



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

**УТИЦАЈ ПРИМЕНЕ ВАЛПРОИЧНЕ КИСЕЛИНЕ ТОКОМ
ПРИПЛОДА И ГЕСТАЦИЈЕ НА АНИМАЛНОМ МОДЕЛУ МИША –
ЕФЕКАТ НА ПСИХОМОТОРНИ РАЗВОЈ КОД ПОТОМАКА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

др Јелена Подгорац

Крагујевац, 2014. година

Захвалница

Овај рад је реализован у оквиру пројекта ОИИ175006 (финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије), под менторством др Слободана Секулића и, у његовом одсуству, заменила га је др Весна Пешић. Један део експеримената је урађен на Катедри за Фармакологију са токсикологијом у Новом Саду, а други део је урађен на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду.

Захваљујем се др сци. мед. Слободану Секулићу на идеји за израду ове докторске дисертације и на простору који ми је омогућио за експериментални рад, као и на слободи коју ми је пружио током израде докторске дисертације.

Захваљујем се Др. Весни Пешић, вишем научном сараднику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, која ми је уместо ментора спреченог због професионалног усавршавања у иностранству, уз несебично залагање пружила драгоцену помоћ у припреми за експериментални рад, анализи и дискусији резултата.

Захваљујем се особљу Катедре за фармакологију са токсикологијом Медицинског факултета у Новом Саду, Проф. др Исидори Самојлик, Асс. др Саши Вукмировићу, Асс. др Небојши Стилиновићу и техничару Славену Шупуту на стрпљењу, саветима, подршци и уступљеним просторијама за држање експерименталних животиња и лабораторије за рад.

Захваљујем се др сци. мед Милки Ђулић, научном саветнику која ме је формирала као истраживача и пружила основно знање из области неурофизиологије.

Захваљујем се Проф. др Душану Лалошевићу, директору Пастеровог Института, за стручну и моралну подршку и на великом разумевању и спремности да увек изађе у сусрет свим захтевима насталим због потреба истраживања.

Захваљујем др Бранки Туцић, научном саветнику, увек присутној и спремној за стручне савете.

Захваљујем се др Бранки Јанаћ, научном саветник, шефу одељења за неурофизиологију, на разумевању и омогућеном простору за рад.

Захваљујем се др Павлу Павловићу директору Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ на великом разумевању и материјалној подршци током експерименталног рада.

Захваљујем се дипл. инг. Микици Јовановићу на великој помоћи у техничкој изради докторске дисертације.

Хвала Игију, Болету и Милици на љубави, која ме је подстицала да истрајем у раду.

Хвала мојим родитељима, што су ме изградили као човека и лекара.

Сажетак

Одређена обољења, синдроми и поремећаји хуманог организма захтевају континуирану медикаментозну терапију. Трудноћа је стање током којег би требало избегнути употребу лекова јер могу прећи из мајчиног у фетални крвоток и код потомства изазвати оштећења нервног система, чак и приликом изложености примарно субтоксичним дозама. Иако позната као тератогена супстанца, валпроична киселина је често неопходан лек у терапији епилепсија код трудница. Употреба валпроичне киселине током трудноће код потомства изазива фетални валпроични синдром, телесне аномалије, кранио-фацијалну дисморфију и когнитивне потешкоће. Такође је познато да се одређени проценат потомства рађа без аномалија и да нема неуро-бихејвиоралних потешкоћа током живота, што указује да је генетичка варијабилност значајан фактор за испољавање нежељених дејстава употребе валпроичне киселине током трудноће на опште физичко и психомоторно стање потомства.

Циљ ове докторске дисертације је био да се испитају последице интраутериног излагања различитим дозама валпроата (са акцентом на субтерапијске дозе) на психомоторни развој јединки миша, које су тестиране у различитим фазама постнаталног развоја. Батерија тестова за испитивање понашања која је употребљена током ове студије укључивала је следеће тестове: тест рефлекса усправљања и тест качења о реп – током прве две постнаталне недеље, тест излагања врућој плочи – у периадолесцентној фази, тест уздигнутог крстастог лавиринта и тест отвореног поља – током адолесценције.

Подаци добијени у тесту рефлекса усправљања и тесту качења јединке о реп су јасно указали на кашњење у развоју сензорног и моторног система јединки које су током гестације биле изложене различитим дозама валпроата, које је уочљиво кроз квалитативно и квантитативно другачији одговор јединки на дате тестове у периоду раног постнаталног развоја. Велике физичке аномалије нису детектоване, али је јасно показан негативан утицај интраутериног излагања валпроату на телесну тежину и отварање очију. Подаци добијени у тесту вруће плоче су додатно указали на кашњење у сазревању сензорног система значајног за перцепцију болног стимулуса, са посебним акцентом на утицај малих

доза валпроата. Тестови примењени на јединкама у периоду адолесценције су указали да интраутерино излагање валпроату изазива полно- и дозно-специфичне промене у понашању, у смислу анксиозно/депресивних стања код јединки мушког пола услед примене великих доза валпроата и хиперактивних стања код јединки женског пола услед примене малих доза валпроата.

Резултати добијени у овом истраживању пружају могућност сагледавања последица примене валпроата током трудноће на функционисање централног нервног система потомства, са аспекта понашања. У складу са литературом, наши експерименти су указали да интраутерино излагање валпроату изазива комплексне промене у понашању потомства, услед морфо-функционалних поремећаја у одређеним можданим регионима. Ипак, остаје да се прецизно утврде неурални корелати бихејвиоралних ефеката описаних у нашој студији која је за модел имала континуирану примену валпроата током читаве гестације, што је експериментално за сада недовољно испитано.

Садржај

1. УВОД.....	10
1.1. Епилепсија.....	11
1.1.1. Дефиниција и класификација.....	12
1.1.2. Епидемиологија.....	12
1.1.3. Епилепсија и трудноћа.....	13
1.2. Валпроинска киселина.....	13
1.2.1. Фармакодинамика валпроата.....	15
1.2.2. Биотрансформација и елиминација валпроата.....	17
1.2.3. Биоискористљивост валпроата.....	18
1.2.4. Фармакокинетика лека кроз крвно-плаценталну баријеру.....	19
1.2.5. Оштећења плода настала применом валпроата током трудноће.....	20
1.2.6. Тератогени ефекти валпроата.....	21
1.2.7. Неуро-бихејвиорални ризик.....	23
1.3. Психомоторни развој - анимални модели у поређењу са хуманом популацијом.....	24
1.4. Експериментални приступ у изучавању промена у понашању.....	26
1.4.1. Тест рефлекса усправљања.....	28
1.4.2. Тест качења о реп.....	29

1.4.3. Тест излагања врућој плочи.....	30
1.4.4. Тест отвореног поља.....	31
1.4.5. Тест уздигнутог крстастог лавиринта.....	32
1.5. Промена у понашању услед гестационог излагања валпроату.....	34
2. ЦИЉ РАДА.....	36
3. 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	37
3.1. Експерименталне животиње.....	37
3.2. Експериментални дизајн и избор доза валпроата.....	37
3.3. Бихејвиорални тестови коришћени у експерименту.....	39
4. РЕЗУЛТАТИ.....	43
4.1. Утицај третмана валпроатом током приплода и гестације на женке.....	43
4.1.1. Промена бројчаног стања женки током третмана валпроатом.....	43
4.1.2. Временски период од спаривања женки са мужјацима до зачећа.....	43
4.1.3. Промена телесне тежине женки током гестације.....	43
4.2. Утицај интраутериног излагања валпроату на физичке	
карактеристике потомства у различитим фазама постнаталног развоја.....	44
4.2.1. Утицај интраутериног излагања валпроату на телесну тежину потомства.....	45
4.2.2. Утицај интраутериног излагања валпроату на отворање очију потомства.....	46
4.3. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства	
у тесту рефлекса усправљања.....	46
4.3.1. Рефлекс усправљања јединки у петом постнаталном дану.....	50

4.3.2. Рефлекс усправљања јединки у десетом постнаталном дану.....	51
4.3.3. Рефлекс усправљања јединки у петнаестом постнаталном дану.....	52
4.4. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту качења јединке о реп.....	54
4.4.1. Време до појаве имобилности јединки у петом постнаталном дану.....	58
4.4.2. Време до појаве имобилности јединки у десетом постнаталном дану.....	60
4.4.3. Време до појаве имобилности јединки у петнаестом постнаталном дану.....	60
4.5. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту излагања топлој плочи.....	62
4.5.1. Утицај третмана на квалитет одговора.....	63
4.5.2. Утицај третмана на квантитативне карактеристике одговора јединки које су адекватно одреаговале за мање од 40 сек.....	64
4.5.3. Утицај третмана на квантитативне карактеристике одговора јединки које су адекватно одреаговале за више од 40 сек.....	64
4.6. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту уздигнутог крстастог лавиринта.....	67
4.7. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту отвореног поља.....	70
4.7.1. Моторичка активност мужјака у тесту отвореног поља.....	72
4.7.2. Моторичка активност женки у тесту отвореног поља.....	75

5. ДИСКУСИЈА.....	83
5.1. Утицај валпроата на телесну тежину зенки и репродуктивни капацитет.....	92
5.2. Утицај интраутериног излагања валпроату на физичке карактеристике потомства и ембриолеталност.....	93
5.3. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту усправљања.....	97
5.4. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту качења о реп.....	102
5.5. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту излагања врућој плочи.....	105
5.6. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту уздигнутог крстатстог лавиринта.....	108
5.7. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту отвореног поља.....	111
6. ЗАКЉУЧЦИ РАДА.....	113
7. ЛИТЕРАТУРА.....	116

1. УВОД

Током живота, људски организам је изложен различитим утицајима средине, који у мањој или већој мери модификују рад органа и органских система. Пренатална фаза онтогенезе представља најосетљивији стадијум у развоју јединке. Присуство штетних срединских чиниоца и евентуално лоше здравствено стање мајке током гестације знатно доприносе лошем исходу трудноће. Комплексност овог проблема делом се може умањити бољим разумевањем улоге срединских фактора и њихове етиологије. Посебну пажњу, у истраживању и анализи, захтевају релевантни временски интервали пренаталног периода, током којих експозиција различитим чиниоцима условљава тератогеност плода. Један аспект тератогености је такав да се може избећи, односно штетни утицаји спољне средине могу се свести на најмању могућу меру, чиме се спречава појава конгениталних (урођених) аномалија и малформација. Други аспект је онај који отвара простор детаљном испитивању и истраживању, а односи се на континуирану употребу лека током гестације услед здравственог стања труднице. Посебан проблем представља препознавање и дефинисање срединских утицаја (укључујући излагање медикаментима) који не доводе до очигледних оштећења плода, али изазивају извесне заостатке у психомоторном развоју.

Један од примера стања током трудноће која се не могу избећи и захтевају примену одређених лекова представљају различити типови епилепсија. Због тога су од великог значаја интернационални регистри који прате пацијенткиње оболеле од епилепсије и њихово потомство, као и употребу антиепилептика и њихов ефекат на појаву оштећења плода.

Ова докторска дисертација износи резултате добијене на потомству јединки миша које су током периода приплода и гестације биле третиране валпроичном киселином. Иако се као антиепилептик користи скоро 40 година, овај лек и даље задржава атрактивност јер захваљујући дозно-зависним ефектима шири своју примену и на неепилептичне индикације. Мада су штетна дејства валпроата на плод позната, у многим случајевима лек остаје у употреби зато што промена терапије не даје задовољавајуће резултате. Сазнања о неминовној примени валпроата често и током читаве трудноће, имплицирају да

експериментални приступ и рад на анималним моделима може знатно да допринесе разумевању далекосежних дозно-зависних ефеката примене терапије током гестације.

1.1. Епилепсија

Епилепсија (*Morbus sacer*, *Morbus divinus*, *Morbus Herculeus*, *Morbus daemonicus*) или “падавица” (народни назив), поменута је у Хамурабијевом закону 2000 год. п.н.е. као “света болест” (1). Етимолошки реч епилепсија потиче од грчке речи *epilambanein* што значи „бити обузет, нападнут”. У Хомерово време се сматрало да епилептични напад изазивају Богови, сходно томе, називали су је „Светом болешћу” (2). Хипократ (око 400 г. п.р.е.) је први повезао са болешћу мозга и да се може лечити, с’ тога његов запис представља први писани документ против празноверја, магије и шарлатанства.



Слика 1. Дан ширења знања о епилепсији, 26. март.

1.1.1. Дефиниција и класификација

Епилепсија представља мождани поремећај, који се карактерише трајном предиспозицијом за генерисање епилептичних напада са неуробиолошким, когнитивним, физиолошким и социјалним последицама овог стања. Дефиниција епилептичног напада и епилепсије потиче од “International League Against Epilepsy” из 2005. године. Епилептички напад је пролазан догађај карактеристичних знакова и/или симптома, са абнормално ексцесивном или синхронизованом неуронском активношћу.

Да би се епилепсија дефинисала као таква треба да испуњава један од следећих услова (3):

1. најмање два непровоцирана напада између којих је прошло барем 24 х
2. један непровоциран напад и вероватноћа даљих напада слична општем ризику јављања после 2 непровоцирана напада (отприлике 75% или више)
3. најмање два напада у оквиру рефлексних епилепсија

Најновија класификација епилепсије, епилептичког напада, епилептичних синдрома поделила је епилепсије на основу етиологије на генетске, структуралне, метаболичке, имунске, епилепсије изазване инфекцијом и епилепсије непознате етиологије.

1.1.2. Епидемиологија

Епилепсија је најчешће озбиљно обољење и нема ограничавајуће факторе типа године, раса, географско подручје и социо-економске разлике. На основу података Светске здравствене организације, преваленца епилепсије у Европи је 8.2 на 1000 људи и на основу тога око 6 000 000 људи у Европи тренутно има епилепсију, док је 15 000 000 људи, имало епилепсију некад током свог живота (4). У већини популационих студија инциденца и преваленца епилепсије је већа у мушкој популацији у односу на женску (5).

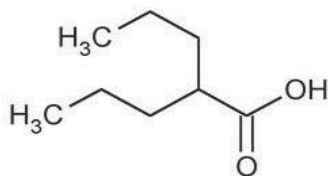
1.1.3. Епилепсија и трудноћа

Статистика указује да 1-2 труднице на 200 трудних жена има епилепсију (6). Са општег становишта не би требало да буде разлога да жене оболеле од епилепсије не остану у другом стању, али највећа забринутост је фокусирана око чињенице да употреба антиепилептика током гестације може изазвати појаву конгениталних малформација и развојно кашњење код потомства. Иако резултати нису потпуно усаглашени, несумњива је чињеница да се ризик од великих малформација повећава два до три пута коришћењем антиепилептика током трудноће (7, 8). Међутим, када се током трудноће епилепсија не контролише фармакотерапијом, епилептични напади могу изазвати трауму и повреду труднице, абрупцију плаценте или феталну хипоксију и потенцијално могу животно бити угрожени и мајка и плод.

На основу ових чињеница ултимативни циљ је да се третман епилепсије током трудноће спроведе као монотерапијски режим који ће бити ефикасан, односно спречиће епи-нападе а неће бити токсичан по фетус. Међутим, до сада, такав антиепилептични третман није откривен.

1.2. Валпроинска киселина

Валпроинска киселина (ВПК; *engl.* valproic acid - VPA; 2-пропилпентаноична киселина) екстрахована је од стране В.С. Вуртон-а (9) још 1882. године, након чега је деценијама коришћена као метаболички инертан органски растварач (10).



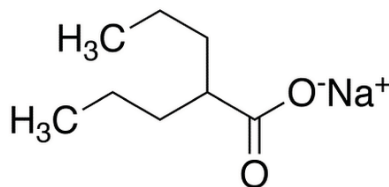
Слика 2. Структурна формула валпроинске киселине

Валпроинска киселина се уводи 1967. године у третман епилепсија захваљујући француском научнику Pierre Eymard-у као најпреписиванији антиепилептик (11). Алтернативни хемијски назив изведен је из хемијског назива 2-пропилвалеринска киселина, која настаје оригиналном пурификацијом биљке *Valeriana officinalis*. (12).

Фармацеутски облик лека припрема се као:

- валпроинска киселина у капсулама, таблетама или сирупу,
- со валпроинске киселине (натријумова или магнезијумова) у виду ретард препарата- таблета, супозиторија и парентералне формулације за интравенску примену.

Валпроинска киселина је у течном агрегатном стању и умерено се раствара у води, док је со натријум-валпроат бела кристална супстанца, хигроскопна и одлично се раствара у води.



Слика 3. Структурна формула натријум-валпроата

Треба напоменути да се поред третмана епилепсије валпроинска киселина примењује у терапији шизофреније (13), мигрене и маније у биполарном поремећају (14). Недавна истраживања укључила су валпроинску киселину у третман канцера, ХИВ-а и неуродегенеративних обољења, као адјувантну терапију услед инхибиторне активности на хистон деацетилазу.

Интересантно је напоменути да медикаментозни третман епилепсије (конвулзија) почиње у 19. веку, када је Сер Чарлс Локок, акушер краљице Викторије и председник Краљевског Медицинског и Хирушког Друштва, 1857. године применио лек, калијум-бромид у третману такозване „хистеричне епилепсије”. Препознао је да, калијум-бромид,

изазива импотенцију, а код жена, у случајевима „сексуалног узбуђења”, хистерије не-епилептичног порекла, има умирујући ефекат на понашање (15). Бромид је био лек, којим је лечен и Ван Гог, за кога се сматра да је патио од епилепсије темпоралног режња и Гешвиндовога синдрома. Барбитурати се уводе у третман епилепсија 1912. године (16), а фенитоин налази пут у третману епилепсија током 1930-их година кроз студије на анималним моделима епилепсија (17).

1.2.1. Фармакодинамика валпроата

Валпроат исказује своје фармакодинамичке ефекте на различите начине (Слика 4; 18).

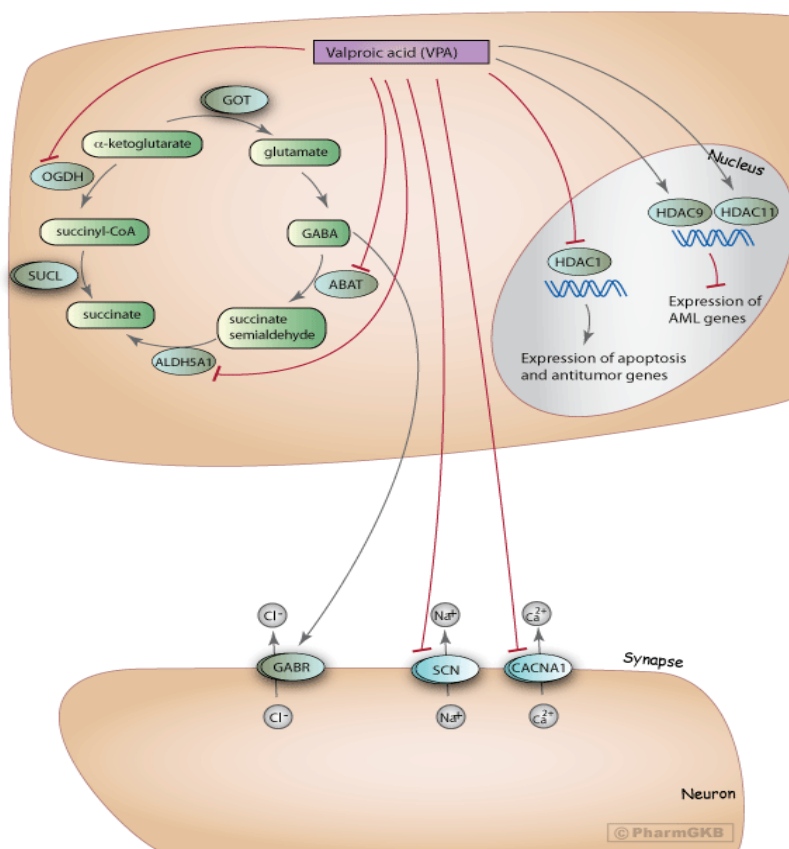
У неурохемијском смислу, применом валпроата у централном нервном систему се постиже ефекат повећања количине гама-аминобутерне киселине (*engl.* gamma-aminobutyric acid - GABA) у синаптичком простору. С обзиром да је у зрелом централном нервном систему ГАБА главни инхибиторни неуротрансмитер, на овај начин валпроат доприноси смиривању неуралне активности. Сматра се да се у основи овог ефекта налази утицај валпроата на мултипле ензимске системе (GABA трансаминаза, α -кетоглутарат дехидрогеназа, сукцинат семиалдехид дехидрогеназа), мада има и индикација да у терапеутском дозном опсегу супстанца не утиче на ове ензимске системе (19).

Валпроат блокира волтажне зависне јонске (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) канале, мада су резултати везани за дејство на K^+ канале (у смислу да ли валпроат повећава или смањује њихову проводљивост) још увек контроверзни. Активно-зависни блок Na^+ канала антиконвулзивима се сматра да је најзначајнији фактор у смислу њихове потентне инхибиције високо-фреквентних неуронских пражњења. Због овог својства валпроат налази примену и у терапији мигрене, јер се сматра да је у патогенетској основи мигрене хиперексциtabilно стање, упркос ширењу кортикалне депресије (20)

Валпроат делује и као инхибитор хистон деацетилаза (*engl.* histone deacetylases – HDAC), и то на првом месту HDAC1, што доводи до повећане експресије гена чији су

протеински производи од значаја у процесу апоптозе. Због овог својства валпроат се посматра и као потенцијални антитуморски агенс. У туморским ћелијским линијама валпроат активира HDAC9 и HDAC11. Инхибицијом HDAC се остварује хистонска ацетилација хроматина и модификује се генска експресија, из чега произилази да валпроинска киселина остварује своју улогу кроз епигенетичку модификацију. Овим својством валпроат је пронашао место и у терапији пацијената оболелих од ХИВ инфекције.

Неки резултати указују да валпроат своја антиконвулзивна дејства остварује и путем повећања експресије пептида који имају улогу ендогених антиконвулзива, на првом месту повећавањем концентрације неуропептида Y у ретикуларном таламичком једру и хипокампусу (21).



Слика 4. Графичка презентација фармакодинамике валпроинске киселине (преузето из Ghodke-Puranik и сарадници, 2013)

1.2.2. Биотрансформација и елиминација валпроата

Биотрансформацијски пут валпроата се састоји из три нивоа, сходно начину примене (администрацији) лека.

Оралном применом, ресорпција лека започиње у танком цреву (на апикалном делу ентероцита), где захваљујући присуству ензима цитохрома Р 450 почиње биотрансформација лека. Други ниво биотрансформације везан је за метаболизам првог пролаза кроз јетру и интеракцију са ензимским системом. Наиме, валпроинска киселина се скоро потпуно метаболише путем ензима јетре у оквиру глукуронидације (30-50%), митохондријалне β оксидације и цитохром Р 450-катализоване терминалне десатурације и хидроксилације. Свега 3% валпроинске киселине се у непромењеном облику излучи путем урина. Трећи ниво представља преузимање лека кроз крвно-мождану баријеру и метаболизам лека у неуронима. Интравенском применом, лек заобилази јетру и улази директно у системску циркулацију.

Због генског полиморфизма ензима јетре који су од значаја за метаболисање валпроата јављају се интериндивидуалне варијабилности у фармакокинетици и фармакодинамици лека. Ово може да допринесе појави непропорционалности између дозе која се примењује и концентрације валпроата у плазми (22).

1.2.3. Биоискористљивост валпроата

Биоискористљивост валпроата је преко 90%. После оралног давања максимална концентрација у серуму се достиже током прва два сата. Код препарата са одложеним растапањем максимална концентрација се достиже после 3 до 8 часова. Релација између дозе и укупне концентрације валпроата у серуму није линеарна, тј. не расте са повећањем дозе услед везивања лека за протеине плазме који имају улогу носача. Наиме, везивање за протеине плазме је до 95%, што условљава низак волумен дистрибуције, док слободна

фракција расте са повећањем дозе. Разлике у везивању валпроата за протеине плазме условљене су старашћу, хроничним обољењем бубрега и јетре, као и узимањем других лекова.

Полувреме елиминације валпроинске киселине је између 12 и 16 часова, а при политерапији 5 до 12 сати. Већа активност Na^+ канала у централном нервном систему епилептичних у односу на не-епилептичне пацијенте доприноси бољој искористљивости лека код епилептичних пацијената. То је у корелацији са самим механизмом дејства антиепилептика, који своје дејство превасходно испољавају на хиперексцитабилном неурону.

Два метаболита, глукуронид-валпроат и 3-оксо-валпроат, представљају око 40% и 33% уринарне екскреције валпроата. Два десатурирана метаболита валпроата, 2-пропил-2-пентанска киселина и 2-пропил-4-пентанска киселина, имају антиконвулзивну активност која је слична у потентности као и валпроат сама по себи. Како постоји кашњење у смислу активности, али и значајна акумулација 2-пропил-2-пентанске киселине, овај процес може пружити објашњење у смислу дискрепанце између времена током којег валпроат достиже пик у серумској концентрацији и антиепилептичке активности (23).

1.2.4. Фармакокинетика лека кроз крвно-плаценталну баријеру

Лекови кроз плаценту могу пролазити на основу хемијско-физичких и/или фармакокинетичких карактеристика, али су од великог значаја и различите врсте протеинских транспортних система.

Протеинска фамилија „АТФ-binding cassette“ (ABC) која укључује ефлуксне транспортере лекова као што су П-гликопротеин, „breast cancer resistance protein“ (BCRP) и мулти-резистентни протеин 2 (MRP), као и “solute carrier” (SLC) протеинска фамилија, у плаценти представљају активни протеински систем за пренос лекова (24). ABC транспортни систем испумпава супstrate на апикалној мембрани трофобласта у мајчину циркулацију. На тај начин овај систем лимитира мајка-фетус транспорт, убрзавајући

фетус-мајка пренос супстрата и штитећи фетус од ксенобиотица. У случају липофилних супстанци транспорт је омогућен пасивном дифузијом и није условљен плаценталним ефлуксним транспортерима. SLC протеинска суперфамилија у плаценти олакшава енергетски-независно преузимање хидрофилних и нелектрисаних молекула. (25). Једном тако преузете супстанце у трофобласту могу се искористити за потребе плаценте или се испумпавају из ћелије другим SLC или ABC транспортером. (26) .

Сматра се да антиепилептици пролазе плаценталну баријеру путем транспортно-протеинског система. Плацентално-перфузионе студије показале су да антиепилептици типа карбамазепина, оксакарбамазепина, ламотригина, фенитоина, примидона пролазе плаценту и достижу феталне вредности једнаке вредностима у мајчиној циркулацији, ако не и веће. (27). Многе студије су потврдиле да је фетални ниво валпроата једнак нивоу валпроата у серуму мајке или пак већи, на рођењу.

Као што је већ споменуто, смањено везивање за протеине плазме условљава већу концентрацију слободног валпроата у серуму мајке. Концентрација валпроата у феталном серуму зависи од начина на који он пролази кроз плаценту, али с обзиром да супстанца не може проћи биолошке мембране пасивном дифузијом, механизам проласка овог терапеутика није још увек објашњен на задовољавајући начин. У студији на анималном моделу истиче се да валпроат пролази плаценталну мембрану путем пасивне дифузије, као и већина хемијских супстанци. Међутим, валпроат као нискомолекуларна масна киселина (144Да), при физиолошком рН скоро је комплетно јонизована и недавно је приказано да је трансплацентарни пролаз посредован протонски-зависним сатурабилним системом путем фамилије монокарбоксилних киселинских транспортера. Преношењем путем овог система олакшава се трансплацентарни пролаз и додатно се повећава концентрација валпроата у феталној крви (28).

1.2.5. Оштећења плода настала применом валпроата током трудноће

Употреба валпроата током трудноће изазива оштећења плода која се могу сврстати у три велике групе:

- велике телесне аномалије (дефект неуралне тубе, конгенитални срчани дефект, расцеп усне и непца, аномалије уринарног тракта, оштећење удова),
- кранио-фацијални дизморфизам,
- когнитивни дефект и поремећај понашања.

Мада су штетна дејства валпроата на плод позната, у многим случајевима лек остаје у употреби зато што промена терапије не даје задовољавајуће резултате. У таквим случајевима значајно је да се ефективна доза лека као монотерапија сведе на минимум (<1000 mg/dnevno; (29)). Међутим, управо ова сазнања о неминовној примени валпроата често и током читаве трудноће, указују да експериментални приступ и рад на анималним моделима може знатно да допринесе разумевању далекосежних дозно-зависних ефеката примене терапије током гестације.

Оштећење централног нервног система плода, чије мајке су као монотерапију користиле валпроат је у директној релацији са механизмом дејства валпроата (30). Сматра се да су за нежељена дејства валпроата у великој мери заслужне промене у GABA-посредованој неуротрансмисији, која током гестације има ексцитаторну улогу, делује као трофички фактор и контролише ћелијску пролиферацију, миграцију и сазревање дендрита. Модулацијом активности GABA-ергичког сигналног система валпроат доводи до низа поремећаја, укључујући промене у формирању ламинарне кортикалне структуре (31).

У трудноћи укупна концентрација лека у крви опада због повећања волумена дистрибуције и повећане елиминације лека. Невезана фракција лека у крви се удвостручује почев од другог триместра услед снижавања концентрације албумина, а при порођају се додатно значајно повећава услед пораста концентрације слободних масних киселина које компетирају са валпроатом за рецепторско место на албумину. Повећана слободна фракција валпроата на крају трудноће и при порођају узрокују акумулацију лека у крвотоку неонатуса, са могућим тератогеним, хепатотоксичним или другим нежељеним дејствима. Код новорођенчади се валпроат елиминише споро и полувреме елиминације је преко 20 ч. Концентрација лека у мајчином млеку чини 1-3% концентрације неvezане фракције у крви мајке, што није од клиничког значаја за новорођенче.

1.2.6. Тератогени ефекти валпроата

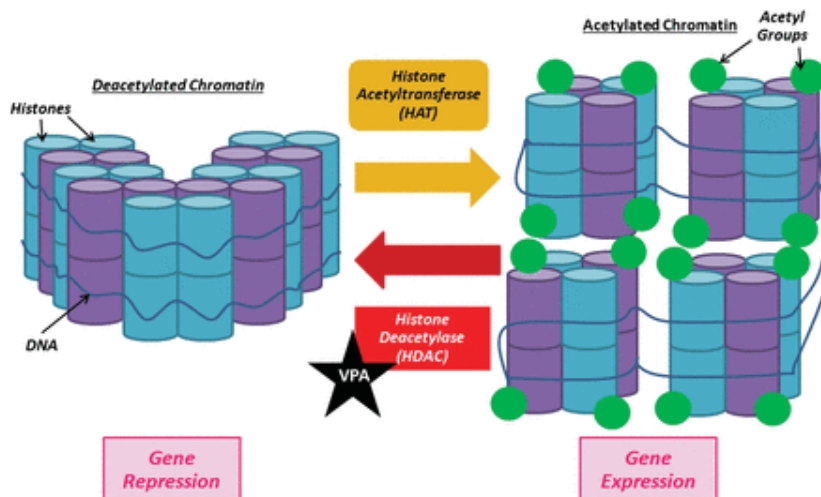
Током интраутериног развоја фетус пролази кроз три различите фазе: формирање бластоциста, органогенеза и хистогенеза. Тератогене супстанце ометају правилну органогенезу, изазивајући поремећаје у процесу ћелијске деобе, миграције, диференцијације и степену ћелијске смрти. Механизми путем којих тератогене супстанце утичу на органогенезу су још увек недовољно разјашњени, мада постоји позитивна корелација између мутагености и тератогености (32).

У досадашњим истраживањима валпроична киселина је препозната као тератогена супстанца како у хуманој популацији тако и на анималним моделима. Међутим, тератогени ефекти се не региструју код сваког потомства које је било изложено дејству валпроата током интраутериног развоја. Статистички подаци указују да је инциденца тератогености услед примене валпроата у хуманој популацији око 14%, што је дупло од процента који се уобичајено јавља 7% (33). Сазнање да примена валпроата изазива дефекте у развоју само код одређених потомстава указује да је тератогеност уско повезана са одређеним генетичким карактеристикама (34).

