

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Željko Z. Pavković

**EFEKTI ANESTEZIJE INDUKOVANE
PROPOFOLOM NA SINAPTIČKU
PLASTIČNOST, AKTIVNOST
DOPAMINSKOG SISTEMA I
PONAŠANJE JUVENILNIH PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Željko Z. Pavković

**THE EFFECTS OF PROPOFOL INDUCED
ANESTHESIA ON SYNAPTIC
PLASTICITY, DOPAMINERGIC SYSTEM
ACTIVITY AND BEHAVIOUR OF
JUVENILE RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR

dr Vesna Pešić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

KOMISIJA

dr Vesna Pešić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Sanja Dacić, docent

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Selma Kanazir, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije“ (broj 173056), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

ZAHVALNICA

Neizmerno se zahvaljujem svom mentoru dr Vesni Pešić, koja me je velikom profesionalnošću sa jedne, i skoro roditeljskom odnosu sa druge strane vodila kroz moj naučni rad. Njeno neiscrpno poznavanje materije, težnja ka novim saznanjima i idejama, posvećenost detaljima, kritičko sagledavanje i istinska, beskompromisna posvećenost kandidatu su mi služile kao inspiracija da u svakom trenutku dam svoj maksimum, kako bih napredovao u profesionalnom smislu. Sve što sam naučio, od načina pristupanja problematici i eksperimentalnom radu, preko sagledavanja dobijenih rezultata, njihovog oblikovanja za publikaciju u vrhunskim časopisima i odgovora na recenzije, do načina pisanja doktorske disertacije je bila njena zasluga.

Zahvaljujem se dr Selmi Kanazir i dr Saberi Ruždijić koje su mi omogućile da radim u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i uspešno realizujem rad na doktorskoj disertaciji.

Dr Sanji Dacić se zahvaljujem na poverenju, kao i na korisnim savetima koji su uobličili ovu tezu.

Zahvaljujem se svim koleginicama iz naše laboratorije koje su mi svojim iskustvom i savetima pomogle uspešno sprovedenje eksperimenata i dr Vesni Tešić koja je nesebično podelila svoje enormno znanje o Western blot tehnici i toplom prijateljskom odnosu.

Mlađim kolegama i koleginicama: Mileni, Ireni, Milanu, Vladimiru, Marjani, Divni, Mirni, Milošu, Anji, Jovani, Mariji, Marku, Miodragu, Ivani i Urošu zahvaljujem na svim korisnim savetima i druženju koji su mi ulepšali boravak na IBISS-u.

Posebnu zahvalnost dugujem akademiku dr Mileni Stevanović i svim koleginicama iz Laboratorije za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo koji su mi omogućili da načinim prve naučne korake, a naročito Slobi na velikom prijateljstvu tokom mog boravka u gimnaziji, na fakultetu i IMGGI-ju.

Mojoj porodici neizmerno zahvaljujem na podršci u svim donesenim odlukama, razumevanju i strpljenju.

Efekti anestezije indukovane propofolom na sinaptičku plastičnost, aktivnost dopaminskog sistema i ponašanje juvenilnih pacova

Sažetak

Propofol je često korišćeni anestetik u modernoj medicini. Adiktivni potencijal propofola je uočen, kao i uticaj na memorijski proces. Međutim, oba fenomena su još uvek nedovoljno istražena. Imajući u vidu da je adolescencija period izuzetne osetljivosti na dejstvo adiktivnih supstanci i intenzivne maturacije mnemoničkog potencijala, cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj jednokratnog izlaganja propofolskoj anesteziji, što je tipičan način kliničke primene anestetika, na dopaminsku signalizaciju, sinaptičku i neuronsku aktivnost u različitim regionima mozga i ponašanje juvenilnih/peripubertetskih pacova, kao model sistema humanog periadolescentnog razvoja. Efekti su analizirani 4, 24 i 48 sati nakon tretmana, kod mužjaka *Wistar* pacova starih 35 dana.

Dobijeni rezultati su po prvi put ukazali da izlaganje propofolskoj anesteziji izaziva promene u ekspresiji/fosforilaciji signalnih molekula koji su već prepoznati kao značajni za dejstvo adiktivnih supstanci. Od svih analiziranih dopaminoceptivnih moždanih regiona (medijalni prefrontalni korteks, strijatum i talamus) jedino su u talamusu uočene značajne promene u ekspresiji fosforilisane/aktivirane forme DARPP-32 proteina, pokazatelja postsinaptičke dopaminske signalizacije, 4 i 24 sata nakon tretmana, i bile su praćene povećanom ekspresijom FosB/ Δ FosB proteina, biohemijskog pokazatelja neuronske aktivnosti. Promene su lokalizovane u paraventrikularnom talamičkom jedru i mediodorzalnom talamusu. U strijatumu i medijalnom prefrontalnom korteksu je uočen porast u ekspresiji fosforilisane forme CaMKII α , biohemijskog senzora sinaptičke aktivnosti koji ima važnu ulogu u pamćenju prethodnog izlaganja adiktivnim supstancama. Smanjenje u intenzitetu anksioznosti (procenjeno na osnovu rezultata dobijenih u testu svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta) je zabeleženo 24 sata nakon tretmana, kada je uočen i pad u ekspresiji FosB proteina u strijatumu, što se može tumačiti kao traženje senzacija usled smanjene aktivnosti moždanog regiona značajnog za osećaj zadovoljstva i motivisanost. Pojačan motorički odgovor na d-amfetamin i fenciklidin je uočen 24 sata nakon tretmana (ukrštena senzitivizacija), kao potvrda da bez obzira na različite primarne

mehanizme dejstva propofol i dve korišćene droge koriste iste neuronske puteve za ostvarivanje psihomotoričkih efekata. Rezultati studije su takođe ukazali da kod peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji postoje izvesne poteškoće u pozivanju memorije i memorisanju novih informacija u neaverzivnim memorijskim testovima (prostorna habituacija, prepoznavanje novog objekta), 24 sata nakon tretmana. Ove posledice su bile praćene promenama u ekspresiji molekula koji učestvuju u pozivanju i rekonsolidaciji epizodične memorije (BDNF/TrkB, Egr-1, ERK1/2, CaMKII α , FosB/ Δ FosB), u dorzalnem hipokampusu. Uočene poteškoće u prepoznavanju novine su u skladu sa malobrojnim kliničkim studijama, koje naglašavaju značaj kontrole osnovnih kognitivnih funkcija kod starije dece nakon izlaganja propofolskoj anesteziji. Takođe, u svim ispitivanim moždanim regionima osim u talamusu je zabeležen porast u ekspresiji fosforilisane forme Aducin β proteina, što je indikacija za destabilizaciju citoskeleta i sinaptičku reorganizaciju.

Gledano u celini, rezultati ove studije su ukazali da bolje razumevanje bioloških posledica primene propofola u juvenilnom/pubertetskom uzrastu može doprineti sagledavanju starosno zavisnih zdravstvenih rizika tretmana, koji su do sada intenzivno istraživani samo u ekstremima životne dobi, tj. u ranoj postnatalnoj i kasnoj životnoj fazi.

Ključne reči: propofol, peripubertet, zavisnost/adikcija, anksioznost, dopamin, sinaptička aktivnost, sinaptička stabilnost, prostorna habituacija, prepoznavanje novog objekta, epizodična memorija.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

UDK BROJ: 615.211: [612.82 + 612.661] (043.3)

The effects of propofol induced anesthesia on synaptic plasticity, dopaminergic system activity and behaviour of juvenile rats

Abstract

Propofol is a commonly used anesthetic in modern medicine. Addictive potential of propofol is observed, as well as the impact on the memory process. However, both phenomena are still insufficiently explored. Bearing in mind that adolescence is a period of extreme sensitivity to addictive substances and intense maturation of the mnemonic potential, the aim of this study was to examine the effect of a single exposure to propofol anesthesia, which is a typical method of its clinical application, on dopaminergic signaling, synaptic and neuronal activity in different brain regions and behavior of juvenile/peripubertal rats, as a model system of human periadolescent development. The effects were analyzed 4, 24 and 48 hours after the treatment, in male *Wistar* rats aged 35 days.

The obtained findings for the first time showed that exposure to propofol anesthesia caused changes in the expression/phosphorylation of signal molecules that are already recognized as significant for the action of the addictive substances. Of all the analyzed dopaminergic brain regions (medial prefrontal cortex, striatum and thalamus), significant changes in the expression of the phosphorylated/activated form of DARPP-32 protein, indicator of postsynaptic dopaminergic signalling, were observed only in the thalamus, 4 and 24 hours after the treatment, and were accompanied by increased expression of FosB/ Δ FosB protein, a biochemical indicator of neuronal activity. The alterations were localized in the paraventricular thalamic nucleus and the mid-dorsal thalamus. An increase in the expression of the phosphorylated form of CaMKII α , a biochemical sensor of synaptic activity that has an important role in memory on addictive substances exposure, was detected in striatum and medial prefrontal cortex. Reduction in the intensity of anxiety (estimated in accordance to the data obtained in the light/dark box and elevated plus maze tests) was observed 24 hours after the treatment, along with the decrease in the expression of FosB protein in striatum, which can be interpreted as a sensation seeking due to decreased activity of brain region important for a pleasure/motivation. An enhanced motor response to d-amphetamine and phencyclidine was observed 24 hours after the treatment (cross

sensitization), as confirmation that despite the different primary mechanisms of action, propofol and these two drugs use the same neuronal pathways to achieve psychomotor effects. The results of the study also indicated that in peripubertal rats exposed to propofol anesthesia, there were some difficulties in memory retrieval and acquisition of new learning in non-aversive memory tests (spatial habituation, novel object recognition), 24 hours after the treatment. These effects were accompanied by changes in the expression of molecules involved in retrieval and reconsolidation of episodic memory (BDNF/TrkB, Egr-1, ERK1/2, CaMKII α , FosB/ Δ FosB) in the dorsal hippocampus. Detected difficulties in recognizing the novelty are consistent with a few clinical studies that emphasize the importance of controlling basic cognitive functions in older children after exposure to propofol anesthesia. Also, in all investigated brain regions, except the thalamus, an increase in the expression of the phosphorylated form of Adducin β protein was observed, which is an indication of the cytoskeleton destabilization and synaptic reorganization.

Overall, the results of this study accentuated that a better understanding of the biological consequences of the use of propofol in juvenile/puberty period could contribute to the understanding of age-dependent health risks of the treatment, which have been extensively investigated so far only at the extremes of age, i.e. during early postnatal period and in aging.

Key words: propofol, peripuberty, addiction, anxiety, dopamine, synaptic activity, synaptic stability, spatial habituation, novel object recognition, episodic memory.

RESEARCH AREA: Biology

AREA OF SPECIAL INTEREST : Neurobiology

UDC NUMBER: 615.211: [612.82 + 612.661] (043.3)

Lista skraćenica

A2 – sekundarno aktivno memorijsko stanje

Akt – protein kinaza B

AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropanoična kiselina

AMPH – amfetamin

AP-1 – aktivatorski protein 1 (engl. *Activator protein 1*)

BDNF – neurotrofički faktor sintetisan u mozgu (engl. *Brain derived neurotrophic factor*)

BF – bazalni prednji mozak (lat. *pars basalis telencephali*)

BSA – goveđi serumski albumin (engl. *Bovine Serum Albumin*)

CA – Amonov rog (lat. *cornu ammonis*)

CaMK – Ca^{2+} /kalmodulin-zavisne protein kinaze (engl. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*)

CaMKK (engl. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*)

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CDK5 kinaza (engl. *Cell division protein kinase 5*)

CM – centralno medijalno jedro (lat. *nucleus centromedianus thalami*)

CNS – centralni nervni sistem

CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*)

D3V – dorzalna treća ventrikula

DA – dopamin

DAB – 3,3-diaminobenzidin

DARPP-32 – dopaminom i cikličnim adenzin-monofosfatom regulisani fosfoprotein molekulske mase 32 kDa

DAT – dopaminski nosač (engl. *Dopamine transporter*)

DG – dentatni girus (lat. *gyrus dentatus*)

DI – diskriminacioni indeks

DpMe – duboka mezencefalička retikularna formacija

DR – dorzalno jedro rafe (lat. *nucleus raphe dorsalis*)

EDTA – etilendiamino-tetrasirćetna kiselina

EEG – elektroencefalografija

Egr-1 (engl. *Early growth response protein 1*)

ER – endoplazmatski retikulum
ERK1/2 (engl. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*)
FDA (engl. *Food and Drug Administration*)
FosB (engl. *Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*)
GABA – γ aminobuterna kiselina
Glu – glutamat
GluR1 – (engl. *Glutamate receptor 1*)
His – histamin
HRP – peroksidaza iz rena
i.p. – intraperitonealno
IMD – intermediodorsalno jedro talamusa (lat. *nucleus intermediodorsalis*)
IP3 – inozitol-3-fosfat
iRNK – informacijska ribonukleinska kiselina
LC – locus coeruleus (lat. *nucleus locus coeruleus*)
LDT – laterodorsalno tegmentalno jedro (lat. *nucleus tegmentalis posterolateralis*)
LH – lateralni hipotalamus
LHb – lateralne habenule
LTD – dugotrajna depresija (engl. *Long term depression*)
LTDg – laterodorsalno tegmentalno jedro (lat. *nucleus tegmentalis posterolateralis*)
LTP – dugotrajne potencijacije (engl. *Long term potentiation*)
MAPK – mitogenom-aktivirane protein kinaze (engl. *Mitogen activated protein kinase*)
MARCKS (engl. *Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*)
MD – mediodorsalno jedro talamusa (lat. *nucleus mediodorsalis thalami*)
MnPO – srednji preoptički region
mPFK – medijalni prefrontalni korteks
NA – noradrenalin
NAc (lat. *nucleus accumbens*)
NMDA – N-metil-D-aspartat
NR2B – (engl. *NMDA receptor 2B*)
OD – optička gustina (engl. *Optical density*)
ORX – oreksin
PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*)

PCP fenciklidin (engl. *Phencyclidine*)
Pef – perifornikalni region
PI3K (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)
PKA – Protein kinaza A
PKC – protein kinaza C
PLC γ – fosfolipaza C γ
PND – dan postnatalnog razvića
PnO – oralno pontinsko jedro (lat. *nucleus reticularis pontis oralis*)
PP1 – protein fosfataze-1
PP2A – protein fosfataze-2A
PP2B – protein fosfataze-2B
PPT (lat. *nucleus tegmentalis pedunculopontinus*)
PSD – postsinaptička gustina (engl. *Postsynaptic density*)
PVDF – poliviniliden fluorid
PVT – paraventrikularno jedro talamusa (lat. *nucleus paraventricularis thalami*)
RMT – rostromedijalni tegmentum
RRF – retrorubralno polje (engl. *Retrorubral field*)
SDS – natrijum dodecil sulfat
SDS-PAGE (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SEM – standardna greška merenja (eng. *Standard error of measurement*)
Ser – serotonin
SNc – pars kompakta substancije nigre (lat. *Pars compacta substantiae nigrae*)
TBS – Tris-boratni pufer (engl. *Tris-buffered saline*)
TEMED – tetrametiletilendiamina
TIPS – dvo-injekcioni protokol senzitivizacije (engl. *Two-injection protocol of sensitization*)
TMN – tuberomamilarno jedro (lat. *nucleus tuberomamillaris*)
TrkB (engl. *Tropomyosin related kinase B*)
VLPO – ventrolateralno preoptičko jedro
vPAG – ventrolateralna periakveduktalna siva masa
VPC – test za uparena poređenja (engl. *Visual Paired-Comparison test*)
VTA – ventralna tegmentalna oblast (lat. *area tegmentalis ventralis*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Opšta anestezija.....	1
1.2. Propofol.....	4
1.3. Pozitivne i negativne strane primene propofola u kliničkoj praksi	7
1.4. Buđenje iz propofolske anestezije – otkrivanje adiktivnog potencijala propofola.....	9
1.5. Fenomen bihevioralne senzitivacije	12
1.5.1. Dvo-injekcioni protokol senzitivacije	14
1.5.2. DARPP-32, CaMKII α i FosB/ Δ FosB kao biohemijski indikatori promena u dopaminskoj signalizaciji, sinaptičkoj i neuronskoj aktivnosti.....	14
1.5.2.1. DARPP-32.....	14
1.5.2.2. CaMKII α	16
1.5.2.3. FosB/ Δ FosB	18
1.5.3. Testiranje ukrštene senzitivacije – odgovor na d-amfetamin i fenciklidin.....	20
1.5.3.1. Fenciklidin.....	20
1.5.3.2. Amfetamin.....	21
1.6. Adolescencija	22
1.6.1. Opšte karakteristike razvojnog perioda.....	23
1.6.2. Sinaptičko orezivanje i mijelinizacija	24
1.6.3. Dopaminski sistem tokom adolescencije	25
1.6.4. Kritičan period razvića jedinke praćen velikim potencijalom za razvijanje zavisnosti	27
1.7. Učenje i pamćenje	29
1.7.1. Prepoznavanje novine	31
1.7.1.1. Test prostorne habituacije	32
1.7.1.2. Test prepoznavanja novog objekta	33
1.7.2. Molekulska osnova memorijskog procesa	35
1.7.2.1. BDNF i TrkB.....	35
1.7.2.2. Egr-1 i FosB	37
1.7.2.3. Uloga kinaza CaMKII α i ERK 1/2 u procesima učenja i pamćenja.....	39
1.8. Sinaptička stabilnost i reorganizacija	40
2. CILJ.....	43
3. MATERIJAL I METODE.....	45
3.1. Etička izjava	45
3.2. Eksperimentalne životinje i tretman.....	45

3.3. Izbor doze propofola	46
3.4. Eksperimentalna procedura	47
3.5. Izolacija tkiva, proteina i Western blot metoda.....	49
3.5.1. Izolacija tkiva	49
3.5.2. Izolacija proteina i određivanje koncentracije metodom po Pirsu	50
3.5.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu	51
3.5.4. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na poliviniliden fluoridnu (PVDF) membranu.....	52
3.5.5. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina	53
3.5.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova	54
3.6. Histološke analize	54
3.6.1. Priprema tkiva	54
3.6.2. Kvantitativna imunohistohemijska analiza	55
3.7. Praćenje ponašanja eksperimentalnih životinja.....	57
3.7.1. Merenje motoričke aktivnosti.....	57
3.7.2. Bazalna motorička aktivnost i motorički odgovor na d-AMPH i PCP	59
3.7.3. Test prostorne habituacije - dugotrajna habituacija.....	59
3.7.4. Test prepoznavanja novog objekta	60
3.7.5. Test svetlo/tamne kutije	63
3.7.6. Test uzdignutog krstastog lavirinta	64
3.8. Statistička obrada podataka	65
4. REZULTATI.....	68
4.1. Ekspresija D1DR, DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina u mPFK-u peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji.....	68
4.2. Ekspresija D1DR, DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina u strijatumu peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji.....	70
4.3. Ekspresija D1DR, DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina u talamusu peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji.....	72
4.4. Spontana motorička aktivnost	74
4.5. Motorička aktivnost indukovana d-amfetaminom.....	74
4.6. Motorička aktivnost indukovana fenciklidinom.....	76
4.7. Test svetlo/tamne kutije	78
4.8. Test uzdignutog krstastog lavirinta	78

4.9. Imunohistochemijska analiza ekspresije FosB i pDARPP-32 proteina u talamičkim jedrima peripubertetskih pacova 24 sata nakon izlaganja propofolu	80
4.10. Uticaj anestezije indukovane propofolom na prostornu habituaciju peripubertetskih pacova	84
4.10.1. Uticaj anestezije indukovane propofolom na lokomotornu aktivnost peripubertetskih pacova	84
4.10.2. Uticaj anestezije indukovane propofolom na stereotipnu aktivnost peripubertetskih pacova	85
4.10.3. Uticaj anestezije indukovane propofolom na vertikalnu aktivnost peripubertetskih pacova	85
4.10.4. Uticaj anestezije indukovane propofolom na vreme provedeno u centralnom delu arene	86
4.11. Uticaj propofolske anestezije na ponašanje životinja u testu prepoznavanja novog objekta sa produženim trajanjem	88
4.11.1. Karakterizacija ponašanja životinja za vreme faze familjarizacije	88
4.11.2. Uticaj propofolske anestezije na vreme potrebno za prepoznavanje novog objekta... ..	89
4.11.3. Istraživanje test arene pred početak svake faze testa prepoznavanja novog objekta... ..	91
4.12. Ekspresija BDNF, TrkB, Erg-1, CaMKII α i ERK1/2 proteina u dorzalnom hipokampusu peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji	92
4.13. Promene u ekspresiji FosB/ Δ FosB proteina u dorzalnom hipokampusu peripubertetskih mužjaka pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji	94
4.14. Ekspresija proteina Aducin β u medijalnom prefrontalnom korteksu, strijatumu, talamusu i hipokampusu peripubertetskih pacova.	98
5. DISKUSIJA.....	102
5.1. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva molekulske i promene u ponašanju koje su odlika dejstva adiktivnih supstanci	102
5.1.1. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva promene u ekspresiji ukupne i fosforilisane forme DARPP-32 i CaMKII α kao i FosB proteina u različitim moždanim regionima 4, 24 i 48 sati nakon tretmana	103
5.1.2. Izlaganje propofolskoj anesteziji ne menja spontanu lokomotornu aktivnost peripubertetskih pacova.....	105
5.1.3. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva senzitivaciju lokomotornog odgovora na d-amfetamin	106
5.1.4. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva senzitivaciju lokomotornog odgovora na fenciklidin	110
5.1.5. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova smanjuje anksiozni odgovor u testu svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta 24 sata nakon tretmana	112

5.2. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova utiče na pozivanje neavertivne memorije i izaziva promene u ekspresiji molekula koji učestvuju u memorijskom procesu u dorzalnom hipokampusu.....	116
5.2.1. Izlaganje propofolskoj anesteziji otežava prepoznavanje novine prostora u testu prostorne habituacije	117
5.2.2. Izlaganje propofolskoj anesteziji otežava prepoznavanje novine objekta u poznatom prostoru	119
5.2.3. Izlaganje propofolskoj anesteziji smanjuje ekspresiju fosforilisane forme TrkB receptora u hipokampusu peripubertetskih pacova 24 sata nakon tretmana	125
5.2.4. Izlaganje propofolskoj anesteziji smanjuje ekspresiju Egr-1 proteina u hipokampusu peripubertetskih pacova 24 sata nakon tretmana.....	126
5.2.5. Izlaganje propofolskoj anesteziji povećava nivo fosforilisane forme CaMKII α u hipokampusu peripubertetskih pacova 24 sata nakon tretmana	128
5.2.6. Izlaganje propofolskoj anesteziji smanjuje ekspresiju fosforilisane forme Erk2 proteina u hipokampusu peripubertetskih pacova nakon tretmana	129
5.2.7. Izlaganje propofolskoj anesteziji povećava FosB/ Δ FosB imunoreaktivnost u granularnim ćelijama dorzalnog dentatnog girusa 24 sata nakon tretmana	129
5.3. Izlaganje propofolskoj anesteziji povećava nivo fosforilisane forme Aducin β proteina u medijalnom prefrontalnom korteksu, talamusu, strijatumu i hipokampusu peripubertetskih pacova	131
ZAKLJUČAK	134
LITERATURA.....	136

1. UVOD

1.1. Opšta anestezija

Termin anestezija je grčkog porekla (*an* – ne i *estezijs* – osećanje) i u prevodu označava neosetljivost. U kontekstu koji i danas ima prvi put ga uvodi grčki lekar i travar Dioskorides da bi opisao efekte vinskog preparata mandragore, koji je korišćen zbog izazivanja sedacije pre izlaganja intenzivnim hirurškim zahvatima (Askitopoulou i sar., 2000). U modernom dobu, anestetici predstavljaju nezaobilazni agens korišćen pri svakom hirurškom zahvatu. Definišu se kao farmakološki aktivne supstance koje izazivaju reverzibilni gubitak svesti, mišićnu relaksaciju, akineziju i odsustvo reakcije na bolne stimuluse uz minimalan uticaj na funkcionalnost respiratornog, kardiovaskularnog i termoregulacionog sistema (Brown i sar., 2010).

Prema načinu primene mogu se podeliti u dve grupe: inhalacijske (azot oksid, izofluran, dezofluran, sevofluran, ksenon, manje popularni halotan, enfluran i metoksifluran) i intravenske (barbiturati, propofol, etomidat, ketamin, metoheksital i tiopental). Uz ove opšte anestetike se koriste i sedativi iz grupe benzodiazepina: midazolam, diazepam i lorazepam (Garcia i sar., 2010). Intravenski anestetici se uglavnom koriste za uvođenje u anesteziju, dok se inhalacijski koriste za održavanje neophodnog nivoa anestezije. Anestetici se mogu podeliti i prema mehanizmu delovanja na (Franks, 2008):

1. one koji pojačavaju inhibiciju posredovanu $GABA_A$ (γ aminobuterna kiselina) receptorima (propofol, izofluran, etomidat, halotan);
2. one koji smanjuju ekscitaciju posredovanu NMDA (N-metil-D-aspartat) receptorima (ketamin, azot oksid, ksenon).

Promene na pacijentima uočljive nakon primene anestetika se mogu opisati kroz četiri faze (Hewer, 1937):

Faza 1. **Izmenjeno stanje svesti.** U zavisnosti od temperamenta, pacijent stiče osećaj blagostanja, topline, misli postaju egzaltirane, a neretko dolazi do stanja paranoje. Čulo sluha postaje osetljivije. Fizičko stanje može da varira u zavisnosti od stupnja nervoze pacijenta.

Faza 2. **Ekscitacija.** Pojavljuju se nekontrolisani mišićni pokreti, nekontrolisana fonacija i nepravilno disanje. Refleksi postaju osetljiviji, krvni pritisak povišen, puls ubrzan. Može doći do spazma laringusa. Ova faza je najuočljivija kod jako

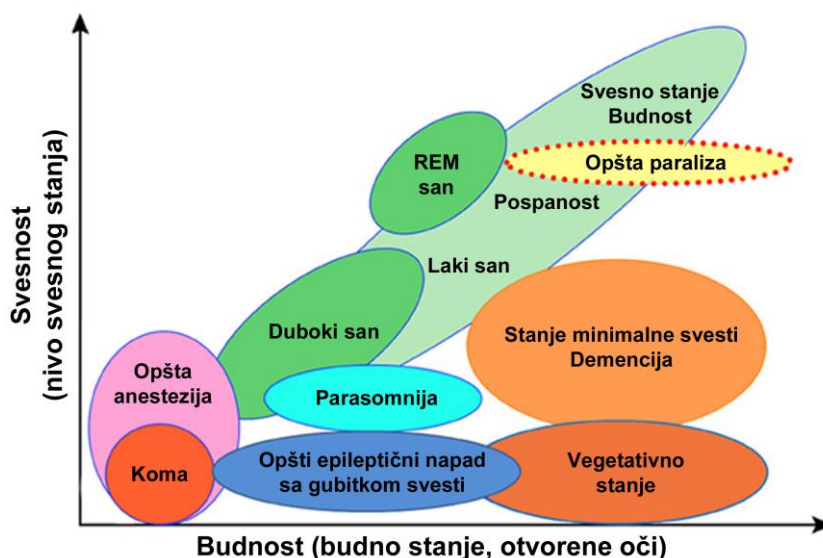
uznemirenih osoba i alkoholičara muškog pola. Kod žena, flegmatičnih tipova ličnosti i pacijenata koji su prethodno bili sedirani, ovakvo stanje se retko manifestuje.

Faza 3. **Hirurška anestezija.** Pacijent ulazi u stanje narkoze koja nalikuje dubokom snu. Disanje se normalizuje i tonus skeletne muskulature opušta. Pacijent postaje neosetljiv na bol, a pupilarni refleks se gubi. Krvni pritisak se vraća na normalan nivo. Mišići jezika gube svoj tonus, tako da jezik može da zakrči disajne puteve.

Faza 4. **Prevelika doza.** Znaci prekomernog doziranja zavise od tipa anestetika i nalikuju šoku. Koža postaje bleđa i hladna, zenice proširene, krvni pritisak opada, razmak između udisaja postaje sve veći a disanje pliće. Krajnji ishod je smrt.

Granice između faza nisu jasno uočljive i zavise od tipa anestetika koji se koristi, kao i od psihofizičkog stanja samog pacijenta. Sve ove faze se mogu detektovati i kod životinja.

Anesteziozolozi često u praksi poistovećuju stanje anestezije sa „dubokim snom“. (Gawande i sar., 2008). Međutim, reverzibilno stanje izazvano primenom opštih anestetika je najbližnje stanju kome (slika 1.1.).

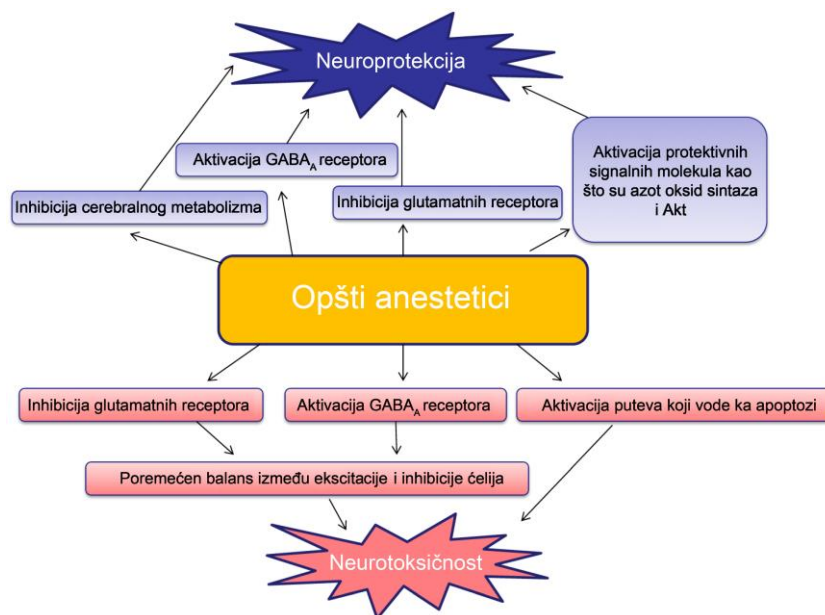


Slika 1.1. Procena stanja svesti prema praktičnim i etičkim činjenicama (preuzeto i modifikovano iz (Boly i sar., 2013).

Iako je broj smrtnih slučajeva koji su direktno prouzrokovani anestezijom jako mali, dosta su česte druge neželjene posledice kao što su hipotermija, srčane aritmije, povraćanje, mučnine, delirijum, što ne samo da izaziva nelagodu kod pacijenata, već povećava cenu boravka pacijenta u bolnici i odlaže njegovo otpuštanje (Campagna i sar., 2003). Najugroženiji su pacijenti koji su u ekstremima životne dobi (rano razviće i starije životno doba). Uprava za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*; FDA) je 2016. godine izdala upozorenje profesionalnim zdravstvenim radnicima vezano za primenu anestetika, da pažljivo pristupe upotrebi opštih anestetika i izbalansiraju prednosti korišćenja odgovarajuće anestezije kod dece mlađe od 3 godine i trudnica, naročito ako su u pitanju procedure koje traju više od 3 sata ili se ponavljaju više puta u toku kratkog vremenskog perioda. Razlog za zabrinutost u modernom dobu predstavlja sve veća potreba za dugačkim i komplikovanim anestetskim procedurama.

Poslednjih godina, mnogobrojna istraživanja na životinjama ukazuju da anestetici nisu toliko bezbedni kao što se misli. Upotreba anestetika kod mladih životinja izaziva neurodegeneraciju, dugotrajne neurokognitivne posledice i promene u ponašanju. Kod starijih životinja dolazi do problema u učenju i pamćenju nakon opšte anestezije. Studije na životinjama, među kojima su i istraživanja naše grupe (Pescic i sar., 2009, Milanovic i sar., 2010, Milanovic i sar., 2014, Pescic i sar., 2015), ukazala su da opšti anestetici mogu aktivirati apoptotske procese u mozgu mladih životinja. Mada su neurotoksični efekti opšte anestezije razvojno regulisani (Popic i sar., 2012, Popic i sar., 2015), sinaptotoksični efekti nisu dovoljno ispitani (Pescic i sar., 2015, Milanovic i sar., 2017). Neke prekliničke studije pokazuju da je izlaganje opštoj anesteziji u ranom postnatalnom razvojnom periodu povezano sa neurobihejvioralnim i neurokognitivnim poteškoćama u kasnijim fazama života (Yon i sar., 2005, Fredriksson i sar., 2007, Han i sar., 2015), dok su rezultati naših istraživanja po prvi put ukazali na hiperaktivnost kao potencijalni uzrok poteškoća u učenju (Milanovic i sar., 2016), što je u saglasnosti sa novim kliničkim podacima (Sprung i sar., 2012).

Međutim, treba napomenuti da su pojedine studije došle do zaključaka da izlaganje opštoj anesteziji može biti od koristi i imati neuroprotektivnu ulogu u modelu moždanih povreda ili čak imati potencijalni antidepresivni efekat (Vutskits, 2018). Zbog svega toga, anestetici se mogu smatrati snažnim kontekst-zavisnim modulatorima neuralne plastičnosti (slika 1.2.).



Slika 1.2. Shematski prikaz neuroprotektivnih i neurotoksičnih efekata indukovanih opštim anestetici. Preuzeto i modificirano iz (Chiao i Zuo, 2014).

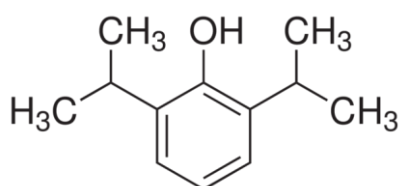
Najviše eksperimentalno dobijenih podataka o posljedicama primene opšte anestezije se odnosi na rani postnatalni period, shodno činjenici da je neurotoksičnost (tj. neuronska smrt) izazvana primenom opšte anestezije razvojno regulisana (Jevtovic-Todorovic, 2016). Posljedice primene anestetika u ranom juvenilnom periodu, kao i u periadolescentnom/kasnom juvenilnom periodu su u velikoj meri neistražene. Ovom prilikom treba naglasiti da se termin *juvenilni* u literaturi koristi da bi se označio period starosti eksperimentalnih jedinki koji podrazumeva seksualnu nezrelost i intenzivan fizički razvoj (Spear, 2000).

1.2. Propofol

Propofol (2,6-di-izopropilfenol) je jedan od najpopularnijih intravenskih anestetika u modernoj medicini. Intenzivnu primenu u kliničkoj praksi je našao zbog brzog delovanja, relativno male toksičnosti, brzog oporavka pacijenta sa minimalnim nuspojavama kao što su mučnine, čak i nakon dugih perioda anestezije (Trapani i sar., 2000). Originalno je proizveden u Ujedinjenom Kraljevstvu od strane Imperial Chemical Industries, za istraživanja sedativnih efekata fenolnih derivata u animalnim modelima, dok su anestetska svojstva propofola prvi put prijavljena januara 1973. godine, kada je propofol korišćen u emulziji sa polietoksiliranim dabrovim uljem (Chidambaran i sar., 2015). Međutim uskoro je kao takav povučen iz upotrebe jer je stabilisajući agens

izazivao anafilaktičke reakcije (Briggs i sar., 1982). Sredinom XX veka nova istraživanja u Evropi i SAD su dovela do formiranja novih lipidnih emulzija koje nisu izazivale anafilaktički šok (Chidambaran i sar., 2015). Tek 1986. godine je propofol uveden u terapeutske svrhe u SAD i Novom Zelandu. Uprava za hranu i lekove je oktobra 1989. godine dala dozvolu za upotrebu propofola (Diprivan®) u kliničke svrhe.

