksna kognitivna, afektivna, fiziološka i bihevioralna reakcija pripreme organizma na ponavljanje situacije koja je ranije izazivala strah, za posledicu ima anksioznost (Thibaut, 2017). Kada se pak nepoznate ili iskustveno nesigurne situacije precenjenjuju kao preteće, javljaju se anksiozni poremećaji (Thibaut, 2017).

Grupa anksioznih poremećaja predstavlja najčešće psihijatrijsko oboljenje, sa godišnjom prevalencom u opštoj populaciji od oko 10,3%. Specifična podela unutar grupe anksioznih poremećaja diktira vreme pojave istih, a primećeno je da se javljaju u periodu od detinjstva do kasne adolescencije, sa retkom pojavom poremećaja nakon 50. godine (Bandelow, 2020). Trenutni koncept etiologije anksioznih poremećaja podrazumeva interakciju psihosocijalnih faktora, stresa ili traume i genetske predisponiranosti, koja se manifestuju neurobiološkom i neuropsihološkom disfunkcijom. Ekstenzivna neurobiološka istraživanja anksioznih poremećaja rezultirala su višestrukim nalazima u polju

neurovizualizacije, genetike, neurohemije, neurofiziologije, kognicije i drugo (Munir i Takov, 2019). Ipak, najprominentniji zaključak kako kliničkih tako i prekliničkih studija je da se prevalenca anksioznih poremećaj značajno razlikuje među polovima (Thibaut, 2017). Žene su češće pogođene ovim poremećajem u poređenju sa muškarcima (McHenry i sar., 2014) i zbog toga polni hormoni i hormonski status predstavljaju važan etiološki faktor razvoja anksioznosti.

Epidemiološke studije sugerišu da žene imaju veći rizik razvoja anksioznih poremećaja ili pogoršanja simptoma postojeće bolesti tokom različitih faza reproduktivnog života, kao što su: pubertet, menstrualni ciklus, trudnoća, postporođajni period i menopauza (Hickey i sar., 2012; van Veen i sar., 2009; Vesga-López i sar., 2008). Ovi periodi povišenog rizika se poklapaju sa drastičnim fluktuacijama koncentracija polnih hormona, ukazujući na njihovu izuzetnu uogu u pojavi, razvoju i održavanju anksioznih poremećaja kod žena. Hormonski poremećaji koji se povezuju sa anksioznošću, mogu izazvati poremećaj neurotransmisije i sledstvenih signalnih puteva kao što su npr. poremećaj neurotransmisije serotonina. Serotonin igra značajnu ulogu u brojim fiziološkim i patološkim procesima. Serotoninska neurotransmisija je uključena u regulaciju raspoloženja, kontroli impulsa, spavanju, budnosti, hranjenju, libidu i kognitivnim funkcijama, kao što su učenje i pamćenje. Ovi efekti se ostvaruju putem 14 različitih serotoninskih (5-HT) receptora. Uočeno je takođe da serotonin ima značajnu ulogu u neuralnom procesiranju anksioznih stanja (Gordon i Hen, 2004). Preklinička istraživanja i kliničke studije su ukazale da značajnu ulogu u anksioznim poremećajima ima glavni inhibicioni serotoninski receptor, tip 5-HT_{1A}, a da njegovi parcijalni agonisti deluju anksiolitički (Albert i sar., 2014). Uočeno je takođe da transgeni miševi koji nemaju gen za serotoninski transporter pokazuju izraženo anksiozno ponašanje, dok je smanjeno vezivanje serotonina za receptore u CNSu uočeno kod paničnih poremećaja i post-traumatskog stresnog poremećaja (PTSP) (Loomes i sar., 2017).

Alopregnanolon je neurosteroid koji se sintetiše u CNSu iz progesterona i njegove koncentracije osciliraju tokom menstrualnog ciklusa (Timby i sar., 2016). Snižen nivo alopregnenolona je u pozitivnoj korelaciji sa pojavom anksioznosti. Shodno tome, smanjena koncentracija alopregnanolona u serumu, plazmi i likvoru je nađena u čitavom spektru anksioznih poremećaja i PTSP (Schüle i sar., 2014). Interesantno je da nivo alopregnanolona raste kao odgovor na akutni stress kod glodara, dok istraživanja povezanosti istih kod ljudi nisu dala jasne rezultate (Bali i Jaggi, 2014). Administracija alopregnanolona deluje akutno anksiolitički, dok blokada sinteze indukuje anksioznost. Ovi efekti su najverovantije posledica alopregnenolonske alosterne modulacije GABA_A receptora, kao i modulacije aktivnosti hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine (HHA) (Engin i Treit, 2007)

Estradiol ima snažno stimulatorno dejstvo na serotonergičnu transmisiju. Pokazano je da tretman estradiolom kod ovariektomisanih glodara i primata facilitira serotonergičnu neurotransmisiju inhibicijom monoamino oksidaze (MAO), povećavajući nivo ekspresije triptofan hidroksilaze kao i povećavajući gensku ekspresiju za serotoninski transporter, posebno u regionima mozga odgovornim za afektivno ponašanje. U prilog tome govore i istraživanja sprovedena putem pozitronske emisije tomografija MAO-A receptora, gde je pokazano da je distribucije vezivanja za receptor značajno veći kod žena u perimenopauzi i menopauzi u poređenju sa onima u premenopauzi. Ovi nalazi sugerišu da je smanjena koncentracija estradiola tokom reproduktivnog starenja doprinosi smanjenju serotonergične transmisije smanjenjem inhibicije MAO enzima (Walf i Frye, 2006). Alopregnenolon je na sličan način kao i serotonin pozitivno modulisan estradiolom i progesteronom. Maksimalne koncentracije alopregnanolona se beleže tokom sredine lutealne faze, kada su i koncentracije progesterona visoke (Kimball i sar., 2020). Takođe je uočeno da supresija estradiola i progesterona kontraceptivima korelira sa nižim nivoima alopregnanolona. (Porcu i sar., 2012).

Kontradiktorni su nalazi u brojnim eksperimentalnih studijama, koji ukazuju da testosteron može imati anksiolitičke i anksigene efekte. Moguće objašnjenje nekonzistentnih nalaza je razlika organizacionog i aktivacionog dejstva testosterona na neuronske krugove tokom prenatalnog ili postnatalnog perioda (Domonkos i sar., 2018). Analizirajući uticaj testosterona na anksioznost kod

mužjaka miševa, Aikey i saradici (2002) su kroz nekoliko eksperimenata pokazali dozno zavisno anksiolitičko dejstvo, najverovatnije posredovano aktivnošću 5 α reduktaze. Anksiolitičko dejstvo testosterona u zdravih žena potvrdili su Van Honk i saradnici (2011). Interesantno je da administracija jedne doze testosterona mužjacima pacova prilikom bihevioralnih testiranja nije rezultirala redukcijom anksioznosti, za razliku od ponavljene administracije koja je delovala anksioitički (Fernandez-Guasti i Martinez-Mota, 2005).

1.6. Uticaj polnih hormona na nociocepciju

Bol je neprijatan osećaj ili emocionalno iskustvo povezano sa aktuelnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (Treede, 2018). Senzorna i afektivna komponenta bola su visoko povezane u najvećem broju slučajeva – kako bol postaje intenzivnija, postaje sve neprijatnija (Hofbauer i sar., 2001). Veliki broj faktora kao što su: starost, kompozicija tela, endogeni hormonski status, komorbiditeti, postojeća farmakoterapija, prethodno bolno iskustvo, sredinski i psihosocijalni faktori, preduslov su značajnih individualnih varijacija u percepciji bola - nocicepciji i analgeziji. Intrigantnost varijacije nocicepcije među individuama pominje se još od doba Pitagore, koji je primetio da uzimanje fava mahunarki kod nekih osoba izaziva fatalne reakcije dok kod drugih ne (Pirmohamed, 2001).

Poznato je da hormoni igraju značajnu ulogu u polno različitoj percepciji bola i analgeziji (Greenspan i sar., 2007). Testosteron smanjuje bolnu osetljivost, a u prilog tome govore i studije gde su niski nivoi testosterona nađeni u stanjima hroničnog bola (Cairns i Gazerani, 2009). Sa druge strane, uticaj estrogena i progesterona na bolnu osetljivost značajno je komplikovaniji, ispoljavajući pro i anti-nociceptivne osobine (Craft, 2007; Smith i sar., 2006). Žene percipiraju isti bolni stimulus kao jači, imaju niži prag i manju toleranciju u poređenju sa muškarcima (Cairns i Gazerani, 2009). Ove činjenice su takođe indikovale da je testosteron odgovoran za polno različitu bolnu senzitivnost, s obzirom da je prosečan nivo testosterona kod odraslog muškarca oko 7-10 puta veći u odnosu na odraslu ženu (Craft, 2007). Brojne studije su uočile da se bolni sindromi kao što su: migrena, temporomandibularni poremećaji, neuropatski bol, artritis i fibrimijalgija, značajno češće javljaju kod žena nego kod muškaraca (Fillingim i Ness, 2000; Stewart i sar., 1991).

Podrazumevajuću ulogu polnih hormona u nocicepciji, unutargrupna varijacija kod žena, varijacija kod samih individua u različitim fazama reproduktivnog razvoja, kao i ciklična varijacija povezana sa menstrualnim ciklusom, imaju veliki klinički značaj uprkos činjenici da su brojna istraživanja ovih fenomena dala nekonzistentne rezultate (Sherman i Leresche, 2006; Klatzkin i sar., 2010; Iacovides i sar., 2015; Leresche i sar., 2005). Primećeno je da se senzitivnost tj. percepcija bola menja tokom perioda života žene, sa maksimalnom prevalencom bolnih sindroma tokom reproduktivnog peiroda (Dao i LeResche, 2000). Posmatrajući promene tokom menstrualnog ciklusa, mnoge studije sugerišu da žene u postovulatornoj, lutealnoj fazi ciklua pokazuju pojačanu senzitivnost na bol u poređenju sa folikularnom fazom (Packiasabapathy i Sadhasivam, 2018). Simptom bola u hroničnim bolnim sindromima doseže svoj maksimum u perimentrualnom periodu, što je protumačeno niskim nivoom estrogena (Leresche i sar., 2005; Iacovides i sar., 2005). Analogno ljudima, u eksperimentima na pacovima pokazano je da je nociceptivni prag maksimalan tokom kasnog proestrusa (Craft and Bernal, 2001) i diestrusa (Stoffel i sar., 2003).

S obzirom na prethodno pomenute rezultate, nekolicina istraživača je analizirala da li se krajnji efekat angezije tj. smanjene nocicepcije postiže konverzijom testosterona u estrogen ili u dihidrotestosteron putem androgenih receptora (Borzan i Fuchs, 2006). U do sada dostupnoj literaturi, nije ispitivan uticaj prenatalne androgenizacije na nocicepciju odraslih ženskih potomaka kod pacova.

1.7. Polni hormoni i epilepsija

Epilepsija je bolest koja je stara koliko i čovek. Najstariji detaljan opis epilepsije dat je u Vavilonskim tablicama iz II veka p.n.e. koje se nalaze u Britanskom muzeju u Londonu. Kroz istoriju joj je pripisivano nadprirodno poreklo i nazivana je različitim imenima: „sveta bolest”, „božanska bolest”, „padavica”. Od epilepsije boluje 1% svetske populacije (65 miliona) i 0,5 % dece. U Evropi od epilepsije boluje oko 6 miliona ljudi, dok je u Srbiji oko 50,000 obolelih. Više od 65% pacijenata je u detinjstvu imalo prvi napad (najveća incidenca u prvoj godini), a čak 40% obolelih je rezistentno na primenjenu terapiju (Fiest i sar, 2017)

Epilepsija je poremećaj funkcije mozga koji karakteriše rekurentna i nepredvidljiva pojava konvulzija. Konvulzije predstavljaju prolaznu promenu ponašanja usled poremećenog, hipersinhronog i ritmičnog pražnjenja populacije neurona u CNSu. Pojava jednog konvulzivnog napada nije dovoljna za dijagnozu epilepsije. U praksi, pod epilepsijom se podrazumeva stanje posle 2 ili više spontanih epileptičkih napada (Kostić, 2018). Epilepsije ne predstavljaju jedinstvenu bolest, već skup različito ispoljenih neuroloških poremećaja. Bihevioralne manifestacije napada zavise od normalne funkcije nervne strukture zahvaćene epileptičkim pražnjenjem, i traju najčešće od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (Stafstrom i Carmant, 2015).

Epilepsiju kao hroničnu bolest karakterišu EEG promene koje se registruju tokom napada (iktalne), i van napada (interiktalne epileptiformne promene). Međutim, odsustvo interiktalnih epileptiformnih EEG promena ne isključuje klinički postavljenu dijagnozu epilepsije, jer je interiktalni EEG kod mnogih bolesnika sa epilepsijom normalan (15%-50% bolesnika) (Kostić, 2018). Ipak, za dijagnozu epilepsije je neophodno dokazivanje abnormalnosti u EEG-u u toku epileptičkog napada. EEG je koristan i za klasifikaciju epilepsija. Amplituda EEG-a je rezultat prostorne i vremenske sumacije ekscitacijskih postsinaptičkih potencijala nastalih usled sinhronne sinaptičke aktivnosti koritikalnih regiona ispod površinske registrujuće elektrode. Akcioni potencijali neurona malo doprinose amplitudi jer su veoma kratkog trajanja i relativno asinhroni. Postoji nekoliko karakterističnih obrazaca u EEG-u koji su indikatori epileptiformne aktivnosti: epileptični šiljak, multipli šiljci, šiljak-talas kompleksi (Chen i Koubeissi, 2019).

Mnogobrojni mehanizmi su odgovorni za nastanak epilepsije, ali je jedan od najčešće navođenih uzroka narušavanje ravnoteže između ekscitacijskih i inhibicijskih procesa u mozgu (Löscher, 2017). Epileptički neuroni su spontano podražljivi jer je membrana u mirovanju propustljiva za jone Na^+ . Ulazak Na^+ u ćeliju dovodi do spontane depolarizacije i stvaranja ekscitacijskih postsinaptičkih potencijala koji se prostorno i vremenski sumiraju i formiraju *paroksizmalni depolarizujući pomak*, koji se prenosi do aksonskog brežuljka gde izaziva generisanje učestalih akcionih potencijala. Akcioni potencijali se haotično propagiraju do susednih neurona, a da bi se razvio napad neophodno je da dođe do njihove sinhronizacije. Sinhronizacija može nastati kao posledica smanjenja sinaptičke inhibicije ili povećanja sinaptičke ekscitacije.

Epidemiološka istraživanja ukazuju da je prevalenca epilepsije veća u muškaraca nego u žena (Scharfman i MacLusky, 2014). S druge strane, idiopatska generalizovana epilepsija se sa većom učestalošću javlja kod žena, dok je u muškaraca zastupljenija fokalna epilepsija (Morrell, 2008). Takođe je primećeno da tokom životnog veka žene, postoji velika fluktuacija učestalosti napada, što se objašnjava promenama hormonskog statusa žena. Katamenijalna epilepsija pogađa isključivo žene, a pojava napada je povezana sa hormonskim promenama koje nastaju tokom menstrualnog ciklusa (Herzog i sar., 2008). U zavisnosti od faze menstrualnog ciklusa u kome se napadi javljaju razlikujemo tri vrste katamenijalne epilepsije: perimenstrualnu, periovulatornu i lutealnu. Najveća incidenca napada je u periodima kada je koncentracija estrogena visoka, neposredno pre ovulacije ili tokom lutealne faze ukoliko je produkcija progesterona nedovoljna (Herzog i sar., 1997).

Polne razlike u učestalosti i kliničkoj slici uočene su i u različitim animalnim modelima epilepsije. Učestalost konvulzija izazvanih pilokarpinom i kainatnom kiselinom je veća kod mužjaka nego kod ženki (Reddy, 2017). Takođe je uočeno da se učestalost napada menja u zavisnosti od faze estrusnog ciklusa, te je utvrđeno da je učestalost najmanja tokom diestrusa, kada je koncentracija estrogena niska (Herzog i sar., 2011). Pored endogenog uticaja hormona, i egzogena administracija polnih hormona utiče na konvulzivni prag: estrogen ispoljava prokonvulzivni uticaj, dok progesteron deluje antikonvulzivno (Herzog i sar., 2012). Testosteron sa druge strane ispoljava i pro- i anti-konvulzivne efekte, što se objašnjava različitim metaboličkim putevima ovog hormona. Naime, testosteron se može aromatizovati u estradiol ili konvertovati u dihidrotesteron i androstenediol koji ispoljavaju antikonvulzivna svojstva (Herzog i sar., 1997). Paradoksalni efekat testosterona je možda posledica primenjene doze, jer se pri većim koncentracijama ponaša kao prokonvulzant, dok pri manjim deluje antikonvulzivno (Herzog i sar., 1997).

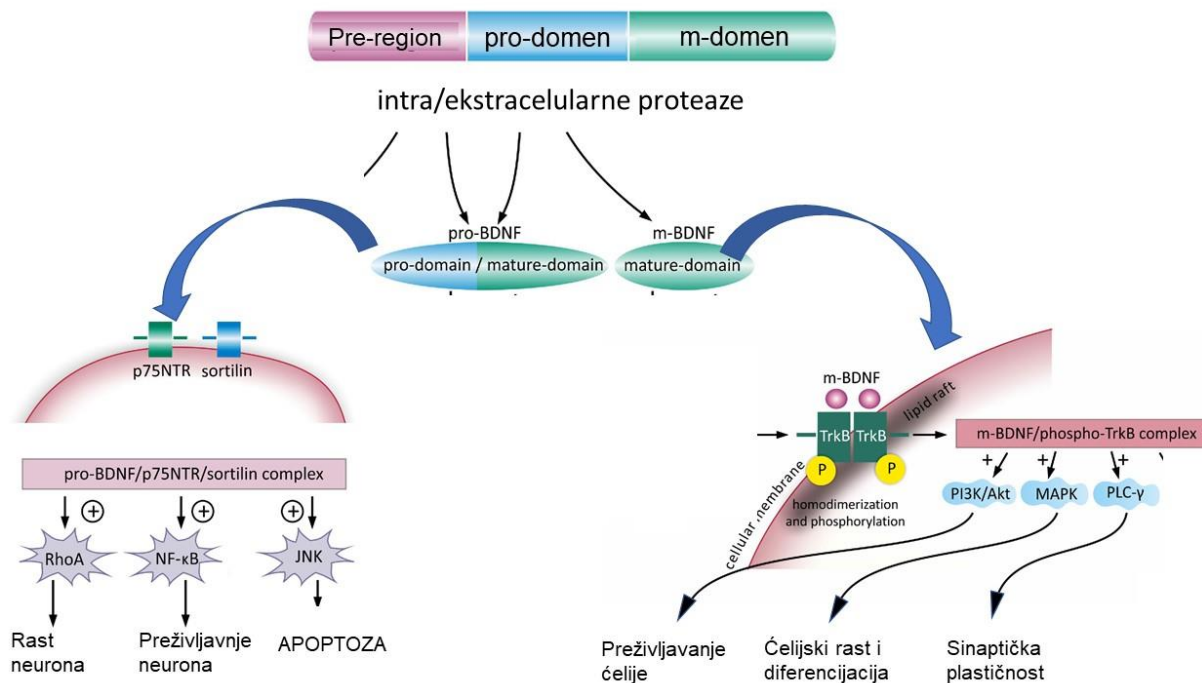
Prevalenca PCOS kod žena sa epilepsijom se procenjuje na između 4 i 19% (%) (Lobo, 1995). Najveći broj studija sugerise da to može biti povezano sa antiepileptičnom terapijom valproatom (Hu i sar., 2011; Zhou i sar., 2012), a nedavnom studijom je je pokazano da uzrok ove činjenice leži u hiperandrogenizmu uzrokovanom valproatom (Tsallagova i sar., 2018). Iako je pokazano da poremećaj hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine tokom prvih meseci fetalnog razvoja uzrokuje niži prag pojave konvulzivnih napada tokom odrastanja, uticaj prenatalne hiperandrogenizacije na pojavu epilepsije kod odraslih ženskih potomaka do sada nije ispitivan.

1.8. Moždani neurotrofinski faktor rasta

Neurotrofini su familija strukturno sličnih polipeptidnih faktora rasta koju čine: nervni faktor rasta (*engl.* nerve growth factor, NGF), moždani neurotrofinski faktor (*engl.* brain-derived neurotrophic factor, BDNF), neurotrofin-3 (NT-3) i neurotrofin-4 (NT-4/5). Neurotrofini utiču na rast i diferencijaciju nervnog sistema tokom embrionalnog i adultnog perioda. Efekte ostvaruju posredstvom dva tipa receptora: tropomiozin receptor kinaza (Trk) receptora i p75 neurotrofinskog receptora (p75NTR) (Lu i sar., 2005). Trk receptori aktiviraju kaskadu sekundarnih glasnika poput fosfolipaze C (PLC), fofatidil-izozitol 3 kinaze (PI3K) i Ras/ERK kinaza (Dechant i Barde, 2002) koji su uključeni u različite aspekte neruonskog preživljavanja i rasta neurita (Murray i Holmes, 2011). p75NTR je uključen u pro i antitrofičke procese poput rasta neurita i apoptoze (Kowiański I sar., 2018). Ekspresija BDNF u CNS-u je velika i od izuzetnog značaja za dopaminergičku, serotonergičku i glutamatergičku neurotransmisiju (Carlino i sar., 2015) i sinaptičko remodelovanje tokom kognitivnih procesa. BDNF je uključen u regulaciju rasta ćelije, diferencijaciju ćelija i sinaptičku modifikaciju i ima značajnu ekspresiju u hipokampusu i tokom perioda razvoja i u adultnom periodu (Vilar i Mira, 2016; Webster i sar., 2006).

Sinteza BDNF-a počinje u endoplazmatskom retikulumu, sintezom prekusorskog molekula pre-proBDNF koji se nakon odcepljenja signalnog peptida transformiše u proBDNF (32 kDa). ProBDNF dalje podleže proteolitičkom cepanju i nastaju: zreli BDNF (mBDDNF, 14 kDa) ili skraćeni BDNF (trunkBDNF, 28kDa). mBDNF se obično nalazi u vidu dimera (28 kDa) koje se ne sme pomešati sa trunkBDNF monomerom. mBDNF nastaje proteolitičkim cepanjem argininskih rezidua pod dejstvom furina u Goldžijevom aparatu ili se cepanje vrši pod uticajem plazmina ili matriksmetaloproteinaza-7 u ekstracelularnom prostoru. BDNF se potom pakuje u sekretorne vezikule u aksonskim i dendritskim završecima glutamatskih neurona. trunkBDNF nastaje u endoplazmatskom retikulumu cepanjem na mestu treonina 57 pod dejstvom Ca^{2+} -zavisne serin proteinaze, on ne podleže daljem proteolitičkom cepanju i predstavlja krajnji produkt čiji fiziološki značaj jos uvek nije u potpunosti razjašnjen (Carlino i sar., 2015). Pokazano je da oba oblika BDNF-a (pro- i zreli BDNF) imaju značajne uloge kako tokom razvoja neurona,

tako i u odrasloj dobi (Lu i sar., 2005). Do skora se mislilo da je proBDNF neaktivni intracelularni prekursor, međutim danas se zna da su oba proteina biološki aktivna i ispoljavaju dijametralno različite efekte: mBDNF povećava gustinu dendritskih spina i izaziva dugotrajnu potencijaciju, dok proBDNF izaziva smanje gustine dendritskih spina i dugotrajnu depresiju. Različiti efekti BDNF izoformi se objašnjavaju afinitetom za različite receptore: proBDNF se prevashodno vezuje za p75NTR receptore, dok mBDNF dimer ima veći afinitet za TrkB receptore (Slika 1.4).



Slika 1.4. Interakcija izoformi BDNF sa specifičnim receptorima i aktivacija signalnih kaskada.

RhoA- familija malih GTP vezujućih proteina; NF- κ B – nuklearni faktor kapa B; JNK – cJun amino terminalna kinaza; PI3K – fosfatidil inositol kinaza; MAPK – mitogen aktivirana protein kinaza; PLC γ – fosfolipaza C γ ; mBDNF – zreli BDNF (Modifikovano iz Koviański i sar., 2017.)

Vezivanje mBDNF za TrkB receptore može da aktivira 3 signalna puta: 1) **PI3K** aktivira serin-treonin kinazu Akt koja stimuliše preživljavanje neurona; 2) **EKR kinaze** pripadaju grupi mitogenom-aktiviranih protein kinaza (MAPK) i regulišu proliferaciju i diferencijaciju ćelija; 3) **PLC** hidolizuje fosfatidilinozitol difosfat pri čemu nastaje diacilglicerol (DAG) i inozitol 3-fosfat (I3P). DAG aktivira protein kinazu C (PKC), dok I3P oslobađa Ca^{2+} iz intracelularnih depoa i povećava aktivnost kalmodulin kinaze što dovodi do modulacije sinaptičke plastičnosti – dugotrajane potencijacije (Slika 1.4). Svi pomenuti putevi izazivaju fosforilaciju i aktivaciju transkripcionih faktora cAMP zavisni. Element vezujući protein (CREB) izaziva transkripciju gena koji su važni sa diferencijaciju i preživljavanje neurona (Zaletel i sar., 2017). Pro-BDNF efekte ostvaruje preko p75 NTR/sortilin receptora izazivajući redukciju gustine dendritskih spina, apoptozu i dugotrajnu depresiju (Slika 1.4).

Imajući u vidu ulogu BDNF u preživljavanju neurona i apoptozi, istraživanja su usmerena na značaj i ulogu BDNF tokom razvoja. Tokom razvoja neurotrofini utiču i usmeravaju diferencijaciju neurona u CNS i PNS. Barnabe-Heider i Miller (2003) su pokazale da kortikalne progenitorske ćelije eksprimiraju BDNF, NT-3 i njihove receptore TrkB i TrkC, te da su ovi neurotrofini od vitalnog značaja za preživljavanje progenitorskih ćelija. Mladi embrioni imaju najmanju ekspresiju BDNF miRNA koja se

dramatično povećava od GD 11 do GD 13, što se poklapa sa početkom intenzivne neurogeneze u CNS-u kod glodara (Murray i Holmes, 2011). Ekspresija BDNF mRNA se kontinuirano povećava sve do adultnog perioda, naročito u hipokampusu (Mogi i sar., 1999).

U zavisnosti od dinamike promene BDNF imunoreaktivnosti, razlikujemo tri grupe BDNF ćelija. Ćelije priiformnog korteksa i cingulatnog girusa se detektuju rano tokom postnatalnog razvoja, njihov broj se povećava i ostaje stabilan tokom adultnog perioda. U bazolateralnom jedru i amigdalama, broj BDNF ćelija se povećava tokom postnatalnog perioda a zatim se njihov broj smanjuje tokom adultnog perioda. BDNF ćelije substancije nigre i hipotalamusa se detektuju tokom kratkog perioda i njihov broj se dramatično redukuje tokom adultnog perioda. U hipokampusu, BDNF imunoreaktivne ćelije se već PN7 detektuju u piramidalom sloju CA2 i CA3 i njihov broj se povećava do PN28 nakon čega se smanjuje (Kim i sar., 2007).

BDNF je od ključnog značaja za preživljavanje tokom postnatalnog perioda. *Knockout* BDNF homozigotni miševi umiru ubrzo nakon rođenja, a oni koji prežive do 2. meseca ispoljavaju simptome poremećaja razvoja PNS, naročito aferentnih neurona i cerebeluma sa poremećajem ravnoteže, hoda, nekontrolisanim pokretima. *Knockout* BDNF heterozigoti (+/-) imaju bolje preživljavanje tokom postnatalnog perioda i ispoljavaju gojaznost, smanjenu podložnost epileptičnim napadima (Kokaia i sar., 1995) i poremećaj prostornog učenja (Linnarsson i sar., 1997). Kod adulta, neurotrofini su važni posrednici plastičnosti neurona koji utiču na rast i remodelovanje aksona i dendrita; takođe utiču na transport i recikliranje membranskih receptora, oslobađanje neurotransmitera, formiranje i funkcionisanje sinapsi (Lu i sar., 2005). Uticaj BDNF je složen i zavisi od posmatrane izoforme, mesta delovanja (presinaptički, postsinaptički efekti), trajanja efekta (kratkoročni, dugoročni), kao vrste neurotransmitera koji se oslobađa (GABA, NO, glutamat). Primera radi viskofrekventna hipokampalna stimulacija povećava ekspresiju mBDNF i na taj način pojačava dugotrajnu potencijaciju (LTP), dok se ekspresija proBDNF povećava nakon niskofrekventne stimulacije što indukuje dugotrajnu depresiju (LTD) (Kowiański i sar., 2018).

Molekulski mehanizmi kojima BDNF utiče na hipokampalnu sinaptičku potencijaciju mogu biti kratkotrajni i dugotrajni, presinaptički i postsinaptički. U kratkoročne mehanizme regulacije spada regulacija oslobađanja neurotransmitera i modifikacija postojećih proteina i sinapsi, dok dugoročni mehanizmi podrazumevaju uticaj na ekspresiju gena i sintezu proteina. Prema mestu delovanja, uticaj BDNF na sinaptičku plastičnost može biti presinaptički ili postsinaptički. Presinaptički efekti predstavljaju regulaciju oslobađanja neurotransmitera, dok se postsinaptički efekti odnose na promenu ekspresije receptora, njihovih molekulskih karakteristika i regulaciju signalnih puteva (Edelmann i sar, 2015). BDNF povećava ekspresiju subjedinca NMDA receptora (Autry i Monteggia, 2012) i izaziva pojačano oslobađanje i reciklovanja vezikula.

Uočeno je da su od testosterona zavisne morfološke promene u CNS između ostalog, posredovane glavnim neurotrofičkim faktorom mozga-BDNF i njegovim ciljnim postsinaptičkim proteinom (*post-synaptic density protein 95*, PSD-95) (Auer i sar., 2016). Studije na glodarima su pokazale da smanjenje nivoa testosterona kod muškaraca posle orhidektomije smanjuje BDNF unutar hipokampusa, kao i kod određenih motoneurona (Scharfman i MacLusky, 2014; Verhovshek i Sengelaub, 2010). Pored toga, otkriveno je da hiperandrogenemija kod žena sa PCOS može biti u korelaciji sa povećanim nivoima BDNF-a (Russo i sar., 2012). Nadalje, pokazano je da promene u ekspresiji BDNF-a mogu uticati na ponašanje vezano uz anksioznost (Autry i Monteggia, 2012), iako neuronski krug uključen u te procese još uvek nije jasno definisan. Polimorfizam jednog nukleotida (SNP) kodirajućeg područja gena BDNF (Val66Met) identifikovan je kao faktor rizika za razvoj anksioznih poremećaja, uključujući posttraumatski stresni poremećaj (Jiang i sar, 2005). Još uvek nije utvrđena veza između BDNF, preživljavanja inhibicijskih interneurona i anksioznosti.

1.9. Polni hormoni i neurogeneza

Efikasnost adultne neurogeneze podrazumeva dve komponente: broj novostvorenih ćelija, kao i broj preživelih ćelija u određenoj tački vremena. Hipokampalna neuronska proliferacija je veća kod ženki (Galea i McEwen, 1999), dok je preživljavanje ćelija veće kod mužjaka glodara (Westenbroek i sar., 2004; Dalla i sar., 2009). Zavaljujući razlikama u hormonskom statusu među polovima, jasno proizilazi njihov uticaj na adultnu neurogenezu (Galea i sar., 2006). Brojne studije su pokazale da estradiol utiče na povećanje ćelijske proliferacije u subgranularnoj zoni dentatnog girusa hipokampusa (*eng. subgranular zone, SGZ*), ali i na smanjenje preživljavanja novostvorenih neurona kod ženki glodara, te da ovi efekti zavise od doze i vremena administracije (Ormerod i sar., 2003; Barker i Galea, 2008; Barha i sar., 2009). Uticaj testosterona na proliferaciju neurona u SGZ kao i u subventrikularnoj zoni (*eng. subventricular zone, SVZ*) takođe se pokazao pozitivnim, međutim pretpostavlja se da se ovi efekti ostvaruju preko estrogenskih receptora, zahvaljujući metaboličkoj konverziji testosterona u estrogen (Farinetti i sar., 2015). Nasuprot tome, testosteron i njegov metabolit, dihidrotestosteron, deluju pozitivno na proliferaciju i preživljavanje ćelija aktiviranjem i androgenih receptora. Ovo se ne odnosi na dentatni girus, koji najverovatnije odgovara na stimulaciju estrogenskih receptora $Er\alpha$ i $Er\beta$ (Hamson i sar., 2013; Mazzucco i sar., 2006). Umerena fizička aktivnost koja ima za posledicu sintezu dihidrotestosterona stimuliše neurogenezu u adultnom hipokampusu (Hojo i sar., 2012). Pretpostavlja se da se ovi efekti ostvaruju preko NMDA glutaminičkih receptora te aktivacijom sinteze BDNF i VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*) (Louissaint i sar., 2002).

Uticaj gonadnih hormona na neurogenezu i hipokampokampalne funkcije, uočen je u eksperimentima na ženkama glodara sa očuvanim estrusnim ciklusom (Galea i sar., 2006; Tanapat i sar., 1999). Ženke pacova u proestrusu (visok estradiol i progesteron) imaju lošiji rezultat u testovima prostornog učenja (ispitivan na Morisovom vodenom lavirintu) u poređenju sa ženkama u estrusu (nizak estradiol) (Warren i Juraska, 1997; Frye, 1995). Uloga stresa tokom proestrusa verovatno umanjuje uticaj estrusnog ciklusa (i hormona) na performanse prostornog pamćenja (Berry i sar., 1997). S ozirom da se kod ženki pacova koncentracije estrogen i progesteron menaju tokom estrusnog ciklusa, brojne studije su pokušale da utvrde doprinos svakog od ovih hormona na učenje i pamćenje. Chesler i Juraska (2000) su utvrdili da kod ovariektomisanih životinja administracija estradiola ili progesterona 4h pre testiranja u Morisovom vodenom lavirintu ne pokazuju značajan efekat, dok oba hormona administrirana zajedno utiču na lošiji ishod pamćenja. Za razliku od prethodnih studija, akutna administracija estradiola i progesterona odmah nakon treninga značajno poboljšava pamćenje položaja objekta (Berry i sar., 1997). Brojnim testovima je pokazano da je ovariektomija praćena lošijim kognitivnim funkcijama u žena, i ženki glodara (Shors i sar., 2002; Sherwin i Henry, 2008; Gibbs, 2010), dok tretman estradiolom može da poboljša kognitivne funkcije izazvane ovariektomijom (Bimonte-Nelson i sar., 2003). Nauka ne bi bila interesantna da ne postoje oprečni rezultati: ovariektomija oštećuje prostornu kogniciju kod adultnih, dok je poboljšava kod starijih žena (Barha i sar., 2015).