Постоји неколико механизма за које се сматра да су од значаја за тератогене ефекте валпроата (35). Као што је већ поменуто (поглавље 1.2.4.), супстанца пролази плаценту великим делом захваљујући својој липофилности, рН, везивању за одређене протеине и носаче, достижући концентрације у крвотоку фетуса које су чак и веће од концентрације у крвотоку мајке. Према једном од претпостављених механизма, валпроат у крви прелази у анијон који може да формира ковалентне везе са антиоксидативним ензимима (нпр. супероксид-дисмутаза, СОД). На тај начин валпроат омета ове ензиме у уклањању реактивних кисеоничних врста (*eng. reactive oxygen species – ROS*), високо реактивних молекула који утичу на есенцијалне ћелијске елементе као што су ДНК/РНК, липиди и протеини (36; 37). Сматра се да тератогени ефекат валпроична киселина остварује и путем медијатора који ступају у интеракцију са пероксизомалним пролиферативно-активираним рецептором (PPAR δ), услед тога што валпроинска киселина

изазива продукцију пероксизома у јетри пацова (38). Утицај валпроата на кључне ензиме у метаболизму фолата је такође од значаја за феномен тератогености, јер на овај начин валпроат редукује конверзију неактивне у биолошки активну форму фолата (39).

Ефекат валпроата који последњих година посебно привлачи пажњу је инхибиторно дејство на HDAC ензиме (40). Сматра се да се валпроат, али и неки његови активни метаболити, директно везују за HDAC, спречавајући га да хидролитички уклони ацетилне групе са ДНК. Због тога хроматин није у стању да се кондензује и остаје доступан различитим транскрипционим факторима који врше преписивање гена чији протеински производи ремете апоптозу и морфогенезу (30).



Слика 5. Претпостављени механизам утицаја валпроата на генску експресију (преузето из Lloyd, 2013)

1.2.7. Неуро-бихејвиорални ризик

Студије које су испитивале утицај примене валпроинске киселине током трудноће указују да постоји изванредан утицај третмана на психомоторни развој и когнитивни

дефицит потомака (41; 42). Међутим, због разлике у дизајну и начину когнитивног тестирања, ове студије нису могле бити укључене у мета-анализу. Два истакнута ефекта била су утицај на вербалну интелигенцију и на општи коефицијент интелигенције. У једној студији низак ниво когнитивног функционисања имала су деца чије су мајке имале нижи степен образовања, док су у другој студији учестали клонично-тонични напади мајки били у корелацији са нижим вербалним коефицијентом интелигенције деце. Ови резултати отварају простор детаљном испитивању психомоторног развоја, са акцентом на когнитивни аспект, где би студије недвосмислено указале на степен оштећења интелектуалног и когнитивног развоја искључивши социо-економске и друге срединске факторе, као и мајчин коефицијент интелигенције, што се у хуманој популацији не може избећи (43).

1.3. Психомоторни развој - анимални модели у поређењу са хуманом популацијом

Студије у оквиру хумане популације које разматрају утицај лекова током гестације на плод и ефекат на психомоторни развој детета су од великог значаја, али сабирањем и скупљањем резултата и поштовањем етичких принципа добијају се непотпуне информације у смислу ограничене, униформне дозе током гестације примењене код трудница, различитог здравственог стања (коморбидитет), телесних и фармакокинетичких карактеристика (телесне масе, генске варијабилности ензимских комплекса...) и социокултуролошких разлика (животне навике, дисциплиновано узимање терапије...).

Могућност испитивања ефеката одређених третмана на анималном моделу, уз примену етичких норми, пружа широк увид у дозно-зависни ефекат лека како на органске системе плода тако и на саму женку. Сазнање да је идентичност генома глодара и човека преко 95% чини оправданим базична истраживања на анималним моделима, мада бројне фенотипске разлике доприносе бројним транслационим лимитацијама (44). Осим тога, захваљујући убрзаном животном развоју, на глодарима се могу у пристојном временском оквиру испитати процеси везани за различите фазе развића и/или старења.

Сврха употребе анималних модела у испитивању неуро-бихејвиоралних поремећаја је да се [1.] повећа разумевање неуроанатомског супстрата који је у основи поремећаја, као и механизма који контролише нормално понашање и [2] да се стечена сазнања примене у клиничким истраживањима (45). Досадашња истраживања недвосмислено указују на постојање интелектуалне активности код новорођенчета, али и у фетуса “in utero” (46). Питање које се отвара је: Да ли се развој централног нервног система може сагледавати генерализовано кроз различите врсте сисара?!

Веза еволуционе и развојне биологије указује да су временске кључне фазе и редослед раног можданог развоја изузетно очуване код сисара. Период пренаталног и постнаталног развоја може бити идеално време за поређење различитих сисарских врста, јер конверзија постаје високо варијабилна код адултних животиња које су неминовно изложене различитим срединским факторима, услед којих постоје одређене специфичности у реакцији на стимулус.

Група аутора је урадила 280 морфолошких опсервација мозга ембриона и плода човека почевши од формирања неуралне цеви до мијелинизације субкортикалних влакана. Добијени резултати су указали да се око 88% морфолошких промена одиграва у првом триместру, а само 1% у последњем триместру. (47). Насупрот концепту да новорођенче човека припада незрелим врстама, показатељи матурације ЦНС-а указују да је људски плод два месеца пре рођења изнад нивоа зрелости макаки мајмуна, да је зрелији од недељу дана старог новорођенчета мачке и недељу дана старог новорођенчета пацова (48).

Изједначавање можданог развоја кроз различите врсте сисара обухвата (46):

- **морфолошко поређење** - добијено детаљним повезивањем појаве великих анатомских обележја у ембрионима различитих врста. Џорџ Стилер увео је “соматичне фазе” као приступ студијама хуманог развоја. Приступ је базиран на соматској морфологији и претпоставка је да је мождани развој линеарно предвидив;
- **“правило палица”** – премиса да се мождани региони развијају сличним интензитетом код свих врста није до краја поуздана; разлика у степену

зрелости лимбичког система и кортикалних региона отежава тумачење добијених резулта чак и међу приматима ;

- **чињенично потврђена поређења** - кључни догађаји током развоја ЦНС-а представљају уопштени временски прозор почетка и краја пролиферације, формације синапси, развоја неуротрансмитерских система. Почетак пролиферације је током пете недеље гестације код хуманог ембриона што одговара 12,5 дану постконцепције код глодара.

1.4. Експериментални приступ у изучавању промена у понашању

Понашање се може дефинисати као одговор организма на спољашње и унуташње стимулусе. Сходно основама понашања које је карактеристично за дату врсту, у одговору на третман могу се анализирати психомоторна активност, рефлексне реакције, ноцицептивни одговор, али и бројни физички показатељи општег стања организма. Испитивање сензорног и моторног развоја лабораторијске јединке може се сматрати моделом сензорног и моторног развоја код људи, односно код новорођенчади (49).

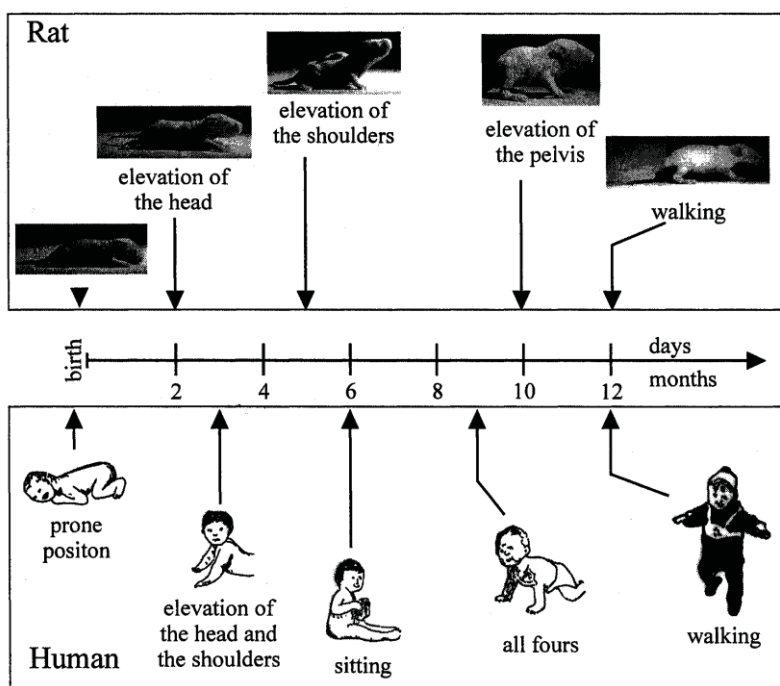
Неопходна је и процена крупних телесних аномалија, које могу утицати на исход тестирања. Увид у опште стање животиње стиче се њеним континуираним праћењем од самог рођења. Параметри које је неопходно обсервирати су телесна масе јединке, дан када се отварају очи и одлепљују ушне шкољке, симетрија и координација леве и десне стране тела и кранијално-каудална матурација моторичког одговора током развоја (50).

Једна од значајних карактеристика свих животињских врста јесте да заузимају карактеристичан положај тела, који се за квадрипедалне организме (укључујући глодаре) може дефинисати као положај са дорзалном страном тела окренутом од хоризонталне подлоге и вертикалном страном тела окренутом ка подлози (51). Одржавање положаја тела је невољна активност која се у највећој мери базира на урођеним механизмима (52). Ефективна контрола положаја тела је значајна како за статичку тако и за динамичку активност организма, и као таква је неопходна да обезбеди основу за вољне покрете главе, тела и екстремитета (53). Дефекти у сензорним или моторним механизмима који

контролишу положај тела се драматично одражавају на стабилност тела и моторичке способности целокупног организма (54).

Два главна аспекта контроле положаја тела подразумевају рефлексну реакцију и антиципацију. При рефлексној реакцији постурални систем одговара на промене у оријентацији тела, са циљем да га доведе у природни положај (55). Са друге стране, захваљујући феномену антиципаторног одговора, постурални систем изазива промене у држању тела да би предупредио дестабилишуће ефекте како спољашњих фактора тако и очекиваних вољних покрета самог организма.

Моторички одговор како људи тако и глодара је на рођењу незрео, а током развоја показује росто-каудалну матурацију (Слика 6; 52).



Слика 6. Шематска компарација постнаталног моторног развоја човека и пацова. Preuzeto из Vinay i sar., 2005

1.4.1. Тест рефлекса усправљања

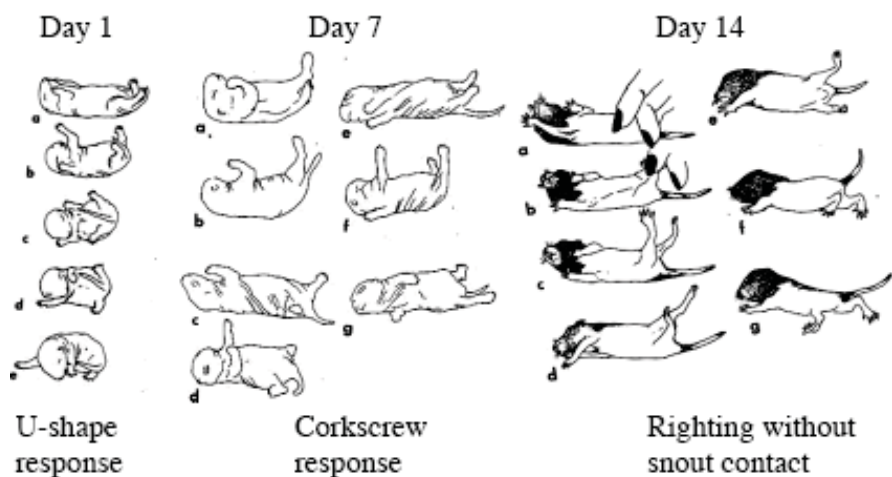
Тест рефлекса усправљања (*engl. righting reflex*) примењен на јединкама у различитим фазама постнаталног развића се користи за тестирање развоја моторног одговора везаног за положај животиње. Усправљање је последица координисане активности најмање 4 система (56): вестибуларни систем (за осећај гравитације), *trigeminus* (стимулација подручја носа и уста), површина главе (тактилна стимулација), површина тела (тактилна стимулација). Ови системи достижу зрелост у различитим временским оквирима током постнаталног развића. Због тога се помоћу рефлекса усправљања може тестирати интегритет визуелних, вестибуларних, тактилних и проприоцептивних функција за дату постнаталну старост животиње.

Ако се пацов постави на леђа на површину стола окренуће се покрећући прво предњи део тела (главу, врат и предње екстремитете), а потом и задњи део тела.

Постоје две форме рефлекса усправљања из супинације у пронацију, у зависности од средине у којој се изазива:

1. вестибуларна форма – изазива се испуштањем експерименталне животиње на леђа да слободно пада,
2. контактна форма - изазива се окретањем експерименталне животиње на леђа, на равној подлози.

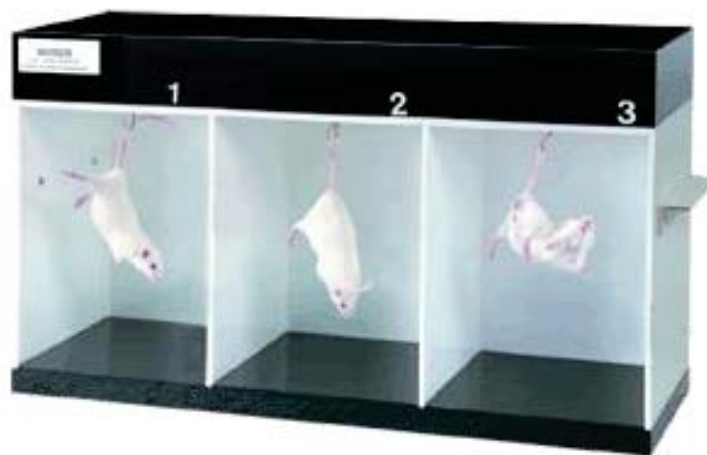
Развој рефлекса окретања из супинације у пронацију се код глодара одвија постнатално. Прво се јавља контактна форма рефлекса, а након ње вестибуларна. Матурација контактне форме рефлекса је постепена и одвија се у три фазе (Pellis и Pellis, 1994). У првим постнаталним данима јединке се окрећу по тзв. У-обрасцу, крајем прве и током друге недеље се окрећу по принципу "вадичепа", а крајем друге недеље и надаље би требало да успоставе адултни тип окрета, без контакта њушке са подлогом (Слика 7.; 56).



Слика 7. Постнатална матурација рефлекса усправљања код пацова.

1.4.2. Тест качења о реп

Један од најчешће употребљаваних тестова за проверу стања сличних депресији јесте „тест качења о реп“ (*engl.* tail suspension test). Тест је базиран на принципу да се миш у кратком временском интервалу доведе у безизлазну, стресну ситуацију качењем о реп (Слика 8.). Услед тога животиња показује изразиту активност у жељи да избегне наметнути положај, али након неког времена постаје неактиван и прихвата услове.



Слика 8. Тест качења о реп

Овај тест је врло економичан, брз и једноставан, а има и високу предиктивну вредност. Тестом качења о реп мери се трајање имобилног (неактивног) периода у оквиру читавог тест-периода. У одређеним условима тест се може модификовати и повећати његова сензитивност тако што се прибегне мерењу дужине трајања активног периода, до појаве прве фазе имобилности. Сензитивност теста постиже се мерењем латенце од момента качења репа до момента укочености (57; 58).

1.4.3. Тест излагања врућој плочи

Тест излагања врућој плочи (*engl. hot plate test*) се користи за испитивање реакције јединке на ноцицептивни (у овом случају топлотни) стимулус. Ноцицепција (ноциперцепција), се односи на неуралне процесе који централном нервном систему дају информацију о болном стимулусу (59). Ноцицепција настаје услед одговора слободних нервних завршетака (ноцицептори) на хемијске, механичке и термалне стимулусе генерацијом акционих потенцијала. Фреквенца појављивања акционих потенцијала зависи од интензитета стимулације. Дуж нервних влакана сигнал се простире до кичмене мождине, а затим до мозга. Захваљујући различитим аутономним одговорима ноцицептивни стимулус прераста у субјективни доживљај бола па се зато бол може дефинисати као субјективан, мултидимензионалан доживљај који укључује сензорну, емоционалну и когнитивну компоненту. Цимерман је реинтерпретирао дефиницију бола: “Аверзивна сензорна драж изазвана актуелном или потенцијалном повредом изазива моторну и вегетативну реакцију, која резултира понашањем наученог избегавања и може модификовати понашање специфично за врсту, укључујући и социјално понашање“ (60).

У тесту излагања врућој плочи (Слика 9.) мери се латенца у одговору животиње на топлотни стимулус. Сам одговор при првом излагању се манифестује одизањем и лизањем задње шапе, а затим и поскакивањем животиње у покушају да избегне даљу стимулацију. Овим тестом се мери супраспинални одговор на ноцицепцију.

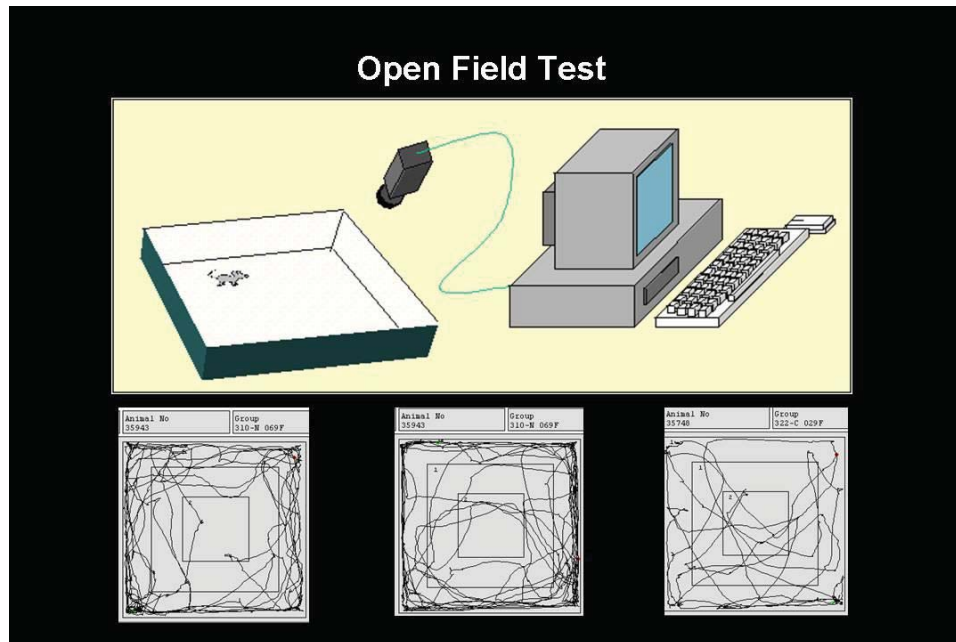


Слика 9. Тест излагања врућој плочи

Предности теста су његова објективност и квантитативност, као и то што може да се примени неколико пута на истој животињи без опасности од изазивања инфламаторних процеса. Понављањем теста, скраћује се време одговора јединке на топлотни стимулус и најчешће изостаје лизање шапе, што се у неким студијама тумачи учењем док друге студије указују да се наученим одговором може сматрати само реакција у виду покушаја скакања са тест-плоче (61; 62). Резултати који скрећу пажњу на утицај неноцицептивних фактора на латенцу у одговору на тест вруће плоче су од значаја када се тестирају животиње различите старости а самим тим и различитих тежина (62).

1.4.4. Тест отвореног поља

Један од тестова који пружа увид у општи моторни статус јединке је тест активности у отвореном пољу (*engl.* open field test). Овај тест се користи у процени евентуалног моторног дефицита, док се на основу обрасца кретања животиње у арени за тестирање могу добити и информације о анксиозном понашању.

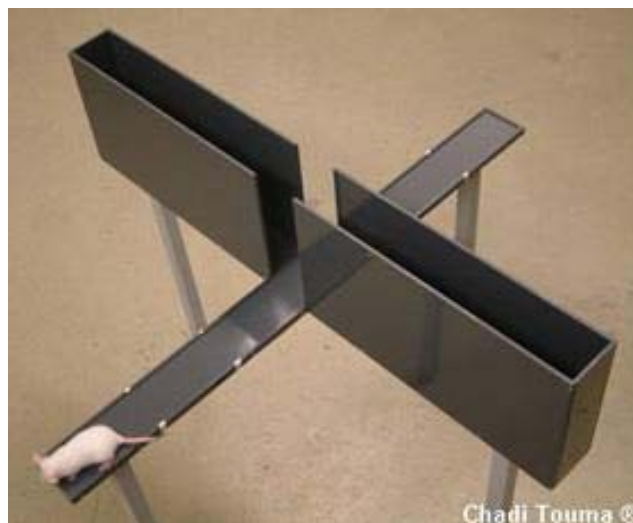


Слика 10. Тест отвореног поља.

Промене у интензитету моторног одговора током задатог временског периода указују да ли се животиња после интензивне експлорације навикава на експериментални кавез, што се означава као фаза хабитуације и дешава се у физиолошким условима код највећег броја животиња. Услед различитих претретмана овакав моторни одговор у отвореном пољу може да буде измењен (63).

1.4.5. Тест уздигнутог крстастог лавиринта

Тест уздигнутог крстастог лавиринта је модус за испитивање етолошког анималног модела анксиозности лабораторијских животиња (пацов/миш), на основу њиховог карактеристичног понашања.



Слика 11. Тест уздигнутог крстастог лавиринта

Карактеристика уздигнутог крстастог лавиринта је да представља „неусловљени модел“, који подразумева да је задатак сам по себи аверзиван. Употреба овог теста се шири на испитивање измењене емоционалности, која је условљена биохемијским и генским варијацијама код јединки. У тесту се испитује спонтана експлорација средине, без награде по обављеном задатку у тесту. Требало би имати у виду да у зависности од дужине трајања теста, јединка на почетку тестирања и на крају може исказати другачији облик понашања. Измењено понашање током тестирања условљено је учењем. Понашање у смислу избегавања отворених кракова и одлука да јединка остане у затвореним крацима је карактеристично за каснију фазу теста.

Висина као једини фактор није довољна да буде интензиван анксиогени стимулус. Аверзија глодара према отвореном простору повезана је са тигмотаксом (*engl. thigmotaxis*), реакцијом јединке да се креће у простору блиско вертикалној површини, што је у репертоару њиховог природног одбрамбеног понашања. Битан фактор оваквог понашања је визуелна перцепција. Одбрамбено понашање има утемељење у неуралном супстрату. Наиме, амигдала, хипокампадна формација, медијална хипоталамична регија и периаквадуктална сива маса су мождани региони чија је активност у корелацији са одбрамбеним понашањем. Одбрамбено понашање јединке односи се на поступке којима ће смањити на најмању меру шансу да буде повређена. Одбрамбено понашање обухвата

спектар понашања везан за процену ризика (*engl.* risk assessment behavior) и понашање избегавања. (64).

Просторна мерења првенствено се односе на анксиозност и представљају избегавање отворених кракова. Валидност теста уздигнутог лавиринта у испитивању појаве анксиозног понашања животиња описује се кроз неколико параметара (65). Анксиозност, тј. страх експерименталне животиње од отвореног простора и висине се у тесту уздигнутог лавиринта се огледа у избегавању отворених кракова и нагињања преко ивице отворених кракова, што се може објективно пратити. Управо ова карактеристика говори да изглед апаратуре оправдава сврху коришћења (*engl.* face validity). Остали параметри анксиозног понашања који се могу пратити у отвореном краку лавиринта су имобилност, тј. „залеђивање“ (*engl.* freezing behavior) и дефекација на отвореном краку. Друга важна карактеристика уздигнутог лавиринта је валидност конструисања стања (*engl.* construct validity), тј. да на основу зависне варијабле која се примећује и прати у тесту (као што је време проведено у отвореним крацима лавиринта), може да се мери (конструисе) стање које се не може приметити (као што је анксиозност). Трећа важна карактеристика уздигнутог лавиринта је да на основу одређених параметара понашања у овом тесту може да се предвиди понашање у сродним тестовима (*engl.* predicitive validity). На пример, повећана активност експерименталне животиње у отвореном краку уздигнутог лавиринта је углавном повезана са повећаном инциденцом боравка исте животиње у централном, најсветлијем делу отвореног поља (66). Такође, повећани ниво кортикостерона у крви експерименталних животиња је пратећи параметар боравка животиње у отвореним крацима. Међутим, овај биохемијски параметар је у позитивној корелацији са понашањем (на пример истезање) путем кога животиња процењује ризик боравка у уздигнутом лавиринту (67; 68).

1.5. Промена у понашању услед гестационог излагања валпроату

Преглед литературе указује да је утицај гестационог излагања валпроату на понашање потомства (миш, пацов) праћен кроз неколико експерименталних парадигми, са акцентом на период гестације од 7-мог до 18-тог гестационог дана (69), од 6-тог до 15-тог

гестационог дана (70), односно од 12-тог до 17-тог гестационог дана (71) и дозни опсег од 50mg/kg, 150mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg, 600 mg/kg и 800mg/kg (70; 71; 72). Добијени резултати указују да третман код новорођених јединки доводи до кашњења у отварању очију (73) и смањене телесне тежине (74; 75). Касније током живота јединки је примећена измењена социјална интеракција (76), кашњење у моторном развоју (71), низак ниво осетљивости на спиналну и супраспиналну болну драж и хиперактивност са смањеном експлоративном компонентом активности (75).

Досадашњи резултати такође указују да излагање валпроату током интраутериног развоја има извесне полно-специфичне неуроендокринолошке утицаје. На пример, измењен имунолошки одговор није уочен код женки, код којих су и промене у понашању биле знатно мањег интензитета у односу на мужјаке (77).

Према нашим сазнањима, у литератури нема резултата који описују бихејвиоралне корелате потомства рођених од женки које су током целокупног периода приплода и гестације биле изложене дејству клинички релевантних доза валпроата.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ ове докторске дисертације је био да се испитају последице интраутериног излагања различитим дозама валпроата на ток физичког (телесна тежина и кашњење у отварању очију) и психомоторног развоја јединки миша. Праћено је и стање третираних женки (телесна тежина, време које је било потребно да женке остану скотне- фертилитет и смртност).

Тестови примењени на потомству су у литератури окарактерисани као одговарајући за процену стања моторног и сензорног система у одређеној фази постнаталног развоја. Одређени тестови, поред опште моторне способности, омогућавали су и процену понашања типа анксиозности/депресије, хипер- и хипоактивности јединки. Процењиван је одговор потомства у следећим тестовима:

1. тест рефлекса усправљања
2. тест качења о реп
3. тест излагања врућој плочи
4. тест уздигнутог крстастог лавиринта
5. тест отвореног поља

Прва два наведена теста рађена су на јединкама у раној фази постнаталног развоја са циљем да се утврде евентуална одступања/неправилности у функционисању моторног и сензорног система јединки. Остала три теста су рађена у адолесцентној фази развоја са циљем да се испита супраспинални рефлексни одговор јединки на болну драж, анксиозно/депресивно стање и понашање у новој средини, редом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Експерименталне животиње

У експериментима су коришћене женке и мужјаци здравих лабораторијских мишева соја НМРИ, одабране методом случајног избора из окота на Војномедицинској академији у Београду. Током експеримента животиње су боравиле у стандардним лабораторијским условима на Заводу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију, Медицинског факултета у Новом Саду, где су третиране и испитиване. Део експеримента (који се односи на тест отвореног поља) је изведен у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, у Београду. Сви експерименти су одобрени од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Новом Саду и Етичког комитета Института за биолошка истраживања у Београду.

Услови у виваријуму су били: температура 23 ± 2 °C, влажност ваздуха $55\% \pm 1.5\%$, циклус светлост-тама по 12 сати. Животињама је био омогућен слободан приступ храни и води.

3.2. Експериментални дизајн и избор доза валпроата

Експеримент је почињао спаривањем две женке и једног мужјака у једном кавезу. Сходно третману, оформљено је 5 експерименталних група и то једна контролна (n=9 женки), која је била третирана физиолошким раствором (Natrii Chloridi Infundibule 0,9%, HemofarmhospitalLogica), и 4 групе које су третиране валпроатом (Valproic acid sodium salt – 2 propylpentanoic sodium, ≥ 98 , P4543 Sigma Aldrich) у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг или 400 мг/кг (n=10-11 женки по групи). Натријумова со валпроинске киселине растварана је у физиолошком раствору. Инјектирање је обављано свакодневно, од момента спаривања, током читавог периода приплода и гестације. Након рађања потомства третман је престајао и женке су са својим потомством одвајане у засебне кавезе. Младунци су

остајали са мајкама до 21. постнаталног дана (ПНД21), након чега су одвајани по половима, уз прецизну евиденцију третмана током интраутериног развоја. Приступ храни и води је био неограничен.

Дозе које су коришћене у експерименту прерачунате су на основу Кларкове формуле:

$$\text{Animalna doza leka} = \sqrt[3]{\frac{TT^2 \text{ \textit{čoveka}}}{TT^2 \text{ \textit{miša}}} \times \textit{humana doza leka}}$$

Уобичајена дневна терапијска доза валпроата коју не би требало прекорачити, ради спречавања тератогеног ефекта на плод, током трудноће је 1000 мг/кг (30), и хуманој популацији. Прерачунавањем хумане дозе од 1000 мг/кг, путем Кларкове формуле добија се анимална доза валпроата од 150мг/кг телесне тежине женке миша. Циљ овог истраживања је био испитивање ефеката валпроата на ЦНС-у у субтерапијским дозама и дозно- зависни ефекат. Сходно овим циљевима, дозе су одређене на основу „Принципа токсикологије“ (78).

3.3. Бихејвиорални тестови коришћени у експерименту

Психомоторни развој контролних и јединки чије су мајке током гестације биле третитране различитим дозама валпроата је праћен помоћу различитих бихејвиоралних тестова. У периоду раног постанатлног развоја мужјаци и женке су тестирани заједно у оквиру одређене групе, а након одвајања по половима (ПНД21) засебно.

Тест рефлекса окретања

Процена моторне координације испитивана је ПНД 5, ПНД 10, ПНД 15 тестирањем рефлекса окретања (engl. Righting reflex) (79). Тестом „Рефлексног окретања из супинације у пронацију“ испитиван је развој моторног дела нервног система. „Рефлекс окретања из супинације у пронацију“ тест омогућава испитивање рефлекса постуре. Јединка се на равној подлози поставља трупом у дорзални положај и мери се време које је потребно јединки да са сва 4 екстремитета додирне подлогу. Исход тестирања био би успешан, односно неуспешан, у случају да се јединка не окрене током 120 секунди. Поред времена као квантитативног параметра, испитиван је тип окрета као квалитативан параметар. На основу литературе (56) типови окрета су:

1. „У“ окрет (U-okret)
2. „Вадичеп“ окрет
3. „Адултни“ окрет

Тест качења о реп

Пре почетка испитивања јединки у тесту качења о реп (engl. Tail Suspension Test-TST), животиње које су биле укључене у експеримент транспортоване су у просторију где се обављало мерење, најмање сат времена, како би се прилагодили новој средини.

Експеримент је извођен у временском интервалу од 9-18ч, а током мерења морала је да влада тишина. Овај тест је извођен непосредно по завршеном тестирању рефлекса окретања. У току периода од 3 минута, након качења о реп, штоперицом је мерено време (сек) у којем је животиња показивала имобилност/укоченост (латенца имобилизације). Тестом качења репа јединка се поставља у позицију у којој виси 20цм изнад подлоге, тачка фиксације била је пар mm од врха репа јединке. Извођење теста омогућава увид у покрете главе, трупа и екстремитета и време за које јединка постане потпуно непокретна. Време испитивања јединки је ограничено на 3 мин. Испитивање је спровођено ПНД 5, ПНД 10, ПНД 15 услед карактеристика моторног понашања, које се тада јављају и могу бити регистроване. Ради поређења и потврде резултата, експеримент је изведен и са групом животиња чије мајке су биле третиране физиолошким раствором.

Тест вруће плоче

Тест вруће плоче (*engl. Hot Plate Test*) спроведен је у периоду адолесценције миша, 25ог дана постнатално и поновљен је 32ог дана. Током овог теста испитивана је реакција експерименталне животиње на супраспиналну драж, односно топлотни стимулус. Понављани тест топле плоче као феномен условног учења, спровео би се по методи Ле Бара и сарадника (61). Током тестирања, температура вруће плоче, односно подлоге на којој је тестиран миш одржавана је на температури од $50\pm 1^{\circ}\text{C}$. За загревање плоче, односно металног цилиндра урођеног у воду, коришћено је водено купатило. Време испитивања јединки ограничено је на 40 сек., да би се избегла повреда ткива испитиване јединке. Мерено је време од момента спуштања испитиване јединке на загрејани метал до тренутка када је јединка подигла задњу шапу и отресла или олизала. Јединка је одмах на одговарајући начин склоњена са подлоге за тестирање.