Propofol je alkilni derivat fenola (slika 1.3.) molekulske mase 178,27 g/mol. Distribicioni koeficijent oktanol/voda za propofol iznosi 6761 na pH 6-8,5. Nerastvoran je u vodi jer njegova hidroksilna grupa koja ima $pK_a = 11$ vodi ka formiranju soli. Benzenski prsten i izopropilske grupe propofola su lipofilne. Posедуje strukturnu analogiju sa antioksidantom vitaminom E, što delimično objašnjava njegova antioksidativna svojstva (Adembri i sar., 2007). Komercijano je dostupan kao 1% propofol (Diprivan proizvođača AstraZeneka ili Recofol proizvođača Shering) rastvoren u vidu lipidne emulzije (Intralipid®) bele boje, sastava: 10% sojino ulje, 1,2% fosfolipida iz jajeta koji je emulgator, 2,25% glicerola za izotoničnost, NaOH za postizanje odgovarajućeg pH i EDTA (etilendiamino-tetrasirćetna kiselina) ili metabisulfida kao antimikrobiološkog agensa. Upravo ovakva emulziona forma čini anestetik jako korisnim za intravenski unos u organizam, međutim lipidna komponenta predstavlja pogodnu podlogu za proliferaciju bakterija i nosi potencijalni rizik za formiranje jatrogene sepse pri kontaminaciji. Pored toga propofol u dodiru sa vazduhom u roku od 6 sati oksidiše do kvinona, što menja boju suspenzije u žutu i kao takav postaje neadekvatan za upotrebu.



Slika 1.3. Strukturna formula propofola (2,6-di-izopropilfenol) (Chidambaran i sar., 2015).

Zbog lipofilnosti propofol brzo prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Proračunato vreme ekvibracije između krvi i mozga iznosi svega 2,9 minuta. Propofol se u organizmu brzo distribuira, ali i eliminiše. Sama eliminacija propofola iz organizma se može podeliti u tri faze. Eliminacioni poluživot anestetika tokom prve faze iznosi 2-8 minuta što označava brzi početak delovanja propofola. Tokom druge faze i perioda snažnog uklanjanja anestetika poluživot iznosi 30-70 minuta. Tokom treće faze propofol

se sporo uklanja iz slabo perfundovanih tkiva i eliminacioni poluživot iznosi 4-23 sata. Za vreme prve dve faze se ukloni do 70% propofola. Propofol se brzo metaboliše u jetri i prevodi do glukuronida i sulfata koji se dalje uklanjaju preko bubrega. Dva procenta se uklanja fecesom, a manje od 1% se oslobađa putem urina u neizmenjenom obliku. U zavisnosti od koncentracije propofol može da inhibira citohrom P450 (Marik, 2004). Sistemski klirens zavisi od starosti jedinke. Deca uzrasta između 1 i 3 godine imaju sistemski klirens znatno veći nego odrasli (Murat i sar., 1996). U prepubertetskom uzrastu (od 3. godine do puberteta) sistemski klirens ume da bude i do 50% veći nego kod adulta (Chidambaran i sar., 2015).

Propofol ispoljava hipnotička dejstva potenciranjem neurotransmisije posredovane GABA (Sanna i sar., 1995). Prvi dokaz ovakvog efekta je izneo Collins još 1988. godine (Collins, 1988). GABA je glavni inhibitorski neurotransmiter u mozgu sisara i procenjuje se da je čak 20% neurona u mozgu GABAergicnog tipa (Henschel i sar., 2008). Tokom budnog stanja organizma, u mozgu postoji određena ravnoteža između ekscitatornog i inhibitorskog unosa (engl. *Input*), gde mali broj inhibitorskih neurona kontroliše veliki broj ekscitatornih (Markram i sar., 2004). Propofol znatno povećava GABA_A posredovanu inhibiciju i može efikasno da (reverzibilno) suprimira neuronsku aktivnost.

GABA_A receptori su jonski kanali sačinjeni od različitih podjedinica (α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ , ϵ i ρ 1-3) koje formiraju pentamernu strukturu sa kanalom u sredini za transport jona hlora. Pri nižim koncentracijama propofol potencira funkciju GABA_A receptora, dok pri višim koncentracijama može direktno otvoriti GABA_A receptore (Thompson i Wafford, 2001, Irifune i sar., 2003, Grasshoff i Gillessen, 2005). Vezivanjem molekula propofola za β 3 subjedinicu GABA_A receptora dolazi do otvaranja kanala, pojačanog priliva (engl. *Influksa*) jona hlora (Cl⁻), hiperpolarizacije neurona i pojačane aktivnosti inhibitorskih struja, što se klinički manifestuje gubitkom svesti (Chidambaran i sar., 2015). Propofol takođe ima mogućnost da negativno reguliše proces ulazaka jona kalcijuma (Ca²⁺) u ćeliju, redukujući aktivnost L-tipa voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala (Franks, 2008). Sa neurohemijske tačke gledišta, izlaganje propofolskoj anesteziji dovodi do smanjenja nivoa glutamata i povećanja nivoa GABA u motornom i senzornom regionu kore velikog mozga, talamusu, hipokampusu i bazalnim ganglijama (Zhang i sar., 2009). Propofol u manjoj meri može da stimuliše i

AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropanoična kiselina) receptore, acetilholinske receptore, glicinske receptore osjetljive na strihnin i voltažno-zavisne Na⁺ kanale (Thompson i Wafford, 2001, Kozinn i sar., 2006, Alkire i sar., 2008, Nguyen i sar., 2009).

1.3. Pozitivne i negativne strane primene propofola u kliničkoj praksi

Propofol je jedan od najčešće korišćenih anestetika u kliničkoj praksi zbog brzog delovanja i kratkog vremena potrebnog za oporavak pacijenata. Često se koristi za kratkotrajnu i dugotrajnu sedaciju i hipnozu pacijenata na intenzivnoj nezi. Odličan je hipnotički agens jer se lako dozira i ostvaruje predvidljiv nivo hipnoze, a pri prestanku unošenja pacijent se vraća u svesno stanje za 10-15 minuta (Marik, 2004). Najznačajnije prednosti primene propofola u odnosu na druge anestetike su: kratko vreme delovanja, brzo metabolisanje i uklanjanje iz organizma, mala akumulacija čak i pri dugotrajnim intervencijama, što ga čini korisnim anestetikom za indukciju i održavanje opšte anestezije. Retke su postoperativne mučnine i povraćanje. Antiemetička svojstva ovog agensa su primetna čak i ako je primenjen u subhipnotičnim dozama (Gan i sar., 1997). Posедуje antioksidativna, antiinflamatorna, bronhodilatatorna svojstva. Smanjuje cerebralnu potrošnju kiseonika, redukuje intrakranijalni pritisak i ima antikonvulzivna svojstva. Zbog ovakvih karakteristika propofol je izuzetno koristan pri traumatskim povredama mozga, statusu epileptikusu, delirijumu tremensu, statusu asmatikusu i kod kritično bolesnih pacijenata sa sepsom. Propofol smanjuje postoperativni delirijum, što je od izuzetnog značaja kod jako uznemirene dece, koja bi potencijalno mogla fizički da se ozlede nakon buđenja iz anestezije (van Hoff i sar., 2015). Ovakav efekat anestetika se pripisuje anksiolitičkim svojstvima supstance, primećenim još devedesetih godina 20. veka (Winwood i Jago, 1993, Smith i sar., 1994, Murdoch i Kenny, 1999). Uprkos tome, jako su oskudni eksperimentalni podaci (naročito za raniji period ontogenetskog razvića) koji potvrđuju da je nakon opšte anestezije indukovane propofolom anksioznost smanjena.

Najčešće posledice primene propofola su vezane za bol na mestu uboda. Usled toga što propofol ne poseduje analgetska svojstva, a kako bi se osigurala adekvatna anestezija tokom operativnih zahvata, propofol se u praksi kombinuje sa medikamentima koji ta svojstva poseduju. Retko se mogu javiti hipertrigliceridemija,

pankreatitis, respiratorna depresija i infekcija nakon unosa. Veoma retko se javlja propofolski infuzijski sindrom (engl. *Propofol infusion syndrome*), komplikacija koja se karakteriše ozbiljnom acidozom i kolapsom cirkulacije, a povezana je sa unosom visoke doze propofola (Marik, 2004).

Iako se pacijenti posle anestezije ili sedacije propofolom brzo oporavljaju, bez posledica primećenih kod drugih anestetika kao što su mučnine, povraćanje, glavobolje ili iscrpljenost, sve je više zabeleženih slučajeva koji ukazuju na izražen adiktivni potencijal ovog anestetika. Veliki broj pacijenata je izjavio da su se nakon anestezije propofolom osećali lepo, opuštено, skoro euforično, imali lepe snove i halucinacije, često seksualne prirode (Wilson i sar., 2010). Takođe su evidentirani slučajevi zloupotrebe propofola kod medicinskog osoblja, slučajevi tolerancije na propofol kao i efekti slični posledicama primene psihoaktivnih supstanci nakon prestanka unošenja anestetika. Najnoviji podaci ukazuju da skoro polovina grupe od 82 pacijenta podvrgnutih gastrointestinalnoj endoskopiji nakon buđenja doživljava specifično stanje euforije, koga se intenzivno seća i do nedelju dana nakon procedure (Brechmann i sar., 2017).

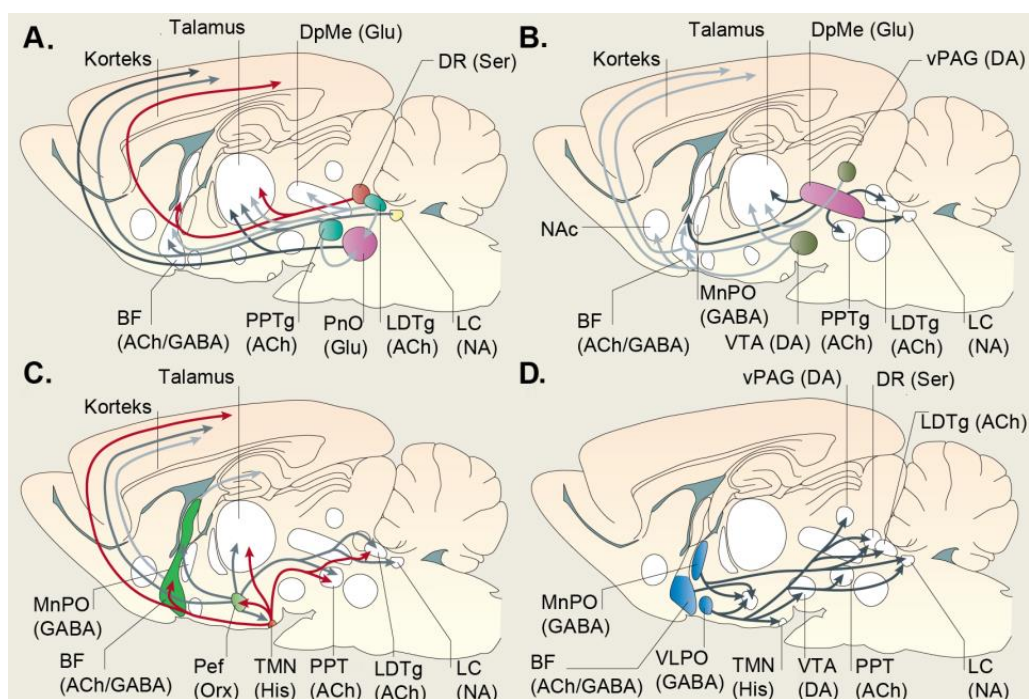
Osim adiktivnog potencijala, drugi aspekt neželjenih efekata propofolske anestezije se odnosi na memorijske poteškoće. Primenjen u subkliničkim dozama propofol kod ljudi izaziva anterogradnu amneziju koju karakterišu problemi sa konsolidacijom memorije, tj. kaskadom procesa preko kojih se inicijalno osetljiva memorija stabilizuje, što je u literaturi opisano kao poteškoća u retenciji/memorijskom zadržavanju informacija u odnosu na stepen zaboravljanja istih informacija u kontrolnoj grupi (Veselis i sar., 2004, Veselis i sar., 2009). U klinički efektivnim, sedativnim dozama propofol ometa inicijalno usvajanje informacija sa kojima se subjekt susreće za vreme indukcije anestezije, mada novija literatura ukazuje da je uticaj selektivan i da različito deluje na različite tipove memorije, tj. ne utiče na memoriju straha (Pryor i sar., 2015). Podataka o uticaju anestezije na memorijski proces kod dece ima malo. Pokazano je da izlaganje propofolskoj anesteziji utiče na kratkotrajnu memoriju i u potpunosti eliminiše anterogradnu memoriju pri čemu je retrogradna memorija sačuvana (Rich i sar., 1999, Yin i sar., 2014), što se i očekuje. Međutim, postoje podaci o pojedinačnim slučajevima kod kojih je detektovana i produžena retrogradna annezija (Quraishi i sar., 2007). Novi podaci ukazuju da izlaganje propofolskoj anesteziji kod

dece uzrasta 5-14 godina može da izazove poteškoće u pozivanju (engl. *Retrieval, recall*) memorije, tj. korišćenju već naučenih podataka (Millar i sar., 2014). Imajući u vidu da se eksplicitna memorija (vezana za budno i svesno stanje, (Quillfeldt, 2016)) poboljšava tokom maturacije nervnog sistema u drugoj deceniji života (Jabes i Nelson, 2015), kao i da se najveći deo rezultata koji se odnose na posledice primene anestetika na eksplicitnu memoriju odnosi na adultnu populaciju, od presudnog je značaja da se preciznije analiziraju posledice primene opšte anestezije na memorijski proces kod mladih, kao i molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi tih uticaja. Prema mišljenju kliničara uticaj propofolske anestezije, koja se rutinski koristi u dijagnostičke svrhe (kada procedura zahteva strogo mirovanje pacijenta) ili hirurških intervencija u dnevnim bolnicama kod dece, treba da se bolje ispita naročito kada su u pitanju deca školskog uzrasta jer za posledicu može da ima prolazne memorijske smetnje i poteškoće u dnevnim aktivnostima (Millar i sar., 2014).

1.4. Buđenje iz propofolske anestezije – otkrivanje adiktivnog potencijala propofola

Pokazano je da anestetici, među kojima je i propofol, smanjuju neuralnu aktivnost u specifičnim moždanim regionima (Veselis i sar., 1997, Fiset i sar., 1999, Velly i sar., 2007). Međutim za njihovu kliničku primenu relevantan je uticaj na koru velikog mozga i talamus. Nakon primene propofolske anestezije elektroencefalografski (EEG) zapis se menja (usporava) prvo u kori velikog mozga a zatim u talamusu, što ukazuje da talamička aktivnost opada usled smanjene kortiko-talamičke stimulacije (Velly i sar., 2007). Ovakav efekat anestezije na kortikalnu aktivnost je u suprotnosti sa neurofiziologijom prirodnog sna, što je jedan od pokazatelja da mehanizmi koji dovode do gubitka svesti tokom anestezije nisu isti kao kod prirodnog sna (Velly i sar., 2007). Interesantan je podatak da tokom buđenja iz opšte anestezije dolazi prvo do aktivacije filogenetski starijih moždanih regiona pa tek onda kortikalnih regiona (Langsjo i sar., 2012). Za buđenje iz anestezije su od izuzetnog značaja intralaminarna i medijalna talamička jedra jer predstavljaju važan deo kortiko-talamo-kortikalnih petlji (deluju kao filter senzornih informacija), ostvaruju direktne veze sa frontalnim, dorzolateralnim regionom kore velikog mozga i strijatumom i važni su za održavanje viših nervnih delatnosti (Saalman, 2014).

Uloga koju neurohemijski sistemi značajni za normalan san imaju u procesu održavanja stanja anestezije nije do kraja razjašnjena, ali brojni podaci ukazuju da je ovaj proces kompleksan i zavisi od GABAergičkog (Nelson i sar., 2002, Zecharia i sar., 2009), noradrenergičkog (Nelson i sar., 2003, Hu i sar., 2012), histaminskog (Luo i Leung, 2011, Zecharia i sar., 2012) i holinergičkog (Leung i sar., 2011, Tai i sar., 2014,) sistema. Neronske projekcije/putevi značajni za san i normalno buđenje sumirani su na slici 1.4., (preuzeto iz (Franks, 2008)).



Slika 1.4. Neronske projekcije/putevi značajni za održavanje budnog stanja i sna. Jedra ponsa (A), srednjeg mozga (B), hipotalamusa i bazalnog prednjeg mozga (C) svojom aktivnošću promovišu budnost dok druga grupacija jedara hipotalamusa i bazalnog prednjeg mozga (D) promoviše san/spavanje. Pedunkulopontinska tegmentalna oblast (PPT, lat. *nucleus tegmentalis pedunculopontinus*), laterodorzalno tegmentalno jedro (LTDg, lat. *nucleus tegmentalis posterolateralis*), duboka mezencefalička retikularna formacija (DpMe), oralnolateralno pontinsko jedro (PnO, lat. *nucleus reticularis pontis oralis*), bazalni prednji mozak (BF, lat. *pars basalis telencephali*), dorzalno jedro rafe (DR, lat. *nucleus raphe dorsalis*), locus coeruleus (LC, lat. *nucleus locus coeruleus*), ventralna tegmentalna oblast (VTA, lat. *area tegmentalis ventralis*), ventralna periakveduktalna siva masa (vPAG), nucleus accumbens (NAc, lat. *nucleus accumbens*), perifornikalni region (Pef), tuberomamilarno jedro (TMN, lat. *nucleus tuberomamillaris*), ventrolateralno preoptičko jedro (VLPO), srednji preoptički region (MnPO). DA, dopamin; Glu, glutamat; His, histamin; NA, noradrenalin; Ser, serotonin; Orx, oreksin. Preuzeto i modifikovano iz (Franks, 2008).

U kliničkoj praksi se mnogo više pažnje obraćalo na procese uvođenja u anesteziju (gubitak svesti) i održavanju iste, dok se smatralo da je buđenje iz anestezije pasivan proces koji zavisi pre svega od farmakokinetike anestetskog agensa. Međutim, noviji podaci ukazuju da specifični neurotransmiterski sistemi, sa akcentom na monoaminergičke, značajno doprinose buđenju iz opšte anestezije, do čega se došlo na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka da metilfenidat (Ritalin; inhibitor dopaminskih i noradrenalinskih transportera; sprečava preuzimanje dopamina i noradrenalina iz sinapse) indukuje buđenje/reanimaciju iz opšte anestezije indukovane izofluranom (Solt i sar., 2011). To je kasnije pokazano i u slučaju anestezije indukovane propofolom, uz napomenu da elektroencefalografske promene odgovaraju budnom stanju (Chemali i sar., 2012). Treba naglasiti da je problem uvođenja u anesteziju kod dece koja su na terapiji Ritalinom (zbog poremećaja pažnje i hiperaktivnosti) primećen i u ranijim istraživanjima, zbog čega i su u ovim slučajevima neophodne veće doze anestetika (Ririe i sar., 1997).

U kasnijim istraživanjima isti tim istraživača je pokazao da aktivacija dopaminskih D1 receptora značajno učestvuje u procesu reanimacije iz opšte anestezije indukovane izofluranom (Taylor i sar., 2013). Da bi se razjasnila uloga porekla dopamina neophodnog za reanimaciju sprovedena je serija eksperimenata koji su pokazali da je presudan dopamin iz ventralne tegmentalne oblasti (lat. *ventral tegmental area*; VTA), jer stimulacija VTA a ne pars kompakta substancije nigre (lat. *Pars compacta substantiae nigrae*; SNc) dovodi do buđenja iz anestezije indukovane propofolom ili izofluranom (Solt i sar., 2014). Ovo je potvrđeno u narednim istraživanjima od strane drugog istraživačkog tima, koji je ukazao da selektivna bilateralna lezija VTA izazvana primenom 6-hidroksi-dopamina kod pacova značajno odlaže buđenje iz propofolske anestezije, dok na indukciju ne utiče, potencirajući značaj dopamina poreklom iz VTA u procesu buđenja iz anestezije (Zhou i sar., 2015).

Dopaminski neuroni mezencefalona su organizovani u tri grupacije – VTA (A10), SNc (A9) i retrorubralno polje (engl. *Retrorubral field*; RRF; A8) (Dahlstrom i Fuxe, 1964, Yetnikoff i sar., 2014). Regulacija njihove aktivnosti je specifična kao i fiziološki procesi u kojima učestvuju – SNc je esencijalni deo mezo-strijatalnog puta i zajedno sa kortiko-strijatalnim glutamatergičkim projekcijama (iz senzomotornog korteksa) učestvuje u kontroli voljnih pokreta, dok je VTA deo mezo-kortiko-limbičkog

puta i od značaja je za kontrolu motivacionog ponašanja i nagrađivanja (Watabe-Uchida i sar., 2012). RRF predstavlja svega 4-5% od ukupnog broja dopaminskih neurona mezencefalona i njihovi targeti nisu u potpunosti detektovani.

Aktivacija mezolimbičkog dopaminskog sistema (koji obuhvata VTA) tokom buđenja iz anestezije je u funkcionalnom smislu od šireg značaja nego što je samo buđenje iz anestezije, jer je zajednički mehanizam delovanja svih adiktivnih supstanci upravo povećanje aktivnosti VTA kao i nivoa dopamina u ventralnom strijatumu (nukleus akumbensu (lat. *nucleus accumbens*, NAc)), što izaziva neurohemijski efekat koji doprinosi subjektivnom osećanju nagrađivanja i sreće (Vezina, 2004). Smatra se da je povećanje vanćelijskog nivoa dopamina u NAc-u, koje nastaje kao posledica aktivacije VTA usled primene propofola u visokim, tj. anestetskim dozama (Pain i sar., 2002), neurohemijska osnova za osećanja poput sreće, zadovoljstva i euforije koje pacijenti često opisuju nakon buđenja iz propofolske anestezije (Earley i Finver, 2013, Brechmann i sar., 2017). Ventromedijalni prefrontalni region kore velikog mozga je uključen u obradu informacija o nagrađivanju, izboru trenutnih nagrada i donošenje rizičnih odluka, dok se konačni odabir značajnih nagrada (relevantnih za nagrađivanje, rizično ponašanje i adikciju) vrši u sadejstvu sa informacijama obrađenim u dorzalnom prefrontalnom korteksu (PFK), koji je odgovoran za egzekutivne odluke višeg reda (Vezina, 2004).

Kao što je bio slučaj sa ketaminom (nazvan i *Special K*) i fenciklidinom (engl. *Phencyclidine*, PCP; *Angel Dust*) koji su bili u širokoj primeni u anesteziološkoj praksi, nakon čega je otkriven njihov adiktivni potencijal, sve veći broj eksperimentalnih i kliničkih dokaza ukazuje da ne treba zanemariti adiktivni potencijal propofola (Earley i Finver, 2013).

1.5. Fenomen bihevioralne senzitivacije

Izlaganje organizama adiktivnim supstancama dovodi do razvoja bihevioralne senzitivacije koja se kod životinja manifestuje povećanjem motoričkog odgovora na tretman usled prethodnog izlaganja istoj supstanci. Sličan fenomen, označen kao ukrštena senzitivacija (engl. *Cross-sensitization*), označava motoričku hiperaktivnost izazvanu jednom a potvrđenu drugom supstancom (već dobro definisanom u smislu izazivanja zavisnosti) i ukazuje da dve ispitivane droge deluju preko istih neuralnih

sistema bez obzira na razlike u primarnom mehanizmu dejstva (Steketee i Kalivas, 2011).

Bihevioralna senzitivizacija je forma bihevioralne plastičnosti koja se povezuje sa potrebom za unosom narkotika kod ljudi i razlikuje se od hiperaktivnosti koja se kod glodara može videti nakon akutnog izlaganja adiktivnoj supstanci i poistovećuje se sa prolaznim bihevioralnim/euforičnim promenama koju data supstanca izaziva u humanoj populaciji (Tirelli i sar., 2003, Steketee i Kalivas, 2011). U eksperimentalnim modelima bihevioralna senzitivizacija može da perzistira i do godinu dana nakon prestanka tretmana (Paulson i sar., 1991). Na dugotrajnost efekta utiču brojni faktori uključujući broj tretmana adiktivnom supstancom, interval između tretmana, dozu, pol i starost tretirane jedinke, kao i genetičku predispoziciju (Steketee i Kalivas, 2011). Supstance za koje se zna da izazivaju bihevioralnu senzitivizaciju su kokain, amfetamin, PCP, morfin, etanol, nikotin, Δ^9 -tetrahidrokanabinol.

Eksperimentalne studije ukazuju da se za razliku od adultnih glodara, profil bihevioralne senzitivizacije kod jedinki u kasnoj juvenilnoj/peripubertetskoj fazi ogleda u povećanoj lokomotivnoj ali ne i stereotipiji (Tirelli i sar., 2003). Ovi podaci se podudaraju sa prethodnim saznanjima da su adolescenti posebno podložni razvoju zavisničkog ponašanja, jer zahvaljujući razvojno-specifičnim odlikama, manje osećaju posledice dejstva adiktivnih supstanci (Tirelli i sar., 2003).

Razvoj bihevioralne senzitivizacije podrazumeva inicijaciju i ekspresiju (Kalivas i Stewart, 1991). Povećana aktivnost VTA je od presudnog značaja za inicijaciju, dok su adaptacije u ventralnom strijatumu (povećana senzitivnost dopaminskog D1 receptora, povećano oslobađanje dopamina, povećana aktivnost Ca^{2+} /kalmodulin-zavisne protein kinaze (engl. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*; CaMK) II α) značajne za ekspresiju bihevioralne senzitivizacije (Vezina, 2004, Valjent i sar., 2010, Steketee i Kalivas, 2011). Na osnovu rezultata dobijenih u studijama u kojima je vršena lezija struktura od interesa pokazano je da su i za akutni odgovor na adiktivne supstance i za proces senzitivizacije, osim ventralnog strijatuma, značajni i medijalni prefrontalni korteks (mPFK) i paraventrikularno jedro talamusa (lat. *nucleus paraventricularis thalami*, PVT) (Steketee i Kalivas, 2011, Kirouac, 2015).

1.5.1. Dvo-injekcioni protokol senzitivacije

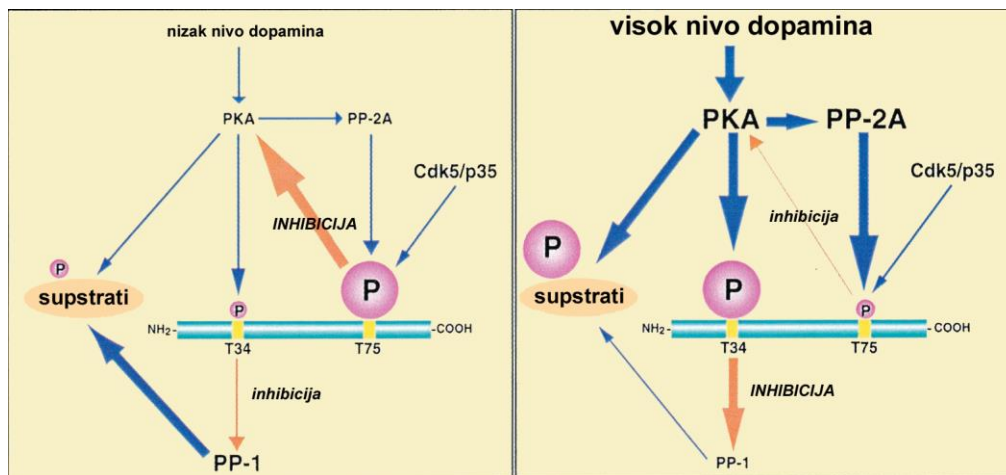
Novija istraživanja skrenula su pažnju da se senzitivacija može razviti i nakon jednokratnog izlaganja adiktivnoj supstanci, a model je označen kao dvo-injekcioni protokol senzitivacije (engl. *Two-injection protocol of sensitization*; TIPS) (Valjent i sar., 2010). Protein značajan za ovaj fenomen je dopaminom i cikličnim adenozin-monofosfatom regulisani fosfoprotein molekulske mase 32 kDa (engl. *Dopamine- and Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa*; DARPP-32), jer deluje kao pojačivač signala posredovanog D1 receptorima. Studija takođe naglašava da jednokratno izlaganje adiktivnoj/potencijalno adiktivnoj supstanci predstavlja idealnu paradigmu za ispitivanje paralelizma između molekulskih i bihevioralnih posledica tretmana, kao i jasno razlikovanje indukcije senzitivacije (izazvane prvom injekcijom) od ekspresije (izazvane drugom injekcijom iste ili različite (ukrštena senzitivacija) supstance). Senzitivacija koja se razvija na jednokratno izlaganje adiktivnom agensu može da ima drugačije mehanizme od senzitivacije izazvane dugotrajnim izlaganjem, koja može (upravo zbog dugotrajnosti) da obuhvati i kombinovane mehanizme tolerancije i desenzitivacije. Zbog toga je dvo-injekcioni protokol senzitivacije izuzetno pogodan za detekciju ranih efekata izazvanih potencijalnim adiktivnim agensom (Valjent i sar., 2010).

1.5.2. DARPP-32, CaMKII α i FosB/ Δ FosB kao biohemijski indikatori promena u dopaminskoj signalizaciji, sinaptičkoj i neuronskoj aktivnosti

1.5.2.1. DARPP-32

Stimulacija D1 klase receptora aktivira adenil ciklaze i produkciju cAMP-a, koji stimuliše aktivnost protein kinaze zavisne od cikličnog adenozin monofosfata (engl. *cAMP Dependent Protein Kinase A*; PKA) (Beaulieu i Gainetdinov, 2011, Svenningsson i sar., 2004.). Ova protein kinaza zatim fosforiliše DARPP-32 na poziciji Treonin 34 u aminokiselinskoj sekvenci ovog proteina (pDARPP-32^{Thr34}). Nivo pDARPP-32^{Thr34} proteina zavisi od nivoa sinaptičkog dopamina, tj. potenciran je u uslovima povećane količine sinaptičkog dopamina, dok je u bazalnim uslovima dominantna fosforilacija DARPP-32 na poziciji treonin 75 (pDARPP-32^{Thr75}) posredovana CDK5 kinazom (engl. *Cell division protein kinase 5*) (Slika 1.5., (Nishi i

sar., 2000)). Pozitivna regulacija PKA takođe doprinosi aktivaciji protein fosfataze-2A (engl. *Protein Phosphatase-2A*; PP2A), koja mehanizmom povratne sprege posreduje u defosforilaciji pDARPP-32^{Thr75} i dodatno potencira pDARPP-32^{Thr34}.



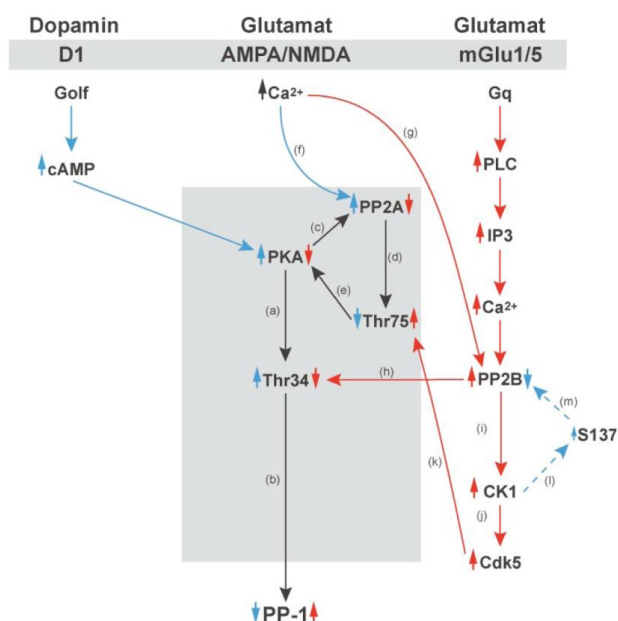
Slika 1.5. Shematski prikaz regulacije dopaminskog signalnog puta preko CDK5/pDARPP-32^{Thr75} i regulacije CDK5/pDARPP-32^{Thr75} signalnog puta koja je zavisna od nivoa dopamina (Nishi i sar., 2000).

Pokazano je da pDARPP-32^{Thr34} pojačava signalizaciju posredovanu D1 receptorom i deluje kao potentan inhibitor protein fosfataze-1 (engl. *Protein Phosphatase-1*; PP1) (Beaulieu i sar., 2015). PP-1 defosforiliše i inaktivira voltažno zavisne jonske kanale za natrijum i kalcijum, glutamatne receptore (AMPA i NMDA receptore), CaMKII, i transkripcioni regulator CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*), tako da povećana ekspresija pDARPP-32^{Thr34} specifično doprinosi promeni neuronske ekscitabilnosti.

Ukoliko dođe do značajnog povećanja koncentracije unutarćelijskog kalcijuma defosforilacija pDARPP-32^{Thr34} se može izvršiti posredstvom protein fosfataze-2B (engl. *Protein Phosphatase-2B*; PP2B), koja se označava i kao kalcineurin (Ca²⁺/kalmodulin zavisna serin/treonin protein fosfataza). Defosforilaciji pDARPP-32^{Thr34} takođe doprinosi i signalizacija posredovana D2 receptorima, povećavajući nivo pDARPP-32^{Thr75} koji funkcioniše i kao inhibitor PKA (Nishi i sar., 2011).

Iako primarno identifikovan kao ključni molekul u dopaminskoj transmisiji DARPP-32, zahvaljujući regulisanoj fosforilaciji, integriše informacije koje u dopaminoceptivne neurone dolaze iz različitih regiona mozga putem različitih neurotransmitera, neuromodulatora, neuropeptida i steroidnih hormona (Slika 1.6.,

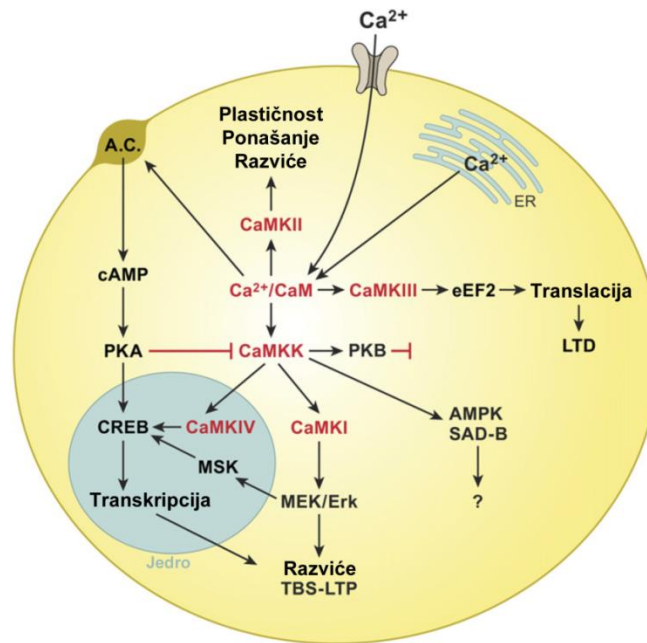
(Svenningsson i sar., 2004)), zbog čega je od ključnog značaja za odgovor neurona na fiziološke i farmakološke stimuluse uključujući adiktivne supstance.



Slika 1.6. Fosforilacija DARPP-32 proteina zavisi od fine regulacije kinaznih i fosfataznih kaskada koje se nalaze u dopaminskom i glutamatnom signalnom putu (Svenningsson i sar., 2004). Objašnjenje dato u tekstu.

1.5.2.2. CaMKII α

Literaturni podaci ukazuju da je CaMKII neophodna za indukciju dugotrajne potencijacije (engl. *Long term potentiation*, LTP) (Silva i sar., 1992), odnosno da je od ključnog značaja za procese regulacije jačanja ili slabljenja intenziteta transmisije u okviru sinapsi a koji mogu trajati minutima ili mesecima (Frankland i sar., 2001). Takođe, direktnom ili indirektnom interakcijom sa proteinima sinapse među kojima je i aktin, CaMKII može da reguliše strukturnu sinaptičku plastičnost dendritskih trnova na ekscitatornim sinapsama. Zbog toga je CaMKII ključni molekul u regulaciji sinaptičke i neuronske aktivnosti. Osim CaMKII multifunkcionalnim CaM kinazama pripadaju i CaMKK (engl. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*), CaMKI i CaMKIV – aktiviraju se Ca²⁺/CaM kompleksom i fosforilišu Ser/Thr ostatke u svojim proteinskim supstratima regulišući njihovu funkcionalnost (revijski prikaz u (Wayman i sar., 2006)). Distribucija ovih kinaza unutar ćelije određuje njihove supstrate i aktivacionu kinetiku (Slika 1.7.).



Slika 1.7. Ćelijska signalizacija posredovana kalcijum/kalmodulin-zavisnim protein kinazama (CaMK). CaMKI ima primarno citosolnu distribuciju, CaMKIV jedarnu a CaMKII sinaptičku (preuzeto i modifikovano iz (Wayman i sar., 2008)). Objašnjenje dato u tekstu.