S obzirom na široku rasprostranjenost progesteronskih receptora na svim vrstama ćelija u nervnom sistemu, opravdan je razmotriti njegov uticaj na ponašanje, emocije, zapaljenske reakcije, funkciju mitohondrija, neurogenezu i regeneraciju, mijelinizaciju i oporavak u modelima traumatskog oštećenja mozga (Wright i sar., 2014). Verovanja u terapijske mogućnosti progesterona sežu čak do III faze kliničkih studija traumatskog oštećenja mozga, gde nije pokazana značajnija promena u odnosu na placebo (Skolnick i sar., 2014).

Adultna neurogeneza i veličina hipokampusa značajno su smanjeni u trudnoći (Rolls i sar., 2008) i kao posledično dolazi do smanjenja radne memorije i prostorne orijentacije u odnosu na negravidne žene (Henry i Sherwin, 2012). Oprečni zaključci dobijeni iz isto dizajniranih studija ukazuju da rezultati testova zavise od pola fetusa (Vanston i Watson, 2005). Zapravo, majke koje nose muški fetus imaju bolje rezultate na testovima (radne memorije i mentalne rotacije) i oni perzistiraju do 19 meseci nakon porođaja.

Adultna neurogeneza u hipokampusu, funkcionalna integracija mladih neurona u postojeće neuronske krugove i njihova funkcionalna uloga danas su predmet velikog broja istraživanja (Jessberger i Kempermann, 2003; Shors i sar., 2001). Eksperimentalni radovi ukazuju da smanjen nivo neurogeneze redukuje sposobnost učenja i prostornog pamćenja (dugotrajno i kratkotrajno) (Saxe i sar., 2006; Lopes da Silva i sar., 1986). Nasuprot jasnom odnosu neurogeneze i hipokampus - zavisnih oblika učenja i pamćenja, pokazano je da veći broj neurona nije siguran parametar boljeg ishoda u rešavanju kognitivnih testova (Jessberger i sar., 2007). Zahvaljujući razvoju imunohistohemijske metodologije, omogućeno je ispitivanje uticaja različitih egzogenih faktora na proliferaciju ćelija u hipokampusu i njihovo rano diferencijalno prepoznavanje. Zahvaljujući detekciji mitogenih proteina kao što je Ki67 u proliferišućim ćelijama hipokampusa i daljom detekcijom proteina specifičnih za neurone (NeuN) ili atrocite/gliju (GFAP) omogućen je uvidu potencijalne funkcionalne implikacije primenjenog egzogenog faktora.

Od posebnog značaja je rasvetliti ulogu inhibicijskih interneurona u anksioznosti i sličnim poremećajima (Selten i sar., 2018). Oni utiču na vremenski okvir sinaptičke ekscitacije i posledične inicijacije akcionog potnecijala, kontrolišući time vremenski usklađen tok informacija među neuronima (Pelkey et al., 2017). PV+ i NPY+ interneuroni imaju veoma značajnu ulogu u održavanju normalnog kognitivnog funkcionisanja (Verret i sar., 2012), cirkadijalnog ritma, uzimanja hrane (Levine i sar., 2004) i anksioznosti (Lin i sar., 2010). Specifična podvrsta NPY+ ćelija je veoma senzitivna na stress, uzrokujući smanjeno oslobađanje NPY, remeteći na taj način funkcionisanje neuronskih krugova u CA1 regiji hipokampusa, što sve zajedno potencijalno doprinosi anksioznosti (Li et al., 2017). Sa druge strane GABA-ergički interneuroni koji ekspimiraju kalcijum vezujući protein parvalbumin (PV) čine skoro 24% populacije interneurona CA1 regije (Bezair i Soltesz, 2013). Adekvatna aktivnost PV+ interneurona stoji u bazi osnovnog kognitivnog i emocionalnog ponašanja jedinki (Song i sar., 2013; Chevaleyre i Piskorowski, 2014), dok njihova poremećaj njihove funkcije, posebno u dentatnom girusu uzrokuje takođe anksioznost (Zou et al., 2016).

1.10. Oksidativni stres

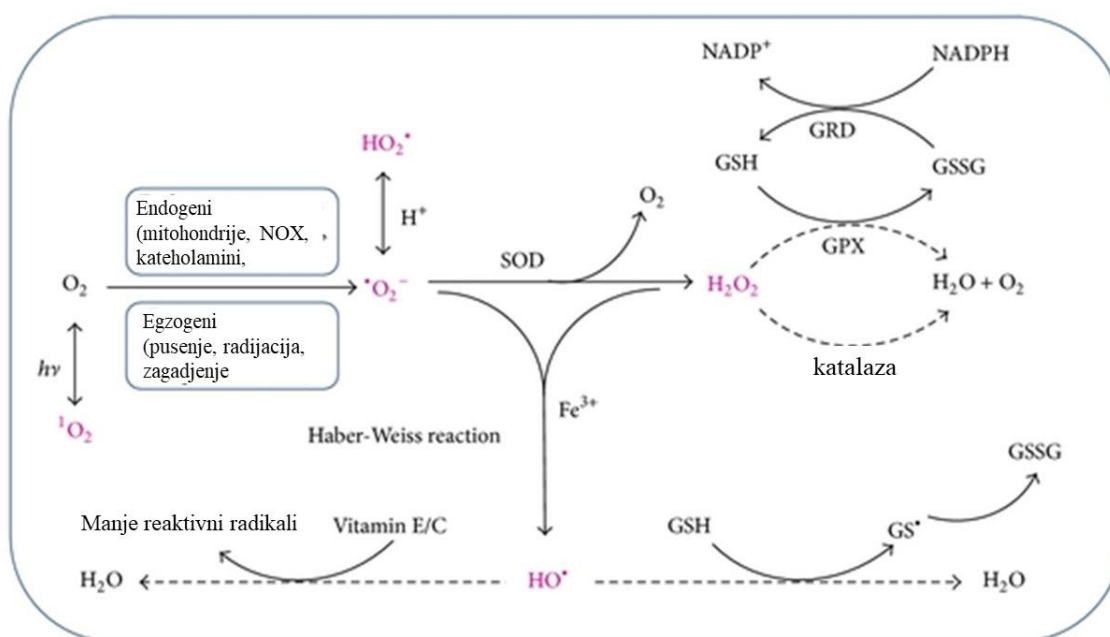
Oksidativni stres je poremećaj ravnoteže između produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng. reactive oxygen species*, ROS) i antioksidativne zaštite, što može rezultirati oštećenjem ćelije i tkiva (Pizzino, 2017). U ROS spadaju slobodni radikali i neradikalni oblici. **Slobodni radikali** su molekuli, atomi ili joni koji imaju jedan ili više nesparenih valentnih elektrona što ih čini izuzetno reaktivnim. Mnogi elementi mogu formirati slobodne radikale, ali su najzastupljenije reaktivne kiseonične i azotne vrste. U slobodne radikale spadaju: kiseonik (O_2^{\bullet}), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$), azot monoksid (NO^{\bullet}), peroksil (ROO^{\bullet}). U **neradikalne kiseoničke derivate** spadaju: vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina ($HOCl$), ozon (O_3), aldehyd ($HCOR$) i peroksinitrit ($ONOO^-$) (Halliwell i Gutteridge, 2007).

ROS mogu nastati tokom enzimskih i neenzimskih reakcija. **Enzimske reakcije** tokom kojih nastaju ROS su reakcije unutar respiratornog lanca, sinteze prostaglandina, fagocitoze i sistema citohroma P450. Slobodni radikali se mogu formirati u različitim biohemijskim procesima u telu uključujući redukciju molekulskog kiseonika tokom aerobne respiracije pri čemu nastaju $O_2^{\bullet-}$ i OH^{\bullet} . Mogu nastati takođe kao sporedni proizvod u reakcijama oksidacije kateholamina i aktivacije kaskadnog elektronskog lanca arahidonske kiseline koja redukuje molekulski kiseonik do $O_2^{\bullet-}$; tokom stvaranja $O_2^{\bullet-}$ i $HOCl$ koji su snazni oksidanti u fagocitima; tokom produkcije NO u vaskularom endotelu i u drugim ćelijama (Pizzino i sar., 2017; Genestra, 2007). Tokom **neenzimskih reakcija** ROS nastaju kada kiseonik reaguje sa organskom komponentom ili kada se ćelija izloži jonizujućem zračenju. ROS mogu nastati i pri delovanju intenzivnog elektromagnetnog zračenja, kao što su gama zraci koji razdvajaju vodu i nastaju OH^{\bullet} .

Molekulski kiseonik je radikal jer ima 2 nesparena elektrona u dve različite orbitale. On je nereaktivni biradikal koji može da izazove oksidaciju i oštećenje proteina i enzima. Molekulski kiseonik je

neophodan u procesima oksidativne fosforilacije u mitohondrijama u kojima nastaje ATP. O_3 takođe nije radikal, ali je snažan oksidujući agens koji može da izazove direktnu oksidaciju bioloških komponenti (Rao i Davis, 2001). $O_2^{\cdot-}$ nastaje tokom reakcija redukcije po dejstvu NADPH oksidaze, ksantin oksidaze i peroksidaze, a zatim učestvuje u reakcijama tokom kojih nastaju H_2O_2 , $\cdot OH$, $ONOO^-$ ili $HOCl$. $O_2^{\cdot-}$ takođe može nastati i u okviru kraćeg elektronskog transportnog lanca u endoplazmatskom retikulumu tokom sinteze proteina i biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata (Slika 1.5).

H_2O_2 je neradikalni oblik koji nastaje delovanjem aminokiselinskih oksidaza ili ksantin oksidaze. $\cdot OH$ je najreaktivniji slobodni radikal i nastaje u reakcijama $O_2^{\cdot-}$ sa H_2O_2 , u prisustvu Fe^{2+} ili Cu^+ kao katalizatora (Slika 1.5). $\cdot NO$ radikal ima brojne fiziološke uloge i nastaje oksidacijom arginina u citrulin pod dejstvom NO sintaze (NOS). Prekomerno stvaranje $O_2^{\cdot-}$ može da dovede do interakcije sa $\cdot NO$ i stvaranjem $ONOO^-$. **Peroksinitriti** su snažni prooksidanti koji mogu da difunduju i do 5 μm i utiču na susedne ćelije (Burton i Jauniaux, 2011).



Slika 1.5. Glavni putevi stvaranja i eliminacije ROS. ROS može nastati pod dejstvom egzogenih i endogenih faktora. Nastali $O_2^{\cdot-}$ može da reaguje sa H_2O_2 u prisutvu Fe^{3+} jona kao katalizatora i da nagradi $\cdot OH$. Višak $O_2^{\cdot-}$ se eliminiše pomoću SOD koja katalizuje dismutaciju $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 i O_2 . Nastali H_2O_2 se uklanja pomoću katalaza i GPx i kao krajnji produkt nastaju H_2O i O_2 . GPx katalizuje razgradnju H_2O_2 do vode uz učešće GSH kao donora elektrona, pri čemu se GSH oksiduje u GSSG. GSSG je moguće ponovo redukovati do GSH pomoću enzima GR uz učešće NADPH kao redukujućeg kofaktora. Vitamin E i C mogu da reaguju sa kiseoničkim radikalima i formiraju manje reaktivne radikale.

NADPH: nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat; NOX: NADPH oksidaza; XO: ksantin oksidaza; SOD: superoksid dismutaza; GSH: glutation; GSSG: glutation disulfid; GPx: glutation peroksidaza; GR: glutation reduktaza.

(Preuzeto iz Koben i Njyska, 2002)

Produkcija ROS može biti inicirana endogenim ili egzogenim uzrocima. Endogeni uzročnici produkcije ROS su aktivacija imunog odgovora, inflamacija, ishemija, infekcija, tumori, prekomerno vežbanje, stres i starenje. U egzogene uzročnike produkcije ROS ubrajamo zagađivače sredine, teške metale,

neke lekove (ciklosporin, gentamicin), organske raztvarače, pušenje, alkohol i zračenje (Valko i sar., 2005). U niskim koncentracijama, ROS imaju značajne fiziološke uloge. Fagociti sintetišu i deponuju slobodne radikale u cilju odbrane od patogena, superoksid anjon je značajan za odbranu od infekcija. Slobodni radikali su deo brojnih signalnih puteva. NO je slobodni radikal i signalni molekul koji je značajan za modulaciju protoka krvi, normalnu nervnu aktivnost i nespecifičnu odbranu organizma (uklanjanje nespecifičnih patogena i tumora).

Antioksidativna zaštita je sistem koji sprečava stvaranje i uklanja već stvorene slobodne radikale. Razlikujemo enzimsku i ne-enzimsku antioksidativnu zaštitu. Antioksidans je bilo koja supstanca koja može da spreči oksidaciju supstrata. Enzimska antioksidativna zaštita predstavlja prvu liniju odbrane i čine je: superoksid dismutaza, katalaza, glutation reduktaza i glutation peroksidaza.

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim, metaloprotein koji katalizuje transformaciju $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 i kiseonika. Razlikujemo tri vrste SOD: bakar/cink (Cu/Zn SOD) koja je zastupljena u citoplazmi, mangan (Mn SOD) u mitohondrijama i ekstracelularna SOD koja se nalazi u plazmi, limfi, likvoru. Krajnji produkt tokom dismutacije $O_2^{\cdot-}$ je H_2O_2 koji se uklanja delovanjem katalaze i glutation peroksidaze.

Katalaza (CAT) je enzim, metaloprotein, koji razlaže H_2O_2 do vode i kiseonika i aktivan je pri visokim koncentracijama H_2O_2 . Sastoji se iz 4 proteinske subjedinice i 4 hema koji sadrže Fe^{+3} . Tokom reakcije sa prvim molekulom H_2O_2 dolazi do oksidacije gvožđa u Fe^{+4} i nastaje Komponenta I koja stupa u reakciju sa drugim molekulom H_2O_2 koji joj predaje još jedan elektron (Kohen i Nyska, 2002).

Glutation peroksidaza (GPx) za razliku od katalaze, uklanja H_2O_2 i pri niskim koncentracijama. Donor elektrona je glutation (GSH) i za uklanjanje jednog molekula H_2O_2 potrebno je utrošiti 2 molekula glutationa, a krajnji proizvod reakcije je oksidovani glutation (glutation disulfid - GSSG) i voda. Tokom oksidacionog stresa koncentracija GSH se smanjuje, dok se GSSG povećava. GSH se nadoknađuje de novo sintezom ili redukcijom GSSG.

Glutation reduktaza (GR) je enzim glutation redoks ciklusa koji katalizuje redukciju GSSG u GSH uz učešće NADPH kao redukujućeg faktora (Chance i sar., 1979).

U antioksidativne enzime spada i **glutation-S-transferaza** koja katalizuje konjugaciju GSH i elektrofilnih jedinjenja koja nastaju tokom oksidativnog stresa.

Neenzimski antioksidansi predstavljaju drugu liniju odbrane. To je heterogena grupa jedinjenja koja se nalaze u organizmu ili se unose putem hrane. U neenzimske oksidanse se ubrajaju vitamini (C i E), koenzim Q, proteini (ceruloplazmin, transferin) i glutation. Bilirubin i mokraćna kiselina takođe poseduju antioksidaciona svojstva (Betteridge, 2000).

Slobodni radikali imaju nesparene valentne elektrone što ih čini nestabilnim i visokoreaktivnim. U reakciji slobodnih radikala sa biološkim makromolekulima, proteinima, ugljenim hidratima, lipidima dolazi do lančane reakcije u kojoj se stvaraju novi slobodni radikali koji zatim reaguju sa novim makromolekulima. Prekomerno stvaranje $OH\cdot$ i $ONOO^-$ može da izazove lipidnu peroksidaciju i oštećenje membrana i lipoproteina. Tokom lipidne peroksidacije formira se malonilaldehid (MDA) i konjugovani dieni, koji imaju citotoksično i mutageno dejstvo. Oksidativni stres izaziva konformacione promene proteina što može dovesti do oštećenja ili gubitka enzimske aktivnosti (Halliwell, 2007). Nuklearna i mitohondrijalna DNK su podložne oštećenju usled oksidativnog stresa. $OH\cdot$ 8-okso-2-dezoksiguanozin (8-OHdG) koji se formira je odgovoran za mutacije, a njegova koncentracije u tkivu može se koristiti kao marker oksidativnog stresa (Nishida i sar., 2013).

Mozak je posebno osetljiv na oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom zbog broja mitohondrija kojima obiluje, visokih zahteva za kiseonikom, niskog reparatornog kapaciteta, te prisustva visoke koncentracije polinezasićenih masnih kiselina (Halliwell, 2007). Relativni ili stvarni višak slobodnih radikala u mozgu izaziva oštećenje membrana, proteina, lipida i DNK, što može narušiti preuzimanje/oslobađanje neurotransmitera i aktivnosti jonskih kanala (Pearson-Smith i Patel, 2017). Na ovaj način, slobodni kiseonični radikali u mozgu narušavaju dugotrajnu potencijaciju, sinaptičku transmisiju i neuroplastičnost (Knapp i Klann, 2002; Salim, 2017). Slobodni radikali koji imaju ulogu

signalnih molekula povećavaju permeabilnost krvno-moždane barijere, indukuju neuroinflamaciju i ćelijsku smrt neurona (Gu i sar., 2011).

Zbog svega navedenog, smatra se da je oksidativni stres značajan etiopatogenetski factor nastanka neurodegenerativnih (Li i sar., 2013), cerebrovaskularnih (Salim, 2017) i psihijatrijskih poremećaja (Maes i sar., 2011). Veća prevalenca neurodegenerativnih oboljenja, Parkinsonove bolesti i Alchajmerove demencije kod osoba muškog pola ukazala je na pozitivnu korelaciju između koncentracije androgenih hormona i oksidativnog stresa koji se nalazi u osnovi ovih oboljenja. Pokazano je da u uslovima postojećeg oksidativnog stresa, kao na primer kod Parkinsonove bolesti ili ishemijskog moždanog udara, androgeni dodatno stimulišu stvaranje slobodnih radikala (Cunningham i sar., 2011). Ipak, brojnim dokazima je opisano neuroprotektivno dejstvo polnih hormona (Carroll i Rosario, 2012). Ispitivanja su pokazala da estrogeni imaju antioksidativnu aktivnost u CNSu, te da sprečavaju potencijalna oštećenja izazvana oksidativnim stresom (Numakawai sar., 2011). Egzogeno administrirana estrogena u populaciji postmenopauzalnih žena redukovala je prevalencu Alchajmerove bolesti (Baldereschi i sar., 1998) i a kod muškaraca je poboljšala kliničke simptome Parkinsonove bolesti (Adams i Kumar, 2013). Testosteron takođe ispoljava parcijalno neuroprotektivno dejstvo kod pacijenata sa multiplom sklerozom (Kurth i sar., 2014), a rezultati određenog broja eksperimentalnih studija su pokazali da testosteron ima antioksidativno dejstvo (Fanaei i sar., 2014). Činjenica da se moždanom tkivu nalazi aromataza, te da se testosteron konvertuje u estrogen, kroz brojne eksperimentalne studije nametnula je pitanje regulacije ovih hormona u uslovima povećanog oksidativnog stresa. Jasno je da su efekti testosterona zavisni od preduslova u koji ispoljava svoje dejstvo (Morakinyo i sar., 2014; Victor i sar., 2009).

Brojni rezultati ispitivanja pacijenata sa PCOS ukazuju na prisustvo visokog nivoa cirkulišućih markera oksidativnog stresa: malondialdehida (MDA, jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije), homocisteina i visoku aktivnost superoksid dizmutaze, dok su nivoi antioksidanasa - glutationa i aktivnost paroksonaze 1, bili sniženi (Murri i sar., 2013). Hiperandrogenemija, kao jedna od fenotipskih karakteristika PCOS, pozitivno korelira sa povišenim oksidativnim stresom. Ispitivanjem uticaja hiperandrogenemije majki na parametre oksidativnog stresa u plazmi potomaka ovaca, nađene su visoke vrednosti ovih parametara (Puttabyatappa M. i sar., 2017). Administrirajući antagonist gonadotropnog hormona kod potomaka ovaca androgenizovanih u neonatalnom period, Nóbrega i saradnici (2019) su našli samo delimičnu regulaciju parametara povećanog oksidativnog stresa.

Poređenjem osetljivosti moždanih regiona: hipokampus, prefrontalne kore mozga i cerbeluma, na oksidativni stres u uslovima nedostatka testosterona (orhiektomije), nađena je posebna osetljivost dentatnog girusa hipokampus (Vandresen-Filho i sar., 2015). Oksidativni stress može izazvati poremećaj ekscitabilnosti neurona i time doprineti razvoju epilepsije (Shin i sar., 2011).

2. CILJEVI

Uzimajući u obzir dosadašnja saznanja o kompleksnim uticajima polnih hormona u osetljivim periodima razvoja, postavljeni su sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati uticaj kasne prenatalne androgenizacije testosteron undekanoatom na antropometrijske karakteristike, karakteristike reproduktivnog fenotipa i građu jajnika adultnih ženskih potomaka.
2. Utvrditi uticaj kasne prenatalne androgenizacije testosteron undekanoatom na metaboličke karakteristike, serumsku koncentraciju steroidnih hormona i parametre oksidativnog stresa kod adultnih ženskih potomaka.
3. Ispitati uticaj prenatalne androgenizacije na parametre anksioznog ponašanja i bolnu osetljivost adultnih ženskih potomaka.
4. Ispitati uticaj prenatalne androgenizacije na bihejvoralne i elektroencefalografske osobine epilepsija izazvanih DL homocistein tiolaktonom kod adultnih ženskih potomaka.
5. Utvrditi da li je kasna prenatalna androgenizacija uticala na zastupljenost pojedinih ćelija i neurotrofina u korteksu i hipokampusu adultnih ženskih potomaka, metodom imunohistohemije ili Western blota.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćene ženke pacova soja *Wistar* albino (starosi: 75-90 dana, telesne mase 180-200 g), a potom i njihovi ženski potomci.

Životinje su nabavljene iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu, i čuvane u polikarbonatnim kavezima dimenzija: 55x35x30 cm, pod standardnim ambijentalnim uslovima za životinje: temperatura 21-22 °C; vlažnost: 55-65%; ciklusi svetla/tame 12 sati, sa početkom svetlog perioda u 08:00 h. Sve vreme trajanja eksperimenta voda i hrana su bili dostupni *ad libitum*.

Svi eksperimentalni postupci su bili u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (86/609/EEC) i odobreni od strane Etičkog komiteta za brigu o životinjama Univerziteta u Beogradu (licenca broj 323-07-06141/2015-05/11).

3.2. Eksperimentalni protokol

Eksperiment je započet sparivanjem ženki i mužjaka pacova. Za prvi dan graviditeta uzet je onaj kada je u vaginalnom razmazu uočeno prisustvo spermatozoida (Ypsilantis P. i sar., 2009). Gravidne ženke (n = 12) su potom bile pojedinačno smeštene u kavezima, i nasumično podeljene u dve grupe: eksperimentalnu (TUM, n = 6) i kontrolnu (Km, n = 6). Dvadesetog dana gestacije eksperimentalne ženke pacova su tretirane testosteron undekanoatom u dozi od 100 mg/kg, dok je kontrolna grupa tretirana ricinusovim uljem. Supstance su davane subkutano (s.c.).

Drugog postnatalnog dana (PD) prebrojan je ukupan broj potomaka, i ostavljeni su u kavezu sa majkama do 21. PD. 21.PD potomci su odvojeni od majki, prebrojani su muški i ženski potomci, i u daljem toku eksperimenta su korišćeni samo ženski potomci eksperimentalne (TU; n = 38) i kontrolne grupe (K; n = 38). Životinje kontrolne i eksperimentalne grupe su smeštane po 2 do 3 životinje u isti kavez da bi se izbegao efekat socijalne izolacije. Tokom čitavnog toka eksperimenta, meren je dnevni unos hrane, dok je telesna masa merena jednom nedeljno.

U daljem toku eksperimenta, počevši od 50. PD registrovani su sledeći parametri:

- cikličnost i faze estrusnog ciklusa
- parametri maskulinizacije
- intraperitonealni test tolerancije na glikozu
- ponašanje povezano sa anksioznošću
- bolna osetljivost
- Bihejvioralne i EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja izazvanog administracijom D,L-homocistein tiolaktona

Specijalnom giljotinom za pacove, životinje su 85-90. PD žrtvovane bez anestezije, u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa, te su *post mortem* učinjene sledeće analize:

- analiza koncentracije hormona u serumu
- analiza nivoa BDNF proteina u strukturama mozga

- imunohistohemijska analiza ekspresije markera neuro i glijageneze.
- analiza parametara oksidativnog stresa u strukturama mozga
- uzorkovanje i *histomorfološka* analiza jajnika

3.3. Eksperimentalne metode

3.3.1. Telesna masa i unos hrane

Visoke koncentracije testosterona tokom trudnoće su udružene sa malom telesnom masom potomaka na rođenju u ljudi i životinja (Carlsen i sar., 2006.). Telesna masa ženskih potomaka u K i TU grupi (n = 28 po grupi), prvi put je merena nakon odvajanja od majke 24. dana života a zatim jednom nedeljno do navršene 11. nedelje starosti. Unos hrane je meren svakodnevno, od 7. do 11. nedelje života, a zatim je izračunat prosečan dnevni unos tokom nedelju dana (n= 28 po grupi).

3.3.2. Karakteristike reproduktivnog fenotipa

U cilju određivanja karakteristika reproduktivnog fenotipa u K i TU grupi (n = 28 po grupi) su utvrđene: vreme vaginalnog otvaranja, parametri masulinizacije – anogenitalna distanca, indeks anogenitalne distance i karakteristike estrusnog ciklusa. Vreme vaginalnog otvaranja utvrđeno svakodnenim posmatranjem ženskih potomaka od 30. dana života do pojave vaginalnog otvaranja.

3.3.2.1. Karakteristike legla

Drugog postnatalnog dana utvrđena je veličina svakog legla Km i Tm majki (n = 6 po grupi). Izbrojan je ukupan broj potomaka, broj muških i ženskih potomaka svake gravidne ženke. Nakon odvajanja od majke, 24. dana starosti registrovan je broj preživelih muških i ženskih potomaka i ukupan broj preživelih potomaka te je izračunat procenat preživljavanja u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi.

3.3.2.2. Parametri maskulinizacije

Anogenitalna distanca (AGD) predstavlja rastojanje između anusa i baze genitalne papile i pokazatelj je stepena intrauterine androgenizacije i posledične maskulinizacije. Merenje AGD je vršeno na polno zrelim ženkama oko 70 ± 2 dana starosti (n=12 po grupi). AGD je merena digitalnim kaliperom kao rastojanje između baze genitalne papile i proksimalne ivice analnog otvora. Obzirom da velika varijabilnost AGD može biti posledica različite telesne mase životinja, uveden je novi parametar – indeks anogenitalne distance (AGDI) koji se izračunava po formuli (Vandenbergh i Huggett, 1995):

$$AGDI = \frac{AGD}{TM} \times 100\%$$

3.3.2.3. Karakteristike estrusnog ciklusa

Faze estrusnog ciklusa određivane su uzorkovanjem vaginalnog brisa svakog jutra tokom 15 dana (65. - 80 PD). Uzorci su bojeni hematoksinom i analizirani pod svetlosnim mikroskopom (uveličanje 10x ili 20x). U laboratorijskih pacova, estrusni ciklus traje između 4-6 dana i sastoji se od sledećih faza: proestrus, estrus, diestrus 1 (ili metaestrus) i diestrus2. Faze estrusnog ciklusa su određivane na osnovu prisustva i zastupljenosti različitih vrsta ćelija: kornifikovanih ćelija, okruglih epitelnih ćelija i leukocita.

Proestrus traje oko 12 h i tokom ove faze koncentracija estradiola naglo raste i pozitivnom povratnom spregom stimuliše lučenje gonadotropina što izaziva ovulaciju. Estrus traje između 24 i 48 h i

ovulacije se odigrava tokom ove faze. Proestrus i estrus čine folikularnu fazu estrusnog ciklusa. Proestrus se identifikuje na osnovu prisutva okruglih epitelnih ćelija sa jedrom, koje mogu biti grupisane u klastere, dok je za estrus karakteristično prisustvo kornifikovanih ćelija neparvilnog oblika i naboranih ivica. Metaestrus, često se naziva diestrus 1, predstavlja tranzicioni period tokom prvog dana diestrusa, i traje 6-8h. Ukoliko nakon ovulacije ne dodje do oplodjenja, formira se corpus luteum koji sekretuje progesteron. Tokom diestrusa 1, žuto telo sekretuje progesteron, a tokom diestrusa 2 koncentracija progesterona se smanjuje. Diestrus 2 je najduža faza estrusnog ciklusa i može trajati od 48 do 72 h. Tokom diestrusa koncentracije estrogena i progesterona su vrlo niske. (Joksimovic i sar., 2017). Diestrus 1 odlikuje ga prisustvo kornifikovanih, okruglih epitelnih ćelija i leukocita. Prisustvo okruglih epitelnih ćelija je uobičajeno za prvi i drugi dan diestrusa kada su često prisutni i leukociti. Zastupljenost leukocita varira i tokom drugog dana diestrusa (diestrus 2) u razmazu se često mogu naći isključivo leukociti. Krajem diestrusa 2 u razmazu se mogu uočiti nakupine okruglih epitelnih ćelija sa jedrom koje najavljuju pojavu proestrusa tokom narednog dana. Ukoliko estrusni ciklus traje 5 dana, diestrus može trajati i čitavih 3 dana. U zavisnosti od doba dana kada se uzimaju brisevi, histološka slika se može značajno razlikovati: ukoliko se brisevi uzimaju rano izjutra, u brisevima se često očava tranzicija između prethodnog i aktuelnog dana. Slično se može uočiti i ukoliko se brisevi uzimaju tokom popodneva. Stoga se preporučuje da se vaginalni brisevi uzorkuju uvek u isto vreme.

U cilju analize karakteristika estrusnog ciklusa analizirani su sledeći parametri: medijana trajanja ciklusa i medijana trajanja pojedinačnih faza (diestrus, proestrus, estrus), reproduktivna cikličnost i distribucija pojedinačnih faza estrusnog ciklusa. Trajanje estrusnog ciklusa meri se brojem dana do ponovljene estrusne faze. Distribucija pojedinačnih faza estrusnog ciklusa predstavlja procentualni udeo trajanja neke faze u odnosu na ukupno trajanje estrusnog ciklusa (n=20 po grupi).

3.3.2.4. Histološka analiza jajnika

Nakon žrtvovanja izolovani ovarijumi su fiksirani u 4% paraformaldehidu (Sigma-Aldrich, USA) koji je puferovan 0.1 M fosfatnim puferom (PBS, pH=7,4), u trajanju od 24 h. Nakon fiksacije, organi su dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije (30-100%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), prosvetljeni u ksilolu (Ksilol, Zorka Pharma-Hemija, Srbija); kalupljenje u parafinu (Bio-plastextra, Biooptica, Italy). Nakon dobijanja kalupa, tkivo je sečeno na preseke debljine 3 μ m, rotacionim mikrotomom. Nakon sušenja preseki su pripremljeni za histološko bojenje.

Za vizuelizaciju građe ovarijuma korišćeno je osnovno histološko bojenje hematoksilin-eozin. Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidratacije preseka u seriji etanola opadajuće koncentracije (100-96-70%), preseki su bojeni Mayer-ovim hematoksilinom (Merck-Alkaloid, BJR Macedonia) u trajanju od 5 minuta, a zatim eozinom u trajanju od 3 minuta. Zatim je sledila dehidratacija u seriji etanola rastuće koncentracije (96-100%), i montiranje pokrovnog stakla DPX-om (Fluka, Switzerland). Na histološkim preparatima.

3.3.3. Metabolički parametri

3.3.3.1. Koncentracija glikoze i triglicerida u serumu

Životinjama K i TU grupe (n = 8 po grupi) je u periodu 60-70. dana starosti i 12 h nakon restrikcije hrane, tokom diestrusne faze ciklusa uzimana krv iz repne vene i mereni su:

- Glikoza - aparat Contour Plus (Bayer HealthCare, LLC) i odgovarajuće (istoimene) trake (merni opseg 0,6 - 33,3 mmol/L)
- Trigliceridi - aparat Accutrend Plus (Roshe Diagnostics, USA) i odgovarajuće trake (merni opseg 0.80–6.86)

3.3.3.2. Intraperitonealni test tolerancije na glikozu

U cilju određivanja homeostaze glikoze i rezistencije na insulin, 12h nakon restrikcije hrane, životinjama K i TU grupe (n=8 po grupi) je intraperitonealnim putem (i.p) aplikovana injekcija glikoznog rastvora (50%) u dozi od 2 g/kg telesne mase. Nakon 30, 60, 90 i 120 min uzimana je kap krvi iz repne vene zarad analize nivoa glikoze koja je vršena uz pomoć komercijalnih test traka i elektronskog čitača (*Contour plus, Bayer*, senzitivnost aparata 0,6-33,3 mmol/L).

3.3.4. Određivanje koncentracije hormona u serumu

Uzorci krvi K i TU grupe (n=8 po grupi) dobijeni su neposredno nakon dekapitacije na giljotini koja je vršena 85-90. PD u diestrusnoj fazi ciklusa, u periodu između 11č i 13č. Krv je uzimana nakon noći tokom koje je životinjama uskraćena hrana, sa ciljem redukcije cirkadijalnih promena adhenzionih molekula koji potencijalno mogu biti vezani sa oslobađanjem kortizola ili unosom hrane. Uzorkovanje krvi vršeno je korišćenjem Vacutainer® epruveta za serume. Epruvete su okretane 5 puta i potom ostavljene 30min na sobnoj temperaturi da se krv zgruša, praćeno sa još 30min na temperaturi od 4°C. Serum i krvne ćelije su razdvojene centrifugiranjem (15min, 3000rpm). Uzorci seruma čuvani su na -80°C.

Koncentracije hormona: testosterona, estradiola, progesterona i kortikosterona merene su u uzorcima seruma po uputstvima proizvođača korišćenjem sledećih komercijalnih eseja:

- Testosteron ELISA esej za pacove (*Cusabio, Houston, USA*). Senzitivnost testa: <0,06ng/ml.
- Estradiol ELISA esej za pacove (*Cusabio, Houston, USA*). Senzitivnost testa: 40pg/ml-1400 pg/ml
- Progesterone ELISA esej za pacove (*Cusabio, Houston, USA*). Senzitivnost testa: <0,02ng/ml.
- Kortikosteron ELISA esej za pacove (*IDS, American Laboratory Products Co*). Senzitivnost testa: < 0,17 ng/ml.

Rezultati su izračunati pomoću standardne krive koja je konstruisana u programu "Curve Expert 1.4". Svaki uzorak urađen je u duplikatu.