Тест уздигнутог крстастог лавиринта

За процену анксиозног стања јединки коришћен је уздигнути лавиринт (*engl. Elevated Plus Maze - EPM*). Испитивање јединки у овом тесту спровођено је ПНД 35. Коришћен је лавиринт израђен од стакла, постављен на висину од 45 cm (60 cm до врха затвореног крака). Краци су били 30 cm дуги и 5 cm широки. Димензије централне платформе су износиле 5 x 5 cm. Експерименталне животиње које су учествовале у испитивању транспортоване су у просторију где је вршено мерење, најмање сат времена пре теста, како би се искључио утицај премештања на резултате теста. Експеримент је извођен у временском интервалу од 9-18h, а током мерења контролисани су осветљење, бука и температура. Једна животиња улазила је само једанпут у извођење ЕРМ, како би се искључио утицај поновног уласка у тест на резултате (65). Након сваке животиње, лавиринт је темељно чишћен, разблаженим раствором етанола. Животиње су постављане у центар лавиринта окренуте ка отвореном краку, репом ка експериментатору (Ibarrá i sag., 2010). У периоду од 5 минута, бележен је број улазака и време проведено у отвореним и затвореним крацима, а на основу ових мерења израчунато је и време које је животиња провела на централној платформи (64). У овом тесту мерени су параметри понашања које се односи на процену ризика (број истезања, број издизања и број нагињања). Ради поређења и потврде резултата, експеримент је изведен и са контролном групом.

Тест отвореног поља

Јединке су испитиване у тесту отвореног поља у фази адолесценције (ПНД 40). Тестирање се одвијло у соби са контролисаном температуром, буком и осветљењем. Моторичка активност је праћена помоћу аутоматског уређаја, Auto-Track System (Version 3.0A, Columbus Ins., OH, USA). Кавези за мониторинг (Opto-Varimex) су од плексигласа, димензија 44,2 x 43,2 x 20 cm, и повезани су са Auto-Track интерфејсом. Систем за детекцију промене положаја експерименталне животиње ради по принципу пресецања инфрацрвених зрака, који се у форми решетке налазе у два нивоа. Прекидом зрака генерише се аналогни сигнал који се шаље компјутеру (умрежен са Auto-Track

интерфејсом) где се врши дигитална конверзија сигнала, тј. постиже се бројање одређених активности. Систем може да раздвоји 11 параметара понашања, укључујући локомоторну активност, стереотипну активност и вертикалну активност (успињање). Тип активности, тј. класификација покрета, зависи од понашања животиње и одређен је бројем инфрацрвених зрака које животиња мора у континуитету да пресеке. У нашем експерименту, сходно величини експерименталних јединки, величина мреже је била одређена са два узастопна зрака. Њихово пресецање систем је видео као локомоторну активност, док је сваку активност у пољу између два зрака детектовао као стереотипну активност. Вертикална активност је бележена независно, пресецањем горњих снопова инфрацрвених зрака који су на 5 cm од хоризонталне површине по којој се животиње крећу.

3.4. Статистичка обрада података

За статистичку анализу добијених резултата је коришћен софтверски пакет STATISTICA 6.0. Промене у испитиваним параметрима су представљене табеларно или графички, као средња вредност \pm стандардна грешка. Статистичка поређења између група су рађена непараметарским тестовима (Kruskal-Wallis ANOVA, U-test) јер велики део добијених података није имао нормалну расподелу, што је предуслов за коришћење параметарских тестова. Статистички значајним разликама су сматране оне код којих је анализа указала да је $p < 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Утицај третмана валпроатом током приплода и гестације на женке

У експерименту је укупно третирано 50 женки миша НМРИ соја. Натријумова со валпроинске киселине (Valproic acid sodium salt- 2 propylpentanoic sodium, ≥ 98 , P4543 Sigma Aldrich) коришћена је за третман женки у 4 различите дозе од 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг, од момента спаривања женки са мужјацима (2 женке са једним мужјаком по кавезу). Контролна група женки третирана је физиолошким раствором (Natrii Chloridi Infundibule 0,9%, HemofarmhospitalLogica).

4.1.1. Промена бројчаног стања женки током третмана валпроатом

У Табели 1. приказане су опште статистичке карактеристике броја и стања женки током третмана. У контролној групи, као и у групама третираним валпроатом у дози од 50 мг/кг и 100 мг/кг није забележена смртност. У овим групама све женке су зачеле. Међутим, у групама које су третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг угинуле су 2 и 5 женки, редом (што је 18% и 50%, редом, од укупног броја јединки у групи). У групи третираној валпроатом у дози од 200 мг/кг 3 женке нису остале скотне (што је 27% од укупног броја јединки у групи).

третман	укупан број женки у експерименту	број женки које су угинуле током третмана	број женки које нису зачеле
физиолошки раствор (контрола)	9	/	/
валпроат, 50мг/кг	10	/	/
валпроат, 100мг/кг	10	/	/
валпроат, 200мг/кг	11	2	3
валпроат, 400мг/кг	10	5	/

Табела 1. Промена бројчаног стања женки. Током читавог периода приплода и гестације јединке су третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата.

4.1.2. Временски период од спаривања женки са мужјацима до зачећа

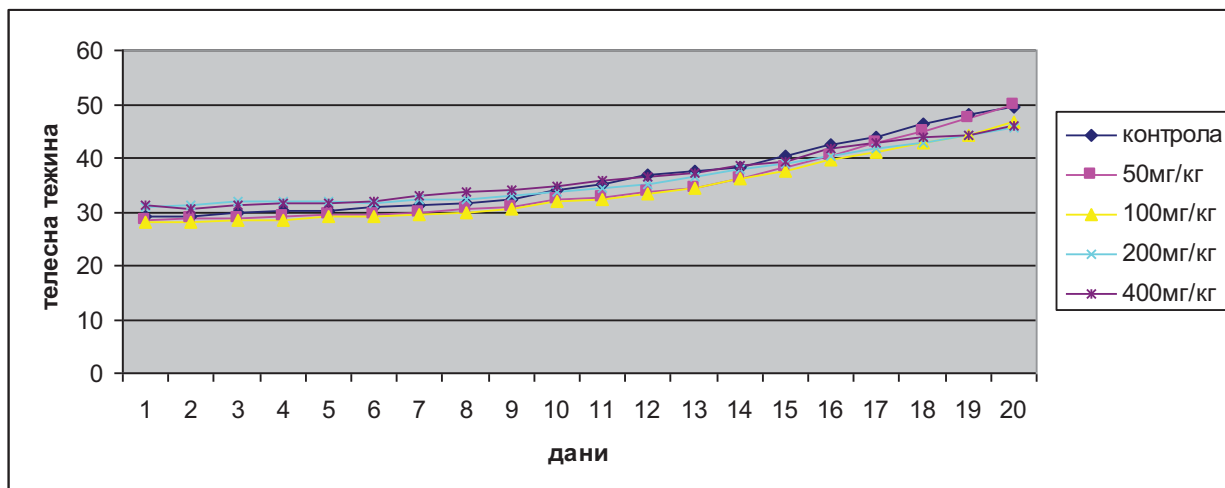
Временски период који је био потребан да женкама остану скотне је приказан у Табели 2. Статистичка анализа података је показала да је третман валпроатом значајно утицао на овај параметар (Kruskal-Wallis ANOVA, $H(4, N=40)=10,059$, $p=0,039$). Групе женки које су биле третиране физиолошким раствором и валпроатом у дози од 50 мг/кг су у просеку су остајале скотне осмог (8 ± 2) дана од почетка третмана, док је групи женки која је добијала валпроат у дози од 100 мг/кг просечно требало 11 ± 2 дана. У поређењу са контролном групом гранична статистичка значајност ($p<0.06$, U-test) је детектована у групи третираној валпроатом у дози од 200 мг/кг (време до зачећа 17 ± 4 дана), док је у групи која је добила валпроат у дози од 400 t потвђена значајна статистичка разлика ($p<0.02$, U-test; време до зачећа 18 ± 3 дана).

третман током гестације	дани до зачећа (средња вредност±стандардна грешка)	статистичка значајност (p) у поређењу са контролом
физиолошки раствор (контрола)	8 ± 2	
валпроат, 50 мг/кг	8 ± 2	/
валпроат, 100 мг/кг	11 ± 2	/
валпроат, 200 мг/кг	17 ± 4	0.06
валпроат, 400 мг/кг	18 ± 3	0.02

Табела 2. Временски период од спаривања женки са мужјацима до зачећа. Током читавог периода приплода јединке су третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата.

4.1.3. Промена телесне тежине женки током гестације

Телесна тежина женки мерена је свакодневно од почетка експеримента, на основу чега је примењивана адекватна количина супсатнце, сходно предвиђеној дози. Средње вредности телесних тежина женки током гестације по експерименталним групама су представљене графички (Графикон 1.) Статистичка анализа није указала на значајна одступања у телесној тежини јединки које су биле изложене дејству валпроата у односу на телесне тежине женки у контролној групи.



Графикон 1. Промена телесне тежине женки током трудноће. Током читавог периода приплода и гестације јединке су третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (наведено у легенди у оквиру графикона). Измерене тежине су у грамама (г).

4.2. Утицај интраутериног излагања валпроату на физичке карактеристике потомства у различитим фазама постнаталног развоја

Познато је да интраутерино излагање валпроату може да утиче на физичке карактеристике потомства, па су сходно томе у нашем експерименту праћене промене у телесној тежини и отварању очију потомства.

4.2.1. Утицај интраутериног излагања валпроату на телесну тежину потомства

Телесне тежине јединки чије су мајке током читавог периода приплода и гестације биле изложене различитим дозама валпроата мерене су 5., 10., 15., 25. и 32. постнаталног дана (ПНД). Телесне тежине јединки за ПНД5, ПНД10 и ПНД15 обухватају и мужјаче и женке. Јединке су у каснијем периоду постнаталног развоја (ПНД21) раздвојене по половима у оквиру датих експерименталних група, тако да су за периадолесцентне

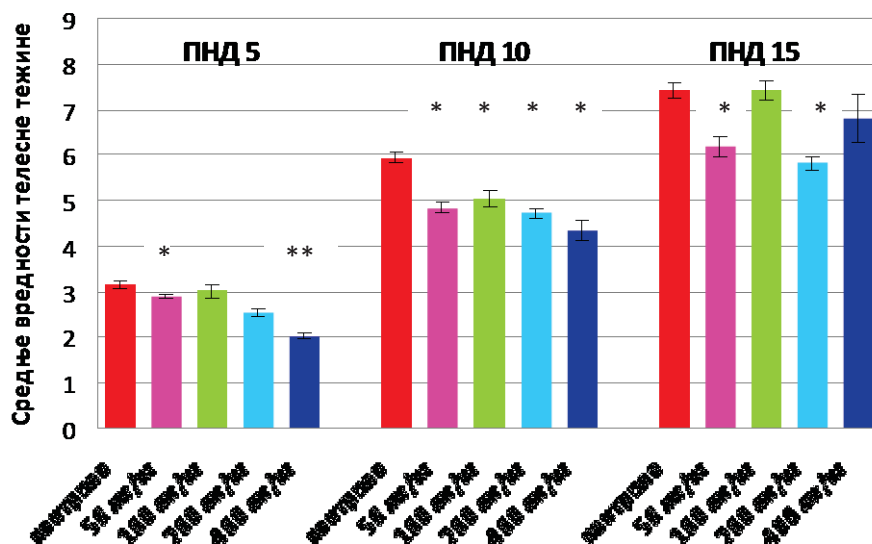
(ПНД25) и адолесцентне (ПНД32) јединке телесне тежине мужјака и женки приказане одвојено.

Телесна тежина у раном постнаталном периоду

Мерења извршена у ПНД5 су показала да је просечна телесна тежина контролних јединки $3,16 \pm 0,08$ г, док су просечне телесне тежине јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг биле редом: $2,89 \pm 0,05$ г, $3,01 \pm 0,14$ г, $2,54 \pm 0,08$ г, $2,04 \pm 0,05$ г (Графикон 2.). Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату значајно утицало на телесну тежину новорођених јединки у прва три мерења (ПНД5: $H(4, N=207)=44,699$, $p=0,001$; ПНД10: $H(4, N=199)=58,473$, $p=0,001$; ПНД15: $H(4, N=193)=49,231$, $p=0,001$). У ПНД5 значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је утврђена за третман валпроатом у дозама од 50 мг/кг ($*p<0,05$; U-test), 200 мг/кг и 400 мг/кг ($*p<0,01$; U-test).

Мерења извршена у ПНД10 су показала да је просечна телесна тежина контролних јединки $5,94 \pm 0,11$ г, док су просечне телесне тежине јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг редом: $4,85 \pm 0,13$ г, $5,04 \pm 0,17$ г, $4,72 \pm 0,11$ г, $4,34 \pm 0,21$ г (Графикон 2.). У ПНД10 значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је утврђена за све примењене дозе валпроата ($*p<0,01$; U-test).

Мерења извршена у ПНД15 су показала да је просечна телесна тежина контролних јединки $7,43 \pm 0,18$ г, док су просечне телесне тежине јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг редом: $6,21 \pm 0,22$ г, $7,41 \pm 0,23$ г, $5,82 \pm 0,14$ г, $6,81 \pm 0,53$ г (Графикон 2.). У ПНД15 значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је утврђена само за јединке које су током интраутериног развоја индиректно биле изложене валпроату у дозама од 50 мг/кг и 200 мг/кг ($*p<0,01$; U-test).



Графикон 2. Просечна телесна тежина јединки током раног постнаталног развоја. Мајке испитиваних јединки су током целокупног периода гестације биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

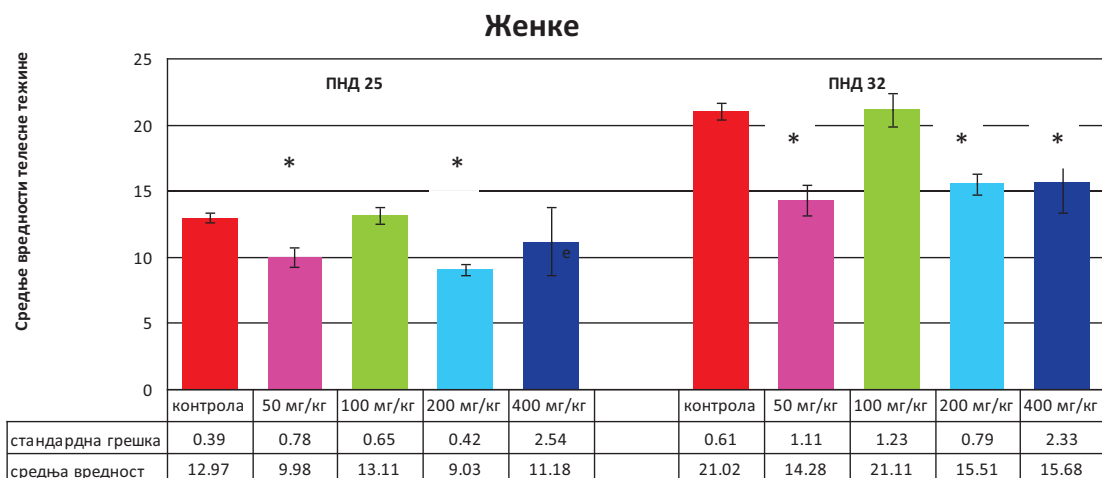
Телесна тежина у периадолесценцији и адолесценцији

Просечне телесне тежине женки измерене 25-тог и 32-ог ПНД су приказане на Графикону 3.

У ПНД25 просечна телесна тежина женки у контролној групи износила је $12,97 \pm 0,39$ г, док су просечне телесне тежине женки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг редом: $9,98 \pm 0,78$ г, $13,11 \pm 0,65$ г, $9,03 \pm 0,42$ г, $11,18 \pm 2,54$ г. Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату значајно утицало на телесну тежину потомства (женки) у ПНД25 ($H(4, N=97)=30,868, p=0.001$), а значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је утврђена за дозе валпроата од 50 мг/кг и 200 мг/кг (* $p<0,05$; U-test).

У ПНД32 просечна телесна тежина женки у контролној групи износила је $21,01 \pm 0,61$ г, док су просечне телесне тежине женки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг редом: $14,28 \pm 1,11$ г, $21,11 \pm$

1,23 г, $15,51 \pm 0,79$ г, $15,68 \pm 2,33$ г. Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату значајно утицало на телесну тежину потомства (женки) у ПНД32 ($H(4, N=97)=34,429, p=0.001$), а значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је утврђена за све примењене дозе валпроата осим за 100 мг/кг ($*p<0,05; U$ -test).



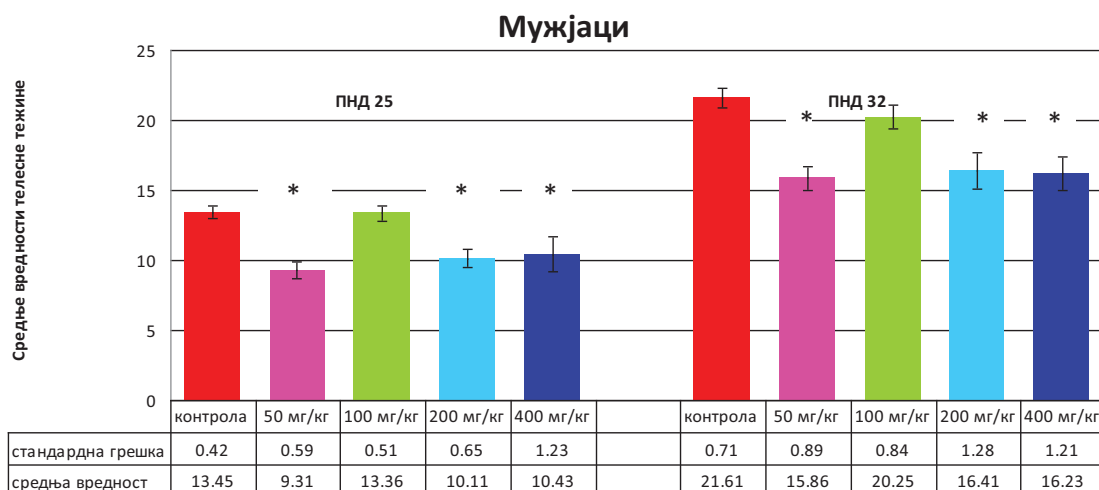
Графикон 3. Просечна телесна тежина женки током периадолесценције и ране адолесценције. Мајке испитиваних јединки су током целокупног периода гестације биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

Просечне телесне тежине мужјака измерене 25-тог и 32-ог ПНД су приказане на Графикону 4.

У ПНД25 просечна телесна тежина мужјака у контролној групи износила је $13,45 \pm 0,42$ г, док су просечне телесне тежине мужјака чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг биле редом: $9,31 \pm 0,59$ г, $13,36 \pm 0,51$ г, $10,11 \pm 2,54$ г, $10,43 \pm 1,23$ г. Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату значајно утицало на телесну тежину потомства (мужјака) у ПНД25 ($H(4, N=110)=35,703, p=0.001$), а значајна разлика у поређењу са контролним

вредностима је утврђена за све примењене дозе валпроата осим за 100 мг/кг (* $p < 0,05$; U-test).

У ПНД32 просечна телесна тежина мужјака у контролној групи износила је $21,61 \pm 0,71$ г, док су просечне телесне тежине мужјака чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг биле редом: $15,86 \pm 0,89$ г, $20,25 \pm 0,84$ г, $16,41 \pm 1,28$ г, $16,23 \pm 1,21$ г. Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату значајно утицало на телесну тежину потомства (мужјака) у ПНД32 ($H(4, N=110)=29,261$, $p=0.001$), а значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је утврђена за све примењене дозе валпроата осим за 100 мг/кг (* $p < 0,05$; U-test).



Графикон 4. Просечна телесна тежина мужјака током периадолесценције и ране адолесценције. Мајке испитиваних јединки су током целокупног периода гестације биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

4.2.2. Утицај интраутериног излагања валпроату на отворање очију потомства

третман	укупан број јединки	број јединки са оба ока не отворена ПНД15	број јединки са једним оком не отвореним ПНД15	број јединки са једним оком не отвореним ПНД15
физиолошки раствор (контрола)	91	/	2	89
валпроат, 50 мг/кг	47	27	3	17
валпроат, 100 мг/кг	42	30	2	10
валпроат, 200 мг/кг	36	24	2	10
валпроат, 400 мг/кг	31	21	4	6

Табела 3. Преглед бројчаног стања јединки са отвореним очима у ПНД15. Мајке испитиваних јединки су током целокупног периода гестације биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

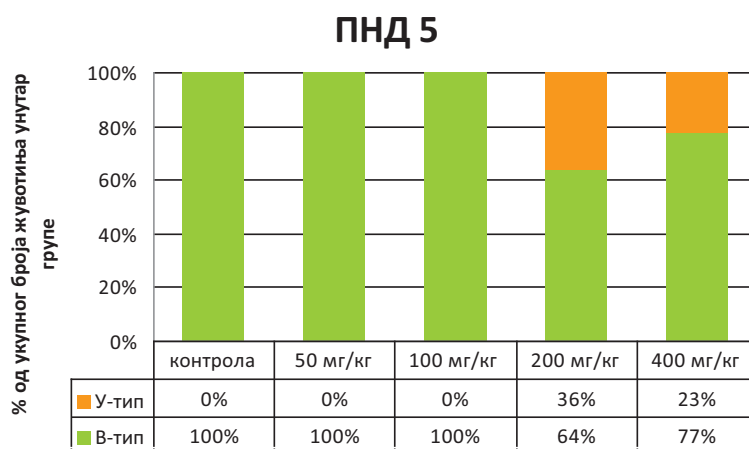
4.3. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту рефлекса усправљања

Контактна форма рефлекса усправљања је испитивана на јединкама миша чије су мајке током гестације биле изложене дејству различитих доза валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг). Прво тестирање је рађено у петом постнаталном дану

(ПНД5), након чега су јединке тестиране у ПНД10 и ПНД15. Сврха теста је била сагледавање евентуалног утицаја пренаталне изложености валпроату на интегритет визуелних, вестибуларних, тактилних и проприоцептивних функција, које су значајне за адекватан одговор на тест, сходно старости испитиване јединке (У-, В- или А-тип окрета, тј. усправљања).

4.3.1. Рефлекс усправљања јединки у петом постнаталном дану

У зависности од третмана које су мајке имале током гравидитета, код потомства су у ПНД5 детектоване две форме рефлекса усправљања: У-форма и В-форма (Графикон 5).

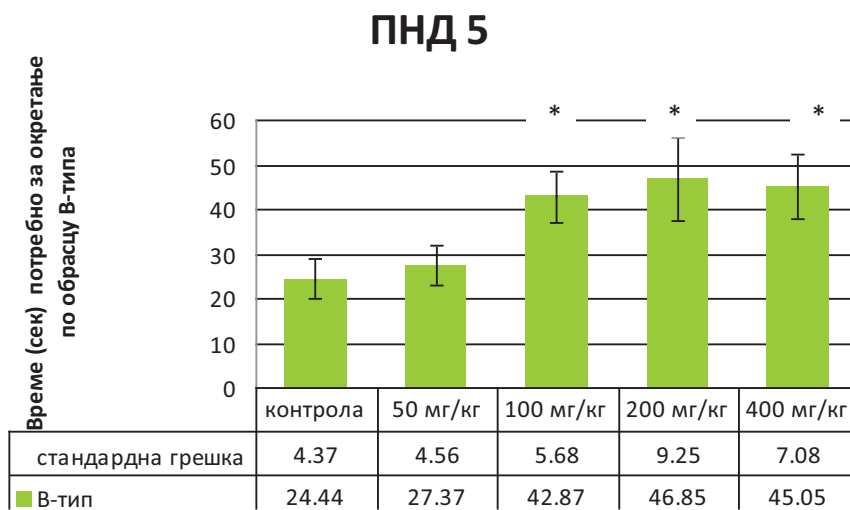


Графикон 5. Типови рефлекса усправљања јединки миша у ПНД5. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

У контролној групи је код свих јединки (n=47, 100%) уочен само В-тип усправљања, као и код животиња чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг (n=36, 100%) и 100 мг/кг (n=40, 100%). Међутим, пренатално излагање валпроату у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг је осим В-типа усправљања, који је детектован код 64% (n=23 од 36) и 77% (n=23 од 30) испитаних јединки у оквиру датих група, довео и до присуства У-типа усправљања код 36% (n=13) и 23% (n=7) јединки, редом (Графикон 5).

Анализом времена које је било потребно ПНД5 јединкама да изведу усправљање по В-обрасцу (Графикон 6) дошло се до закључка да је третман валпроатом током

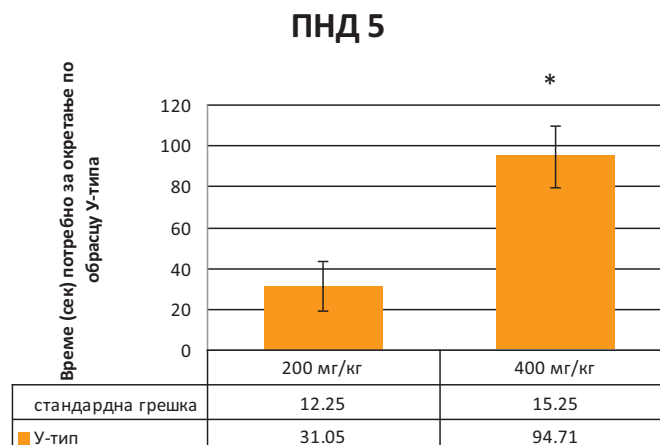
интраутериног развоја значајан фактор за брзину усправљања (тј. брзину окретања са леђа на стомак и постављање на ножице) у раном постнаталном развоју (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(4, N=169)=17,156, p=0,013$).



Графикон 6. Време потребно за усправљање по обрасцу В-типа јединкама миша у ПНД5. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

Уочено је да је у односу на време потребно јединкама из контролне групе (24.44 ± 4.37 сек) значајно више времена за усправљање по В-обрасцу било потребно јединкама које су биле изложене валпроату у дози од 100 мг/кг (42.87 ± 5.68 сек; $*p<0.05$, U-test), 200 мг/кг (46.85 ± 9.25 сек ; $*p<0.05$, U-test) и 400 mg/kg (45.05 ± 7.08 сек; $*p<0.05$, U-test). Јединке изложене валпроату у дози од 50 mg/kg су показале време које је незначајно одступало од оквира контролних вредности (27.37 ± 4.56 сек), али је значајно одступало од ефекта осталих доза валпроата (Графикон 6.; $*p<0.05$ у односу на 50 мг/кг).

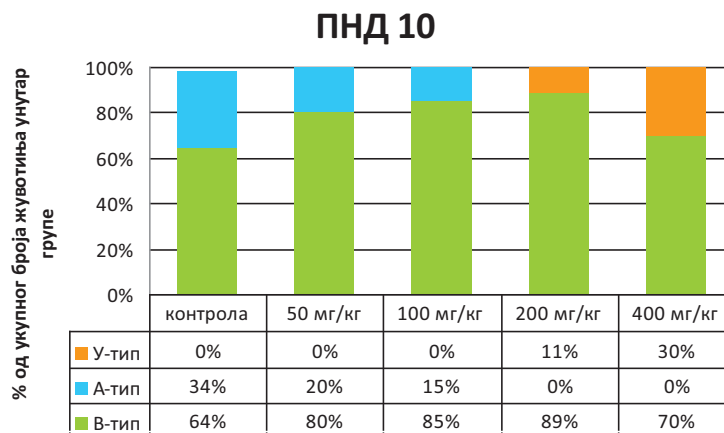
Када је у питању У-тип усправљања (Графикон 7.), статистичка анализа је показала да је знатно више времена за успешно обављање окретања било потребно јединкама чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 400 мг/кг (94.71 ± 15.25 сек, $*p<0.05$) у односу на јединке чије су мајке биле третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг (31.05 ± 12.25 сек). С обзиром да овај тип усправљања није детектован у контролној групи ПНД5 јединки, контролна група није ни представљена на графикону.



Графикон 7. Време потребно за усправљање по обрасцу У-типа јединкама миша у ПНД5. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране различитим дозама валпроата (200 мг/кг, 400 мг/кг).

4.3.2. Рефлекс усправљања јединки у десетом постнаталном дану

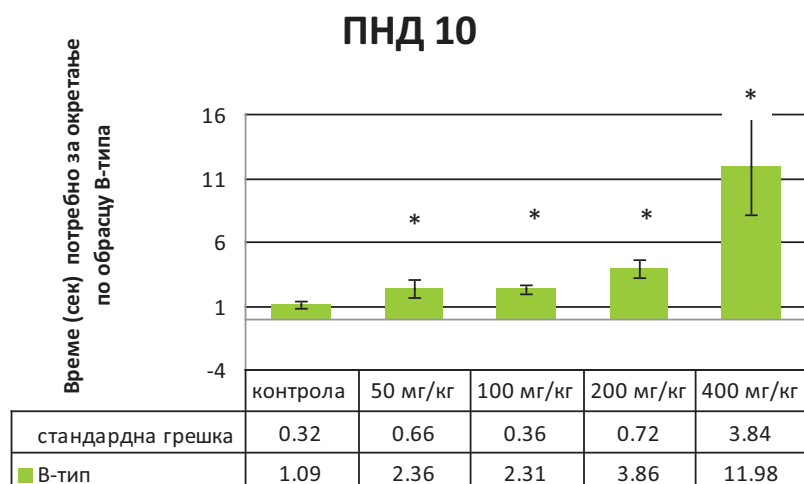
У зависности од третмана које су мајке имале током гравидитета, код потомства су у ПНД10 детектоване три форме рефлекса усправљања: У-форма, В-форма и А-форма (Графикон 8.). У контролној групи су уочене А-форма (34%) и В-форма (64%), као и код јединки чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг (А – 20%, В – 80 %) и 100 мг/кг (А – 15%, В – 85%). Код потомства чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг већински део потомства је имао В-форму усправљања (89% и 70%, редом), док је код одређеног броја јединки још увек био присутан У-тип усправљања (11% и 30%, редом; Графикон 8.).



Графикон 8. Типови рефлекса усправљања јединки миша у ПНД10. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

Поређење броја јединки (%) које су упражњавале У-тип окреатња, тј. усправљања, у ПНД5 (Графикон 5.) и ПНД10 (Графикон 8.) даје интересантне податке. Наиме, долази се до информације да се у групи јединки чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 200 мг/кг смањује број младунаца који се усправљају по У-обрасцу током неонаталног периода (ПНД5: 36%, ПНД10: 11%). Насупрот томе, у групи јединки чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 400 мг/кг број младунаца који се усправљају по У-обрасцу током неонаталног периода расте (ПНД5: 23%, ПНД10: 30%).

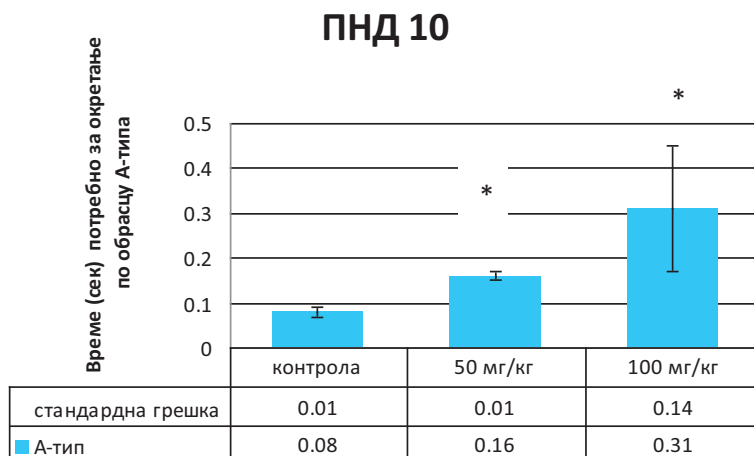
Анализом времена које је било потребно ПНД10 јединкама да изведу усправљање по В-обрасцу (Графикон 9.) дошло се до закључка да је третман валпроатом током интраутериног развоја значајан фактор за брзину усправљања у раном постнаталном развоју (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(4, N=141)=25,956$, $p=0,001$). Наиме, уочено је да је у односу на време потребно јединкама из контролне групе ($1,09 \pm 0,32$ сек) значајно више времена за усправљање по В-обрасцу било потребно јединкама које су биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг ($2,36 \pm 0,66$ сек, $*p<0.05$, U-test), 100 мг/кг ($2,31 \pm 0,36$ сек, $*p<0.05$, U-test), 200 мг/кг ($3,86 \pm 0,72$ сек, $*p<0.05$, U-test) и 400 мг/кг ($11,98 \pm 3,84$ сек; $*p<0.05$, U-test).