Postoje četiri izoforme CaMKII – α , β , γ i δ . CaMKII α se predominantno nalazi u ekscitatornim sinaptičkim kontaktima i glavni je činilac postsinaptičke gustine (engl. *Postsynaptic density*; PSD). Nasuprot ovoj izoformi, CaMKII β koja se takođe nalazi u sinapsi, specifično se vezuje za F-aktin i doprinosi izrastanju neurita i održavanju dendritskih trnova (revijski prikaz dat u (Wayman i sar., 2008)).

U odgovoru na ulazak Ca^{2+} i povećanje njegove unutarćelijske koncentracije dolazi do vezivanja Ca^{2+} za kalmodulin (CaM), koji zatim aktivira širok dijapazon enzima uključujući familiju Ca^{2+} -kalmodulin zavisnih protein kinaza (Swulius i Waxham, 2008). Aktivacija CaMKII α podrazumeva autofosforilaciju treonina na poziciji 286 u aminokiselinskoj sekvenci CaMKII α (pCaMKII α^{Thr286}) u N-terminalnom kinaznom domenu, obezbeđujući autonomiju i povećavajući afinitet kinaze za kalmodulin do 1000 puta (Coultrap i sar., 2010). Zbog autokataličkog potencijala kinaze, fosforilacija bočne grupe treonina na poziciji 286 u primarnoj sekvenci CaMKII α se koristi kao surogat mera aktivnosti ove sinaptički pozicionirane izoforme CaMKII (Muller i sar., 2016).

Literatura ukazuje da sve adiktivne supstance povećavaju aktivnost CaMKII α povećavajući ekspresiju ovog proteina ili njegovu fosforilaciju ili na oba pomenuta

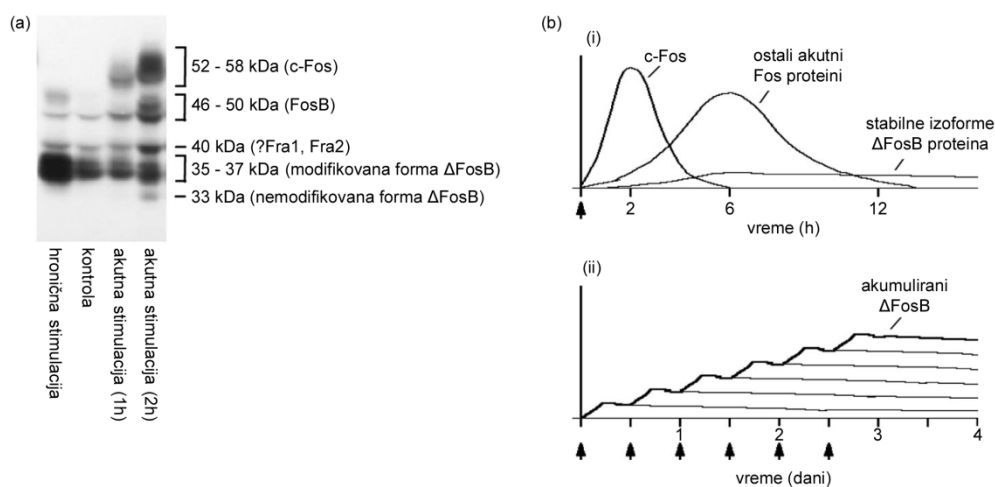
načina (Muller i sar., 2016). Indukcija mehanizama zavisnih od aktivnosti CaMKII tokom ekspresije bihevioralne senzitivacije je u skladu sa rezultatima biohemijskih merenja koji pokazuju da je kalmomodulinska aktivnost povećana kod pacova prethodno tretiranih amfetaminom (engl. *Amphetamine*; AMPH) (Gnagy i sar., 1991). Jedan od mehanizama kojim CaMKII doprinosi povećanju koncentracije vanćelijskog dopamina nakon ponovljene primene adiktivnih supstanci je podsticanje odvajanja vezikula od citoskeletnih proteina tokom pripreme za proces egzocitoze indukovane fosforilacijom sinapsina I (Lin i sar., 1990). Noviji podaci dodatno ukazuju da se aktivirana/fosforilisana CaMKII α (pCaMKII α^{Thr286}) vezuje za C terminus dopaminskog transportera, stimuliše fosforilaciju N termina transportera i podstiče reverzni transport dopamina (Fog i sar., 2006), što ima značajnu ulogu u ostvarivanju adiktivnog potencijala (Sulzer, 2011).

1.5.2.3. FosB/ Δ FosB

Izlaganje drogama menja gensku aktivnost i uzrokuje dugoročne sinaptičke (morfološke i funkcionalne) promene u mozgu koje se odražavaju na ponašanje jedinki tj. dovode do poremećaja u ponašanju koji definišu stanje zavisnosti (Nestler, 2008). Nakon akutne stimulacije/primene adiktivnih supstanci indukuje se brza, prolazna i strukturno-specifična ekspresija proteinskih produkata gena ranog odgovora (engl. *Immediate early genes*), među kojima su i članovi Fos familije. Promene se u velikoj meri uočavaju u limbičkom sistemu, NAc-u i dorzalnom strijatumu, moždanim regionima važnim za ostvarivanje psihomotoričkih efekata droga kao i za subjektivni osećaj zadovoljstva i nagrađivanja (Nestler, 2008). Osim detaljno okarakterisanog proteina c-Fos, koji je u literaturi opisan kao jedan od markera aktivacije neurona, Fos familija oduhvata još i FosB (engl. *Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*), FosL1 (Fra1) i FosL2 (Fra2). Fos familija transkripcionih faktora heterodimerizuje sa Jun familijom proteina, čineći heterodimere koji formiraju kompleks aktivatorskog proteina 1 (engl. *Activator protein 1*; AP-1); vezivanjem za AP-1 mesto u promotorskoj sekvenci gena reguliše ekspresiju i represiju; (Nestler, 2008)).

Poluživot Fos proteina je kratak i u toku nekoliko sati nakon stimulacije se postiže kontrolni nivo ekspresije. Jedino kratka varijanta FosB proteina (čiji je poluživot ~6 sati) označena kao Δ FosB ima duži poluživot i mogućnost da se nagomilava u

neuronima u kojima se eksprimira, zbog čega se može detektovati danima (čak i mesecima) nakon tretmana (Robison i Nestler, 2011). Δ FosB predstavlja skraćeni proteinski produkt *FOSB* gena i u poređenju sa FosB proteinom nedostaje mu C-terminalni domen od 101 aminokiseline (koji je značajan za proteozomsku degradaciju i ubikvitinaciju (Nestler, 2008)). Može se detektovati u nemodifikovanoj (primarnoj) formi kao protein mase 33 kDa kao i u posttranslaciono modifikovanoj (fosforilanoj; (Ulery-Reynolds i sar., 2009)) i stabilnijoj formi molekulske mase 35-37 kDa (Slika 1.8.; (Ulery-Reynolds i sar., 2009)).



Slika 1.8. Shematski prikaz postepene akumulacije Δ FosB proteina u odnosu na brzu i prolaznu indukciju ostalih proteina FosB familije kao odgovor na primenu adiktivnih supstanci. Preuzeto i modifikovano iz (Nestler, 2008).

Stabilna forma Δ FosB se akumulira u istim regiona mozga gde je inicijalno aktivirana nakon prvog izlaganja adiktivnoj supstanci, što je u suprotnosti sa drugim proteinima ove familije koji pokazuju toleranciju, odnosno smanjenje koncentracije nakon inicijalnog izlaganja (Chen i sar., 1995, Chen i sar., 1997, Hiroi i sar., 1997). Pored navedenog, Δ FosB je značajan za regulaciju ekspresije određenih subjedinica AMPA i NMDA receptora, kao i aktivnost CaMKII i CDK5 koji su značajni za razvijanje zavisnosti (Gajewski i sar., 2016). Zbog svih ovih funkcija i svoje stabilnosti, pojačana ekspresija Δ FosB se smatra potencijalnim markerom adiktivnog stanja organizma.

1.5.3. Testiranje ukrštene senzitivacije – odgovor na d-amfetamin i fenciklidin

Kao što je već pomenuto, ukrštena senzitivacija se odnosi na ispoljavanje motoričke hiperaktivnosti nakon tretmana jednom drogom a kao posledica prethodnog izlaganja drugom (nezavisnom) tretmanu. Koristi se kao dokaz da dva ispitivana tretmana deluju preko istih neuronskih sistema, bez obzira na razlike u primarnom mehanizmu dejstva (Steketee i Kalivas, 2011).

Psihostimulans d-AMPH i halucinogen PCP, koji imaju različite primarne mehanizme delovanja, mogu se koristiti za testiranje ukrštene senzitivacije.

1.5.3.1. Fenciklidin

Halucinogen PCP je prvobitno korišćen kao anestetik ali je zbog neželjenih postanestetskih efekata prestao da se koristi u klinici; rasprostranjena zloupotreba ove supstance brzo je ukazala na adiktivni potencijal (Graeven, 1978). Stanja slična psihozama i shizofreniji koja nastaju nakon konzumacije PCP-a su navela naučnike da efekte PCP-a iskoriste kao heuristički farmakološki model za shizofreniju (Luby i sar., 1962, Meltzer i Stahl, 1976). PCP primarno deluje kao nekompetitivni antagonist NMDA receptora. Nakon njegove primene kod eksperimentalnih životinja se (dozno-zavisno) detektuje pojačana motorička aktivnost, kod zdravih ljudi se indukuju psihotički simptomi, a kod obolelih od shizofrenije pogoršava psihičko stanje (Jentsch i Roth, 1999). Eksperimentalno je pokazano da primena PCP-a pojačava neuronsku aktivnost (praćeno promenom u ekspresiji c-Fos proteina, markera neuronske aktivnosti) ekscitatornih neurona kortikalnih i talamičkih subregiona (mediodorzalni i centromedijalni), koji su recipročno povezani (revijski prikaz (Santana i sar., 2011)). Bihevioralne posledice primene PCP-a se mogu objasniti kompleksnim mehanizmima delovanja PCP-a, koji se odigravaju istovremeno:

1. PCP blokira aktivnost NMDA receptora na GABAergičkim interneuronima PFK-a, snižavajući GABA-posredovanu inhibiciju (fenomen disinhibicije) piramidalnih neurona pojačava aktivnost PFK-a kao i kortikotalamički unos (Santana i sar., 2011);
2. PCP blokira aktivnost NMDA receptora na GABAergičkim interneuronima bazalnih ganglija (ventralni palidum i retikularni deo SNC-a) i/ili retikularnog jedra talamusa pojačavajući talamokortikalni unos (Santana i sar., 2011);

3. PCP povećava aktivnost dopaminskih neurona VTA – disinhibicija izazvana akutnom primenom PCP-a (inhibicija aktivnosti inhibitornih, najvećim delom GABAergičkih interneurona) dovodi do pojačanja glutamatne transmisije u regionu VTA, što stimuliše aktivnost dopaminskih neurona i mezokortikolimbicku dopaminsku transmisiju. Uprkos pojačanoj dopaminskoj transmisiji u PFK-u i ventralnom strijatumu/NAc-u, nakon akutne primene PCP-a dopaminska transmisija u dorzalnom strijatumu je relativno neoštećena (Jentsch i Roth, 1999).

Zbog antagonističkog efekta na NMDA receptore i izazivanja disinhibicije PCP pojačava oslobađanje glutamata, dopamina, serotonina i acetilholina. Ne treba zanemariti razliku u neurohemijskim efektima akutne i hronične primene nekompetitivnih NMDA antagonista (Jentsch i Roth, 1999, Lodge i Mercier, 2015). U svakom slučaju može se reći da PCP snažno utiče na normalno funkcionisanje kortiko-strijato-talamo-kortikalnih petlji koje učestvuju u kontroli različitih formi ponašanja, uključujući psihomotoričko (Paus i sar., 2008). Neuralni korelati hipermotoričkog odgovora izazvanog primenom PCP-a su detaljno okarakterisani za dozu od 5 mg/kg (Jentsch i sar., 1998).

1.5.3.2. Amfetamin

D-amfetamin (d-AMPH) je psihomotorički stimulans poznat kao aktivator dopaminskog sistema prednjeg mozga (Seiden i sar., 1993). Izaziva dozno – zavisne biohemijske i bihevioralne efekte koji su najbolje proučeni kod glodara (Kuczenski, 1986, Sharp i sar., 1987). Pri manjim i srednjim dozama AMPH izaziva povećanje lokomotorne aktivnosti usled povišenja nivoa dopamina u sinapsama NAc-a, dok pri većim dozama izrazito povećava stereotipne aktivnosti usled povećanog nivoa dopamina u sinapsama strijatuma (Creese i Iversen, 1974, Fink i Smith, 1980). AMPH povećava nivo sinaptičkog dopamina tako što (Calipari i Ferris, 2013):

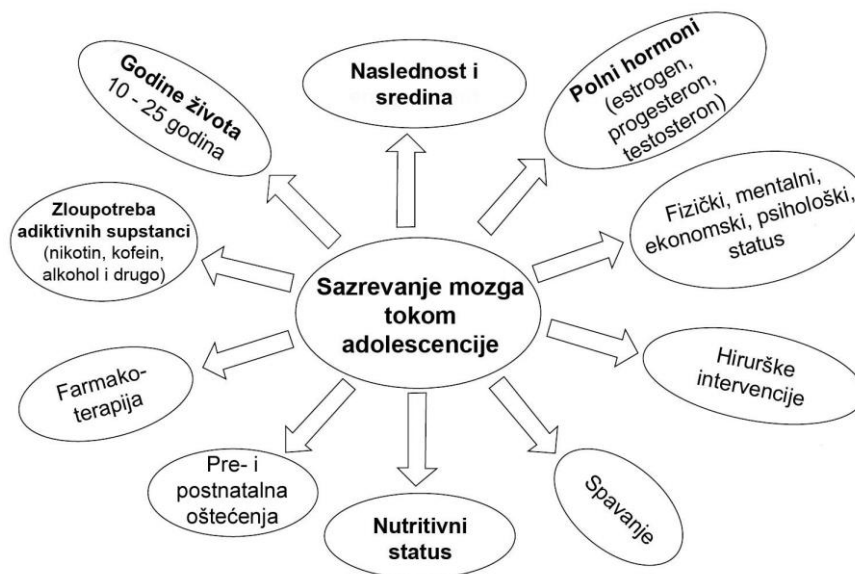
1. Zbog strukturne sličnosti sa dopaminom predstavlja supstrat za dopaminski nosač (engl. *Dopamine transporter*; DAT) i na taj način ometa vraćanje dopamina iz sinaptičke pukotine u presinapsu, tj. njegovo uklanjanje iz sinapse;
2. Ubrzava oslobađanje dopamina iz vezikula u citoplazmu;

3. Promoviše DAT-posredovani reverzni transfer dopamina u sinaptičku pukotinu, nezavisno od oslobađanja dopamina iz vezikula indukovanog akcionim potencijalom.

Pri dozama većim od 1,75 mg/kg, d-AMPH povećava vanćelijsku koncentraciju serotonina i acetilholina (Kuczenski i Segal, 1989, Florin i sar., 1992). S obzirom da izbor doze značajno utiče na selektivnost neurohemijskih efekata primene d-AMPH-a, izbor malih ka srednjim dozama omogućava selektivniju procenu uticaja tretmana na dopaminski sistem nego izbor velikih doza (Robinson i Becker, 1986). Pri izboru doze takođe treba imati u vidu da su juvenilne/peripubertetske jedinke pacova znatno manje osetljive na d-AMPH-izazvanu motoričku stimulaciju u poređenju sa adultnim jedinkama i da doza od 1,5 mg/kg daje zadovoljavajuće motoričke efekte (Vasilev i sar., 2003).

1.6. Adolescencija

Adolescencija predstavlja prelazni period između detinjstva i adultnog stadijuma i karakteriše se intenzivnim intelektualnim, fizičkim, hormonskim i socijalnim sazrevanjem u datim društveno-kulturološkim uslovima (Crews i sar., 2007, Steinberg, 2008, Arain i sar., 2013). Neurofarmakološki, neurofiziološki, bihejvioristički i neuromorfološki podaci ukazuju da se tokom perioda adolescencije u centralnom nervnom sistemu (CNS) dešavaju maturacione promene koje su po intenzitetu odmah iza promena uočenih u ranom postnatalnom periodu (Arain i sar., 2013). Zna se da je u ovom periodu mozak izuzetno osetljiv na sredinske stimuluse (uključujući stres) (Slika 1.9.) i da su adolescentne jedinke sklone razvoju rizičnog i zavisničkog ponašanja kao i neadekvantnoj kontroli impulsivnog ponašanja (Casey i sar., 2008, Steinberg, 2008).



Slika 1.9. Faktori koji utiču na sazrevanje mozga tokom adolescencije. Preuzeto i modifikovano iz (Arain i sar., 2013).

1.6.1. Opšte karakteristike razvojnog perioda

Ponašanje karakteristično za period adolescencije kod ljudi (težnja za novinom i senzacijom, intenzivne promene u socijalnom ponašanju, sklonost ka rizičnom ponašanju) se može uočiti kod većine sisarskih vrsta, što ukazuje da animalni modeli mogu opravdano da se koriste u proučavanju neurobihejviorističkih i fizioloških karakteristika adolescentnog perioda (Spear, 2004). Ipak, ne treba izostaviti činjenicu da potpunu neurobiološku kompleksnost tokom ovog maturacionog perioda iskazuju samo ljudi, kod kojih je, prema jednoj od definicija, adolescencija period koji počinje pubertetom i završava se uspostavljanjem socijalne nezavisnosti (Steinberg, 2008).

Literaturni podaci ne daju jasnu sliku od koje uzrasne godine kod ljudi adolescencija počinje a kad se završava, a još manje je jasna direktna analogija vezana za razvojnu starost između ljudi i glodara. Period adolescencije konvencionalno obuhvata uzrasni period od približno 10 do 18 godina starosti kod čoveka, mada se prema najnovijim standardima gornja granica znatno pomera na 26 godina starosti (APA, 2002). Razlikuju se tri adolescentna stadijuma razvića, koji variraju po godinama koje obuhvataju (Burke i Miczek, 2014): rana (10-14 godina), srednja (14-17 godina) i kasna (koja prema nekim autorima traje i do 25 godine, a prema drugim autorima ovaj period predstavlja rani adultni stadijum razvića (Curtis, 2015)) adolescencija.

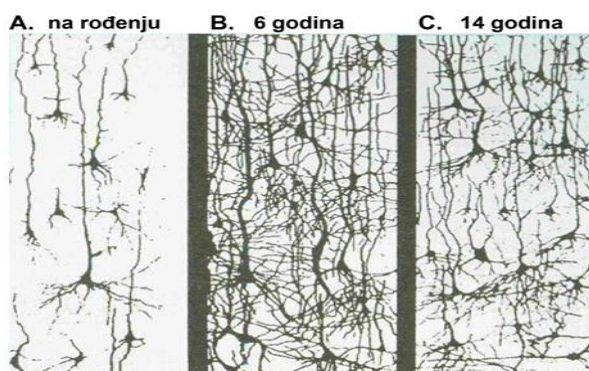
Kod glodara se adolescencija standardno odnosi na period od 28. do 42. dana postnatalnog razvića (PND 28-42) (Spear, 2000). Novije podele, koje odgovaraju gore pomenutoj klasifikaciji kod ljudi, obuhvataju ranu (prepubescentni period, PND 21-34), srednju (periadolescentni period, PND 34-46) i kasnu (PND 46-59) adolescenciju (Tirelli i sar., 2003). Treba napomenuti da pubertet nije sinonim za adolescenciju i da predstavlja samo jedan od značajnih razvojnih događaja tokom vremenske skale adolescencije (Schneider, 2013). Pubertet se definiše merljivim hormonskim i fizičkim promenama značajnim za sticanje seksualne zrelosti i sposobnosti reprodukcije, nije striktno zavisano od hronološke starosti, iniciran je pojačanim lučenjem gonadotropin-oslobađajućeg hormona od strane hipotalamusa i posledičnim porastom nivoa seksualnih hormona. Kod glodara, periadolescentni period obuhvata 7-10 dana pre početka puberteta, koji se dešava oko 40. postnatalnog dana (kod miševa ranije u odnosu na pacove (Schneider, 2013), i nekoliko dana nakon toga.

Ovom prilikom treba naglasiti da je termin *juvenilni* u ranijoj literaturi često korišćen u eksperimentalnim radovima da bi se označio period starosti eksperimentalnih jedinki koji podrazumeva seksualnu nezrelost i intenzivan fizički razvoj, jer su granice tačnog razdvajanja juvenilne i pubertetske faze teško precizno odredive kod vrsta životinja koje se intenzivno koriste u eksperimentalnim istraživanjima (ne-humani primati i glodari), kao i tačna starost kada nastupa seksualna zrelost (Spear, 2000, Schneider, 2013).

1.6.2. Sinaptičko orezivanje i mijelinizacija

Tokom adolescencije, mozak prolazi kroz niz progresivnih i regresivnih promena koje predstavljaju biološku osnovu jedinstvenog adolescentnog ponašanja (Crews i sar., 2007). Najuočljivije promene se javljaju na nivou sinapsi, gde se beleži gubitak i do 50% sinaptičkih veza u okviru nekih regiona kore velikog mozga (Rakic i sar., 1994). Pretpostavlja se da procesu orezivanja podležu one sinapse koje su manje efikasne, dok veze između onih sinapsi koje se koriste postaju snažnije, što za rezultat ima precizniju obradu informacija (npr. bolje izvršavanje kognitivnih zadataka) (Huttenlocher, 1979). Tokom adolescencije se najviše orezuju (engl. *Synaptic pruning*) ekscitatorne sinapse (Bourgeois i sar., 1994).

Najveće promene tokom adolescencije trpe PFK i limbički sistem (koji obuhvata limbički korteks – (pojasna vijuga (lat. *gyrus cingulatus*), parahipokampalna vijuga (lat. *gyrus hippocampus*), hipokampalnu formaciju – dentatni girus (lat. *gyrus dentatus*), hipokampus, subikularni kompleks, amigdale, septalna oblast, anteriorni talamus, hipotalamus, (Rajmohan i Mohandas, 2007), kao i delovi bazalnih ganglija sa akcentom na ventralni strijatum koji predstavlja funkcionalni interfejs između limbičkog i motoričkog sistema (Salgado i Kaplitt, 2015). Reprezentativni prikaz promena u gustini sinaptičkih kontakata u prefrontalnom korteksu čoveka tokom maturacije dat je na slici 1.10.



Slika 1.10. Gustina sinapsi tokom razvića. Značajno povećanje broja sinapsi je uočljivo nakon rođenja (A) do ranog prepubertetskog razvića (B). Nakon ovog perioda dolazi do redukcije sinapsi (C) i stabilizacije njihovog broja tokom kasne adolescencije. Preuzeto i modifikovano iz (Shore, 1997).

Tokom razvića/maturacije nervnog sistema usled sinaptogeneze i orezivanja sinapsi dolazi do promena u volumenu sive mase mozga koje imaju profil obrnutog slova U, odnosno preadolescentni rast je praćen postadolescentom smanjivanjem volumena sive mase (Giedd i sar., 1999, Giedd, 2004). Sa druge strane, volumen bele mase mozga se konstantno uvećava tokom razvića do adultnog perioda, usled progresivne mijelinizacije aksona (Villablanca i sar., 2000, Sowell i sar., 2003). Mijelinizacija povećava brzinu provođenja električnih impulsa kroz akson i na taj način ubrzava protok informacija između različitih regiona mozga.

1.6.3. Dopaminski sistem tokom adolescencije

Posebna pažnja se pridaje ispitivanju monoaminskih neurotransmiterskih sistema (dopamin, noradrenalin i serotonin), jer se promene u njihovoj aktivnosti u velikoj meri odražavaju na ponašanje, uključujući psihofizičku, emotivnu i kognitivnu

komponentu. U fokusu istraživanja je dopaminski sistem koji tokom adolescencije podleže intenzivnim promenama, koje zadržavaju izvesne specifičnosti za datu vrstu (Wahlstrom i sar., 2010).

Dopaminski neuroni srednjeg mozga su glavni izvor dopamina u CNS-u sisara i, projektujući se na kortikalne, limbičke i strijatalne moždane regione, ostvaruju važnu ulogu u širokom spektru bihevioralnih aktivnosti uključujući raspoloženje, podsticajem/nagrađivanjem vođeno ponašanje i motoričku aktivnost jedinke (Depue i Collins, 1999). Dopaminske mezokortikolimbiske projekcije iz VTA završavaju se u kori velikog mozga (najviše u mPFK-u), limbičkom sistemu i ventralnom strijatumu (Bjorklund i Dunnett, 2007, Dahlstroem i Fuxe, 1964), uz naglasak na funkcionalnu heterogenost i antero-posteriorne razlike u targetima dopaminskih neurona VTA (Ikemoto, 2010).

Dostupni podaci ukazuju da i kod primata i kod glodara tokom adolescencije dolazi do povećanja aktivnosti dopaminskog sistema u mozgu na region-specifičan način. Kod primata se beleži porast dopamina kao i gustine D1 i D2 receptora u kortikalnim i subkortikalnim regionima mozga tokom adolescencije (revijski prikaz u (Wahlstrom i sar., 2010)). Sa druge strane, kod glodara dopaminergička inervacija kao i gustina dopaminskih receptora pokazuju porast u PFK-u sve do ranog adultnog perioda (Kalsbeek i sar., 1988, Tarazi i Baldessarini, 2000), dok su u strijatumu (sa akcentom na ventralni strijatum) u piku upravo tokom puberteta (Andersen i sar., 1997, Tarazi i sar., 1998, Andersen i sar., 2002). Novija literatura takođe ukazuje da su dopaminski neuroni VTA aktivniji tokom adolescencije u odnosu na ranije i kasnije faze razvića kod glodara (McCutcheon i sar., 2012).

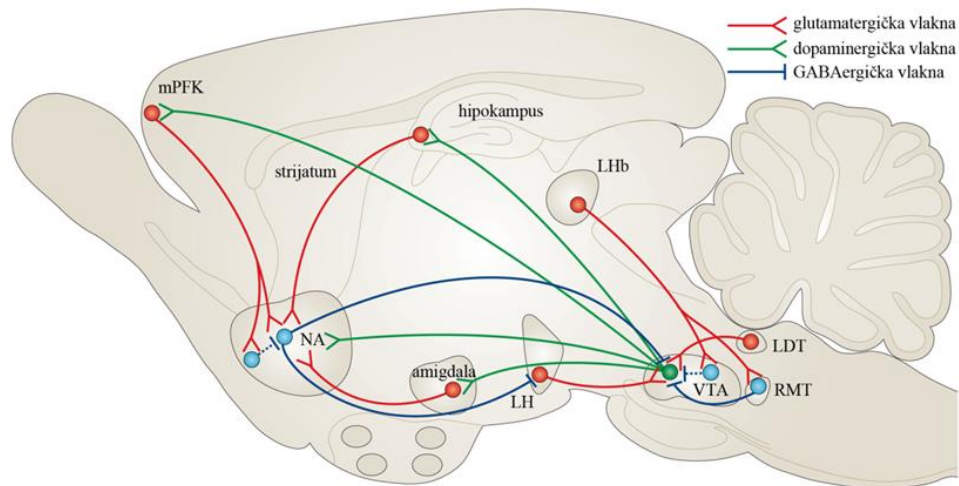
Koliko je aktivnost dopaminskog sistema u okviru mezokortikolimbickog sistema važna za podsticajem vođeno ponašanje pokazuju studije u kojima izazivanje hiperdopaminskog statusa inicira potragu za novinom i lokomotorno ponašanje usmereno ka nekom cilju, dok izlaganje dopaminskim antagonistima izaziva suprotan efekat (Fouriezos i sar., 1978, Le Moal i Simon, 1991). Sa druge strane pacovi koji pokazuju viši nivo lokomotorne aktivnosti i potrage za novinom u većoj meri ispoljavaju težnju za samoinicijativno izlaganje adiktivnim supstancama i imaju viši nivo dopamina u poređenju sa pacovima koji imaju nizak bazalni nivo aktivnosti (Piazza i sar., 1991). Prema tome, jasna je veza između aktivnosti dopaminskog sistema

i podsticajem vođenog lokomotornog ponašanja, zbog čega u eksperimentalnim istraživanjima na glodarima lokomotorna aktivnost služi kao osnovni indikator ovog vida ponašanja želje/težnje da se ispita novo okruženje i prevaziđe strah od nepoznatog (Wahlstrom i sar., 2010).

1.6.4. Kritičan period razvića jedinke praćen velikim potencijalom za razvijanje zavisnosti

Obrazac inicijacije i eskalacije zloupotrebe najčešće korišćenih droga povezan je upravo sa adolescencijom i smatra se u velikoj meri posledicom sporije maturacije moždanih regiona značajnih za izvršnu kontrolu ponašanja u odnosu na subkortikalne regione koji promovišu motivaciono ponašanje (Ernst i Luciana, 2015). Uprkos čestim apelima naučnika da je nervni sistem tokom adolescencije izuzetno plastičan i da su jedinke tokom ovog perioda jako osetljive na dejstvo spoljašnjih stimulusa, dugoročan uticaj farmakološki aktivnih supstanci na adolescente nije dovoljno istražen (Ernst i Luciana, 2015).

Nagrade se definišu kao svaki objekat ili cilj, za koji će voljno biti uloženo vreme, energija i napor kako bi se dosegao i zadobio neki vid satisfakcije (Schultz, 2010). Osećaj zadovoljstva i nagrađivanja se postiže elementarnim životnim potrebama kao što su unos hrane, unos tečnosti i reprodukcija, ali i stimulusima neelementarne prirode kao što su kockanje, alkohol ili korišćenje psihoaktivnih supstanci (Arias-Carrion i sar., 2010). Sve navedene elementarne i neelementarne potrebe jedinki izazivaju osećaj zadovoljstva delujući na isti evolutivno očuvani sistem za nagrađivanje koji ima kompleksnu neurohemijsku osnovu koju čine glutamatni, GABAergički, serotoninški i drugi, sa nezaobilaznom ulogom dopaminskog sistema. Aktivnost sistema za nagrađivanje (Arias-Carrion i sar., 2010, Russo i Nestler, 2013) podrazumeva stimulaciju mezolimbicke dopaminske transmisije (značajne za obradu informacija sa emotivnog aspekta, tj. da li je i koliko stimulus bio prijatan), mezokortikalne transmisije (koja je značajna za više moždane aktivnosti, tj. za obradu informacija o kontekstu u kom se ovaj prijatni stimulus pojavio) i hipokampalne aktivnosti (što doprinosi stvaranju memorije o datom stimulusu i sveukupnim posledicama, uključujući promene u emotivnom statusu) pri čemu je aktivnost ventralnog hipokampusa od posebnog značaja (slika 1.11.).



Slika 1.11. Uprošćen shematski prikaz glavnih dopaminergičkih, glutamatergičkih i GABAergičkih neuronskih puteva između ventralne tegmentalne oblasti (VTA) i odgovarajućih dopaminoceptivnih regiona u mozgu glodara. Medijalni prefrontalni korteks – mPFK, nukleus akumbens – NAc, laterodorzalno tegmentalno jedro – LDT, rostromedijalni tegmentum – RMT, lateralne habenule – LHb, lateralni hipotalamus – LH. Preuzeto i modifikovano iz (Russo i Nestler, 2013).

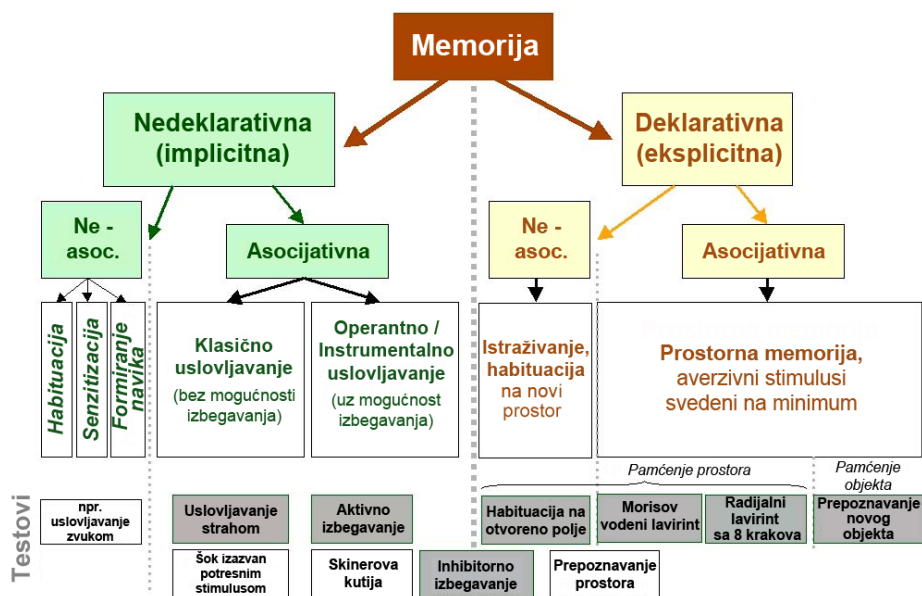
Recipročne veze koje postoje između svih navedenih regiona mozga uključenih u sistem nagrađivanja, organizmu daju informacije o prirodi stimulusa, važnosti stimulusa za organizam, kontekstu u kojem se pojavio, šta je potrebno uraditi i koliko rizikovati da bi se stimulus ponovio. Takođe je poznato da individue koje imaju povišen nivo dopamina u moždanim regionima sistema za nagrađivanje (mezolimbčki put) ispoljavaju povećan nivo moždane aktivnosti u odgovoru na nagrade (Dreher i sar., 2009, Hariri, 2009).

Ponašanje sklono riziku je posredovano povećanom aktivnošću dopaminskog sistema u subkortikalnim regionima primata i glodara, pri čemu procesi koji su u osnovi takvog ponašanja nisu adekvatno kontrolisani od strane PFK-a koji tokom adolescencije najkasnije sazreva (Wahlstrom i sar., 2010). Zbog toga je ovaj period razvića okarakterisan kao veoma osetljiv na sredinsku (pozitivnu i negativnu) stimulaciju jer može da rezultira razvojem maladaptivnih ponašanja. Smatra se da je zbog nesinhronizovane maturacije neurotransmiterskih sistema i aktivnosti moždanih regiona tokom adolescencije povećan rizik za nastanak kognitivnih, afektivnih i adiktivnih poremećaja (Giedd i sar., 2008).

1.7. Učenje i pamćenje

Pamćenje ili memorisanje se može opisati kao bihejvioralna promena prouzrokovana iskustvom, a učenje kao proces prikupljanja informacija neophodnih za formiranje memorije (Okano i sar., 2000). Memorisanje informacija predstavlja kompleksan proces i ne zavisi od jednog tipa memorije, već od nekoliko tipova koji se mogu klasifikovati prema različitim kriterijumima (Quillfeldt, 2016). Jedna od klasifikacija koja uzima u obzir i testove primenljive na animalnim modelima, pogodna za ispitivanje određenih aspekata procesa učenja i pamćenja, je prikazana na slici 1.12.

Implicitna memorija se ne odvija svesno, odgovorna je za motoričke veštine, sticanje navika, klasično uslovljavanje i zavisi od aktivnosti moždanih regiona kao što su mali mozak, strijatum, amigdale i neokorteks. Eksplicitno pamćenje (semantičko – opšte znanje i epizodično – sećanje na autobiografske događaje) je vezano za događaje, činjenice, predmete i mesta kojima možemo da pristupimo sa namerom, svesno i zahteva aktivnost medijalnog temporalnog režnja (hipokampus i peririnalni, entorinalni region kore velikog mozga). Epizodična eksplicitna memorija je najosetljivija na delovanje unutrašnjih i spoljašnjih stimulusa/faktora, među kojima su anestetici, i njen gubitak se označava kao amnezija.



Slika 1.12. Taksonomski model različitih tipova memorije i bihejvioralni testovi koji mogu poslužiti za njihovo ispitivanje (preuzeto i modifikovano iz (Quillfeldt, 2016).