3.3.5. Oksidativni stres

U cilju analize parametara oksidativnog stresa i antioksidativnih kapaciteta iz svake grupe izdvojeno je po 6 životinja. Nakon dekapitacije, izolovane su strukture mozga, koje su zatim trenutno zamrzavane u tečnom azotu i potom čuvane na -85°C. Dorzolateralni prefrontalni korteks i hipokampus su preparisani na hladno i homogenizovani u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25 M/L saharoze, 10 mmol/L K/NaPO₄ pufer pH 7,0 i 1 mmol/L EDTA) nakon čega je izdvojena neprečišćena sinaptozomalna frakcija po metodi Whittakera (1972). Homogenizovano tkivo je potom centrifugirano na 1000xg 15 minuta. Supernatanti su centrifugirani 30 minuta na 20000xg, a dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule (mikrozome) glatkog i granulisanog endoplazmatičnog retikuluma, Goldžijevog aparata i plazma membrane kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je potom resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen 60 minuta na +4° C uz povremeno mešanje. Ovako resuspendovan talog je zatim centrifugiran na 1700xg 15 minuta. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome. Neprečišćena sinaptozomalna frakcija je čuvana na -80° C.

U korteksu i hipokampusu pacova, spektrofotometrijskom metodom su određeni sledeći parametri oksidativnog stresa: koncentracija malondialdehida (MDA), aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), koncentracija sulfhidrilnih grupa (SH) i nitrotirozina.

Nivo lipidne peroksidacije je određen na osnovu koncentracije malondialdehida (MDA) u sinaptosomalnoj frakciji pomenutih struktura mozga. Naime, tiobarbiturna kiselina nakon stimulacije lipidne peroksidacije reaguje sa MDA oslobođenim iz polinezasićenih masnih kiselina stvarajući obojeni kompleks čija se apsorbcija meri spektrofotometrijski na 533 nm (Rehncrona i sar., 1980). Rezultati su izraženi kao nmol MDA/ mg proteina.

Aktivnost SOD je određivana kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini (Sun and Zigman, 1978). Aktivnost ukupne SOD određuje se kinetički, kao promena apsorbcije u vremenu (5 min) na talasnoj dužini od 480 nm.

Određivanje aktivnost GPx vršeno je po metodi koja se zasniva na oksidaciji redukovano glutathiona sa iskorišćavanjem redukovano nikotin-amid-adenin dinukleotid-fosfata (NADPH) u reakciji koju katalizuje enzim glutathion reduktaza. Meru aktivnosti glutathion peroksidaze u kuplovanoj reakciji sa glutathion reduktazom, predstavlja promena apsorbcije merena na 340 nm kao posledica potrošnje NADPH+H⁺ (Gunzler i sar., 1974).

Određivanje koncentracije sulfhidrilnih grupa (SH) vršeno je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Ellman-ovog reagensa (5,5' ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina - DTNB) po metodi Sedlak i Lindsay (1968). DTNB se redukuje u prisustvu SH grupa u nitromerkaptobenzoični kiselni anjon žute boje. Sulfhidrilne grupe su određivane merenjem absorbance na 412 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina.

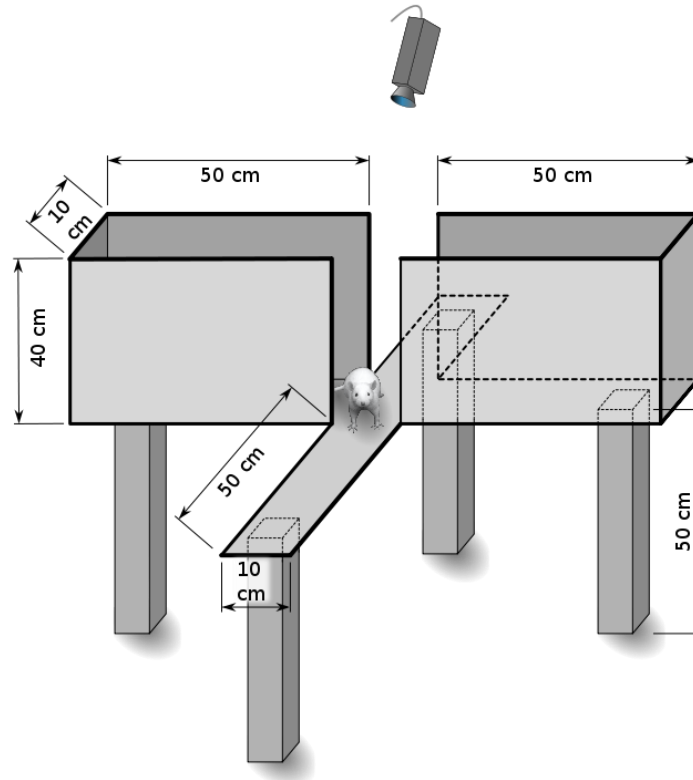
Za određivanje nitrotirozina korišćen je kompetitivni enzimski imunoesej (OxiSelect™ ELISA kits, Cell Biolabs). Osetljivost za nitrotirozin je u opsegu 20 nM do 8.0 μM. U svakom pakovanju se nalazi dovoljno reagensa za izvođenje 96 eseja, uključujući i standardnu krivu i proteinske uzorke.

3.3.6. Bihevioralni testovi

Anksiozno ponašanje ispitano je testiranjem u uzdignutom krstastom lavirintu i testu otvorenog polja. Testiranje je vršeno 70-75. dana života, tokom svetle faze ciklusa dan-noć. Ženski potomci eksperimentalne (T) i kontrolne grupe (K), (n=12 po grupi), testirane su u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa.

3.3.6.1. Uzdignuti krstasti lavirint

Testiranje životinja u uzdignutom plus lavirintu korišćeno je za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću (Walf i Frye, 2007). Uzdignuti plus lavirint se sastoji od dva otvorena i dva zatvorena kraka (kraci 50 x 10 cm, zidovi visine 40cm) koji su izdignuti iznad podloge (50 cm) (Slika 3.1). Životinja se postavlja u centralni deo lavirinta i ostavlja se da tokom 5 min samostalno istražuje lavirint. Ponašanje i kretanje svake životinje beleženo je kamerom (HicVision Bullet 2612), a zatim je analizirano od strane nezavisnog eksperimentatora. Analizirani parametri ponašanja bili su: broj ulazaka u otvorene i zatvorene krake; vreme provedeno u otvorenim i zatvorenim kracima; broj poniranja glave ispod nivoa otvorenih kraka i ukupan broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih kraka. Ulazak u krak definisan je ulaskom sva 4 ekstremiteta životinje.



Slika 3.1. Shematski prikaz uzdignutog krstastog lavirinta

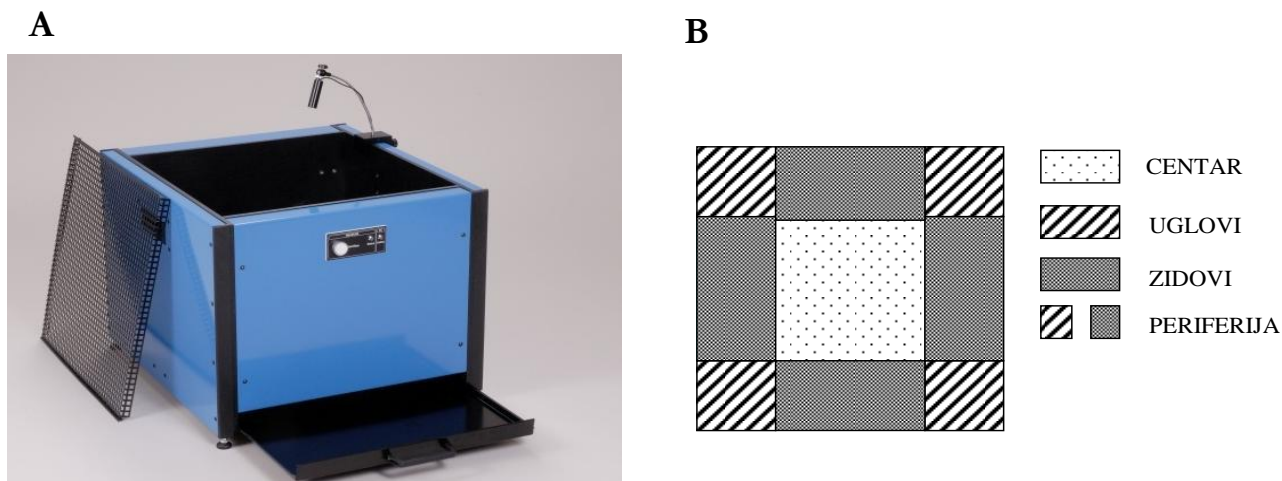
Test se zasniva na urođenoj potrebi pacova da istražuju novu sredinu i urođenom strahu od nazaštićenih, svetlih i uzdignutih površina, koje su predstavljene otvorenim kracima. Izbegavanje otvorenih kraka je karakteristično za anksiozne životinje. Brojni faktori utiču na bazalnu aktivnost životinja u uzdignutom krstastom lavirintu: smeštaj životinja, osvetljenje, cirkadijalne varijacije, rukovanje i izalaganje stresorima. Parametri koje možemo da registrujemo ukazuju na različite aspekte anksioznog ponašanja; ukupan broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih kraka su pokazatelj lokomotorne aktivnosti, dok je vreme provedeno u otvorenim kracima ili procenat vremena proveden u otvorenim kracima je pokazatelj anksioznosti. Pored pomenutih parametara, uvedene su i druge etološke varijable, kao što je procena rizika poniranja glave ispod nivoa međa, propinjanje na zadnje noge, defekacija. Naime, tokom boravka u otvorenim kracima, povećava se koncentracija kortikostserona u plazmi što je u pozitivnoj korelaciji sa ponašanjem koje je u vezi sa procenom rizika (istegnut položaj, fokusirana pažnja). Posle ispitivanja svake pojedinačne životinje, lavirint je čišćen 70% etanolom.

3.3.7.2. Otvoreno polje

Test otvorenog polja se koristi za ispitivanje lokomotorne aktivnosti, eksplorativnog ponašanja i anksioznosti. Neposredno po završetku testiranja u uzdignutom plus lavirintu životinja je podvrgnuta ispitivanju u testu otvorenog polja. Test se izvodi u zvučno izolovanoj kutiji sa infracrvenim zracima (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska), i tokom 30 min registruje se aktivnost životinje (Slika 3.2). Automatsko registrovanje ponašanja se vrši pomoću automatizovanog sistema sa infracrvenim senzorima, a potom se analizira pomoću pratećeg softvera (Conducta 1.0). Sistem registruje horizontalnu i vertikalnu aktivnost životinja. Osnova zvučno izolovane kutije – otvorenog polja (površine 48 x 48 cm, zidova visine 40 cm) podeljena je na 16 kvadrata i osvetljena crvenim svetlom jačine 12 luxa. Analizirani su sledeći

parametri eksplorativnog ponašanja i lokomocije: ukupan pređeni put i vreme ambulacije; broj ulazaka i vreme provedeno u centralnom delu otvorenog polja (4 srednja kvadrata), broj propinjanja na zadnje noge i indeks tigmotaksije. Posle ispitivanja svake pojedinačne životinje, otvoreno polje je čišćeno 70% etanolom.

Svaki od registrovanih prametara je pokazatelj modaliteta ponašanja. Ukupan put i vreme ambulacije, kao i broj propinjanja na zadnje noge je pokazatelj lokomotorne aktivnosti, ali u iznesoj meri može da ukazuje i na eksplorativno ponašanje i anksioznost.

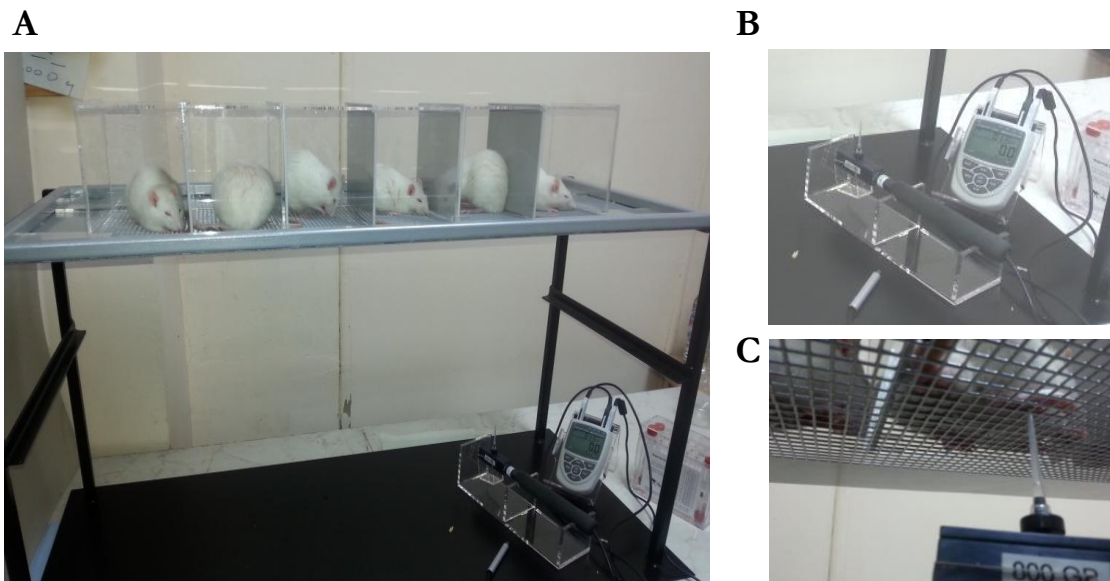


Slika 3.2. Prikaz aparature za automatsko registrovanje ponašanja A. Zvučno izolovana kutija sa infracrvenim senzorima; B. Shematski prikaz osnove kutije i podele na centralno i periferna polja.

Povećanje ovih parametara ukazuje na povećanu lokomotornu aktivnost i eksploraciju i/ili smanjenu anksioznost. Broj ulazaka u centralno polje i vreme provedeno u centru je pokazatelj eksplorativnog ponašanja i anksioznosti; povećanje ovih parametara ukazuje na povećanu eksploraciju i smanjenu anksioznost. **Indeks tigmotaksije** predstavlja odnos pređenog puta u perifernim zonama i ukupnog pređenog puta tokom ambulatornog kretanja, i jedan je od najznačajnijih pokazatelja anksioznog ponašanja (Simon i sar., 1994). Kao jedan od parametara anksioznosti može se koristiti i registrovanje defekacije i uriniranja tokom izodjenja testa (Hall, 1934), premda neki autori osporavaju značaj ovih prametara u proceni stepena anksioznosti, i smatraju da su oni bolji pokazatelji emotivnosti (Lister, 1990).

3.3.7. Test bolne osetljivosti

Ispitivanje bolne osetljivosti vršeno je određivanjem praga bola za mehaničke stimulse pomoću električnog *von Frey* esteziometra (IITC Life Sciences, Kalifornija, SAD), perpendikularnom aplikacijom rigidnog polipropilenskog filameta prečnika vrha od 0,8 mm (Slika 3.3 B,C). Testiranje je vršeno nakon okončanih bihejvioralnih testova (n=12 po grupi), 70-75. dana života, tokom svetle faze ciklusa dan-noć, u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa.



Slika 3.3. Prikaz opreme za testiranje bolne osetljivosti. A. transparentni polikarbonatni kavezi na perforiranoj podlozi; B. von Frey esteziometar; C. aplikovanje filameta esteziometra

Pacovi su postavljeni na standardnu platformu sa transparentnim odeljcima od pleksiglasa i kribriformnom metalnom podlogom kroz koju je omogućen pristup plantarnoj strani šape. Pre testiranja, životinje su adaptirane na uslove testiranja tako što su provodile u odeljcima od pleksiglasa dva puta po 15 minuta tokom 24 h (Slika 3.3A). Rigidni filament esteziometra (Slika 3.3B) je aplikovan na centralni deo plantarne strane zadnje šape silom postepeno rastućeg intenziteta, sve do pojave refleksa uklanjanja (Slika 3.3C). Ostvaren je maksimalni intenzitet sile do 300g, kako bi se izbegla mogućnost povređivanja šape pacova.

Prag bola je definisan kao minimalna sila potrebna da izazove refleks uklanjanja i predstavlja prosečnu vrednost tri uzastopna merenja koja su izvršena u intervalima od 10 s.

3.3.8. Bihevioralne i elektroencefalografske osobine konvulzivnih napada

U cilju analize parametara konvulzivnog ponašanja i EEG aktivnosti, životinjama je 75-85. dana starosti, i.p. administriran D,L-homocistein tiolakton u dozi od 5,5 mmol/kg (n=8) dok je kontrolnoj grupi administriran 0,9% NaCl (n=8).

3.3.8.1. Bihevioralne karakteristike konvulzivnih napada

Tokom 90 min od administracije D,L-homocistein tiolaktona posmatrane su bihevioralne karakteristike konvulzivnih napada: incidenca napada, latentni period, intenzitet napada i broj konvulzivnih napada po pacovu.

Incidenca napada je definisana kao broj životinja koje bar jednom unutar opservacionog perioda dobiju konvulzivni napad u odnosu na ukupan broj životinja u grupi i izražena je u procentima (%).

Latentni period je vreme proteklo od administracije D,L-homocistein tiolaktona do prvog konvulzivnog napada. Životinjama koje nisu dobile konvulzivni napad pripisana je latenca 90 min.

Za procenu **intenziteta konvulzivnih napada** korišćena je modifikovana deskriptivna skala (Stanojlović i sar., 2008), sa gradusima od 0 do 4 koji su definisani shodno vrsti odgovora na sledeći način: **gradus 0** - bez konvulzivnog odgovora; **gradus 1** - klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice; **gradus 2** - mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); **gradus 3** – progresija u generalizovane kloničke napade praćene toničkom ekstenzijom prednjih, zadnjih ekstremiteta i repa; **gradus 4** – *status epilepticus*.

Letalitet je opserviran posle 90 min i 24č od administracije D,L - homocistein tiolaktona u određenim grupama.

3.3.8.2. Elektroencefalografsko registrovanje

Operativna procedura

Životinje u intraperitonealnoj anesteziji (Nesdonal, 40 mg/Kg, i.p.) su postavljene u stereotaksički ram (David Kopff, Tujung, SAD) sa gornjom šipkom sekutića na -5,0 mm. Za hronično registrovanje EEG-a pozlaćene elektrode su postavljene iznad **frontalnog** (2 mm ispred bregme i 2mm lateralno od srednje linije), **parijetalnog** (2mm ispred lambde i 2mm lateralno od srednje linije) i **okcipitalnog** (2 mm iza lambde) korteksa (Paxinos i Watson, 2005). Prilikom implantacije pažljivo je izbegnuto postavljanje u korteks, tako da je mozak ostao nepovredjen i nije napravljen arteficialni fokus. Period oporavka posle operacije trajao je nedelju dana.

Digitalna akvizicija EEG signala

Bipolarno registrovanje je vršeno na osmokanalnom EEG aparatu (RIZ, Zagreb, Hrvatska), čiji izlazni stepen je modifikovan. Analogno-digitalna konverzija izvršena je pomoću 8-kanalne, 16-o bitne kartice SCB - 68 (National Instruments Co, Austin, SAD) koja je instalirana u računar. Vrednosti parametara akvizicije bile su podešene tako da je frekvenca smplovanja iznosila 512 Hz, granične frekvencije filtriranja signala su bile 0,3 i 80 Hz, dok je ambijetalni električni fon uklonjen pomoću noć filtera od 50 Hz. Za digitalnu akviziciju i obradu signala EEG-a u našoj Laboratoriji razvijen je odgovarajući originalni programski paket (NeuroSciLaBG, Beograd, Srbija) pomoću koga se signali EEG – a trajno i kontinuirano beleže na hard disku računara.

Analiza EEG zapisa

Registrovani EEG signali analizirani su najpre vizuelno, a zatim i pomoću softvera (NeuroSciLaBG). Određivana je amplituda promena i spektralna gustina snage. Epileptiformne promene su definisane kao 1. pojedinačni izolovani visokovoltazni šiljci; 2. multipli šiljci; 3. šiljak – talas kompleksi; 4. šiljak – talas pražnjenja (spike-wave discharge, SWD). Epileptiformne promene karakteristične za epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom su SWD (Stanojlović i sar., 2009). Kriterijumi za analizu SWD-a definisani su na sledeći način: paroksizmalno pražnjenje visoko-frekventnih, visoko voltažnih šiljak-talas kompleksa trajanja > 1 s, amplitude dva puta veće od bazalne aktivnosti, sa dominacijom, spektralne gustine snage u opsegu od 5 – 7 Hz $\mu V^2/Hz$, koje su praćene karakterističnim promenama u ponašanju (minimalni mioklonički trzaji facijalne muskulature i odsustvo odgovora na taktilne i auditivne draži). Spektralna gustina snage reprezentativnih epoha dobijena je brzom Fourier-ovom analizom (FFT) i izražena u funkciji frekvencije ($\mu V^2/Hz$). Putem brze Furijeove transformacije (linearna transformacija, Hanning prozor, rezolucija spektra 0.083 Hz) izračunata je ukupna spektralna gustina u frekventnom opsegu 0,5 – 80 Hz kao i spektralna gustina po frekventnim opsezima: delta ($\delta = 0,5 - 4$ Hz); teta ($\theta = 4-7$ Hz); alfa ($\alpha = 7-15$ Hz) i beta ($\beta = 15-30$ Hz). EG aktivnost je registrovana od 120 do 180 minuta, dok je trajanje izolovanih i analiziranih epoha iznosilo 8s.

3.3.9. *Western blot* proBDNF i BDNF

Za *Western blot* analizu životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom bez anestezije, nakon čega su izolovane moždane strukture: dorzolateralni frontalni korteks i hipokampus, koje su trenutno zamrzavane u tečnom azotu i čuvane na -85°C . Izolovane moždane strukture su bile podvrgnute homogenizaciji u 8 volumena standardnog RIPA pufera koji sadrži koktel inhibitora proteaze (Sigma, Nemačka). Epruvete su centrifugirane na 14 000 rpm tokom 30 minuta na 4°C i u supernatantu su izdvojeni ćelijski lizati. Svi uzorci su čuvani na -80°C do dalje analize. Koncentracije proteina su određene korišćenjem goveđeg albumina (Bradford, 1976). Ukupno 50 μg proteina nanoseno je na 15% poliakrilamidni gel i elektroforeza je izvršena tokom 90min na 150V. Nakon transfera proteina sa gela na nitroceluloznu membranu, membrane su nespecifično blokirane 5% nemasnim mlekom (Carl Roth, Nemačka) tokom 1h na sobnoj temperature, a zatim su inkubirane primarnim antitelima: zečije poliklonalno anti-BDNF (1: 2000; Millipore, SAD) i mišji monoklonalni anti-B aktin (1: 3000, Sigma, Nemačka) tokom noći na 4°C . Membrane su potom isprane u TBS - Tveen-u i inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima: anti-zečijim (1: 2000, Amersham, Velika Britanija) i anti-mišjim (1: 3000, Dako, SAD) tokom 1 h na sobnoj temperature. Opseg proteina BDNF otkriven je na 18kDa, dok je proBDNF detektovan na 28 kDa, korišćenjem Clarmi Western ECL supstrata (BioRad, USA) od ChemiDoc (BioRad, USA)

3.3.10. Imunohistohemijska bojenja i kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija mozga

U cilju izvođenja imunohistohemijske analize, izolovani mozgovi ($n=6$ po grupi) su najpre fiksirani u 4% paraformaldehidu koji je puferovan 0.1 M fosfatnim puferom (PBS, pH=7,4), u trajanju od 24 h. Mozgovi su zatim podvrgnuti standardnoj proceduri za parafinsko kalupljenje koja podrazumeva sledeće korake: dehidraciju tkiva u seriji alkohola rastuće koncentracije (etanol, 70%, 96%, 100%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija); prosvetljavanje (Ksilol, Zorka Pharma-Hemija, Srbija); kalupljenje u parafinu (Bio-plastextra, Biooptica, Italy). Nakon dobijanja kalupa, tkivo je sečeno u koronarnoj ravni na rotacionom mikrotomu (debljina preseka 4 μm), nakon čega su preseci ispravljani u vodenom kupatilu i lepljeni na predmetna stakla za potrebe histoloških analiza (SuperfrostTM Ultra Plus Adhesion Slides, Thermo Scientific, USA). Za svaki imunohistohemijski analizirani protein, obojena su po dva preseka hipokampusa po životinji. Obojeni preseci su dalje korišćeni za kvantifikaciju imunoreaktivnih ćelija, i dobijanje digitalnih mikrofotografija. Minimalno rastojanje između dva preseka iznosilo je najmanje 200 μm .

U cilju imunohistohemijskog bojenja parafinski isecci su deparafinirani u ksilolu (Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), rehidrirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (etanol, 100%, 96%, 70%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija) i tretirani citratnim puferom (pH = 6.0) u mikrotalasnoj peći (21 minut, 800 W) u cilju demaskiranja antigena. Aktivnost endogene peroksidaze je neutralizovana sa 3% vodonikovim peroksidom, posle čega je usledila jednočasovna inkubacija u komercijalnim preparatima normalnog kozjeg (za Ki67, NPY ili GFAP) ili konjskog (za PV i NeuN) seruma (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit - Peroxidase, Goat IgG, PK-6105; Peroxidase, Rabbit IgG, PK-6101, Vector Laboratories), u zavisnosti od tipa antitela koje je prethodno upotrebljeno. Preseci su tokom noći inkubirani na sobnoj temperature, sa sledećim antitelima: anti-Ki67 (rabbit polyclonal IgG, Abcam, ab15580, razblaženja 1:3500), anti-NeuN (mouse monoclonal IgG, Chemicon, MAB377, razblaženje 1: 200), anti-NPY (rabbit polyclonal, AbD Serotec, razblaženja 1:250), anti-PV (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, razblaženja 1:1000) i anti-GFAP (razblaženje 1:500, Dako). Nakon toga, preseci su inkubirani još sat vremena sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim biotinom anti-zečijim (za Ki67, NPY, GFAP) ili anti-mišjim (za PV ili NeuN) i potom tretirani sa ABC kompleksom (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit -

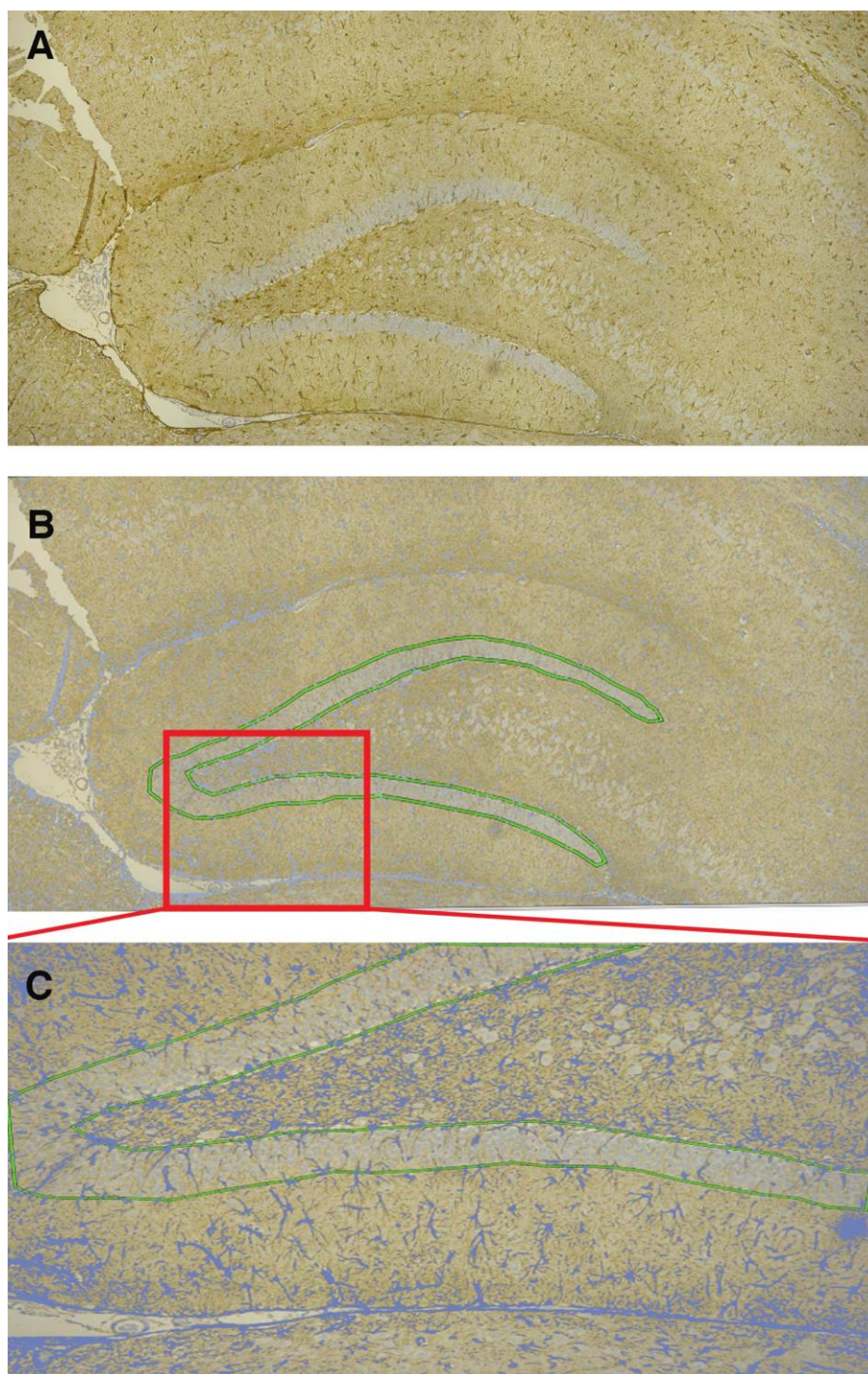
Peroxidase, Goat IgG, PK-6105; Peroxidase, Rabbit IgG, PK-6101, Vector Laboratories). Između svakog koraka uzorci su ispirani u svežem PBS-u (3 x 5 min). Vizuelizacija je izvršena primenom 3,3'-diaminobenzidin hromogena pojačanog niklom (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (with Nickel), SK4100, Vector Laboratories). Preseci su kontrastirani Majerovim hematoksilinom, dehidrirani u seriji alkohola rastuće koncentracije, prosvetljeni u ksilolu i pokriveni odgovarajućim medijumom (DPX, 44581, Sigma, St. Louis, MO, USA) i pokrovnim stakalcima. Specifičnost bojenja je proverena izostavljanjem primarnog antiseruma, a imunoreaktivnost nije detektovana u ovim presecima.

Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija

Broj NPY i PV imunoreaktivnih ćelija kvantifikovan je u svakoj hipokampalnoj regiji (CA1, CA2/3, DG), istim softverskim sistemom, a broj imunoreaktivnih ćelija brojan u svakoj od tih oblasti, izražen je na 1 mm² ispitivane regije da bi se standardizovao broj prebrojanih ćelija [36]. Prebrojavanja su obavili nezavisni istraživači, koji su bili slepi za eksperimentalni protokol.

Kvantifikacija broja imunoreaktivnih NeuN ćelija unutar granularnog sloja dentatnog girusa (DG) izvršena je po sličnom principu, s tim što je broj granularnih ćelija pozitivnih na NeuN kvantifikovan po jedinici površine DG. Kako bi se standardizovala kvantifikacija, ukupan broj detektovanih NeuN imunoreaktivnih ćelija je izražen po 1mm² površine DG.

Brojanje Ki67 imunoreaktivnih ćelija urađeno je duž SGZ hipokampusu, koja je definisana kao granični region između hilusa i sloja granularnih ćelija (Moon i sar., 2014). Dužina SGZ izmerena je na svakom preseku uz pomoć Leica Application Suite (LAS, v4.4.0) softverskog sistema, nakon čega je izbrojan ukupan broj imunoreaktivnih ćelija na datoj izmerenoj dužini. Brojanje ćelija je izvršeno pod uvećanjem objektiva od x40, a brojane su sve imunoreaktivne ćelije bez obzira na njihovu veličinu i oblik. Broj detektovanih imunoreaktivnih ćelija je izražen po 1 mm dužine SGZ



Slika 3.4. Prikaz kvantifikacije GFAP pozitivnih ćelija u granularnom sloju dentatnog girusa hipokampusa. **A.** Imunoreaktivne GFAP ćelije u hipokampusu životinje K grupe. **B.** Selektovanje površine granularnog sloja DG hipokampusa **C.** Deo granularog sloja DG hipokampusa sa GFAP pozitivnim ćelijama koje su putem odabira “pozitivnih” (predstavljene zeleno) prepoznate u *Color Picker Threshold* softverskom paketu. hipokampusa u cilju standardizacije ukupnog broja izbrojanih ćelija. Reprezentativne histološke mikrofotografije iz svake eksperimentalne grupe životinja napravljene su pomoću OlympusBX41

svetlosnog mikroskopa i OlympusC5060A-ADU digitalne kamere, a pod uveličanjem objektiva od x40 i dalje sa imerzionim objektivom (x100).

Za kvantifikaciju GFAP pozitivnih ćelija/astrocita korišćen je *Color Picker Threshold* paket u okviru *Icy* softvera. GFAP pozitivne ćelije/astrociti su brojani u dva regiona: celom DG i granularnom sloju DG hipokampusa. Pomoću Leica DM4000 B LED (Leica, Wetzlar, Germany) svetlosnog mikroskopa na uveličanju 20x napravljena je serija snimaka. Zatim su na snimcima, pomoću softverskog dodatka *Color Picker Threshold* selektovane "pozitivne" i "negativne" boje; "pozitivne" boje su nekoliko nijansi braon (što predstavlja GFAP pozitivne ćelije obojene DAB-om) dok su "negativne" boje plava, bela i svetlo braon (kojima su predstavljena jedra obojena hematoksilinom, neobojeno tkivo i slabije obojena pozadina). Softverski dodatak meri površinu zahvaćenu "pozitivnim" bojama, što u našem slučaju odgovara površini pokrivenoj GFAP pozitivnim ćelijama (Slika 3.4.) Rezultat je izražen kao procenat površine koja je zahvaćena GFAP pozitivnim ćelijama podeljen sa površinom DF ili granularog sloja DG.

3.4. Korišćene supstance

U eksperimentu je korišćene sledeće supstance:

- testosteron-undekanoat (Nebido, Bayer, 1000 mg/4 ml)
- D,L-homocistein tiolakton HCl (Sigma Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) MT = 153,63 g.
Rastvor se pravi *ex tempore*, rastvaranjem supstance u fiziološkom rastvoru, a puferovanje do pH = 7,0 se vrši pomoću 1N NaOH. Supstanca se administrira intraperitonealno (i.p.) u volumenu 1,0 ml/100 g TM.
- fiziološki rastvor (Hemofarm, Vršac, Srbija)
- tiopental natrijum (Nesdonal, Specia, Pariz, Francuska)

3.5. Statistička analiza

Prikazivanje i statistička obrada rezultata zavisila je od rezultata testiranja hipoteze o normalnoj distribuciji podataka Kolmogorov - Smirnov testom. Rezultati čije su vrednosti bile normalno distribuirane, prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) i analizirani su Studentovim t testom ili jednosmernom ANOVAom. Rezultati čije vrednosti nisu bile normalno distribuirane izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom, i analizirani Kruskal-Wallis ANOVAom i Mann - Whitney U testom. U svim slučajevima, nivo statističke značajnosti je bio statističke značajnost bio je $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

4. REZULTATI

4.1. Uticaj prenatalne androgenizacije na antropometrijske karakteristike

Životinje TU i K grupe su imale *ad libitum* pristup standardnoj hrani i vodi. Nakon odvajanja od majke, od 24. postnatalnog dana, pa sve do kraja 11. nedelje života, jednom nedeljno merena je telesna masa životinja i na osnovu dobijenih vrednosti preračunat je prosečan dnevni unos za posmatranu nedelju. Merenjima telesne mase utvrđeno je da su 24. postnatalnog dana životinje u TU grupi imale značajno manju telesnu masu u poređenju sa životinjama K grupe ($48,01 \pm 8,95$ vs. $63,96 \pm 9,80$; $p < 0,01$). Od 5. do 8. nedelje života nije uočena značajna razlika u telesnoj masi životinja TU i K grupe. Od 8. nedelje, pa sve do kraja opservacionog perioda, životinje TU grupe su imale značajno veću telesnu masu od životinja K grupe ($215,73 \pm 29,45$ vs. $180,41 \pm 21,41$; $p < 0,01$), a taj trend se zadržao i tokom 10. nedelje ($286,99 \pm 40,43$ vs. $261,39 \pm 26,95$; $p < 0,05$) i 11. nedelje ($302,63 \pm 38,50$ vs. $283,108 \pm 37,37$; $p < 0,05$). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.1.1.