Графикон 9. Време потребно за усправљање по обрасцу В-типа јединкама миша у ПНД10. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

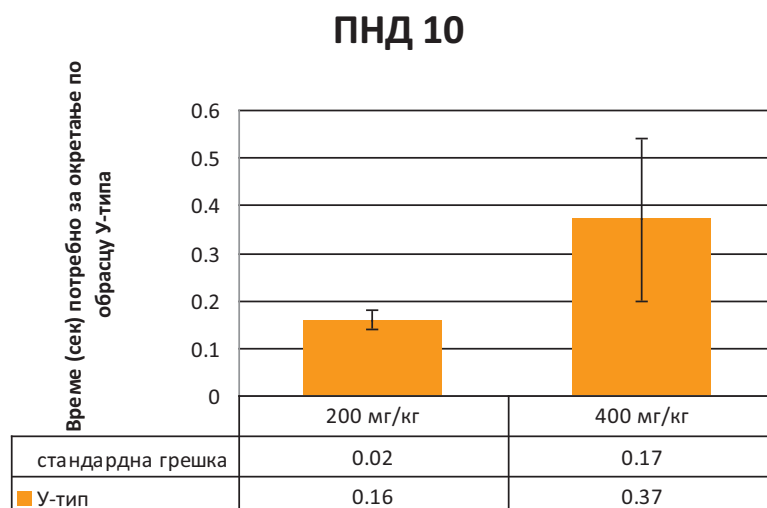
Поређењем ефекта различитих доза на В-тип усправљања ПНД10 животиња (Графикон 9.) статистички значајна разлика је утврђена за дозу од 400 мг/кг у поређењу са 50 мг/кг (* $p < 0.05$, U-test), 100 мг/кг (* $p < 0.05$, U-test) и 200 мг/кг (* $p < 0.05$, U-test).

Статистичка анализа временских профила који су били потребни ПНД10 јединкама да се усправе по А-обрасцу (Графикон 10.) је показала да пренатално излагање валпроату значајно утиче на овај параметар (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(2, N=29)=16,706$, $p=0,001$). У односу на временски оквир који су показале јединке из контролне групе ($0,08 \pm 0,01$ сек) животињама чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг и 100 мг/кг је требало дупло ($0,16 \pm 0,01$ сек) и 3 пута више времена ($0,31 \pm 0,14$ сек), редом (Графикон 10, * $p < 0.05$, U-test). Значајна разлика у ефекту између две наведене дозе није уочена за дати параметар.



Графикон 10. Време потребно за усправљање по обрасцу А-типа јединкама миша у ПНД10. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг).

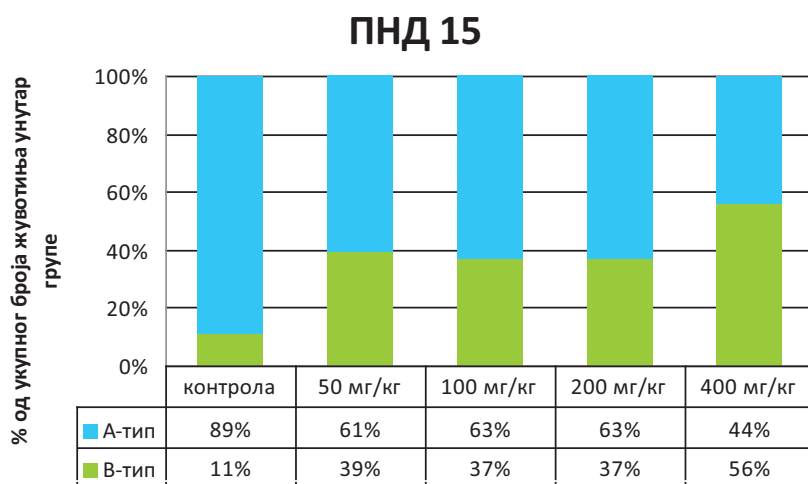
За У-тип усправљања, који је у ПНД10 детектован код одређеног броја јединки чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг (Графикон 11.), није уочена статистички значајна разлика у времену потребном за обављање рефлекса ($0,16 \pm 0,02$ сек и $0,37 \pm 0,17$ сек, редом; $*p=0.086$).



Графикон 11. Време потребно за усправљање по обрасцу У-типа јединкама миша у ПНД10. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг).

4.3.3. Рефлекс усправљања јединки у петнаестом постнаталном дану

У зависности од третмана које су мајке имале током гравидитета, код потомства су у ПНД15 детектоване две форме рефлекса усправљања: А-форма и В-форма (Графикон 12.).

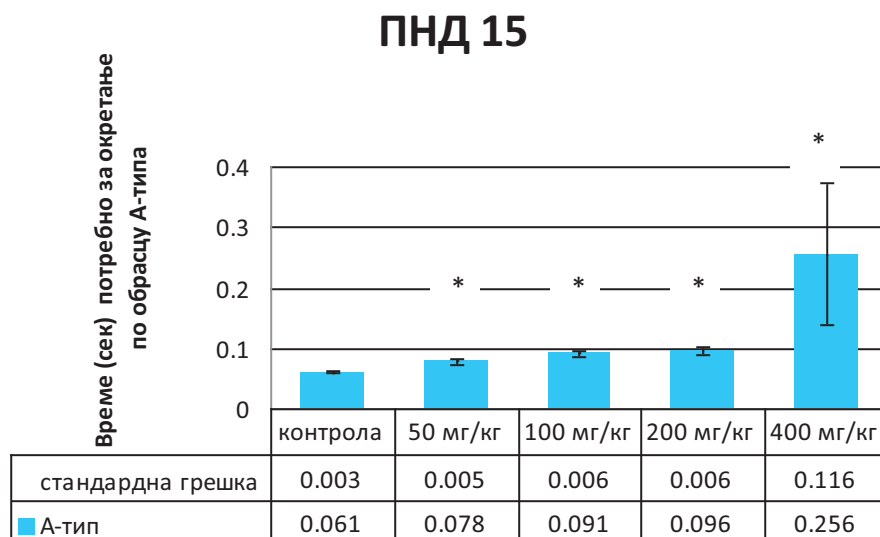


Графикон 12. Типови рефлекса усправљања јединки миша у ПНД15. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

У контролној групи је код већег броја јединки уочена А-форма (89%), док је В-форма усправљања уочена код мањег броја (11%). У групама јединки чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг је у односу на контролну групу дошло до смањеног усправљања по А-обрасцу (61%, 63% и 63%, редом), као и до повећаног усправљања по В-обрасцу (39%, 37% и 37%, редом; Графикон 12.). Промене су биле најизразитије у групи јединки код јединки чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 400 мг/кг (А – 44%, В – 56%; Графикон 12.).

Анализом времена које је било потребно ПНД15 јединкама да изведу усправљање по А-обрасцу (Графикон 13.) дошло се до закључка да је третман валпроатом током

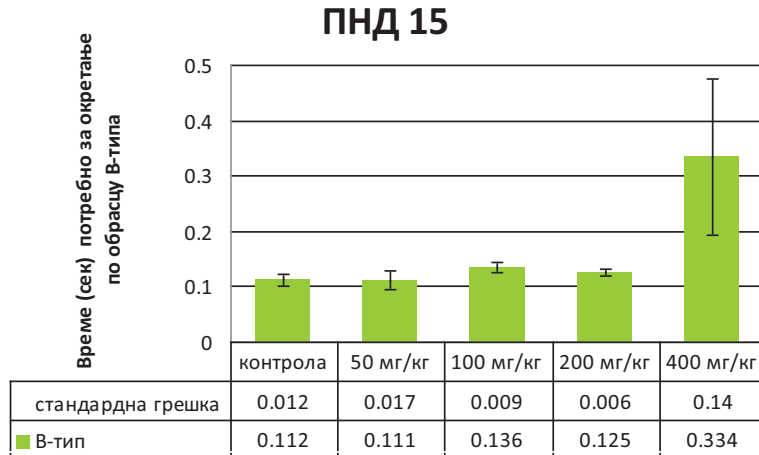
интраутериног развоја значајан фактор за брзину усправљања у раном постнаталном развоју (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(4, N=117)=44,767, p=0,001$).



Графикон 13. Време потребно за усправљање по обрасцу А-типа јединкама миша у PND15. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg).

У односу на време потребно јединкама из контролне групе ($0,061 \pm 0,003$ sec) значајно више времена за усправљање по А-обрасцу је било потребно јединкама чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг ($0,078 \pm 0,005$ сек; $*p < 0.05$, U-test), 100 мг/кг ($0,091 \pm 0,006$ сек; $*p < 0.05$, U-test), 200 мг/кг ($0,096 \pm 0,006$ сек; $*p < 0.05$, U-test) и 400 мг/кг ($0,256 \pm 0,116$ сек; $*p < 0.05$, U-test, Графикон 13.). У односу на време које су показале животиње чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг значајне разлике су детектоване у групама јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг (Графикон 13., $*p < 0.05$, U-test). Јединке које су индиректно биле изложене валпроату у дози од 400 мг/кг показале су и значајно спорије усправљење по А-обрасцу и у поређењу са животињама чије су мајке третиране валпроатом у дози од 100 мг/кг ($*p < 0.05$, U-test) и 200 мг/кг ($*p < 0.05$, U-test).

Статистичка анализа је показала да третман валпроатом током интраутериног развоја није значајан фактор за брзину усправљања у ПНД15 по В-обрасцу (Графикон 14.; Kruskal-Wallis ANOVA: $H(4, N=64)=4,854$ $p=0,302$).



Графикон 14. Време потребно за усправљање по обрасцу В-типа јединкама миша у ПНД15. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

4.4. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту качења јединке о реп

Младе јединке, чије су мајке биле третиране различитим дозама валпроата током гестације, су испитиване у тесту качења о реп 5., 10. и 15. постнаталног дана (ПНД). У тесту је мерено време од почетка качења јединке о реп до потпуног одсуства покрета (латенца), односно по момента када јединка постане имобилна.

4.4.1. Време до појаве имобилности јединки у петом постнаталном дану

Резултати добијени у тесту качења о реп на ПНД5 јединкама су приказани у Табели 4. Најдужа просечна латенца (од момента качења јединке о реп до потпуног престанка активности) регистрована је у контролној групи и износила је $117,7 \pm 8,5$ сек. Просечне латенце код младунаца чије су мајке биле третиране током гестације валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг биле су редом: $112,3 \pm 9,1$ сек, $108,2 \pm 10,1$ сек,

60,1 ± 10,3 сек, 68,6 ± 12,1 сек. Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату значајно утицало на резултат који је потомство у 5 показало у тесту качења о реп (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(4, N=181)=28,683, p=0,001$). Значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је утврђена код јединки које су у току интраутериног развоја индиректно биле изложене валпроату у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг ($p<0,05$; U-test).

третман током гестације	временски период (сек) од качења животиње о реп до појаве имобилности (латенца)		ст. значајност (p) у поређењу са контролом
	средња вредност	стандардна грешка	
физиолошки раствор (контрола)	117,7	8,5	/
валпроат, 50 мг/кг	112,3	9,1	/
валпроат, 100 мг/кг	118,2	10,1	/
валпроат, 200 мг/кг	60,1	10,3	0,001
валпроат, 400 мг/кг	68,6	12,1	0,001

Табела 4. Временски период до појаве имобилности јединки старих пет постнаталних дана у тесту качења о реп. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

4.4.2. Време до појаве имобилности јединки у десетом постнаталном дану

Испитивањем јединки старих 10 дана (ПНД10) у тесту качења о реп добијене су вредности латенце, које су представљене у Табели 5. У контролној групи латенца је износила $140,4 \pm 7,4$ сек, док су у групама чије су мајке током гестације биле третиране

валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг измерене следеће вредности латенци (редом): $118,2 \pm 9,1$ сек, $126,6 \pm 8,1$ сек, $102,6 \pm 9,1$ сек и $113 \pm 10,1$ сек.

Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату значајно утицало на резултат који је потомство у ПНД5 показало у тесту качења о реп (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(4, N=181)=9,531$, $p=0.049$). Значајна разлика у поређењу са контролним вредностима је, као и у ПНД5, утврђена код јединки које су у току интраутериног развоја биле индиректно изложене валпроату у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг ($p<0,05$; U-test).

третман током гестације	временски период (сек) од качења животиње о реп до појаве имобилности (латенца)		ст. значајност (p) у поређењу са контролом
	средња вредност	стандардна грешка	
физиолошки раствор (контрола)	140,4	7,4	/
валпроат, 50мг/кг	118,2	9,1	/
валпроат, 100 мг/кг	126,6	8,1	/
валпроат, 200 мг/кг	102,6	9,1	0,05
валпроат, 400 мг/кг	113,6	10,1	0,05

Табела 5. Временски период до појаве имобилности јединки старих десет постнаталних дана у тесту качења о реп. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

4.4.3. Време до појаве имобилности јединки у петнаестом постнаталном дану

Јединке су петнаестог постнаталног дана (ПНД15) по трећи пут тестиране у тесту качења о реп и вредности просечних латенци за дате групе приказане су у Табели 6. У контролној групи латенца је износила $151,5 \pm 7,9$ сек, док су у групама чије су мајке током

гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг измерене следеће вредности латенци (редом): $159,9 \pm 5,2$ сек, $155,7 \pm 6,1$ сек, $154,1 \pm 8,1$ сек и $153 \pm 9,4$ сек.

Статистичка анализа података је показала да је излагање мајки валпроату није значајно утицало на резултат који је потомство у ПНД15 показало у тесту качења о реп.

третман током гестације	временски период (сек) од качења животиње о реп до појаве имобилности (латенца)		ст. значајност (p) у поређењу са контролом
	средња вредност	стандардна грешка	
физиолошки раствор (контрола)	151,5	7,9	/
валпроат, 50 мг/кг	159,9	5,2	/
валпроат, 100 мг/кг	155,7	6,1	/
валпроат, 200 мг/кг	154,1	8,1	/
валпроат, 400 мг/кг	153,5	9,4	/

Табела 6. Временски период до појаве имобилности јединки старих петнаест постнаталних дана у тесту качења о реп. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

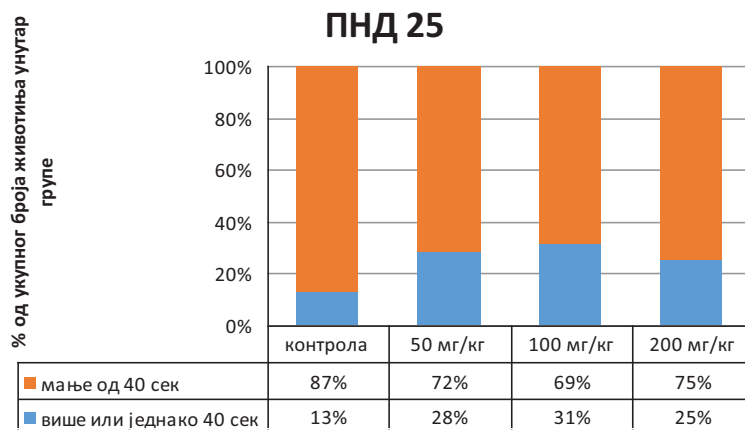
4.5. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту излагања топлој плочи

На потомству мајки које су третиране током гестације различитим дозама валпроата је испитивана реакција на болни (топлотни) стимулус, у тесту излагања топлој

плочи. Јединке (мужјаци и женке, одвојено) су испитиване у ПНД25, а затим су исте јединке тестиране и ПНД32. Тест је био „успешан“ уколико су јединке одговориле одизањем задње шапе са топле плоче за мање од 40 сек, укључујући и реакцију отресања задње шапе. У случају да јединка на тесту не одговори одизањем и отресањем шапе у периоду од 40 сек, тестирање се прекидало.

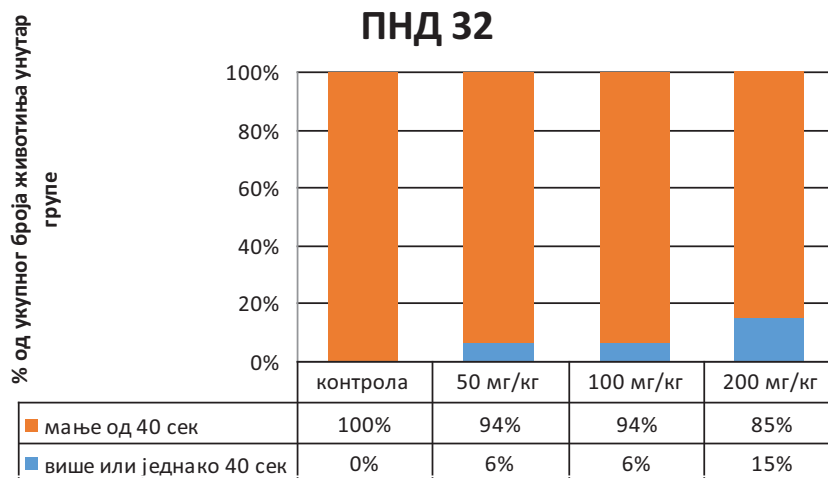
4.5.1. Утицај третмана на квалитет одговора

Резултати добијени мерењем времена које је женкама (ПНД25) било потребно да одигну задњу шапу од момента стављања на топлу плочу приказани су на Графикону 15. У контролној групи 13% женки (5 јединки од укупно 38 тестираних) није адекватно одговорило на тест, тј. нису одигле задњу шапу у периоду од 40 сек. У групама женки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг проценат јединки које нису адекватно одговориле на тест је био, редом: 28% (5 од укупно 18), 31% (5 од укупно 17) и 25% (5 од укупно 20).



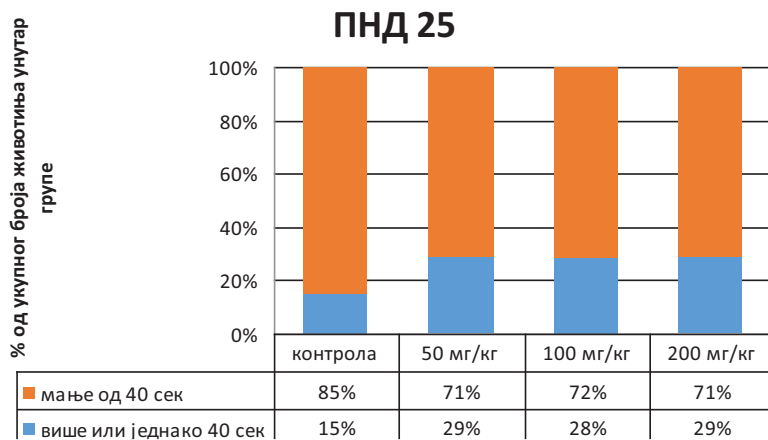
Графикон 15. Временски период до одизања задње шапе женки миша старости 25 дана (ПНД25) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

Друго тестирање на топлој плочи је изведено на истим јединкама у ПНД32 (Графикон 16). У контролној групи женки све јединке су отресле задњу шапу за мање од 40 сек, док је у групама женки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг проценат јединки које нису адекватно одговориле на тест био, редом: 6% (1 женка од укупно 18), 6% (1 од укупно 17 женки) и 15% (3 женке од укупно 20).



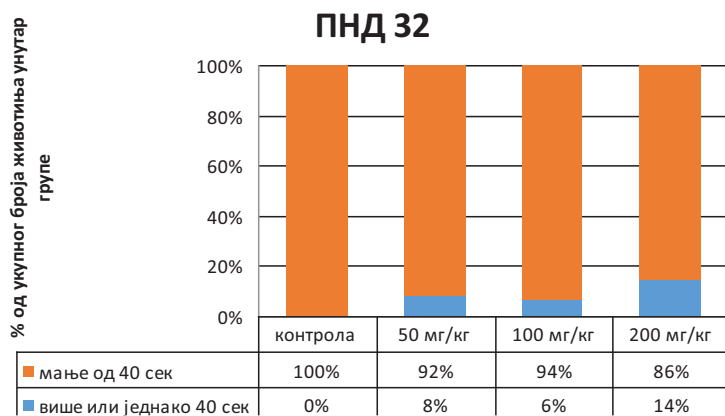
Графикон 16. Временски период до одизања задње шапе женки миша старости 32 дана (ПНД32) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

На Графикону 17 приказани су резултати добијени тестирањем мужјака на топлој плочи. У ПНД25 у контролној групи 15% мужјака (7 од укупно 48 тестираних) није отресло задњу шапу током 40 сек. У групама мужјака чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг проценат јединки које нису адекватно одговориле на тест је био, редом: 29% (7 од укупно 24), 28% (5 од укупно 18) и 29% (4 од укупно 14).



Графикон 17. Временски период до одизања задње шапе мужјака миша старости 25 дана (ПНД25) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

Резултати добијени тестирањем мужјака на топлој плочи у ПНД32 приказани су на Графикону 18. У контролној групи мужјака у ПНД32 није било јединки које нису одговориле отресањем задње шапе током 40 сек (Графикон 18). У групама мужјака чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг проценат јединки које нису адекватно одговориле на тест је био, редом: 8% (2 од укупно 24), 6% (1 од укупно 18) 14% (2 од укупно 14).



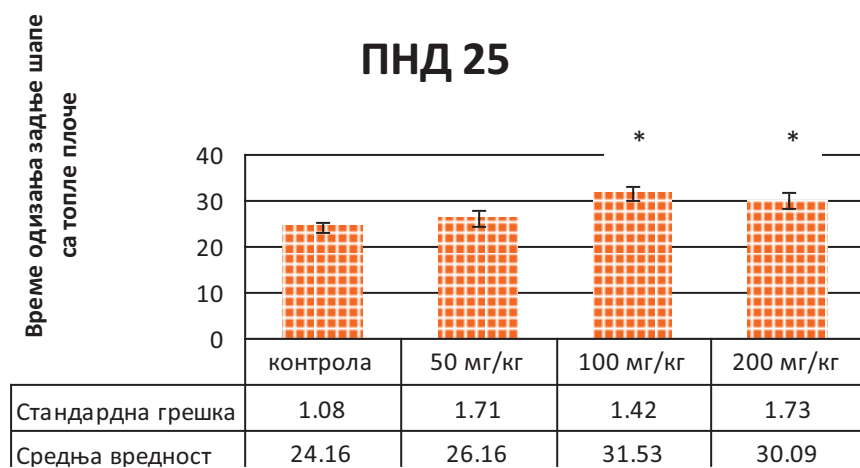
Графикон 18. Временски период до одизања задње шапе мужјака миша старости 32 дана (ПНД32) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

4.5.2. Утицај третмана на квантитативне карактеристике одговора јединки које су адекватно одреаговале за мање од 40 сек

Детаљна статистичка анализа квантитативних карактеристика одговора јединки у тесту излагања топлој плочи је рађена на јединкама које су и у првом и у другом тестирању одговориле за мање од 40 сек.

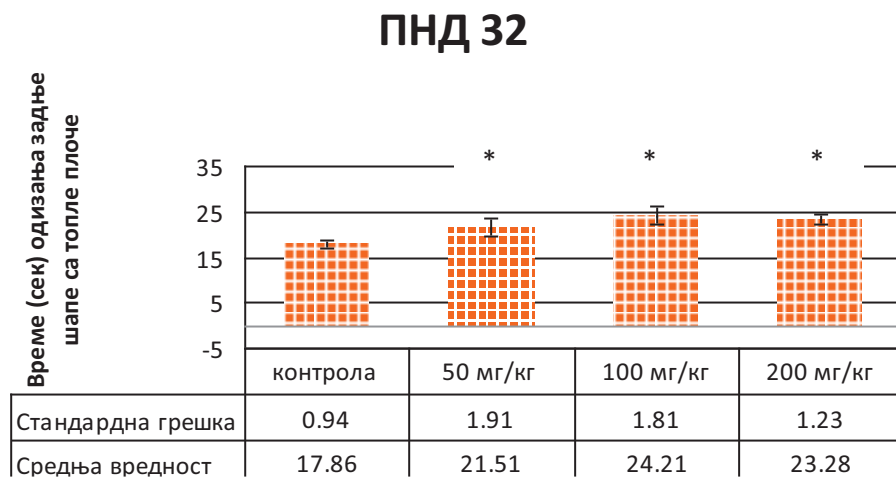
Време реакције женки у ПНД25 и ПНД32

Просечно време реакције у тесту излагања топлој плочи за јединке женског пола у ПНД25 је приказано на Графикону 19. Статистичка анализа података је потврдила да је излагање мајки током гестације валпроату значајно утицало на време реакције потомства женског пола (ПНД25) у тесту (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(3, N=72)=14,621$, $p=0,002$). Значајно одступање у односу на контролне вредности ($24,16 \pm 1,08$ сек) је показано за групе животиња које су индиректно биле изложене валпроату у дози од 100 мг/кг ($31,53 \pm 1,42$ сек, $*p<0.05$, U-test) и 200 мг/кг ($30,09 \pm 1,73$ сек, $*p<0.05$, U-test), али не и дози од 50 мг/кг ($26,16 \pm 1,71$ сек, Графикон 19). Значајна разлика у одговору је утврђена и поређењу група које су индиректно биле изложене валпроату у дозама од 50 мг/кг и 100 мг/кг ($*p<0.05$, U-test).



Графикон 19. Временски период до одизања задње шапе женки миша старости 25 дана (ПНД25) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

Просечно време реакције у тесту излагања топлој плочи за јединке женског пола у ПНД32 је приказано на Графикону 20. Статистичка анализа података је потврдила да је излагање мајки током гестације валпроату значајно утицало на време реакције потомства женског пола (ПНД32) у тесту (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(3, N=72)=14,469$, $p=0,002$).



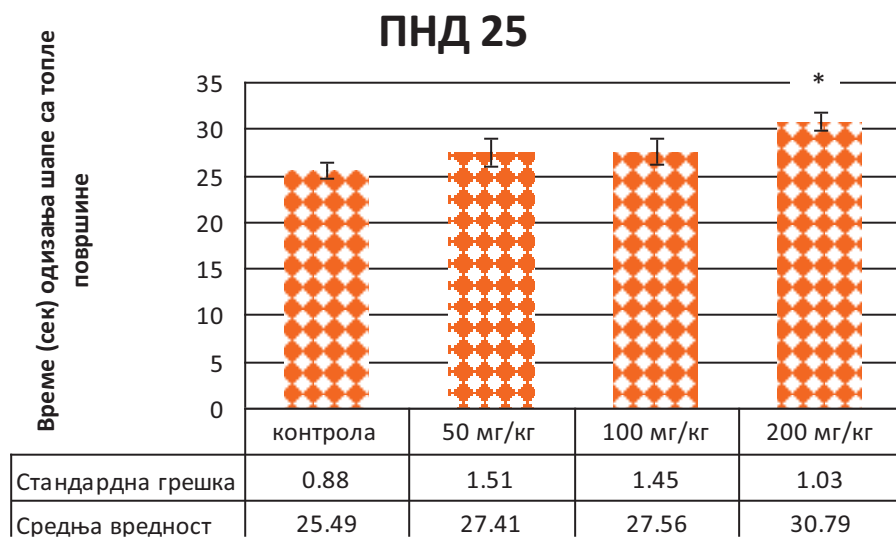
Графикон 20. Временски период до одизања задње шапе женки миша старости 32 дана (ПНД32) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

Значајно одступање у односу на контролне вредности ($17,86 \pm 0,94$ сек) је показано за групе животиња које су индиректно биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг ($21,51 \pm 1,91$ сек, $*p<0.05$, U-test), 100 мг/кг ($24,21 \pm 1,81$ сек, $*p<0.05$, U-test) и 200 мг/кг ($23,28 \pm 1,23$ сек, $*p<0.05$, U-test). Значајна разлика у ефекту самих доза није показана (Графикон 20).

Време реакције мужјака у ПНД25 и ПНД32

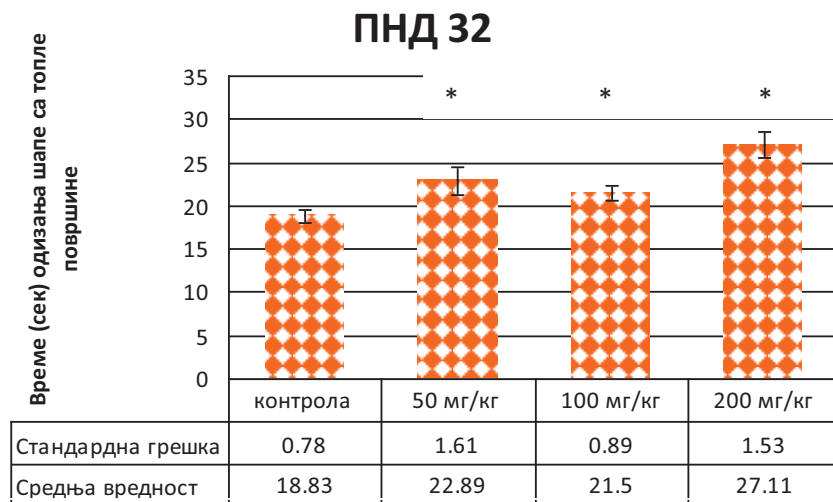
Просечно време реакције у тесту излагања топлој плочи за јединке мушког пола у ПНД25 је приказано на Графикону 21. Статистичка анализа података је потврдила да је излагање мајки током гестације валпроату значајно утицало на време реакције потомства мушког пола (ПНД25) у тесту (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(3, N=83)=7,952$, $p=0,047$). Значајно одступање у односу на контролне вредности ($25,49 \pm 0,88$ сек) је показано за

групе животиња које су индиректно биле изложене валпроату у дози од 200 мг/кг ($30,79 \pm 1,03$ сек, $*p < 0.05$, U-test), али не и дозама од 50 мг/кг ($27,41 \pm 1,51$ сек) и 100 мг/кг ($27,56 \pm 1,45$ сек; Графикон 21). Значајна разлика у ефекту самих доза није показана.



Графикон 21. Временски период до одизања задње шапе мужјака миша старости 25 дана (ПНД25) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

Просечно време реакције у тесту излагања топлој плочи за јединке мушког пола у ПНД32 је приказано на Графикону 22. Статистичка анализа података је потврдила да је излагање мајки током гестације валпроату значајно утицало на време реакције потомства мушког пола (ПНД25) у тесту (Kruskal-Wallis ANOVA: $H(3, N=83)=17,536$, $p=0,001$). Значајно одступање у односу на контролне вредности ($18,83 \pm 0,78$ сек) је показано за групе животиња које су индиректно биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг ($22,89 \pm 1,61$ сек, $*p < 0.05$, U-test), 100 мг/кг ($21,5 \pm 0,89$ сек, $*p < 0.05$, U-test) и 200 мг/кг ($27,11 \pm 1,53$ сек, $*p < 0.05$, U-test). Значајна разлика у одговору је утврђена и поређењу група које су индиректно биле изложене валпроату у дозама од 50 мг/кг и 200 мг/кг ($*p < 0.05$, U-test), као и 100 мг/кг и 200 мг/кг ($*p < 0.05$, U-test).



Графикон 22. Временски период до одизања задње шапе мужјака миша старости 32 дана (ПНД32) са топле плоче. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг , 100 мг/кг, 200 мг/кг).

4.5.3. Утицај третмана на квантитативне карактеристике одговора јединки које су адекватно одреаговале за више од 40 сек

Животиње које су и у првом и у другом тестирању одговориле за више или једнако 40 сек су искључене из даље анализе. Просечна времена реакције у тесту топле плоче за јединке које су у првом тесту (ПНД25) одговориле за више или једнако 40 сек а у другом тесту (ПНД32) за мање од 40 сек су представљена у Табели 7 (женке) и Табели 8 (мужјаци). Број животиња у контролној и групама чије су мајке биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, и који је на овакав начин одговорио, је у групи женки био (редом) 13%, 14%, 24% и 10%, а у групи мужјака 15%, 21%, 22%, 14%.

ПНД 25		ПНД 32	
Третман	Време реакције на топлотни стимулус	Третман	Време реакције на топлотни стимулус
физиолошки раствор (контрола)	≥ 40 сек	физиолошки раствор (контрола)	28.94 \pm 3.02 сек
50 мг	≥ 40 сек	50 мг	25.40 \pm 1.94 сек
100 мг	≥ 40 сек	100 мг	27.38 \pm 3.95 сек
200 мг	≥ 40 сек	200 мг	27.61 \pm 1.44 сек

Табела 7. Временски период до одизања задње шапе јединки женског пола са топле плоче. Јединке су тестиране прво у ПНД25 а затим у ПНД32. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

Статистичком анализом података је показано да код животиња које су у првом тестирању (ПНД25) одговориле за више или једнако 40 сек а у другом тестирању (ПНД32) за мање од 40 сек не постоји значајан утицај третмана валпроатом током интраутериног развија на време реакције у другом тестирању (женке: Kruskal-Wallis ANOVA: $H(3, N=16)=0,959$, $p=0,811$; мушјаци: Kruskal-Wallis ANOVA: $H(3, N=16)=2,751$, $p=0,432$).