Kratkotrajna memorija traje do nekoliko sati, dok dugotrajna može da traje danima, godinama ili do kraja života jedinke. Kratkotrajna memorija ne predstavlja početnu fazu formiranja dugotrajne memorije, jer se ova dva procesa odvijaju paralelno i u velikoj meri nezavisno jedan od drugog, u okviru istih neuroanatomskih regiona, ali ne uključuju iste unutarćelijske, neurohemijske i elektrofiziološke mehanizme (Quillfeldt, 2016). Prema istom autoru poseban vid kratkotrajne memorije predstavlja radna memorija. Ona se razlikuje od drugih vidova memorije prvenstveno zbog njene u suštini „egzekutivne” funkcije, jer se informacije ovog tipa koriste za donošenje odluke koji vid ponašanja treba ispoljiti u datom trenutku.

Proces učenja i pamćenja zavisi od aktivnosti mnogobrojnih neuronskih puteva u mozgu, kao i procesa koji se dešavaju na sinapsama tih neuralnih mreža, tako da sinaptička plastičnost predstavlja osnovu formiranja memorije. Značaj sinaptičke plastičnosti u učenju i pamćenju se može velikim delom objasniti Hebovim postulatom (Hebb, 1949). Posledica simultane aktivnosti nervnih ćelija je indukcija i ekspresija LTP-a i dugotrajne depresije (engl. *Long term depression*; LTD), što se reflektuje kroz lokalnu aktivaciju enzima, posttranslacione modifikacije proteina, promene u genskoj ekspresiji i sintezi proteina u okviru pre- i postsinaptičke ćelije, što dovodi do dugotrajnih strukturnih i funkcionalnih promena u sinapsama i neuronima kao celinama (Bi i Poo, 2001). Pošto veći broj sinapsi koordinisano učestvuje u aktivaciji postsinaptičkog neurona, ovi procesi mogu biti u osnovi sposobnosti neurona da informacije poreklom od različitih izvora koji su prezentovani zajedno obrađuje i povezuje, formirajući na taj način memorijske asocijacije.

Formiranje dugotrajne memorije se može podeliti u više faza: sticanje informacija (engl. *Acquisition*), konsolidacija i prisećanje (Quillfeldt, 2016). Učenje predstavlja prikupljanje i obradu kratkotrajnih eksplicitnih informacija. Konsolidacija je proces u kome se formirana memorija skladišti nakon učenja, dok faza prisećanja predstavlja proces tokom kojeg se prethodno konsolidovana memorija aktivno koristi (Tronson i Taylor, 2007). Memorija koja je vraćena u svest nakon procesa prisećanja je nestabilna i mora naknadno da se stabilizuje. Ovaj proces, funkcionalno i molekularno različit od konsolidacije, je nazvan rekonsolidacija. Ukoliko nije prethodno kompletiran proces rekonsolidacije memorisane informacije nakon prisećanja mogu biti izgubljene (Lee, 2008, Rudy, 2008).

Proces konsolidacije memorije nakon učenja relativno dugo traje i meri se desetinama sekundi ili minuta za inicijalnu fazu (sinaptička konsolidacija), a danima pa čak i godinama za sistemsku konsolidaciju (Miller i Matzel, 2006). Upravo ovaj vremenski period nakon učenja, koji je znatno duži nego vremenski period potreban za inicijalnu konsolidaciju, je neophodan za dovršavanje procesa koji determinišu efikasnost procesa prisećanja, što ukazuje da proces prisećanja može biti deo sistemske konsolidacije. Vremenski period između inicijalne i završne faze sistemske konsolidacije je najosetljiviji na uticaj spoljašnjih/sredinskih faktora.

1.7.1. Prepoznavanje novine

Najosnovniju formu učenja i pamćenja predstavlja neuralna reprezentacija novine. Novi stimulus izaziva specifičan bihevioralni odgovor koji organizam priprema na neočekivani, potencijalno značajni događaj i daje jedinki mogućnost da istraži značajnost novog stimulusa. Da bi stimulus uopšte bio prepoznat kao nov, neophodno je da prikupljene informacije o tom stimulusu budu upoređene sa prethodno zapamćenim informacijama. Kako bi mogla da se iskaže preferenca prema novini jedinka mora da kodira, skladišti/konsoliduje i povрати informacije iz memorije, što predstavlja osnovu intelektualnog ponašanja (Burbacher i Grant, 2012). Prema tome, memorija prepoznavanja se smatra osnovnim intelektualnim procesom pomoću kojeg, nakon prisećanja, jedinka može ustanoviti da li je već upoznata sa određenom informacijom, događajem ili činjenicom (Mishkin i Murray, 1994, Rose i sar., 2003).

Prepoznavanje novine zavisi od aktivnosti dorzalnog hipokampusa (Hunsaker i sar., 2008, Sanderson i Bannerman, 2012, Cohen i Stackman, 2015). Dorzalni hipokampus je takođe definisan i kao moždana struktura specifično uključena u proces prisećanja koji zavisi od konteksta sredine i tipa testirane memorije (Strange i sar., 2014). Međutim pored hipokampusa i drugi regioni mozga (peririnalni, parahipokampalni i entorinalni regioni kore velikog mozga) koji formiraju veze sa hipokampusom i zajedno čine medijalni temporalni režanj, imaju značajnu ulogu u memoriji prepoznavanja (Brown i Aggleton, 2001, Oliveira i sar., 2010, Wixted i Squire, 2011). Pokazano je da memorija prostora u odnosu na ne-prostornu memoriju može biti znatno osetljivija na izmene u normalnoj aktivnosti hipokampusa (Broadbent i sar., 2004).

Većina podataka je dobijena iz studija lezija navedenih regiona medijalnog temporalnog režnja kod adultnih glodara. Zato je važno ispitati na koji način supstance za koje se zna da poseduju amnezijski efekat utiču na neaverzivne oblike memorije (zavisne od aktivnosti hipokampusa) kod mladih jedinki, naročito imajući u vidu da se eksplicitni memorijski kapacitet intenzivno razvija/sazreva tokom juvenilne faze, kroz adolescenciju (druga decenija života kod ljudi, (Jabes i Nelson, 2015)).

1.7.1.1. Test prostorne habituacije

Prostorna habituacija je jedna od najosnovnijih formi neaverzivnog hipokampus-zavisnog učenja (Leussis i Bolivar, 2006). Može se definisati kao smanjenje eksploratorne aktivnosti u odgovoru na kontinuirano ili ponovljeno izlaganje istoj sredini, bez prisustva pozitivnih (npr. hrana) ili negativnih (npr. šokiranje neprijatnim stimulusom) biološki relevantnih stimulusa u njoj (Leussis i Bolivar, 2006). Izrazita eksploratorna aktivnost ukazuje da sredina nije dovoljno poznata. Prema teoriji „kognitivnih mapa“, pacovi izloženi novoj sredini formiraju unutrašnju reprezentaciju informacija prikupljenih iz spoljne sredine (O'Keefe i Nadel, 1978). U trenutku kada se kompletira unutrašnja reprezentacija informacija u hipokampusu, istraživanje sredine, čija je mera najčešće intenzitet lokomotorne aktivnosti, se redukuje i glodar postaje habituiran (familijaran) sa okruženjem. Zbog toga se habituacija na novu sredinu koristi za ispitivanje promena u procesu neasocijativnog učenja i pamćenja kod glodara usled različitih farmakoloških tretmana (Platel i Porsolt, 1982). Iako se prostorna habituacija smatra neasocijativnim procesom (Leussis i Bolivar, 2006, Quillfeldt, 2016), neki naučnici razlikuju kratkotrajnu neasocijativnu habituaciju i dugotrajnu asocijativnu habituaciju (Sanderson i Bannerman, 2012). Dok je kratkotrajna habituacija rezultat adaptabilnosti na prisustvo stimulusa, dugotrajna habituacija zavisi od procesa prisećanja. Prema jednoj hipotezi (Wagner, 1981) dugotrajna habituacija nastupa zato što formirane asocijacije između mentalnih prezentacija sredine/stimulusa omogućavaju memorijsku aktivaciju i usled parcijalne stimulacije, što je označeno kao sekundarno aktivno memorijsko stanje (A2). Ako stimulus formira asocijaciju sa kontekstom u kome je predstavljen, predstavljanje konteksta može (asocijativno) da aktivira mentalnu prezentaciju tog stimulusa, pri čemu nivo aktivacije A2 stanja zavisi od jačine

asocijacija koje su formirane između stimulusa, a ne od toga koliko je skoro stimulus prezentovan (što je slučaj sa kratkotrajnom habituacijom).

1.7.1.2. Test prepoznavanja novog objekta

Test prepoznavanja novog objekta (engl. *Novel object recognition test*) (Ennaceur i Delacour, 1988) se bazira na sposobnosti eksperimentalne jedinke da zapamti karakteristike objekta i nakon određenog vremena prepozna šta je novi a šta stari objekat, što se manifestuje kroz intenzivno ispitivanje novog objekta u odnosu na stari. Ovakav eksperimentalni pristup je nastao na osnovu kliničkog testa za uparena poređenja (engl. *Visual Paired-Comparison (VPC) test*) u kojem je selektivna vizuelna pažnja u određenim uslovima mera perceptualno-kognitivnih sposobnosti (Fagan, 1990).

Test je originalno osmislio Dr. Robert L. Fantz i predstavljao je inovativni pristup za evaluaciju percepcije kod male dece na osnovu principa vizuelne selektivnosti (Fantz, 1958). Fantz je 1964. godine prilagodio VPC paradigmu za proučavanje memorije kod dece i formiran je test memorije vizuelnog prepoznavanja (Fantz, 1964). Test se sastojao od faze familijarizacije koja je podrazumevala upoznavanje deteta sa dva identična stimulusa, i nakon određenog vremena (retencionog intervala) predstavljanje novog uparenog stimulusa sa starim stimulusom (slika 1.13.). Uočeno je da vizuelna pažnja upravljena ka stimulusu sa kojim je dete prethodno upoznato opada, što je protumačeno kao dokaz da dete pamti familijaran stimulus. Sa druge strane pažnja deteta je više upravljena na novi u odnosu na stari (familijaran) vizuelni stimulus/sliku (Fantz, 1964, Fagan, 1970, Fagan, 1971). Na ovaj način je ustanovljeno da deca vrlo rano uspostavljaju memoriju vizuelnog prepoznavanja.



Faza familijarizacije

Subjektima se za vizuelnu inspekciju predstavljaju dve identične slike (krugovi). Nakon unapred određenog vremenskog perioda potrebnog da se subjekti familijarizuju sa stimulusom (obično između 30 i 60 sekundi), primenjuje se prvi retencionni interval.



Test faza nakon prvog retencionog intervala

Familijarni stimulus (krug) se uparuje sa novim stimulusom (trougao) i beleži se vreme provedeno u posmatranju svakog.



Test faza nakon drugog retencionog intervala

Ova faza je skoro identična kao test faza nakon prvog retencionog intervala. Jedina izmena je u obrnutom položaju familijarnog i novog stimulusa (sa leva na desno ili obrnuto u zavisnosti od početnog položaja u test fazi 1) kako bi se izvršila kontrola naklonjenosti određenoj strani.

Slika 1.13. Problematika testa vizuelne memorije prepoznavanja (engl. *Visual Recognition Memory test*) se prikazuje subjektima po protokolu koji se koristi za test vizuelnog uparenog poređenja (engl. *Visual Paired-Comparison test*). Dve identične kopije stimulusa (krugovi) se subjektima prikazuju za vizuelnu inspekciju (period familijarizacije**). Nakon određenog vremena predviđenog za posmatranje, sada familijaran stimulus (krug) se posle određenog retencionog intervala uparuje sa novim stimulusom (trougao), a vreme provedeno u posmatranju svakog beleži utrenirani eksperimentator (**test faza nakon prvog retencionog intervala**). Posle drugog retencionog intervala, zamenjuje se položaj starog i novog predmeta, a vreme provedeno u posmatranju svakog opet beleži eksperimentator (**test faza nakon drugog retencionog intervala**). Preuzeto i modifikovano iz (Burbacher i Grant, 2012).**

Individualne razlike u rešavanju testa vizuelnog prepoznavanja zavise od mnogobrojnih faktora (npr. intelektualne karakteristike osobe ili uticaja određenih supstanci), ali najviše od brzine procesuiranja informacija. Senzitivnost ovog testa pri ispitivanju intelektualnih poteškoća je navelo Univerzitet Case Western da razvije Faganov test dečje inteligencije, komercijalno dostupan test koji se koristi u bazičnim istraživanjima i kliničkim postavkama (slika 1.14.) (Fagan i Detterman, 1992).

Na osnovu testa memorije vizuelnog prepoznavanja Ennaceur i Delacour su 1988. godine predstavili test prepoznavanja novog objekta koji se mogao primenjivati na glodarima (Ennaceur i Delacour, 1988). Ovaj test takođe uključuje fazu familijarizacije (upoznavanje sa dva identična objekta) i test fazu (prepoznavanje starog u odnosu na novo-prezentovani objekat). Testu prethodi faza habituacije (upoznavanje sa sredinom u kojoj će biti predstavljeni objekti).



Slika 1.14. Na slici je prikazano dete podvrgnuto Faganovom testu dečje inteligencije. Može se uočiti dete koje posmatra dva različita stimulusa (ljudske ekspresije lica) koji su predstavljeni na eksperimentalnoj postavci. Osoba koja sakuplja podatke se nalazi iza postavke i gleda dete kroz mali otvor, pri čemu pažljivo prati pokrete oka i beleži usmerenost pogleda ka nekom od stimulusa. Primer parova slika/izraza lica je prikazan na desnoj strani slike. Preuzeto iz (Burbacher i Grant, 2012).

Iako su sve ove faze uvek zastupljene, test je pretrpeo niz modifikacija kako bi se prilagodio različitim zahtevima istraživanja. Danas je jedan od najzastupljenijih testova na animalnim modelima i koristi se za proučavanje bihevioralnih promena zavisnih od biohemijskih i strukturno specifičnih mehanizama koji se nalaze u osnovi procesa učenja i pamćenja, kao i posledica koje na ove procese imaju izlaganje raznim supstancama, modifikacija genske ekspresije i veštački izazvana oštećenja na mozgu. Iako široko primenjivan u eksperimentalnim istraživanjima ovaj test još uvek nije standardizovan (Cohen i Stackman, 2015).

1.7.2. Molekulska osnova memorijskog procesa

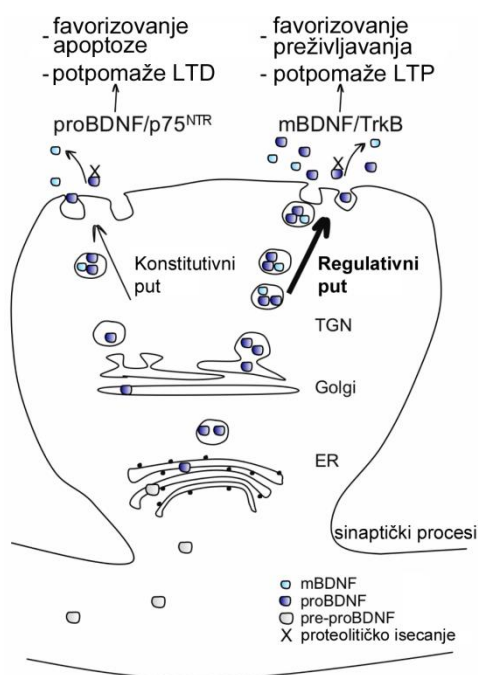
Uprkos višedecenijskom intenzivnom istraživanju, uz korišćenje naprednih tehničkih pristupa, molekulska osnova memorijskog procesa nije do kraja razjašnjena (Jabes i Nelson, 2015). Interferencija različitih sredinskih uticaja sa procesom pamćenja, kako u fazi konsolidacije tako i fazi prisećanja (tj. korišćenja već postojeće memorije) dodatno ukazuje na složenu molekulsku i neuralnu osnovu ovog fenomena. Zahvaljujući genetički modifikovanim animalnim modelima došlo se do podataka da je adekvatna ekspresija određenih proteina, uključujući neurotrofički faktor sintetisan u mozgu (engl. *Brain derived neurotrophic factor*; BDNF) i njegov receptor TrkB (engl. *Tropomyosin related kinase B*) (revijski prikaz u (Minichiello, 2009)), transkripcione faktore Egr-1 (engl. *Early growth response protein 1*) (Jones i sar., 2001, Bozon i sar., 2003, Veyrac i sar., 2014), i FosB/ Δ FosB (Eagle i sar., 2015), kao i kinaze CaMKII α (Cao i sar., 2008, Vigil i sar., 2017, Jarome i sar., 2016), i ERK1/2 (engl. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) sa akcentom na ERK2 (Szapiro i sar., 2002, Giovannini, 2006, Satoh i sar., 2007) u dorzalnom hipokampusu od izuzetne važnosti za uspostavljanje i stabilnost memorije.

1.7.2.1. BDNF i TrkB

Tekuća saznanja u oblasti neurobiologije učenja i pamćenja ukazuju da se tokom učenja stimulišu procesi u hipokampusu regulisani aktivnošću neurona, među kojima je i ekspresija BDNF-a kao i signalna kinetika BDNF/TrkB (Minichiello, 2009, Cunha i sar., 2010). Proces obrade, pakovanja i oslobađanja BDNF-a je prikazan na slici 1.15. Oslobođeni/sinaptički BDNF se vezuje za dva različita transmembranska proteina i

aktivira ih: TrkB receptor sa visokim afinitetom i p75 neurotrofički receptor (p75^{NTR}) sa niskim afinitetom (p75^{NTR} vezuje pro-forme neurotrofičkih faktora).

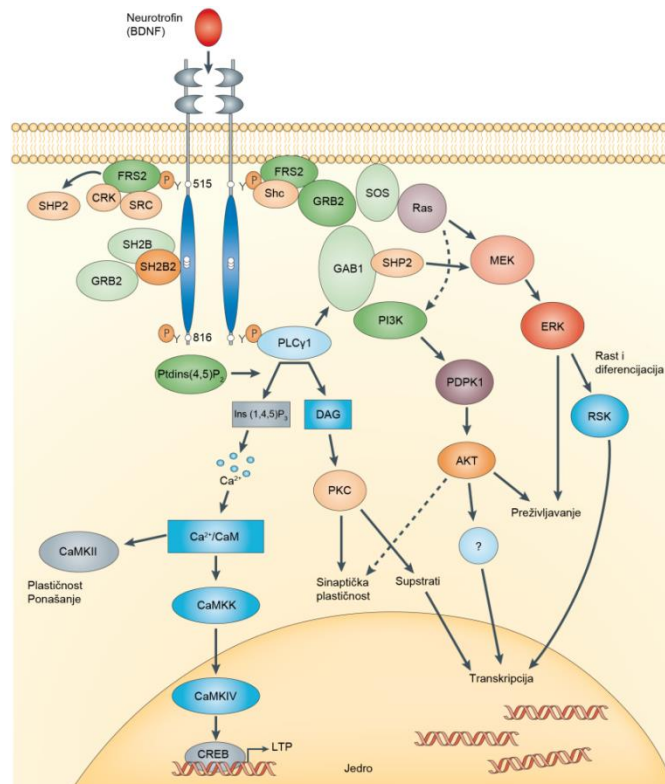
Značaj BDNF-a u procesima učenja i pamćenja se prvenstveno ogleda u tome što u hipokampusu ima ključnu ulogu u procesu LTP-a, pri čemu LTP predstavlja povećanje sinaptičke snage koja je u osnovi formiranja dugotrajne memorije (Bekinschtein i sar., 2008). LTP obuhvata dve faze (ranu i kasnu). Rana faza LTP-a zavisi od svojstava pre- i postsinaptičkih neurona, uključuje aktivnost CaMKII kao i redistribuciju i fosforilaciju sinaptičkih receptora. Kasna faza LTP-a uključuje *de novo* sinteze proteina (revijski prikaz dat u (Luscher i Malenka, 2012)). Dostupni podaci ukazuju da je BDNF od značaja i za ranu i za kasnu fazu LTP-a (Minichiello i sar., 2002, Luscher i Malenka, 2012).



Slika 1.15. Obrada, pakovanje i oslobađanje BDNF-a. BDNF se sintetise kao pre-proBDNF protein, pri čemu se pre-sekvencu eliminiše u endoplazmatičnom retikulumu (ER). Tako nastaje proBDNF koji se prolaskom kroz Goldži (engl. *Golgi*) aparat i trans-Goldži mrežu (TNG) pakuje u dva tipa sekretornih vezikula, shodno načinu lučenja: konstitutivno i regulisano. ProBDNF se dalje može obraditi (unutar vezikule ili vanćelijski) do BDNF-a. Regulisana sekrecija favorizuje lučenje BDNF-a i signalizaciju posredovanu TrkB receptorima (preuzeto iz (Cunha i sar., 2010)).

Aktivacija TrkB receptora prouzrokovana BDNF-om dovodi do dimerizacije i autofosforilacije ovog receptora na specifičnim tirozinskim ostacima citoplazmatičnih

kinaznih domena i za posledicu ima pokretanje tri značajne signalne kaskade (slika 1.16., (Minichiello, 2009)). Fosforilacija TrkB receptora na tirozinu 816 (pTrkB^{Y816}), koja vezivanjem fosfolipaze C γ (engl. *Phosphoinositide phospholipase C* γ ; PLC γ) za ovo mesto izaziva oslođanje Ca²⁺ iz unutarćelijskih odeljaka, je značajna za regulaciju ekspresije Egr-1 i regulaciju aktivacije CaMKII α , koji učestvuju u procesu formiranja dugotrajne memorije (Minichiello i sar., 2002).

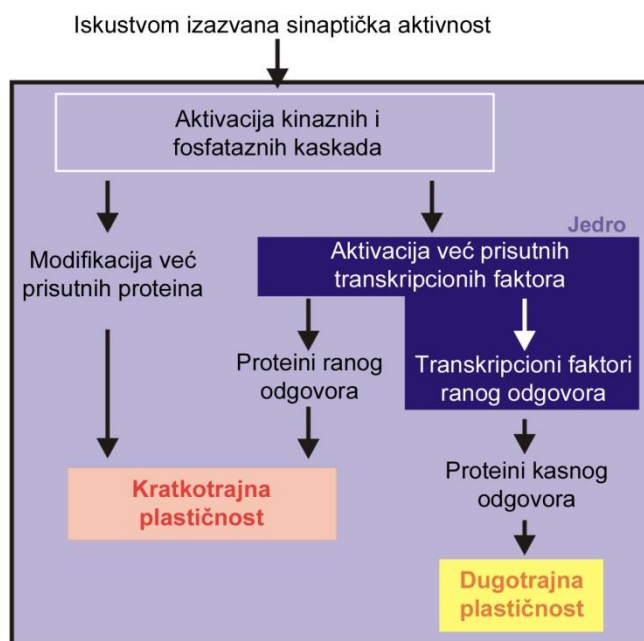


Slika 1.16. Tri glavna unutarćelijska signalna puta indukovana fosforilacijama TrkB receptora. BDNF izaziva fosforilaciju TrkB receptora na tirozinskim ostacima Y515 i Y816. Fosforilacija na poziciji Y515 aktivira MAPK (engl. *Mitogen activated protein kinase*) signalni put i PI3K (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*) (PI3K/Akt) signalni put. Fosforilacija na poziciji Y816 aktivira PLC γ -Ca²⁺ signalni put. Sve tri kaskade regulišu proces transkripcije, a neke su uključene u proces dugotrajne potencijacije (LTP). Dalje objašnjenje dato je u tekstu. Preuzeto i modifikovano iz (Minichiello, 2009).

1.7.2.2. Egr-1 i FosB

Značajnu ulogu u formiranju memorije imaju proteinski produkti gena neposrednog i ranog odgovora među kojima su Egr-1 i FosB/ Δ FosB (Eagle i sar., 2015). Proteinski produkti ovih gena su transkripcioni faktori odgovorni za ekspresiju gena kasnog odgovora, čiji su proteinski produkti, između ostalog, i sinaptički proteini. Na

ovaj način prolazne promene u neuronskoj aktivnosti izazivaju promene u sinaptičkoj strukturi i funkciji (Slika 1.17.).



Slika 1.17. Pretpostavljeni model iskustvom-izazvanih promena u genskoj ekspresiji i sinaptičkoj plastičnosti. Preuzeto i modifikovano iz (Fontán-Lozano i sar., 2011).

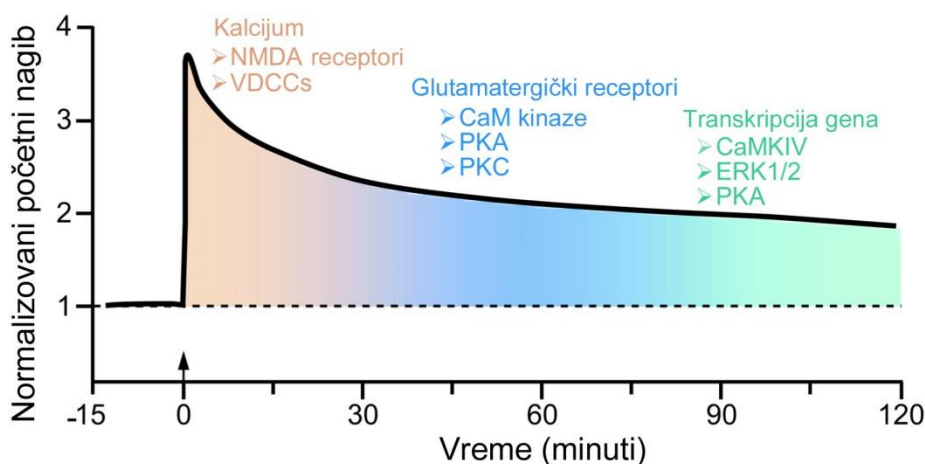
Egr-1 protein je značajan za različite forme učenja i pamćenja i održanje kasne faze LTP-a (Jones i sar., 2001). Miševi kod kojih je suprimirana njegova ekspresija imaju očuvanu kratkotrajnu memoriju ali narušenu dugotrajnu hipokampus-zavisnu i hipokampus-nezavisnu memoriju (u testovima preferencije hrane, prostorne memorije, prepoznavanja novog objekta, prepoznavanja objekta-mesta i memoriji straha u zavisnosti od konteksta (revijski prikaz u (Veyrac i sar., 2014))). Takođe je značajan za regulaciju transkripcionih mehanizama koji posreduju u rekonsolidaciji memorije prepoznavanja (Bozon i sar., 2003). Iako različite signalne kaskade mogu da utiču na ekspresiju Egr-1 postoje čvrsti eksperimentalni dokazi da je ona pod direktnom ili indirektnom kontrolom pTrkB^{Y816} (Minichiello i sar., 2002).

Ekspresija FosB/ Δ FosB proteina je intenzivno proučavana nakon izlaganja adiktivnim supstancama, ali novija literatura ukazuje da izmenjena ekspresija FosB/ Δ FosB, kako smanjena tako i povećana, ometa hipokampus-zavisno učenje kod glodara (Eagle i sar., 2015). Ranija istraživanja su ukazala na značaj FosB proteina za neurogenezu i prostorno učenje (Yutsudo i sar., 2013) ali je studija Eagle i saradnika (Eagle i sar., 2015) po prvi put ukazala na značaj balansirane ekspresije Δ FosB

(aktivnošću-regulisanog proteina u fiziološkim uslovima) za normalno učenje i pamćenje. Dobijeni rezultati su u skladu sa principima homeostatičke sinaptičke plastičnosti, tj. sa mehanizmom negativne povratne sprege koji neuroni koriste da pojačanu ekscitabilnost kompenzuju smanjenjem sinaptičke snage (Pozo i Goda, 2010).

1.7.2.3. Uloga kinaza CaMKII α i ERK 1/2 u procesima učenja i pamćenja

Učenje i memorisanje su regulisani neuronskom plastičnošću, koja uključuje jačanje postojećih sinapsi (npr. pomoću dugotrajne potencijacije), sinaptogenezu, unutraćelijsku ekscitabilnost i neurogenezu (Giese i Mizuno, 2013). U svim ovim procesima važnu ulogu imaju protein kinaze koje fosforilišu ciljne proteine uključene u ove procese i regulišući (reverzibilno) njihovu aktivnost. Studije ukazuju da kinaze, među kojima su CaMKII i ERK1/2, utiču na sinaptičke procese regulacijom aktivnosti proteina koji učestvuju u kontroli sinaptičke transmisije, menjajući aktivnost jonskih kanala i utičući na sintezu proteina (slika 1.18.) (Giese i Mizuno, 2013).



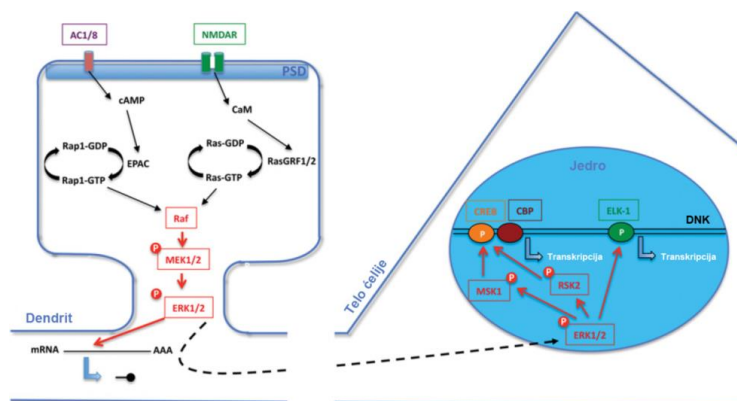
Slika 1.18. Biohemijski mehanizmi neophodni za LTP u hipokampusu i formiranje memorije. Tokom indukcije LTP-a najpre dolazi do ulaska Ca²⁺ u nervnu ćeliju što aktivira nekoliko protein kinaza: CaM kinaze, PKA i PKC. Ove kinaze dalje fosforilišu ciljne proteine koji zatim omogućuju potencijaciju sinaptičke transmisije. Tokom kasne faze (održavanja) LTP-a i formiranja dugotrajne memorije, kinaze kao što su CaMKIV, ERK1/2 i PKA regulišu aktivnost transkripcionih faktora koji učestvuju u transkripciji gena čiji su proteinski produkti neophodni za strukturne promene u okviru sinapsi kako bi podržale ovu potencijaciju. Preuzeto i modifikovano iz (Atkins, 2011).

Jedan od ključnih signalnih molekula koji omogućuje adekvatno odvijanje procesa učenja i pamćenja je CaMKII. Posebno je značajna autofosforilacija na treoninu 286 u aminokiselinskoj sekvenci CaMKII α proteina jer ima fundamentalnu ulogu u

formiranju dugotrajne memorije ali i slabljenju memorije tokom prisećanja (Vigil i sar., 2017). Detaljniji prikaz aktivacije CaMKII α opisan je u okviru poglavlja 1.5.2.2.

Porodici MAP kinaza (engl. *Mitogen-activated protein kinase*; MAPK) za koje se zna da učestvuju u procesima učenja i pamćenja pripada ERK1/2 (Giese i Mizuno, 2013). Signalni put koji uključuje ERK 1/2 je važan za aktivaciju transkripcionih procesa koji se nalaze u osnovi formiranja dugotrajne memorije (ali ne i kratkotrajne), regulacijom aktivnosti CREB-a kao prototipskog inducibilnog transkripcionog faktora (Lonze i Ginty, 2002) koji se aktivira u odgovoru na različite fiziološke stimuluse (Slika 1.19.). Pored toga što učestvuje u regulaciji genske ekspresije, ERK1/2 takođe reguliše lokalnu sintezu proteina u dendritima, procesuiranje informacija u dendritima i stabilizaciju dendritskih trnova, ostvarujući značajnu ulogu u regulaciji sinaptičke plastičnosti i memorijskog procesa (Sweatt, 2004).

ERK 1/2 ima i važnu ulogu u procesu korišćenja već postojeće memorije jer eksperimentalno dobijeni podaci ukazuju da je aktivacija ERK1/2 u hipokampusu direktno proporcionalna kvalitetu prisećanja u hipokampus-zavisnim testovima učenja (Szapiro i sar., 2002). Takođe treba napomenuti da je ERK2 selektivnije uključen u procese učenja od ERK1 (Giovannini, 2006).



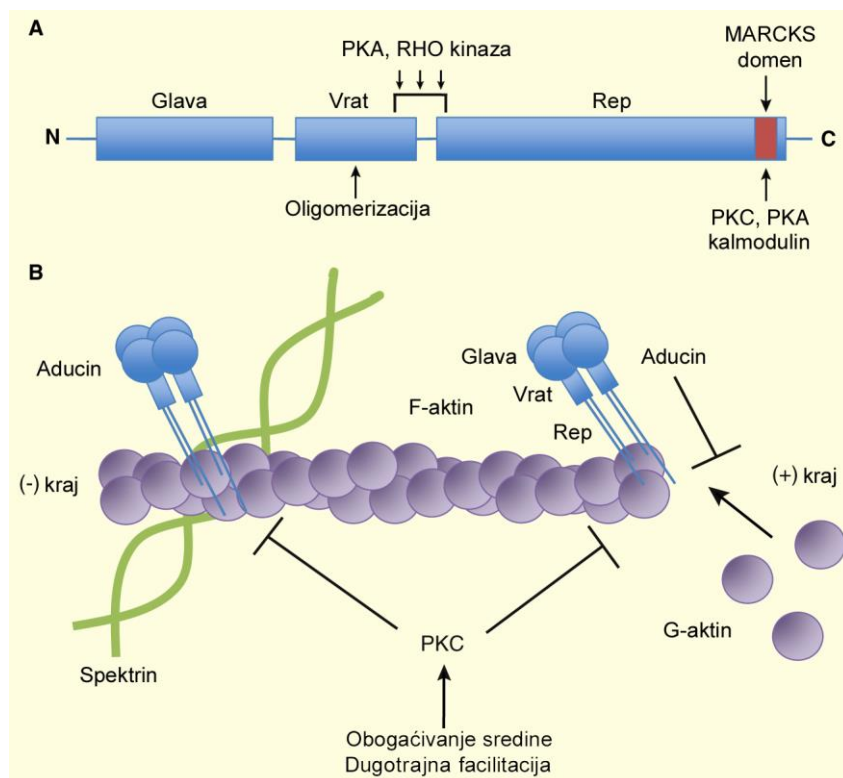
Slika 1.19. Shematski prikaz uloge ERK 1/2 signalne kaskade u konsolidaciji memorije. Crvene strelice ukazuju na proces fosforilacije, a isprekidane strelice na translokaciju proteina. Preuzeto i modifikovano iz (Giese i Mizuno, 2013).

1.8. Sinaptička stabilnost i reorganizacija

Neuralne mreže tokom razvića mozga su podložne značajnim modifikacijama koje se ogledaju u izraženom formiranju novih sinaptičkih kontakata, ali i eliminaciji nepotrebnih sinapsi. Remodelovanje aktinskog citoskeleta ima značajnu ulogu u ovim procesima, jer aktin u presinapsi kontroliše aktivnost sinaptičkih vezikula, u postsinapsi

učestvuje u umetanju i uklanjanju receptora i ostalih membranskih konstituenata iz membrana, a takođe reguliše retrakciju kao i formiranje dendritskih trnova (Stevens i Littleton, 2011). Zbog toga je regulacija polimerizacije aktina, kao i interakcija između aktina i drugih strukturnih proteina od ključne važnosti za sinaptičku plastičnost.