Telesna masa (g)								
Nedelja	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
K	$63,96 \pm 9,8$	$81,5 \pm 8,6$	$98,10 \pm 17,1$	$146,69 \pm 16,8$	$180,4 \pm 21,4$	$238,42 \pm 20,5$	$261,39 \pm 26,9$	$283,11 \pm 37,4$
TU	$48,0 \pm 8,9$	$73,41 \pm 7,5$	$95,62 \pm 12,5$	$152,19 \pm 33,6$	$215,73 \pm 29,4$	$253,55 \pm 30,6$	$286,99 \pm 40,4$	$302,63 \pm 38,5$
<i>p</i>	** $p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	** $p < 0,01$	* $p < 0,05$	* $p < 0,05$	* $p < 0,05$

Tabela 4.1.1. Promena telesne mase u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi mereni od 4. do 11. nedelje života ($n=28$ po grupi). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost utvrđena je Studentovim *t* testom (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu).

Unos hrane je meren jednom nedeljno u periodu od 7. do 11. nedelje života i na osnovu dobijenih vrednosti preračunat je prosečan dnevni unos za posmatranu nedelju. Prva značajna razlika u količini utrošene hrane registrovana je tokom 7. nedelje života gde su životinje TU grupe jele manje hrane u odnosu na K grupu ($26,54 \pm 3,86$ vs. $27,59 \pm 0,82$; $p < 0,05$), dok je druga značajna razlika registrovana u 9. nedelji posledica povećanog unosa hrane u TU u poređenju sa K grupom ($27,51 \pm 3,31$ vs. $25,31 \pm 5,02$; $p < 0,01$). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.1.2.

Nedeljni unos hrane (kg)					
Nedelja	VII	VIII	IX	X	XI
K	$27,59 \pm 0,82$	$27,22 \pm 0,89$	$25,31 \pm 5,02$	$26,58 \pm 1,69$	$26,21 \pm 1,89$
TU	$26,54 \pm 3,86$	$27,02 \pm 3,82$	$27,51 \pm 3,31$	$26,86 \pm 2,81$	$26,64 \pm 3,04$
<i>p</i>	* $p < 0,05$	$p > 0,05$	** $p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Tabela 4.1.2. Prosečan nedeljni unos hrane meren od 7. do 11. nedelje života u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi ($n = 28$, po grupi). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost razlike utvrđena je studentovim *t*-testom (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu).

4.2. Uticaj prenatalne androgenizacije na karakteristike reproduktivnog fenotipa

4.2.1. Karakteristike legla

Ukupan broj potomaka u leglu jedne majke izbrojan je 2. postnatalnog dana i u TUm grupi majki je bio značajno manji ($9,0 \pm 2,4$ vs. $13,17 \pm 1,47$; $p < 0,05$) u poređenju sa Km grupom.

Broj preživelih potomaka je utvrđen 24. postnatalnog dana i u TU grupi je bio značajno manji ($8,4 \pm 2,1$ vs $12,83 \pm 1,03$; $p < 0,05$) u poređenju sa K grupom. Posledično, preživljavanje legla je bilo manje u TU grupi ($93,3 \pm 0,36$ % vs. $98,72 \pm 0,54$ %) nego u K grupi životinja.

Parametar	K	TU
Broj životinja u leglu	$13,17 \pm 1,47$	$9,0 \pm 2,4$ *
Broj preživelih potomaka	$12,83 \pm 1,03$	$8,4 \pm 2,1$ *
Broj muških/ženskih potomaka	$6,8 \pm 1,2/5,8 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,5^*/5,8 \pm 1,8$
Preživljavanje do odvajanja %	$98,72 \pm 0,54$	$93,33 \pm 0,36$

Tabela 4.2.1. Karakteristike legla u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost utvrđena je Studentovim t testom (* $p < 0,05$)

Brojanjem muških i ženskih potomaka u svakom leglu utvrđen je odnos polova i primećeno je da je TUm grupa majki imala manje muških potomaka nego Km grupa, dok se broj ženskih potomaka Km i TUm majki, nije bitno razlikovao. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.2.1.

4.2.2. Parametri maskulinizacije

Efekte prenatalne izloženosti androgenima i posledična maskulinizacija ženki ispitana je praćenjem vaginalnog otvaranja od 30. postnatalnog dana, merenjem anogenitalne distance (AGD) i određivanjem indeksa anogenitalne distance (AGDI) oko 70. dana starosti ($n = 20$ po grupi). Nije utvrđena značajna razlika u vremenu vaginalnog otvaranja između K i TU grupe. Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti AGD i AGDI u K i TU grupi (Tabela 4.2.2.)

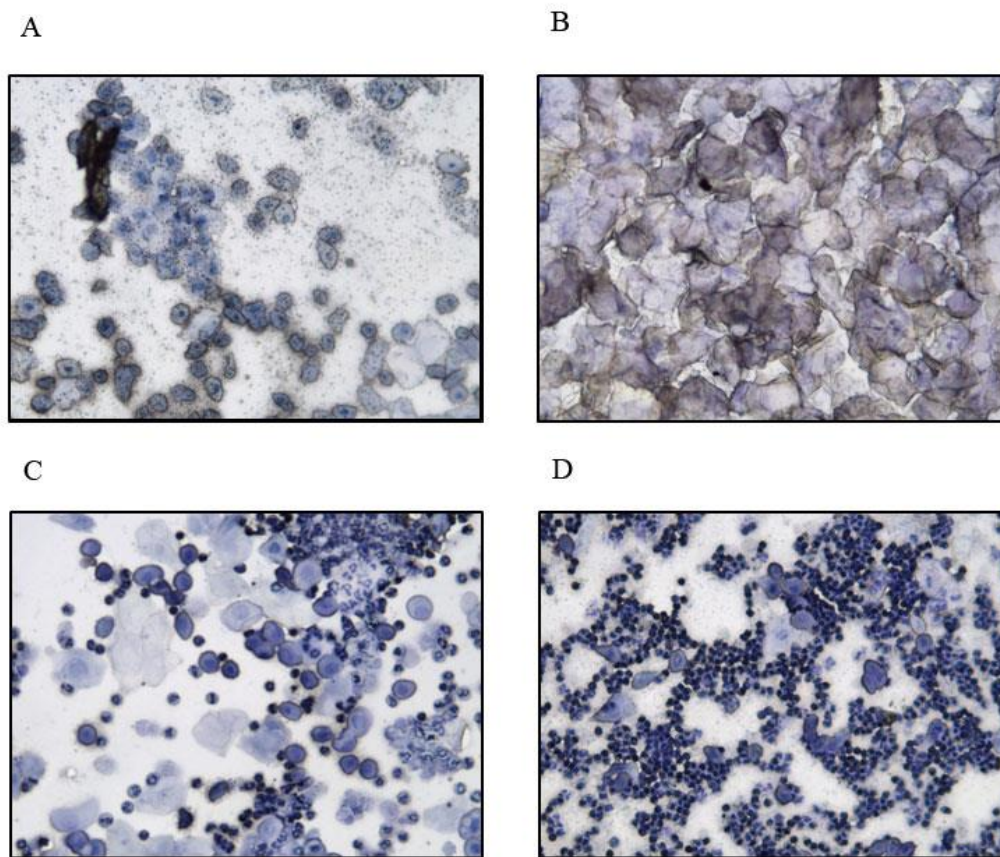
Parametar	K	TU
Vaginalno otvaranje (dani starosti)	$35,7 \pm 0,58$	$36,1 \pm 0,63$
AGD (mm)	$25,87 \pm 2,60$	$26,53 \pm 2,15$
AGI	$8,4 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,4$
Duzina ES (dani)	$4,48 \pm 0,75$	$4,46 \pm 0,74$

Tabela 4.2.2. Parametri maskulinizacije u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost utvrđena je Studentovim t testom.

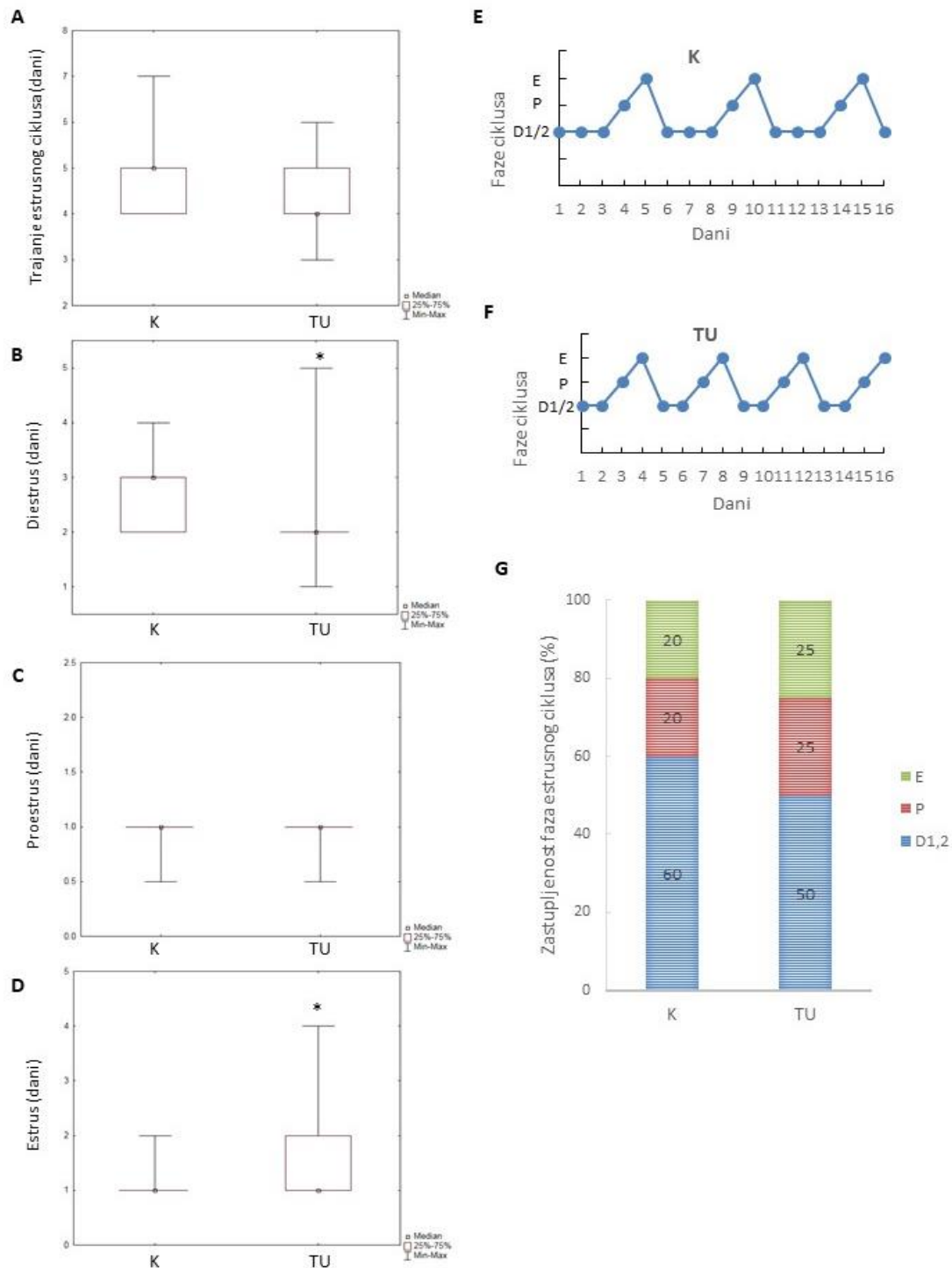
4.2.3. Estrusni ciklus

Tokom 15. dana (50-65. PD) svakodnevno je uziman uzorak vaginalnog brisa životinja kontrolne i eksperimentalne grupe, koji je pripreman, bojen a zatim analiziran pod svetlosnim mikroskopom (Slika 4.2.3.).

Rezultati analize su pokazali da je medijana trajanja estrusnog ciklusa u TU grupi iznosila [4 (4-5)] i nije se bitno razlikovala od trajanja ciklusa u K grupi [4 (4-5); $p > 0,05$] (Slika 4.2.3.A). Analizom dužine faza estrusnog ciklusa utvrđeno je da je diestrus u TU grupi trajao značajno kraće [2 (2-2)] nego u K [3 (2-3); $p < 0,05$, Slika 4.2.3.B], dok nije uočena značajna razlika u trajanju proestrusa medju grupama (Slika 4.2.3.C). Takođe, estrus u TU grupi je bio značajno različit u poredjenju sa K grupom [1 (1-2) vs 1 (1-1), $p < 0,05$, Slika 4.2.3.D]. Analiza procentualne zastupljenosti faza estrusnog ciklusa pokazala je slične rezultate, naime diestrus je bio kraći u TU grupi (50%) u poredjenju sa K grupom (60%), dok je estrus u TU grupi trajao duže (25%) nego u K grupi (20%) (Slika 4.2.3G).



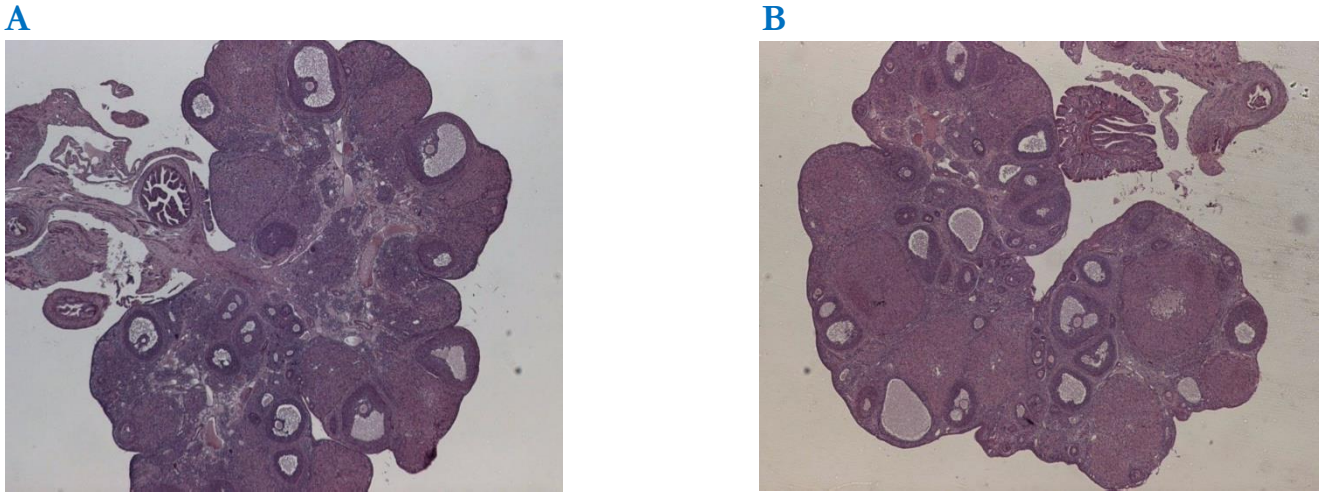
Slika 4.2.3 Faze estrusnog ciklusa: **A. PROESTRUS** - okrugle epitelne ćelije prisutne u grozdovima; jasno se vide jedra u ćelijama; traje 1 dan; **B. ESTRUS** - prazne ćelije bez jedra (žučkaste na svetlosnom mikros); keratinizovane ćelije, veće od epitelnih ćelija sa neravnim ivicama (kornifikovane ćelije); kerat. ćelije mogu izgledati igličasto; sekret beličast, sluzav i razvlači se; traje 1 do 2 dana (4- ili 5-ciklus); **C. DIESTRUS 1 ili METESTRUS** - prisutna tri tipa ćelija: kornifikovane (najkrupnije, smanjuje im se broj), epitelne (okrugle sa jedrom, sitnije od kornif.ć.) i leukociti (najsitnije ćelije, okrugle, invazija leukocita); traje 1 dan; **D. DIESTRUS 2** - puno sitnih leukocita (sa velikim jedrom i malo citoplazme); traje 2 dana.



Slika 4.2.4. A) Medijana trajanja estrusnog ciklusa; B) medijana trajanja diestrusa; C) proestrusa i D) estrusa; E, F) Cikličnost smene faza ciklusa u grupama procentualna zastupljenost faza u odnosu na ukupno trajanje ciklusa. Rezultati A, B i C su izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom. **K** – kontrolna grupa, **TU** – eksperimentalna grupa, prenatalno tretirana testosteron undekanoatom.

4.2.4. Uticaj prenatalne androgenizacije na histološke karakteristike jajnika

Histološkom analizom jajnika K i TU grupe nije primećena razlika u histološkoj građi i organizaciji (Slika 4.2.5.) Na poprečnom preseku centralnog dela jajnika obe grupe uočavaju se folikuli u svim stadijumima folikulogeneze, žuta tela i pojedinačni atretični folikuli.

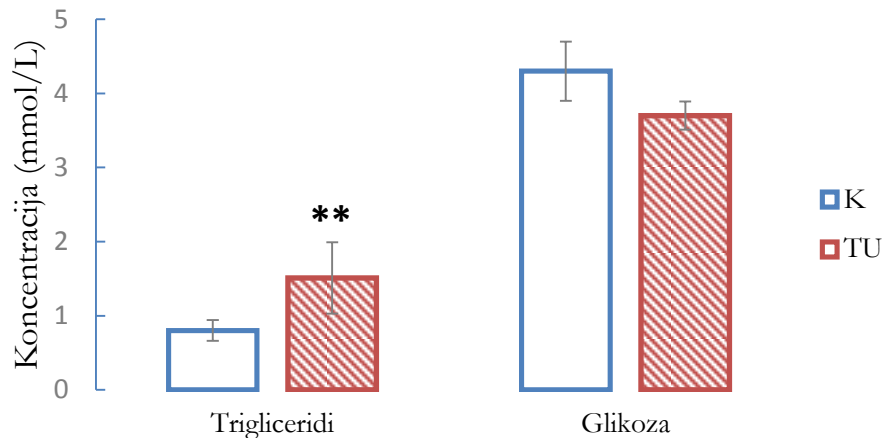


Slika 4.2.5. Poprečni preseki centralnog dela jajnika ženskih potomaka a) kontrolne K grupe i b) grupe koja je prenatalno tretirana testosteron undekanoatom (TU).

4.3. Uticaj prenatalne androgenizacije na metaboličke parametre

4.3.1. Koncentracija glikoze i triglicerida u serumu

Koncentracija glikoze u TU grupi bila manja u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statistički značajne razlike ($3,7 \pm 0,19$ vs. $4,3 \pm 0,4$; $p > 0,05$). Našte koncentracije triglicerida je bila značajno veća u TU grupi ($1,51 \pm 0,48$ vs. $0,8 \pm 0,14$; $p < 0,01$) u poredjenju sa K grupom. Rezultati su prikazani na Slici 4.4.1

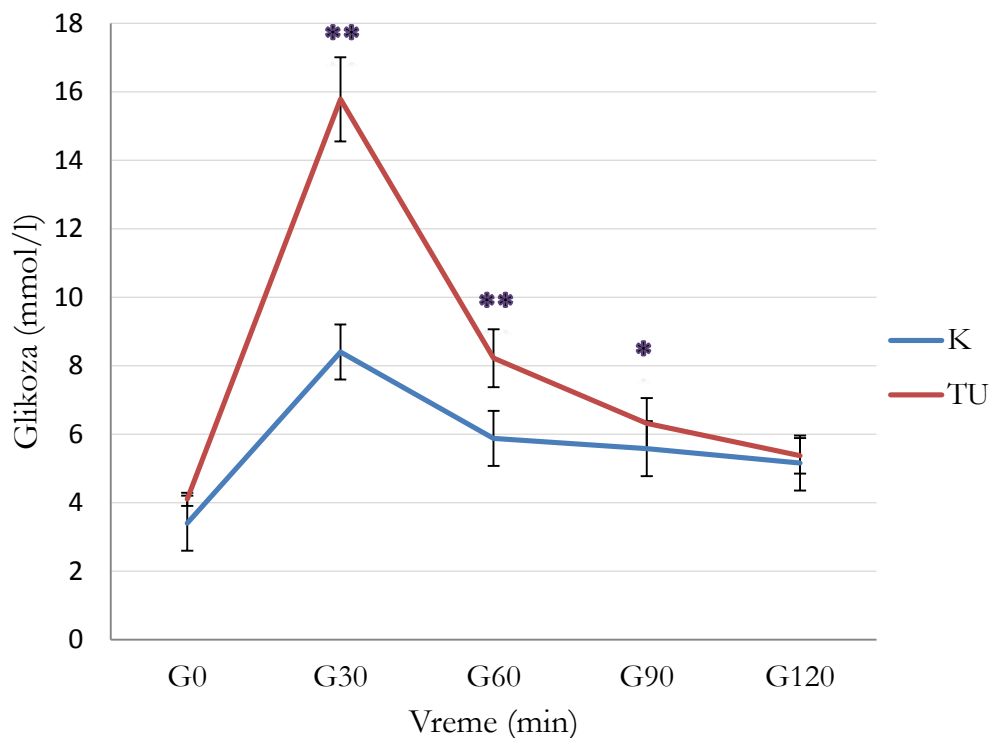


Slika 4.4.1. Koncentracija triglicerida i glikoze u serumu kontrolne i eksperimentalne grupe. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost razlike između grupa procenjena je Studentovim *t* testom (** $p < 0.01$).

4.3.2. Intraperitonealni test tolerancije na glikozu (IPGTT)

Nakon i.p. administracije glikoze, koncentracije glikoze su bile značano veće u TU grupi nakon 30, 60 i 90 min. 30 min nakon administracije, koncentracija glikoze u TU grupi je bila značajno veća ($15,78 \pm 1,23$ vs. $8,4 \pm 1,94$; $p < 0.01$) u poređenju sa K grupom. Nakon 120 min nije bilo značajne razlike u koncentraciji glikoze u TU i K grupi. Dobijeni rezultati su prikazani na Slikci 4.4.2.

Na osnovu dobijenih vrednosti glikemije, izračunata je površina ispod krive (AUC), a poredjenjem rezultata utvrđeno je da je AUC u TU grupi značajno veći ($1044,05 \pm 81,55$ vs. $736,2 \pm 23,15$; $p < 0,05$) u poređenju sa AUC K grupe (Tabela 4.4.1).



Slika 4.4.2. Intraperitonealni test tolerancije na glikozu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost razlike rezultata u pojedinačnim tačkama vremena procenjena je Studentovim *t* testom za nezavisne uzorke (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu).

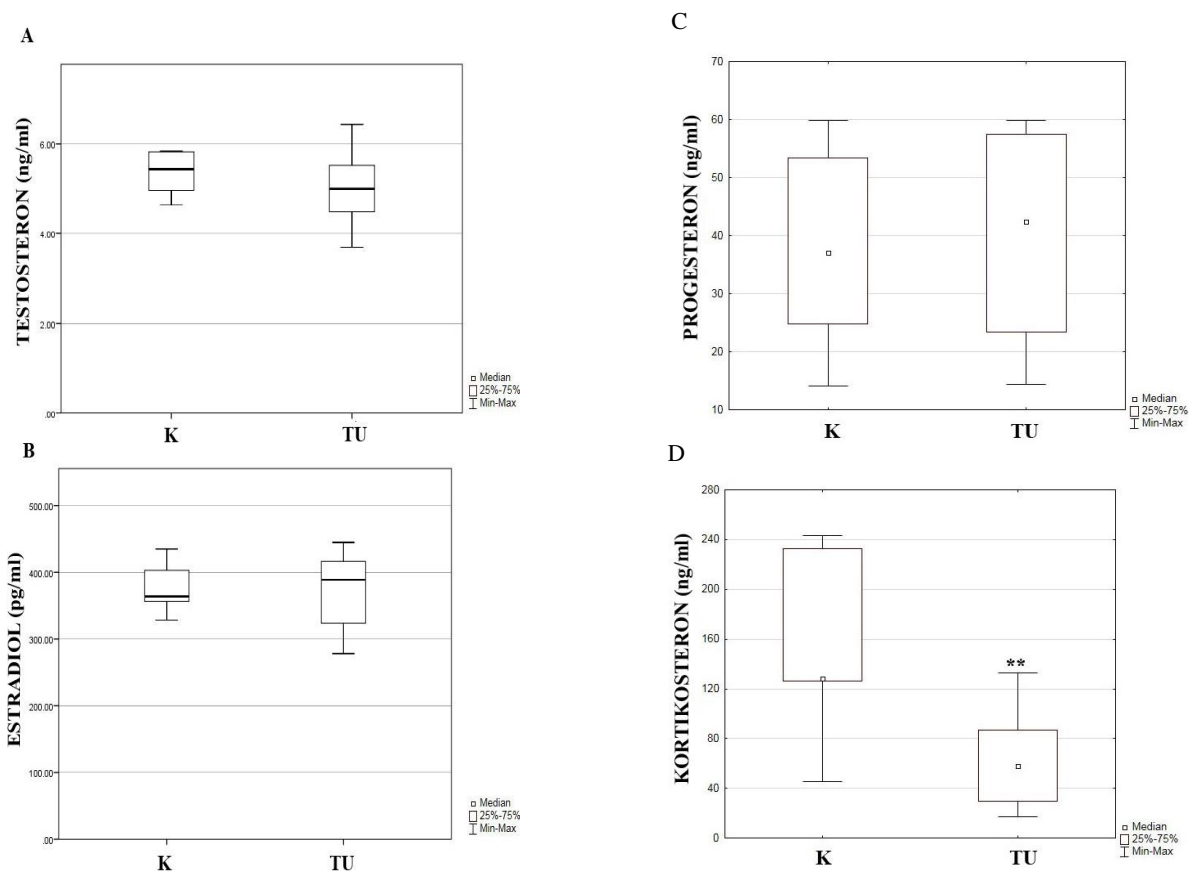
	K	TU
Glikoza (mmol/L)	736.2 \pm 23,15	1044,05 \pm 81,55
Površina ispod krive (AUC)	* $p < 0,05$	

Tabela 4.4.1. Poređenje površina ispod krive (AUC) konstruisane tokom testa tolerancije na glikozu u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi. Statistička značajnost razlike između grupa procenjena je Studentovim *t* testom (* $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD

4.4. Uticaj prenatalne androgenizacije na koncentraciju hormona u serumu

Koncentracija testosterona u serumu ženskih potomaka majki tretiranih testosteron undekanoatom nije se statistički značajno razlikovala od kontrolne grupe ženskih potomaka ($p > 0,05$, Slika 4.6.1.A). Isti odnos uočen je među izmerenim vrednostima estradiola u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi životinja ($p > 0,05$, Slika 4.6.2.B).

Koncentracija progesterona u serumu ženki prenatalno tretiranih testosteron undekanoatom nije se statistički značajno razlikovala od vrednosti zabeleženoj u kontrolnoj grupi životinja ($p > 0,05$, Slika 4.6.2.A).



Slika 4.6.1. Serumske koncentracija **A)** tetstosterona, **B)** estradiola u serumu, **C)** progesterona i **D)** kortikosterona. Rezultati su izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom. Značajnost razlike u ispitivanim grupama životinja učinjena je Mann-Whitney *U* testom (** $p < 0,01$). **K** – kontrolna grupa, **TU** – eksperimentalna grupa, prenatalno tretirana testosteron undekanoatom.

Sa druge strane, visoko statistički značajna razlika zabeležena je u koncentraciji kortikosterona eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$, Slika 4.6.2.B)

4.5 Uticaj prenatalne androgenizacije na oksidativni stress

Nije uočana značajna razlika u koncentraciji MDA u korteksu kontrolne grupe i grupe koja je prenatalno tretirana testosteron undekanoatom ($p > 0.05$). Takođe nije uočena značajna razlika u koncentraciji MDA u hipokampusima K i T grupe ($p > 0.05$) (Tabela 4.10).

Aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) bila je značajno povećana u korteksu životinja prenatalno tretiranih testosteronom, poredeći sa kontrolom ($p < 0.05$). Isti odnos zabeležen je i u

hipokampusu, gde je aktivnost enzima bila značajno veća u TU grupi u poređenju sa K grupom ($p < 0.05$, Tabela 4.10).

Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) izmerena kod ženskih potomaka prenatalno tretiranih testosteron undekanoatom bila je značajno veća u obe ispitivane strukture: korteksu i hipokampusu, u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$, Tabela 4.10).

Parametar	Korteks		Hipokampus	
	K	TU	K	TU
MDA (nmol/mg prot.)	4.322±2.059	6.285±4.266	4.047±2.362	5.155±1.588
SOD (U/mg prot.)	0.410±0.054	0.520±0.033*	0.460±0.010	0.537±0.034*
GPx (U/mg prot.)	28.770±3.443	42.937±6.926*	28.020±8.140	58.753±15.527*
SH-grupe (nmol/mg prot.)	15.94±1.327	14.556±1.873	13.62±3.852	12.107±3.167
Nitrotirozin (nmol/mg prot.)	104.068±13.424	90.127±11.772	108.531±10.421	120.107±22.369

Tabela 4.5.1. Koncentracija parametara oksidativnog stresa u korteksu i hipokampusu eksperimentalnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost razlike procenjena je Studentovim t testom (* $p < 0,05$).

Koncentracija sulfhidrilnih grupa (SH) bila je niža u testosteronom tretiranoj grupi životinja u poređenju sa kontrolnom u obe ispitivane strukture, ali statistička značajnost razlike nije dosegnuta ($p > 0.05$, Tabela 4.10).

Izmerena koncentracija nitrotirozina nije se značajno razlikovala među ispitivanim grupama, kako u korteksu ($p > 0.05$), tako i u hipokampusu ($p > 0.05$, Tabela 4.10).

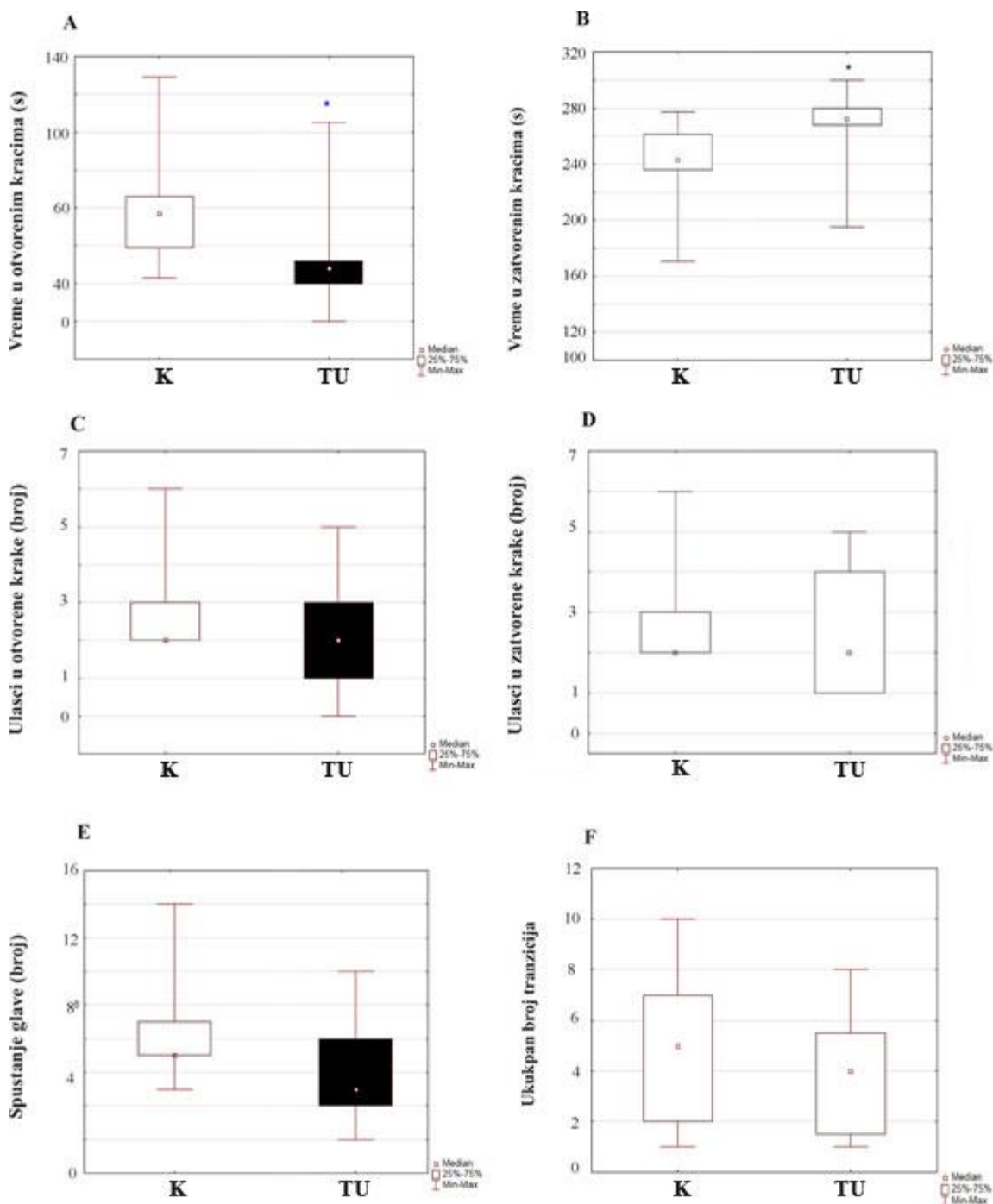
4.6 Uticaj prenatalne androgenizacije na parametre anksioznog ponašanja

U cilju ispitivanja efekata prenatalne androgenizacije na ponašanje povezano sa anksioznošću primenjeni su test uzdignutog plus lavirina (*eng. Elevated plus maze*) i test otvorenog polja (*eng. Open field*).