ПНД 25		ПНД 32	
Третман	Време реакције на топлотни стимулус	Третман	Време реакције на топлотни стимулус
физиолошки раствор (контрола)	≥ 40 сек	физиолошки раствор (контрола)	24.56 \pm 3.96 сек
50 мг	≥ 40 сек	50 мг	25.53 \pm 3.95 сек
100 мг	≥ 40 сек	100 мг	22.91 \pm 3.82 сек
200 мг	≥ 40 сек	200 мг	28.03 \pm 3.83 сек

Табела 8. Временски период до одизања задње шапе јединки мушког пола са топле плоче. Јединке су тестиране прво у ПНД25 а затим у ПНД32. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг).

4.6. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту уздигнутог крстастог лавиринта

Резултати добијени у тесту уздигнутог лавиринта на контролним и животињама чије су мајке током трудноће биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг су приказани табеларно.

Тестирањем потомства мушког пола у 35. постнаталном дану (ПНД35) добијени су резултати приказани у Табели 9. Детаљна статистичка анализа података је указала да је интраутерино излагање валпроату значајно утицало на број улазака у отворене краке лавиринта ($H(4, N=52)=13,435$ $p=0.009$), време боравка у отвореним крацима лавиринта ($H(4, N=52)=16,491$, $p=0.002$), време боравка у затвореним крацима лавиринта ($H(4, N=52)=12,237$, $p=0.016$), нагињање преко ивица отворених кракова лавиринта ($H(4, N=52)=13,951$, $p=0.008$) и истезање животиње ($H(4, N=52)=11,743$, $p=0.019$). Значајно мањи број улазака у отворене краке, значајно краће време боравка у отвореним крацима,

значајно дуже време боравка у затвореним крацима и значајно мање нагињања преко ивица отворених кракова лавиринта је показало потомство мушког пола чије су мајке током трудноће биле третиране валпроатом у дози од 400 мг/кг (Табела 9., * $p < 0.05$, U-test). Значајно краће време боравка у отвореним крацима и значајно дуже време боравка у затвореним крацима је утврђено и код животиња чије су мајке током трудноће биле третиране валпроатом у дози од 100 мг/кг (Табела 9., * $p < 0.05$, U-test). Код животиња чије су мајке током трудноће биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг је детектовано интензивније истезање у односу на контролну групу (Табела 9., * $p < 0.05$, U-test).

Тестирањем потомства женског пола у 35. постнаталном дану (ПНД35) добијени су резултати приказани у Табели 10. Детаљна статистичка анализа података је указала да је интраутерино излагање валпроату значајно утицало на број улазака у отворене краке лавиринта ($H(4, N=42)=16,095$ $p=0.003$), време боравка у отвореним крацима лавиринта ($H(4, N=42)=14,341$ $p=0.006$), време боравка у затвореним крацима лавиринта ($H(4, N=42)=11,852$ $p=0.018$), нагињање преко ивица отворених кракова лавиринта ($H(4, N=42)=15,056$ $p=0.005$) и истезање животиња ($H(4, N=42)=19,016$ $p=0.001$). Значајно већи број улазака у отворене краке, значајно дуже време боравка у отвореним крацима, значајно краће време боравка у затвореним крацима и значајно више нагињања је детектовано код потомства женског пола чије су мајке током трудноће биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг (Табела 10., * $p < 0.05$, U-test). Код група јединки чије су мајке током трудноће биле третиране валпроатом у дози од 100 мг/кг и 200 мг/кг ни у једном од испитиваних параметара није било значајних одступања у односу на контролне вредности. Код јединки чије су мајке током трудноће биле третиране валпроатом у дози од 400 мг/кг разлика у односу на контролну групу је утврђена само у истезању, и то у смислу значајног смањења (Табела 10., * $p < 0.05$, U-test).

tretman	ulazak u otvoreni krak	ulazak u zatvoreni krak	vreme boravka u otv. kr.	vreme boravka u zatv. kr.	vreme boravka u centru	uspinjane	naginjane	istezanje	timarenje
fiz.rastvor (kontrola)	5 ± 1	8 ± 1	75 ± 17	123 ± 16	102 ± 13	23 ± 3	29 ± 6	65 ± 4	11 ± 3
valproat, 50 mg/kg	8 ± 1	9 ± 1	93 ± 15	114 ± 13	93 ± 10	22 ± 3	29 ± 4	85 ± 5 *	11 ± 2
valproat, 100 mg/kg	3 ± 1	11 ± 1	24 ± 3 *	177 ± 14*	99 ± 14	29 ± 3	22 ± 2	67 ± 6	26 ± 10
valproat, 200 mg/kg	4 ± 1	8 ± 1	54 ± 17	153 ± 23	93 ± 17	19 ± 6	18 ± 6	73 ± 6	11 ± 4
valproat, 400 mg/kg	2 ± 1*	11 ± 1	17 ± 6 *	179 ± 14*	104 ± 14	21 ± 5	9 ± 1*	55 ± 8	27 ± 14

Табела 9. Параметри понашања јединки мушког пола у тесту уздигнутог лавиринта. Јединке су тестиране у ПНД35. Регистрациони период је трајао 5 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

tretman	ulazak u otvoreni krak	ulazak u zatvoreni krak	vreme boravka u otv. kr.	vreme boravka u zatv. kr.	vreme boravka u centru	uspinjane	naginjane	istezanje	timarenje
fiz.rastvor (kontrola)	5 ± 1	11 ± 2	57 ± 11	157 ± 18	85 ± 10	30 ± 5	21 ± 3	89 ± 12	14 ± 4
valproat, 50 mg/kg	9 ± 1*	9 ± 1	114 ± 15*	98 ± 15*	87 ± 11	24 ± 3	33 ± 5*	87 ± 4	8 ± 2
valproat, 100 mg/kg	3 ± 1	9 ± 1	39 ± 12	163 ± 12	99 ± 7	24 ± 4	16 ± 2	60 ± 6	16 ± 5
valproat, 200 mg/kg	4 ± 0	9 ± 1	48 ± 9	161 ± 9	91 ± 10	22 ± 3	16 ± 2	80 ± 3	24 ± 7
valproat, 400 mg/kg	3 ± 1	7 ± 2	69 ± 23	140 ± 14	91 ± 12	21 ± 4	13 ± 2	44 ± 3*	14 ± 3

Табела 10. Параметри понашања јединки женског пола у тесту уздигнутог лавиринта. Јединке су тестиране у ПНД35. Регистрациони период је трајао 5 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг).

4.7. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту отвореног поља

Тест отвореног поља је рађен са циљем да се утврде евентуалне промене у моторној и експлораторној активности животиња услед интраутериног излагања

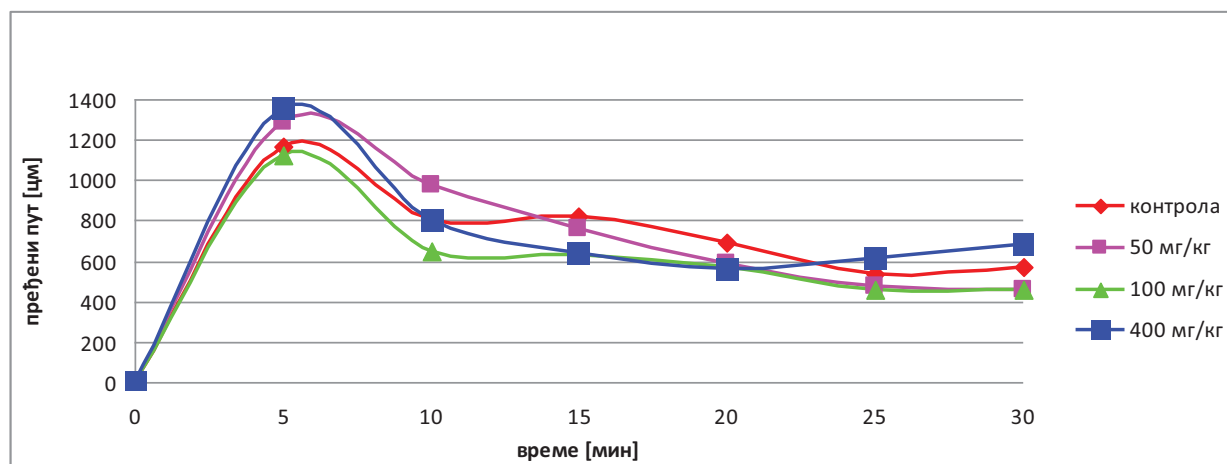
валпроату (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг телесне тежине мајке). С обзиром да није утврђен значајан утицај дозе валпроата од 200 мг/кг на понашање у тесту уздигнутог лавиринта, последице примене ове дозе нису испитиване у тесту отвореног поља.

Мужјаци и женке су тестирани одвојено. Резултати су представљени кроз промене у локомоторној, стереотипној и вертикалној активности животиња, као временски-зависни профили и тотална активност за испитивани временски период.

4.7.1. Моторичка активност мужјака у тесту отвореног поља

Локомоторна активност

Временски-зависни профили промена у локомоторној активности контролних и животиња чије су мајке током гестације биле изложене валпроату приказан је на Графикону 23.



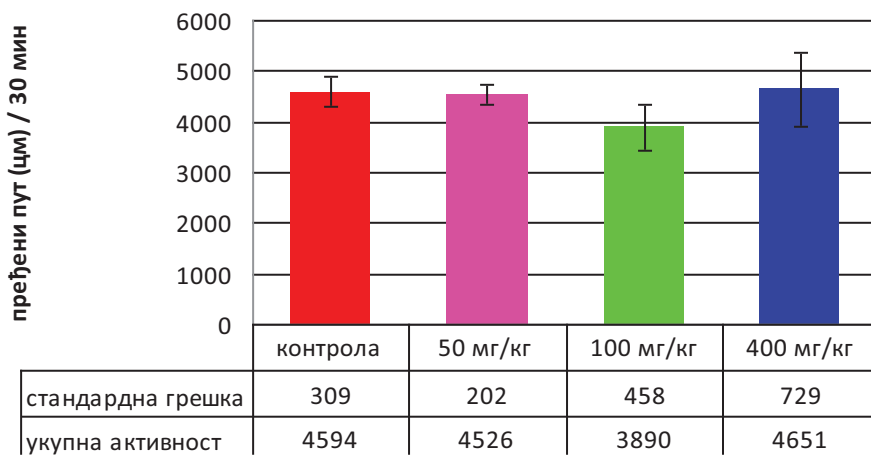
Графикон 23. Временски профил промена у локомоторној активности мужјака старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Током регистрационог периода од 30 мин све групе животиња су показале смањење у интензитету локомоторне активности. Статистичка анализа (Friedman ANOVA) је потврдила да је време боравка у експерименталном кавезу значајан фактор за испољавање интензитета локомоторне активности (контролна група: (N=15, df=5)=19,984 $p < 0,001$; валпроат 50 мг/кг: (N=15, df=5)=76,862 $p < 0,001$; валпроат 100 мг/кг: (N=15, df=5)=30,346 $p < 0,001$; валпроат 400 мг/кг: (N=15, df=5)=14,429 $p < 0,013$). Најинтезивнији моторни одговор је забележен у првих 5 min регистрационог периода и у односу на ове вредности код свих експерименталних група је детектовано статистички значајно смањење одговора у осталим временским периодима (Табела 11., Wilcoxon test).

период у коме се врши анализа	физиолошки раствор (контрола)	валпроат, 50 мг/кг	валпроат, 100мг/кг	валпроат, 400мг/кг
Статистичка значајност (p, Wilcoxon test) у односу на вредности добијене 0-5 мин регистрације				
6-10 мин	0,01	0,00001	0,002	0,02
11-15мин	0,01	0,00001	0,002	0,02
16-20 мин	0,04	0,00001	0,002	0,02
21-25 мин	0,01	0,00001	0,003	0,03
26-30 мин	0,01	0,00001	0,002	0,02

Табела 11. Статистичка обрада промене интензитета локомоторне активности јединки мушког пола током регистрационог периода. Јединке су тестиране у ПНД40. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Укупна локомоторна активност мужјака (за 30 мин период) контролне групе и група животиња које су индиректно биле изложене валпроату је приказана на Графикону 24.

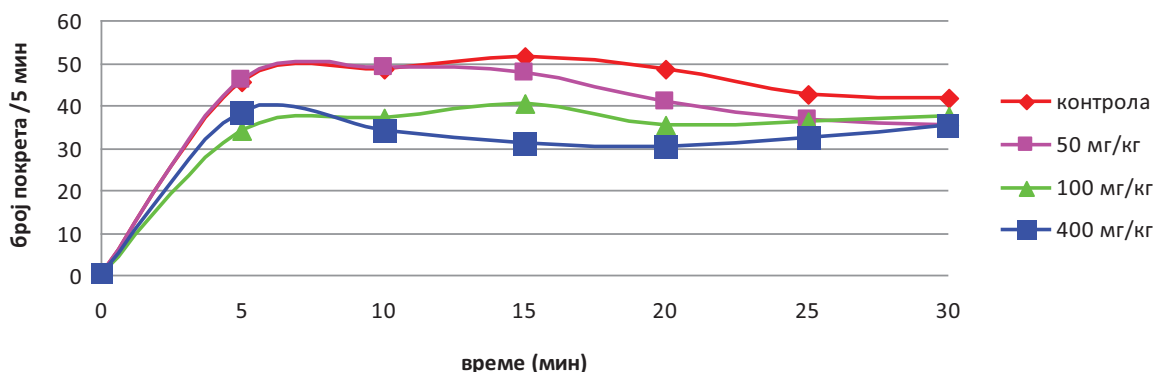


Графикон 24. Укупна локомоторна активност мужјака старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Статистичка анализа је показала да не постоји дозно-зависни утицај интраутериног излагања валпроату на укупну локомоторну активност за 30 мин регистрациони период јединки мушког пола у ПНД40 (Графикон 24., Kruskal-Wallis ANOVA; $H(3, N=60)=3,746$, $p=0.291$). Овај резултат је додатно потврђен поређењем временски-зависних профила контролне групе и група животиња које су биле изложене валпроату (Графикон 23., U-test), при чему нису утврђене статистички значајне разлике у интензитету локомоторне активности ни у једном од испитиваних временских интервала.

Стереотипна активност

Временски-зависни профили промена у стереотипној активности контролних и животиња чије су мајке током гестације биле изложене валпроату приказан је на Графикону 25.



Графикон 25. Временски профил промена у стереотипној активности мужјака старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

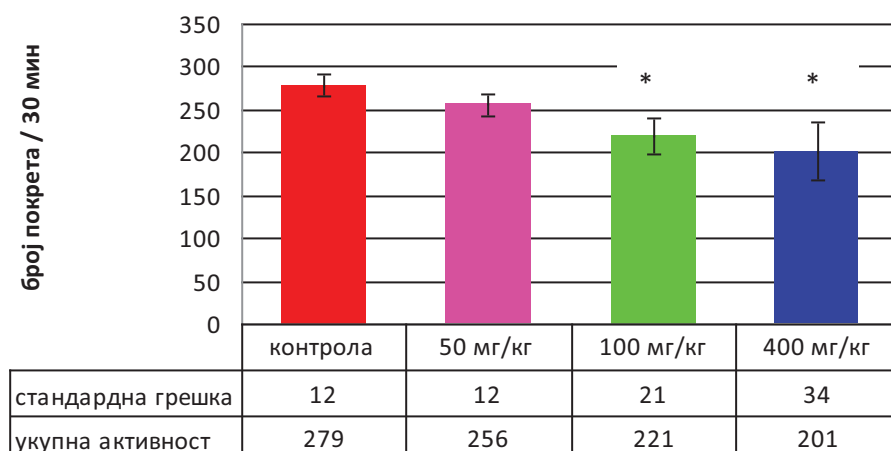
Запажа се феномен интензивне стереотипије током читавог регистрационог периода од 30 мин. Статистичка анализа (Табела 12., Friedman ANOVA) је потврдила да дужина боравка у експерименталном кавезу није значајан фактор за испољавање интензитета стереотипне активности контролне групе мужјака ((N=15, df=5)=9,391 $p < 0,094$), као и група животиња које су индиректно биле изложене валпроату у дозама од 100 мг/кг ((N=15, df=5)=6,256 $p < 0,282$) и 400 мг/кг ((N=15, df=5)=6,751 $p < 0,239$).

период у коме се врши анализа	физиолошки раствор (контрола)	валпроат, 50мг/кг	валпроат, 100мг/кг	валпроат, 400мг/кг
Статистичка значајност (p, Wilcoxon test) у односу на вредности добијене 0-5 мин регистрације				
6-10 мин	/	/	/	/
11-15 мин	/	/	/	/
16-20 мин	/	/	/	/
21-25 мин	/	0,02	/	/
26-30 мин	/	0,01	/	/

Табела 12. Статистичка обрада промене интензитета стереотипне активности јединки мушког пола током регистрационог периода. Јединке су тестиране у ПНД40. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Међутим, значајно смањење интензитета стереотипне активности током времена проведеног у експерименталном кавезу је детектовано код животиња чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг (Табела 12.; (N=15, df=5)=24,527, $p < 0,001$).

Укупна стереотипна активност мужјака (за 30 мин период) контролне групе и група животиња које су индиректно биле изложене валпроату је приказана на Графикону 26.

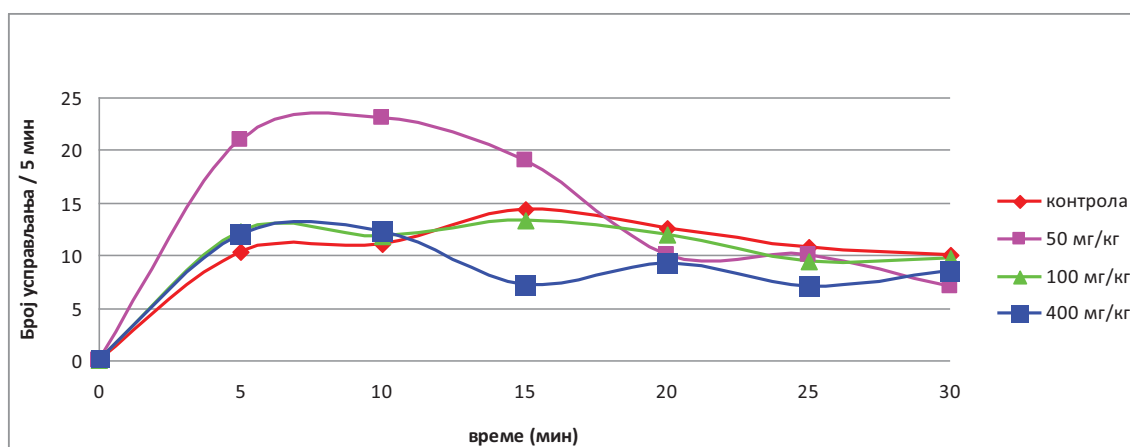


Графикон 26. Укупна стереотипна активност мужјака старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Статистичка анализа је показала да постоји значајан утицај интраутериног излагања валпроату на укупну стереотипну активност за 30 мин регистрациони период јединки мушког пола у ПНД40 (Kruskal-Wallis ANOVA; $H(3, N=60)=7,943$, $p=0,047$). Значајно смањење у односу на контролне вредности је утврђено код животиња дневно излаганих валпроату у дози од 100 мг/кг и 400 мг/кг (Графикон 26.; $*p<0.05$, U-test), али значајна разлика између ефеката ових доза није показана. Детаљнијом анализом, тј. поређењем временски-зависних профила (Графикон 25.), је показано да се значајна смањења у интензитету стереотипног одговора код обе групе животиња у односу на контролне вредности дешавају у периоду 11.-20. мин боравка у експерименталном кавезу ($*p<0.05$, U-test), мада је тренд смањеног стереотипног одговора очигледан у свим временским тачкама.

Вертикална активност

Временски-зависни профили промена у вертикалној активности контролних и мужјака миша чије су мајке током гестације биле изложене валпроату приказан је на Графикону 27.



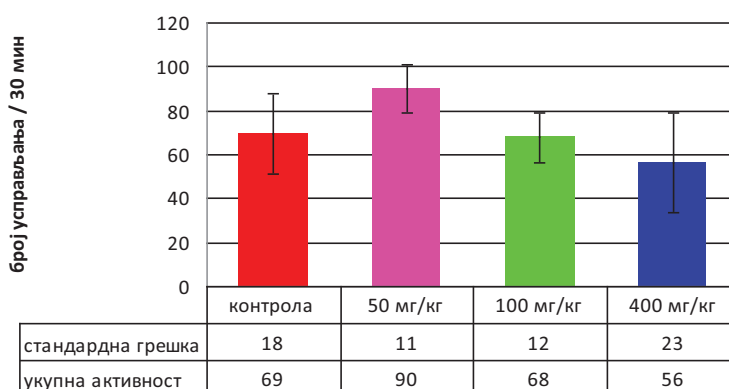
Графикон 27. Временски профил промена у вертикалној активности мужјака старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Интензивно успињање је детектовано током читавог регистрационог периода од 30 мин, а статистичка анализа је потврдила да дужина боравка у експерименталном кавезу није значајан фактор за испољавање интензитета вертикалне активности контролне групе (($N=15$, $df=5$)= $0,952$ $p<0,966$), као и група животиња које су индиректно биле изложене валпроату у дозама од 100 мг/кг (($N=15$, $df=5$)= $2,411$ $p<0,789$) и 400 мг/кг (($N=15$, $df=5$)= $6,097$ $p<0,296$). Међутим, значајно смањење вертикалне активности током временаведеног у експерименталном кавезу је детектовано код животиња чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг (Табела 13., Friedman ANOVA, Chi Sqr. ($N=15$, $df=5$)= $21,714$ $p<0,001$).

период у коме се врши анализа	физиолошки раствор (контрола)	валпроат, 50мг/кг	валпроат, 100мг/кг	валпроат, 400мг/кг
Статистичка значајност (p, Wilcoxon test) у односу на вредности добијене 0-5 мин регистрације				
6-10 мин	/	/	/	/
11-15 мин	/	/	/	/
16-20 мин	/	/	/	/
21-25 мин	/	0,02	/	/
26-30 мин	/	0,01	/	/

Табела 13. Статистичка обрада промене интензитета вертикалне активности јединки мушког пола током регистрационог периода. Јединке су тестиране у ПНД40. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Укупна вертикална активност мужјака (за 30 мин период) контролне групе и група животиња које су индиректно биле изложене валпроату је приказана на Графикону 28.



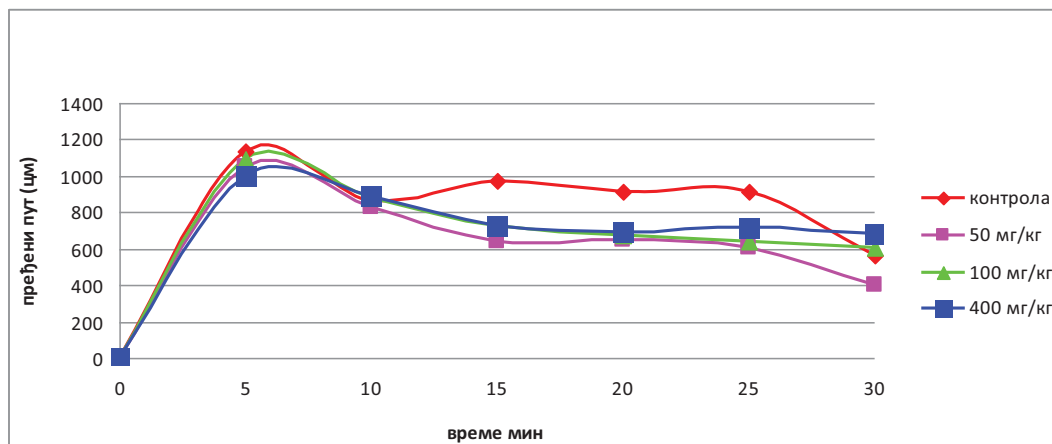
Графикон 28. Укупна вертикална активност мужјака старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Поређење укупне вертикалне активности (за 30 мин период) контролне групе и група животиња чије су мајке током гестације биле изложене валпроату је указало да не постоји значајан утицај третмана на изабрани параметар (Kruskal-Wallis ANOVA; $H(3, N=60)=6,597$ $p=0,086$). Поређењем временски-зависних профила (Графикон 27.) утврђено је значајно повећање у интензитету вертикалне активности животиња које су током интраутериног развоја индиректно биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг у односу на контролну групу, и то у првих 10 мин боравка у експерименталном кавезу ($*p<0.05$, U-test).

4.7.2. Моторичка активност женки у тесту отвореног поља

Локомоторна активност

Временски-зависни профили промена у локомоторној активности контролних и женки миша чије су мајке током гестације биле изложене валпроату приказан је на Графикону 29.



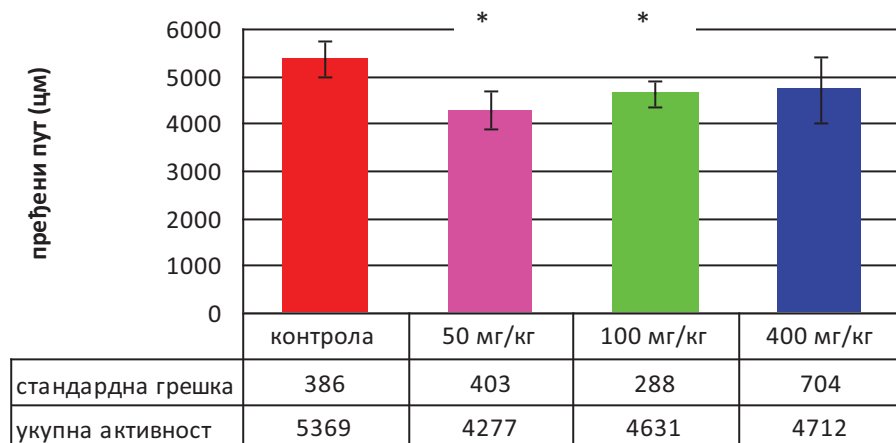
Графикон 29. Временски профил промена у локомоторној активности женки старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Током регистрационог периода од 30 мин све групе животиња су показале смањење у интензитету локомоторне активности, али је статистичка анализа (Табела 14.) показала да је време боравка у експерименталном кавезу значајан фактор за испољавање интензитета локомоторне активности само за животиње које су током интраутериног развоја индиректно (посредством мајки) биле изложене валпроату у дозама од 50 мг/кг (Friedman ANOVA, Chi Sqr. (N=12, df=5)=16,174 $p<0,006$) и 100 мг/кг (Friedman ANOVA, Chi Sqr. (N=12, df=5)=23,386 $p<0,001$). Код ових експерименталних група је уочено значајно смањење у интензитету локомоторног одговора у свим испитиваним временским периодима у односу на први 5 мин период (Табела 14., Wilcoxon test), док су код контролних и животиња које су биле изложене дејству највеће испитиване дозе валпроата (400 мг/кг) детектоване спорадичне значајности.

период у коме се врши анализа	физиолошки раствор (контрола)	валпроат, 50мг/кг	валпроат, 100мг/кг	валпроат, 400мг/кг
Статистичка значајност (p, Wilcoxon test) у односу на вредности добијене 0-5 мин регистрације				
6-10 мин	0,02	0,04	0,05	/
11-15 мин	/	0,01	0,002	0,02
16-20 мин	/	0,04	0,004	0,05
21-25 мин	/	0,04	0,004	/
26-30 мин	/	0,01	0,003	/

Табела 14. Статистичка обрада промене интензитета локомоторне активности јединки женског пола током регистрационог периода. Јединке су тестиране у ПНД40. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Укупна локомоторна активност женки контролне групе и група животиња које су индиректно биле изложене валпроату је приказана на Графикону 30.

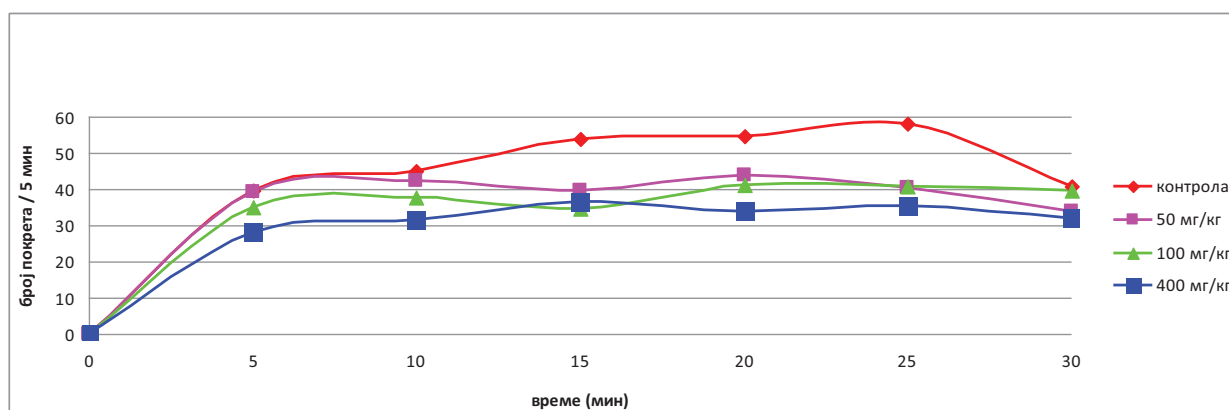


Графикон 30. Укупна локомоторна активност женки старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Поређење укупне локомоторне активности (за 30 мин период) контролне групе и групе женки које су индиректно биле изложене утицају валпроата (Графикон 30.) је указало да не постоји утицај третмана на изабрани параметар (Kruskal-Wallis ANOVA; $H(3, N=48)=1,995, p=0.573$). Додатно поређење временски-зависних профила контролне групе и група животиња које су биле изложене валпроату (Графикон 29.) је показало да постоји извесно смањење у интензитету локомоторног одговора женки које су током интраутериног развоја биле индиректно изложене утицају валпроата (50 мг/кг и 100 мг/кг) у односу на контролну групу у периоду од 15. до 25 мин (* $p<0.05$, У-тест).

Стереотипна активност

Временски-зависни профили промена у стереотипној активности контролних и женки миша чије су мајке током гестације биле изложене валпроату приказан је на Графикону 31.



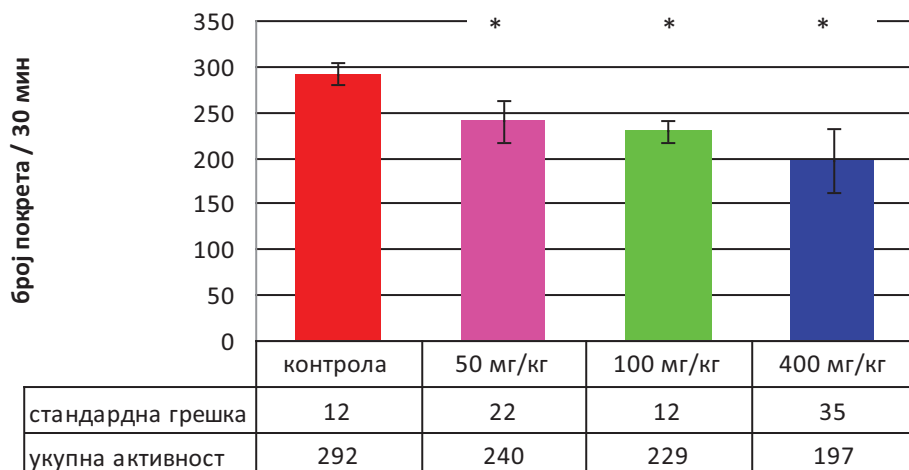
Графикон 31. Временски профил промена у стереотипној активности женки старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Као и код мужјака, запажа се феномен интензивне стереотипије током читавог регистрационог периода од 30 мин. Међутим, статистичка анализа (Табела 15., Friedman ANOVA, Chi Sqr.) је потврдила да дужина боравка у експерименталном кавезу јесте значајан фактор за испољавање интензитета стереотипне активности контролне групе женки ($(N=12, df=5)=12,091$ $p<0,034$), и то у смислу повећања активности у периоду од 15. до 25. мин тестирања у односу на први 5 мин период (Табела 15., Wilcoxon test). Код женки које су биле под утицајем валпроата овај феномен није уочен (Табела 15.).