Aducini su proteini koji kontrolišu polimerizaciju aktina tako što obuhvataju krajeve aktinskih filamenata i potpomažu interakciju aktina sa citoskeletnim proteinom spektrinom (slika 1.20.) (Kuhlman i sar., 1996, Bennett i sar., 1988, Matsuoka i sar., 2000). Predstavljaju porodicu tri jako srodna proteina, označeni sa α , β i γ , kodirani sa različitim gena. Dok su α - i γ - aducini opšte zastupljeni proteini, Aducin β je uglavnom eksprimiran u mozgu i crvenim krvnim zrnima. Aducini poseduju region na C-kraju aminokiselinske sekvence sličan domenu MARCKS (engl. *Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) proteina. Ovaj region je ključan za regulatorne procese jer poseduje vezivna mesta za PKC (engl. *Protein kinase C*), PKA i Ca^{2+}/CaM (Matsuoka i sar., 2000), proteine koji imaju ključne uloge u sinaptičkoj plastičnosti (slika 1.20A). Fosforilacijom MARCKS regiona (na poziciji serin 713 u aminokiselinskoj sekvenci Aducin β proteina) od strane PKC uz interakciju ovog regiona sa Ca^{2+}/CaM , narušava se veza između aducina, aktina i spektrina i favorizuje depolimerizacija aktinskih filamenata (slika 1.20B) (Matsuoka i sar., 1996, Matsuoka i sar., 1998). Na taj način aducini regulišu stabilnost citoskeleta, što se može uočiti na „*knock out*“ miševima, kod kojih je isključena aktivnost gena za Aducin β (Bednarek i Caroni, 2011). Kod ovakvih miševa je poremećena dinamika formiranja i gubitka nastavaka na dendritskim trnovima, što ukazuje na gubitak sinaptičke stabilnosti. Miševi kojima nedostaje Aducin β imaju probleme sa održavanjem LTP-a, poteškoće sa učenjem zavisnim od aktivnosti hipokampusa (Rabenstein i sar., 2005, Porro i sar., 2010), poteškoće u učenju novih motoričkih veština (Xu i sar., 2009) kao i suptilne izmene u trnovima NAc-a (Jung i sar., 2013). Aducin je važan za uspostavljanje dugotrajnih morfoloških promena povezanih sa sinaptičkom plastičnošću a regulacija aducinske aktivnosti (fosforilacije) odražava promene u stabilnosti i morfologiji sinapsi, smanjujući rigidnost citoskeleta i omogućavajući nastanak, demontiranje ili reorganizaciju sinapsi. Osim PKC aducinsku aktivnost menjaju i PKA, Rho kinaze, Fyn kinaze i Ca^{2+}/k almodulin (Stevens i Littleton, 2011).



Slika 1.20. Organizacija i regulacija funkcije aducina. (A) Shematski prikaz monomera aducina, koji sadrži globularni glaveni region, vratni region neophodan za oligomerizaciju i repni region koji poseduje MARCKS domen. Glavna mesta fosforilacije su obeležena strelicama. (B) Aducin obuhvata brzorastuće krajeve filamentoznog F-aktina i sprečava vezivanje monomernog G-aktina. Obogaćivanje sredine i dugotrajna facilitacija potpomažu fosforilaciju aducina od strane PKC, ometajući njegovu ulogu stabilizatora citoskeleta i izazivajući disocijaciju aktin-spektrin kompleksa, što omogućava destabilizaciju filameta. Preuzeto i modifikovano iz (Stevens i Littleton, 2011).

2. CILJ

Imajući u vidu adiktivni potencijal propofolske anestezije i njen uticaj na eksplicitnu memoriju, što je uočeno u adultnoj populaciji, kao i da se kasni juvenilni/peripubertetski period karakteriše izuzetnom osetljivošću na adiktivne supstance i intenzivnom maturacijom mnemoničkog potencijala, posledice primene propofolske anestezije u periodu peripuberteta mogu imati određene specifičnosti, što do sada nije istraživano. Imajući u vidu ovaj nedostatak informacija, a budući da je propofol jedan od najčešće korištenih anestetika, osnovni cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj jednokratnog izlaganja propofolskoj anesteziji, što je tipičan način kliničke primene anestetika, na dopaminergičku signalizaciju, sinaptičku i neuronsku aktivnost u različitim regionima mozga i ponašanje juvenilnih/peripubertetskih pacova, kao model sistema humanog periadolescentnog razvoja, u periodu nakon buđenja iz anestezije.

U skladu sa postavljenim ciljem ove teze definisani su neposredni zadaci istraživanja sa akcentom na:

1. Molekulske promene i promene u ponašanju koje su već opisane nakon primene adiktivnih supstanci, što je ispitivano na osnovu:
 - promena u ekspresiji D1DR, DARPP-32/pDARPP-32^{Thr34}, CaMKII α /pCaMKII α ^{Thr286} kao i FosB/ Δ FosB proteina u strijatumu, medijalnom prefrontalnom regionu kore velikog mozga i talamusu,
 - promena u spontanoj motoričkoj aktivnosti, d-AMPH-indukovanoj motoričkoj aktivnost, PCP-indukovanoj motoričkoj aktivnost, anksioznom ponašanju u testovima svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta;
2. Smetnje u učenju i pozivanju eksplicitne epizodičke memorije, što je procenjivano na osnovu:
 - promena u ekspresiji BDNF, TrkB/pTrkB^{Y816}, Egr-1, CaMKII α /pCaMKII α ^{Thr286}, ERK1/2/pERK1/2, kao i FosB/ Δ FosB proteina u dorzalnom hipokampusu, značajnih za formiranje, stabilnost i upotrebljivost memorije,
 - promena u kognitivnim karakteristikama u testovima prostorne habituacije i prepoznavanja novog objekta u poznatoj sredini, kao bihevioralnim paradigmatama za testiranje hipokampus zavisne neaverzivne memorije prepoznavanja (nije povezana sa izazivanjem specifičnog emotivnog statusa).

3. Sinaptičku stabilnost i reorganizaciju, što je procenjivano na osnovu:
 - promena u ekspresiji Aducin β /pAducin β proteina u strijatumu, medijalnom prefrontalnom regionu kore velikog mozga, talamusu i hipokampusu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Etička izjava

Sve eksperimentalne procedure su sprovedene u saglasnosti sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i naučne svrhe i odobrene od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu (pod brojem 03-05/14). Korišćen je minimalan broj jedinki neophodan za realizaciju eksperimenata, uz maksimalnu brigu o životinjama.

3.2. Eksperimentalne životinje i tretman

U eksperimentu su korišćeni juvenilni mužjaci pacova soja *Wistar* iz vivarijuma Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” stari 35 ± 1 dan ($P35 \pm 1$). Ovaj vremenski period predstavlja završetak rane/početak srednje adolescentne faze kod mužjaka *Wistar* pacova i pripada periadolescenciji, tj. ontogenetskom periodu razvića koji kod pacova obuhvata 7 – 10 dana pre i nekoliko dana nakon puberteta (Burke i Miczek, 2014). Pubertet kod mužjaka *Wistar* pacova tipično nastupa 40. – 42. dana a kod ženki 34. – 36. dana postnatalnog razvoja (Fernandez-Fernandez i sar., 2005).

Životinje su gajene u matičnim okotima do 21. postnatalnog dana, kada su odvojene od majke, razdvojene po polovima i stavljene u zasebne kaveze ($n = 4$ po kavezu). Sve životinje su boravile u standardnim uslovima (temperatura: 23 ± 2 °C; relativna vlažnost vazduha: 60 – 70%; svetlosni režim 12 sati svetlost / 12 sati mrak, uz paljenje svetla u 7,00 i gašenje u 19,00 h). Hrana i voda su životinjama bile dostupne *ad libitum*.

Eksperimentalne grupe su formirane od 35 ± 1 dan starih mužjaka iz različitih okota (zadržan broj od $n = 4$ životinje po kavezu). Prosečna težina eksperimentalnih grupa jedinki je iznosila 100 ± 5 grama.

Životinje su tretirane (intraperitonealno injecirane; i.p.) propofolom koji je proizveden za ljudsku upotrebu (1%; Recofol®, BAYER SCHERING PHARMA AG - Finska). Ampule su korišćene prema instrukcijama proizvođača. S obzirom da je propofol rastvoren u lipidnoj emulziji koja je takođe komercijalno dostupna (Fresenius Kabi AB, Švedska; u klinici se koristi kao intravenska, tj. parenteralna, dohrana za

pacijente kod kojih je regularna ishrana onemogućena), u jednom segmentu istraživanja dodatna kohorta životinja je tretirana samo intralipidom, čineći kontrolu za efekte izazvane propofolskom emulzijom. Treba naglasiti da je propofolska anestezija na tržištu dostupna samo u formi ove emulzije (tj. propofol u intralipidu), a pošto je zadatak studije bio ispitivanje posledica primene propofolske anestezije (pri čemu je prisustvo intralipida neminovno) nismo postavljali za cilj istraživanja posledice primene samog intralipida. Zbog toga prisustvo intralipidne grupe nije konzistentno u svim segmentima istraživanja. Rezultati dobijeni pri realizaciji prve tematske celine (Pavkovic i sar., 2017) nisu ukazali na značajan uticaj tretmana intralipidom na bilo koji od ispitivanih molekulskih i bihejvioralnih parametara, zbog čega intralipidna grupa nije ispitivana u okviru eksperimenata predviđenih za realizaciju druge tematske celine (Pavkovic i sar., 2018). Time je u izvesnoj meri smanjen broj životinja potrebnih za realizaciju istraživanja.

D-AMPH i PCP (Sigma-ALDRICH Chemie, Germany) su rastvoreni u fiziološkom rastvoru u koncentracijama od 1,5 mg/ml i 5 mg/ml, redom, i injecirani (i.p.) u dozi od 1,5 mg/kg i 5 mg/kg, redom. Ove droge su primenjene kako bi se ispitala ekspresija ukrštene bihejvioralne senzitivacije. Doze su izabrane na osnovu podataka iz literature da: 1) u malim ka srednjim dozama d-AMPH deluje primarno na dopaminski sistem dok doze veće od 1,75 mg/kg utiču i na acetilholinski i serotonininski sistem (Kuczenski i Segal, 1989, Florin i sar., 1992), 2) primena PCP-a u dozi od 5 mg/kg izaziva hiperdopaminski status i lokomotornu aktivnost koja u velikoj meri (za razliku od d-AMPH-indukovanog motoričkog odgovora) zavisi od PFK-a (Jentsch i sar., 1998, Pickering i sar., 2010).

3.3. Izbor doze propofola

Kako bi se odredila adekvatna anestetska doza propofola za navedenu starost pacova urađen je nezavisan eksperiment jer u literaturi nije bilo dostupnih podataka o doznim efektima propofola kod mladih pacova (rezultati ovog eksperimenta su publikovani kao dopunski materijal za (Pavkovic i sar., 2018). Formirane su 4 grupe životinja starih 35 ± 1 dan (5 životinja po grupi) i injecirane (i.p.) propofolom u dozi od 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg i 100 mg/kg (poslednje dve doze imaju anestetski efekat kod adultnih pacova). Kao indikator anestetskog delovanja propofola služilo je odsustvo

refleksa okretanja sa leđa na stomak (engl. *Loss of righting reflex*). Štopericom je praćeno vreme do gubitka, kao i do ponovnog uspostavljanja ovog refleksa. Primenjivan je test štipanja repa i šapice kako bi se utvrdio gubitak bolnih nadražaja. Takođe su praćene promene u boji kože (modro plava boja ukazuje na nedostatak kiseonika - hipoksiju) i ritmu disanja (izraženi abdominalni pokreti koje vode ka apnei) (Alves i sar., 2010).

Životinje tretirane propofolom u dozi od 25 mg/kg su zadržale refleks okretanja sa leđa na stomak. Ostale doze su izazivale gubitak ovog refleksa. Vreme do gubitka refleksa kod grupa koje su primile dozu propofola od 50 mg/kg, 75 mg/kg i 100 mg/kg je iznosilo redom: 6 ± 1 minut, 5 ± 1 minut, 3 ± 1 minut, dok je vreme potrebno za uspostavljanje refleksa okretanja sa leđa na stomak kod ispitivanih grupa iznosilo redom: 28 ± 3 minuta, 45 ± 5 minuta, 90 ± 7 minuta. Odsustvo reakcije na bolni nadražaj (štipkanje šape i repa) je primećeno kod grupa koje su primile dozu od 75 mg/kg i 100 mg/kg, i to u trajanju od 2 ± 1 minut i 4 ± 1 minut, redom. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju da propofol može indukovati anesteziju, ali ne može da izazove analgeziju u meri neophodnoj za kliničke potrebe (Goto i sar., 1994, Gilron i Coderre, 1996, Merrill i sar., 2006, Fassoulaki, 2011), tako da bi kao samostalni agens trebao da se koristi samo u bezbolnim procedurama (Chang i sar., 2003, Guthrie, 2006). Promene u boji kože i ritmu disanja su zabeležene u grupi životinja koje su tretirane propofolom u dozi od 100 mg/kg.

Na osnovu svega navedenog za dalji rad je izabrana doza propofola od 75 mg/kg.

3.4. Eksperimentalna procedura

Životinje stare 35 ± 1 dan su injecirane (i.p.) dozom propofola od 75 mg/kg (7,5 ml/kg komercijalno dostupne emulzije propofola) i analizirane u različitim vremenskim tačkama nakon tretmana (4, 24 i 48 sati). Fiziološku kontrolu za sve molekulske analize predstavljale su netretirane životinje, kao i za bihejvioralne analize u okviru prve tematske celine rada (Pavkovic i sar., 2017), dok su za potrebe ispitivanja ponašanja životinje u okviru druge tematske celine rada (Pavkovic i sar., 2018) injecirane fiziološkim rastvorom (7,5 ml/kg, 0,9% NaCl). Grupa životinja tretirana intralipidom je

korišćena za Western blot analizu i ispitivanje ponašanja u okviru prve tematske celine rada (Pavkovic i sar., 2017).

Rukovanje životinjama je uvek obavljao eksperimentator na koga su životinje prethodno naviknute, a injeciranje je obavljao drugi eksperimentator. Injeciranje je sprovedeno u donji desni region abdomena kako bi se izbegla neželjena oštećenja urinarnog trakta ili crevnog sistema. Dve različite kohorte životinja bile su korišćene za bihevioralna i biohemijska istraživanja, čemu se pristupilo sa ciljem da se izbegne eventualni uticaj samog bihevioralnog testiranja na biohemijske parametre od interesa. Ukupan broj životinja koje su korišćene u istraživanju je 168 (uključujući i za selekciju doze).

Za Western blot analizu su korišćene 32 životinje. Analiza je vršena na četiri moždana regiona (mPFK, strijatum, talamus i hipokampus) koja su izolovana iz kontrolne grupe ($n = 5$ životinja po grupi), grupa izloženih propofolskoj anesteziji (žrtvovane 4, 24 i 48 sati nakon tretmana; $n = 5$ životinja) i grupe izložene intralipidu (žrtvovanih 4, 24 i 48 sati nakon injeciranja; $n = 4$ životinje po grupi).

Imunohistohemijske analize su vršene na mozgovima izolovanim iz kontrolnih životinja ($n = 3$) i jedinki koje su žrtvovane 24 sata nakon tretmana propofolom ($n = 3$).

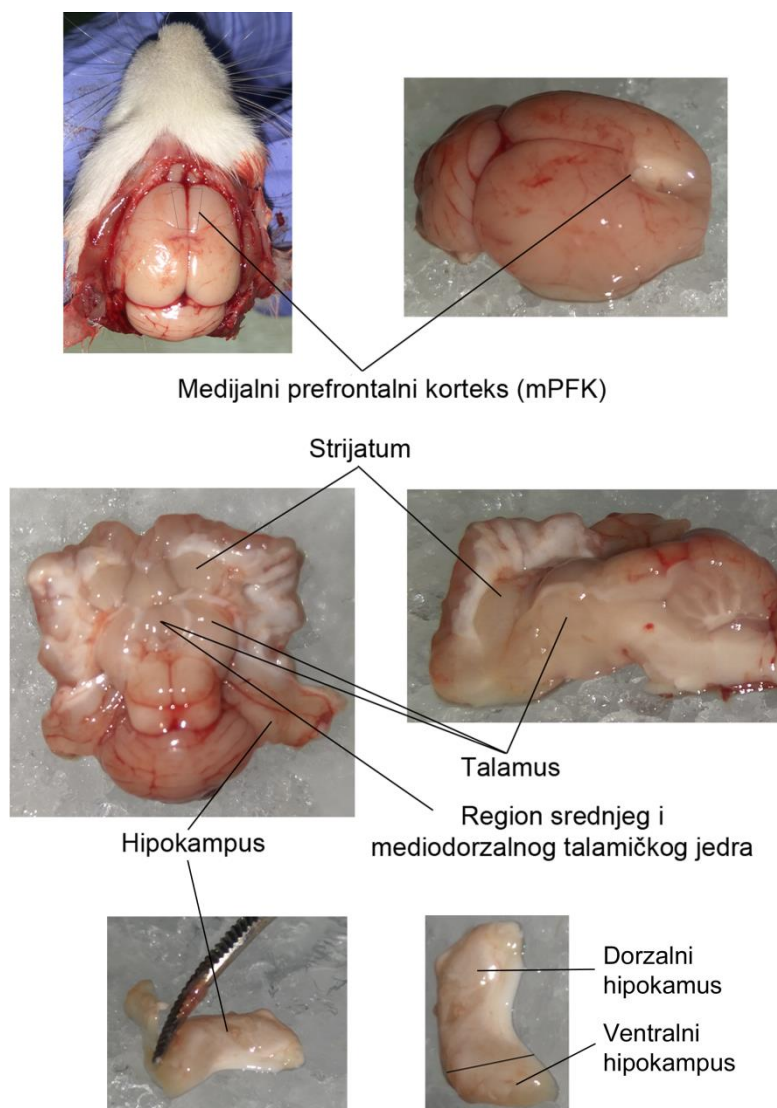
Testovima ponašanja bilo je podvrgnuto 110 jedinki, pri čemu je svaka životinja prošla samo jedan test. Svi testovi ponašanja su rađeni u vremenskom periodu između 9 i 15 časova. Pre svakog testa, životinjama je dozvoljeno da se u trajanju od 30 minuta, u njihovim kavezima, prilagode uslovima eksperimentalne sobe. Bihevioralni odgovor na d-AMPH ($n = 6$ životinja po grupi) je praćen u kontrolnoj grupi, grupama izloženih propofolskoj anesteziji (4, 24 i 48 sati nakon tretmana) i grupi izloženoj intralipidu (24 sata nakon injeciranja). Bihevioralni odgovor na PCP ($n = 5$ životinja po grupi) je praćen u kontrolnoj grupi i grupama izloženim propofolskoj anesteziji (24 i 48 sati nakon tretmana; vremenske tačke u kojima je praćeno ponašanje su izabrane na osnovu podataka dobijenih u testu odgovora na d-AMPH). Testovima anksioznosti – testu svetlo/tamne kutije (kontrolna grupa, 24 h nakon propofola, 24 h nakon intralipida; $n = 7$ životinja po grupi) i testu uzdignutog krstastog lavirinta (kontrolna grupa, 24 h nakon propofola; $n = 6$ životinja po grupi) je podvrgnuto ukupno 33 jedinke. Ukupno 32 životinje su korišćene u memorijskim testovima (test prostorne habituacije i test prepoznavanja novog objekta, $n = 16$ po testu). Za svaki test životinje su podeljene u

dve grupe (kontrolna/injecirana fiziološkim rastvorom i tretirana propofolom) i testirane 24 časa nakon tretmana propofolom ($n = 8$ životinja po grupi). U testu prepoznavanja novog objekta 3 od 16 životinja je isključeno iz eksperimenta na osnovu ponašanja u fazi familijarizacije i finalni broj životinja je bio $n = 6$ u kontrolnoj i $n = 7$ u grupi tretiranoj propofolom.

3.5. Izolacija tkiva, proteina i Western blot metoda

3.5.1. Izolacija tkiva

Kontrolne životinje i jedinke tretirane propofolom ili intralipidom, su dekapitovane korišćenjem giljotine bez pretretmana anestetikom, kako bi se izbegla interferencija efekta takve anestezije sa osnovnim rezultatom naše studije. Izolacija tkiva je vršena iz regiona mPFK-a, strijatuma, talamusa i dorzalnog hipokampusa. Nakon dekapitacije i uklanjanja lobanjskih kostiju pozicija bregme je pažljivo označena. Mozak je stavljen na hladnu površinu da bi se smanjila aktivnost proteolitičkih enzima i skalpelom izolovan region mPFK-a (sekundarna motorna zona, anteriorni cingulatni korteks, prelimbičko i infralimbičko područje; 1,5 do 4,7 mm od bregme (Paxinos i Watson, 2005)). Nakon izolacije mPFK-a pristupljeno je izolaciji strijatuma i dorzalnog hipokampusa (slika 3.1), što je omogućilo pristup talamusu. Protokol izolacije struktura je sličan protokolu po Spijkeru (Spijker, 2011). Obzirom da je tkivo izuzetno osetljivo za mehaničke manipulacije, potrebna je određena rutina kako bi izolacija moždanih struktura od interesa bila precizna i tkivo maksimalno očuvano. Uzorci tkiva su do trenutka izolacije proteina čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 3.1. Prikaz procedure izolacije moždanih struktura (medijalni prefrontalni region kore velikog mozga (mPFK), strijatum, dorzalne dve trećine hipokampusa i talamus) pacova.

3.5.2. Izolacija proteina i određivanje koncentracije metodom po Pirsu

Za pripremanje ekstrakta ukupnih proteina, tkiva su homogenizovana i sonifikovana u deset puta većoj zapremini pufera RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 1% NP-40; 0,1% SDS; 0,5% Triton X-100; 1 mM EDTA i 1 mM EGTA), u koji je na 10 ml dodata po jedna tableta komercijalno dostupnog koktela inhibitora proteaza i fosfataza (Roche). Nakon 30 min inkubacije na ledu, lizati su centrifugirani na 14000 g tokom 30 min na +4 °C. Supernatanti su odliveni i čuvani na -80 °C do dalje analize.

Koncentracije ukupnih proteina određene su kolorimetrijskom metodom po Pirsu (*Pierce Micro BCA Protein Assay Kit* (Product No. 23235)). Koncentracija svakog uzorka određena je spektrofotometrijskim merenjem (A562 nm), na osnovu standardne krive dobijene upotrebom poznatih koncentracija proteina goveđeg serum albumina (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) kao standarda.

3.5.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj masi vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories). Gel za razdvajanje je, pored akrilamida/bisakrilamida (Sigma) u odnosu 29/1, čija je finalna koncentracija iznosila 10% ili 12% (za proteine manje od 25 kDa), sadržao i 1,5 M Tris HCl (pH 8,8) i 10% SDS. Gel za koncentrisanje je bio sledećeg sastava: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1); 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; i 10% SDS. Za polimerizaciju gelova (i za razdvajanje i za koncentrisanje) je korišćeno 100 µl 10% amonijum persulfata (ICN) i 4 µl tetrametiletilendiamina - TEMED (Serva) na 10 ml smese.

Količina proteina koja je nanošena na gel eksperimentalno je optimizovana za svaki protein pomoću krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina, a sa koncentracijama primarnog antitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala od količine nanetih proteina. Za ispitivanje proteina CaMKII/pCaMKII^{Thr286}, TrkB/pTrkB nanošeno je po 20 µg ukupnih proteina, a za proteine Aducinβ/pAducin, DARPP-32/pDARPP-32^{Thr34}, ERK1/2/pERK1/2 i FosB nanošeno je po 40 µg izolata ukupnih proteina. Kao pufer za nalivanje korišćen je pufer 2x Laemmli (31,25 mM Tris, pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptetanol; 0,025% bromfenol plavo) dodat uzorku u zapreminskom odnosu 1:1. Uzorci su pre nalivanja dodatno termički denaturisani 4 min na temperaturi od 95 °C. Kao standard za molekularnu masu proteina korišćen je obojeni „Prestained“ marker širokog opsega (Thermo Scientific, Litvanija). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris, pH 8,3; 0,1% SDS) pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi.

3.5.4. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na poliviniliden fluoridnu (PVDF) membranu

Proteina sa poliakrilamidnog gela su preneseni na poliviniliden fluoridnu (engl. *Polyvinylidene fluoride*; PVDF) membranu (Amersham™ Hybond™, Nemačka) korišćenjem sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories). Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče prenesen u posudu sa puferom za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris, pH 8,3) i ekvilibrisan narednih 15 minuta. Isečena u dimenzijama gela, membrana je prvo aktivirana u metanolu 20 sekundi, oprana u dejonizovanoj vodi 20 sekundi, a potom je prebačena u posudu sa puferom za transfer, u kojoj je ekvilibrisana narednih 15 minuta. Pomoćne komponente, poput filter papira, papira „watman“ i sunđera, pripremljene su potapanjem u pufer za transfer, takođe, 30 minuta. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i njenog potapanja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen pod konstantnim naponom od 30 V tokom noći na +4°C. Po završenom transferu, membrane su, bez ikakvog dodatnog ispiranja, 2 sata sušene na sobnoj temperaturi. Potom su membrane aktivirane 20 sekundi u 100% metanolu, isprane u vodi i prebačene u posudu sa bojom Ponso S (*Ponceau S*; 1% boja Ponso S; 5% glacijalna sirćetna kiselina; dejonizovana voda) radi vizuelizacije proteinskih traka. Membrane su bile potopljene u Ponso S 10 minuta, a zatim su odbojene u vodi tako da su obojene proteinske trake bile jasno vidljive, a ostaci boje oko traka svedeni na minimum. Zatim su membrane skenirane i kao takve korišćene za analizu količine nanetih proteina.

Sve je veći broj radova koji koriste tehnike bojenja totalnih proteina kao kontrole nanošenja uzoraka umesto „housekeeping“ proteina (Dittmer i Dittmer, 2006, Romero-Calvo i sar., 2010, Li i Shen, 2013). „Housekeeping“ proteini su u velikoj meri zastupljeni u organizmima i mogu biti prekomerno eksprimirani pri nanošenju većih koncentracija proteina (u našoj studiji 40µg po uzorku), što je neophodno za detekciju ispitivanih malo zastupljenih proteina. Nanošenje većih količina ukupnih proteina često dovodi koncentracije kontrolnih proteina izvan linearnog opsega detekcije (prezasićenost). U tom slučaju ekspresija proteina koji se koriste kao standardne kontrole nanošenja ne moraju da budu proporcionalne količini ukupnih proteina u uzorku, pri čemu se može dobiti lažan uniforman signal pri detekciji u svim

analiziranim trakama. Uniforman signal dobijen na ovaj način ne predstavlja realan odnos količina nanetih uzoraka, već je posledica prekoračenja kapaciteta membrane za apsorbciju proteina pri transferu ili odstupanja od linearnog opsega detekcije. Razblaživanje radnog rastvora antitela ili menjanje vremena inkubacije može dovesti do neadekvatnih rezultata.

Gelovi su nakon izvršenog transfera potopljeni u Coomassie Brilliant Blue boju (0,25% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol; dejonizovana voda) u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti elektrotransfera proteina.

Membrane bojene sa Ponso S su odbojene ispiranjem u dejonizovanoj vodi, osušene na sobnoj temperaturi i skladištene u kesicama od filter papira na +4°C do dalje primene.

3.5.5. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina

Proteini imobilizovani na PVDF membranama su prethodno pripremljeni za imunološku detekciju. Membrane su prvo kvašene u 20% metanolu 20 sekundi i ispirane u dejonizovanoj vodi 20 sekundi, a zatim su blokirane u rastvoru obranog mleka (5%) u Tris-boratnom puferu (engl. *Tris-buffered saline*, TBS) sa dodatkom deterđenta Tween-20 (TBST: 20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,05% Tween 20). Blokiranje membrane je trajalo 1 sat na sobnoj temperaturi, da bi se smanjio intenzitet nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja, membrane su ispirane u TBST puferu 5 minuta, koji je zamenjen rastvorom primarnog antitela u određenom razblaženju. Korišćena su sledeća primarna antitela (pored kataloškog broja i proizvođača, naznačeno je i razblaženje): anti-Aducin β (sc-376063, Santa Cruz, 1:8000), anti-pAducin β (sc-12614-r, Santa Cruz, 1:5000), anti-BDNF (sc-546, Santa Cruz, 1:1000), anti-CaMKII (sc-9035, Santa Cruz, 1:6000), anti-pCaMKII^{Thr286} (sc-12886-R, Santa Cruz, 1:6000), anti-D1DR (sc-31478, Santa Cruz, 1:1000000), anti-DARPP-32 (sc-271111, Santa Cruz, 1:8000), anti-pDARPP-32^{Thr34} (sc-135687, Santa Cruz, 1:6000), anti-Egr1 (sc-515830, Santa Cruz, 1:2000), anti-ERK1/2 (sc-94, Santa Cruz, 1:20000), anti-pERK1/2 (sc-7383, Santa Cruz, 1:1000), anti-FosB (sc-7203, Santa Cruz, 1:1000), anti-TrkB (sc-12, Santa Cruz, 1:10000), anti-pTrkB (ab-75173-100, Abcam, 1:15000). Odnos između fosforilisane i ukupne forme proteina je procenjen na

osnovu signala dobijenih sa dve membrane poreklom od dva paralelna gela, odrađena pod istim uslovima. Primarno antitelo za fosforilisanu formu je inkubirano na jednoj, a za ukupnu formu na drugoj membrani. Da bi se uklonila antitela koja se nisu specifično vezala, nakon inkubiranja sa primarnim antitelom membrane su ispirane tri puta po 10 minuta u TBST puferu. Potom su membrane inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena: anti-zečje antitelo (sc-2370, Santa Cruz, 1:5000), anti-mišje antitelo (P0260, Dako Denmark A/S, 1:3000) i anti-kozje (sc-2350, Santa Cruz, 1:5000). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST puferu, a zatim su izložene dejstvu luminola (komercijalni komplet za hemiluminiscenciju RNP 2106 Western blotting detection reagents, Amersham). Membrana je inkubirana u supstratu 2 minuta, očeđena i izložena autoradiografskom filmu (Kodak) osetljivom na plavu svetlost u trajanju od 10 sekundi do 10 minuta. Filmovi su razvijeni odmah nakon završetka ekspozicije membrane i skenirani za dalju analizu.

3.5.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet signala dobijenih na autoradiografskom filmu je kvantifikovan denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (Image Quant 5.0). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na vrednosti koje su dobijene za odgovarajući Ponso S (35-110 kDa), koje su bile merilo ukupne nanete količine proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.6. Histološke analize

3.6.1. Priprema tkiva

Za potrebe imunohistohemijskih analiza po 3 kontrolne životinje i 3 životinje izložene propofolskoj anesteziji su dekapitovane 24 sata nakon tretmana (korišćenjem giljotine, bez pretretmana anestetikom, kako bi se izbegla interferencija efekta takve anestezije sa osnovnim rezultatom naše studije). Celi mozgovi su izolovani, fiksirani u 4%-tnom rastvoru paraformaldehida sa 0,1M PBS puferu (engl. *Phosphate Buffered Saline*; PBS) pH 7,4, 24 sata na 4 °C. Tkivo je potom dehidratirano kroz seriju rastvora sa rastućim koncentracijama saharoze (10%, 20%, 30%) u PBS-u tokom 72 sata na 4

°C. Potom su mozgovi zamrznuti u izopentanolu i čuvani na minus 80 °C do daljeg korišćenja. Mozgovi su isečeni na kriotomu (Leica) na preseke debljine 30 µm, pri čemu je čuvan svaki presek. Preseci su lepljeni direktno na mikroskopske pločice koje su radi fiksacije ostavljane 24 sata na sobnoj temperaturi i nakon toga čuvane na -20 °C, do daljeg korišćenja.

3.6.2. Kvantitativna imunohistohemijska analiza

Čitav postupak, osim inkubacije u primarnom antitelu, rađen je na sobnoj temperaturi, a rastvori su pravljani u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,4. Pločice sa presecima pripremanim za svetlosnu mikroskopiju su najpre isprane 3 puta po 5 minuta u PBS-u, inkubirane 5 minuta u smeši 0,3% vodonik-peroksida i 10% metanola u PBS-u kako bi se blokirala aktivnost endogene peroksidaze. Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta u PBS-u, preseci su inkubirani 15 minuta u 0,1% rastvoru deterdženta Triton-X 100, da bi se olakšao prolazak antitela kroz membranu ćelija. Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, preseci su inkubirani u 5% serumu kože (Dako). Višak rastvora za blokiranje je uklonjen kratkim ispiranjem u PBS-u, a zatim je na ovako pripremljene preseke nakapan rastvor primarnog antitela u fosfatnom puferu. Primarna antitela koja su korišćena za analizu su bila anti-FosB (sc-7203, Santa Cruz, 1:250) i anti-p-DARPP-32^{Thr34} (sc-135687, Santa Cruz, 1:2000). Inkubacija antitela je vršena preko noći na 4°C. Nevezana primarna antitela su uklonjena ispiranjem u PBS-u 3 puta po 5 minuta. Nakon toga su preseci inkubirani sat vremena na sobnoj temperaturi u univerzalnom biotiniziranom sekundarnom antitelu iz ABC kompleta (VECTASTAIN®UNIVERSAL ABC KIT, PK-6200, VECTOR LABORATORIES). Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta, preseci su inkubirani u avidin/biotin enzim kompleksu u trajanju od 30 minuta po protokolu iz istog ABC kompleta. Budući da avidin poseduje četiri vezujuća mesta za biotin i ima izvanredno veliki afinitet za biotin (skoro milion puta veći od afiniteta antitela za većinu antigena), korišćenje ovog senzitivnog kompleksa nam je omogućilo lakšu detekciju i intenzivniji signal. Za vizuelizaciju imunokompleksa, kao supstrat peroksidazi rena iz avidin/biotin enzim kompleksa, ponuđen je 3, 3 – diaminobenzidine (DAB; DAB supstrate kit for peroxidase, SK-4100, VECTOR LABORATORIES), razblažen u peroksidaznom puferu prema uputstvu proizvođača. Reakcija je prekidana ispiranjem pločica sa presecima u

tekućoj, a zatim u destilovanoj vodi. Potom su preseći dehidratirani kroz seriju alkohola (70%, 96% i 100% etanol), po 5 minuta u svakoj koncentraciji i prosvetljeni u ksilolu. Pločice su montirane nakapavanjem medijuma za mikroskopiranje (DPX, Sigma) i pokriveni pokrovnim staklom. Kako bi se proverila specifičnost reakcije, određeni preseći koji su poslužili kao negativna kontrola su prošli opisan protokol bez inkubacije sa primarnim antitelom. Detaljna analiza imunohistohemijske reakcije za pDARPP-32 i FosB proteine u okviru motornog PFK-a, strijatuma i talamusa je urađena korišćenjem Axio Image mikroskopa Axio Observer Microscope Z1, ZEISS.

Kvantitativna imunohistohemijska analiza je rađena na talamusu i hipokampusu kontrolnih i životinja žrtvovanih 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji ($n = 3$). Kvantifikacija je vršena u okviru pet nasumično odabranih reprezentativnih preseka po životinji (u regionu anteriornog ka srednje-posteriornom talamusu (Pavkovic i sar., 2017) i dorzalnom hipokampusu (Pavkovic i sar., 2018)) pri čemu su pločice sa presecima bile obeležene tako da eksperimentator koji vrši analizu nije upoznat kojoj kohorti pripada eksperimentalna životinja (kontrola ili tretman).

Brojanje FosB i pDARPP-32 pozitivnih ćelija u talamusu je vršeno u regionu PVT jedra (od kraja anteriornog ka srednje-posteriornom regionu, na osnovu izgleda treće ventrikule u mozgu adultnog pacova po stereotaksičkom atlasu (Paxinos i Watson, 2005). Za svaki presek, određena je površina veličine 250x350 μm u okviru koje su brojane imunopozitivne ćelije, selektovane na osnovu oblika i veličine i jasno uočljive u odnosu na pozadinski signal (Pavkovic i sar., 2017).

Ekspresija FosB/ Δ FosB proteina u različitim subregionima dorzalnog hipokampusa (CA1, CA3 (lat. *cornu ammonis*; CA) i dorzalnog dentatnog girusa (lat. *gyrus dentatus*; DG)) je ispitivana na osnovu intenziteta imunobojenja. Ovo imunobojenje je izvršeno pod istim uslovima prethodno opisanim za imunohistohemijsko bojenje za FosB proteina u okviru motornog PFK-a, strijatuma i talamusa. Analiza imunohistohemijsko bojenje za FosB/ Δ FosB proteina u hipokampusu je vršena na DM RB fotomikroskopu (Leica, Wetzlar, Germany) sa DFC 320 CCD kamerom (Leica). Ispitivane su tri životinje po grupi i 5 preseka po životinji. Rezolucija slika je iznosila 2088 \times 1550 pixela koje su zabeležene na uvećanju objektiva od 20 puta. Analiza je obuhvatala region hipokampusa od -2.6 do -3.6 mm od bregme po stereotaksičkom atlasu mozga pacova (Paxinos i Watson, 2005). Za svaki presek je

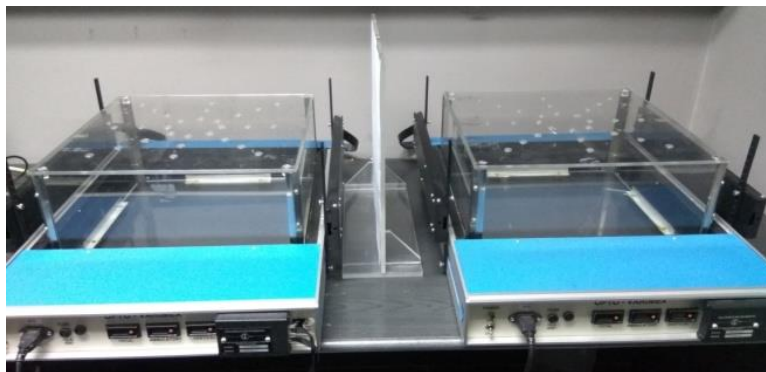
određeno 8 nepreklapajućih površina veličine 35x35 μ m za CA1 region, 8 za DG i 15 za CA3 region na kojima je izvršena analiza i kvantifikacija pomoću ImageJ programa. Relativno mala površina odabrana za kvantifikaciju je omogućila izbegavanje artefakta (kvalitet tkiva i artefakti nakon bojenja) koji mogu postojati na presecima tokom analize regiona/subregiona od interesa. Srednja vrednost je izračunata prvo za svaki presek pojedinačno, pa zatim i za svaku grupu.