4.6.1 Ponašanje u uzdignutom plus lavirintu

Životinje prenatalno tretirane testosteron undekanoatom su značajno kraće vreme provodile u otvorenim kracima ($U=25,5$, $Z=2,17$, $p < 0,05$), dok je vreme provedeno u zatvorenim kracima bilo značajno duže ($U=25,5$, $Z=-2,17$, $p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom ženki (Slika 4.6.1.A, B). Prenatalni tretman testosteronom nije značano uticao na broj ulazaka u otvorene ($U=37,5$, $Z=1,37$; $p < 0,05$, Slika 4.7.1.C) i zatvorene krake uzdignutog plus lavirinta ($U=50,5$; $Z=0,50$; $p < 0,05$, Slika 4.6.1.D.).

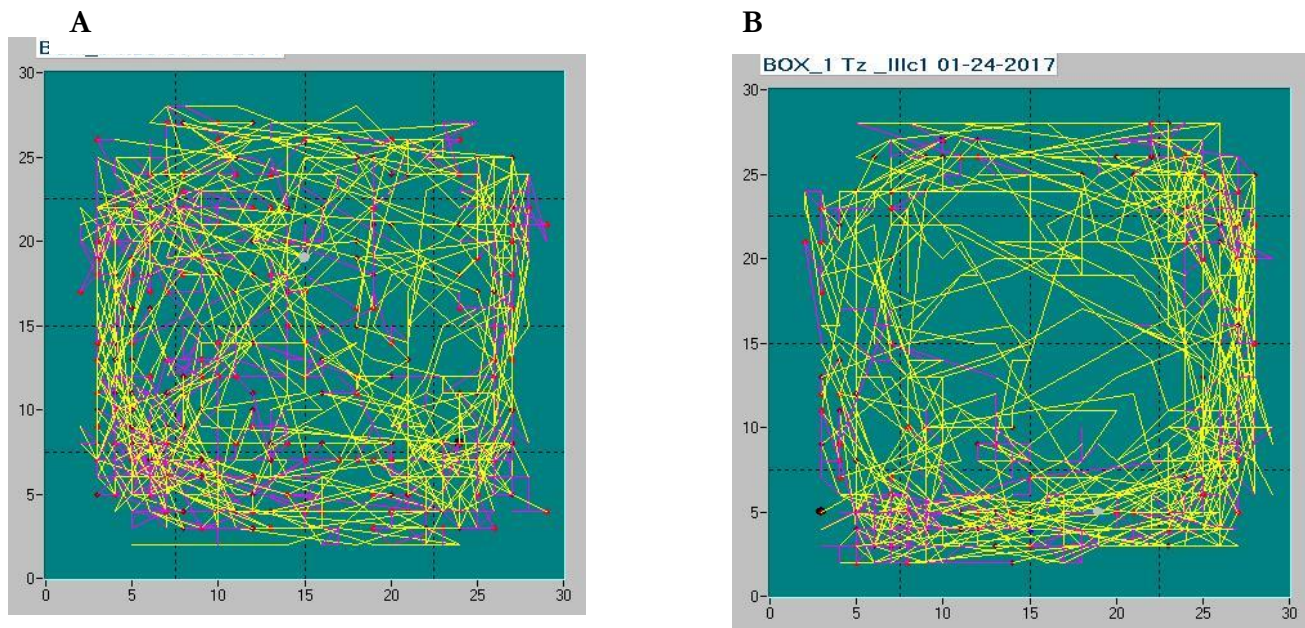
Eksplorativna aktivnost u lavirintu, izražena brojem poniranja glave ispod nivoa kraka ($U=32,0$; $Z=1,74$; $p < 0,05$) i ukupnim brojem tranzicija između otvorenih i zatvorenih kraka ($U=61,5$, $Z=0,87$; $p=0,38$) nije se značano razlikovala među grupama. (Slika 4.6.1.E, F.).



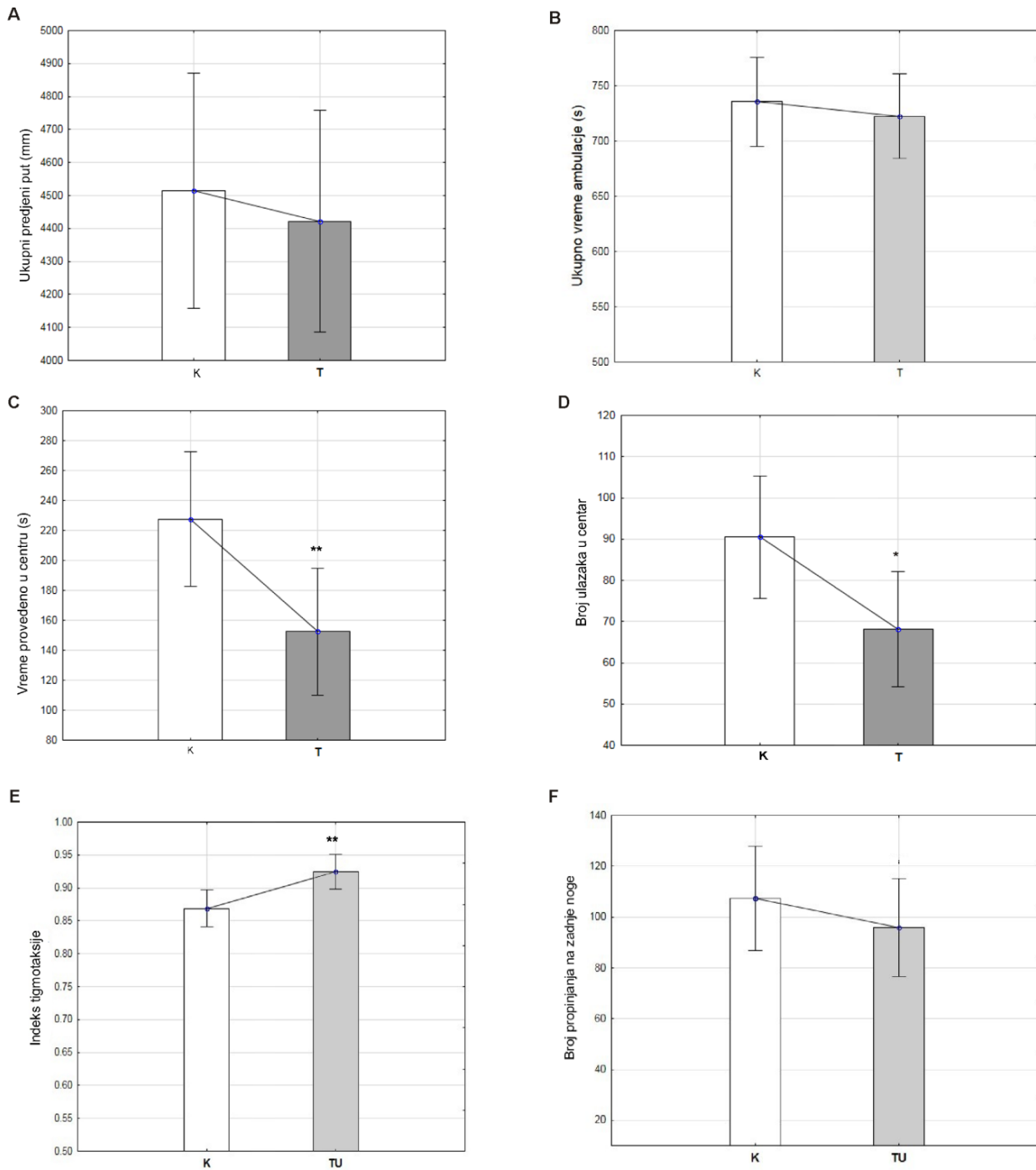
Slika 4.6.1. Uticaj prenatalnog tretmana testosteron undekanoatom na ponašanje u uzdignutom plus lavirintu: **A)** vreme u otvorenim kracima, **B)** vreme u zatvorenim kracima, **C)** ulasci u otvorene krake, **D)** ulasci u zatvorene krake **E)** broj spuštanja glave **F)** ukupan broj realizacija. Rezultati su izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom. Statistička značajnost razlike među ispitivanim grupama procenjena je Mann - hitney U testom (* $p < 0,05$). **K** – kontrolna grupa, **TU** – eksperimentalna grupa, prenatalno tretirana testosteron undekanoatom

4.6.2. Ponašanje u otvorenom polju

Analizom registrovane lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja uočeni su različiti obrasci ponašanja životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe. Na Slici 4.6.2.A i B prikazani su reprezentativni snimci trajektorije kretanja životinje K i TU grupe.



Slika 4.6.2. Reprezentativni obrazac horizontalne i vertikalne lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja za životinje iz kontrolne (A) i eksperimentalne grupe (B). Životinje su pojedinačno testirane u otvorenom polju tokom 30 min. Automatsko registrovanje ponašanja vršeno je pomoću sistema sa infracrvenim senzorima, a potom analizirano pomoću pratećeg softvera (Conducta 1.0).



Slika 4.6.3. Uticaj prenatalne androgenizacije na ponašanje u otvorenom polju: **A)** ukupan predjeni put, **B)** ukupno vreme ambulacije, **C)** vreme provedeno u centru, **D)** broj ulazaka u centar, **E)** broj propinjanja na zadnje noge, **F)** indeks tigmotaksije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost razlike među ispitivanim grupama procenjena je Studentovim t testom (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). **K** – kontrolna grupa, **TU** – eksperimentalna grupa, prenatalno tretirana testosteron undekanoatom.

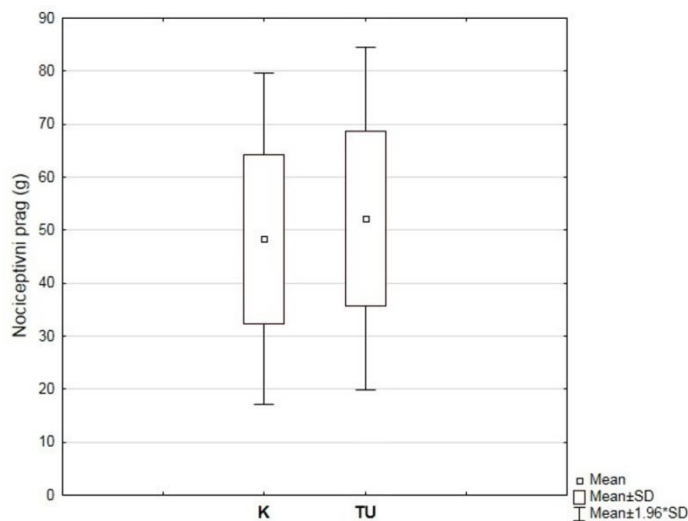
Horizontalna lokomotorna aktivnost tj. *ukupni pređeni put* tokom ambulatornog kretanja se nije značajno razlikovo među ispitivanim grupama (K: $4515,64 \pm 133,6$ vs. TU: $4421,79 \pm 181,02$; $p > 0,05$). Takođe, nije uočena statistički značajna razlika u *ukupnom vremenu ambulacije* (K: $735,5 \pm 45,7$ vs. TU: $722,44 \pm 59,9$; $p > 0,05$) (Slika 4.6.3. A i B).

Ipak specifični načini lokomotorne aktivnosti koji su pokazatelji anksioznog ponašanja, kao što su vreme provedeno u centru i broj ulazaka u centar, značajno su se razlikovali među ispitivanim grupama. *Vreme provedeno u centralnom polju* bilo je značajno kraće u TU grupi ($152,44 \pm 36,6$), u poređenju sa K grupom ($227,62 \pm 77,7$; $p < 0,01$) životinja. *Broj ulazaka u centralno polje* tadođe je bio manji u TU nego u K grupi ($68,2 \pm 13,53$ vs. $90,5 \pm 24,8$; $p < 0,05$) (Slika 4.6.3. C i D).

Indeks tigmotaksije bio je značajno veći u TU grupi ($0,925 \pm 0,02$) u poredjenju sa K grupom ($0,867 \pm 0,05$; $p < 0,01$, Slika 4.6.3 E).

Broj propinjanja na zadnje ekstremitete se nije bitno razlikovao medju ispitivanim grupama (K: $107,25 \pm 29,7$ vs. TU: $95,89 \pm 24,8$; $p > 0,05$, Slika 4.6.3 F).

4.7 Uticaj prenatalne androgenizacije na bolnu osetljivost



Slika 4.7.1. Uticaj prenatalne androgenizacije na prag bola u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

K – kontrolna grupa, **TU** – eksperimentalna grupa, prenatalno tretirana testosteron undekanoatom

Aplikovanjem rigidnog filameta esteziometra na centralni deo plantarne strane zadnje šape silom postepeno rastućeg intenziteta, određen je srednji nivo intenziteta bolne draži koji izaziva refleks uklanjanja tokom tri uzastopna merenja, koja su izvršena u intervalima od 10 s. Dobijeni rezultati u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi životinja nisu se značajno razlikovali (K: $48,38 \pm 15,9$ vs. $52,14 \pm 16,5$, $p > 0,05$, Slika 4.7.1).

4.8 Uticaj prenatalne androgenizacije na bihevioralne i elektroencefalografske osobine konvulzivnih napada

U cilju ispitivanja efekata prenatalne androgenizacije testosteron undekanoatom na epileptičnu aktivnost izazvanu homocistein tiolaktonom, ženka pacova kontrolne (Kh) i eksperimentalne grupe (TUH) je 75-85. dana, u diestrusnoj fazi ciklusa administrirana pojedinačna subkonvulzivna doza D, L homocistein tiolaktona (5,5 mmol/kg). Odgovarajućim kontrolama u kontrolnoj (Kk) i eksperimentalnoj (TUK) grupi je administriran fiziološki rastvor (0,9% NaCl). Parametri konvulzivnog ponašanja i EEG aktivnost su opservirani tokom 90 min od administracije D, L homocistein tiolaktona.

4.9.1. Parametri konvulzivnog ponašanja

Kontrolna (Kk) i eksperimentalna grupa (TUK) pacova tretirana fiziološkim rastvorom imala je normalno ponašanje, bez znakova konvulzija.

Medijana latence konvulzivnih napada izazvanih D,L-homocistein tiolaktonom u TUH grupi je iznosila [40 (30-66)]min i bila je značajno kraća ($p < 0,05$), u poređenju sa latencom registrovanom u K grup [90 min (54,5-90)] min. (Slika 4.8.1.A)

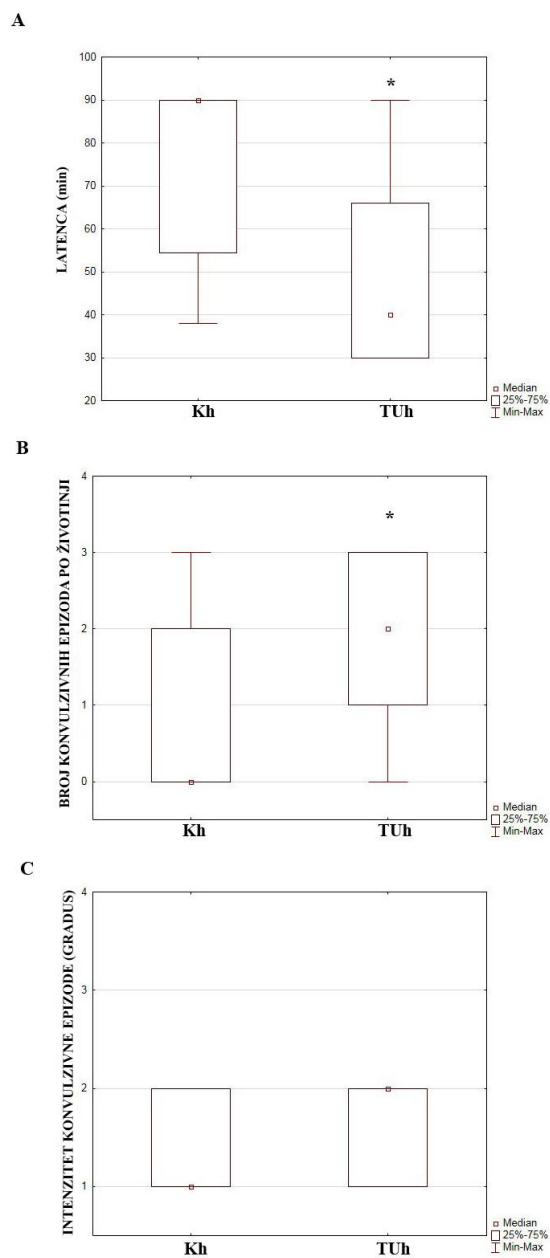
Medijana broja konvulzivnih napada po životinji u TUH grupi je iznosila [2 (1-3)] i bila je značajno veća ($p < 0,05$) u poređenju sa medijanom broja napada u K grupi [0 (0-2)], (Slika 4.8.1.B.).

Medijana intenziteta konvulzivnih napada u TUH grupi [2 (1-2)] nije se značajno razlikovala od one koja je zabeležena u K [1 (1-2)] ($p > 0,05$) (Slika 4.8.1. C.).

U cilju ispitivanja intergrupne razlike u intenzitetu konvulzivnih napada, ispitivana je statistička značajnost u *distribuciji intenziteta konvulzivnih napada*, pomoću Fišerovog testa tačne verovatnoće. Dominantni intenzitet konvulzivnih epizoda u Kh je bio **gradus 1** (71,4%), dok je u TUH grupi zastupljenost napada gradusa 1 (40%; $p > 0,05$) bila manja, ali statistička značajnost nije utvrđena. Dominantni gradus konvulzivnih epizoda u TUH grupi je bio **gradus 2** (60%), dok je u Kh grupi zastupljenost napada gradusa 2 bila manja (28,6%; $p > 0,05$) (Slika 4.8.2).

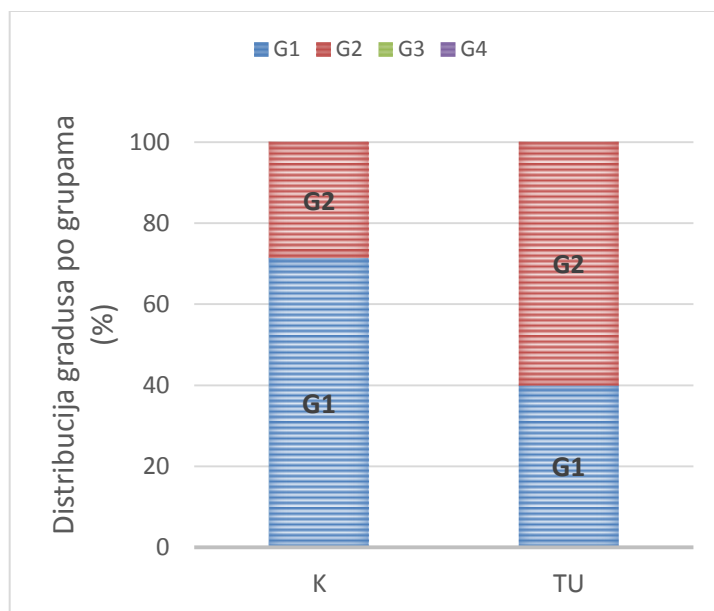
Incidencija napada bila je značajno veća u TUH grupi (83,33%; $p < 0,05$) u poređenju sa Kh grupom (37,5%) životinja (Tabela 4.8.1).

Administracija D,L homocistein tiolaktona u dozi od 5,5 mmol/kg nije uzrokovala niti jedan smrtni ishod nakon 90min u Kh grupi, dok je u TUH grupi životinja *letalitet* iznosio 83,33% ($p < 0,05$). Odnos broja zabeleženih smrtnih ishoda nakon 24h pokazao je isti smer značajnosti razlike među grupama (TUH *vs.* Kh, 100% *vs.* 12,5%, $p < 0,05$, Tabela 4.8.1).



Slika 4.8.1. Uticaj prenatalne androgenizacije na **(A)** medijanu latence konvulzivnih napada, **(B)** medijanu broja konvulzivnih napada i **(C)** medijanu intenziteta konvulzivnih napada u eksperimentalnim grupama (* $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu). Rezultati su izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom.

Kh – ženski potomci kontrolnih ženki tretirani D,L homocistein tiolaktonom (5,5 mmol/kg); **TUh** – ženski potomci prenatalno androgenizovanih ženki tretirani D,L homocistein tiolaktonom (5,5 mmol/kg)



Slika 4.8.2. Uticaj prenatalne androgenizacije na distribuciju intenziteta konvulzivnih napada u eksperimentalnim grupama. Značajnost razlike je izračunata pomoću Fišerovog testa tačne verovatnoće. (G1-gradus 1; G2-gradus 2). Za značenje grupa videti legendu na Slici 4.7.1.

<i>Letalitet (%)</i>	<i>D,L Homocistein tiolakton (5,5 mmol/kg)</i>	
	Kh	TUh
90 min	0%	83,3% *
24 h	12,5%	100% *
<i>Incidenca (%)</i>	37,5 %	83,3 %

Tabela 4.8.1. Letalitet i incidenca napada u eksperimentalnim grupama. Letalitet je određivan u 90 min i 24 h posle administracije D,L homocistein-tiolaktona (5,5 mmol/kg). Značajnost razlike je izračunata pomoću Fišerovog testa tačne verovatnoće (* $p < 0,05$).

4.9.2. EEG nalaz

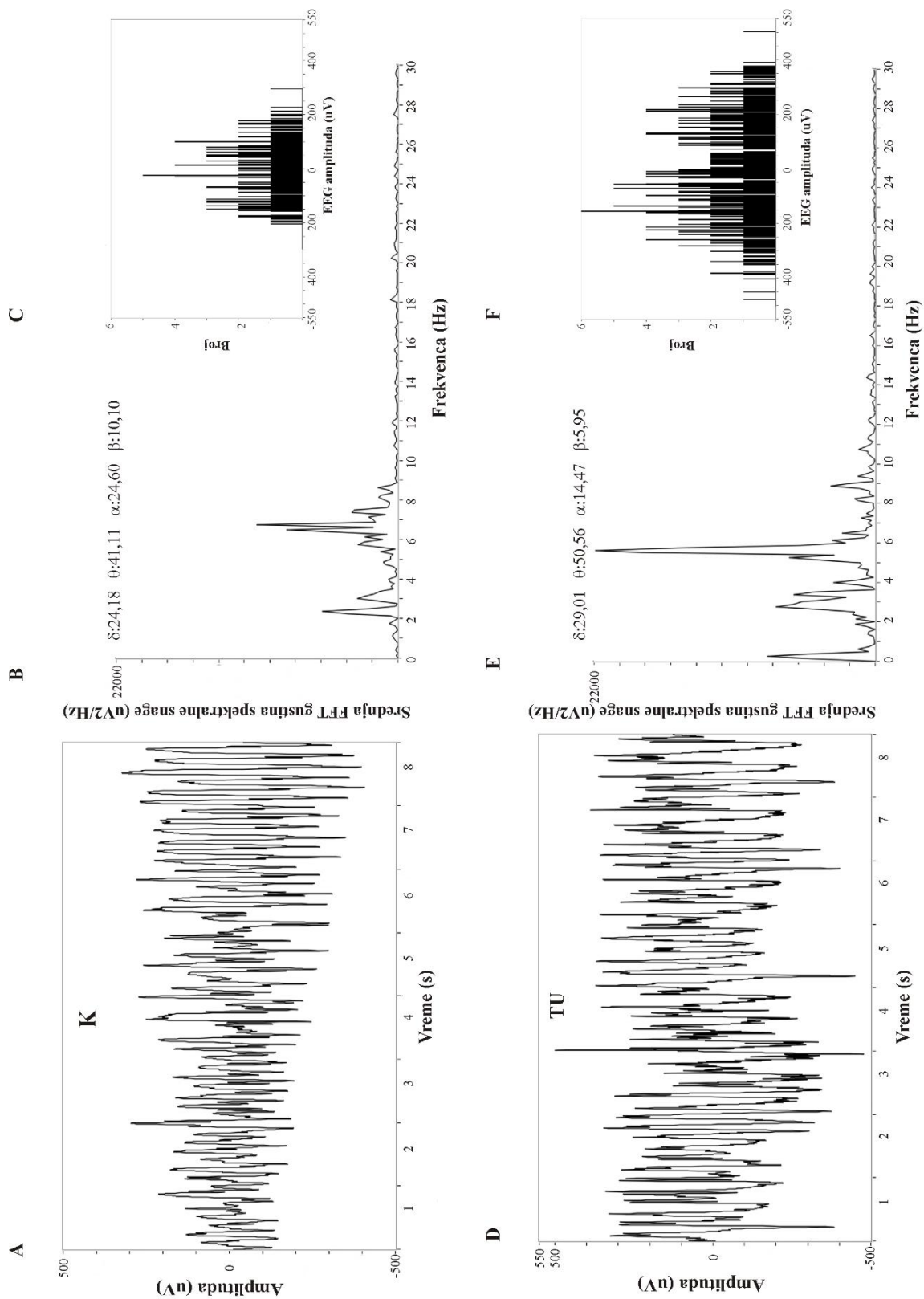
U kontrolnim grupama koje su tretirane fiziološkim rastvorom (Kk, TUK) nisu uočeni znaci epileptiformne aktivnosti, dok je analiza spektralne gustine pokazala da je dominantna aktivnost u α frekventnom opsegu.

Analiza zapisa životinja koje su tretirane D,L homocistein tiolaktonom (Kh i TUh) je pokazala dobru elektrokliničku korelaciju između uočenih motornih fenomena i EEG promena. Bioelektrična aktivnost frontalnog, parijetalnog i okcipitalnog korteksa je pokazala izolovane šiljke koji su predstavljali

prvi znak efekata D, L homocistein-tiolaktona, dok su napadi većeg intenziteta bili praćeni salvom visokovoltaznih šiljaka i šiljak-talas kompleksima.

Analizom zapisa utvrđeno je da su konvulzivni napadi u TUh grupi bili praćeni intenzivnijom EEG aktivnošću što se može videti na Slici 4.8.3. Naime, tokom napada intenziteta **gradus 2** (G2) u obe grupe su se mogle uočiti salve viskokovoltaznih šiljaka u EEG-u (Slika 4.8.3. A i D). Spektralnom analizom zapisa utvrđeno je da je ukupna spektralna gustina epoha bila značajno veća u TUh grupi ($24194,1 \pm 103,6 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$; $p < 0,05$), u poredjenju sa Kh ($14218,4 \pm 110,3 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$) grupom (Slika 4.8.3. B, E). Analiza histograma amplituda pokazala je da su amplitude šiljaka tokom G2 napada bile značajno veće u TU grupi (Slika 4.8.3. C, F).

Putem brze Furijeove transformacije (linearna transformacija, Hanning prozor, rezolucija spektra 0.083 Hz) izračunata je ukupna spektralna gustina u frekventnom opsegu 0,5 – 80 Hz kao i spektralna gustina po frekventnim opsezima: delta ($\delta = 0,5 - 4$ Hz); teta ($\theta = 4-7$ Hz); alfa ($\alpha = 7-15$ Hz) i beta ($\beta = 15-30$ Hz). EG aktivnost je registrovana od 120 do 180 minuta, dok je trajanje izolovanih i analiziranih epoha iznosilo 8s.

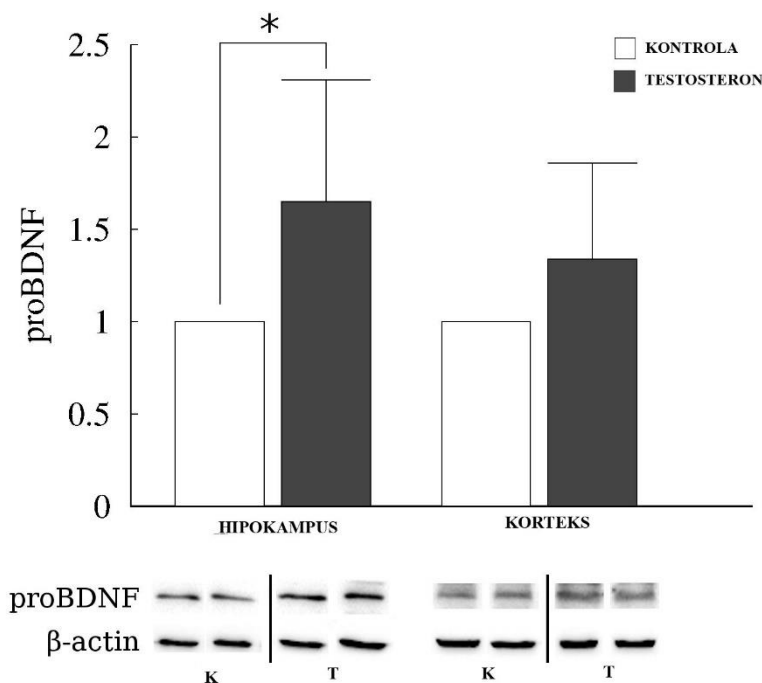


Slika 4.8.3. EEG aktivnost, spektralna gustina i histogram amplituda registrovani tokom konvulzivnih napada gradusa 2 u kontrolnoj (A, B, C) i eksperimentalnoj (D, E, F) grupi

4.9 Uticaj prenatalne androgenizacije na nivo proBDNF i BDNF proteina

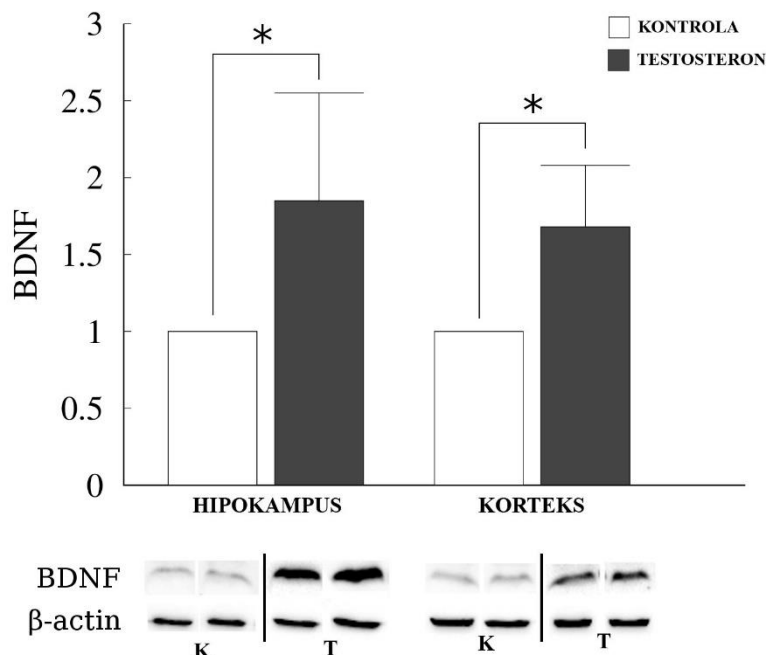
Efekti prenatalne androgenizacije ispoljeni su u vidu region-specifično povišenog nivoa ekspresije prekursora BDNF proteina. Nivo proBDNF proteina u hipokampusu eksperimentalne grupe životinja bio je statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0.05$, Slika 4.9.1).

Iako je ekspresija proBDNF proteina bila veća u korteksu životinja prenatalno tretiranih testosteronom, nije dosegnuta statistička značajnost razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p > 0.05$, Slika 4.9.1).



Slika 4.9.1. Efekat prenatalne androgenizacije na nivo proBDNF proteina u hipokampusu i korteksu kontrolne i eksperimentalne grupe životinja. Ekspresija proBDNF proteina u hipokampusu bila je značajno veća u testosteronom tretiranoj grupi životinja u poređenju sa kontrolom. ProBDNF ekspresija standardizovana je u odnosu na 1 (100%). Prikazani su reprezentativni blotovi udaljenih traka sa istog gela. Denzitometrija je prikazana kao srednja vrednost \pm SD, * $p < 0,05$

Nivo ekspresije BDNF proteina kod životinja prenatalno tretiranih testosteronom bio je značajno veći u obe ispitivane strukture – hipokampusu i korteksu, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja ($p < 0,05$, Slika 4.9.2)

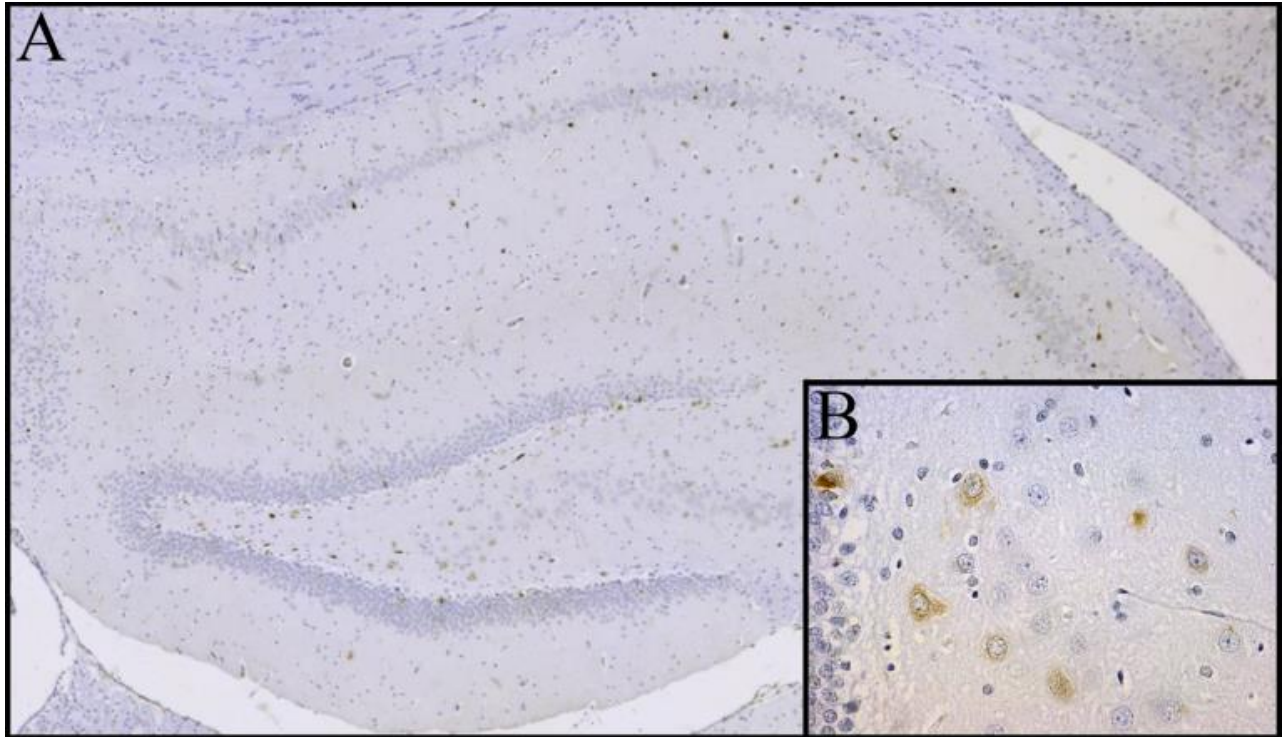


Slika 4.9.2. Efekat prenatalne androgenizacije na nivo proBDNF proteina u hipokampusu i korteksu kontrolne i eksperimentalne grupe životinja. Ekspresija proBDNF proteina u hipokampusu bila je značajno veća u testosteronom tretiranoj grupi životinja u poređenju sa kontrolom. ProBDNF ekspresija standardizovana je u odnosu na 1 (100%). Prikazani su reprezentativni blotovi udaljenih traka sa istog gela. Denzitometrija je prikazana kao srednja vrednost \pm SD, * $p < 0,05$

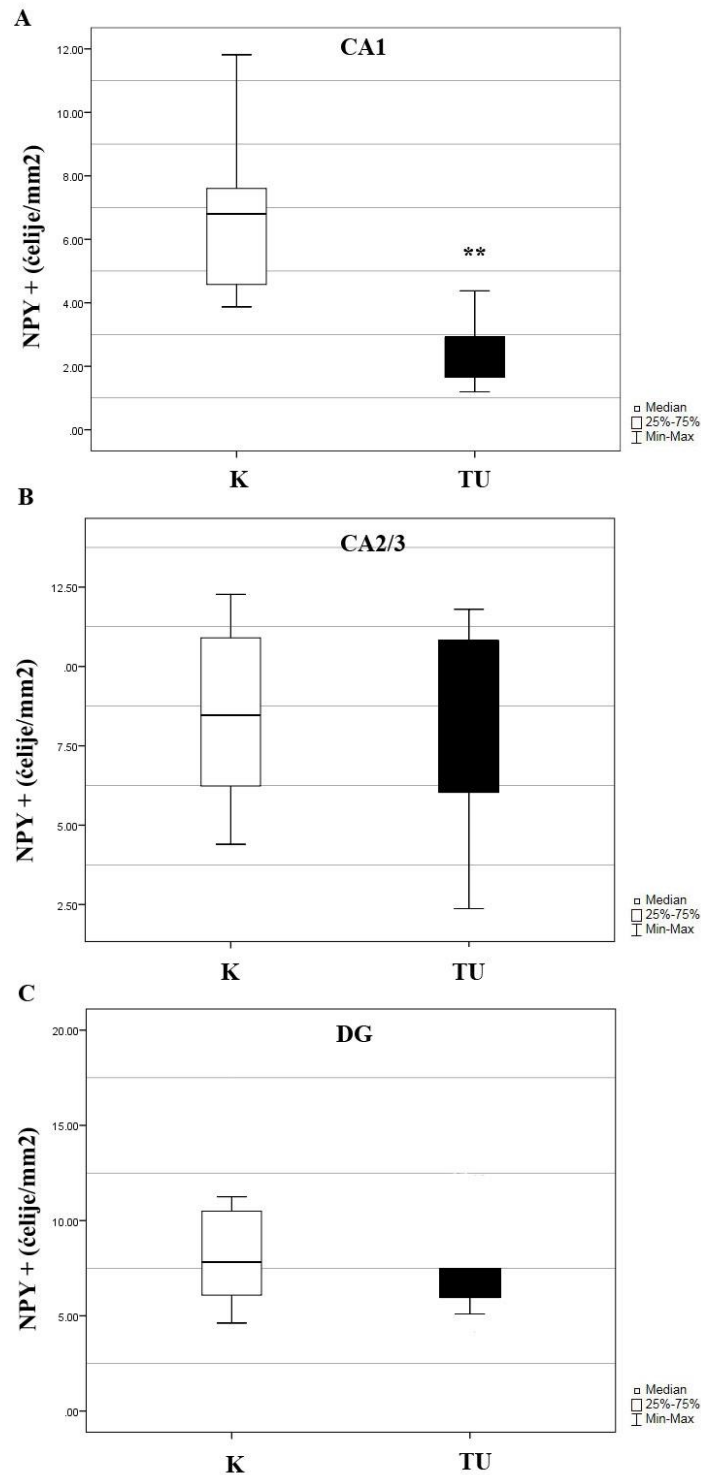
4.10.1. Uticaj prenatalne androgenizacije na ekspresiju imunoreaktivnih ćelija hipokampusu

Imunohistohemijsko bojenje antitelima za NPY i PV omogućilo je ispitivanje distribucije i promene GABA-ergičkih interneurona u delovima hipokampusu: CA1, CA2/3 i dentatnom girusu (DG) kod ženskih potomak majki tretiranih testosterone undekanoatom tokom graviditeta, kao i u kontrolnoj grupi životinja.