период у коме се врши анализа	физиолошки раствор (контрола)	валпроат, 50мг/кг	валпроат, 100мг/кг	валпроат, 400мг/кг
Статистичка значајност (p, Wilcoxon test) у односу на вредности добијене 0-5 мин регистрације				
6-10 мин	/	/	/	/
11-15 мин	0,03	/	/	/
16-20 мин	0,03	/	/	/
21-25 мин	0,02	/	/	/
26-30 мин	/	/	/	/

Табела 15. Статистичка обрада промене интензитета стереотипне активности јединки женског пола током регистрационог периода. Јединке су тестиране у ПНД40. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Поређење укупне стереотипне активности (за 30 мин период) контролне групе и групе женки које су индиректно биле под утицајем валпроата (Графикон 32.) је указало да постоји значајан утицај третмана на изабрани параметар (Kruskal-Wallis ANOVA; $H(3, N=48)=9.099$ $p=0,028$), у смислу значајног смањења у односу на контролне вредности (* $p<0.05$, U- тест).

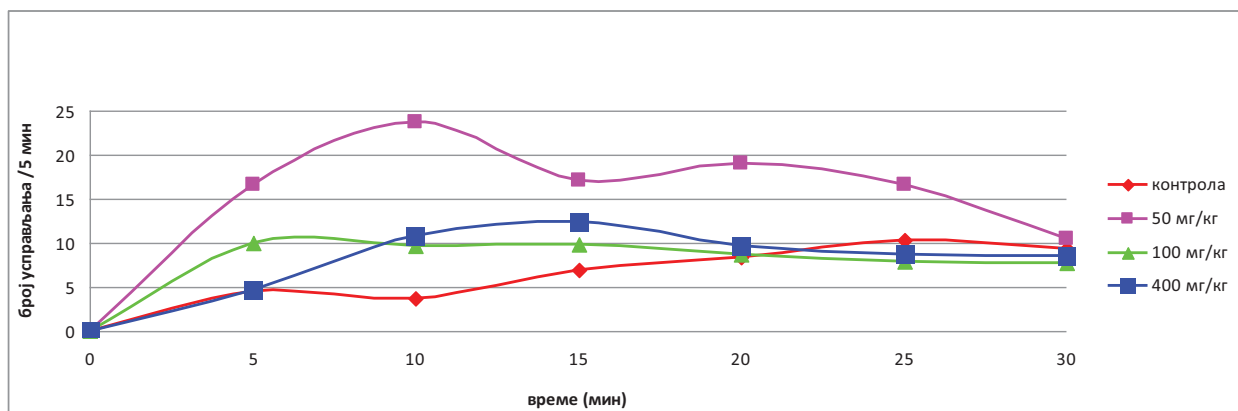


Графикон 32. Укупна стереотипна активност женки старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Детаљнијом анализом, тј. поређењем временски-зависних профила (Графикон 31.), је показано да се значајна смањења у интензитету стереотипног одговора код све три групе женки у односу на контролну групу дешавају у периоду 15. - 25. мин боравка у експерименталном кавезу (* $p < 0.05$, У-тест). Овај период је у потпуности подударан са горе наведеним временским оквиром интензивирања стереотипног одговора контролних женки у тесту отвореног поља.

Вертикална активност

Временски-зависни профили промена у вертикалној активности контролних и женки миша чије су мајке током гестације биле изложене валпроату приказан је на Графикону 33.



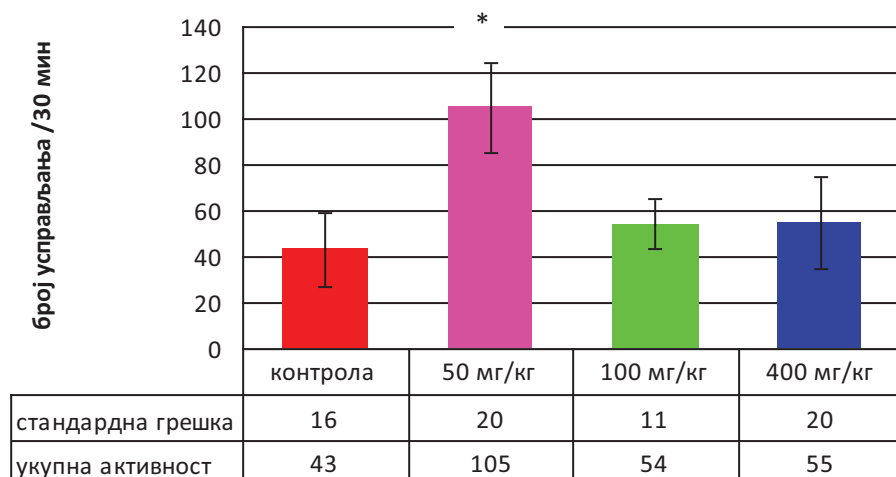
Графикон 33. Временски профил промена у вертикалној активности женки старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Интензивно успињање је детектовано током читавог регистрационог периода од 30 мин, а статистичка анализа (Friedman ANOVA, Chi Sqr.) је потврдила да дужина боравка у експерименталном кавезу није значајан фактор за испољавање интензитета вертикалне активности контролне групе ((N=12, df=5)=6,199 $p < 0,287$), као и групе животиња која је индиректно била изложена валпроату у дози од 100 mg/kg ((N=12, df=5)=1,713 $p < 0,887$). Значајно повећање вертикалне активности током времена provedеног у експерименталном кавезу је уочено код женки чије су мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг (Friedman ANOVA, Chi Sqr. (N=12, df=5)=11,621 $p < 0,042$) и 400 мг/кг (Friedman ANOVA, Chi Sqr. (N=12, df=5)=12,512 $p < 0,028$). Резултати добијени поређењем (у оквиру групе) у односу на интензитет вертикалне активности у првих 5 мин су приказане у Табели 16.

период у коме се врши анализа	физиолошки раствор (контрола)	валпроат, 50мг/кг	валпроат, 100мг/кг	валпроат, 400мг/кг
Статистичка значајност (p, Wilcoxon test) у односу на вредности добијене 0-5 мин регистрације				
6-10 мин	/	0,02	/	0,04
11-15 мин	/	/	/	0,03
16-20 мин	/	/	/	0,03
21-25 мин	/	/	/	0,05
26-30 мин	/	/	/	0,03

Табела 16. Статистичка обрада промене интензитета вертикалне активности јединки женског пола током регистрационог периода. Јединке су тестиране у ПНД40. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Укупна вертикална активност женки контролне групе и група животиња које су индиректно биле изложене валпроату је приказана на Графикону 34.



Графикон 34. Укупна вертикална активност женки старих 40 постнаталних дана (ПНД40) у тесту отвореног поља. Регистрациони период је трајао 30 мин. Током целокупног периода гестације мајке испитиваних јединки су биле третиране физиолошким раствором или различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 400 мг/кг).

Статистичка анализа података је показала да не постоји значајан утицај третмана на укупну вертикалну активност женки у ПНД40 (Kruskal-Wallis ANOVA; $H(3, N=48)=5,396$ $p=0,145$). Међутим, post-hoc анализа је указала да у односу на контролну вредност значајно повећање вертикалне активности постоји код женки које су током интраутериног развоја биле под утицајем валпроата у дози од 50 mg/kg (Графикон 34.; * $p<0.05$, U-test), као и да је овакав ефекат последица интензивне активности животиња у првих 20 мин регистрационог периода (Графикон 33.; * $p<0.05$, U-test).

5. ДИСКУСИЈА

Валпроат се већ 40 година користи у клиничкој пракси, али многобројна истраживања која се односе на његове терапијске, токсичне и тератогене ефекте и даље изазивају пажњу. Зато су од посебног значаја истраживања која се бави испитивањем утицаја валпроата током гестације на психомоторни развој потомства.

5.1. Утицај валпроата на телесну тежину женки и репродуктивни капацитет

Наша студија је показала да примена валпроата у периоду приплода има дозно-зависни утицај на брзину зачећа женки миша НМРИ соја, као и да континуирана примена током периода приплода и гестације утиче на фертилитет и смртности женки. Наиме, у групама женки које су третиране валпроатом у дневној дози од 200 мг/кг 27% јединки није остало скотно. Такође, у групама које су третиране валпроатом у дневној дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг угинуло је 18% и 50% јединки, редом. У контролној групи, као и у групама третираним валпроатом у дози од 50 мг/кг и 100 мг/кг није забележена смртност и у овим групама све женке су зачеле.

Део добијених резултата је у сагласности са подацима из литературе, којих је заиста веома мало за модел који је спроведен у нашој студији (третман женки валпроатом током целокупног периода приплода и гестације), док су неки ефекти примене валпроата по први пут описани. На пример, у истраживању у којем је валпроат примењиван током читаве гестације на женкама пацова Wistar соја (орална примена у дози од 500 мг/кг и 800 мг/кг; 72) није праћено преживљавање женки. Међутим резултати наше студије су јасно указали да постоји дозно-зависни утицај валпроата на преживљавање експерименталних јединки, макар када је у питању субкутани начин примене валпроата. У истој студији (72) нису забележена значајна одступања у тежини јединки третираних валпроатом током гестације у односу на контролне женке, што је потврђено и у нашим експериментима.

Наши експерименти су показали да је временски период који је био потребан женкама да остану скотне био продужен у групи женки које су третиране валпроатом у

дозе од 400 мг/кг (потвђена значајна статистичка разлика у односу на контролну групу, $p < 0.02$, U-test), док је за групу третирану валпроатом у дози од 200 мг/кг пронађена гранична статистичка значајност у односу на контролну групу. Ови резултати су у сагласности са метаболичким променама које изазива примена валпроата код људи, и за које се сматра да се налазе у основи репродуктивне дисфункције. Наиме, валпроат изазива репродуктивну ендокрину дисфункцију, типа полицистичних промена на јајницима и аменореју, услед повећане концентрације тестостерона, андростенедиона, као и повећаног нивоа лутеинизирајућег хормона (81).

Иако је познато да валпроат изазива промену у телесној тежини услед стимулативног дејства валпроата на хипоталамус и повећања апетита, резултати наше студије нису указали на значајне разлике у тежини између женки које су биле изложене валпроату и контролне групе, што је у сагласности са подацима из литературе (72). Међутим, интересантни резултати су добијени у студији у којој су женке Вистар соја третиране валпроатом у дози од 400 мг/кг и 600 мг/кг током 90 дана, а мужјаци у истом временском периоду дозом од 400 мг/кг и 800 мг/кг (73). Наиме, ова студија је показала да ни у једној од ових група није било значајне промене у телесној тежини у односу на контролну тежину, осим у групи мужјака који су били изложени дози од 800 мг/кг, где је забележена редукција телесне тежине за 16%.

5.2. Утицај интраутериног излагања валпроату на физичке карактеристике потомства и ембриолеталност

Наша студија је показала да код јединки које су индиректно биле излагане валпроату током читавог периода интраутериног развоја осим промене у телесној тежини јединки (пад) постоји и кашњење у отварању очију у ПНД15. Физичке малформације су уочене само код једне новорођене јединке. Ови резултати су значајни за разумевање последица изазваних применом валпроата током трудноће јер је у већини експеримената у које је увид доступан из литературе примарно праћен тератогени ефекат валпроата, па су сходно томе гравидне женке биле третиране високим дозана валпроата у одређеном дану гестације, што се у пракси у суштини не дешава.

Нежељени ефекти акутне примене валпроата током гестације највише се испитују на глодарима. Потентни ефекат валпроата на фетални развој пацова и мишева приказан је у ревијалном раду (82). Употреба валпроата (једнократно или у одређеном временском интервалу) на одређеном соју скотних женки пацова/мишева изазива атак на развој нервног система потомства, што доводи до рађања јединки са дефектом. Једнократна примена валпроата у дози од 800мг/кг (орално) на женкама код којих је трудноћа стара 9 или 10 дана изазива пад телесне тежине потомака. У неколико сојева мишева изложеним различитим дозама валпроата и у различитом временском интервалу *in utero* приказана је ембриоредукција, присутност дефектних удова на рођењу и дефект неуралне тубе (укључујући егзенцефалију, развој скелетних малформација- сраслост ребара и кичмених пршљенова, синдактилија и дисплазија).

Наши експерименти су показали да третман валпроатом током гестације значајно утиче на телесну тежину потомства у ПНД5, ПНД10, ПНД15, ПНД25 и ПНД32. Ефекат у каснијим фазама развића није праћен. Неочекивани резултат је да потомство чије су мајке биле третиране валпроатом у дози од 400 мг/кг није показало перманентне промене у телесној тежини. Међутим, потомство чије су мајке биле изложене валпроату у дневној дози од 50 мг/кг и 200 мг/кг је у свим праћеним временским тачкама постнаталног развоја показало знатно мању тежину у односу на одговарајућу старосну контролу. У истраживању у којем је валпроат примењиван током читаве гестације на женкама пацова Wistar соја (орална примена у дози од 500 мг/кг и 800 мг/кг; 72) нису детектоване промене у телесној тежини јединки у ПНД7.

Као последица третмана гравидних женки различитих инбред сојева мишева валпроатом у дози од 400 мг/кг три пута у 9том гестационом дану, између осталог, наводи се значајно смањење телесне тежине потомства у већини тестираних инбред сојева (74). Пад телесне тежине потомака у периоду од ПНД23 до ПНД180 детектован је приликом третмана женки Wistar пацова једнократном дозом валпроата (600мг/кг) 12тог дана гестације (75), али у прве две недеље постнаталног живота није било разлике у телесној тежини потомства. Међутим, у студији Wagnera и сарадника (71) потомство женки BALBc соја мишева, које су третиране валпроатом у дози од 600мг/кг 13тог дана гестације, имало је статистички значајно повећање телесне тежине у односу на контролну групу, и то од ПНД 5 до ПНД 26.

Резултати наше студије не иду у прилог својству валпроата да када се примењује током трудноће изазива физичке малформације потомства. Наиме, међу потомством женки које су третиране дневном дозом валпроата од 400 мг/кг одмах након окота детектован је један фетус са егзенцефалијом и дефектом неуралне тубе. У експерименталној групи јединки чије мајке током гестације биле изложене валпроату у дози од 200 мг/кг, 5 потомака је имало ишчашен корен репа. Међутим, забележена је редукција у броју потомака од ПНД1 до ПНД5 у окотима женки које су током гестације третиране валпроатом у дози од 400 мг/кг, што се може објаснити биолошком карактеристиком женки глодара да потомство које препозна као малформисано поједе (83). Треба напоменути да наша студија није указала на велико одступање у просечном броју новорођених јединки по окоту између контролних и валпроатом третираних женки (n=7-8 јединки по окоту), што је показано и у студији на Вистар пацовима, мада су ове женке третиране једнократном дозом валпроата (600мг/кг) 12тог дана гестације (75).

У студији Kultima и сарадника (84) женке НМРИ соја су третиране интраперитонеалном ињекцијом валпроичне киселине у дози од 600мг/кг 8. постконцепцијског дана. Дефект неуралне тубе примећен је 18. постконцепцијског дана код 60% живих фетуса. Различит степен дефекта неуралне тубе заједно са успореним растом уочен је 10. постконцепцијског дана код 52% ембриона. Одређени број (36%) фетуса имао је нормалан морфолошки изглед, али је детектовано кашњење у расту, док су код 12% фетуса запажене различите абнормалности (одсуство каудалних структура, срчана дисфункција, едеми). Ни једна аномалија од горе поменутих није била у налазу контролне групе. У овој студији су испитивани и гени који су одговорни су за незатварање неуралне тубе, чију прекомерну експресију индукује валпроат. Транскрипциони одговор прекомерно експримираних гена индукованих валпроичном киселином су винкулин, металотионеини 1 и 2, кератин 1-18, галектин 1, трансгелин, тироидни хормон рецептор интерактивни протеин 6, синтаза масних киселина, анексин А5 и А11.

In utero експозиција валпроату у дози од 600мг/кг 12тог ембриогеног дана ког Long- Evans пацова довела је до малформација типа микроцефалије и церебеларних абнормалностима, које су репродуковане на Sprague-Dawley пацовима применом валпроата у дози од 600mg/kg 17. и 18. ембриогеног дана. Излагање женки пацова Wistar

соја различитим дозама валпроата током гестације, доводи до смањења броја јединки у леглу за 50%, међутим није детектована промена телесне тежине мајки, али ни значајне разлике у телесној тежини потомака у ПНД7 и у адолесцентној фази. У другом истраживању примена валпроата 9тог ембриогеног дана у дози од 600mg/kg на Wistar соју, број јединки у леглу се смањило за 25%. Није било статистичке значајности међу групама у телесној тежини потомства. Иста доза је аплицирана 12тог дана код Wistar соја, што је изазвало пад у телесној тежини код потомака (који су мерени од ПНД23 до ПНД180) (82).

Наша студија је показала да код јединки које су индиректно биле излагане валпроату током читавог периода интраутериног развоја осим промене у телесној тежини јединки (пад) постоји и кашњење у отварању очију у ПНД15. Наиме, у контролној групи ни једна јединка није имала оба ока неотворена у ПНД15. Јединке, чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50, 100, 200 или 400 мг/кг нису имале оба ока отворена редом: 57%, 71%, 67% и 68% од укупног броја у оквиру групе док је број потомака који нису имали једно око отворено био редом: 6%, 5%, 6%, и 13%. У контролној групи 2% јединки од укупног броја у оквиру групе, имало је једно око отворено ПНД15. Добијени резултати су у сагласности са подацима из литературе који указују да пренатално излагање мишева и пацова валпроату изазива кашњење у отварању очију, при чему се кашњење од 2 дана сматра значајним (82). Исти феномен је забележен и у окотима Wistar женки, које су биле под третманом валпроата, у смислу кашњења у отварању очију код потомака 13тог и 14тог дана (75).

Сходно дискутованим подацима и резултатима добијеним у нашим истраживањима може се закључити да последице примене валпроата током гестације у великој мери зависе од самог експерименталног модела, тј. генетичке основе експерименталних животиња. Начин примене и дозе валпроата такође треба узети у обзир при интерпретацији резултата јер постоје јасне индикације да су неке последице примене валпроата у директној корелацији са начином метаболизма саме супстанце у организму мајке, а самим тим и настанка активних метаболита, о чему се за сада још увек најалост недовољно зна (35).

5.3. Утицај интраутериног излагања валпроату на одговор потомства у тесту усправљања

Подаци добијени у нашим експериментима у тесту усправљања, на јединкама које су биле изложене валпроату *ин утеро*, указују да третман значајно успорава моторички развој потомства. Сходно старости животиња, резултат се огледа како у квалитету одговора на тест (У-, В- или А-тип окрета, тј. усправљања), тако и у времену које је потребно да се одређени тип окрета обави.

Онтогенија сензоримоторних рефлекса од рођења до адултног стадијума прати росто-каудални смер развоја, а успорен развој спиналних рефлекса поред многобројних фактора може бити условљен малнутрицијом јединки, услед лошег стања женки које су биле под третманом или услед стања самих младунаца (86). Моторна стратегија неонатуса глодара, која укључује ротацију као врло битан фактор, неопходна је да би младучне стигло до брадавице женке. Прогресија у моторичком сазревању типа окрета креће се од не-аксијалне до аксијалне форме, током које се типови окрета преклапају.

Одмах по рођењу, током тестирања јединка после великог броја неуспешних покушаја испружањем удова, окретање постиже забацивањем предњег дела тела и извијањем трупа у леву и десну страну (са испруженим екстремитетима, који на тај начин помажу у процесу окретања). Практично, јединка заузима вентрофлексиону позу трупа и квадрипедалну екстензију са slabим покретима главе (87). Овај облик окрета представља У-тип. Сазревање контактне форме рефлекса испољава се кроз два нивоа, односно у старосно- и активно-зависном смислу, тако да од ПНД3-5 ротација главе постаје очигледнија и предњи део трупа помаже у окретању. Активација вестибулоколичне мреже и сазревање вестибулоспиналног пута током друге постнаталне недеље, резултира окретањем главе, смањењем учесталости незрелог облика окретања у корист аксијалног окрета.

Наши резултати, који се односе на квалитативну компоненту одговора контролних животиња у тесту усправљања, су у сагласности са подацима из литературе (87; 88). У ПНД5 је код свих контролних јединки уочен само В-тип усправљања, у ПНД10 су уочене А-форма (34%) и В-форма (64%). У ПНД15 је већина јединки показивала А-форму (89,

док је В-форма усправљања уочена код мањег броја (11%). У тесту усправљања У-постура се очекује у првим постнаталним данима и губи се у корист В-типа окрета, који се у различитој мери може јавити у периоду од ПНД0 до ПНД12 (88). В-облик окрета замењује аксијална форма рефлекса при чему се нагли пораст аксијалног типа окрета јавља се око ПНД10 и постаје преобладајући у периоду од ПНД15 до ПНД16.

Наши експерименти су показали да третман валпроатом током гестације значајно утиче на моторички развој потомства. У ПНД5 је, као и у ПНД10, код одређеног броја јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом (200 мг/кг и 400 мг/кг) још увек био присутан У-тип усправљања. Сходно томе, наши резултати указују да интраутеринско излагање валпроату значајно утиче на сазревање тригеминалне компоненте вестибулоспиналног пута, који су битни за сазревање контактне форме рефлекса окретања у смислу координисане ротације главе и раменог појаса. Такође, ПНД5 јединкама које су имале задовољавајући тип усправљања (В-тип) требало је знатно више времена да се окрену са леђа на стомак у поређењу са контролном групом. Интересантно је да се овај ефекат кашњења у одговору запажа већ код потомства чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 100 мг/кг и то у истом опсегу као и код потомства чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг, што указује на комплексне последице *ин утеро* излагања валпроату у смислу појаве хипоничког синдрома. Потомство чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг је у ПНД5 у тесту усправљања било квалитативно и квантитативно у опсегу одговора контролних животиња.

У ПНД10 је, код највећег броја јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг забележен В-тип окрета, али је у одређеној мери у обе групе још увек био присутан У-тип усправљања (ефекат дискутован у претходном пасусу). Јединке чије су мајке биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг и 100 мг/кг су квалитативно, као и у ПНД5, имале задовољавајући тип окрета, али резултати који се односе на време потребно да се јединке окрену по В-обрасцу указује да ефекат валпроата постоји и у овим групама. Наиме, у односу на контролне вредности за дату старост, значајно више времена за усправљање по В-обрасцу је било потребно свим јединкама које су *ин утеро* биле изложене дејству валпроата. Разлика је утврђена и у времену потребном за А-тип окретања између контролних и јединки које су током

интраутериног развоја биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг и 100 мг/кг (телесне тежине мајке).

У ПНД15, за који је карактеристичан А-тип одговора у тесту усправљања, сви третмани су довели до значајног смањења броја јединки које одговарају А-типом окрета, као и до значајног продужења временског периода који је био потребан за овакав одговор. Овакав резултат указује на могућност постојања одређених проблема са тонусом скелетне мускулатуре који перзистирају и кроз раније фазе постнаталног развоја (ПНД5, ПНД10). Наиме, слаб мишићни тонус и лоша координација (укључујући фину моторику) је уочен код деце чије су мајке током трудноће биле лечене валпроатом (89).

Литература која детаљно обрађује моторичке перформансе потомства рођеног од мајки које су током читавог периода гестације биле третиране валпроатом није бројна. У студији Вагнера и сарадника (71) у којој је испитивана контактна форма рефлекса окретања (ПНД5-9) на мишевима BALB соја чије мајке су третиране валпроатом у дози од 600 мг/кг 13тог гестационог дана, утврђена је дужа латенцу окретања у ПНД5 и ПНД6 у односу на контролну групу. Друга група мишева у истом истраживању била је третирана валпроатом у дози од 200 мг/кг од 12тог до 17тог ембрионалног дана, али њихова латенца окретања се није значајно разликовала од контролне групе. Поред значајног утицаја на време у тесту рефлекса окретања, примена валпроата током интраутериног периода значајан је фактор за тип окрета. На основу литературе (90) рефлекс окретања јавља се ПНД 1, али код 50% јединки мишева (C57BL/6, C3H/HeJ, BALB/c) одговор је слаб. ПНД5 код 75% јединки претходно поменутих рефлекс окретања је јак. ПНД6-7 100% јединки горе поменутих сојева имају јак одговор тестирањем рефлекса окретања.

Промене у сазревања рефлекса окретања код јединки које су изложене дејству различитих фармаколошки активних агенанса могу да укажу на промене у матурацији и нарушеном интегритету система чија координисана активност, сходно старости експерименталне животиње, доприноси адекватном одговору (56; 91). Вестибуларни систем је одговоран за перцепцију, окуломоторну и постуралну контролу, и има привилеговане везе са многим можданим регионима. Познато је да је церебелум структура значајна за контролу моторне координације, времена започињања покрета, али и за моторно учење и когницију. Кроз вестибуло-церебеларни пут (аферентни и еферентни) вестибуларни систем остварује контакте са церебелумом. Део вестибуларног система

(осетљив на гравитацију) прави везу са флокуло-нодуларним делом церебелума (вестибуларни церебелум). За перцепцију покрета значајне су и везе вестибуларног систем са регионима таламуса где се захваљујућу вестибуло-таламичким контактима (соматосензорни пут) обрађују информације и шаљу у кортикалне регионе (вестибуларни и соматосензорни кортекс, примарни и премоторни кортекс, цингулатни кортекс) и хипокампус, у коме су од посебног значаја ћелије чијом се активношћу стиче интернално представљање положаја тела у простору (92). Вестибуло-стријатналне моторичке компоненте, вестибуло-визуелне и визуелно-моторне компоненте рефлекса усправљања су такође од значаја.

Познато је да у раном постнаталном животу младунци пацова (изложени валпроату у дози од 600 мг/кг 12. ембриогеног дана) имају измењену физиологију медијалног префронталног кортекса (мПФК) и синаптичку пластичност, која се огледа дуготрајном потенцијацијом услед повећане експресије НМДА рецептора. Код животиња пренатално изложених валпроату синаптичке абнормалности перзистирају и током адултне фазе али је присутан сасвим другачији синаптички фенотип (прелаз из хипер- у хипо-функционалност у мПФК) (93). Осим ових промена у ПФК, код потомака мишева који су пренатално третирани валпроатом у дози од 500 мг/кг приказан је губитак ћелија у овом можданом региону као и у одређеним сојевима соматосензорног кортекса који је, између осталог, значајан за развој контактне форме рефлекса усправљања (94). У церебелуму Long Evans расова, пренатално третираних валпроатом у дози од 600 мг/кг 12. ембриогеног дана, забележене су следеће промене: смањен волумен церебелума, посебно постериорног дела вермиса, као и смањен број Пуркињевих ћелија у вермису и церебеларним хемисферама. Церебелум има критичну улогу у контроли очних покрета иако нема директну везу са мишићима ока и познато је да су једра која контролишу покретање очних мишића оштећена код пацова изложеним валпроату пренатално (95). У поглављу књиге Gottfrieda и сарадника (96) наводи се да хипокампус има смањену експресију информационе РНК за неуролигин 3, који игра кључну улогу у сазревању синапси, а поред тога у књизи је изнесено да јединке изложене валпроату „ин утеро” имају снижену кортикалну експресију информационе РНК за БДНФ, што може резултирати измењеним развојем синапси (сматра се да је овај неуротрофични фактор од велике

важности за синаптичку пластичност у смислу правилног успостављања контакта између пресинаптичких и постсинаптичких јединица, као и за њихово функционисање – 97).

Сходно свему наведеном може се закључити да је контрола рефлекса усправљања веома сложена и да је тешко на основу бихејвиоралних резултата тачно проценити на ком нивоу постоји дефицит у контроли. Упркос томе резултати наше студије јасно указују да интраутерино излагање валпроату има сложене последице на развој рефлекса усправљања потомства и да за правилно сагледавање последица интраутериног излагања одређеној дози валпроата мора да постоји адекватан опсег постнаталних старости. Резултати добијени на само једној старосној групи могу да наведу на погрешан закључак, нпр. у нашој студији у ПНД5 није детектован значајан утицај валпроата на рефлекс усправљања, али је у каснијим стадијумима ефекат дошао до изражаја. Интраутерино излагање валпроату не показује јасне дозно-зависне ефекате на одговор потомства старости ПНД5-ПНД15 у тесту усправљања, већ се одговор углавном јавља по принципу "све или ништа" (нпр. дозе 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг телесне тежине мајке у истој мери продужавају време потребно за одговор потомства у ПНД5 по обрасцу В-типа, дозе 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг телесне тежине мајке у истој мери продужавају време потребно за одговор потомства у ПНД10 по обрасцу В-типа и у ПНД15 по обрасцу В- и А-типа). Наши експерименти су показали да су за процену утицаја интраутериног излагања валпроату на рефлекс усправљања посебну пажњу треба обратити на време потребно за усправљање (тј. окретање) по обрасцу очекиваном за дату постнаталну старост. Прецизније речено, у одређеним комбинацијама (доза валпроата x постнатална старост) ефекат третмана може да се потврди на основу одступања од контролног времена (квантитативна компонента) али не и на основу типа окрета (квалитативна компонента), што је случај у ПНД5 при дози од 100 мг/кг. Сходно свему наведеном, потребна је обазривост у тумачењу резултата када је приликом поставке експеримента направљен мали дозни опсег и последице праћене искључиво у раном постнаталном развоју потомства.

5.4. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту качења о реп

Резултати наших експериментата су показали да интраутерино излагање валпроату значајно утиче на исход теста качења о реп само код јединки у неонаталном периоду развоја (до ПНД10), и да се код старијих јединки (ПНД15) не може учити. Ефекат се огледа у томе да јединке које су биле изложене дејству валпроата знатно раније постају имобилне у односу на контролну групу.

Тест качења миша о реп се користи за процену про- или анти-депресивног ефекта одређених фармаколошки активних агенаса и углавном се ради на **адултним** мишевима (98). Иницијална реакција миша који је окачен о реп је борба, односно покушај да побегне из непријатне ситуације. Ови периоди борбе су прекинути епизодама имобилности, односно стањем укочености. На основу епизода укочености израчунава се индекс депресивног стања, што одговара стању очаја (99). По протоколу миш се качи о реп током 6 мин и мери се време током којег је у имобилном стању. Како је тест качења о реп зависан о моторној способности јединке, јединке оштећеног моторног фенотипа требало би искључити приликом интерпретације резултата (98). Различити сојеви мишева различито реагују на базалну имобилност у тесту качења о реп, што указује да је тест осетљив на генетичку основу соја који се тестира. Одговор соја на антидепресиве се разликује од профила базалног одговора, што указује да детерминанте антидепресивног и базалног одговора нису идентичне (100).

У нашој студији тест качења о реп смо модификовали сходно старости јединки (ПНД5, ПНД10, ПНД15) које су тестиране, са циљем да избегнемо оштећења ЦНС-а током раног постнаталног развоја. Наиме, у прве две недеље постнаталног живота централни нервни систем глодара пролази кроз брз раст и интензивну синаптогенезу (48), те је стога дужина тестирања ограничена на 3 мин и тестирање је прекидано после првог стања имобилности. Мерена је временска латенца од момента качења јединке о реп до тренутка имобилности (односно праћена је активност јединке у тесту). Овај параметар у класичном тестирању повећава сензитивност теста (101). У неким студијама које су рађене на

животињама до 21. дана старости (ПНД21) тест качења о реп је сведен на свега 25 секунди (103).

Резултати наших експериментата су показали да интраутерино излагање валпроату значајно утиче на исход теста качења о реп када се јединке тестирају у периоду ПНД5-ПНД10, али да не постоји јасна дозно-зависна разлика у ефекту. Прецизније речено, ефекат није уочен код ПНД5 и ПНД10 јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг и 100 мг/кг. Код јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг имобилност је, у односу на одговарајућу контролну групу, знатно пре наступила, али значајна разлика између ефеката ових доза није показана је. Овакви резултати јасно указују да интраутерино излагање различитим дозама валпроата код ПНД5 и ПНД10 јединки миша у тесту качења о реп исказује свој ефекат по принципу "све или ништа", при чему се доза од 200 мг/кг понаша као гранична за испољавање ефекта.

У нашој студији временска латенца током три тестирања (ПНД5, ПНД10, ПНД15) се повећавала од ПНД5 до ПНД15 у свим групама. Овакав резултат може да се објасни чињеницом да током постнаталног развоја јединке бивају снажније, услед чега могу дуже да супротстављају наметнутом неприродном положају. Постура и локомоција су подржани независним неуралним субсистемима. Стање имобилности у којем је став постуре заузет против гравитације је предмет великог броја локалних, али и рефлекса који укључују целокупни одговор организма. Имобилност стога треба сагледати као понашање са комплексно повезаним рефлексима. Чак и кататоничне животиње комплетно неподражљиве могу се брзо кретати да би поново овладале равнотежним ставом уколико су постављене у нестабилни положај. Рефлекси постуре су као и рефлекс окретања посредовани визуелним и вестибуларним системом, чулима са површине тела као и проприоцептивним системом (104). Индукована имобилност, зове се још и тонична имобилност, а изазива се постављањем јединке у бизарну позицију, при чему је јединка свесна/будна (87).