3.7. Praćenje ponašanja eksperimentalnih životinja

Eksperimenti su sprovedeni između 9:00 i 15:00 časova. Pacovi su prvo habituirani na eksperimentalnu sobu u trajanju od najmanje 30 minuta a zatim podvrgnuti testovima ponašanja. Svaka životinja je prošla kroz eksperimentalnu proceduru samo jednom kako bi se izbegli eventualne posledice nastale kao rezultat prethodnog testiranja. Životinjama je rukovao uvek isti eksperimentator, na koga su životinje naviknute. Velika pažnja je bila usmerena ka uklanjanju mirisa između dva testiranja i u tu svrhu su test arene detaljno higijenski održavane (uklanjanje mehaničkih nečistoća, brisanje površina prvo ubrusom nakvašenim vodom pa 20% alkoholom, i opet vodom kako bi se uklonio eventualno zaostali miris alkohola i na kraju sušene ubrusom pred svako novo testiranje). Kako bi uslovi bili što ujednačeniji, kontrolne i tretirane životinje su paralelno prolazile proceduru u istom danu, i kada je bilo moguće (u testu praćenja bazalne i drogama indukovane motoričke aktivnosti, prostorne habituacije i prepoznavanja novog objekta) u isto vreme testirane jedna kontrolna i jedna tretirana jedinka.

3.7.1. Merenje motoričke aktivnosti

Motorička aktivnost peripubertetskih pacova je merena u kavezima Opto-Varimex sa sistemom Auto-Track (Version 3.0 A, Columbus Instruments, Sjedinjene Američke Države; Slika 3.2.).



Slika 3.2. Opto-Varimex kavezi (sa Auto-Track sistemom) za praćenje motoričke aktivnosti glodara (Laboratorija 56, IBISS).

Kavezi Opto-Varimex napravljeni su od pleksiglasa ($44,2 \text{ cm} \times 43,2 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$) i okruženi horizontalnim i vertikalnim izvorima infracrvenih zraka. Svaki kavez je opremljen sa 15 emitera koji se nalaze na x i y osi, kao i jednakim brojem prijemnika na odgovarajućoj suprotnoj strani. Svaki kavez je povezan sa interfejsom Auto-Track. Prekidanje snopova infracrvene svetlosti generisalo je električni impuls koji je bio obrađen i poslat ka kompjuteru povezanom sa sistemom Auto-Track. Dobijeni podaci su čuvani u kompjuteru. Sistem Auto-Track detektuje jedanaest parametara ponašanja, uključujući lokomotornu, vertikalnu i stereotipnu aktivnost. Tip aktivnosti, determinisani pokretima životinje, bio je određen definisanjem veličine polja od strane eksperimentatora (u našim ogledima obeležen sa tri snopa svetlosti). To je značilo da je svaka jedinka tokom kretanja morala da preseče tri uzastopna infracrvena zraka kako bi aktivnost bila identifikovana kao lokomotorna. Broj repetativnih/stereotipnih pokreta je definisan kao broj uzastopnih prekidanja istog zraka u jednoj desetini sekunde, dok je vertikalna aktivnost definisana kao broj prekinutih vertikalno postavljenih snopova usled uspinjanja životinje.

U cilju eliminacije interakcije životinja sa okolinom tokom eksperimentalne sesije, kavezi Opto-Varimex su bili smešteni u homogenu sredinu Laboratorije za ponašanje, ublažene osvetljenosti (100 lx u centru arene u našem eksperimentu). Intenzitet osvetljenosti je jako važan za bihejvioralne testove na pacovima, naročito za albino pacove (kojima pripada Wistar soj) čiji se vizuelni sistem dosta razlikuje od normalnih pigmentisanih pacova. Albino pacovi nemaju pigment melanin u dužici oka, stoga crvena boja oka potiče samo od krvi u kapilarima. Takođe nemaju pigment u makuli oka koji normalno apsorbuje svetlost. Intenzitet osvetljenosti do 150 lux-a u otvorenoj areni kod Wistar pacova ne utiče na tigmotaksis (prirodni defanzivni odgovor

u kome pacovi teže da borave u blizini vertikalnih površina, koje ih u prirodnom okruženju štite od predatora) (Lynn i Brown, 2010). Međutim, veći intenzitet osvetljenja za posledicu ima rasipanje svetlosnog signala u oku, koje postaje prezasićeno svetlom tako da je vid znatno otežan. Navedeno može da izazove nelagodu kod pacova i anksiozni odgovor, što onemogućava adekvatnu interpretaciju rezultata.

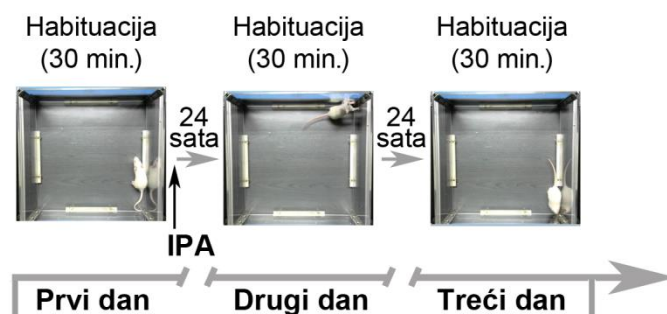
3.7.2. Bazalna motorička aktivnost i motorički odgovor na d-AMPH i PCP

Bazalna motorička aktivnost životinja je merena tokom habituacije na eksperimentalnu arenu, u trajanju od 30 minuta, pri čemu je vremenski profil aktivnosti utvrđen na osnovu vrednosti očitanih na svakih 5 minuta. Životinje su zatim injecirane (i.p.) d-AMPH-om (1,5 mg/kg) ili PCP-om (5 mg/kg). Nakon injeciranja droge životinje su vraćene u eksperimentalne kaveze gde je merena motorička aktivnost u narednih 100 minuta nakon injeciranja d-AMPH, tj. 120 minuta nakon injeciranja PCP. Rezultati su očitavani za 10-minutne periode i dodatno predstavljeni za duže vremenske intervale (prvih 50 i drugih 50 minuta u slučaju d-AMPH tretmana, na 30 minuta u slučaju PCP tretmana).

3.7.3. Test prostorne habituacije - dugotrajna habituacija

Test prostorne habituacije je podrazumevao trodnevnu habituaciju u Opto-Varimex kavezima, pri čemu je merena lokomotorna, stereotipna i vertikalna aktivnost. Vreme testiranja je iznosilo 30 minuta po sesiji. Prvog dana, odmah nakon 30 minuta inicijalne habituacije na eksperimentalne kaveze, životinje su podeljene u dve grupe: kontrolnu (koja je i.p. primila 7.5 ml/kg 0,9% NaCl, $n = 8$) i propofolsku (pacovi tretirani sa 75 mg/kg, tj. 7.5 ml/kg komercijalno dostupne 1% emulzije propofola). Iste grupe životinja su ponovo testirane 24 sata nakon prvog testiranja/tretmana, a zatim i 24 sata nakon drugog testiranja (eksperimentalni dizajn je shematski prikazan na slici 3.3.). Analizirana je aktivnost na svakih 5 minuta kao i ukupna motorička aktivnost za 30-minutni registracioni period.

A. Test prostorne habituacije



Slika 3.3. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna testa prostorne habituacije. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji (75 mg/kg, tj. 7,5 ml/kg komercijalno dostupne 1% emulzije propofola), istovremeno su kontrolne životinje bile injecirane fiziološkim rastvorom (7,5 ml/kg, i.p.). Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2018).

3.7.4. Test prepoznavanja novog objekta

Test prepoznavanja novog objekta nije mnogo zastupljen u bihevioralnim istraživanjima vezanim za mlade/peripubertetske pacove. Znajući da rezultati postignuti u testu prepoznavanja novog objekta u velikoj meri zavise od anksioznog stanja ispitivanih jedinki (Antunes i Biala, 2012), prilagodili smo metodološki postupak kako bi bio u skladu sa specifičnim bihevioralnim karakteristikama peripubertetskih pacova u zadatim uslovima.

Test prepoznavanja novog objekta je sproveden u istim eksperimentalnim kavezima u kojima je rađen test prostorne habituacije, što nam je omogućilo da uporedimo podatke dobijene iz ova dva testa i izbegnemo mogućnost uticaja dimenzija test arene na ponašanje pacova u testovima prepoznavanja novine. Mogućnost korišćenja eksperimentalnih kaveza za merenje motoričke aktivnosti u testu prepoznavanja novog objekta za adolescentne Wistar pacove je već potvrđena (Silvers i sar., 2007). Takođe je pokazano da peripubertetski pacovi mogu da prepoznaju novi objekat nakon retencionog perioda od 24 časa (Reger i sar., 2009).

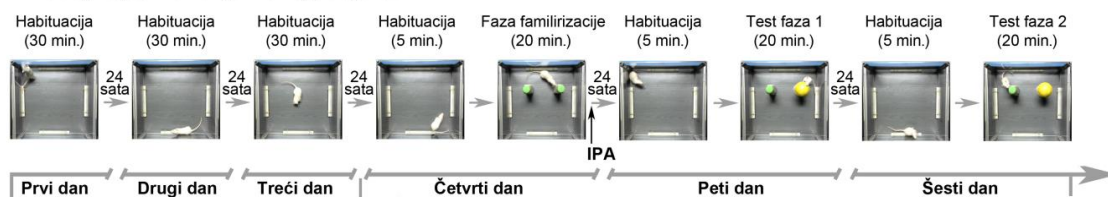
Nakon prilagođavanja na uslove eksperimentalne sobe, pre testa prepoznavanja novog objekta, P32 pacovi su podvrgnuti trodnevnoj habituaciji na eksperimentalne kaveze u trajanju od po 30 minuta svakog dana. Životinje su 35. postnatalnog dana podeljene u dve grupe (n = 8 po grupi) i podvrgnute testu prepoznavanja novog objekta. Ovaj test je za potrebe naše studije modifikovan i umesto standardne 2 faze (faza familijarizacije sa dva ista objekta i faza prepoznavanja novog objekta, (Ennaceur,

2010) bio produžen za još jednu test fazu, koja je za cilj imala testiranje memorije na novi objekat (test faza 2, raspored objekata isti kao u test fazi 1). U našem eksperimentu razmak između dve uzastopne faze testiranja (retencioni interval) je bio 24 časa, a svaka faza testiranja je trajala 20 minuta. U svakoj od tri faze testiranja objekti su postavljeni u uglove arene, udaljeni 8 centimetara od samih uglova.

Na početku svake faze životinjama je dopušteno da istraže praznu test arenu u vremenskom periodu od 5 minuta i omogućeno da se prisete sredine u kojoj su boravile prethodnih dana. Ova eksploratorna aktivnost je automatski beležena i naknadno analizirana. Na osnovu ovih podataka smo mogli proceniti da li opšta anestezija izazvana propofolom može uticati na prostornu memoriju koja je sticana danima pre tretmana, a na taj način i na rezultate dobijene u testu prepoznavanja novog objekta.

Nakon faze familijarizacije životinje su injecirane propofolom (ili fiziološkim rastvorom) i vraćene u matične kaveze. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna testa prepoznavanja novog objekta dat je na slici 3.4.

B. Test prepoznavanja novog objekta



Slika 3.4. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna testa prepoznavanja novog objekta. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji (75 mg/kg, tj. 7,5 ml/kg komercijalno dostupne 1% emulzije propofola), istovremeno su kontrolne životinje bile injecirane fiziološkim rastvorom (7,5 ml/kg, i.p.). Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2018).

Treba napomenuti da test prepoznavanja novog objekta nije standardizovan i da su kriterijumi koji se smatraju važnim za postizanje hipokampus-zavisne memorije prepoznavanja: dužina aktivnog upoznavanja sa objektima tokom faze familijarizacije (ukupno vreme ispitivanja objekata > 30 sekundi) i trajanje retencionog perioda (> 10 minuta) (Cohen i Stackman, 2015). U tom smislu, u našoj studiji je po prvi put primenjen pristup dugotrajne spontane ekspoloracije objekata, uzimajući u obzir razvojno specifični aspekt spontanosti (Pavkovic i sar., 2018). Naime, u literaturi postoje suprotstavljeni rezultati o sklonosti mladih pacova ka istraživanju novine, od kojih neki ukazuju da su peripubertetske jedinke više sklone istraživanju novine nego adultne jedinke (Stansfield i Kirstein, 2006, Spear, 2007b) dok drugi podaci ukazuju da

u novoj sredini mlade jedinke pokazuju anksioznije ponašanje u odnosu na adulte (Lynn i Brown, 2009, Lynn i Brown, 2010).

Ponašanje životinja tokom testa prepoznavanja novog objekta je beleženo kamerom i kvantitativno analizirano od strane istraživača koji nije znao koja je životinja kontrolna a koja tretirana. Kako bi se dobio vremenski profil eksploratorne aktivnosti vreme provedeno u istraživanju predmeta je analizirano na 5 minuta. Sabiranjem svih vrednosti analize na 5 minuta dobijeno je ukupno vreme istraživanja i ukupan broj prilazaka predmetu za ceo period registracije od 20 minuta. Na taj način smo procenjivali globalnu/opštu habituaciju. Aktivnost je računata kao eksploratorna računata samo ako bi pacov njuškom dotakao predmet ili ako je nos životinje upravljn direkno ka predmetu na udaljenosti manjoj ili jednakoj 2 centimetra. Iako je test prepoznavanja objekta baziran na VPC testu kod ljudi, treba imati u vidu da pacovi imaju loš, nejasan vid i najviše se oslanjaju na čula dodira i sluha. To je još više izraženo kod albino pacova za koje je pokazano da imaju znatno lošiji vid u odnosu na normalno pigmentisane pripadnike iste vrste (Antunes i Biala, 2012). Cirkularno kretanje oko predmeta nije računato kao eksploratorno ponašanje. Sedenje i stajanje na objektima je onemogućeno oblikom i veličinom predmeta. Dva ista objekta su predstavljale četvrtaste plastične flaše sa zelenim poklopcem, visine 8 centimetara i širine 4 centimetra, napunjene peskom radi povećanja težine i eliminisanja mogućnosti pomeranja i obaranja istih. Novi objekat je predstavljala okrugla plastična čaša sa širokim postoljem i žutim poklopcem i sličnih dimenzija. Pri izboru predmeta treba voditi računa o njihovom obliku ali i boji, jer za razliku od ljudi koji imaju sposobnost trihromatskog viđenja, pacovi imaju dihromatski vid, odnosno vide spektar boja od zelene do ultraljubičaste (ne vide crvenu). Prema tome izbor obojenih detalja familijanog i novog objekta, uz značajne razlike u obliku objekata, dodatno olakšava albino pacovima razlikovanje istih.

Za parametar, vreme provedeno u istraživanju objekata, izračunat je diskriminacioni indeks (DI, (Silvers i sar., 2007)), po formuli $DI = (n-f) / (n+f)$, gde je n vreme provedeno u istraživanju novog objekta, a f vreme provedeno u istraživanju familijarnog/starog objekta. Ovaj indeks može da ima vrednost od -1 do 1, pri čemu -1 označava potpunu preferencu za familijaran objekat, 0 da nema preference i 1 da postoji potpuna preferenca za novi objekat. Statistički se postojanje preference, tj. potvrda da je

DI značajno različit od nule, izračunava korišćenjem testa za jedan uzorak (engl. *One-sample t test*), koji poredi srednju vrednost grupe (uz postignutu standardnu devijaciju/grešku) za dati broj uzoraka sa $DI = 0,0$.

Zbog toga što je u našem eksperimentu novi predmet uvek stavljan u isti ugao arene (tj. novi objekat nije nasumično uveden), izračunali smo DI i za fazu familijarizacije, kako bi bili sigurni da ne postoji preferiranje mesta na kom se predmet nalazi. Ovakva analiza nam je ukazala da su dve životinje iz kontrolne grupe i jedna iz propofolske grupe morale biti isključene iz eksperimenta usled značajnog izbegavanja nekog od dva objekta (anksioznost usled prisustva novog objekta u poznatoj sredini) ili preferiranja levog ili desnog objekta (ako je za ukupno vreme istraživanja $DI > 0.2$ ili $DI < -0.2$ životinje su bile isključene iz eksperimenta). Na osnovu svega navedenog 6 životinja iz kontrolne i 7 iz tretirane grupe, umesto 8 životinja po grupi na početku testiranja, su uspešno završile eksperiment.

3.7.5. Test svetlo/tamne kutije

Test svetlo/tamne kutije (engl. *Light/dark box*) se koristi za testiranje anksioznosti kod glodara. Kutija se sastoji od svetlog odeljka napravljenog od belog pleksiglasa (31 cm × 31 cm × 36 cm) i tamnog odeljka, u potpunosti zatvorenog i napravljenog od crnog pleksiglasa (20 cm × 31 cm × 36 cm), koji su spojeni i povezani prolazom (10 cm × 10 cm) u sredini vertikalne pregrade (Slika 3.5.).



Slika 3.5. Svetlo/tamna kutija za praćenje anksioznog ponašanja pacova (Laboratorija 56, IBISS).

Jačina osvetljenja u svetlom delu je iznosila 85 lx, dok je tamni deo kutije bio bez osvetljenja. Nešto niži intenzitet svetla u ovom testu u odnosu na test otvorenog

polja je izabran zbog vizuelnih karakteristika pacova Wistar soja (Albino pacovi se teže prilagođavaju naglim promenama osvetljenja (Silvers i sar., 2007), što je posledica nedostatka melanina u njihovim očima (Reger i sar., 2009)).

Testirane su kontrolna grupa, životinje injecirane (i.p.) intralipidom i propofolom, a testiranje je obavljano 24 časa nakon injeciranja (jedino u ovoj ispitivanoj vremenskoj tački je utvrđena značajna razlika u motoričkom odgovoru izazvanom d-AMPH-om i PCP-om u odnosu na kontrolnu grupu). Jedinke su u kutiju spuštane u sredinu osvetljenog odeljka, okrenute od strane na kojoj se nalazi prolaz. Ponašanje je snimano video kamerom 10 min. Kvantitativna procena ponašanja životinje (latenca do ulaska u tamni odeljak, broj izlazaka u osvetljeni deo, vreme provedeno u osvetljenom odeljku (jedinka sa sve četiri šape prisutna u osvetljenom odeljku), vreme provedeno u tamnom odeljku i vreme provedeno u oblasti prolaza, frekvencija provirivanja/pružanja tela u osvetljeni deo (jedinka nije na sve četiri šape prisutna u osvetljenom odeljku)) sprovedena je posmatranjem snimljenog materijala od strane posmatrača koji nije bio upoznat kojoj kohorti pripada eksperimentalna životinja.

3.7.6. Test uzdignutog krstastog lavirinta

Razlike u anksioznom stanju kontrolnih i propofolom tretiranih jedinki (n = 6 po grupi) dodatno su ispitivane u testu uzdignutog krstastog (plus) lavirinta (engl. *Elevated plus maze*), 24 časa nakon injeciranja (u testu svetlo/tamne kutije značajna razlika je pokazana samo između ove dve grupe). Ovaj lavirint se sastoji od 4 kraka koja su postavljena u obliku znaka plus (+) i uzdignuta 55 cm od poda, od kojih su dva nasuprot postavljena kraka ograđena akrilnim zidom crne boje (visine 40 cm) a druga dva nasuprot postavljena kraka u potpunosti otvorena (Slika 3.6.). Širina svakog kraka je iznosila 10 cm a dužina 50 cm.



Slika 3.6. Uzdignuti krstasti lavirint za praćenje anksioznog ponašanja pacova (Laboratorija 56, IBISS).

Pacovi su stavljeni na centar platforme, upravljani ka otvorenom kraku. Životinjama je omogućeno da istražuju platformu 10 minuta, bez prisustva eksperimentatora u eksperimentalnoj sobi. Istraživač koji nije bio upućen u dizajn eksperimenta je na osnovu snimljenog materijala analizirao vreme provedeno u otvorenim i zatvorenim kracima, vreme provedeno u centralnoj zoni, broj izlazaka iz zatvorenih u otvorene krake i broj izvirivanja/protezanja u iste, tokom prvih 5 minuta i drugih 5 minuta trajanja eksperimenta.

3.8. Statistička obrada podataka

Svi podaci su statistički obrađeni korišćenjem Statistica 6.0 softverskog paketa (StatSoft Inc.). Numeričke varijable testirane su na normalnost raspodele Shapiro-Wilksovim testom (osetljiviji od ostalih testova normalnosti kada je u pitanju mali broj uzoraka (Razali i Wah, 2011)), što je bio uslov za dalje korišćenje parametrijskih testova u statističkoj analizi podataka.

Podaci dobijeni pri realizaciji prve tematske celine rada predstavljeni su kao srednja vrednost \pm standardna greška (Pavkovic i sar., 2017). Rezultati Western blot i imunohistohemijske analize, kao i rezultati dobijeni u testu svetlo/tamne kutije i spontane motoričke aktivnosti, analizirani su Mann-Whitney *U*-testom. Promene u motoričkoj aktivnosti životinja nakon injeciranja d-AMPH-a predstavljene su kao srednje vrednosti za 10-minutne intervale aktivnosti u okviru 100-minutnog registracionog perioda; ovi podaci nisu korišćeni za statistička poređenja već za

određivanje vremenskog perioda tokom kojeg se mogu detektovati izražene razlike u motoričkoj aktivnosti između grupa. Na osnovu ovih podataka rezultati su dodatno izraženi kao ukupne aktivnosti u prvih i drugih 50 minuta registracionog perioda, nakon testiranja normalnosti distribucije vrednosti su transformisane (primenom funkcije kvadratnog korena, da bi se postigla normalna distribucija podataka (McDonald, 2009) i statistički analizirani primenom dvofaktorske ANOVA analize sa ponovljenim merenjem (propofolski pretretman i vremenski interval u okviru registracionog perioda u kome se registruje aktivnost (ponovljeno merenje) kao faktori) i naknadno upoređivani Student-Newman-Keuls testom za multiple komparacije. Na grafikonima su prikazane originalne vrednosti, a podaci dobijeni transformacijom podataka korišćeni su samo za statistička poređenja (Manikandan, 2010). Promene u motoričkoj aktivnosti (lokomotorna, stereotipna i vertikalna) životinja nakon injeciranja PCP-a su predstavljene kao srednje vrednosti za 30-minutne intervale aktivnosti u okviru 120-minutnog registracionog perioda. Rezultati dobijeni za PCP indukovanu lokomotornu aktivnost 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji su analizirani primenom dvofaktorske ANOVA analize sa ponovljenim merenjem (propofolski pretretman i vremenski interval u okviru registracionog perioda u kome se registruje aktivnost (ponovljeno merenje) kao faktori) i naknadno upoređivani Student-Newman-Keuls testom za multiple komparacije. Ostali podaci vezani za PCP indukovanu motoričku aktivnost 24 i 48 sati nakon tretmana propofolom nisu imali normalnu raspodelu i analizirani su Mann-Whitney *U*-testom za poređenja između grupa i Wilcoxon testom za poređenja u okviru grupa (ponovljena merenja). Podaci dobijeni u testu uzdignutog krstastog lavirinta su predstavljeni kao srednje vrednosti za prvih i drugih 5 minuta testiranja i s obzirom da nisu imali normalnu raspodelu, analizirani su Mann-Whitney *U*-testom za poređenja između grupa i Wilcoxon-ovim testom za poređenja u okviru grupa (ponovljena merenja).

Pri realizaciji druge tematske celine rada rezultati su predstavljeni (prema zahtevima recenzenata) kao srednja vrednost \pm standardna devijacija sa individualnim vrednostima u okviru grupe (Pavkovic i sar., 2018).

Rezultati dobijeni u testu prostorne habituacije (lokomotorna, stereotipna i vertikalna aktivnost) su analizirani primenom dvofaktorske ANOVA analize (propofolski pretretman i vreme (faza testa prostorne habituacije – ponovljeno merenje)

kao faktori) i naknadno upoređivani Tukey testom. Podaci koji se odnose na vreme provedeno u centralnim kvadratima eksperimentalne arene nisu imali normalnu raspodelu i analizirani su neparametrijskim statističkim testovima (Friedman i Wilcoxon test za ponovljena merenja, Mann-Whitney *U*-test za poređenja između grupa). Poređenja su rađena za rezultate dobijene u prvih 5 minuta praćenja aktivnosti kao i za ukupnu aktivnost u toku 30 minuta registracije.

U testu prepoznavanja novog objekta, podaci koji se odnose na vreme provedeno u istraživanju objekata i diskriminacioni indeks (DI) su analizirani primenom neparametrijskih statističkih testova (Wilcoxon i Mann-Whitney *U* test). Postojanje preference testirano je korišćenjem testa za jedan uzorak (engl. *One-sample t test*), koji poredi srednju vrednost grupe (uz postignutu standardnu devijaciju/grešku) za dati broj uzoraka sa $DI = 0,0$ ($p < 0,05$ je potvrda da je DI značajno različit od nule, tj. da preferenca postoji). Podaci vezani za lokomotornu aktivnost u eksperimentalnoj areni 5 minuta pre početka svake faze su analizirani primenom dvofaktorske ANOVA analize sa ponovljenim merenjem (propofolski pretretman i vreme (faza testa prostorne habituacije - ponovljeno merenje) kao faktori).

Rezultati Western blot analize u okviru druge i treće tematske celine su analizirani jednofaktorskom ANOVA analizom i Dunnett testom za istovremeno upoređivanje svake tretirane grupe sa kontrolnom. Rezultati dobijeni za ERK-1 protein nisu imali normalnu distribuciju i analizirani su Kruskal-Wallis ANOVA analizom i nakon toga Mann-Whitney *U*-testom. Podaci dobijeni imunohistochemijskom analizom su analizirani Mann-Whitney *U*-testom, zbog malog broja uzoraka po grupi.

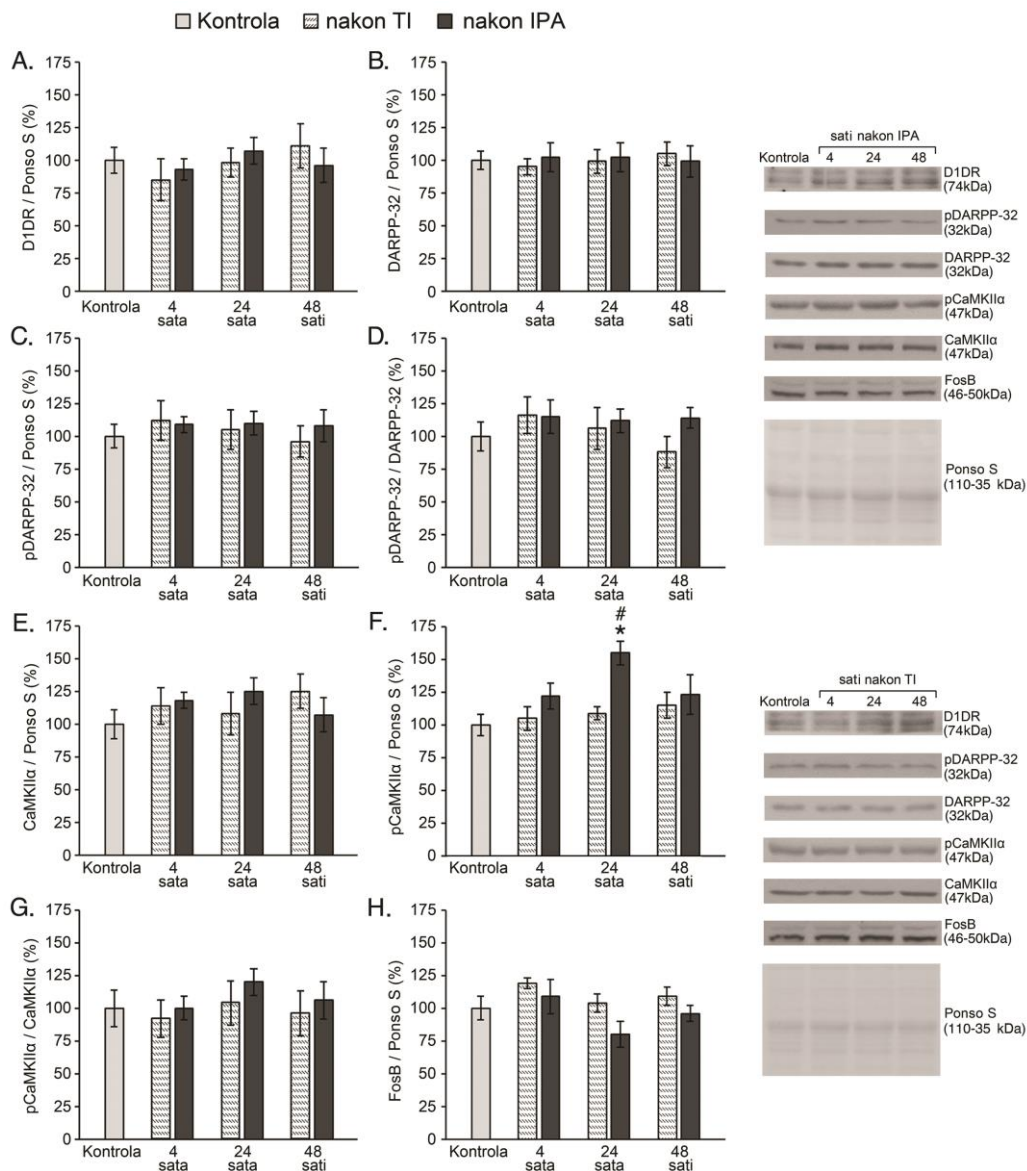
Statistički značajnom razlikom smatrana su poređenja u kojima je $p < 0,05$. Sumarni prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka, dobijenih parametara i broja korišćenih životinja je predstavljen u tabelama 1, 2, 3. Date su tačne p vrednosti, osim ako je $p < 0,000$, što je označavano kao $p < 0,001$.

4. REZULTATI

Shodno postavljenim zadacima, rezultati ove doktorske disertacije su predstavljeni kroz tri celine i organizovani po potpoglavljima numerisanim od 4.1. do 4.14. U okviru prve celine (potpoglavlja 4.1. – 4.9.) prikazani su rezultati koji se odnose na: promene u ekspresiji D1DR, DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina u mPFK-u (4.1.), strijatumu (4.2.) i talamusu (4.3.); spontanu motoričku aktivnost (4.4.) i motorički odgovor na d-AMPH (4.5.) i PCP (4.6.); anksiozni odgovor u crno/beloj kutiji (4.7.) i uzdignutom krstastom lavirintu (4.8.); imunobojenje pDARPP-32 i FosB u talamusu (4.9). U okviru druge celine (potpoglavlja 4.10. – 4.13.) prikazani su rezultati koji se odnose na: prostornu habituaciju (4.10.); prepoznavanje novog objekta (4.11.), promene u ekspresiji proteina značajnih za memorijski proces – BDNF, TrkB, Erg-1, CaMKII α , ERK1/2 (4.12.) i FosB/ Δ FosB (4.13.) u dorzalnem hipokampusu. U okviru treće celine prikazani su rezultati koji se odnose na promene u ekspresiji Aducin β proteina u mPFK-u, strijatumu, talamusu i dorzalnem hipokampusu (4.14.).

4.1. Ekspresija D1DR, DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina u mPFK-u peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji

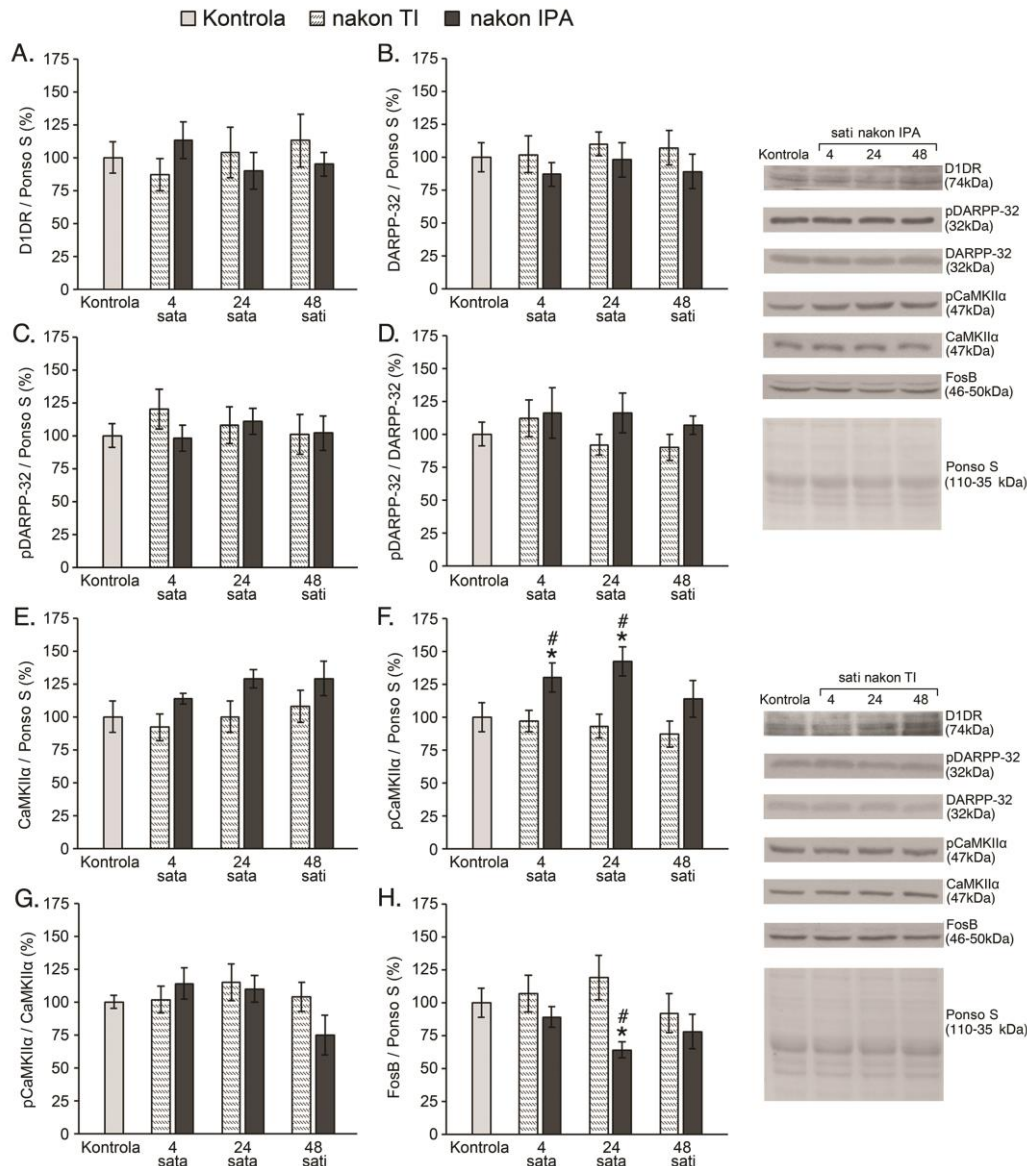
Izlaganje opštoj propofolskoj anesteziji nije uticalo na ekspresiju D1DR proteina (slika 4.1A) u mPFK-u. Nije uticalo ni na ekspresiju ukupne forme DARPP-32 proteina (slika 4.1B) i fosforilisane forme ovog proteina (pDARPP-32) (slika 4.1C). Takođe, nisu detektovane promene u odnosu između fosforilisane i ukupne forme DARPP-32 proteina (pDARPP-32 / DARPP-32; slika 4.1D), kao ni u ekspresiji FosB proteina (slika 4.1H). Statistički značajno povećanje ekspresije fosforilisane forme CaMKII α proteina je detektovano 24 sata nakon injeciranja anestetske doze propofola (slika 4.1F, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na tretman intralipidom). Nije bilo statistički značajnih promena u ekspresiji ukupne forme CaMKII α proteina (slika 4.1E), kao ni u relativnom odnosu između fosforilisane i ukupne forme CaMKII α proteina (pCaMKII α / CaMKII α) (slika 4.1G). Analiza podataka dobijenih Western blot metodom nije ukazala na razlike u ekspresiji navedenih proteina u okviru mPFK-a između kontrolne grupe i životinja tretiranih intralipidom. Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara analize, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 1, deo 4.1(A-H).