NPY imunoreaktivni interneuroni hipokampusu predominantno su lokalizovani u piramidnom sloju CA1 i CA2/3 regiona, dok je ekspresija u DG bila dominantno u hilusu (Slika 4.10.1). Prenatalni tretman testosterone undekanoatom uticao je na značajno smanjenje broja NPY imunoreaktivnih interneurona u CA1 regiji, u poređenju sa kontrolnom grupom ($U=16.0$, $Z=3.86$, $p < 0.01$; Slika 4.10.2.A), dok razlika ekspresije imunoreaktivnih NPY ćelija u CA2/3 ($U=103.0$, $Z=0.85$, $p > 0.05$; Slika 4.10.2.B) i DG ($U=112.0$, $Z=0.81$, $p > 0.05$; Slika 4.10.2.C) među ispitivanim grupama nije uočena.

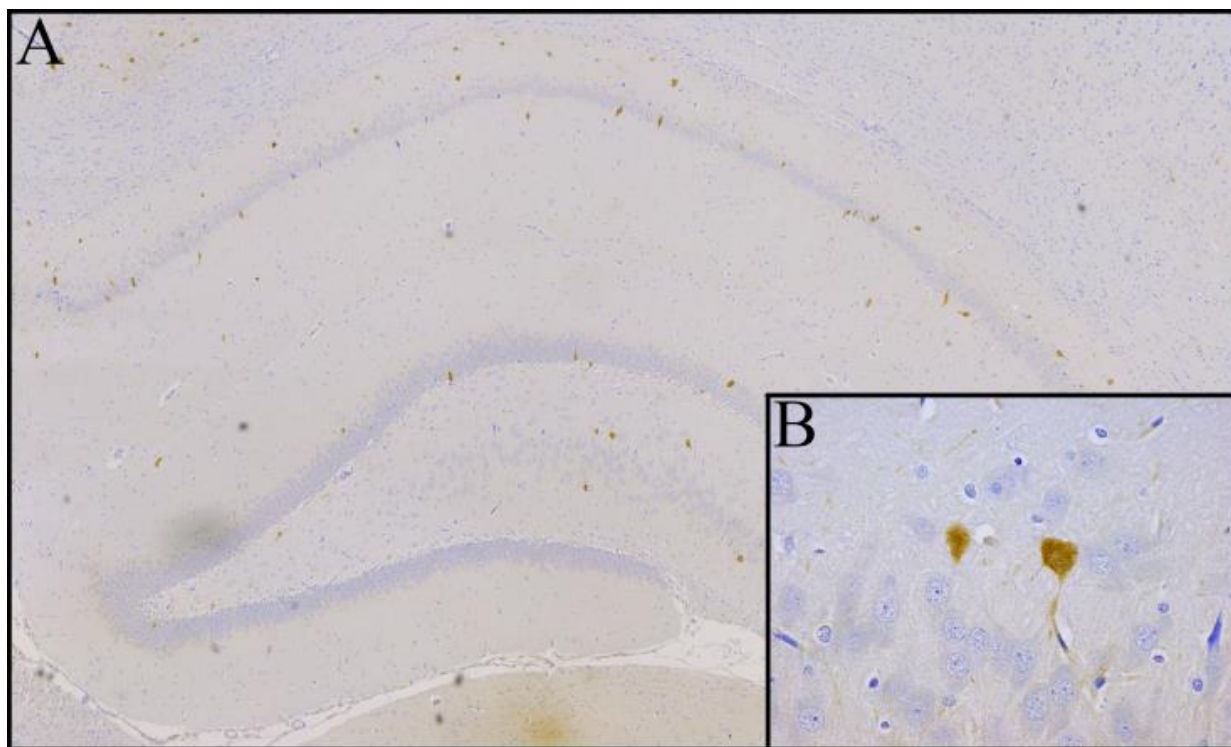


Slika 4.10.1. Reprezentativna fotografija imunohistohemijske ekspresije NPY interneurona hipokampusa kontrolne grupe životinja (**A, B**)

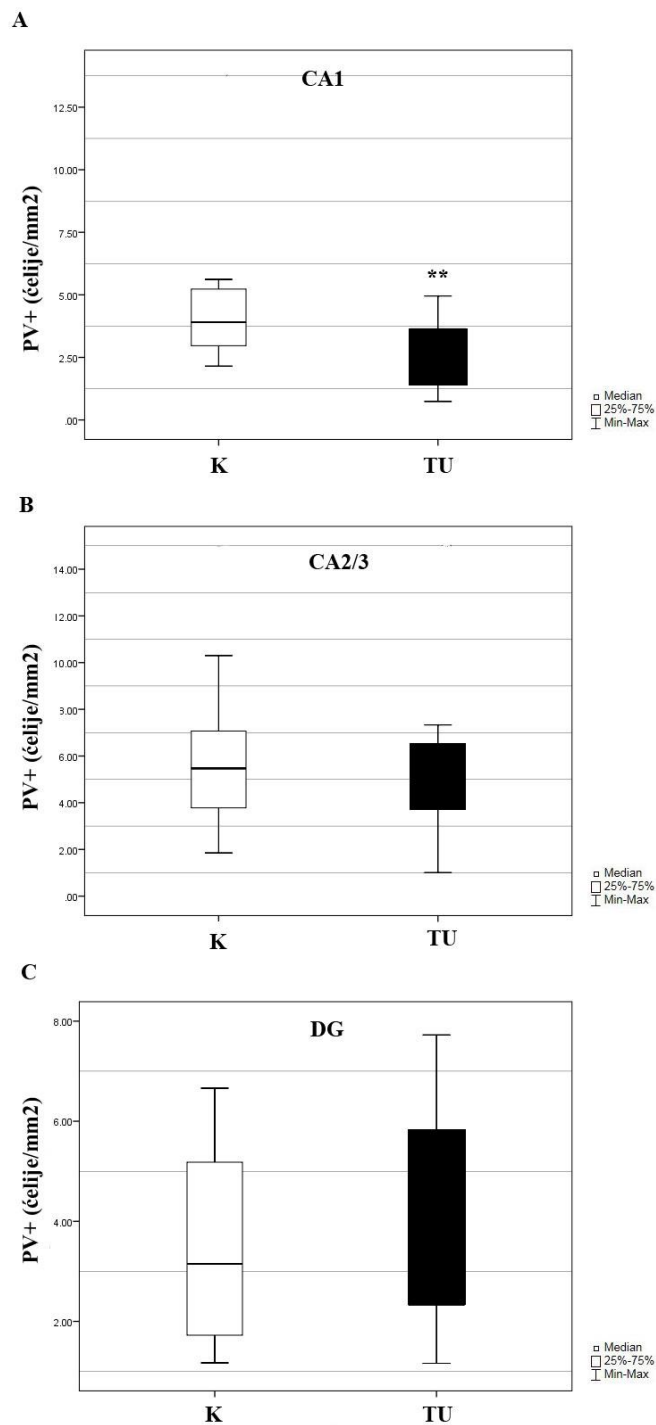


Slika 4.10.2. Uticaj prenatalne androgenizacije na broj NPY imunoreaktivnih interneurona u hipokampalnim regionima **(A)** CA1 regiji **(B)** CA2/3 regiji i **(C)** dentatnom girusu (DG). Rezultati su izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom. Statistička značajnost razlike među ispitivanim grupama procenjena je Mann-Whitney U testom (** $p < 0,01$).

Imunoreaktivnost PV eksprimirana je na isti način kao i NPY. Parvalbuminski interneuroni bili su izraženo lokalizovani u blizini ili u samom piramidnom sloju CA1 i CA2/3 regije, kao i u granularnom sloju dentatnog girusa, u obe ispitivane grupe životinja (Slika 4.10.3). Ekspresija parvalbuminskih interneurona CA1 regije bila je statistički značajno niža u testosteronskoj grupi životinja u poređenju sa kontrolnom grupom ($U=46.0$, $Z=3.02$, $p < 0.01$, Slika 4.10.4.A). Nije uočena statistička značajnost razlike u ekspresiji PV u CA2/3 regiji ($U=108.0$, $Z=0.66$, $p > 0.05$, Slika 4.10.4.B) niti u regiji DG ($U=117.0$, $Z=0.91$, $p > 0.05$, Slika 4.10.4.C).



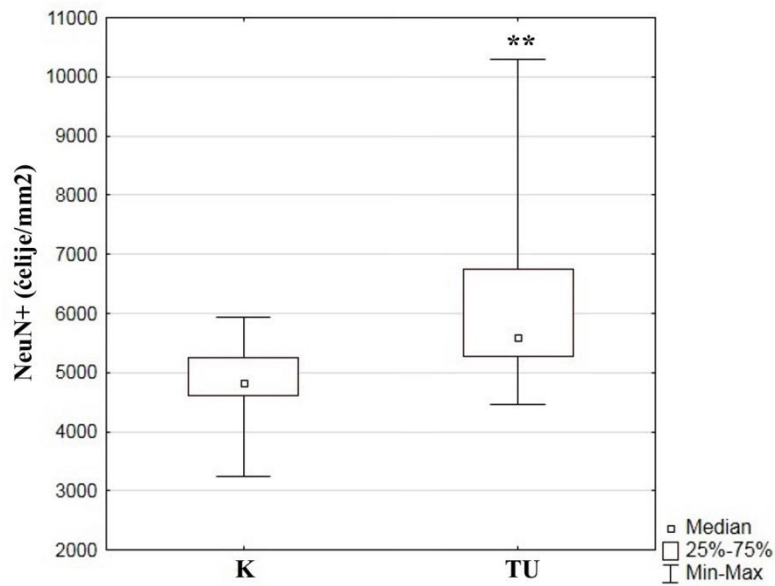
Slika 4.10.3. Reprezentativna fotografija imunohistochemijske ekspresije PV interneurona hipokampusa kontrolne grupe životinja (**A**, **B**)



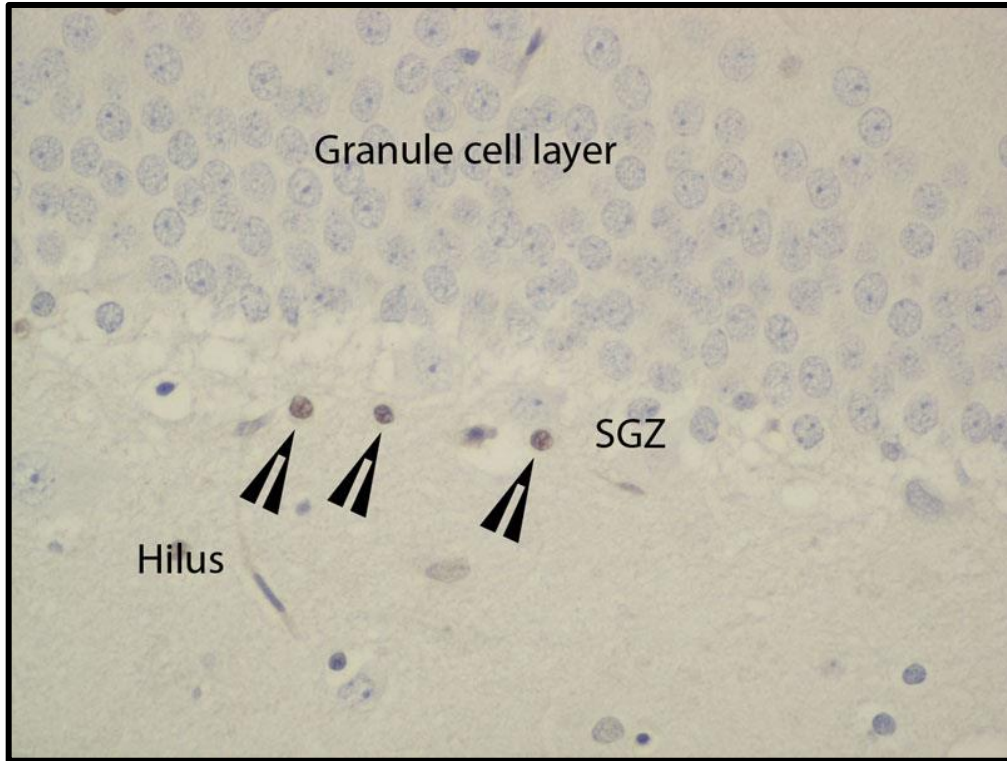
Slika 4.10.4. Uticaj prenatalne androgenizacije na broj PV imunoreaktivnih interneurona u hipokampalnim regionima (A) CA1 regiji (B) CA2/3 regiji i (C) dentatnom girusu (DG). Rezultati su izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom. Statistička značajnost razlike među ispitivanim grupama procenjena je Mann-Whitney U testom (** $p < 0,01$).



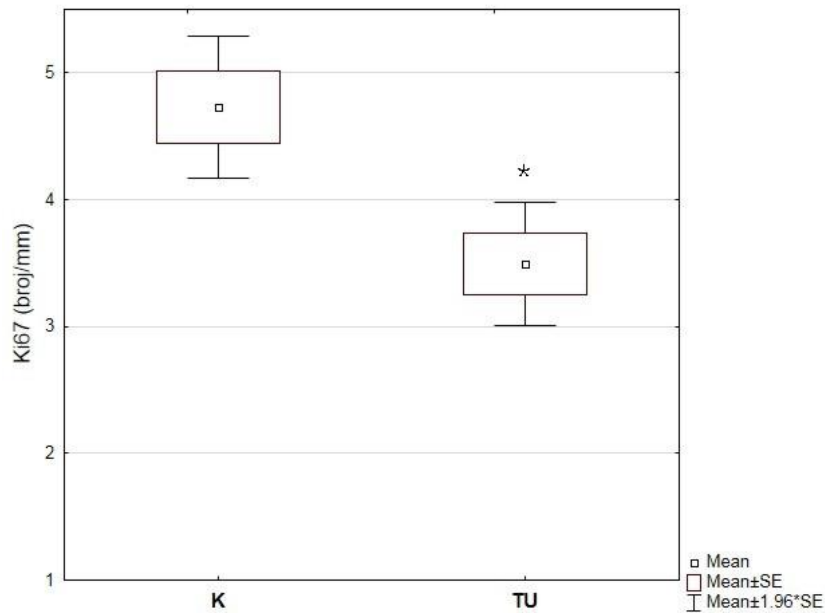
Slika 4.10.5. Reprezentativna fotografija imunohistohemijske ekspresije NeuN neurona u dentatnom girusu hipokampusa eksperimentalne grupe životinja, prenatalno tretirane testosteroone undekanoatom.



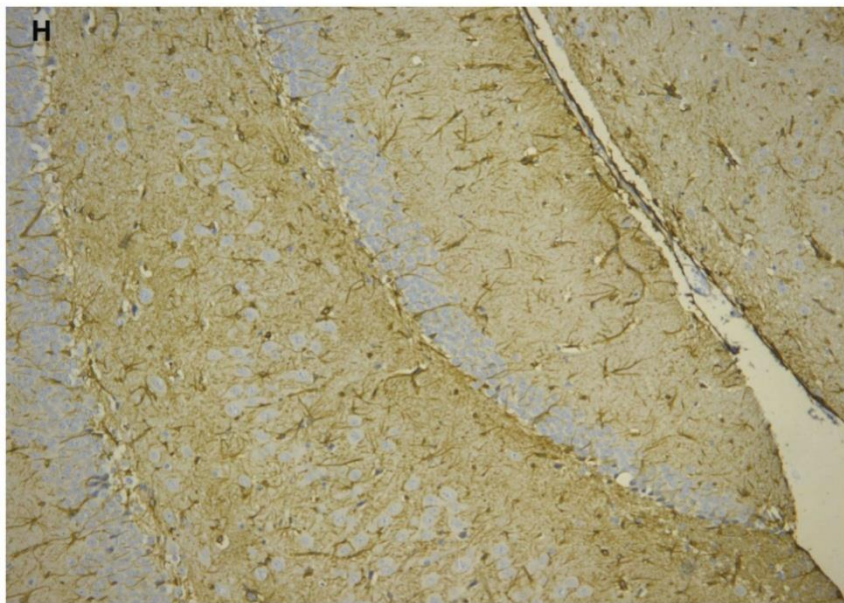
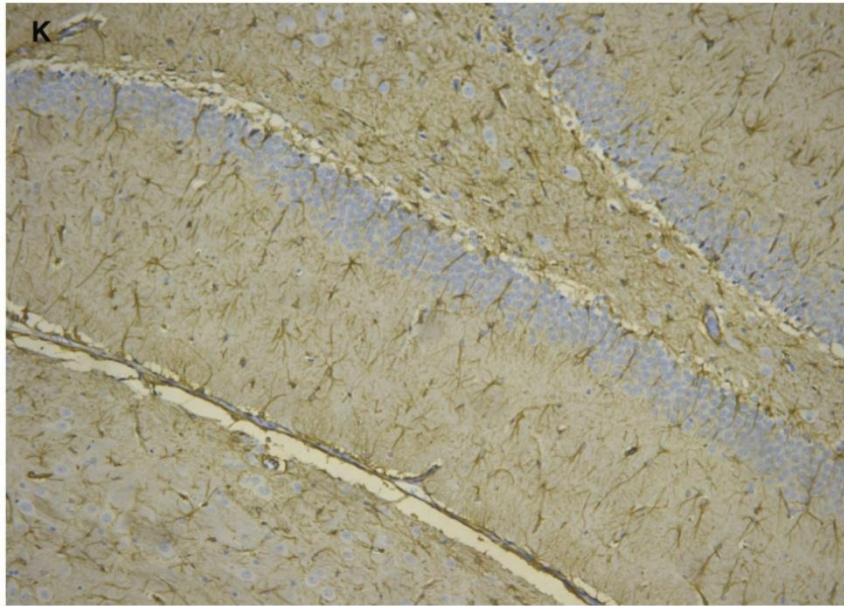
Slika 4.10.6. Uticaj prenatalne androgenizacije na broj NeuN imunoreaktivnih neurona u dentatnom girusu (DG). Statistička značajnost razlike među ispitivanim grupama procenjena je Mann-Whitney U testom (** $p < 0,01$).



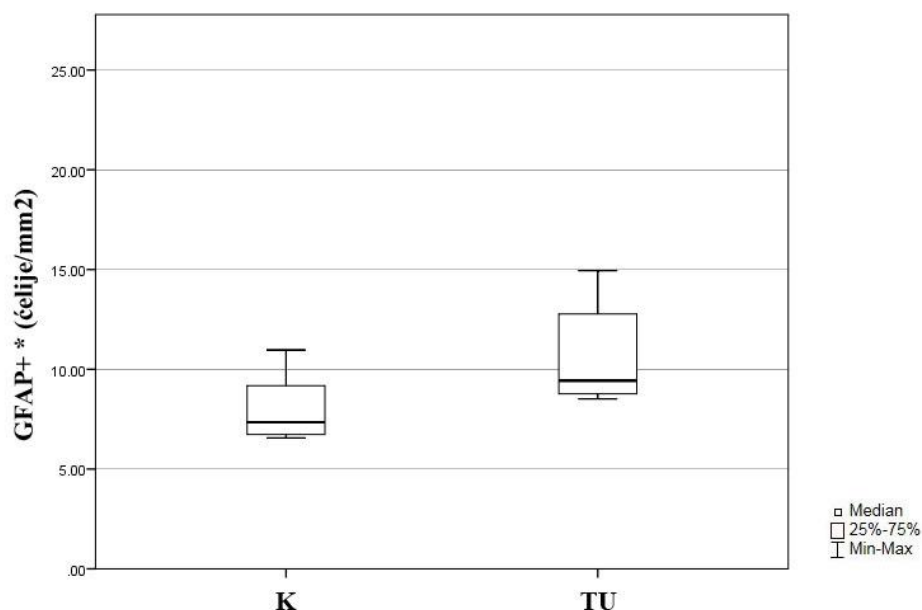
Slika 4.10.7. Reprezentativna fotografija imunohistohemijske ekspresije Ki67+ ćelija u subgranularnoj zoni dentatnog girusa hipokampusa eksperimentalne grupe životinja, prenatalno tretirane testosteroe undekanoatom. **SGZ** – subgranularna zona



Slika 4.10.8. Uticaj prenatalne androgenizacije na broj Ki67+ ćelija u dentatnom girusu (DG). Statistička značajnost razlike među ispitivanim grupama procenjena je Studentovim t tesotm. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± sd (*p<0,05).



Slika 4.10.9. Reprezentativne fotografije GFAP-pozitivnih ćelija u dentatnom girusu kontrolne (**K**) i eksperimentalen grupe životinja (**H**)



Slika 4.10.10. Uticaj prenatalne androgenizacije na broj GFAP+ ćelija u dentatnom girusu. Rezultati su izraženi medijanom i 25. i 75. percentilom. Statistička značajnost razlike među ispitivanim grupama procenjena je Mann-Whitney U testom ($p > 0,05$)

Broj NeuN pozitivnih ćelija po mm^2 u dentatnom girusu hipokampusa (Slika 4.10.5) bio je statistički značajno veći u grupi životinja prenatalno tretiranoj testosterone undekanoatom [6205.8 (5591.3-6820.9)] u poređenju sa kontrolom [4867.1 (4657.0 – 5076.3)] ($p < 0,01$, Slika 4.10.6).

Broj detektovanih Ki67+ imunoreaktivnih ćelija izražen je po 1 mm dužine SGZ hipokampusa (Slika 4.9.7.). Uočeno je da je broj Ki67+ značajno manji u TU grupi, u poređenju sa K grupom životinja ($p < 0,01$; Slika 4.10.8.).

Rezultat kvantifikacije GFAP pozitivnih ćelija/astrocita izražen je kao procenat površine koja je zahvaćena GFAP pozitivnim ćelijama podeljen sa površinom DG ili granularog sloja DG (Slika 4.10.9.). Analiza je pokazala da imunoreaktivnost GFAP ćelija u pomenutim regionima nije značajno razlikovala među ispitivanim grupama [K: 8,1 (6.36 – 9,83) vs. TU: 11,86 (7,23 -16,49), $p > 0,05$, Slika 4.10.10.]

4. Diskusija

Prenatalna androgenizacija predstavlja jedan od najboljih animalnih modela koji omogućava istraživanje fetalnog programiranja i njegove efekte u odraslom dobu (Padmanabhan i sar., 2010; Nisenblat i sar., 2010). Hiperandrogenizacija je jedna od karakteristika obolelih od PCOS, koji predstavlja jedno od najčešćih reproduktivnih oboljenja današnjice, sa prevalencom od 8 do 12% kod žena reproduktivne dobi (Franks, 2003). Etiologija poremećaja je još uvek nerasvetljena, ali savremene teorije ukazuju na postojanje genetskih i intrauterinih uzroka (McCartney i Marshall, 2016).

U okvirima naših saznanja i dostupne literature, ovo istraživanje je prvo u kome je korišćen testosteron undekanoat koji je administriran 20. gestacijskog u cilju izazivanja hormonskih karakteristika PCOSa – hiperandrogenizma majke tokom gestacije.

Brojnim istraživanjima o uticajima prenatalne androgenizacije, tokom poslednje dve decenije došlo se do zaključka da doza administriranog androgena treba da odgovara koncentraciji koja se registruje kod zdravih muških jedinki iste vrste (Amalfi i sar., 2012). Callies i saradnici (2003) su u uporednom analizom različitih preparata testosterona, pokazali da upravo testosteron undekanoat u dozi od 100mg/kg, subkutano administriran, može tokom četiri nedelje da održava koncentraciju testosterona u krvi koja odgovara fiziološkim vrednostima kod mužjaka pacova. U cilju razvoja prenatalnog modela PCOS kod pacova, veliki broj istraživača je zaključio je da je adekvatan period administracije testosterona od 16 do 19 dana gestacije: post-placentalno vreme kao i vreme tokom kojeg androgeni imaju ulogu neuromodulatora (Amalfi i sar., 2012). Ipak, uočeno je da se skok koncentracije androgena kod muških fetusa pacova događa od 16. do 21. gestacionog dana, te da primenjena doza androgena tokom ovog perioda može biti presudna za modulaciju ženskog ponašanja.

U našem istraživanju, primenjena doza testosterona 20. gestacijskog dana, rezultirala je značajnom razlikom ranog postnatalnog preživljavanja potomaka ženskog pola, gde je povećana smrtnost zabeležena u eksperimentalnoj grupi životinja.

Administracija testosterona tokom gestacije, dala je heterogene rezultate u ispitivanim grupama. Merenjem telesne mase utvrđeno je da su neposredno nakon odvajanja, 24. postnatalnog dana, potomci TU grupe imali značajno manju telesnu masu u poređenju sa potomcima K grupe. U daljem toku eksperimenta, od 8. pa sve do 11. nedelje života životinje TU grupe su imale značajno veću telesnu masu odnosu na K grupu. Kvantifikacijom unosa hrane uočeno je da nije bilo značajne razlike među grupama.

U uslovima hiperandrogenemije majke, stvaraju se uslovi za poremećaj placentalne steroidogeneze. Placentalni signalni transducer i activator transkripcije 2 (P-STAT3) povišen je kod žena sa PCOS. STAT3 je posrednik važnog puta u regulaciji placentalnog transporta hranljivih materija i posledičnog fetalnog rasta. I druge studije su pokazale da prenatalno izlaganje testosteronu smanjuje fetalni i placentalni rast (Sathishkumar i sar., 2011; Sun i sar., 2012), koji je takođe uzrokovan smanjenim prenošenjem amino kiselina preko placente (Sathishkumar i sar., 2011). Abbott i saradnici (2010) su pak našli da u uslovima prenatalne androgenizacije dolazi do pojačanog fetalnog rasta kao posledice poremećene cirkulacije fetalnih slobodnih masnih kiselina.

Testosteron stimuliše sintezu eritropoetina, što izaziva povećanje koncentracije hemoglobina i broj eritrocitaa (Bachman i sar., 2014). U normalnim uslovima, broj eritrocita se povećava tokom druge polovine gestacije i povezana je sa povišenom produkcijom eritropoetina. Adekvatna prokrvljenost placente esencijalna je za adekvatan razvoj ploda i dostizanje porođajne zrelosti (Poston, 1997). Uočeno je da majke sa PCOSom imaju značajno veći broj poremećaja rasta i razvoja fetusa, što ukazuje da jedan od uzroka može biti loša vaskularizacija placente (Boomsma i sar., 2008). Uporedna istraživanje

intenziteta eritropoeze fetusa kod majki obolelih od dijabetesa i hiperinsulinemičnih majmuna, pokazala su značajno povećanu eritropoezu, retikulocitozu usled mogućih hipoksičnih epizoda u samoj placenti. Sun i saradnici (2012) su histološkom analizom placente hiperandrogenizovanih ženki pacova uočili značajno manji broj eritrocita te prokrvljenost određenih regiona u poređenju sa zdravim kontrolama.

Izmerene koncentracije triglicerida u androgenizovanih životinja bile su značajno veće u poređenju sa kontrolnom grupom. Pretpostavlja se da osovina: androgeni-mozak-adipociti posreduje u metaboličkoj disfunkciji tokom PCOSa. U modelima hiperandrogenizacije na miševima, homeostatski kapaciteti leptina, hormona koji se sintetise u masnom tkiva, bili su značajno narušeni. Leptin utiče na proopiomelanokortinske neurone i neuropeptid Y neurone (Villanueva i sar., 2008), a uočen je poremećaj ovih puteva u modelima hiperandrogenizacije. Takođe je uočeno da blokada androgenskih receptora flutamidom sprečava ove poremećaje (Sheppard i sar., 2011). Uočeno je da hiperandrogenizacija takođe izaziva promenu morfologije i funkcije adipocita kod glodara, ovaca i primata (Cardoso i sar., 2015; Keller i sar., 2014; Caldwell i sar., 2017). Interesantno je da je promena morfologije adipocita primećena pre pojave insulinske rezisnecije na modelu PCOS kod ovaca (Cardoso i sar., 2015).

Koncentracija glikoze u serumu se nije značajno razlikovala u ispitivanim grupama, ali je intraperitonelani test tolerancije na glikozu pokazao je značajno više vrednosti u eksperimentalnoj grupi tokom srednjeg perioda mernih vemeni, u poređenju sa kontrolom. Najprominentniji metabolički poremećaji koji predstavljaju deo sindroma PCOS su hiperinsulinemija, insulinska rezistencija, diabetes tip 2, povećana telesna masa, oligo/anovulacija, poremećaj hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine i drugi (Foecking, 2005; Wu i sar., 2010). Prenatalnom administracijom androgena, omogućeni su analozi PCOS i metaboličkog sindroma pored odraslih pacova, kod majmuna (Abbott i sar., 2005) i kod ovaca (Manikkam i sar., 2006; Christine Knickmeyer i sar., 2006). Eksperimentalno izazvana hiperandrogenemija može rezultirati tranzitornim hiperglikemijskim epizodama tokom intrauterinog razvoja, što je dovoljno da indukuje povećanje pankreasne funkcije. Ovo sugerise mogući mehanizam diferencijalnog programiranja insulinske aktivnosti koji prethodi metaboličkoj disfunkciji u daljem toku rasta i razvoja (Filippou i Homburg, 2017). Počevši još od 1980. godine (Demissie i sar., 2008) i sve do danas, fenomeni povezanosti reproduktivnih i metaboličkih poremećaja predmet su opsežnih istraživanja. Brojni su dokazi da insulin ima ulogu kognadotropina i da na taj način stimuliše ovarijalnu produkciju androgena (Blank i sar., 2006). Ranijim studijama u kojima je pokazano da sniženje androgena utiče na poboljšanje insulinske senzitivnosti (Moggetti i sar., 1997), zaključeno je da insulinska rezistencija uzrokuje hiperandrogenemiju (Dunaif, 1997). Nasuprot tome, novije studije, kao i naša studija, pokazale su da izlaganje androgenima *in utero* izaziva promene koje su karakteristične za metabolički sindrom/PCOS kod ženskih potomaka (Noroazzadeh i sar., 2015).

U našem istraživanju, primenjena doza testosterona 20. gestacijskog dana, nije značajno uticala na postnatalnog preživljavanja potomaka. Ispitivanjem karakteristika legla, uočeno je da je u TU grupi ukupan broj potomaka i broj muških potomaka bio značajno manji u poređenju sa K grupom.

Kasna prenatalna primena testosterona nije značajno izmenila reproduktivni fenotip, iako su učene diskretne promene u estrusnom ciklusu. Ukupna dužina estrusnog ciklusa se nije razlikovala u TU i K grupi, ali je diestrus bio značajno kraći u TU grupi. Ipak morfometrijski pokazatelji nisu ukazali na razvoj maskulinizacije kao posledicu primene testosteron undekanoata u dozi od 100mg/kg u 20. gestacijskom danu. Diskretnom manipulacijom primenjenim dozama Wu i saradnici (2010) su našli da primena visokih doza testosterona od 14-18. gestacijskog dana, utiču na povećan mortalitet fetusa i potpunu defeminizaciju, dok Demissie i saradnici (2008) sa većom dozom primenjenog testosterona prenatalno nisu zabeležili značajan mortalitet, ali jesu potpunu defeminizaciju. Visok nivo testosterona u prenatalnom periodu utiče na razvoj defeminizacije mehanizmom frekventnije pulsne sekrecije gonadotropin-oslobađajućeg hormona (eng. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) (Foecking EM, 2005).