Наши резултати су показали да код јединки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг и 400 мг/кг имобилност, у односу на одговарајућу контролну групу, знатно пре наступа. Једно објашњење овог феномена је да

се животиње које су интраутерино биле изложене дејству валпроата знатно пре заморе због релативно лошег стања скелетне мускулатуре, на шта указују и подаци добијени у тесту усправљања (дискутовани у подпоглављу 5.3.). Познато је да интраутерино излагање валпроату може да изазове слаб мишићни тонус и лошу координација код деце (89). Друго објашњење феномена може се наћи у поремећеном функционисању мезолимбичког и нигростријаталног допаминергичког система, који имају кључно место у контроли и координацији вољних покрета и неуробиологији депресије. Током нормалног постнаталног развоја миша концентрација допамина знатно расте (у периоду од П0 до П14 порасте око 3,5 пута) и уско је повезана са понашањем јединки, између осталог и у тесту качења о реп (103). Парцијална дефицијенција тетрахидробиоптерина (БХ₄), који је кључни кофактор ензима укључених у синтезу моноамина (тирозин хидроксилаза – допамин и норадреналин, триптофан хидроксилаза – серотонин), ремети нормалан развој моноаминергичких система и повезана је са одређеним психомоторним дефицитима. Биоптерин је релативно нестабилан и лако деградује, а за његову регенерацију је неопходно присуство фолне киселине и Л-метилфолата. Супстанце са антиконвулзивним дејством, укључујући валпроат, знатно снижавају концентрацију Л-метилфолата, изазивајући на тај начин нестабилност биоптерина и неадекватно коришћење фолне киселине, што резултира смањеном продукцијом серотонина, норепинефрина и допамина. На тај начин интраутерино излагање валпроату може да доведе до поремећаја у синтези моноамина, поремећеном функционисању моноаминских трансмитерских система и лошег исхода у одређеним психомоторним тестовима.

Интересантно је да код јединки старих 15 дана (ПНД15) није детектован утицај интраутериног излагања валпроату на исход теста качења о реп. Овакав резултат се може објаснити чињеницом да се, захваљујући пластичности, нервни систем релативно опоравио од последица третмана, и да зато у "грубљим" тестовима понашања који не захтевају фину координацију појединих делова тела, ефекат није могуће уочити. Међутим, резултати добијени у тесту усправљања (дискутовани у подпоглављу 5.3.) јасно указују да последице интраутериног излагања свим испитиваним дозама (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг) још увек постоје код јединки старих 15 дана. На овај начин резултати наших истраживања јасно указују да се одабир тестова који ће користити за процену евентуалних последица интраутериног излагања валпроату мора пажљиво одабрати, као и

да резултати добијени на јединкама у раним фазама постнаталног развоја морају обазриво да се тумаче.

5.5. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту излагања врућој плочи

Наша истраживања су показала да интраутерино излагање валпроату значајно утиче на исход у тесту излагања врућој плочи, у смислу да повећава број јединки које неадекватно одговарају на тест (за више од 40 сек) и да у оквиру јединки које адекватно одговоре на тест (за мање од 40 сек) значајно продужава латенцу одговора на топлотни стимулус у односу на одговарајућу контролну групу животиња. Ефекат је примећен код потомства оба пола и у обе испитиване постнаталне старости (ПНД25, ПНД32). У оквиру исте постнаталне старости није детектована значајна разлика у одговору мужјака и женки, али је у оквиру истог пола и различитих старости уочена значајна разлика у смислу значајно краће латенце у другом тестирању (ПНД32) у односу на прво (ПНД25).

Оригинално креиран пре 70 год. за испитивање у студијама ноцицепције и аналгезије тестом вруће плоче у коме се јединка ставља на уоквирену врућу плочу (прецизно загрејане до одређене температуре) прати се временска латенца до првог знака дискомфора (вокализација, скакање или подизање, отресање и лизање шапе). Током деценија је испитивана осетљивост теста. Фактори који утичу на исход тестирања су интензитет стимулуса, претходна експозиција тесту вруће плоче и индивидуалне карактеристике јединки. (105). Тест вруће плоче представља тест за испитивање супраспиналне дражи, уколико се понавља може бити модел за испитивање условног учења (61). Посебан аспект у испитивању система за ноцицепцију је период сазревања овог система током постнаталног развоја. Сматра се да су прве три постнаталне недеље кључне за формирање рефлексног одговора типа отресања и лизања шапе и покрета оријентације на ноцицептивну драж и попримају форму реакције као код одраслих. (106). Наиме, ноцицептивни рефлекс и ћелије дорзалне ламине рецепторског поља код младих пацова имају снижен механички праг, повећану амплитуду одговора и трајања и сазревају после ПНД21. Nathaway и сарадници (107) сматрају да развој силазних путева за бол

можданог стабла има критичан период током четврте постнаталне недеље. То је период током којег опоидна сигнализација доживљава смену и из силазне фацилитације прелази у силазну инхибицију. Стога, податке добијене тестирањем до 4. постнаталне недеље и после овог периода треба сматрати као резултате добијене током финалног развоја сензорног система важног за перцепцију бола

Шнајдер и сарадници (75, 77, 108), али и Бамбини-Јуниор и сарадници (109), Гандал и сарадници (110), Маркрам и сарадници (111) су у својим истраживањима испитивали последице утицаја пренаталне примене валпроата на изазивање стања сличном аутизму на анималном моделу. До резултата које су детектовали на овим јединкама током испитивања су поремећаји у сензоримоторном сазревању, тактилне дисфункције, поремећај у перцепцији бола, али и измењено социјално понашање и меморија, повећање стереотипне активности и поремећај у развоју вокализације. Кинаст и сарадници (112) су уочили промене у организацији соматосензорног система су у основи промена сензорне перформансе на јединкама -5ХТТ кноцкоут пацова, пренатално изложеним селективним серотонинским инхибиторима поновног преузимања, али и код пацова изложеним валпроату. Одређено социјално понашање је снажно зависно од тога какви су социјални стимулуси примљени нпр. кроз вибрисе (код пацова). Хиперактивност у соматосензорном кортексу може допринети оштећењу у социјалном понашању у овим моделима. Закључује се да хиперактивност може допринети „замагљеним“ соматосензорним одговорима и редуковати социјалне интеракције, ако не представља компензаторни механизам за редуковани или дифузни сензорни инпут. На основу овога закључује се да оштећење сензорног система потомака јединки које су биле изложене валпроату имплицира квалитативно широк спектар поремећаја у понашању.

Резултати наших истраживања су у складу са наведеном литературом која указује да интраутерино излагање валпроату значајно утиче на ноцицептивни одговор јединки. Међутим, треба нагласити да у литератури нема података везано за модел који је спроведен у нашој студији (излагање различитим дозама валпроата током читавог интраутериног развоја) што даје на значају добијеним резултатима. Наша истраживања су по први пут показала да доза валпроата (којом су третиране мајке испитиваних јединки током гестације) значајно утиче на резултат у тесту вруће плоче. Прецизније речено, и код женки и код мужјака у ПНД25 доза од 50 мг/кг (телесне тежине мајке) није имала ефекта

на одговор у тесту, доза од 100 мг/кг је имала ефекта само на одговор потомства женског пола, док је доза од 200 мг/кг имала несумњивог ефекта код оба пола. Друго важно запажање јесте да се ефекат дозе од 50 мг/кг по први пут испољио тек у другом тестирању (ПНД32). Као и у случају друге две тестиране дозе (100 мг/кг и 200 мг/кг) и код мужјака и код женки одговор је наступио у значајно краћем временском оквиру у односу на прво тестирање (ПНД25), што је феноменолошки показано и у контролној групи. Овакав одговор експерименталних јединки ствара слику о евентуалном памћењу искуства из претходног излагања, што остаје да се детаљно испита у даљем раду поређењем резултата добијених на јединкама које су тестиране у ПНД25 и ПНД32 и резултата добијених на јединкама које су тесту вруће плоче први пут биле изложене у ПНД32.

Наша истраживања су по први пут указала да интраутерино излагање и малим дозама валпроата изазива суптилна оштећења система за перцепцију болног стимулуса и да ефекат малих доза може да се уочи тек након четврте недеље старости миша, када се очекује потпуна матурација сензорног система (107).

Средње и високе дозе валпроата, због саме јачине дејства, испољавају ефекат знатно раније. Испитивањем ефеката екстракта камилице на акутни бол у присуству и одсуству полних хормона на NMRI соју мишева Kesmatі и сарадника (113) потвђена је улога ових хормона у модификацији перцепције болне дражи и аналгетског ефекта опоида. На основу даље дискусије резултата добијених у нашим истраживањима (понашање у тесту уздигнутог лавиринта и тесту отвореног поља) видеће се да интраутерино излагање малим дозама валпроата има знатно веће ефекте на понашање потомства женског пола, што сходно претходно анализираним резултатима може да се доведе у везу са неадекватним развојем (тј. матурацијом) сензорног система и одређеним полно-специфичним последицама.

5.6. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту уздигнутог крстатстог лавиринта

Подаци добијени у нашим експериментима у тесту уздигнутог крстатстог лавиринта, на јединкама чије су мајке током гестације биле третиране различитим дозама валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг), указују да третман значајно утиче на одговор адолесцентног потомства оба пола, али без јасне дозне зависности.

Тест уздигнутог крстатог лавиринта је један од најпопуларнијих тестова за испитивање анксиозности лабораторијских животиња. Лавиринт се састоји од два отворена и два затворена крака, а за јединке које више времена проводе у отвореним крацима се сматра да показују мањи степен анксиозности у односу на оне које више времена проводе у затвореним крацима (65). Реакција у тесту уздигнутог лавиринта се, као и реакција у тесту отвореног поља, генерално базира на претпоставци да када се нађе у непознатој средини јединка избегава отворене површине због страха од грабљиваца или (у ширем смислу) страха од непознатих срединских фактора којима је лако доступна.

Наши експерименти су показали да излагање мајки током трудноће валпроату значајно утиче на понашање адолесцентних јединки (ПНД35) у тесту уздигнутог лавиринта, али да су ефекти различити код потомства мушког и женског пола. Наиме, код јединки мушког пола значајне промене у највећем броју параметара које указују на анксиозно понашање (смањени број улазака у отворене краке, краће време боравка у отвореним крацима, продужено време боравка у затвореним крацима и смањени интензитет нагињања) су детектоване код јединки чије су мајке током трудноће третиране валпроатом у дози од 400 мг/кг. Значајно краће време боравка у отвореним крацима на рачун боравка у затвореним крацима је детектовано и код јединки мушког пола чије су мајке третиране валпроатом у дози од 200 мг/кг. Овакви резултати недвосмислено указују да интраутерино излагање одређеним дозама валпроата интензивира појаву анксиозног понашања код потомства мушког пола у периоду адолесценције. Резултати су у складу са литературом према којој се пренатално излагање валпроату сматра новим моделом за аутизам (75). Осим повећане анксиозности карактеристике овог модела су мања осетљивост на болни стимулус, повећана локомоторна и стереотипна активност и промене

у социјалном понашању, мада су наведене промене у великој мери полно-специфичне (77). Неколико студија у којима су праћене последице примене валпроата у хуманој популацији указују да интраутерино излагање валпроату заиста носи велики ризик за промене у понашању потомства у смислу повећане инциденце настанка поремећаја у понашању сродних аутизму, који су често праћени анксиозним понашањем (114; 115). Има озбиљних индикација да интраутерино излагање валпроату доводи до развоја анксиозног понашања и интензивног памћења догађаја условљених страхом, услед хиперактивности и повећане синаптичке пластичности амигдала (111). Аутори претпостављају да је на ћелијском нивоу овакав ефекат последица дефицита у активности инхибиторних интернеурона у амигдалама, чији је задатак да смире активност ових можданих структура и да контролом активности регулишу и њихову синаптичку пластичност (116). Претпоставља се да промене постоје и у медијалном префронталном кортексу (мПФЦ), чији је задатак да контролише (тј. инхибира) активност амигдала путем ексцитаторних пројекционих неурона који инервишу инхибиторне неуроне амигдала (117). У прилог овој хипотези иду подаци да је mPFC хиперреактиван и хиперпластичан код потомства пренатално изложеног валпроату (93). Познати су и парадоксални резултати који указују да пренатално излагање валпроату значајно повећава пластичност неокортекса па би, самим тим, могло да побољша неке форме учења (118). Мужјаци пренатално изложени валпроату који у тесту уздигнутог лавиринта исказују анксиозно понашање имају значајно виши базални ниво кортикостерона у односу на контролне животиње, што указује на хиперактивност хипоталамичко-хипофизно-адреналне осовине (*енгл.* хзпотхаламо-питуитару-адренал (ХПА) ахис) код ових животиња (119; 77).

Изненађујући одговор су у тесту уздигнутог крстатог лавиринта су показале женке (ПНД35) чије су мајке током трудноће третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг. Код њих је овакав третман током интраутериног развоја имао анксиолитички ефекат на понашање у тесту (повећани број улазака у отворене краке, дуже време боравка у отвореним и карће време боравка у затвореним крацима, интензивно нагињање преко ивица отворених крака). Сходно литератури (120) овакав профил параметара у тесту уздигнутог лавиринта се тумачи као склоност ка ризичном понашању. У хуманој популацији овакво понашање се најчешће огледа у склоности ка сензационализму и наркоманији (121). Мада је полно-специфични утицај пренаталног излагања валпроату на понашање јединки већ описан у

литератури (77), ефекат који је детектован у нашој студији до сада није показан. У већ дискутованом истраживању је показано да пренатално излагање валпроату не изазива значајне промене у понашању женки у тесту уздигнутог лавиринта (77). Треба имати у виду да је у овој студији прибегнуто коришћењу високе дозе валпроата (600 мг/кг телесне тежине мајке) и третману трудних женки у 12,5 дану гестације, што такође може да утиче на карактеристичан бихејвиорални одговор потомства и да допринесе разлици у резултатима. Осим тога, потомство је тестирано у адултној фази (ПНД90-150), док је у нашим експериментима тестирање у тесту уздигнутог лавиринта рађено на адолесцентним животињама (ПНД35).

Образложење избора старости јединки у нашој студији се огледа у податку да је адолесцентна фаза период када јединке исказују повећану пријемчивост за новине и ризична понашања (122; 123). Има индикација да су адолесцентне јединке више истражују и да су мање анксиозне у новој средини у поређењу са адултним животињама (120; 124), али има и контрадикторних података (125). Треба напоменути да у нашим истраживањима нису показане разлике у понашању мужјака и женки у тесту уздигнутог лавиринта, што је у сагласности са литературом која указује да се полно-специфичне разлике у понашању у тесту уздигнутог лавиринта не уочавају да ране адултне фазе (126).

Према свему наведеном може се закључити да су резултати наших експеримената по први пут јасно указали да континуирана примена валпроата на женкама миша НМРИ соја током гестације може значајно да утиче на понашање потомства у адолесценцији у тесту уздигнутог лавиринта, и то на дозно- и полно-специфичан начин:

1. континуирана примена великих доза валпроата (200-400 мг/кг) током гестације изазива анксиозно понашање потомства мушког пола у периоду адолесценције,
2. континуирана примена малих доза валпроата (50 мг/кг) током гестације доводи до фаворизовања ризичног понашања потомства женског пола у периоду адолесценције.

Остаје да се детаљним скринингом потомства које је током интраутериног развоја било изложено дејству валпроата утврди у којој мери је третман повезан са одређеним

маладаптивним понашањима у хуманој популацији, са акцентом на потенцијална дејства малих доза валпроата, јер је за сада корелација утврђена само за повећану инциденцу настанка аутизму-сродних промена у понашању.

5.7. Утицај интраутериног излагања валпроату на понашање потомства у тесту отвореног поља

Резултати наших истраживања су показали да третман валпроатом током интраутериног развоја на комплексан начин ремети понашање адолесцентних животиња (ПНД40) у тесту отвореног поља. У зависности од анализираних параметра (локомоторна, стереотипна или вертикална активност) ефекат пренаталног излагања валпроату се огледа у фином нарушавању активности адолесцентних животиња у одређеном периоду боравка у отвореном пољу или у робусном мењању активности у највећем делу регистрационог периода.

У нашој студији животиње су у отвореном пољу регистроване 30 мин, што је довољно да се осим саме реакције на нову средину (за шта је довољно 5-10 мин) процени и ефекат хабитуације, тј. навикавања на нову средину, што се сматра једном од једноставних форми учења (127). Зато су резултати добијени у тесту отвореног поља, осим фактора третмана, анализирани и кроз фактор време боравка у експерименталном кавезу.

Интраутерино излагање валпроату није значајно изменило укупну локомоторну активност за 30 мин регистрациони период у групи мужјака, али ни у групи женки. С обзиром да базална локомоторна активност експерименталних животиња у тесту отвореног поља представља један од видова експлорације (тј. истраживања) нове средине, може се закључити да интраутерино излагање валпроату не утиче значајно на хоризонталну експлорацију животиња у тесту отвореног поља. Треба нагласити да је значајно мања активност у периоду 15-25 мин боравка у арени за тестирање уочена код женки које су током интраутериног развоја биле изложене валпроату у дози од 50 мг/кг и 100 мг/кг (телесне тежине мајке). Према теорији когнитивних мапа (128), када јединка истражује нову средину она конструише сопствену слику о тој средини у хипокампусу. Када мапа постане комплетна експлорација се редукује. У том смислу, може се

претпоставити да контролне и женке интраутерино изложене дејству валпроата имају различиту "унутрашњу слику" окружења, тј. да се утицај пренаталног излагања мањим дозама валпроата на адолесцентне јединке женског пола огледа у релативно мањем интересовању за детаљно испитивање нове средине. Оваква претпоставка је у складу са чињеницом да хабитуација на нову средину у оквиру једног теста (излагања) више служи као показатељ адаптабилности (129), док је за мера дуготрајне меморије понашање јединке при поновљеном излагању истој средини (*engl. intersession habituation*).

Други анализирани параметар понашања јединки у тесту отвореног поља је стереотипна активност. Наши резултати су показали да интраутерино излагање валпроату значајно смањује стереотипну активност адолесцентних јединки миша. Ефекат је био присутан и код мужјака и код женки. Познато је да је за стереотипну активност важан реципрочни баланс између нигростријаталног допаминергичког система и холинергичког система, у смислу да повећана стереотипија подразумева допаминергичку хиперактивност док је повећана активност холинергичког система у позитивној корелацији са моторном дисфункцијом. Претпостављамо да се у основи ефекта забележеног у нашим истраживањима налазе fine промене у допаминергичком сигналном систему који има кључну улогу у регулацији осцилаторне активности различитих можданих региона (130; 131). Слаба допаминска модулација кортико-стријато-таламо-кортикалних петљи може да утиче на слабљење неких моторних функција и да омета формирање недеklarативне меморије (132). Један од начина утицаја валпроата на стабилност допаминергичког система (посредством фолне киселине и тетрахидробиоптерина) је описан у подпоглављу 5.4.

Наши експерименти су показали да интраутерино излагање валпроату значајно повећава вертикалну активност адолесцентних јединки миша женског пола у тесту отвореног поља у првих 20 мин регистрационог периода, са акцентом на најмању дозу која је коришћена у експерименту (50 мг/кг). Код јединки мушког пола интензивнија вертикална активност у односу на контролну групу је примећена само у првих 10 мин регистрационог периода. Овакви резултати могу да указују на неадекватну обраду сензорних информација код јединки изложених дејству валпроата услед чега код њих интензивна експлораторна фаза траје знатно дуже него што је то случај са контролним животињама (127). Имајући у виду да је вертикална активност конвенционална

бихејвиорална мера експлораторне активности може се рећи да су ови резултати у складу са резултатима који су добијени на женкама у тесту уздигнутог лавиринта, где је утврђена повећана активност управо на групи женки чије су мајке током гестације биле третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг. У сваком случају, на основу добијених резултата је тешко прецизно закључити да ли се у њиховој основи налази повећано интересовање за нову средину или је реч о некој врсти патолошке хиперреактивности на нову средину. Наиме, осим аутистичних промена у понашању, има јасних индикација (133) да пренатално излагање валпроату може да изазове и хиперактивни поремећај, тј. комплексно стање поремећаја пажње са хиперактивношћу (*engl.* Attention-Deficit-Hyperactivity Disorder – ADHD).

6. ЗАКЉУЧЦИ РАДА

У складу са задатим циљевима и на основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. Континуирана примена различитих доза валпроата (50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 400 мг/кг) на женкама миша НМРИ соја у периоду приплода има негативан дозно-зависни утицај на фертилитет, а континуирана примена у периоду приплода и гестације на смртност женки (акцент на високим дозама). Третман нема значајног утицаја на телесну тежину женки.
2. Интраутерино излагање валпроату има негативан утицај на телесну тежину јединки током постнаталног развоја, укључујући период адолесценције. Третман је повезан и са кашњењем у отварању очију јединки у периоду до 15. дана постанаталног развоја.
3. Интраутерино излагање различитим дозама валпроата значајно утиче на понашање јединки у тесту усправљања. Сходно старости јединки ефекат третмана се огледа како у квалитету одговора на тест (У-, В- или А-тип окрета, тј. усправљања), тако и у времену које је потребно да се одређени тип окрета обави.
4. Интраутерино излагање валпроату значајно утиче на исход теста качења о реп када се јединке тестирају у периоду од 5. до 10. постнаталног дана (са акцентом на дозе 200 мг/кг и 400 мг/кг). Код јединки старих 15 постнаталних дана последице третмана нису уочене.
5. Интраутерино излагање валпроату значајно утиче на исход у тесту излагања врућој плочи јединки старих 25 и 32 постнатална дана. Ефекат се огледа у повећању броја јединки које неадекватно одговарају на тест, као и у продуженој латенци одговора на стимулус код јединки које адекватно одговоре на тест. Ефекат је уочен код јединки оба пола. Код контролних као и код јединки изложених валпроату значајно краће време одговора на стимулус је било у другом тестирању (ПНД32) у односу на прво (ПНД25). Посебан акценат је на најмањој тестираној дози валпроата (50 мг/кг), чије су последице у тесту излагања врућој плочи биле уочљиве тек код јединки старих 32 постнатална дана.

6. Излагање мајки током трудноће валпроату значајно утиче на понашање адолесцентног потомства (ПНД35) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта, а последице су дозно- и полно-специфичне. Код јединки мушког пола чије су мајке током гестације третиране валпроатом у дози од 400 мг/кг уочене су значајне промене у највећем броју параметара које указују на анксиозно понашање. Код јединки женског пола чије су мајке током гестације третиране валпроатом у дози од 50 мг/кг понашање у тесту уздигнутог лавиринта је указало да у овакав третман има анксиолитички ефекат.
7. Излагање мајки током трудноће валпроату значајно утиче на понашање адолесцентног потомства (ПНД40) оба пола у тесту отвореног поља. Сходно примењеној дози, ефекат се огледа у фином нарушавању анализираних параметара (локомоторна, стереотипна или вертикална активност) у одређеном периоду боравка у отвореном пољу. Издваја се утицај најмање примењене дозе валпроата (50 мг/кг) на вертикалну активност јединки (нарочито женки), у смислу повећања.

Примењени експериментални модел континуиране апликације валпроата током приплода и гестације на јединкама миша је у корелацији са његовом терапијском применом у третману епилепсија током трудноће у хуманој популацији. Резултати добијени у нашим истраживањима су јасно указали да последице интраутериног излагања валпроату зависе како од примењене дозе тако и од пола потомства. Од посебног значаја су показатељи да субтерапијске дозе валпроата примењене током гестације значајно утичу на психомоторни развој јединки. У методолошком смислу наши експерименти су показали да за правилно сагледавање последица интраутериног излагања валпроату мора да постоји адекватан опсег постнаталних старости јединки. Сходно чињеници да је метаболизам валпроата код јединки мишева убрзан у односу на метаболизам овог лека у хуманој популацији, критички приступ у апроксимацији података добијених из анималног модела миша на људску популацију је неопходан.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Hajnšek F. (1979). Epilepsije. Jugoslavenska Medicinska Naklada
2. Rektor I, Schachter SC, Arzy S, Baloyannis SJ, Bazil C, Brázdil M, Engel JJ, Helmstaedter G, Hesdorffer DC, Jones-Gotman M, Kesner L, Komárek V, Krämer G, Leppik IE, Mann MW, Mula M, Risse G, Stoker GW, Kasteleijn-Nolst Trenité D, Trimble M, Tyrliková I, Korczyn AD (2013) .Epilepsy, behavior, and art (Epilepsy, Brain, and Mind, part 1). *Epilepsy & Behavior* 28 261–282
3. www.ilae.org
4. Cross H. (2011). Fostering Epilepsy Care in Europe. *Epilepsia*. 52(1):187-8
5. Banerjee PN, Hauser WA. (2007) Incidence and Prevalence. In Engel J, Thimoty JR, Pedley A. *Epilepsy A Comprehensive Textbook* 2nd ed. RR Donnelley
6. Viinikainen K, Heinonen S, Eriksson K and Kalviainen R (2006) Community-based, prospective, controlled study of obstetric and neonatal outcome of 179 pregnancies in women with epilepsy. *Epilepsia* 47:186-192
7. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? (2009) *Reproductive Toxicology* 28: 1-10
8. Jentink J, Loane MA, Dolk H, Barisic I, Garne E, Morris JK, Lolkje E, de Jong-van den Berg TW. (2010). Valproic Acid Monotherapy in Pregnancy and Major Congenital Malformations. *N Engl J Med* 362: 2185-93
9. Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchová M. (2007) Valproic Acid, a Molecular Lead to Multiple Regulatory Pathways. *Folia Biol* 53(2):37-49
10. Loscher W. (2002). Basic Pharmacology of valproate: A review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*. 16(10):669-94
11. Henry TR. (2003). The clinical of Valproate in clinical Neuroscience. *Psychopharmacol Bull*. 37 Suppl 2:5-16
12. Monti B, Polazzi E, Contestabile A. (2009). Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Current Molecular Pharmacology* 2(1):95-109
13. Winterer G. (2003) Valproate and GABAergic System Effects. *Neuropsychopharmacology* 28, 2050–2051

14. Tung E, Winn L. (2011). Valproic Acid Increases Formation of Reactive Oxygen Species and Induces Apoptosis in Postimplantation Embryos: A Role for Oxidative Stress in Valproic Acid-Induced Neural Tube Defect *Molecular Pharmacology* 80 (6) 979-987
15. Pearce JM. (2002). Bromide, the first effective antiepileptic agent, *J Neurol. Neurosurgery Psychiatry* 72:412
16. López-Muñoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C. (2005). The history of barbiturates a century after their clinical introduction *Neuropsychiatr Dis Treat.* 1(4) : 329–343
17. Bialer M. (2012). Chemical properties of antiepileptic drugs *Advanced drug delivery Reviews* 64 887-895
18. Ghodke-Puranik Yogita, Thorn Caroline F, Lamba Jatinder K, Leeder J Steven, Song Wen, Birnbaum Angela K, Altman Russ B, Klein Teri E. (2013) "Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics" *Pharmacogenetics and genomics*
19. Johannessen C U, Johannessen S I (2003). Valproate: past, present, and future, *CNS Drug Reviews*, 9, 199–216
20. Terbach, N. and Williams, R. S. (2009). Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem. Soc. Trans.* 37 1126-1132
21. Brill J, Lee M, Zhao S, Fernald RD, Huguenard JR (2006) Chronic Valproic Acid Treatment Triggers Increased Neuropeptide Y Expression and Signaling in Rat Nucleus Reticularis Thalami. *The Journal of Neuroscience* 26(25):6813– 6822
22. Bourgeois B. F.D Valproate. In. Pellock J.M, Bourgeois B. F. D, Dodson E. W. *Pediatric Epilepsy. Diagnosis and Therapy.* 3rd ed. Demos Medical Publishing, New York, 2008, chapter 31
23. Nau, H. & Loscher, W. (1984). Valproic acid and metabolites: pharmacological and toxicological studies. *Epilepsia*, 25 14-22
24. Mao Q. (2008) BCRP/ABCG2 in the placenta: Expression, Function and regulation. Expert review. *Pharmaceuticals Research.* 25 (6) 1244-1255
25. Burckhardt G (2005). Polyspecific Organic Cation Transport: Insights into the Substrate Binding Site *Mol Pharmacol* 67:1391–1392
26. Prouillac C, Lecoœur S. (2010). The Role of the Placenta in Fetal Exposure to Xenobiotics: Importance of Membrane Transporters and Human Models for Transfer Studies. *Drug metabolism & Disposition* 38 (10) 1623-1635

27. Staud F, Cervený L, Cecková M (2012). Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *Journal of Drug Targeting*, Early Online: 1–28
28. Semczuk-Sikora A. (2010). Valproic acid transfer across human placental cotyledon during dual perfusion in vitro. *Ann Agric Environ Med*. 17 153–157
29. Genton P, Semah F, Trinká E. (2006). Valproic Acid in Epilepsy: Pregnancy-Related Issues. *Drug Safety*, 29 (1), 1
30. Ornoy A. (2009). Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive Toxicology*. 28: 1-10
31. Jentink J, Loane MA, Dolk H, Barisic I, Garne E, Morris JK, Lolkje E, de Jong-van den Berg TW. (2010). Valproic Acid Monotherapy in Pregnancy and Major Congenital Malformations. *N Engl J Med*. 362: 2185-93
32. Pennings JL, van Dartel DA, Robinson JF, Pronk TE, Piersma AH. (2011). Gene set assembly for quantitative prediction of developmental toxicity in the embryonic stem cell test. *Toxicology*. 284(1-3):63-71
33. www.eurocat-network.eu
34. Downing C, Biers J, Larson C, Kimball A, Wright H, Ishii T, Gilliam D, Johnson T. (2010). Genetic and maternal effects on valproic acid teratogenesis in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol Sci*. 116(2):632-9.
35. Lloyd KA. (2013). Scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons* doi: 10.1093/biohorizons/hzt003
36. Wu X, Wu Q, Peng Y, Yu D, Wang H, Chui D, Zhao J. (2013) Histone deacetylase inhibition leads to neuroprotection through regulation on glial function. *Molecular Neurodegeneration*, 8 49
37. Verrotti A, Scardapane A, Franzoni E, Manco R, Chiarelli F. (2008) Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy Res* 78:171–177
38. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20: 6969-6978

39. Wilffert B. (2011) From evidence based medicine to mechanism based medicine. Reviewing the role of pharmacogenetics. *International Journal of Clinical Pharmacy*. 33:3–9
40. Menegola E , Di Renzo F , Broccia ML , Giavini E . (2006) Inhibition of histone deacetylase as a new mechanism of teratogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. (4) 78
41. Bromley RL, Baker GA, Meador KJ. 2009 Cognitive abilities and behaviour of children exposed to antiepileptic drugs in utero. *Curr Opin Neurol*. 22(2):162-6
42. Nicolai J, Vles J, Aldenkamp A. (2008). Neurodevelopmental delay in children exposed to antiepileptic drugs in utero: a critical review directed at structural study-bias. *Journal of the Neurological Sciences* 271(1-2):1-14
43. Koren G, Nava-Ocampo AA, Moretti ME, Sussman R, Nulman I. (2006) Major malformations with valproic acid. *Canadian Family Physician*. 52(4): 441–447
44. de Jong M, Maina T. (2010). Of Mice and Humans: Are They the Same?—Implications in Cancer Translational Research. *J Nucl Med*. 51 (4) 501-504
45. van der Staay, F.J., Arndt, S.S., Nordquist, R.E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behavioral Brain Functions*, 5:11
46. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJS. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 28(5):931-7
47. Lemire, R.J., Loeser, J.D., Leech, R.W., Alvord, E.C.J., 1975. *Normal and Abnormal Development of the Human Nervous System*. Harper and Row, Hagerstown, MD
48. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. (2001). Translating developmental time across mammalian species *Neuroscience* Vol. 105 (1) 7-17
49. Le Roy I¹, Carlier M, Roubertoux PL. (2001) Sensory and motor development in mice: genes, environment and their interactions. *Behav Brain Res*. 125(1-2):57-64
50. Crawley JH. (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Research*. 835,18–26
51. Deliagina TG, Orlovsky GN, Zelenin PV, Beloozerova IN. (2006) Neural bases of postural control. *Physiology (Bethesda)*. 21:216-25

52. Vinay L, Ben-Mabrouk F, Brocard F, Clarac F, Jean-Xavier C, Perlstein E, Pflieger JF. (2005) Perinatal development of the motor systems involved in postural control. *Neural Plast* 4: 131–139
53. Massion J. (1992) Movement, posture and equilibrium: interaction and coordination. *Prog Neurobiol* 38: 35–56
54. Deliagina TG, Popova LB, and Grant G. (1997) The role of tonic vestibular input for postural control in rats. *Arch Ital Biol* 135: 239–261
55. Deliagina TG and Orlovsky GN. (2002) Comparative neurobiology of postural control. *Curr Opin Neurobiol* 12: 652–657
56. Pellis SM, Pellis VC. (1994). Development of righting when falling from a bipedal standing posture: evidence for the dissociation of dynamic and static righting reflexes in rats. *Physiol Behav.* 56(4):659-63
57. O'Leary OF, Cryan JF; (2009) 'The tail suspension test: A model for characterizing antidepressant activity in mice' In: Todd Gould (eds). *Mood & Anxiety Related Phenotypes in Mice; Neuromethods*. USA: Springer
58. Castagne, V., Moser, P., Roux, S., and Porsolt, R. D. (2011). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 5:Unit 5.8.
59. Loeser JD, Treede RD. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*.137(3):473-7.
60. Landa L. (2012) Pain in domestic animals and how to assess it: a review. *Veterinari Medicina* 57 (4): 185–192
61. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SM. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 597–652
62. Gunn A, Bobeck EN, Weber C, Morgan MM. (2011). The Influence of Non-Nociceptive Factors on Hot Plate Latency in Rats. *J Pain* 12: 222-227
63. Bolivar VJ. (2009). Intrasession and intersession habituation in mice: from inbred strain variability to linkage analysis. *Neurobiol Learn Mem* 92(2):206–14.
64. Carobrez AP, Bertoglio LJ, (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(8):1193-205.