Slika 4.1. Promene u ekspresiji D1DR (A), DARPP-32 (B-D), CaMKII α (E-G) i FosB (H) u mPFK-u peripubertetskih mužjaka pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji ili tretmana intralipidom. Relativne vrednosti nivoa proteina su dobijene semikvantitativnom analizom imunoblotova, u odnosu na Ponso S bojenje koje je služilo kao kontrola nanošenja uzorka. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolu \pm standardna greška. Za određivanje odnosa između fosforilisanu i ukupne forme proteina bile su neophodne dve membrane sa dva paralelno dobijena gela. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima za fosforilisanu ili ukupnu formu proteina. Dobijeni signali su kvantifikovani u odnosu na interni standard i takve vrednosti dalje korišćene za izračunavanje odnosa fosforilisanu / ukupna forma proteina. Reprezentativni blotovi i membrana obojena Ponso S bojom (interni standard) su prikazani kao deo kolaža. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji, TI – tretman intralipidom. * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom; # $p < 0,05$ u poređenju sa TI. Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2017).

4.2. Ekspresija D1DR, DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina u strijatumu peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji

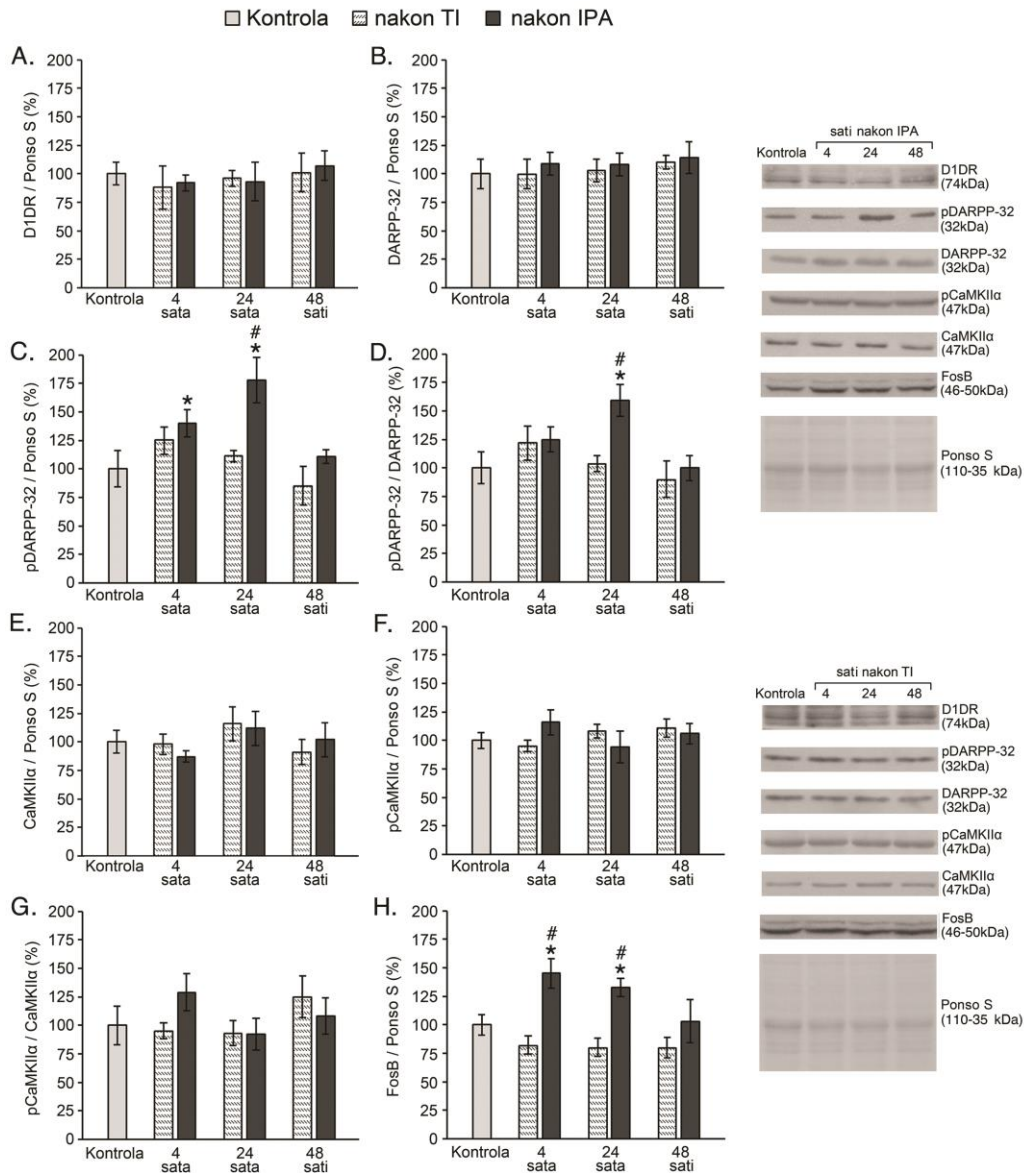
Izlaganje propofolskoj anesteziji nije uticalo na ekspresiju D1DR proteina (slika 4.2A) u strijatumu. Nije uticalo ni na ekspresiju ukupne forme DARPP-32 proteina (slika 4.2B) i fosforilisane forme ovog proteina (pDARPP-32) (slika 4.2C). Promene u odnosu između fosforilisane i ukupne forme DARPP-32 proteina nisu zabeležene (pDARPP-32 / DARPP-32; slika 4.2D). Statistički značajno povećanje ekspresije fosforilisane forme CaMKII α proteina je detektovano 4 i 24 sata nakon injeciranja anestetiske doze propofola (slika 4.2F, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na tretman intralipidom). Međutim, nisu zabeležene promene u ekspresiji ukupne forme CaMKII α proteina (slika 4.2E) i u odnosu između fosforilisane i ukupne forme CaMKII α proteina (pCaMKII α / CaMKII α) (slika 4.2G). Smanjena ekspresija FosB proteina je detektovana 24 sata nakon tretmana propofolom (slika 4.2H, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na tretman intralipidom). Analiza podataka dobijenih Western blot metodom nije ukazala na razlike u ekspresiji navedenih proteina u okviru strijatuma između kontrolne grupe i životinja tretiranih intralipidom. Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, su predstavljeni u tabeli 1, deo 4.2(A-H).



Slika 4.2. Promene u ekspresiji D1DR (A), DARPP-32 (B-D), CaMKII α (E-G) i FosB (H) u strijatumu peripubertetskih mužjaka pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji ili tretmana intralipidom. Relativne vrednosti nivoa proteina su dobijene semikvantitativnom analizom imunoblotova, u odnosu na Ponso S bojenje koje je služilo kao kontrola nanošenja uzorka. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolu \pm standardna greška. Za određivanje odnosa između fosforilisanu i ukupne forme proteina bile su neophodne dve membrane sa dva paralelno dobijena gela. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima za fosforilisanu ili ukupnu formu proteina. Dobijeni signali su kvantifikovani u odnosu na interni standard i takve vrednosti dalje korišćene za izračunavanje odnosa fosforilisanu / ukupna forma proteina. Reprezentativni blotovi i membrana obojena Ponso S bojom (interni standard) su prikazani kao deo kolaža. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji, TI – tretman intralipidom. * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom; # $p < 0,05$ u poređenju sa TI. Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2017).

4.3. Ekspresija D1DR, DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina u talamusu peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji

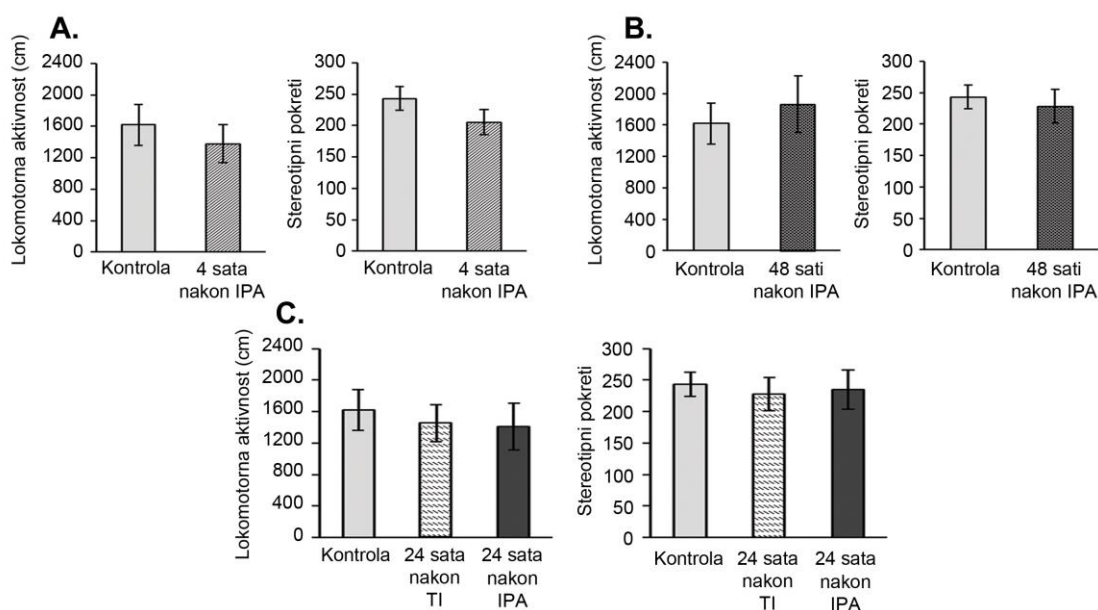
Izlaganje propofolskoj anesteziji nije uticalo na ekspresiju D1DR (slika 4.3A) i ukupne forme DARPP-32 (slika 4.3B) proteina u talamusu. Nije uticalo ni na ekspresiju ukupne forme CaMKII α proteina (slika 4.3E) i fosforilisane forme ovog proteina (pCaMKII α) (slika 4.3F). Odnos pCaMKII α / CaMKII α se nije značajno promenio nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (slika 4.3G). Statistički značajno povećanje nivoa fosforilisane forme DARPP-32 proteina je detektovano 4 i 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (slika 4.3C, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na tretman intralipidom). Značajno povećan nivo fosforilisane forme DARPP-32 u odnosu na ukupnu formu proteina (DARPP-32), je zabeležen 24 sata nakon injeciranja anestetske doze propofola (slika 4.3D, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na tretman intralipidom). Nivo FosB proteina je bio značajno povećan u 4. i 24. satu nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (slika 4.3H, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na tretman intralipidom). Analiza podataka dobijenih Western blot metodom nije ukazala na razlike u ekspresiji navedenih proteina u okviru talamusa između kontrolne i grupe životinja tretiranih intralipidom. Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, su predstavljeni u tabeli 1, deo 4.3(A-H).



Slika 4.3. Promene u ekspresiji D1DR (A), DARPP-32 (B-D), CaMKII α (E-G) i FosB (H) u talamusu peripubertetskih mužjaka pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji ili nakon tretmana intralipidom. Relativne vrednosti nivoa proteina su dobijene semikvantitativnom analizom imunoblotova, u odnosu na Ponso S bojenje koje je služilo kao kontrola nanošenja uzorka. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolu \pm standardna greška. Za određivanje odnosa između fosforilisanog i ukupnog proteina bile su neophodne dve membrane sa dva paralelno dobijena gela. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima za fosforilisanu ili ukupnu formu proteina. Dobijeni signali su kvantifikovani u odnosu na interni standard i takve vrednosti dalje korišćene za izračunavanje odnosa fosforilisanog / ukupna forma proteina. Reprezentativni blotovi i membrana obojena Ponso S bojom (interni standard) su prikazani kao deo kolaža. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji, TI – tretman intralipidom. * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom; # $p < 0,05$ u poređenju sa TI. Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2017).

4.4. Spontana motorička aktivnost

Životinje izložene propofolskoj anesteziji, u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom izloženoj intralipidu, nisu pokazale značajne promene u spontanoj lokomotornoj i stereotipnoj aktivnosti, u različitim vremenskim tačkama nakon tretmana, tokom perioda habituacije na eksperimentalne kaveze (slika 4.4A, 4.4B, 4.4C). Detaljnije objašnjenje statističke analize je prikazano u tabeli 1, deo 4.4.



Slika 4.4. Spontana lokomotorna i stereotipna aktivnost peripubertetskih pacova tokom spontanog istraživanja eksperimentalnih kaveza (habituacije) u različitim vremenskim tačkama (A. 4 sata; B. 48 sati i C. 24 sata) nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (IPA) ili tretmana intralipidom (TI). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška za ceo registracioni period od 30 minuta. Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2017).

4.5. Motorička aktivnost indukovana d–amfetaminom

Motorička aktivnost životinja (lokomocija, stereotipija) nakon izlaganja propofolskoj anesteziji a u odgovoru na d-AMPH je prikazana na slici 4.5.

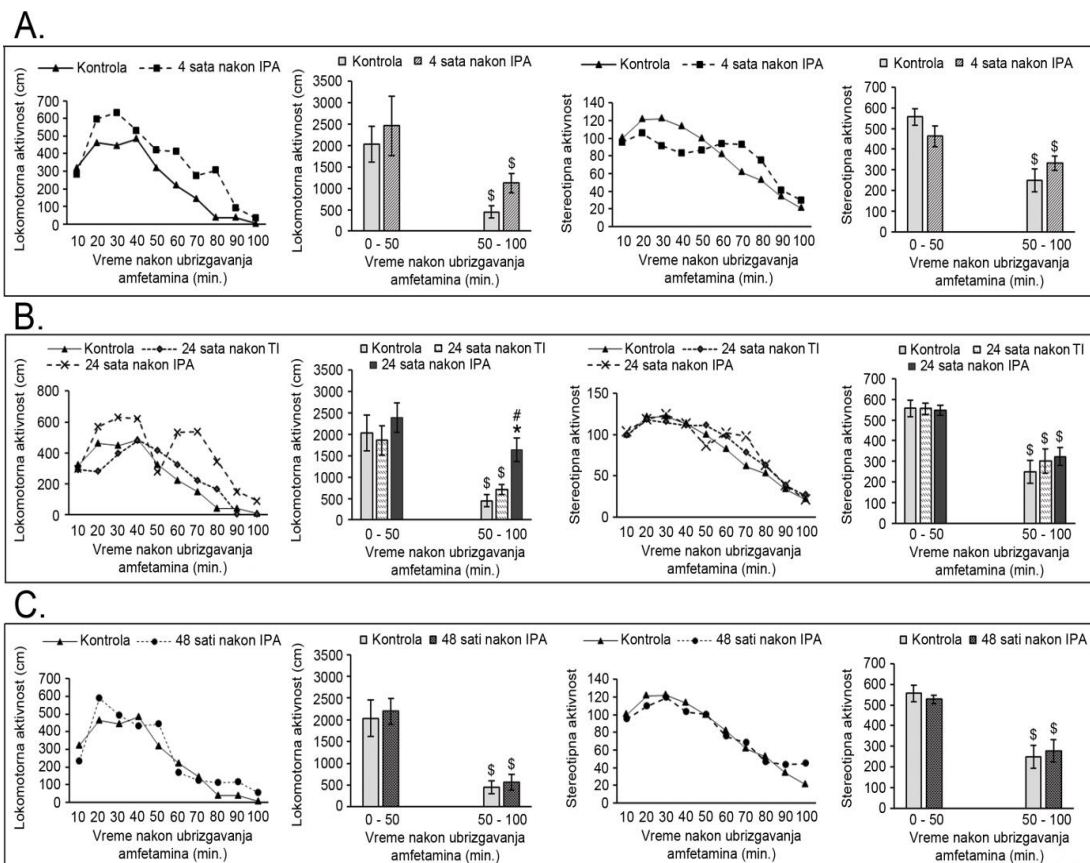
Primećen je sličan vremenski profil promena u lokomotornoj i stereotipnoj aktivnosti u odgovoru na d-AMPH kod svih analiziranih grupa osim kog grupe koja je testirana 24 sata nakon izlaganja anesteziji po osnovu lokomotorne aktivnosti (slika 4.5A – 4 sata nakon anestezije, slika 4.5B – 24 sata nakon anestezije, slika 4.5C – 48 sati nakon anestezije). Karakteriše ga povećana motorička aktivnost u prvih 50 minuta u

odnosu na drugih 50 minuta registracionog perioda, osim kod već pomenute propofolske grupe (24 sata nakon tretmana).

Statistička analiza je pokazala da *vreme jeste*, ali *izlaganje anesteziji* i *izlaganje anesteziji x vreme* nisu bili značajni faktori za promene u d-AMPH indukovanoj lokomotornoj aktivnosti 4 i 48 sati nakon izlaganja peripubertetskih pacova propofolu. Međutim, statistička analiza je pokazala da su *izlaganje anesteziji*, *vreme* i *izlaganje anesteziji x vreme* značajni faktori za promene u d-AMPH indukovanoj lokomotornoj aktivnosti peripubertetskih životinja u 24. satu nakon izlaganja propofolu ili intralipidu. U tom smislu, zabeležena je značajno manja lokomotorna aktivnost tokom drugih 50 minuta u odnosu na prvih 50 minuta kod svih analiziranih grupa osim kod grupe koja je testirana 24 sata nakon izlaganja anesteziji (slika 4.5A, 4.5.B, 4.5C, drugi grafik, \$ $p < 0,05$). Ova grupa je takođe pokazala pojačan intenzitet lokomotorne aktivnosti u drugih 50 minuta registracionog perioda u odnosu na grupe tretirane fiziološkim rastvorom ili intralipidom (slika 4.5B, * $p < 0,05$ u odnosu na isti period kontrolne grupe i # $p < 0,05$ u odnosu na isti vremenski period grupe tretirane intralipidom).

Dvofaktorska ANOVA je pokazala da je samo *vreme* značajan faktor za analizu podataka vezanih za d-AMPH indukovanu stereotipnu aktivnost u svim ispitivanim vremenskim tačkama nakon izlaganja anesteziji. Statistički značajne razlike za navedene parametre između kontrola i jedinki izloženih intralipidu nisu detektovane.

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 1, deo 4.5(A-C).



Slika 4.5. D-amfetaminom indukovane promene u lokomotornoj i stereotipnoj aktivnosti peripubertetskih pacova testiranih 4 sata (A), 24 sata (B) i 48 sati (C) nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (IPA) i 24 sata (B) nakon tretmana intralipidom (TI). Podaci su analizirani na svakih 10 minuta ili 50 minuta u okviru ukupnog registracionog perioda od 100 minuta i grafički predstavljene kao srednja vrednost za svaki 10-minutni period ili kao srednja vrednost \pm standardna greška za 50-minutne periode. Značajnosti su prikazane kao: \$ $p < 0,05$ u odnosu na prvih 50 minuta iste grupe, * $p < 0,05$ u odnosu na isti period kontrolne grupe, # $p < 0,05$ u odnosu na isti vremenski period grupe tretirane intralipidom. Iste grupe životinja su korišćene pri praćenju spontane (slika 4.4) i D-amfetaminom indukovane motoričke aktivnosti. Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2017).

4.6. Motorička aktivnost indukovana fenciklidinom

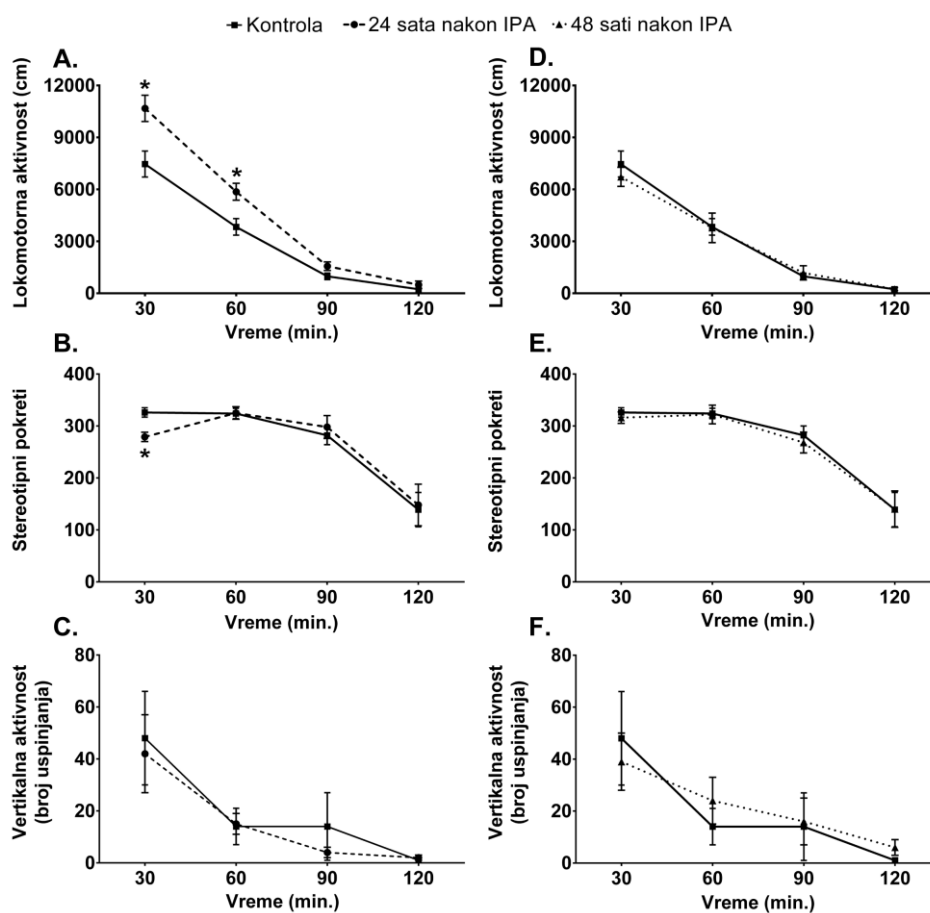
Motorička aktivnost životinja (lokomocija, stereotipija, vertikalna aktivnost) nakon izlaganja propofolskoj anesteziji a u odgovoru na PCP je prikazana na slici 4.6. Kako ni Western blot metoda a ni d-AMPH test nisu pokazali značajne razlike između kontrola i jedinki izloženih intralipidu, ispitivane su samo kontrolna i prethodno propofolom anestezirane grupe životinja.

Kod životinja testiranih 24 sata nakon propofolske anestezije lokomotorna aktivnost indukovana PCP-om je bila značajno veća u prvih i drugih 30 minuta ukupnog registracionog perioda od 120 minuta a stereotipna aktivnost značajno manja u prvih 30

minuta registracionog perioda u odnosu na kontrolnu grupu (slika 4.6A, 4.6B; * $p < 0,05$). Vertikalna aktivnost je bila istog intenziteta kod obe ispitivane grupe (slika 4.6C). Dvofaktorska ANOVA je pokazala da su *izlaganje anesteziji* i *vreme* značajni faktori, ali interakcija ovih faktora (*izlaganje anesteziji* x *vreme*) nije značajna za promene u lokomotornoj aktivnosti indukovanoj PCP-om 24 sata nakon tretmana.

Tretman PCP-om je u istoj meri povećao sve ispitivane parametre motoričke aktivnosti kod kontrolnih i životinja testiranih 48 sati nakon propofolske anestezije (slika 4.6D, 4.6E, 4.6F).

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 1, deo 4.6(A-C).

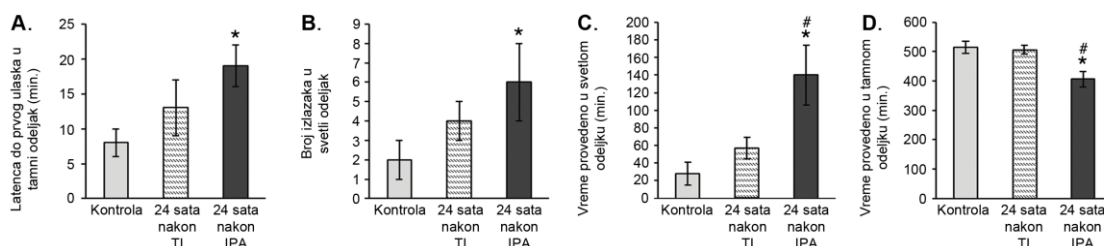


Slika 4.6. Fenciklidinom indukovane promene u lokomotornoj, stereotipnoj i vertikalnoj aktivnosti peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (IPA). Podaci su analizirani na svakih 30 minuta (u okviru eksperimenta koji je trajao 120 minuta) i predstavljeni grafički kao srednja vrednost \pm standardna greška. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji. Značajnosti su prikazane kao: * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

4.7. Test svetlo/tamne kutije

Smanjena bihevioralna inhibicija životinja u testu svetlo/tamne kutije je detektovana u 24. satu nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (Slika 4.7). Zabeležena je duža latenca do ulaska u tamni odeljak (slika 4.7A, * $p < 0,05$), veći broj ulazaka u svetli odeljak (slika 4.7B, * $p < 0,05$) kod jedinki izloženih propofolu u odnosu na kontrolne životinje. Zabeleženo je i duže vreme boravka u svetlom odeljku (slika 4.7C, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu, # $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu intralipidom), kao i kraće vreme boravka u tamnom odeljku (slika 4.7D, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu, # $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu intralipidom) kod životinja tretiranih propofolom a u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu životinja tretiranih intralipidom. Broj izvirivanja u svetli region i dužina zadržavanja u regionu otvora između svetlog i tamnog odeljka se nisu značajno razlikovali između grupa. Statistički značajne razlike između kontrola i jedinki izloženih intralipidu nisu zapažene.

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 1, deo 4.7(A-D).



Slika 4.7. Ponašanje životinja u testu svetlo/tamne kutije, ispitivano 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji ili tretmanu intralipidom. Podaci za latencu do ulaska u tamni odeljak (A), broj ulazaka u svetli odeljak (B), vreme provedeno u svetlom odeljku (C) i vreme provedeno u tamnom odeljku (D) su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška za 10-minutni registracioni period. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji, TI – tretman intralipidom. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu. # $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu intralipidom. Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2017).

4.8. Test uzdignutog krstastog lavirinta

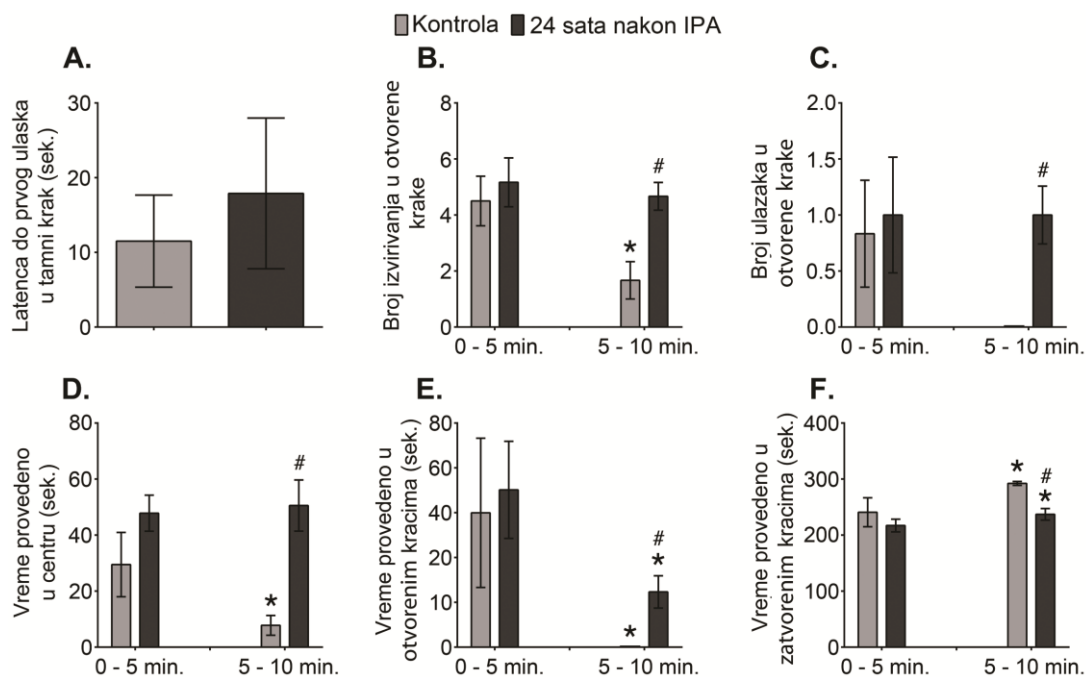
Smanjena bihevioralna inhibicija, detektovana kod pacova 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji u testu svetlo/tamne kutije je potvrđena testom uzdignutog krstasti lavirinta. Analizirano je šest parametara (latenca do prvog ulaska u zatvoreni krak, broj izvirivanja i ulazaka iz zatvorenih u otvorene krake, vreme

provedeno u otvorenim, zatvorenim kracima i u centralnom regionu) tokom prvih 5 i drugih 5 minuta testiranja, a rezultati su grafički prikazani na slici 4.8.

Ni u jednom od analiziranih parametara nisu detektovane statistički značajne razlike u ponašanju između kontrolne i prethodno anestetizirane grupe u prvih 5 minuta testiranja ali jesu u drugih 5 minuta (slika 4.8), tj. tretirane životinje su u odnosu na kontrole češće izvirivale u otvorene krake (slika 4.8B, # $p < 0,05$), češće izlazile iz zatvorenih u otvorene krake (slika 4.8C, # $p < 0,05$), duže boravile u centralnom regionu (slika 4.8D, # $p < 0,05$), duže boravile u otvorenim kracima (slika 4.8E, # $p < 0,05$) a kraće u zatvorenim kracima (slika 4.8F, # $p < 0,05$).

Statističkom obradom podataka Wilcoxon testom između prvih i drugih 5 minuta testiranja (unutar grupa) je zabeleženo da su kontrole ređe izvirivale tokom drugih 5 minuta nego tokom prvih 5 minuta testiranja, što nije primećeno kod tretirane grupe (slika 4.8B, * $p < 0,05$). Ni kod jedne grupe nije detektovana značajna razlika u broju izlazaka iz zatvorenih kraka (slika 4.8C). Kontrolna grupa je kraće boravila u centru uzdignutog krstastog lavirinta tokom drugih 5 minuta u odnosu na prvih 5 minuta (slika 4.8D, * $p < 0,05$), a dužina boravka tretirane grupe na centralnoj površini se nije razlikovala tokom ova dva analizirana perioda testiranja (slika 4.8E). Zajedničko za kontrolnu i tretiranu grupu jeste kraće zadržavanje u otvorenim i duže zadržavanje u zatvorenim kracima tokom drugih nego tokom prvih 5 minuta (slike 4.8E i 4.8F, redom, * $p < 0,05$).

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti je predstavljen u tabeli 1, deo 4.8 (A-F).



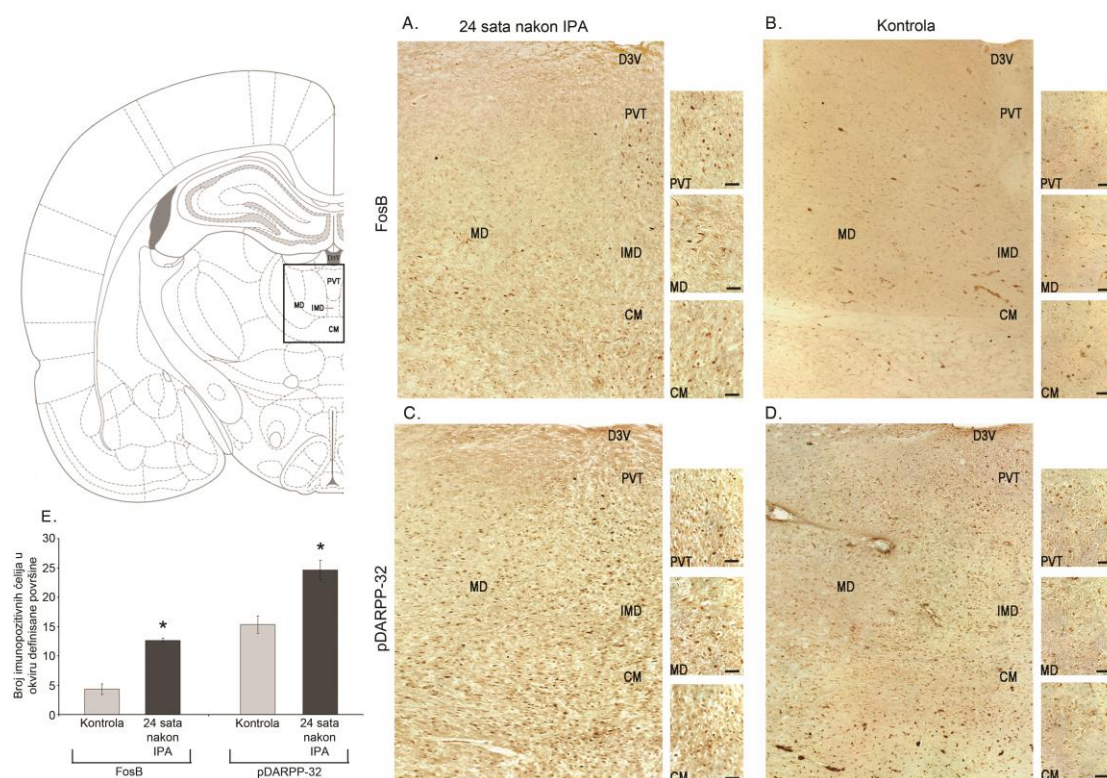
Slika 4.8. Ponašanje životinja u testu uzdignutog krstastog lavirinta, ispitivano 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji. Podaci za latencu do prvog ulaska u zatvoreni krak (A), broj izvirivanja (B) i ulazaka u otvorene krake (C), vreme provedeno u centru (D), otvorenim (E) i zatvorenim (F) kracima lavirinta su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za prvih 5 i drugih 5 minuta testiranja. IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji. # $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu. * $p < 0,05$ u odnosu na prvih 5 minuta iste grupe.

4.9. Imunohistohemijska analiza ekspresije FosB i pDARPP-32 proteina u talamičkim jedrima peripubertetskih pacova 24 sata nakon izlaganja propofolu

Promene u ekspresiji FosB i pDARPP-32 proteina u talamusu, dobijene Western blot metodom, su dodatno ispitivane metodom imunohistohemije. Izabrana je vremenska tačka 24 sata nakon izlaganja propofolu usled najintenzivnijih promena na biohemijskom i bihejvioralnom nivou. Kako ni Western blot metoda a ni d-AMPH test nisu pokazali značajne razlike između kontrola i jedinki izloženih intralipidu, imunohistohemijska analiza je obuhvatala samo kontrolne i uzorke grupe 24 sata nakon izlaganja propofolu (slika 4.9).

Upoređivanjem sa kontrolnom grupom (Slika 4.9B), intenzivnije FosB imunobojenje kod pacova prethodno izloženih propofolskoj anesteziji je bilo uočeno u jedrima središnje linije talamusa (paraventrikularno talamičko jedro (PVT) i centralno medijalno jedro (*lat. nucleus centromedianus thalami*, CM) (slika 4.9A). Intenzivnije pDARPP-32 imunobojenje je takođe detektovano kod prethodno anesteziranih (slika 4.9C) u odnosu

na kontrolne životinje (slika 4.9D), i to u jedrima središnje linije (PVT, intermediodorzalni (IMD) subregion i CM) i mediodorzalnom talamusu. Detaljna kvantitativna analiza je ukazala na značajan porast u broju FosB i pDARPP-32 imunopozitivnih ćelija u paraventrikularnom jedru jedinki izloženih propofolu u odnosu na kontrolu životinje (Slika 4.9E, * $p < 0.05$).