Rezultati studija koje su ispitivale uticaj prenatalnog testosterona na koncentracije polnih hormona u odraslih nisu konzistentni. Dok neke studije navode da prenatalni tretman testosteronom povećava nivo testosterona u plazmi kod odraslih ženki [34, 68], druge studije izveštavaju o smanjenom ili nepromenjenom nivou testosterona u plazmi kod potomstva. Naši rezultati su pokazali da kasna prenatalna primena testosterona nije značano uticala koncentracije testosterona, estradiola i progesterona kod adultnih ženskih potomaka. Ovaj rezultat je u skladu sa istraživanjem Domonkos i saradnika (2017) koji su pokazali da primena testosteron propionata od 18.-21. dana gestacije, nije značajno izmenila serumsku koncentraciju testosterona, estradiola i progesterona. Hu i saradnici (2015) su takođe pokazali da prenatalna primena testosteron propionata od 15-19 dana gestacije nije imala uticaj na nivo serumskog testosterona u potomstvu odraslih ženskih potomaka. Sa druge strane ekperimentima kod ovaca i majmuna uočeno je da visoki nivoi testosterona u krvi majke indukuju visok nivo testosterona u krvi ženskih potomaka (Veiga-Lopez i sar., 2011; Abbott i sar., 2010). Koncentracija sermuskog testosterona kod majki raste za 70% tokom trudnoće (O'Leary P. et al., 1991), dok je kod žena sa PCOS uočen još veći skok (Caanen MR. et al., 2016; Maliqueo M. et al., 2015). Testosteron je lipofilni hormon i potencijalnom difuzijom kroz placentu i može vršiti direktan uticaj na rast i razvoj ploda (Meulenberg i Hofman, 1991). Ipak, pokazano je da nivo testosterona kod majke ne korelira sa koncentracijom testosterona u krvi fetusa, barem ne u momentu porođaja, kada je fetalna cirkulacija dostupna ispitivanju (Troisi i sar., 2004). Pretpostavlja se da je aromataza prisutna u placenti, konveruje cirkulišuće androgene krvi majke u estrogene, štiteći na taj način ženski fetus od direktnog uticaja majčinskog testosterona (Kragie, 2002). Nađeni su višestruki polmorfizmi za gen koji kodira enzim aromatazu, a značajna povezanost disfunkcije ovog gena nađena je u uslovima hiperandrogenizma i gojaznosti (Pete, 2008). Histopatološki nalazi placenti žena sa PCOS pokazali su mikroskopske i makroskopske promene u poređenju sa zdravim kontrolama (Palomba, 2013; Maliqueo, 2013). Aktivnost važnih enzima u procesima placentalne sinteze steroida je bivala izmenjena: uočen je viši nivo aktivnosti 3 β -HSD-1 i snižena aktivnost P450 aromataze (Maliqueo i sar., 2013). Ranija istraživanja su pokazala da ženski potomci majki sa poremećajem gena za P450 aromatazu i steroid vezujuće globuline, tokom sazrevanja razvijaju PCOS (Morishima i sar., 1995). Nasuprot humanoj placenti, placenta glodara normalno sekretuje veoma malu količinu progesterona i testosterona (Warshaw i sar., 1986) i ne može sintetisati estrogen jer ne eksprimira aromatazu. Stoga je zavisna od estogena sintetisanog u ovarijumima (Sridaran i sar., 1981; Al-Bader, 2006). Daljim razmatranjima, uočeno je da je placentalna ekspresija enzima 17 β hidroksisteroid dehidrogenaze povišena u odgovoru na administraciju testosterona majkama. U placenti glodara 17 β hidroksisteroid dehidrogenaza je ekspimirana u glavnom u funkcionalnoj zoni (decidualna i bazalna) i ovaj enzim konvertuje 17 β hidroksi forme estradiola i testosterona u njihove manje aktivne 17-keto produkte (Wetzel i sar., 2011). S obzirom na ove činjenice, sugerisano je da povećana aktivnost ovog enzima u uslovima hiperandrogenemije majke, štiti fetus od velike količine 17-hidroksisteroida prisutnih u amninskoj tečnosti (Wetzel i sar., 2011). Iako je ekspimiranje androgenih receptora (AR) u normalnim uslovima veoma niska u placenti, primećena je značajno povišena AR imunoreaktivnost u bazalnoj zoni placenti kod fetusa kao odgovor na tretman majki testosteronom (Sathishkumar i sar., 2012). Uloga signalne transdukcije putem androgenih receptora u placenti nije u potpunosti razjašnjena, ali je uočeno da poremećaj njihove funkcije utiče na sveukupni razvoj i funkciju placenti.

Razvijanjem modela prenatalne androgenizacije implantacijom depo-preparata DHT tokom gestacije, Wang i saradnici (2018) su pak pokazali značajan poremećaj nivoa FSH, dok se nivo LH nije razlikovao u odnosu na zdrave kontrole. Ovi autori su uočili značajno sniženje nivoa testosterona kod ženskih potomaka, što je uočeno i u našoj studiji, ali bez statistički značajne razlike. Detaljnijim molekularnim ispitivanjem, uočen je važan epigenetski mehanizam uticaja uticaja PCOS *in utero* (Lambertini i sar., 2017). Primarni efekat PCOS epigenetskog otiska ogleđa se u promeni kodiranja

gena za estrogenski receptor α (ESR1). Pretpostavlja se da ushodna regulacija ESR1 *in utero* može biti osnova razvoja metaboličkog sindroma i disfunkcije koja se događa od perioda polnog sazrevanja do odraslog doba. Signalna kaskada koju indukuje aktivacija ESR1 aktivira u daljem toku fosfo inozitol 3 kinazu koja uzrokuje poremećaj oksido-reduktivnog lanca i insulinsku rezistenciju aktivacijom narednog signalnog puta (Yang i sar., 2014).

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da hiperandrogenemija u gestacionom periodu indukuje anksiozno ponašanje kod adultnih ženskih potomaka. Anksiozni poremećaji su među najčešćim od svih psihijatrijskih poremećaja (Duval i sar., 2015), a uloga polnih hormona u njihovom razvoju je prilično složena. Veća prevalenca anksioznosti kod žena i hipogonadnih muškaraca u poređenju sa zdravim muškarcima ukazuje na anksiolitički efekat androgena (Stevens i Hamann, 2013). Ovo je potvrđeno eksperimentalnim studijama, gde je nakon administracije testosterona uočeno smanjenje anksioznog ponašanja kod orhiektomisanih mužjaka pacova i miševa (Bing i sar., 1998; Aikey i sar., 2002). Nasuprot orhiektomisanim mužjacima pacova, primjena fiziološka doza testosterona kod ovariektomisanih ženki pacova, nije imala uticaja na anksiozno ponašanje (Carrier i Kabbaj, 2012). Iako je hiperandrogenemija najistaknutija metabolička karakteristika PCOSa, navodi se da skoro 60% žena sa PCOSom ima dijagnostikovan najmanje jedan psihijatrijski poremećaj kao što su anksioznost, depresija ili poremećaj ishrane (Krepula i sar., 2012). Mehanizmi razvoja anksioznosti kod odraslih potomaka izloženih prenatalnoj hiperandrogenizaciji u majki nisu u potpunosti utvrđeni. Poznato je da steroidni hormoni imaju značajan epigenetski uticaj na rani razvoj mozga, pa postavljaju osnovu za kasniju interakciju između genoma i okoline u stvaranju varijacija neuronskih i bihevioralnih fenotipova (Bale i sar., 2010; Jessen i Auger, 2011).

Naši rezultati su pokazali da kasna prenatalna androgenizacija majki izaziva smanjenje broja NPY+ i PV+interneurona u CA1 regionu hipokampusa. Ovo je u skladu sa istraživanjem Joksimovića i saradnika (2017) koji su takođe uočili značajno smanjenje broja NPY+ interneurona posle tretmana sintetskim androgenom - nandrolon dekanoatom, što je u bihevioralnom smislu pozitivno koreliralo sa anksioznom i depresivnim ponašanjem. Hipokampalna regija CA1 je visoko podložna uticaju androgena tokom razvoja (Murray i sar., 2009) i eksprimira visok nivo mRNA androgenog receptora (Lu i sar., 1998). Studije na glodarima pružile su brojne dokaze koji dokazuju vezu između NPY i PV interneurona i anksioznosti.

Genetski deficit NPYa kod miševa povezan je sa anksioznom fenotipom, a primena NPY kod ovih jedinki rezultovala je jasnim anksiolitičkim dejstvom (Bannon i sar., 2000; Sudakov i sar., 2001). Pored toga, intracerebroventrikularna primena NPYa smanjuje anksiozno ponašanje u uzdignutom krstastom lavirintu, Vogelovom testu konflikta i drugim bihevioralnim testovima (Broqua i sar., 1995; Britton i sar., 1997). Istraživanjem strukturno-specifičnih mesta identifikovani su hipokampus, amigdale, locus coeruleus i bočni septum kao ključnim u anksiolitičkom dejstvu NPY (Trent i Menard, 2001; Lin i sar., 2004). Sa druge strane, optogenetske studije su dokazale značaj GABAergičke, a posebno parvalbuminske interneuronske aktivnosti u hipokampusu u smanjenju anksioznosti (Pelkey i sar., 2017). PV interneuroni su potrebni za sinhronizaciju aktivacije u neuronskim mrežama CA1 regije hipokampusu. Funkcionalna uloga ove grupe interneurona uočena je u korelaciji snižene aktivnosti sa pamćenjem straha (Zou i sar., 2016).

Ispitivanjem nocioceptivnog praga kod odraslih ženskih potomaka, nakon prenatalnog tretmana testosteron undekanoatom, nisu uočeni značajno različiti rezultati u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Brojne kliničke studije su pokazale da se testosteron može veoma pouzdano koristiti za tretman horničnog bola. Njegova efikasnost se pokazala značajnom, te je čak američka agencija za

hranu i lekove (Food and Drug Administration, FDA) odobrila ovaj vid tretmana kod žena sa hroničnim bolom kao što je fibromialgija (White i sar., 2015). Vrlo jasni dokazi ukazuju da je uloga androgena u percepciji bola, ispitana kroz eksperimentalne studije na životinjama, organizaciona i to tokom kritični perioda razvoja (Aloisi, 2000; Cicero i sar., 2002; Craft i sar., 2004). Pokazano je da, kada su u pitanju ženke, testosteronom-bogata intrauterine sredina vodi većoj senzitivnosti na receptore za hladno. Ovo je interesantno, s obzirom da su mnoga istraživanja pokazala manju osetljivost na bol kod mužjaka u odnosu na ženke (Harbuz i sar., 1995; Hau i sar., 2004). Ipak, samo nekoliko humanih studija je poredilo nivo cirkulatornog testosteronu sa osetljivošću na bol, a ovi rezultati su prilično inkonzistentni (Dessein i sar., 1999, 2000; Houghton i sar., 2000; Seguin i sar., 1996). Mehanizmi koji leže u osnovi hormonski uslovljenih promena bazalnog nociceptivnog praga još uvek nisu razjašnjeni. Regije mozga kao što je periakveduktalna siva masa, koji predstavljaju descendenti inhibitorni put, sadrže androgene receptore (Murphy i sar., 1999) i estrogenske (alfa) receptore (Murphy i sar., 1999; VanderHorst i sar., 1998). Skoro svi motoneuroni takođe, sadrže androgene receptore (Matsumoto, 1997). Interesantno je i neohodno naglasiti da sve regije koje ekspimiraju androgene receptore u značajnom broju, sadrže takođe i opioidne receptore (Murphy i sar., 1999; VanderHorst i sar., 1997).

Rezultati naše studije pokazuju da prenatalna hiperandrogenizacija snižava konvulzivni prag u prenatalno androgenizovanih ženskih potomaka u homocisteinskom modelu epilepsija. Prethodne studije iz naše laboratorije (Stanojlović i dr., 2009) otkrile su da hiperhomocisteinemija izaziva ponavljajuće neprovocirane klonične-tonične konvulzije i absansu slične napade koji su praćeni karakterističnim elektroencefalografskim fenomenom, šiljak-talas pražnjenjima. Naša prethodna istraživanja pokazala su da homocistein tiolakton u dozi 5,5 mmol/kg izaziva konvulzivne napade gradusa 1 (pokreti glave i donje vilice) što ga čini pogodnim za ispitivanje uticaja potencijalnih prokonvulzivnih supstanci.

Rezultati naše studije pokazuju da je prenatalna hiperandrogenizacija ženskog potomstva značajno povećala incidencu, skratila latencu i povećala intenzitet konvulzivnih napada izazvanih homocistein tiolaktonom. Prenatalna primena testosteronu je dramatično povećala letalitet životinja nakon 90 min i 24 h. Prikazani rezultati ukazuju da je prenatalna primena hiperandrogenizacija ženskog potomstva ispoljila prokonvulzivno dejstvo i povećala osetljivost na napade izazvane homocisteinom u adultnom periodu.

Jedan od mehanizama povećane podložnosti napadima izazvanim homocisteinom nakon prenatalne androgenizacije mogla bi biti stimulacija hipokampne neurogeneze. Proliferativna aktivnost (Ki67 +) u subgranularnoj zoni DG hipokampusa nije bila značajno izmenjena iako je pokazivala trend smanjenja u TU grupi. Takođe je u TU grupi u DG registrovana povećana NeuN imunoreaktivnost, koja je odraz broja zrelih neurona. Imajući u vidu da prenatalni tretman nije uticao na koncentracije testosteronu i estrogenu u serumu (Rankov Petrović i sur., 2019), nalaz povećanog broja neurona može biti posledica ontogenetskih uticaja koji su posledica prenatalne androgenemije.

Nove publikacije pružile su uvid u jedinstvena svojstva novonastalih neurona tokom prvih 6 nedelja starosti, kojim se objašnjava njihov uticaj na povećanu ekscitabilnost (Anacker i Hen, 2017; Drev i sar., 2013). U periodu od 4 do 6 nedelje nakon rođenja, mladi neuroni se povezuju tri-sinaptički hipokampalni krug, ali se po elektrofiziološkim svojstvima razlikuju od zrelih neurona: otpor pri provođenju impulsa je veći, dok je prag akcionog potencijala niži u odnosu na zrele neurone (Dieni i sar., 2013; Lombardi i Schinder, 2009). S druge strane, nalazi Iyengar i sar. (2015) su pokazali primena kainatne kiseline indukuje napade jačeg intenziteta kod miševa sa smanjenom adultnom neurogenezom. Ova pojava se može objasniti osobinom nezrelih GABA neurona da na stimulus reaguju depolarizacijom, a ne hiperpolarizacijom kao što je to slučaj sa zrelim neuronima (Karten i sar., 2006; Marin-Burgin i sar., 2012; Markvardt i Overstreet-Wadiche, 2008)-

Eksperimentalne studije ukazuju da neuroni nastali tokom adultne neurogeneze ispoljavaju znatno veću ekscitabilnost (Scharfman i Bernstein, 2015; Scharfman i McCloskey, 2009) u poređenju sa zrelim granularnim ćelijama i da mogu snažno da aktiviraju lokalne GABAerگیčke interneurone (Drev i sar., 2016; Toni i sar., 2008). Aktivnost GABAerگیčkih PV+ interneurona je neophodna za integraciju i sazrevanje mladih neurona (Alvarez i sar., 2016). Niži konvulzivni prag i veća ekscitabilnost koja je demonstrirana u našim eksperimentima može biti posledica smanjenog broja PV+ interneurona u hipokampusu prenatalno androgenizovanih ženskih pacova (Rankov Petrović i sar., 2019).

Uočili smo da je ekspresija proBDNF u hipokampusu potomaka prenatalno tretiranih testosteronom bila značajno veća u odnosu na kontrolu. Analiza nivoa ekspresije ovog proteina u korteksu nije pokazala različitost među ispitivanim grupama.

Smatra se da je BDNF signalizacija u dentatnom girusu je od velikog značaja, s obzirom da reguliše građu i aktivnost neurona (Chen i sar., 2006) i moduliše ekscitabilnost moždanih regiona koji regulišu protok informacija ka hipokampusu (Binder i sar., 2001). Zreli BDNF je sekretorni protein koji se oslobađa nakon proteolitičkog cepanja proBDNF (Mowla i sar., 2001), a spoljna regulacija ovog procesa je važan događaj, jer dalje određuje da li će se aktivirati p75^{NTR} ili Trk receptori (Yang i sar., 2009). U hipokampalnim ćelijama fetusa pacova, testosteron može povećati ekspresiju mBDNF koja podstiče neurogenezu putem TrkB receptora (Pan i Zhang, 2013). ProBDNF i mBDNF često imaju suprotne efekte na sinaptičku transmisiju i stabilnost (Chao, 2003). Rezultati istraživanja ukazuju da proBDNF efekte ostvaruje putem p75^{NTR} receptora čime se može objasniti pojava neuroloških poremećaja (Volosin i sar., 2008). Pojačana proBDNF / p75^{NTR} signalizacija vodi povećanoj neuronskoj ekscitabilnosti. Ova kaskada biva prekinuta administracijom blokatora p75^{NTR} (Riffault i sar., 2018). S druge strane, studijom Holma i saradnika (2009) pokazano je da signalni put koji aktivira mBDNF, smanjuje ekscitabilnost brzo-podražljivih interneurona u dentatnom girusu. mBDNF potencira GABAerگیčku inhibiciju putem aktivacije TrkB receptora, koji se može detektovati u parvalbumin-pozitivnim interneuronima. GABAerگیčni interneuroni dentatnog girusa ne odgovaraju na podražaje administracijom proBDNF (Holm i sar., 2009), a pretpostavlja se da je uzrok ovoga nedostatak p75^{NTR} receptora (Dougherty i Milner, 1999). Uočena činjenica da prenatalna androgenizacija kod odraslih ženskih potomaka utiče na smanjenje broja parvalbuminskih interneurona u hipokampusu, ukazuje na mogući mehanizam dejstva kojim se snižava prag ekscitacije u u uslovima povećane ekspresije pro i mBDNFa.

Zanimljivo je da u različitim regionima mozga, androgeni ostvaruju različit uticaj na ekspresiju BDN. U regionima van hipokampusa, koncentracija serumskog androgena je u korelaciji sa ekspresijom mBDNFa, što nije pokazano da je slučaj u hipokampusu (Hill i sar., 2012). Verhovshchek i saradnici (2010) su pokazali da se nakon administracije testosterona orhidektomisanim pacovima, povećava koncentracija mBDNF proteina u spinalnim motoneuronima. Rezultati naše studije su ukazali da ekspresija mBDNF raste kao odgovor na prenatalnu androgenizaciju i u korteksu i u hipokampusu. Ekspresija proBDNF je bila povećana u hipokampusu, ali ne i u korteksu prenatalno androgenizovanih ženskih potomaka. S obzirom na ovu kontradiktornost, efekti testosterona moraju biti veoma pažljivo tumačeni, a mogu se protumačiti mogućnošću da testosteron utiče na proces proteolize i cepanja proteinskog prekursora proBDNF (Atwi i sar., 2014).

U trenutno dostupnoj literaturi ograničena je količina podataka o uticaju prenatalne i postnatalne hiperandrogenizacije na ekspresiju BDNF u mozgu odraslog potomstva. Priroda ovog odnosa je veoma složena i mehanizam zavisi od posmatranog regiona mozga. Kliničko istraživanje sprovedeno kod transseksualnih osoba pokazalo je da uprkos dramatičnim promenama hormonskog miljea nivo BDNF nije značajno promenjen (Auer i sar., 2016). Eksperimentalne studije pokazuju da administracija ženskih polnih hormona nakon gonadektomije, ne utiču na ekspresiju BDNF mRNA u

hipokampusu adultnih mužjaka pacova (Carrier i Kabbaj, 2012), ni na nivo hipokampalnog BDNF proteina u adolescentnih miševa i adultnih možjaka pacova (Pluchino i sar., 2013; Numakawa i sar., 2018). Ipak, postoje dokazi koji ukazuju na to da je testosteron u stanju da modulira nivo BDNF u mozgu (Serrano-Pozo i sar., 2011; Mogi i sar., 1999). Naime, testosteron povećava ekspresiju BDNF i tropomiozinin receptor kinaze B (TrkB) u korteksu odraslih glodara (Verhovshek i Sengelau, 2010). U frontalnoj regiji mozga muških miševa, porast ekspresije BDNF-a vremenski odgovara porastu testosterona u adolescenciji; i obrnuto, zabeleženo je značajno smanjenja TrkB, receptora visokog afiniteta za BDNF, sa povećanim testosteronom u korteksu (Pluchino i sar., 2013). Na osnovu prethodno navedenih nalaza može se pretpostaviti da androgenizacija može imati različite efekte na ekspresiju BDNF u prenatalnom i postnatalnom periodu. Ova mogućnost je dodatno podkrepljena činjenicom da se funkcionalna organizacija mozga i neurotransmiterski milje značajno razlikuju tokom prenatalnog i adultnog perioda. BDNF se eksprimira u korteksu i hipokampusu i igra važnu ulogu u razvoju, preživljavanju i održavanju neurona, kao i u regulaciji sinaptičke plastičnosti (Numakawa i sar., 2018). Otkriveno je da je smanjena ekspresija BDNF-a povezana sa Alzheimerovom bolešću, Parkinsonovom bolešću, shizofrenijom i depresijom (Serrano-Pozo i sar., 2011; Mogi i sar., 1999; Ray i sar., 2014).

Ova studija je pokazala region specifično povećanje ekspresije proBDNF i mBDNF proteina, uz istovremeno smanjenje ćelijske proliferacije u DG (Ki67), smanjenu ekspresiju inhibicijskih PV+ i NPY+ interneurona, dok broj NeuN imunoreaktivnih neurona bio povećan a ekspresija GFAP imunoreaktivnih ćelija glije u hipokampusu, a u odnosu na kontrolu.

Nivo BDNF se može povećati kao kompezatorni odgovor na smanjenje ćelijske proliferacije i smanjenje broja inhibicijskih interneurona. Sa druge strane, BDNF možda nema uticaja na razvoj inhibitornih interneurona u hipokampusu, te je ovaj nalaz slučajan. Ovu hipotezu može potkrepiti i studija Danzera i McNamare (2004), koja je pokazala da BDNF nije eksprimiran u interneuronima hipokampusa. Međutim, ovaj nalaz je u određenoj meri i kontraverzan. Glorioso i saradnici (2006) su utvrdili da interneuroni ekspimiraju TrkB i zahtevaju BDNF sintetizovan piramidnim neuronima za diferencijaciju i sazrevanje. Približno 80% PV neurona eksprimira TrkB (Gorba i Wahe, 1999). Pokazano je da BDNF modulira autoregulationo kolo između ekscitacijskih piramidnih ćelija i inhibitornih interneurona u hipokampusu (Kanematsu i sar., 2006). Na osnovu ovih nalaza verovatnije je da se porast BDNF-a u hipokampusu može smatrati adaptivnim odgovorom.

Uticaj BDNF na NPY neurone još je komplikovaniji. Pokazano je da stimulacija Y2 receptora od strane NPY povećava nivo BDNF što potom biva povezano sa poboljšanjem motorne funkcije u modelu Huntington-ove bolesti. S druge strane, otkriveno je da BDNF protein potencira diferencijaciju inhibicijskih NPY i PV interneurona u kulturi embriona pacova (Ghiglieri i sar., 2010). Dalje, Purves-Tison i saradnici (2015) sugerišu da postoje dinamični odnosi između BDNF/TrkB i interneurona koji zavise od prisustva testosterona. Ovi nalazi nisu u skladu sa rezultatima ove studije, koja je pokazala obrnutu vezu između nivoa BDNF i broja NPY neurona. Ovo ukazuje da se razvoj NPY neurona reguliše na složeniji način i uključuje brojne neurotrofične faktore, čiji se efekti razlikuju u različitim fazama razvoja mozga. BDNF i njegov receptor TrkB mogu igrati ključne uloge u regulisanju protoka informacija kroz neuronske krugove od prefrontalnog korteksa, preko CA3 regiona do CA1 regije, putem mahovinastih vlakana. Ovaj put sadrži visku koncentraciju BDNF proteina u CNS-u (Wong i sar., 2009), što može bar delimično objasniti nalaze ove studije o paralelnom povećanju nivoa BDNF u korteksu i hipokampusu prenatalno androgenizovanih ženki pacova .

Prenatalna primena testosterona u našem istraživanju nije uticala na kvantifikaciju NPY ili PV imunoreaktivnost u DG. BDNF indukuje diferencijaciju neuralnih progenitorskih ćelija u ekscitatorne granularne neurone u dentatnom girusu, ali i na inhibicijske. S toga nalaz povećane ekspresije pro- i mBDNF proteina može korelirati sa nadjenim rezultatom povećanog broja NeuN u hipokampusu.

Iako je uloga oksidativnog stresa u epileptogenezi dobro poznata (Silvestri i sar., 1992; Pauletti i dr., 2017), prokonvulzivni uticaj prenatalne androgenizacije u modelu epilepsija izazvanih DL homocistein tiolaktonom, ne može se direktno pripisati oksidativnom stresu u mozgu. Peroksidacija lipida, nitracija tirozina i koncentracija tiolnih grupa nisu bile izmenjene nakon prenatalne izloženosti testosteronu. Nasuprot tome, naša studija je otkrila da prenatalna androgenizacija poboljšava antioksidativni kapacitet korteksa i hipokampusa, usled povećanog nivoa aktivnosti glutathion peroksidaze i superoksid dizmutaze. Ovi nalazi su verovatno multifaktorskog porekla. Mehanizmi delovanja testosterona na oksidativni status mozga još uvek nisu razjašnjeni. Guzman i saradnici (2005) su otkrili da testosteron smanjuje peroksidaciju lipida u mozgu pacova. Metaboliti testosterona stupaju u interakciju sa ROS proizvedenim u mozgu nakon izlaganja organskim rastvaračima (Guzman i sar., 2005). Pored toga, orhidektomija izaziva peroksidaciju lipida u hipokampusu pacova i smanjuje aktivnost SOD i GPx, i ovi efekti mogu biti poništeni egzogenom primenom testosterona (Meidan i sar., 2010).

S druge strane, otkriveno je da pojačana sekrecija testosterona koja pozitivno korelira sa reproduktivnim ponašanjem kod mužjaka pacova, povećava peroksidaciju lipida u mozgu i indukuje nitrozativno oštećenja tokom starenja (Alabarse i sar., 2011). Međutim, ovaj nalaz povezan je sa povećanom aktivnošću GPx-a i SOD-a. Zanimljivost je da aktivnost GPx i SOD raste pre peroksidacije lipida (Alabarse i sur., 2011), od 3 meseca starosti. Budući da smo kroz naše istraživanje testirali životinje približno iste starosti, to može sugerisati da prenatalna androgenizacija potencijalno utiče na peroksidaciju lipida kasnije u životu, ali najpre vrši ushodnu regulaciju antioksidantnih enzima GPx i SOD. Pored toga, imajući u vidu da su u ovom istraživanju korišćene ženke pacova, estrogeni sa svojim moćnim antioksidativnim efektom mogu sprečavati lipidnu peroksidaciju u mozgu.

Iako nisu direktno uključeni, ne možemo u potpunosti isključiti indirektnu ulogu oksidativnog stresa u ispoljavanju prokonvulzivnog uticaja prenatalne androgenizacije. Prenatalna izloženost testosteronu ne utiče na nivo ovog hormona u starosti u kojoj smo koristili u ovoj studiji. Međutim, testosteron može uticati na oksidativni status mozga u ranijim periodima života. Poznato je da su *cornu ammonis* (CA) 1, CA3 i ćelije granularnog sloja DG veoma osetljive na oksidativne povrede (Vang i Michaelis, 2010). Oksidativna oštećenja ovih regija mogu oslabiti proliferaciju ćelija i neurogenezu, izmeniti funkciju N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora i modulirati neuroplastičnost, sintezu BDNFa i remodeliranje neuronske mreže (Salim, 2017). Pošto je povećana neurogeneza u ranom životu nakon prenatalne androgenizacije sugerisana u skladu sa NeuN imunoreaktivnošću, ne možemo isključiti da je oksidativni stres izazvan testosteronom uticao na ovaj proces. Pored toga, efekti testosterona na oksidativni stres u mozgu tokom prenatalnog i/ili ranog postnatalnog života mogu potencijalno indukovati adaptivni porast aktivnosti SOD i GPx utvrđene u ovoj studiji. Bez obzira na vezu testosterona, oksidativnog stresa u mozgu i osetljivosti na napade, naše istraživanje pokazuje da upotreba antioksidanata u odrasлом periodu ne bi umanjila rizik od konvulzija izazvanih homocisteinom posle prenatalne androgenizacije.

Prethodne studije sugerišu da izloženost žena androgenima tokom prenatalnog života može dovesti do pojave PCOS fenotipa u odrasloj dobi. Raste svest o kontaminaciji životne sredine i sve većoj izloženosti supstancama koje ispoljavaju androgena svojstva. Sve je više dokaza da izloženost androgenima, naročito tokom osetljivih perioda u razvoju jedinke kao što je prenatalni period, značajno menja reproduktivni i metabolični fenotip i ponašanje jedinke. Od naročitog su značaja modeli prenatalne androgenizacije koji nisu praćeni morfološkim poremećajima građe reproduktivnog sistema jer omogućavaju ispitivanje diskretnih i kumulativnih efekata androgena iz životne sredine.

5. ZAKLJUČCI

1. Na osnovu rezultata ove disertacije može se zaključiti da kasna prenatalna androgenizacija gravidnih ženki pacova, administracijom sporo oslobađajućeg oblika testosterona (undekanoata) utiče na smanjeno preživljavanje i telesnu masu preživelih potomaka.
2. Prenatalna androgenizacija testosteron undekanoatom u dozi 100mg/kg, u 20. danu gestacije, ne utiče u značajnoj meri na izmenu reproduktivnog fenotipa. Primenjena doza testosterona ne rezultira razvojem maskulinizacije (anogenitalna distanca i indeks anogenitalne distance). Ipak fine promene reproduktivnog fenotipa mogu se uočiti u trajanju pojedinih faza estrusnog ciklusa. Histološka građa jajnika odraslih ženskih potomaka nije promenjena dejstvom prenatalne hiperandrogenemije majke.
3. Administracija testosterona izaziva povišen nivo triglicerida u serumu, ali ne utiče na nivo glikoze našte. Ipak, ovaj tretman utiče na poremećaj regulacije glikoze i potencijalno uzrokuje insulinsku rezistenciju. Nivo testosterona, progesterona i estradiola nije poremećen uticajem prenatalne androgenizacije, dok se nivo kortikosterona značajno snižava.
4. Prenatalni tretman testosteronom utiče na povećanje antioksidativnih kapaciteta mozga, povećanom ekspresijom antioksidativnih enzima SOD i GPx u hipokampusu.
5. U dentatnom girusu adultnih ženskih potomaka, uočena je snižena ćelijska proliferativna aktivnost kvantifikovana Ki67 imunoreaktivnošću. Ipak prenatalni tretman testosteronom utiče na povećanje broja neurona u dentatnom girusu hipokampusa kvantifikovanih NeuN imunoreaktivnošću. S obzirom na ove nalaze, moguće je da se aktivna proliferativna aktivnost odigrava u ontogenetski ranijim stupnjevima u odnosu na izabrani period kvantifikacije u našem eksperimentu.
6. Prenatalni uticaj testosterona rezultuje smanjenjem broja GABAergičkih interneurona (PV i NPY) u CA1 regiji hipokampusa, ali ne utiče na GFAP+ glijalne ćelije. Porast nivoa prekursora i zrelog oblika moždanog neurotrofičkog faktora (BDNF) beleži se kao posledica prenatalne androgenizacije u hipokampusu i kori velikog mozga. Da li je ovo adaptivni odgovor na aktuelno smanjenu proliferativnu aktivnost i/ili smanjenje broja interneurona u hipokampusu ostaje kao predmet istraživanja nekih budućih dinamskih studija.
7. Prenatalna androgenizacija ne sipoljava značajne efekte u promeni nociceptivnog praga. Navedeni tretman ima proanksiogeno dejstvo kod odraslih ženskih potomaka, a ovo može biti posledica smanjene toničke inhibicije GABAergičkim interneuronima. Ova činjenica može ležati u osnovi i prokonvulzivnog efekta prenatalne androgenizacije. Poremećena dinamika i geneza oksidativnog stresa potencijalno može remodelovati neuronske mreže i na taj način usloviti povećanu osetljivost na genezu epileptičnih napada. Oksidativni stres u ontogenetski ranijim fazama razvoja potencijalno može ležati u osnovi uočenog povećanja NeuN pozitivnih neurona koji svojom neadekvatnom funkcionalnom integracijom mogu doprineti proanksiogenom i prokonvulzivnom dejstvu prenatalne hiperandrogenemije.

8. S obzirom da nakon prenatalne androgenizacije nije došlo do promene nivoa hormona: testosterona, estradiola i progesterona kod odraslih ženskih potomaka pretpostavljeno je da su promene ispoljene u adultnom dobu posledica “organizacionog” dejstva androgena tokom fetalnog rasta i razvoja, a ne direktno “aktivirajuće” dejstvo aktuelne hormonske promene.

6. LITERATURA

- Abraham H, et al. Myelination in the human hippocampal formation from midgestation to adulthood. *Int J Dev Neurosci.* 2010; 28: 401–10.
- Adams C, Kumar R. The effect of estrogen in a man with Parkinson's disease and a review of its therapeutic potential. *Int J Neurosci.* 2013; 123 (10): 741–742.
- Aikey JL, Nyby JG, Anmuth DM, James PJ. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). *Horm Behav.* 2002; 42: 448–60.
- Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci.* 2014; 8: 199.
- Albrecht ED, Pepe GJ. Central integrative role of estrogen in modulating the communication between the placenta and fetus that results in primate fetal–placental development. *Placenta.* 1999; 20: 129–39.
- Albrecht ED, Pepe GJ. Chapter 40 - Placental Endocrine Function and Hormone Action. Eds: Plant TM, Zeleznik AJ, Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*, Academic Press, 2015; 1783-1834.
- Amalfi S, Velez LM, Heber MF et al. renatal Hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depend on the levels of testosterone exposure. *Plos One* 2012; 7 (5): e37658, Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2012; 27 (1): 14-24.
- Arnold SE, Trojanowski JQ. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *Journal of Comparative Neurology.* 1996; 367: 274–292.
- Auer MK, Hellweg R, Briken P, Stalla GK, T'Sjoen G, Fuss J. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is not regulated by testosterone in transmen. *Biology of Sex Differences,* 2016; 7: 1.
- Autry AE., Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Reviews,* 2012; 64(2): 238–258.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol.* 2009; 513: 532–541.

Baldereschi M, Di Carlo A, Lepore V, Bracco L, Maggi S, et al. Estrogen-replacement therapy and Alzheimer's disease in the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*. 1998; 50 (4): 996–1002.

Bali A, Jaggi AS. Multifunctional aspects of allopregnanolone in stress and related disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 48: 64–78.