65. Walf AA, Frye CA. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2: 322 – 328
66. Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME. (2000) Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and $3\alpha,5\alpha$ -THP. *Pharmacol Biochem Behav*. 67:587–596
67. File SE, Zangrossi H, Jr, Sanders FL, Mabbutt PS. (1994) Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 113:543–546.
68. Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. (1999) Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav*. 68:47–53.
69. Vorhees CV. Behavioral teratogenicity of valproic acid: selective effects on behavior after prenatal exposure to rats. *Psychopharmacology* 1987; 92(2): 173-179
70. Ong LL, Schardein JL, Petrere JA, Sakowski R, Jordan H, Humphrey RR, Fitzgerald JE, de la Iglesia FA. (1983). Teratogenesis of calcium valproate in rats. *Fundam Appl Toxicol*. 3(2):121-6
71. Wagner GC, Reuhl KR, Cheh M, McRae P, Halladay AK. (2006). A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord*. 36(6):779-93.
72. Frisch C, Hüsck K, Angenstein F, Kudin A, Kunz W, Elger CE, Helmstaedter C. (2009). Dose-dependent memory effects and cerebral volume changes after in utero exposure to valproate in the rat. *Epilepsia*. 50(6):1432-41
73. Rouillet FI, Wollaston L, Decatanzaro D, Foster JA. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*. 13;170(2):514-22.
74. Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostick U, Hofmann C, Hustert E, Boncinelli E, Balling R, Nadeau JH. (2000). A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Hum Mol Genet*. 9(2):227-36.

75. Schneider T, Pzewlocki R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 30(1):80-9
76. Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Le Guisquet AM, Garreau L, Ternant D, Bodard S, Jaumain E, Gulhan Z, Belzung C, Andres CR, Chalon S, Guilloteau D. Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism. *Neurosci Lett*. 470(1):55-9.
77. Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, Przewlocki R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*. 33(6):728-40.
78. James RC, Roberts SM, Williams PL. General Principles of Toxicology. In Williams PL, James RC, Roberts SM, ed. *Principles of toxicology*. 2nd ed. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc; 2000 Chapter 1
79. Clarac F, Vinay L, Cazalets JR, Fady JC, Jamon M. (1998). Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews* 28, 35-43
80. Verrotti A, Scardapane A, Franzoni E, Manco R, Chiarelli F. (2008) Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy Res* 78:171–177
81. Roste SL, Tauboll E, Isojärvi JI, Pakarinen AJ, Huhtaniemi IT, Knip M, Gjerstad L. (2002). Effects of chronic valproate treatment on reproductive endocrine hormones in female and male Wistar rats. *Reprod Toxicol*. 16(6):767-73.
82. Bath KG, Scharfman HE. (2013). Impact of early life exposure to antiepileptic drugs on neurobehavioral outcomes based on laboratory animal and clinical research. *Epilepsy Behav.* ;26(3):427-39.
83. www.ratbehavior.org
84. Kultima K¹, Nyström AM, Scholz B, Gustafson AL, Dencker L, Stigson M. (2004). Valproic acid teratogenicity: a toxicogenomics approach. *Environ Health Perspect*. 12(12):1225-35.
85. Lloyd KA. (2013). A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons* 6. doi: 10.1093/biohorizons/hzt003

86. Allam AA, Abdul-Hamid M, Bakry A, El-Ghareeb A, Ajarem JS, Sabri M. (2013). Acrylamide Disrupts the Ontogeny of Neurobehaviour in Albino Rats. *Life Science Journal* 10(3)
87. Altman J, Sudarshan K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim Behav.* 23(4):896-920
88. Walton KD, Harding S, Anshel D, Harris YT, Llinas R. (2005). The effects of microgravity on the development of surface righting in rats. *J. Physiol.* 565, 593–608
89. Kini U. (2006). Fetal valproate syndrome: a review. *Paed Perinat Drug Ther.* 7:123–130
90. Fox MW. (1964) . Reflex-Ontogeny and Behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 13, 2-3.
91. Pellis SM (1996) Righting and the modular organization of motor programs. In K-P Ossenkopp, M Kavaliers, PR Sanberg (Eds) *Measuring movement and locomotion: From invertebrates to humans.* RG Landes, Austin Texas, 115–133.
92. Poucet B., Lenck-Santini P. P., Paz-Villagrán V. and Save E. (2003) "Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review," *J Physiol Paris.* 97(4-6), 537-546
93. Martin H.G.S, Manzoni O.J, (2014). Late onset deficits in synaptic plasticity in the valproic acid rat model of autism *Front Cell Neurosci.*8: 23.
94. Hara Y., Maeda Y., Kataoka S., Ago Y., Takuma K., Matsuda T. (2012). Effect of prenatal valproic acid exposure on cortical morphology in female mice. *J. Pharmacol. Sci.* 118, 543–546
95. Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol.* 22(3):319-24.
96. Gottfried C, Bambini-Junior V, Baronio D, Zanatta G, Silvestrin R.B, Vaccaro T, Riesgo R. (2013). Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. In: Gottfried C, Bambini-Junior V, Baronio D, Zanatta G, Silvestrin R.B, Vaccaro T, Riesgo R. "Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I", ed. Michael Fitzgerald, CC BY, Chapter 8

97. Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., and Hempstead, B.L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29, 12764–12767.
98. Cryan J. F., Mombereau C., Vassout A. (2005). The tail suspension test a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 571–625
99. Lad H. V, Liu L, Paya-Cano J, Fernandes C, Schalkwyk L.C. (2007) Quantitative traits for the tail suspension test: automation, optimization, and BXD RI mapping. 18:482–491
100. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. (1985). The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 85, 3, 367-370
101. Duman (2010). Models of depression. *Vitamins and Hormones.* Gerald Litwack, Elsevier. Chapter 1
102. Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. (2010). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Pharmacol.* Chapter 5:Unit 5.8.
103. Homma D, Sumi-Ichinose C, Tokuoka H, Ikemoto K, Nomura T, Kondo K, Katoh S, Ichinose H. (2011), Partial Biopterin Deficiency Disturbs Postnatal Development of the Dopaminergic System in the Brain. *J. Biol. Chem.* 286:1445-1452.
104. Wishaw, I. Q., Haun, F., & Kolb, B. (1999). Analysis of behavior in laboratory rodents. In U. Windhorst & H. Johansson (Eds.), *Modern techniques in neuroscience research* (pp. 1243–1271). Berlin: Springer
105. Plone MA, Emerich DF, and Lindner MD (1996) Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. *Pain* 66:265–270.
106. Holmberg H, Schouenborg J. (1996). Postnatal development of the nociceptive withdrawal reflexes in the rat: a behavioural and electromyographic study. *Journal of Physiology.* 493 (1) 239-252
107. Hathway G, Vega-Avelaira D, Fitzgerald M. (2012). A critical period in the supraspinal control of pain: Opioid-dependent changes in brainstem rostroventral medulla function in preadolescence. *Pain* 153, 775–783

108. Schneider T, Turczak J, Przewłocki R. (2006). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology*. 31(1):36-46.
109. Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C.(2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res*. 2011 Aug 23;1408:8-16.
110. Gandal M. J., Edgar J. C., Ehrlichman R. S., Mehta M., Roberts T. P. L., Siegel S. J. (2010). Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol. Psychiatry* 68,
111. Markram H., Rinaldi T., Markram K. (2007). The intense world syndrome—an alternative hypothesis for autism. *Front. Neurosci*. 15:6
112. Kinast K, Peeters D, Kolk S.M, Schubert D, Homberg J.R. (2013)Genetic and pharmacological manipulations of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. doi:10.3389/fncel.2013.00072
113. Kesmati M, Barfinejad N, Moghadam H.F. (2007) Effect of *matricaria recutita* on acute pain in the presence and absence of sex hormones.*JRUS*. 12(4) 190-197
114. Christensen J, Gronborg T, Sorensen M, Schendel D, et al. (2013) Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 309:1696–1703.
115. Meador K, Loring D: Risks of in utero exposure to valproate [editorial]. *JAMA* 2013;309 (April 24):1730–1731.
116. Shaban H, Humeau Y, Herry C, Cassasus G, Shigemoto R, Ciocchi S et al (2006). Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 9: 1028–1035.
117. Quirk G.J, Likhtik E, Pelletier J.G, Pare D. (2003). Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Decreases the Responsiveness of Central Amygdala Output Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 23(25):8800–8807

118. Rinaldi, T., Kulangara, K., Antonello, K., and Markram, H. (2007). Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 13501–13506
119. Takahashi LK¹, Kalin NH. (1991). Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups. *Brain Res.* 558(1):75-8
120. Macri S, Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. (2002) Risk taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behaviour.* 64:541–546.
121. Wills, T.A., Sandy, J.M., Shinar, O, (1999). Cloninger's constructs related to substance use level and problems in late adolescence: a mediational model based on self-control and coping motives. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 7, 122–134.
122. Spear, L.P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24: 417–463.
123. Spear LP. (2007) Assessment of adolescent neurotoxicology: Rationale and methodological considerations. *Neurotoxicology and Teratology.* 29:1–9.
124. Stansfield KH, Kirstein CL. (2006). Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Developmental Psychobiology.* 48:10–15.
125. Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP. (2003) Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 75:411–418.
126. Estanislau C, Morato S. (2006) Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: Prenatal stress effects. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 24:255–262.
127. Bolivar VJ. (2009) Intrasession and intersession habituation in mice: from inbred strain variability to linkage analysis. *Neurobiol Learn Mem* 92(2):206–14.
128. O'Keefe J, Nadel L. (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map.* Oxford: Clarendon Press
129. Muller, U., Cristina, N., Li, Z. W., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Rulicke, T., et al. (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified betaamyloid precursor protein gene. *Cell*, 79, 755-765.

130. Costa R.M, Lin S.C, Sotnikova T, Cyr M, Gainetdinov R, Caron M, Nikolelis M.A. L. (2006). Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction. *Neuron*. 52, 359-369
131. Dzirasa K, Ribeiro S, Costa R, Santos LM, Lin SC, Grosmark A, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MA. (2006) Dopaminergic control of sleep-wake states. *J Neurosci*. 26(41) :10577-89
132. Sagvolden T, Johansen EB, Aase H, Russell VA (2005): A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci* 28:397– 419
133. Cohen MJ, Meador KJ, Browning N, Baker GA, Clayton-Smith J, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB, Privitera M, Loring DW. (2011) Fetal antiepileptic drug exposure: Motor, adaptive, and emotional/behavioral functioning at age 3 years. *Epilepsy Behav*. 22:240–246.

VIII
ПРИЛОГ И
БИОГРАФИЈА
АУТОРА СА
БИБЛИОГРАФИЈОМ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број: РБ	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска публикација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	Докторска дисертација
Аутор: АУ	Јелена Подгорац
Ментор/коментор: МН	Др сци. мед. Слободан Секулић
Наслов рада: НР	Утицај примене валпроичне киселине током приплода и гестације на анималном моделу миша - ефекат на психомоторни развој код потомака
Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	Српски/Енглески
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Шумадијски округ
Година: ГО	2014
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000 Крагујевац, Улица Светозара Марковића број 69
Физичи опис рада: ФО	133/11/16/34/133

Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Неуронауке
Предметна одредница/ кључне речи ПО	валпроинска киселина, гестација, психомоторни развој, анимални модел
Извод: ИД	<p>Циљ. Основни циљ ове докторске дисертације је био да се испитају последице интраутериног излагања различитим дозама валпроата на ток физичког и психомоторног развоја јединки миша. Испитивани су ефекти валпроата на ЦНС-у у субтерапијским дозама и дозно-зависни ефекат. Тестови примењени на потомству су у литератури окарактерисани као одговарајући за процену стања моторног и сензорног система у одређеној фази постнаталног развоја. Одређени тестови, поред опште моторне способности, омогућавали су и процену понашања типа анксиозности / депресије, хипер- и хипоактивности јединки.</p> <p>Методе. У експериментима су коришћене женке и мужјаци здравих лабораторијских мишева соја НМРИ, одабране методом случајног избора из окота на Војномедицинској академији у Београду. Експеримент је почињао спаривањем две женке и једног мужјака у једном кавезу. Сходно третману, оформљено је 5 експерименталних група и то једна контролна (n=9 женки), која је била третирана физиолошким раствором (Natrii Chloridi Infundibule 0,9%, HemofarmhospitalLogica), и 4 групе које су третиране валпроатом (Valproic acid sodium salt – 2 propylpentanoic sodium, ≥98, P4543 Sigma Aldrich) у дози од 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг или 400 мг/кг (n=10-11 женки по групи). Натријумова со валпроинске киселине растварана је у физиолошком раствору. Инјектирање је обављано свакодневно, од момента спаривања, током читавог периода приплода и гестације.</p>

Након рађања потомства третман је престајао и женке су са својим потомством одвајане у засебне кавезе. Приступ храни и води је био неограничен.

Процењиван је одговор потомства у следећим тестовима: (1) тест рефлекса усправљања, (2) тест качења о реп, (3) тест излагања врућој плочи, (4) тест уздигнутог крстастог лавиринта, (5) тест отвореног поља

Резултати. Континуирана примена различитих доза валпроата (50, 100, 200 и 400 мг/кг) на женкама миша НМРИ соја у периоду приплода има негативан дозно-зависни утицај на фертилитет, а континуирана примена у периоду приплода и гестације на смртност женки (акцент на високим дозама). Третман нема значајног утицаја на телесну тежину женки.

Интраутерино излагање валпроату има негативан утицај на телесну тежину јединки током постнаталног развоја, укључујући период адолесценције. Третман је повезан и са кашњењем у отварању очију јединки у периоду до 15. дана постнаталног развоја.

Интраутерино излагање различитим дозама валпроата значајно утиче на понашање јединки у тесту усправљања. Сходно старости јединки ефекат третмана се огледа како у квалитету (типу) одговора и у времену које је потребно јединки да се усправи.

Третман валпроатом током пренаталног периода утиче на исход теста качења о реп када се јединке тестирају у периоду од 5. до 10. постнаталног дана (са акцентом на дозе 200 мг/кг и 400 мг/кг). Код јединки старих 15 постнаталних дана последице третмана нису уочене.

Интраутерино излагање валпроату значајно утиче на исход у тесту излагања врућој плочи јединки старих 25 и 32 постнатална

дана. Ефекат се огледа у повећању броја јединки које неадекватно одговарају на тест, као и у продуженој латенци одговора на стимулус код јединки које адекватно одговоре на тест.

Излагање мајки током трудноће валпроату значајно утиче на понашање адолесцентног потомства (ПНД35) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта, а последице су дозно-и полно-специфичне. У тесту отвореног поља (ПНД40), излагање мајки током трудноће валпроату значајно утиче на понашање адолесцентног потомства оба пола. Сходно примењеној дози, ефекат се огледа у фином нарушавању анализираних параметара (локомоторна, стереотипна или вертикална активност) у одређеном периоду боравка у отвореном пољу.

Закључак. Примењени експериментални модел континуиране апликације валпроата током приплода и гестације на јединкама миша је у корелацији са његовом терапијском применом у третману епилепсија током трудноће у хуманој популацији. Резултати добијени у нашим истраживањима су јасно указали да последице интраутериног излагања валпроату зависе како од примењене дозе тако и од пола потомства. Од посебног значаја су показатељи да субтерапијске дозе валпроата примењене током гестације значајно утичу на психомоторни развој јединки. У методолошком смислу наши експерименти су показали да за правилно сагледавање последица интраутериног излагања валпроату мора да постоји адекватан опсег постнаталних старости јединки. Сходно чињеници да је метаболизам валпроата код јединки мишева убрзан у односу на метаболизам овог лека у хуманој популацији, критички приступ у апроксимацији података добијених из анималног модела миша на људску популацију је неопходан.

УДК	
Чува се: ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Република Србија
Важна напомена: МН	
Датум прихватања теме од стране ННВ: ДП	02.04.2013.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: КО	<p>1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник</p> <p>2. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан,</p> <p>3. Др Десанка Милановић, научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, члан</p>

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Documentation type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Jelena Podgorac
Menthor/co-mentor MN	Dr sci. med. Slobodan Sekulić, MD, PhD
Title: TI	Influence of valproic acid application during breeding and gestation in the mouse animal model - effect on psychomotor development in offspring
Language of text: LT	Serbian (cyrilic)
Language of abstract:	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Šumadija manucipality
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author`s reprint
Publication place: PP	34000 Kragujevac, Svetozara Markovica Street, 69
Physical description	133/11/16/34/133

PD	
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Neuroscience
Subject/key words: SKW	valproate, gestation, psychomotor development, animal model
Abstract: AB	<p>Objective. The aim of this study was to examine the effects of intrauterine exposure to different doses of valproate on the course of physical and psychomotor development of mouse. The effects of valproate in the CNS was evaluated at subtherapeutic doses and dose-dependent effect.</p> <p>The tests applied to the offspring in the literature are labeled as suitable for the assessment of motor and sensory system at a certain stage of postnatal development. Certain tests, in addition to general motor skills, allowed the assessment of behavioral state as anxiety / depression, hyper-and hypo-activity of offspring.</p> <p>The study was done on adult female NMRI mice. Four experimental and one control group was formed. Females were treated with subcutaneous injection of 50, 100, 200 and 400 mg/kg VPA (Valproic acid sodium salt – 2 propylpentanoic sodium, ≥98, P4543 Sigma Aldrich) or with saline (Natrii Chloridi Infundibule 0,9%, HemofarmhospitalLogica) (control group). All treatments were performed during breeding and whole gestation period. Mice were given ad libitum access to food and water. The offspring was examined in tests:</p> <p>(1) Righting test, (2) Tail suspension test, (3) Hot plate test, (4) Elevated plus maze test and (5) Open field test</p> <p>Results: Different doses of VPA (50, 100, 200 and 400 mg/kg) continuously applied on female NMRI mice during breeding and whole</p>

gestation caused female mortality and lower fertility dose-dependent effect. Treatment had no influence on female body weight.

In utero exposure to valproate has a negative impact on body weight of individuals during postnatal development, including the adolescence. Treatment is associated with a delay in eye-opening at the 15th postnatal day (PND).

Prenatal exposition to different doses of VPA significantly influence on offspring behaviour in righting reflex. Regarding the critical developmental postnatal points, treatment influence on type response and latency during righting reflex testing.

VPA treatment during gestation affect outcome of tail suspension test at the 5th and 10th PND (regarding the doses of 200 and 400mg/kg). There are no consequences in treated groups in tst at 15th PND.

VPA exposition in utero distinctly influence on outcome during hot plate testing at 25th and 32nd PND. Increased percent of inadequately response and extended latency in adequate response of treated mice was obtained in hot plate test.

Offspring which mothers were treated with VPA shown different pattern of behaviour (dose- and gender- dependent) during adolescence in elevated plus maze test (PND 35). Mice prenataly exposed to VPA during adolescence (PND40), represent significant differences during locomotor, stereotypic and vertical activity in the open field test.

Conclusion: Experimental model of continuous application of VPA during breeding and gestation on mice is congruent with therapeutic application in epilepsy treatment during pregnancy in human population. Obtained results in this study indicate that exposure to VPA induce the effect which is dose- and

	gender-dependent. A subtherapeutic doses applied during gestation significantly influence on the course of psychomotor development. Methodologically, this experiments had shown that the consequences of exposition to valproate in-utero must be examined during adequate postnatal period. Mice has higher rate of VPA metabolism compared with the human rate. Regarding this fact, critical approach must be considered in approximation of the results obtained from animal model of mice to human population.
UDC	
Holding data: HD	Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia
Note: N	
Accepted by the Scientific Board on: ASB	02.04.2013.
Defended on: DE	
Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) DB	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof Vladimir Jakovljević, PhD, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, member president 2. Prof Dragan Milovanović, PhD, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Clinical Pharmacology with Toxicology, member, 3. Prof Desanka Milovanović, PhD, Principal Research Fellow, Institute for Biological Research University of Belgrade, scientific domain: Neurobiology, member

8.3. БИОГРАФИЈА АУТОРА

1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Име и презиме: Јелена Подгорац

Датум и место рођења: 13..1979. године, Београд, Република Србија

Адреса: Скендера Куленовића, Београд

Телефон: 063/7297076

2. ОБРАЗОВАЊЕ

Шеста београдска гимназија,

Медицински Факултет у Београду, дипломирала 2007. године

3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА

Енглески (виши ниво), немачки (средњи ниво) и француски (основни ниво)

4. РАДНО ИСКУСТВО

Истраживач сарадник, одељење за Неурофизиологију, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, Београд

5. РАЗНО

Почетком 2008. године започела је као стручни сарадник ангажовање на пројекту Министарства науке П143021: „Ефекти трауматских, неуротоксичних и неуропротективних фактора на електричну активност мозга сисара. Анализа и моделирање“ у Лабораторији за електрофизиологију, Одељења за Неурофизиологију, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. Од фебруара 2010. године запослена је као истраживач сарадник. Године 2011. ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије П175006: „Неуролошки развој код пренаталне изложености плода антиепилептичној терапији“. У оквиру Европске сарадње у области научног и техничког истраживања Јелена Подгорац се активно укључила у два пројекта из домена биомедицине: COST Action BM0601 (NeuroMath) i BM0605 (On Consciousness). Похађала је међународну летњу школу о различитим приступима изучавања свести, Корзика 2009. Године 2010. била је учесник летње школе „Brain computer interface“ у Патрасу. Одржала је два предавања “Animal models of

depression” и “Toxic effect of antiepileptic drugs on cerebellum“ 2010. и 2011. године у оквиру „Brain Awareness Week“. Године 2012. у оквиру „Stress and Behavior Conference” St. Petersburg одржала је предавање „The effect of valproic acid on neurodevelopment of mice during pregnancy”. Учесник великог броја еминентних домаћих и иностраних конгреса. Члан Друштва за Неуронауке Републике Србије.

8.4. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови штампани у међународним часописима:

1. Martać Lj, **Podgorac J**, Sekulić S, Čapo I. Animal model of neurodegeneration and stress cause by aluminum toxicity. American journal of Bioscience. 2014; 2 (2) 28-31
2. Sekulić S, Keković G, Filipović D, Drapšin M, **Podgorac J**, Martać Lj, Novakov-Mikić A. Monitorig the progressive increase of the longest episode of the spontaneous movements in guinea pig fetus. Arch. Biol. Sci. 2013; 65 (4) 1459-1462
3. Sekulić S, Ilinčić M, Radeka G, Novakov-Mikić A, **Podgorac J**, Keković G. Breech presentation and the cornu-fundal location of the placenta. Croat Med J 2013; 54:198-202
4. Sekulić S, **Podgorac J**, Keković G, Žarkov M, Kopitović A. Significance of adequate postural control in the appearance of habitual upright. Medical Hypotheses; 2012; 79 564-571
5. Sekulic S, Bozic A, Zarkov M, Kekovic G, **Podgorac J**, Novakov-Mikic A, Martac L, Barna T, Milovanovic A, Pusic I, Stojanovic D, Pepelcevic N. Changes in the anterior presentation in sheep fetuses due to their ventro-sacral position in the second half of gestation. Philippine Journal of Veterinary Medicine 2012; 49: 51-56
6. Kekovic G, Sekulic S, **Podgorac J**, Sakac D, Markovic J. Linear Analysis of Epileptic Forms in the Electroencephalogram. Neurophysiology. 2012; 44 (6): 474-478
7. Keković G, Sekulić S, **Podgorac J**, Mihaljev-Martinov J, Gebauer-Bukurov K. The slow and infraslow oscillations of cortical neural network. Neurology, Psychiatry and Brain Research 2012; doi: 10.1016/j.npbr.2012.04.003
8. Martać Lj, **Podgorac J**, Sekulić S. Evaluation of the neurotoxic effect of aluminium on the wistar rat. Archives of Biological Sciences 2010; 62: 585-588

9. Martac Lj, Grbic G, Kekovic G, **Podgorac J**, Culic M, Sekulic D, Lalosevic D, Capo I. Spectral changes of brain activity in offspring of rats exposed to aluminium during gestation and lactation. Archives of Biological Sciences 2010; 62 (1): 9-13
10. Kekovic G, Stojadinovic G, Martac Lj, **Podgorac J**, Sekulic S, Culic M. Spectral and fractal measures of cerebellar and cerebral activity in various types of anaesthesia. Acta Neurobiol Exp 2010; 70:1-9
11. Čulić M, Keković K, Grbić G, Martać M, Soković M, **Podgorac J**, Sekulić S. Wavelet and fractal analysis of rat brain activity in seizures evoked by camphor essential oil and 1,8-cineole. Gen Physiol Bioph, Special Issue 2009; 28: 33-40

Рад штампан у домаћем часопису:

1. **Podgorac J**, Čapo I, Sekulić S, Pepelčević N, Martać Lj, Keković G. Funkcija serotoninских receptora I njihov uticaj na ponašanje. MD- Medical Data 2012 4(2): 167-170

8.5. AUTHORS CURRICULUM VITAE

1. PERSONAL DATA

Name and surname: Jelena Podgorac

Date and place of birth: 13.05.1979. Beograd, Serbia

Address : Skendera Kulenovića 4/5, Beograd

Phone : +381637297076

2. EDUCATION

Sixth Belgrade Grammar School,

Medical Faculty, University of Belgrade, graduated - 2007.

3. FOREIGN LANGUAGE

English (advanced) , German and French language (basic)

4. WORK EXPERIENCE

Research Assistant Department of Neurophysiology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Belgrade

5. MISCELLANEOUS

- 2008. engaged as Research Assistant on Project of Ministry of Science and Technology, P14302: "Effect of traumatic, neurotoxic and neuroprotective factors on electrical activity of mammalian brain. Analysis and modeling." Laboratory for Neurophysiology, Institute for Biological Research
- 2011. engaged as Research Assistant on Project of Ministry of Science and Technology, P175006: "Prenatal exposition fetuses to antiepileptic therapy and neurological development". Laboratory for Neurophysiology, Institute for Biological Research
- 2008.-2011. Participated in COST Action BM0601 (NeuroMath)
- 2008.-2011. Participated in COST Action BM0605 (On Consciousness).
- 2009. Summer School for PhD students "On Consciousness", Corsica, France
- 2010. Summer School for PhD students "Brain computer interface", Patras, Greece

- 2010. “Animal models of depression” „Brain Awareness Week“
- 2011. “Toxic effect of antiepileptic drugs on cerebellum“ „Brain Awareness Week“
- 2012. „The effect of valproic acid on neurodevelopment of mice during pregnancy”, Stress and behaviour Conference, St. Petersburg

Participant in large number of eminent national and international congresses. Member of the Serbian Neuroscience Society.

8.6. LIST OF PUBLICATIONS

ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS

1. Martać Lj, **Podgorac J**, Sekulić S, Čapo I. Animal model of neurodegeneration and stress cause by aluminum toxicity. *American journal of Bioscience*. 2014; 2 (2) 28-31
2. Sekulić S, Keković G, Filipović D, Drapšin M, **Podgorac J**, Martać Lj, Novakov-Mikić A. Monitoring the progressive increase of the longest episode of the spontaneous movements in guinea pig fetus. *Arch. Biol. Sci.* 2013; 65 (4) 1459-1462
3. Sekulić S, Ilinčić M, Radeka G, Novakov-Mikić A, **Podgorac J**, Keković G. Breech presentation and the cornu-fundal location of the placenta. *Croat Med J* 2013; 54:198-202
4. Sekulić S, **Podgorac J**, Keković G, Žarkov M, Kopitović A. Significance of adequate postural control in the appearance of habitual upright. *Medical Hypotheses*; 2012; 79 564-571
5. Sekulic S, Bozic A, Zarkov M, Kekovic G, **Podgorac J**, Novakov-Mikic A, Martac L, Barna T, Milovanovic A, Pusic I, Stojanovic D, Pepelcevic N. Changes in the anterior presentation in sheep fetuses due to their ventro-sacral position in the second half of gestation. *Philippine Journal of Veterinary Medicine* 2012; 49: 51-56
6. Kekovic G, Sekulic S, Podgorac J, Sakac D, Markovic J. Linear Analysis of Epileptic Forms in the Electroencephalogram. *Neurophysiology*. 2012; 44 (6): 474-478
7. Keković G, Sekulić S, **Podgorac J**, Mihaljev-Martinov J, Gebauer-Bukurov K. The slow and infraslow oscillations of cortical neural network. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 2012; doi: 10.1016/j.npbr.2012.04.003
8. Martać Lj, **Podgorac J**, Sekulić S. Evaluation of the neurotoxic effect of aluminium on the wistar rat. *Archives of Biological Sciences* 2010; 62: 585-588
9. Martac Lj, Grbic G, Kekovic G, **Podgorac J**, Culic M, Sekulic D, Lalosevic D, Capo I. Spectral changes of brain activity in offspring of rats exposed to aluminium during gestation and lactation. *Archives of Biological Sciences* 2010; 62 (1): 9-13

10. Kekovic G, Stojadinovic G, Martac Lj, **Podgorac J**, Sekulic S, Culic M. Spectral and fractal measures of cerebellar and cerebral activity in various types of anaesthesia. *Acta Neurobiol Exp* 2010; 70:1-9
11. Čulić M, Keković K, Grbić G, Martać M, Soković M, **Podgorac J**, Sekulić S. Wavelet and fractal analysis of rat brain activity in seizures evoked by camphor essential oil and 1,8-cineole. *Gen Physiol Bioph*, Special Issue 2009; 28: 33-40

8.7. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>	
Име и презиме:	Јелена Подгорац
Датум и место рођења:	13.05.1979. Београд , Република Србија
Садашње запослење:	Истраживач сарадник, одељење за Неурофизиологију, Институт за биолошка истраживања, Универзитет у Београду, Београд
<i>II. Докторска дисертација</i>	
Наслов:	Утицај примене валпроичне киселине током приплода и гестације на анималном моделу миша - ефекат на психомоторни развој код потомака
Број страница:	133
Број слика:	11
Број табела:	16
Број графикона:	34
Број библиографских података:	133
Установа и место где је рад израђен:	Лабораторија за фармакологију са токсикологијом, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад Лабораторија за Неуробиологију, Институт за биолошка истраживања, Универзитет у Београду, Београд
Научна област (УДК):	Медицина, Неуронауке
Ментор:	Др сци.мед. Слободан Секулић
<i>III. Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме:	30.08.2012. године

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	177/11 02.04.2013. године
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	Проф. др Драган Миловановић, председник Проф. др Владимир Јаковљевић, члан Др сци. мед. Слободан Секулић, члан
Комисија за оцену докторске дисертације:	Проф. др Владимир Јаковљевић, председник Проф. др Драган Миловановић, члан Др Десанка Миловановић, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације:	Проф. др Владимир Јаковљевић, председник Проф. др Драган Миловановић, члан Др Десанка Миловановић, члан
Датум одбране дисертације:	