Balter JE, Molner JL, Kohrt WM, Maluf KS. Mechanical pain sensitivity and the severity of chronic neck pain and disability are not modulated across the menstrual cycle. *J Pain*. 2013; 14(11): 1450–1459.

Balthazart J, Ball GF. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci*. 2006; 29: 241-249.

Bandelow B. Current and Novel Psychopharmacological Drugs for Anxiety Disorders. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1191: 347–365.

Barha CK, Lieblich SE, Chow C, Galea LA. Multiparity-induced enhancement of hippocampal neurogenesis and spatial memory depends on ovarian hormone status in middle age. *Neurobiol. Aging*, 2015; 36: 2391–2405.

Barha CK, Lieblich SE, Galea LA. Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neuroendocrinol*. 2009; 21 (3): 155-66.

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998; 95: 115–28.

Barker JM, Galea LA. Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male rats. *Neuroscience*. 2008; 152(4): 888-902.

Barnabé-Heider F, Miller FD. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci*. 2003; 23 (12): 5149–5160.

Baxter Jr LR, Mazziotta JC, Phelps ME, Selin CE, Guze BH, Fairbanks L. Cerebral glucose metabolic rates in normal human females versus normal males. *Psychiatry Res*. 1987; 21(3): 237–45.

Bayer SA, Altman J. *The Human Brain during the Second Trimester*. 2005, CRC Press.

Benes FM, Turtle M, Khan Y, Farol P. Myelination of a key relay zone in the hippocampal formation occurs in the human brain during childhood, adolescence, and adulthood. *Arch Gen Psychiatry*. 1994; 51: 477–84.

Berry B, McMahan R, Gallagher M. Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behav. Neurosci*, 1997; 111: 267–274.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000; 49 (2 Suppl 1): 3–8.

Bimonte-Nelson HA, Singleton RS, Hunter CL, Price KL, Moore AB, et al. Ovarian hormones and cognition in the aged female rat: I. Longterm, but not short-term, ovariectomy enhances spatial performance. *Behav. Neurosci*, 2003;117: 1395–1406.

Bishop KM, Rubenstein JL, O'Leary DD. Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex. *The Journal of Neuroscience*. 2002; 22(17): 7627–7638.

Borzan J, Fuchs PN. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. *Neuroscience* 2006; 143(3): 885–893.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(3):287–299.

Bystron DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. 2010; 464: 554–561.

Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9: 110–122.

Cairns BE, Gazerani P. Sex-related differences in pain. *Maturitas*. 2009; 63 (4): 292–296.

Carlino D, Francavilla R, Baj G, Kulak K, d'Adamo P, et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels in genetically isolated populations: gender-specific association with anxiety disorder subtypes but not with anxiety levels or Val66Met polymorphism. *PeerJ*. 2015; 3:e1252.

Carlsen SM, Jacobsen G, Romundstad P. Maternal testosterone levels during pregnancy are associated with offspring size at birth. *Eur J Endocrinol*. 2006; 155(2): 365–370.

Carroll JC, Rosario ER. The potential use of hormone-based therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9(1): 18–34.

Carver CM, Reddy DS. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA (A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013; 230 (2): 151–188.

Celec P, Ostaťníková D, Hodosy J. On the effects of testosterone on brain behavioral functions. *Front Neurosci*. 2015; 9: 12.

Celotti F, Melcangi RC, Martini L. The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Front Neuroendocrinol*. 1992; 13 (2): 163–215.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979; 59(3): 527–605.

Chen H, Koubeissi MZ. Electroencephalography in Epilepsy Evaluation. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2019; 25 (2): 431–453.

Chesler EJ, Juraska JM. Acute administration of estrogen and progesterone impairs the acquisition of the spatial morris water maze in ovariectomized rats. *Horm. Behav*, 2000; 38: 234–242.

Conejo NM, González-Pardo H, Pedraza C, Navarro FF, Vallejo G, et al. Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. *Neuroscience Letters*. 2003; 339 (2): 119–122.

Craft RM, Bernal SA. Sex differences in opioid antinociception: kappa and 'mixed action' agonists. *Drug Alcohol Depend*. 2001; 63 (3): 215-28.

Craft RM. Modulation of pain by estrogens. *Pain*. 2007; 132: S3–S12.

Cunningham GR, Toma SM. Clinical review: Why is androgen replacement in males controversial? *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(1): 38–52.

Dalla C, Papachristos EB, Whetstone AS, Shors TJ. Female rats learn trace memories better than male rats and consequently retain a greater proportion of new neurons in their hippocampi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (8): 2927-32.

Dao TT, LeResche L. Gender differences in pain. *J. Orofac. Pain* 2000; 14: 169–184.

De Azevedo LC, Fallet C, Moura-Neto V, Dumas-Duport C, Hedin-Pereira C, et al. Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes. *J Neurobiol*. 2003; 55: 288–298.

Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75 (NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*. 2002; 5: 1131–1136.

Domonkos E, Hodosy J, Ostatníková D, Celec P. On the Role of Testosterone in Anxiety-Like Behavior Across Life in Experimental Rodents. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018, 6 ;9:441.

Duarte-Guterman P, Yagi S, Chow C, Galea LAM. Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Hormones and Behavior*. 2015; 74: 37–52.

Duque A, Krsnik Z, Kostovic I, Rakic P. Secondary expansion of the transient subplate zone in the developing cerebrum of human and nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2016; 113: 9892–9897.

Edelmann E, Cepeda-Prado E, Franck M, Lichtenecker P, Brigadski T, et al. Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP. *Neuron*. 2015; 86 (4): 1041–1054.

Ehrmann DA. Medical progress: polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 2005; 352: 1223–1236.

Engin E, Treit D. The anxiolytic-like effects of allopregnanolone vary as a function of intracerebral microinfusion site: the amygdala, medial prefrontal cortex, or hippocampus. *Behav Pharmacol.* 2007; 18 (5-6): 461–470.

Fanaei H, Karimian SM, Sadeghipour HR, et al. Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats. *Brain Res.* 2014; 1558: 74–83.

Farinetti A, Tomasi S, Foglio B, Ferraris A, Ponti G, et al. Testosterone and estradiol differentially affect cell proliferation in the subventricular zone of young adult gonadectomized male and female rats. *Neuroscience.* 2015; 286: 162-70.

Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L. Anxiolytic-like actions of testosterone in the burying behavior test: Role of androgen and GABA-benzodiazepine receptors. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30: 762–70.

Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 2017, 8; 89 (6): 642.

Fillingim RB, Ness TJ. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic response. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000; 24: 485–501.

Frye CA. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol. Behav.* 1995; 57: 5–14.

Galea LA, McEwen BS. Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience.* 1999; 89 (3): 955-64.

Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult, *Hippocampus*, 2006; 16: 225–232.

Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus.* 2006; 16 (3): 225-32.

Gavalas A, Ruhrberg C, Livet J, Henderson CE, Krumlauf R. Neuronal defects in the hindbrain of Hoxa1, Hoxb2 and Hoxb2 mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Development.* 2003; 130 (23): 5663–5679.

Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling.* 2007; 19: 1807–1819.

Gibbs RB. Estrogen therapy and cognition: a review of the cholinergic hypothesis. *Endocr. Rev.* 2010; 31: 224–253.

Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Differentiation of the Neural Tube.

Gilmore JH, Knickmeyer RC, Gao W. Imaging structural and functional brain development in early childhood. *Nat Rev Neurosci*. 2018; 19(3): 123–137.

Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 2008; 359: 61–73.

Gordon JA, Hen R. The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular Med*. 2004; 5 (1) :27–40.

Grabowska A. Sex on the brain: Are gender-dependent structural and functional differences associated with behavior? *J Neurosci Res*. 2017 Jan 2; 95(1-2): 200-212.

Greenspan JD, Craft RM, Leresche L, et al. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report. *Pain*. 2007; 132: 26–S45.

Gregg C, Zhang J, Weissbourd B, Luo S, Schroth GP, et al. High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. *Science*. 2010, 329: 643-648.

Gu Y, Dee CM, Shen J. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011; 3: 1216-31.

Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9) in blood. *Zeitsch Klin Chem Klin Biochem* 1974; 12: 444–8.

Gur RC, Gur RE, Obrist WD, et al. Sex and handedness differences in cerebral blood flow during rest and cognitive activity. *Science* 1982; 217(4560): 659–61.

Hall, C. S. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 1934, 18, 385-403.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35 (Pt 5): 1147–1150.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th. Oxford, UK: Clarendon Press; 2007.

Hamson DK, Wainwright SR, Taylor JR, Jones BA, Watson NV, Galea LA. Androgens increase survival of adult-born neurons in the dentate gyrus by an androgen receptor-dependent mechanism in male rats. *Endocrinology*. 2013; 154 (9): 3294-304.

Harada N, Ogawa H, Shozu M, et al. Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. *J Biol Chem*. 1992; 267: 4781–85.

Hasegawa M., Houdou S, Mito T, Takashima S, Asanuma K, et al. Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: A myelin basic protein immunohistochemical study. *Brain and Development*. 1992; 14: 1–6.

Henry JF, Sherwin BB. Hormones and cognitive functioning during late pregnancy and postpartum: a longitudinal study. *Behav Neurosci*, 2012; 126 (1): 73-85.

Herzog AG, Fowler KM, Smithson SD, et al. Progesterone vs placebo therapy for women with epilepsy: a randomized clinical trial. *Neurology*. 2012; 78: 1959–1966.

Herzog AG, Fowler KM, Sperling MR, et al. Variation of seizure frequency with ovulatory status of menstrual cycles. *Epilepsia*. 2011; 52: 1843–1848.

Herzog AG, Klein P, Ransil BJ. Three patterns of catamenial epilepsy. *Epilepsia*. 1997; 38: 1082–1088.

Herzog AG. Menstrual disorders in women with epilepsy. *Neurology*. 2006; 66(3): S23–28.

Hickey M, Bryant C, Judd F. Evaluation and management of depressive and anxiety symptoms in midlife. *Climacteric*. 2012; 15(1): 3–9.

Hines M, Golombok S, Rust J, Johnston KJ, Golding J. et al. Testosterone during pregnancy and gender role behavior of preschool children: a longitudinal, population study. *Child Dev*. 2002; 73 (6): 1678-87.

Hines M. Sex-related variation in human behavior and the brain. *Trends Cogn Sci*. 2010; 14(10): 448-56.

Hofbauer RK, Rainville P, Duncan GH, Bushnell MC. Cortical representation of the sensory dimension of pain. *J Neurophysiol* 2001; 86: 402– 11

Hojo MY, Inoue K, Matsui T, Kawato S. et al. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109 (32): 13100–13105.

Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*. 2006; 444: 486–489.

Iacovides S, Avidon I, Baker FC. Does pain vary across the menstrual cycle? A review. *Eur J Pain*. 2015; 19 (10): 1389–1405.

Ishikawa Y, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. The primary brain vesicles revisited: are the three primary vesicles (forebrain/midbrain/hindbrain) universal in vertebrates? *Brain Behav Evol*. 2012; 79 (2): 75-83.

Jessberger S, Kempermann G. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*. 2003; 18 (10): 2707-12.

Jessberger S, Nakashima K, Clemenson GD Jr, Mejia E, Mathews E. et al. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline, *J. Neurosci*. 2007; 27: 5967–5975.

Jiang X, Xu K, Hoberman J. et al. BDNF variation and mood disorders: A novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects. *Neuropsychopharmacology*, 2005; 30 (7): 1353–1361.

Joksimovic J, Selakovic D, Matovic M. et al. The role of neuropeptide-Y in nandrolone decanoate-induced attenuation of antidepressant effect of exercise. *Plos One* 2017; 12(6): e0178922.

Judas M, Ceganec M. Adult structure and development of the human fronto-opercular cerebral cortex (Broca's region). *Clin Linguist Phon*. 2007; 21 (11-12): 975-89.

Juntti SA, Tollkuhn J, Wu MV, Fraser EJ, Soderborg T, et al. NM: The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron*. 2010; 66:260-272.

Keil KP, Sethi S, Wilson MD, Chen H, Lein PJ. In vivo and in vitro sex differences in the dendritic morphology of developing murine hippocampal and cortical neurons. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 8486.

Kiecker C, Lumsden A. Hedgehog signaling from ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nature Neuroscience*. 2004; 7 (11): 1242–1249.

Kim H, Lee SH, Kim SS, Yoo JH, Kim CJ. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. *Int J Dev Neurosci*. 2007; 25 (4): 243–249.

Kimball A, Dichtel LE, Nyer MB, et al. The allopregnanolone to progesterone ratio across the menstrual cycle and in menopause. *Psychoneuroendocrinology*. 2020; 112: 104512.

Kinney HC, Brody BA, Kloman AS, Gilles FH. Sequence of Central Nervous System Myelination in Human Infancy II. Patterns of Myelination in Autopsied Infants. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1988; 47: 217–234.

Klatzkin RR, Mechlin B, Girdler SS. Menstrual cycle phase does not influence gender differences in experimental pain sensitivity. *Eur J Pain*. 2010; 14 (1): 77–82.

Knapp LT, Klann E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J Neurosci Res*. 2002; 70(1): 1–7.

Knickmeyer RC, et al. Impact of Demographic and Obstetric Factors on Infant Brain Volumes: A Population Neuroscience Study. *Cereb Cortex*. 2016; 27(12): 5616–5625.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002; 30(6): 620–650.

Kokaia M, Ernfors P, Kokaia Z, Elmér E, Jaenisch R, Lindvall O. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Exp Neurol*. 1995; 133 (2): 215–224.

Kosidou K, Dalman C, Widman L, et al. Maternal polycystic ovary syndrome and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a population-based nationwide study in Sweden. *Mol Psychiatry*. 2016; 21 (10): 1441–1448.

Kostić VS. Neurologija za studente medicine. Izdavačka delatnost Medicinskog fakulteta, Beograd, 2018.

Kostovic I, Jovanov-Milosevic N. The development of cerebral connections during the first 20–45 weeks' gestation. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2006; 11 (6): 415–422.

Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018; 38 (3): 579–593.

Kurth F, Luders E, Sicotte NL, Gaser C, Giesser BS, et al. Neuroprotective effects of testosterone treatment in men with multiple sclerosis. *Neuroimage Clin*. 2014; 4: 454–460.

Lahousen T, Kapfhammer HP. Anxiety disorders - clinical and neurobiological aspects. *Psychiatr Danub*. 2018; 30 (4): 479–490.

Lai MC, Lombardo MV, Auyeung B, Chakrabarti B, BaronCohen S. Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2015; 54: 11–24.

Leresche L, Mancl LA, Drangsholt MT, Saunders K, Korff MV. Relationship of pain and symptoms to pubertal development in adolescents. *Pain*. 2005; 118 (1): 201–209.

Levitt M. Perceptions of nature, nurture and behavior. *Life Sciences* 2013; 9: 13.

Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 24438–24475.

Linnarsson S, Björklund A, Ernfors P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci*. 1997; 9(12): 2581–2587.

Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*. 1990; 46: 321–340.

Lonard DM, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: Modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8: 598–604.

Loomes R, Hull L, Mandy WPL. What is the male-to-female ratio in autism spectrum disorder? A systematic review and metaanalysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017; 56: 466–74.

Lopes da Silva FH, Gorter JA, Wadman WJ. Kindling of the hippocampus induces spatial memory deficits in the rat. *Neurosci. Lett*. 1986; 63: 115–120.

Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res.* 2017; 42(7): 1873–1888.

Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron.* 2002; 34 (6): 945-60.

Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(8): 603–614.

Lumsden A, Keynes R. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature.* 1989; 337 (6206): 424–428.

Lyall AE, Shi F, Geng X, Woolson S, Li G, et al. Dynamic Development of Regional Cortical Thickness and Surface Area in Early Childhood. *Cereb Cortex.* 2015; 25: 2204–12.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk MA review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35: 676–692.

Marin O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2003; 26: 441–483.

Mazzucco CA, Lieblich SE, Bingham BI, Williamson MA, Viau V, Galea LA. Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience.* 2006; 141 (4): 1793-800.

McCarthy MM, Konkle AT. When is a sex difference not a sex difference? *Front Neuroendocrinol.* 2005; 26 (2): 85–102.

McCarthy MM, Konkle AT. When is a sex difference not a sex difference?. *Front Neuroendocrinol.* 2005; 26 (2): 85–102.

McCarthy MM. Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016; 18(4): 361–372.

Mehrabian F, Kelishadi R. Comparison of the metabolic parameters and androgen level of umbilical cord blood in newborns of mothers with polycystic ovary syndrome and controls. *J Res Med Sci* 2012; 17: 207–211.

Mesiano S. Chapter 11 - Endocrinology of Human Pregnancy and Fetal-Placental Neuroendocrine Development. In Jerome F. Strauss JF, RBarbieri RL. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management* 2019: 256-284.

Miller DJ., Duka T, Stimpson CD, Schapiro SJ, Baze WB., et al. Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 16480–5.

Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011 Feb; 32(1): 81-151. doi: 10.1210/er.2010-0013.

Mladenović D, Petronijević N, Stojković T, Velimirović M, Jevtić G, et al. Finasteride Has Regionally Different Effects on Brain Oxidative Stress and Acetylcholinesterase Activity in Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy in Rats. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0134434.

Mo Z, Moore AR, Filipovic R, Ogawa Y, Kazuhiro I, Antic SD, et al. Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J Neurosci.* 2007; 27: 4132–4145.

Mogi M., Togari A., Kondo T. et al. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters,* 1999; 270 (1): 45–48.

Moon CM, Kim GW, Jeong GW. Whole-brain gray matter volume abnormalities in patients with generalized anxiety disorder: voxel-based morphometry. *Neuroreport.* 2014; 25(3): 184–189.

Morakinyo AO, Adekunbi DA, Dada KA, Adegoke OA. Testosterone promotes glucose intolerance, lipid disorder and oxidative stress in type 1 diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2014; 25(1): 13–20.

Morford J, Mauvais-Jarvis F. Sex differences in the effects of androgens acting in the central nervous system on metabolism. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016; 18 (4): 415–424.

Morrell MJ, Hayes FJ, Sluss PM, et al. Hyperandrogenism, ovulatory dysfunction, and polycystic ovary syndrome with valproate versus lamotrigine. *Ann Neurol.* 2008; 64: 200–211.

Morris JA., Jordan CL., Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci.* 2004; 7 (10): 1034–1039.

Munir S, Takov V. Generalized Anxiety Disorder (GAD) [Updated 2019 Nov 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020

Murray PS, Holmes PV. An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus. *Int J Pept.* 2011; 2011: 654085.

Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013; 19 (3): 268–288.

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

- Nakachi Y, Iseki M, Yokoo T, Mizuno Y, Okazaki Y. Gene expression profile of the neonatal female mouse brain after administration of testosterone propionate. *J Sex Med.* 2015; 12 (4): 887–896.
- Nakamura H, Katahira T, Matsunaga E, Sato T. Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Research Reviews.* 2002; 49 (2): 120–126.
- Neufang S, Specht K, Hausmann M, Güntürkün O, Herpertz-Dahlmann B, et al. Sex differences and the impact of steroid hormones on the developing human brain. *Cereb Cortex.* 2009; 19(2): 464–73.
- Nishida N, Arizumi T, Takita M, et al. Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis.* 2013; 31(5-6): 459–466.
- Nóbrega JE, Tonelotto Dos Santos J, Serrano-Mujica LK, et al. Oxidative stress and biochemical markers in prenatally androgenized sheep after neonatal treatment with GnRH agonist. *J Inflamm Res.* 2019; 12: 65–71.
- Numakawa T, Matsumoto T, Numakawa Y, Richards M, Yamawaki S, Kunugi H. Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration. *J Toxicol.* 2011; 2011: 405194.
- Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11: 165-75.
- O’Rahilly RR, Müller F, 2006. *The Embryonic Human Brain: an Atlas of Developmental Stages.* John Wiley & Sons.
- Oettel M, Mukhopadhyay AK. Progesterone: The forgotten hormone in men? *The Aging Male.* 2004; 7(3): 236-57.
- Ormerod BK, Falconer EM, Galea LA. N-methyl-D-aspartate receptor activity and estradiol: separate regulation of cell proliferation in the dentate gyrus of adult female meadow vole. *J Endocrinol.* 2003; 179 (2): 155-63.
- Pakkenberg B, Gundersen HJ. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol.* 1997; 384: 312–20.
- Pallayova M, Brandeburov A, Tokarova D. Update on Sexual Dimorphism in Brain Structure–Function Interrelationships: A Literature Review. *Appl Psychophysiol Biofeedback* 2019; 44: 271–284.

- Palomba S, Marotta R, Di Cello A, Russo T, Falbo A, et al. Pervasive developmental disorders in children of hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome: a longitudinal case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77: 898 – 904.
- Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, et al. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* 2016. 354. 354(6308). pii: aaf7073.
- Paxinos G., Watson C. 5th ed. Academic Press; San Diego: 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates.
- Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 947-970.
- Pearson-Smith JN, Patel M. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (11): 2365.
- Pepe GJ, Albrecht ED: Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev.* 1995; 16: 608–648.
- Pepe GJ, Waddell BJ, Stahl SJ, Albrecht ED. The regulation of transplacental cortisol–cortisone metabolism by estrogen in pregnant baboons. *Endocrinology.* 1988; 122: 78–83
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology.* 1959; 65: 369-82.
- Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol.* 2001; 52(4):345-7.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 8416763.
- Porcu P, Mostallino MC, Sogliano C, Santoru F, et al. Long-term administration with levonorgestrel decreases allopregnanolone levels and alters GABA(A) receptor subunit expression and anxiety-like behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 102(2): 366–372.
- Puttabyatappa M, Banker M, Zeng L, Goodrich JM, Domino SE., et al. Maternal Exposure to Environmental Disruptors and Sexually Dimorphic Changes in Maternal and Neonatal Oxidative Stress. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020; 105(2): dgz063.
- Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science.* 1988; 241 (4862): 170-6.
- Rao MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone-induced cell death. *Planta* 213: 682–690

Raskin K, de Gendt K, Duittoz A, Liere P, Verhoeven G, et al. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci.* 2009; 29: 4461-4470.

Raskin K., de Gendt K., Duittoz A., et al. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci.* 2009; 29 (14): 4461–4470.

Rašić-Marković Aleksandra. Fiziologija reproduktivnog sistema, Odabrana poglavlja II deo. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu: LibriMedicorum; 2013.

Raznahan A, Greenstein D, Lee NR, Clasen LS, Giedd JN. Prenatal growth in humans and postnatal brain maturation into late adolescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 2012; 109: 11366–11371.

Raznahan A, Shaw P, Lalonde F, Stockman M, Wallace GL, et al. How does your cortex grow? *J Neurosci.* 2011b; 31: 7174–7.

Règue M, Poilbout C, Martin V, Franc B, Lanfumey L, et al. Increased 5-HT_{2C} receptor editing predisposes to PTSD-like behaviors and alters BDNF and cytokines signaling. *Transl Psychiatry.* 2019; 9(1): 100.

Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjö BK. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1980; 34: 1630–8.

Rolls A, Schori H, London A, Schwartz M. Decrease in hippocampal neurogenesis during pregnancy: a link to immunity. *Molecular Psychiatry*, 2008; 13(5): 468–469.

Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28: 139–168.

Rupprecht RC, Pinna G, Zhubi A, Maloku E, Veldic M, et al. Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 14602–14607.

Russo N, Russo M, Daino D. et al. Polycystic ovary syndrome: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma and follicular fluid levels. *Gynecological Endocrinology*, 2012; 28(4): 241–244.

Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *J Neuroendocrinol.* 2009 Mar; 21(4): 410-4.

Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017; 360 (1): 201-205.

Samba Reddy D. Sex differences in the anticonvulsant activity of neurosteroids. *J Neurosci Res.* 2017; 95(1-2): 661-670.

Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature.* 2011; 478 (7369): 382-6.

Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, et al. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2006; 103: 17501–17506.

Scharfman HE, MacLusky NJ. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective. *Neurobiol Dis.* 2014; 72 Pt B: 180-92.

Schiller CE, Johnson SL, Abate AC, Schmidt PJ, Rubinow DR. Reproductive Steroid Regulation of Mood and Behavior. *Compr Physiol.* 2016; 6(3): 1135-60.

Schüle C, Nothdurfter C, Rupprecht R. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Prog Neurobiol.* 2014; 113: 79–87.

Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal ‘programming’ of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3: 479–88.

Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968; 25 (1): 192–205.

Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 2013; 0: 1–16.

Shah NM, Pisapia DJ, Maniatis S, Mendelsohn MM, Nemes A, Axel R. Visualizing sexual dimorphism in the brain. *Neuron.* 2004; 43(3): 313-9.

Sherman JJ, Leresche L. Does experimental pain response vary across the menstrual cycle? A methodological review. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291 (2): R245–R256.

Sherwin BB, Henry JF. Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review. *Front. Neuroendocrinol.* 2008; 29: 88–113.

Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int.* 2011; 59 (2): 122–137.

Shors TJ, et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature,* 2001; 410: 372–376.

Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus,* 2002; 12: 578–584.

Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron*. 2016; 89: 248–268.

Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron* 2016; 89: 248–268.

Simerly RB. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci*. 2002; 25 (1): 507–536.

Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res*. 1994; 61(1): 59–64.

Skolnick BE, Maas AI, Narayan RK, van der Hoop RG, MacAllister T, et al. A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2014; 371 (26): 2467-76.

Smith YR, Stohler CS, Nichols TE, Bueller JA, Koeppe RA, Zubieta J-K. Pronociceptive and Antinociceptive Effects of Estradiol through Endogenous Opioid Neurotransmission in Women. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26 (21): 5777–5785.

Sridaran R, Gibori G. Placental–ovarian relationship in the control of testosterone secretion in the rat. *Placenta*. 1987; 8: 327-333.

Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5(6): a022426.

Stener-Victorin E, Holm G, Labrie F, Nilsson L, Janson PO, et al. Are there any sensitive and specific sex steroid markers for polycystic ovary syndrome? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95 (2): 810–819.

Stevens JS, Hamann S. Sex differences in brain activation to emotional stimuli: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuropsychologia*. 2012; 50 (7): 1578–1593.

Stewart WF, Linet MS., Celentano DD, Van Natta M, Ziegler D. Age- and sex-specific incidence rates of migraine with and without visual aura. *Am. J. Epidemiol*. 1991; 134: 1111–1120.

Stiles J, Brown T, Haist F, Jernigan T. Brain and Cognitive Development. In: Lerner R, Liben L, Mueller U, editors. *Handbook of Child Psychology and Developmental Neuroscience*. New York: Wiley; 2015. pp. 9–62.

Stiles J, Jernigan T. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev*. 2010; 20 (4): 327–348.

Stiles J, Jernigan TL. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev*. 2010 Dec; 20(4): 327–348.

Stiles J. The fundamentals of brain development: Integrating nature and nurture. Cambridge: MA, Harvard University Press; 2008.

- Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain*. 2003; 103 (3): 285-302.
- Packiasabapathy S, Sadhasivam S. Gender, genetics, and analgesia: understanding the differences in response to pain relief. *J Pain Res*. 2018; 11: 2729-2739.
- Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978; 90: 81–9.
- Tal R, Taylor HS, Burney RO, et al. Endocrinology of Pregnancy. [Updated 2015 Dec 7]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat, *J. Neurosci*. 19 (1999) 5792–5801.
- Thibaut F. Anxiety disorders: a review of current literature. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017; 19(2): 87-88.
- Thibaut F. Gender does matter in clinical research. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2017; 267 (4): 283–284.
- Timby E, Bäckström T, Nyberg S, Stenlund H, Wihlbäck AN, Bixo M. Women with premenstrual dysphoric disorder have altered sensitivity to allopregnanolone over the menstrual cycle compared to controls-a pilot study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016; 233(11): 2109–2117.
- Treede RD. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *Pain Rep*. 2018; 3(2): e643.
- Tsallagova EV, Generalov VO, Sadykov TR. Hyperandrogenism as a side effect of anticonvulsants. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2018; 10(2): 43-50. (In Russ.)
- Turano A, Osborne BF, Schwarz JM. Sexual Differentiation and Sex Differences in Neural Development. *Curr Top Behav Neurosci*. 2019; 43: 69-110
- Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 2005; 12: 1161–1208.
- Van Honk J, Schutter DJ, Bos PA, Kruijt A-W, Lentjes EG, et al. Testosterone administration impairs cognitive empathy in women depending on second-to-fourth digit ratio. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(8): 3448–3452.

Vandenbergh JG, Huggett CL. The anogenital distance index, a predictor of the intrauterine position effects on reproduction in female house mice. *Lab Anim Sci.* 1995; 45 (5): 567–573.

Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Mancini G, De Bem AF, Tasca CI. Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress. *Neurol Sci.* 2015; 36 (8): 1449–1456.

Vanston CM, Watson NV. Selective and persistent effect of foetal sex on cognition in pregnant women. *Neuroreport.* 2005; 16 (7): 779-82.

Vasudevan N, Pfaff DW. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29: 238-257.

Vasung L, Abaci Turk E, Ferradal SL, Sutin J, Stout JN, et al. Exploring early human brain development with structural and physiological neuroimaging. *Neuroimage.* 2019; 187: 226-254.

Verhovshek T, Sengelaub DR. Trophic effects of brain derived neurotrophic factor blockade in an androgen-sensitive neuromuscular system *Endocrinology*, 2010; 151(11): 5337–5348.

Vesga-López O, Schneier FR, Wang S, Heimberg RG, Liu SM, et al. Gender differences in generalized anxiety disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *J Clin Psychiatry.* 2008; 69 (10): 1606–1616.

Victor VM. Oxidative stress and cellular homeostasis. *Curr Pharm Des.* 2009; 15 (26): 2986–2987.

Vilar M., Mira H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: Expected and unexpected roles,” *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10: 26.

Walf AA, Frye CA. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31(6): 1097-111.

Warren SG, Juraska JM. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav. Neurosci.* 1997; 111: 259–266.

Webster MJ, Herman MM., Kleinman JE., Weickert CS. BDNF and trkBmRNA expression in the hippocampus and temporal cortex during the human lifespan. *Gene Expression Patterns*, 2006; 6 (8): 941–951.

Weniger JP. Estrogen production by fetal rat gonads. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993; 44: 459–462.

Westenbroek C, Den Boer JA, Veenhuis M, Ter Horst GJ. Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats. *Brain Res Bull.* 2004; 64 (4): 303-8.

White HD, Brown LA, Gyurik RJ, et al. Treatment of pain in fibromyalgia patients with testosterone gel: Pharmacokinetics and clinical response. *Int Immunopharmacol.* 2015; 27(2): 249-256.

Whittaker VP. The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. *Methods Neuroch* 1972; 2: 1–52.

Wright DW, Yeatts SD, Silbergleit R, Palesch YY, Hertzberg VS, et al. Very early administration of progesterone for acute traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2014; 371 (26): 2457-66.

Wu MV, Shah NM. Control of masculinization of the brain and behavior. *Curr Opin Neurobiol*. 2011 Feb; 21(1): 116-23.

Ypsilantis P, Deftereos S, Prassopoulos P, Simopoulos C. Ultrasonographic diagnosis of pregnancy in rats. *American Association for Laboratory Animal Science* 2009; 48(6): 734–739.

Zaletel I, Filipović D, Puškaš N. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. *Rev Neurosci*. 2017; 28(6): 675–692.

Zecevic N, Chen Y, Filipovic R. Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 2005; 491: 109–122.

Zecevic N. Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. *Glia*. 2004; 48 (1): 27-35.

Zembrzycki A, Griesel G, et al. Genetic interplay between the transcriptions factors Sp8 and Emx2 in the patterning of the forebrain. *Neural Development*. 2007; 2: 8.

Zhang R, Liu H, Bai H, et al. Oxidative stress status in Chinese women with different clinical phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017; 86 (1): 88–96.

Biografija autora

Bojana M. Rankov Petrović je rođena 17. oktobra 1984. godine u Vrbasu, gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,41 i stekla zvanje Doktora medicine. Doktorske studije iz oblasti Neuronauka upisala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2011. godine. Od 2012. godine angažovana je kao saradnik na projektu Ministarstva nauke Republike Srbije br 175032 *“Razvoj animalnih modela epilepsije i testiranje konvulzivnih i antikonvulzivnih supstanci”*, čiji je rukovodilac Prof. dr Olivera Stanojlović. Od maja 2015. biva izabrana u zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast medicinska fiziologija, na Institutu za medicinsku fizologiju „Rihard Burijan“. Na Univerzitetnoj dečjoj klinici započinje radni odnos avgusta 2017. godine, te od oktobra iste godine započinje specijalizaciju iz oblasti neurohirurgije. Specijalističke akademske studije iz oblasti neurohirurgije završila je 2017. godine. Godine 2019. Sertifikovana je od strane ECFMG Komisije Sjedinjenih Američkih Država. Tokom svoje istraživačke i kliničke karijere usavršavala se u brojnim centrima u inostranstvu: Americi, Španiji, Austriji i Francuskoj. Član je Srpskog lekarskog društva, kao i Kongresa Neuroloških Hirurga Amerike i Američke Asocijacije Neuroloških hirurga.

Udata za Rankov Milana, majka Danila i Irine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Божана Ранков Петровић

Број индекса НН-11/09

Изјављујем

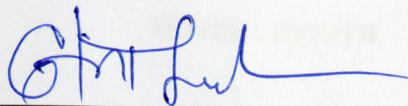
да је докторска дисертација под насловом

ПРЕНАТАЛНА ХИПЕРАНДРОГЕНИЗАЦИЈА ЖЕНКИ ПЛАЗОВА-ТЕСТОСТЕРОН
УНДЕКАНОАТОМ: КОГНИТИВНЕ, ЕЛЕКТРОЕНЦЕФАЛОГРАФСКЕ И МЕТАБОЛИЧКЕ ПРОМЕНЕ

- 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, 8.3.2020.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора БОЈАНА РАНКОВ ПЕТРОВИЋ
Број индекса ННМ/09
Студијски програм НЕУРОНАУКЕ
Наслов рада ПРЕНАТАЛНА ХИПЕРАНДРОГЕНИЗАЦИЈА ЖЕНКИ ПАЦОВА ТЕСТОСТЕРОН УИДЕКАНОАТОМ:
КОГНИТИВНЕ, ЕЛЕКТРОЕНЦЕФАЛОГРАФСКЕ И МЕТАБОЛИЧКЕ ПРОМЕНЕ
Ментор Проф. др Александра Рашић Марковић

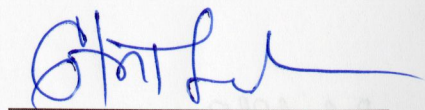
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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, 8.3.2020.



Изјава о коришћењу

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

ПРЕНАТАЛНА ХИПЕРАНДРОГЕНИЗАЦИЈА ЖЕНКИ ПЛАЦОВА ТЕСТОСТЕРОН УНАКАНТОМ:
КОГНИТИВНЕ, ЕЛЕКТРОЕНЦЕФАЛОГРАФСКЕ И МЕТАБОЛИЧКЕ ПРОМЕНЕ

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).

У Београду, 8.3.2020.

Потпис аутора