Slika 4.9. Imunohistohemijska analiza ekspresije FosB i pDARPP-32 proteina u talamusu peripubertetskih pacova 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji. Analizom su obuhvaćeni regioni koji pripadaju jedrima središnje linije. Brojanje FosB i pDARPP-32 imunopozitivnih ćelija je vršeno u okviru PVT regiona (od kraja anteriornog do midposteriornog dela). Imunopozitivne ćelije su brojane na površini od $87500 \mu\text{m}^2$ ($250 \times 350 \mu\text{m}$), pri čemu je korišćeno 5 reprezentativnih preseka mozga po životinji ($n = 3$ životinje po grupi). IPA – izlaganje propofolskoj anesteziji. PVT – paraventrikularno jedro talamusa, IMD – intermediodorzalno jedro talamusa, CM – centralno medijalno jedro (*lat. nucleus centromedianus thalami*), MD – mediodorzalno jedro talamusa (*lat. nucleus mediodorsalis thalami*); D3V – dorzalna treća ventrikula. Skala $50 \mu\text{m}$. Preuzeto i modifikovano iz (Pavkovic i sar., 2017).

Tabela 1. Sumarni prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka, dobijenih parametara i broja korišćenih životinja (n), vezanih za prvu tematsku celinu rada (4.1. – 4.8.). Analizom su obuhvaćene kontrolne, kao i životinje tretirane intralipidom (TI) ili izložene propofolskoj anesteziji (IPA) i ispitivane u različitim vremenskim tačkama nakon tretmana (4, 24 i 48 sati).

4.1.-4.3. Western blot (IPA:n=5 po grupi; TI:n=4 po grupi)					
Slika	Kruskal-Walis ANOVA	Post hoc test	4 sata nakon IPA vs. Kontrola	24 sata nakon IPA vs. Kontrola	48 sati nakon IPA vs. Kontrola
4.1A DIDR	$H_{(3,N=20)} = 1,831; p = 0,608$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,564$	$p = 0,386$	$p = 0,564$
4.1B DARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 0,234; p = 0,972$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,917$	$p = 0,917$	$p = 0,754$
4.1C pDARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 1,057; p = 0,787$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,347$	$p = 0,347$	$p = 0,602$
4.1D pDARPP-32 / DARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 1,800; p = 0,615$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,251$	$p = 0,465$	$p = 0,251$
4.1E CaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 2,886; p = 0,409$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,175$	$p = 0,174$	$p = 0,754$
4.1F pCaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 6,408; p = 0,093$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,117$	$p = 0,009$	$p = 0,754$
4.1G pCaMKII α / CaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 1,800; p = 0,615$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,251$	$p = 0,465$	$p = 0,251$
4.1H FosB	$H_{(3,N=20)} = 1,891; p = 0,595$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,754$	$p = 0,251$	$p = 0,917$
4.1A - 4.1H svi gore navedeni proteini	Kruskal-Walis ANOVA i Mann-Whitney U test nisu ukazali na značajne promene u ekspresiji ni u jednom od ispitivanih proteina, ni u jednoj vremenskoj tački nakon TI				
4.2A DIDR	$H_{(3,N=20)} = 1,612; p = 0,657$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,564$	$p = 0,564$	$p = 0,564$
4.2B DARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 0,897; p = 0,826$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,917$	$p = 0,917$	$p = 0,754$
4.2C pDARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 1,057; p = 0,787$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,602$	$p = 0,602$	$p = 0,917$
4.2D pDARPP-32 / DARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 0,463; p = 0,927$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,602$	$p = 0,602$	$p = 0,602$
4.2E CaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 4,737; p = 0,192$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,465$	$p = 0,117$	$p = 0,117$
4.2F pCaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 7,183; p = 0,063$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,047$	$p = 0,047$	$p = 0,754$
4.2G pCaMKII α / CaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 5,217; p = 0,157$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,251$	$p = 0,917$	$p = 0,174$
4.2H FosB	$H_{(3,N=20)} = 6,243; p = 0,104$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,564$	$p = 0,043$	$p = 0,145$
4.2A - 4.2H svi gore navedeni proteini	Kruskal-Walis ANOVA i Mann-Whitney U test nisu ukazali na značajne promene u ekspresiji ni u jednom od ispitivanih proteina, ni u jednoj vremenskoj tački nakon TI				
4.3A DIDR	$H_{(3,N=20)} = 1,582; p = 0,663$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,347$	$p = 0,175$	$p = 0,917$
4.3B DARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 1,617; p = 0,655$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,117$	$p = 0,465$	$p = 0,465$
4.3C DARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 9,971; p = 0,019$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,047$	$p = 0,016$	$p = 0,917$
4.3D pDARPP-32 / DARPP-32	$H_{(3,N=20)} = 7,971; p = 0,046$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,251$	$p = 0,028$	$p = 0,602$
4.3E CaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 1,629; p = 0,652$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,251$	$p = 0,602$	$p = 0,917$
4.3F pCaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 3,183; p = 0,364$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,251$	$p = 0,347$	$p = 0,754$
4.3G pCaMKII α / CaMKII α	$H_{(3,N=20)} = 3,354; p = 0,341$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,175$	$p = 0,602$	$p = 0,465$
4.3H FosB	$H_{(3,N=20)} = 6,977; p = 0,072$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,016$	$p = 0,028$	$p = 0,174$
4.3A - 4.3H svi gore navedeni proteini	Kruskal-Walis ANOVA i Mann-Whitney U test nisu ukazali na značajne promene u ekspresiji ni u jednom od ispitivanih proteina, ni u jednoj vremenskoj tački nakon TI				

Slika	4.4. - 4.6. Test otvorenog polja							
4.4A – C Spontana motorička aktivnost	<i>Vrednosti nisu prikazane, Mann-Whitney U analiza nije ukazala na značajne promene ni u jednom od ispitivanih parametara</i>							
4.5. D-amfetaminom indukovane promene u motoričkoj aktivnosti (n = 6 po grupi)								
4.5A U lokomotornoj i stereotipnoj aktivnosti pacova 4 sata nakon IPA	<i>Dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Student-Newman-Keuls test</i>				
	Lokomotorna aktivnost (drugi grafik) IPA: $F_{(1,10)} = 1,838; p = 0,205$ vreme: $F_{(1,10)} = 22,454; p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(1,10)} = 1,726; p = 0,218$			$p < 0,001$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod kontrole grupe $p < 0,001$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod IPA grupe				
4.5B U lokomotornoj i stereotipnoj aktivnosti pacova 24 sata nakon IPA i TI	<i>Dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Student-Newman-Keuls test</i>				
	Lokomotorna aktivnost (drugi grafik) IPA: $F_{(2,15)} = 4,813; p = 0,024$ vreme: $F_{(1,15)} = 43,237; p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(2,15)} = 3,732; p = 0,048$			$p < 0,001$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod kontrole grupe $p = 0,006$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod TI grupe $p = 0,009$ IPA vs. Kontrola tokom drugih 50 minuta $p = 0,039$ IPA vs. TI tokom drugih 50 minuta				
4.5C U lokomotornoj i stereotipnoj aktivnosti pacova 48 sati nakon IPA	<i>Dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Student-Newman-Keuls test</i>				
	Lokomotorna aktivnost (drugi grafik) IPA: $F_{(2,15)} = 0,259; p = 0,621$ vreme: $F_{(1,15)} = 35,816; p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(2,15)} = 0,002; p = 0,991$			$p < 0,001$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod kontrole grupe $p < 0,001$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod IPA grupe				
	<i>Dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Student-Newman-Keuls test</i>				
	Stereotipna aktivnost (četvrti grafik) IPA: $F_{(1,10)} = 0,001; p = 0,992$ vreme: $F_{(1,10)} = 71,802; p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(1,10)} = 0,783; p = 0,397$			$p < 0,001$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod kontrole grupe $p < 0,001$ drugih 50 minuta vs. prvih 50 minuta kod IPA grupe				
4.6. Fenciklidinom indukovane promene: (n = 5 po grupi)								
Slika	<i>statistička analiza</i>		<i>post hoc test</i>		30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
4.6A U lokomotornoj aktivnosti 24 sata nakon IPA	<i>Dvofaktorska ANOVA</i>		<i>Student-Newman-Keuls test</i>					
	IPA: $F_{(1,8)} = 13,478; p = 0,006$ vreme: $F_{(3,24)} = 135,620; p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(3,24)} = 0,999; p = 0,410$		IPA vs. Kontrola		$p = 0,022$	$p = 0,040$	$p = 0,205$	$p = 0,531$
4.6B U stereotipnoj aktivnosti 24 sata nakon IPA	<i>Kruskal-Walis ANOVA</i>		<i>Mann-Whitney U test</i>					
			IPA vs. Kontrola		$p = 0,016$	$p = 0,917$	$p = 0,531$	$p = 0,917$
	<i>Friedman ANOVA</i>		<i>Wilcoxon test</i>	Kon.	/	$p = 0,897$	$p = 0,138$	$p = 0,043$
				IPA	/	$p = 0,080$	$p = 0,418$	$p = 0,043$
4.6C U vertikalnoj aktivnosti 24 sata nakon IPA	<i>Kruskal-Walis ANOVA</i>		<i>Mann-Whitney U test</i>					
			IPA vs. Kontrola		$p = 0,713$	$p = 0,713$	$p = 0,806$	$p = 0,462$
	<i>Friedman ANOVA</i>		<i>Wilcoxon test</i>	Kon.	/	$p = 0,177$	$p = 0,043$	$p = 0,043$
				IPA	/	$p = 0,080$	$p = 0,043$	$p = 0,043$
4.6D - F Parametri motoričke aktivnosti 48 sati nakon IPA	<i>Kruskal-Walis ANOVA</i> <i>Friedman ANOVA</i>		vrednosti nisu prikazane, analize nisu ukazale na značajne razlike					

4.7. Test svetlo / tamne kutije (n=7 po grupi)					
Slika	Statistička analiza (Kruskal-Walis ANOVA)	post hoc test	IPA vs. Kontrola	IPA vs. TI	TI vs. Kontrola
4.7A Latenca do ulaska u svetli odeljak	$H_{(2, 21)} = 0,011; p = 0,917$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,038$	$p = 0,118$	$p = 0,253$
4.7B. Broj izlazaka u svetli odeljak	$H_{(2, 18)} = 4,275; p = 0,030$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,033$	$p = 0,183$	$p = 0,133$
4.7C Vreme provedeno u svetlom odeljku	$H_{(2, 18)} = 5,787; p = 0,012$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,014$	$p = 0,045$	$p = 0,418$
4.7D Vreme provedeno u tamnom odeljku	$H_{(2, 18)} = 7,547; p = 0,004$	(Mann-Whitney U test)	$p = 0,014$	$p = 0,015$	$p = 0,096$

4.10. Uticaj anestezije indukovane propofolom na prostornu habituaciju peripubertetskih pacova

Ispitivana je habituacija unutar sesija, koja se može posmatrati kao mera sposobnosti učenja, i između sesija koja se može posmatrati kao mera sposobnosti memorisanja (Leussis i Bolivar, 2006). Detaljna analiza aktivnosti je izvršena za vremenski period od prvih 5 minuta (u velikoj meri povezano sa detekcijom novine) i ukupan vremenski period od 30 minuta (ukupna aktivnost povezana sa učenjem). Ovi parametri mogu i ne moraju da se menjaju na isti način.

4.10.1. Uticaj anestezije indukovane propofolom na lokomotornu aktivnost peripubertetskih pacova

Lokomotorna aktivnost tokom trodnevne habituacije kod životinja izloženih propofolskoj anesteziji i kontrolnih životinja je prikazana na slici 4.10. Dvofaktorska ANOVA je pokazala da *izlaganje anesteziji* nije, ali *vreme* i *izlaganje anesteziji x vreme* jesu značajni faktori za analizu podataka vezanih za lokomotornu aktivnost tokom prvih pet minuta i tokom ukupnog vremena trajanja eksperimenta od 30 minuta).

Nisu detektovane značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti između kontrola i životinja izloženih propofolskoj anesteziji kroz sva tri dana testiranja za prvih 5 minuta i za ukupno vreme od 30 minuta (slika 4.10A). Međutim, zabeležene su specifične promene u okviru grupa tokom tri uzastopna dana testiranja. Kontrolna grupa je ukazala na značajno smanjenu lokomotornu aktivnost tokom trećeg, ali ne i tokom drugog dana testiranja u poređenju sa aktivnošću koja je registrovana tokom prvog dana za prvih 5 minuta testiranja i za ukupno vreme trajanja eksperimenta (slika 4.10A, levi i desni

grafik, redom, * $p < 0,05$). Nisu detektovane značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti kontrolne grupe životinja između drugog i trećeg dana testiranja.

Za razliku od kontrolne grupe, grupa izložena propofolaskoj anesteziji je, u odnosu na prvi dan testiranja, pokazala znatno manju lokomotornu aktivnost već drugog dana (slika 4.10A, & $p < 0,05$), dok je trećeg dana manja lokomotorna aktivnost zabeležena za ukupno analizirano vreme, ali ne i za prvih 5 minuta registracije, ukazujući da ove životinje (za razliku od kontrolnih) trećeg dana detektuju novinu prostora (slika 4.10A, desni grafik, & $p < 0,05$). Lokomotorna aktivnost tokom trećeg dana testiranja kod grupe izložene propofolu se nije značajno razlikovala od aktivnosti zabeležene tokom drugog dana testiranja. Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.10A.

4.10.2. Uticaj anestezije indukovane propofolom na stereotipnu aktivnost peripubertetskih pacova

Uticaj propofolske anestezije na stereotipnu aktivnost tokom testa prostorne habituacije je prikazan na slici 4.10B. Dvofaktorska ANOVA nije pokazala da su *izlaganje anesteziji*, *vreme* i *izlaganje anesteziji x vreme* značajni faktori za analizu podataka vezanih za stereotipnu aktivnost tokom prvih 5 minuta registracije, kao i za 30 minuta ukupnog vremena testiranja. Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.10B.

4.10.3. Uticaj anestezije indukovane propofolom na vertikalnu aktivnost peripubertetskih pacova

Vertikalna aktivnost je još jedan od parametara koji su analizirani u testu prostorne habituacije (slika 4.10C). Dvofaktorska ANOVA je pokazala da *izlaganje anesteziji* nije značajan faktor, međutim *vreme* i interakcija faktora (*izlaganje anesteziji x vreme*) jesu značajni za uočene promene, za oba analizirana vremenska okvira (za prvih 5 minuta i za ukupno vreme od 30 minuta).

Post hoc analiza podataka koji se odnose na vertikalnu aktivnost nije ukazala na značajne razlike u vertikalnoj aktivnosti između kontrole i grupe izložene propofolaskoj

anesteziji kroz sva tri dana testiranja. Međutim, kao i u slučaju lokomotorne aktivnosti, zabeležene su specifične promene u okviru grupa tokom tri uzastopna dana testiranja.

Kontrolna grupa je značajno manju vertikalnu aktivnost u odnosu na prvi dan testiranja pokazala tokom drugog i trećeg dana, kako u prvih 5 minuta tako i za ukupnih 30 minuta testiranja (slika 4.10C, levi i desni grafik, * $p < 0,05$). Nije bilo značajnih razlika u vertikalnoj aktivnosti između drugog i trećeg dana testiranja za oba vremenska perioda.

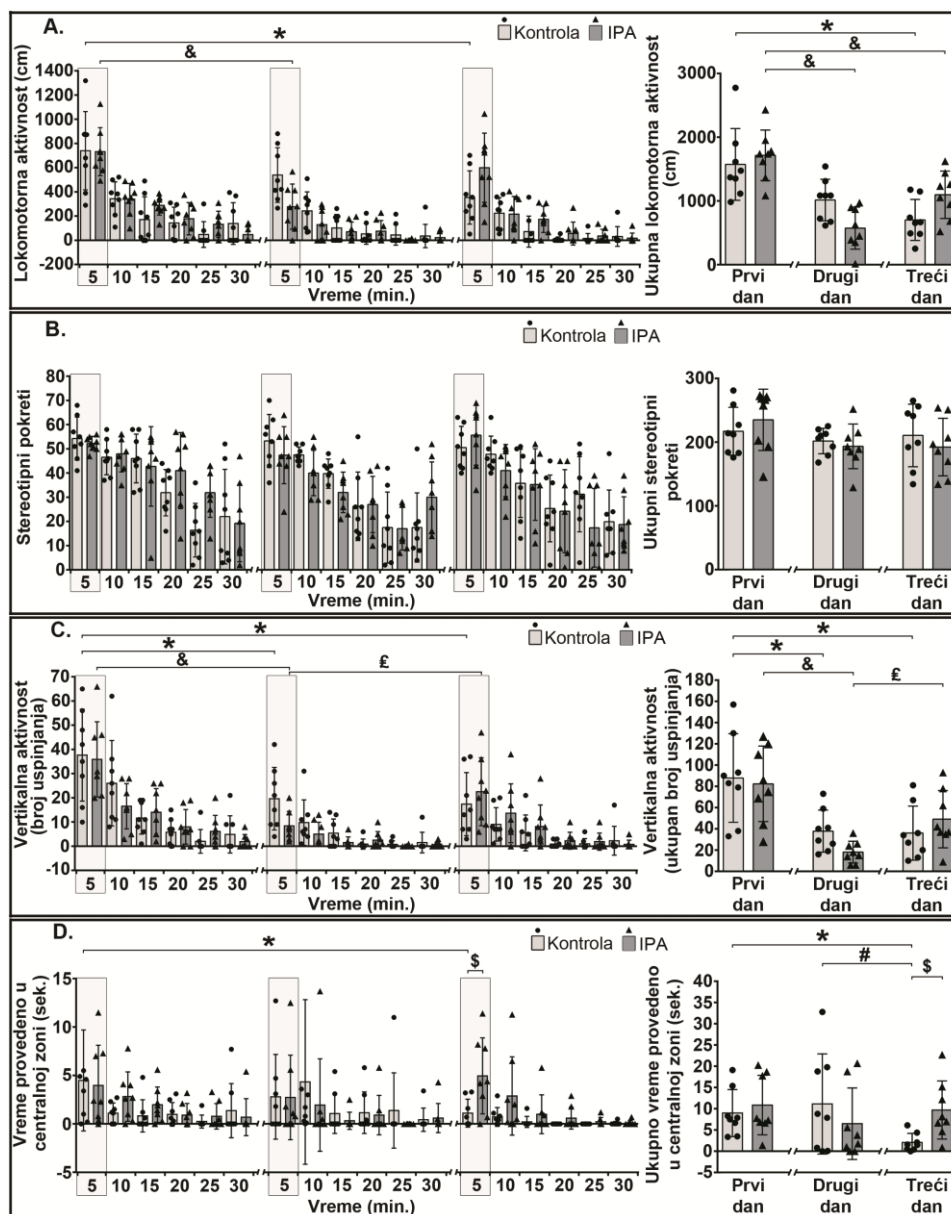
Grupa koja je bila izložena propofolskoj anesteziji je, u odnosu na aktivnost registrovanu prvog dana, značajan pad u vertikalnoj aktivnosti pokazala tokom drugog ali ne i tokom trećeg dana testiranja (slika 4.10C, levi i desni grafik, & $p < 0,05$). Aktivnost detektovana trećeg dana testiranja je bila značajno povećana u odnosu na drugi dan testiranja (slika 4.10C, levi i desni grafik, £ $p < 0,05$). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.10C.

4.10.4. Uticaj anestezije indukovane propofolom na vreme provedeno u centralnom delu arene

Grafički prikaz uticaja propofolske anestezije na vreme provedeno u centralnom delu arene tokom testa prostorne habituacije je prikazan na slici 4.10D. Statistička obrada podataka za navedeni parametar je pokazala da životinje kontrolne grupe značajno kraće borave u centralnim kvadratima tokom prvih 5 minuta i ukupnih 30 minuta tokom trećeg dana u odnosu na vreme provedeno prvog dana testiranja (slika 4.10D, * $p < 0,05$), ali ne i tokom drugog dana testiranja u poređenju sa prvim danom. Iako za prvih 5 minuta testiranja nema razlike u vremenu boravka kontrolnih životinja u centralnim kvadratima tokom trećeg dana u poređenju sa drugim danom, to nije slučaj sa ukupnim vremenom testiranja od 30 minuta, gde kontrole ipak kraće borave u centralnom delu arene tokom trećeg dana u poređenju sa drugim danom (Slika 4.10D, # $p < 0,05$). Tretman propofolom ipak nije uticao na vreme boravka u centralnom delu arene tokom prvih 5 minuta, kao ni tokom ukupnog registracionog perioda od 30 minuta kroz dane testiranja.

Za ispitivani parametar uporedna analiza podataka nije ukazala na značajne razlike za prvih 5 minuta i za ukupni registracioni period između kontrole i tretmana tokom prva dva dana testiranja. Trećeg dana testiranja, grupa izložena propofolskoj

anesteziji je provodila više vremena u centralnim kvadratima tokom prvih 5 minuta i tokom ukupnog registracionog perioda od 30 minuta u poređenju sa kontrolnom grupom (slika 4.10D, \$ $p < 0,05$). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.10D.



Slika 4.10. Uticaj propofolske anestezije na ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova u testu prostorne habituacije sa dugim trajanjem test sesija. Spontana lokomotorna (A), stereotipna (B) i vertikalna aktivnost (C), kao i vreme provedeno u centralnim kvadratima (D), su praćeni tokom 3 uzastopna dana testiranja (30 minuta testiranja po danu, sa retencionim intervalom od 24 sata). Izlaganje propofolskoj anesteziji (IPA) je usledilo odmah po okončanju prve faze testiranja (prvi dan). U isto vreme su kontrolne životinje primile adekvatnu količinu fiziološkog rastvora. Detaljna statistička analiza je izvršena na podacima dobijenim tokom prvih 5 minuta testiranja (period najintenzivnijeg istraživanja nove sredine) i za ukupno vreme

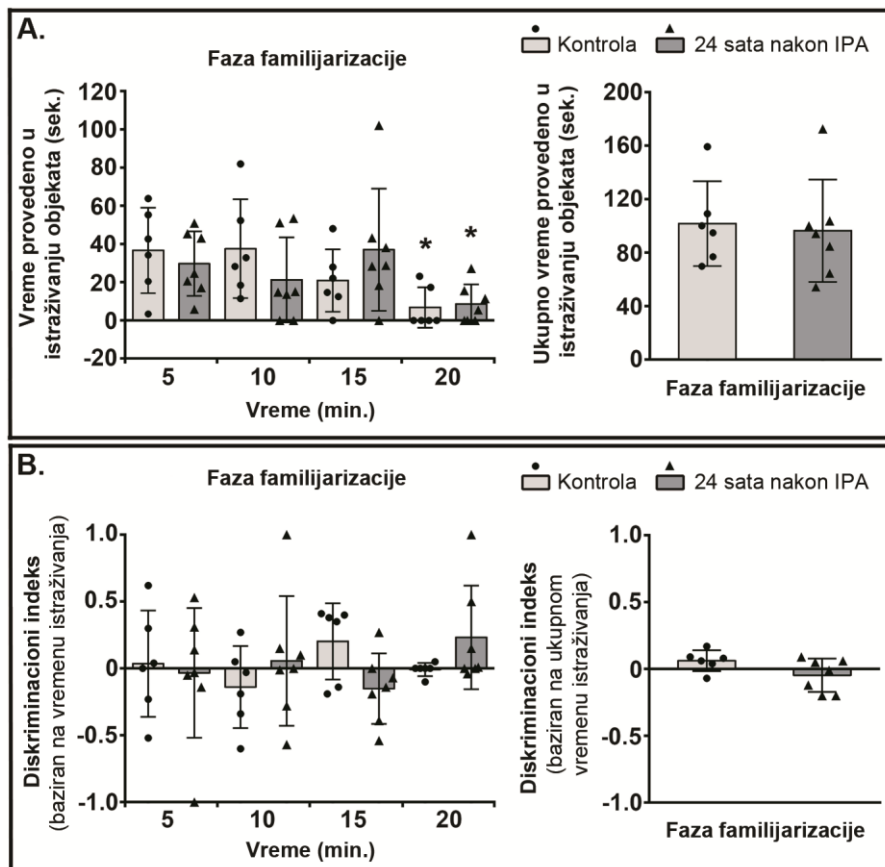
registrovanja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija sa individualnim vrednostima u okviru stubića ($n = 8$ životinja po grupi). * $p < 0,05$ u odnosu na prvi dan kontrolne grupe; & $p < 0,05$ u odnosu na prvi dan IPA grupe; # $p < 0,05$ u odnosu na drugi dan kontrolne grupe; £ $p < 0,05$ u odnosu na drugi dan IPA grupe; \$ $p < 0,05$ u odnosu na isti dan kontrolne grupe. Preuzeto iz (Pavkovic i sar., 2018).

4.11. Uticaj propofolske anestezije na ponašanje životinja u testu prepoznavanja novog objekta sa produženim trajanjem

Memorisanje objekta, koje se postiže tokom faze familijarizacije testa prepoznavanja novog objekta, u velikoj meri zavisi od aktivnosti hipokampusa (Cohen i Stackman, 2015). Za potrebe našeg eksperimenta formirali smo sopstveni protokol sa produženim i fiksnim trajanjem (20 minuta) svih faza testa prepoznavanja novog objekta, koji je zadržao sve potrebne uslove koji definišu validnost testa (Ennaceur, 2010). Detaljno je analiziran vremenski profil promena u istraživanju objekata (kako bi se ispitala promene u interesovanju za objekte tokom sesije) kao i ukupno vreme provedeno u istraživanju objekata, što je takođe izraženo i kroz diskriminacioni indeks (tj. preference objekata).

4.11.1. Karakterizacija ponašanja životinja za vreme faze familijarizacije

Analiza vremena provedenog u istraživanju objekata je ukazala na intenzivnu eksploratornu aktivnost mladih životinja tokom prvih 15 minuta familijarizacione faze testiranja, što je praćeno smanjenjem aktivnosti u narednih 5 minuta kod obe grupe, tj. kontrolne i grupe koja će biti izložena propofolu (slika 4.11A, levi grafik, * $p < 0,05$ u odnosu na prvih 5 minuta iste grupe). Nisu detektovane značajne promene u ukupnom vremenu (20 minuta) provedenom u ispitivanju objekata između kontrolne i tretirane (tada još uvek netretirane) grupe. Nije bilo preference levog ili desnog objekta (izraženo kroz diskriminacioni indeks) ni kod jedne grupe životinja (slika 4.11B), što je bio uslov da jedinke nastave dalje testiranje (tj. životinje kod kojih je uočena preferenca su isključene iz eksperimenta da bi ovaj uslov bio ispunjen). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.11(A i B).



Slika 4.11. Uticaj anestezije indukovane propofolom na vreme provedeno u istraživanju objekta i diskriminacioni indeks tokom faze familijarizacije u testu prepoznavanja novog objekta sa produženim trajanjem faza, kod peripubertetskih pacova. Vreme provedeno u istraživanju objekata (A) i diskriminacioni indeks (B) baziran na vremenu istraživanja objekata su prikazani za petominutni period u okviru familijarizacione faze (levi grafici, vremenski profil promena od interesa vezane za ispitivanje objekata) i za ukupno trajanje sesije od 20 minuta (desni grafici, ukupno vreme istraživanja). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija sa individualnim vrednostima u okviru stubića ($n = 6$ životinja u kontrolnoj grupi i 7 u grupi koja će biti izložena propofolskoj anesteziji (IPA) nakon faze familijarizacije). * $p < 0,05$ u odnosu na prvih pet minuta iste grupe. Preuzeto iz (Pavkovic i sar., 2018).

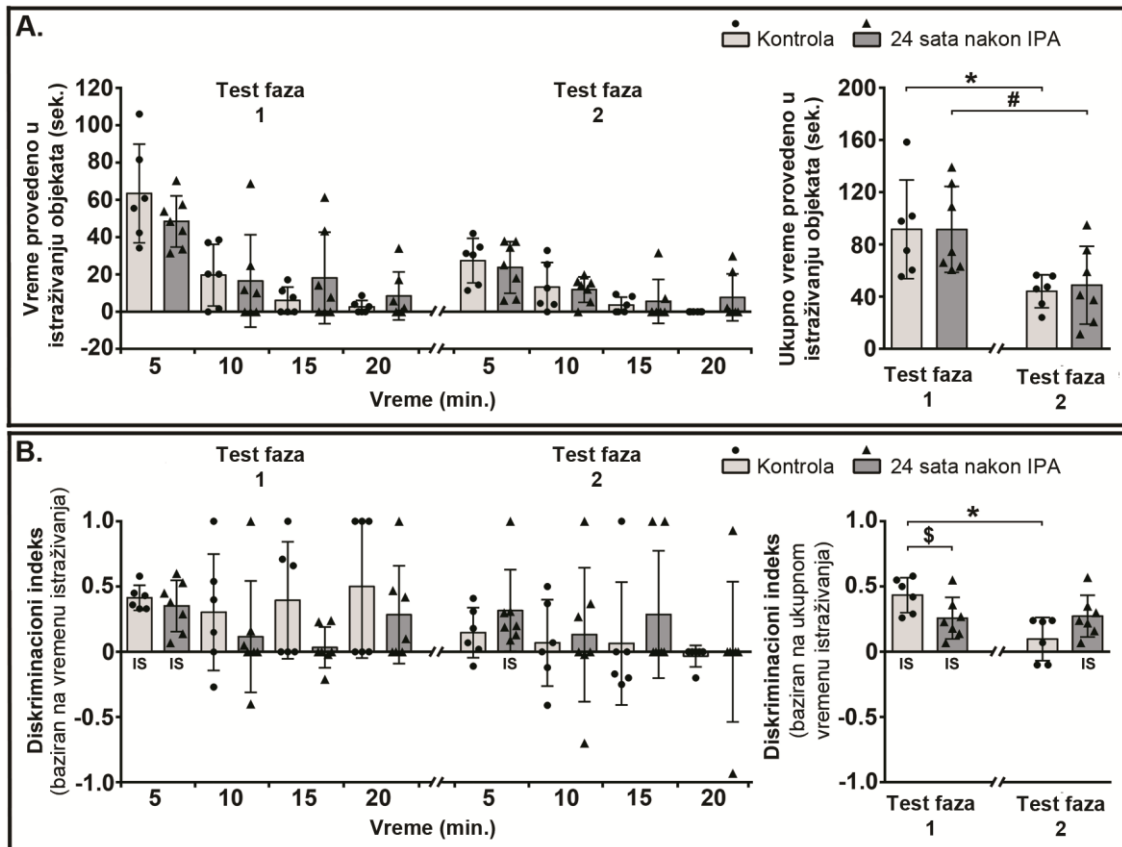
4.11.2. Uticaj propofolske anestezije na vreme potrebno za prepoznavanje novog objekta

U ovoj modifikovanoj verziji testa prepoznavanja novog objekta, koji osim familijarizacione ima i dve test faze, ponašanje životinja tokom test faze 1 odražava prepoznavanje i eksploraciju/istraživanje novine (učenje novine tokom prisećanja), dok ponašanje životinja tokom test faze 2 odražava reakciju životinja na prethodno upoznatu novinu.

Na osnovu vremenskog profila promena u eksploratornoj aktivnosti se može uočiti da je tokom test faze 1 eksploratorna aktivnost obe grupe (kontrolne i tretirane) bila najintenzivnija tokom prvih 5 minuta, sa tendencijom smanjenja nakon tog vremenskog intervala (slika 4.12, levi grafik); tokom test faze 2 eksploratorna aktivnost obe grupe životinja jenjava nakon inicijalnih 10 minuta (slika 4.12, levi grafik). Obračunat kao ukupno vreme provedeno u istraživanju objekata (tokom čitavih 20 min testiranja; slika 4.12A, desni grafik) ovaj parametar je ukazao da kod obe ispitivane grupe životinja dolazi do pada eksploratorne aktivnosti u test fazi 2 u odnosu na test fazu 1 (slika 4.12A, desni grafik, * $p < 0,05$ u odnosu na test fazu 1 kontrolne grupe, # $p < 0,05$ u odnosu na test fazu 1 IPA grupe). Ovakvi rezultati su ukazali da tretman propofolom ne utiče značajno na ukupno vreme provedeno u istraživanju objekata i ne menja pravilnost ovog parametra tokom test faza.

Diskriminacioni indeks (slika 4.12B) je ukazao da je zainteresovanost za objekte tokom test faze 1 bila slična i kod kontrolne i anestezirane grupe, jer je ovaj parametar kod obe grupe bio značajno iznad nule u prvih 5 minuta test faze 1 (slika 4.12B, levi grafik, predstavljeno oznakom IS ispod stubića). Diskriminacioni indeks baziran na ukupnom vremenu istraživanja (slika 4.12B, desni grafik) je ukazivao na preferencu (tj. bio je značajno iznad nule, označeno na grafikonu kao IS) u obe grupe, iako značajno niži u propofolskoj grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (slika 4.12B, desni grafik, \$ $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu tokom iste faze). Tokom test faze 2, diskriminacioni indeks je u kontrolnoj grupi bio u okviru granica slučajnosti tokom svih analiziranih vremenskih tačaka, kao i tokom ukupnog vremena istraživanja, dok je u propofolskoj grupi još uvek bio značajno iznad nule i to tokom prvih 5 minuta i tokom ukupnog vremena testiranja (označeno na grafikonu kao IS). U kontrolnoj grupi je diskriminacioni indeks, izračunat na osnovu ukupnog vremena istraživanja, bio značajno manji u test fazi 2 nego u test fazi 1 (slika 4.12B, desni grafik, * $p < 0,05$), što u propofolskoj grupi nije detektovano.

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.12(A i B).

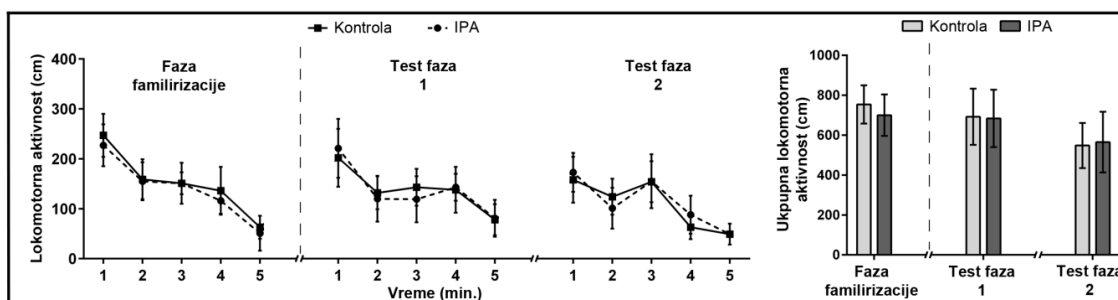


Slika 4.12. Uticaj anestezije indukovane propofolom na vreme provedeno u istraživanju objekata (A) i diskriminacioni indeks (B) u testu prepoznavanja novog objekta sa produženim trajanjem faza, kod peripubertetskih pacova. Parametri su prikazani za petominutne periode u okviru test faza 1 i 2 (levi grafici, vremenski profil promena od interesa vezane za ispitivanje objekata) kao i za ukupno trajanje sesija od po 20 minuta (desni grafici). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (za 6 životinja u kontrolnoj grupi i 7 u grupi izloženoj propofolskoj anesteziji (IPA)). * $p < 0,05$ u odnosu na test fazu 1 kontrolne grupe; # $p < 0,05$ u odnosu na test fazu 1 IPA grupe; \$ $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu tokom iste faze. Oznaka IS ispod stubića ukazuje da je diskriminacioni indeks bio značajno iznad nule (DI = 0,0). Preuzeto iz (Pavkovic i sar., 2018).

4.11.3. Istraživanje test arene pred početak svake faze testa prepoznavanja novog objekta

Na slici 4.13 je dat prikaz lokomotorne aktivnosti kontrolnih životinja i jedinki izloženih propofolskoj anesteziji, koja je izmerena u eksperimentalnim kavezima pre svake od 3 faze testa prepoznavanja novog objekta. Dobijeni rezultati pokazuju da izlaganje peripubertetskih pacova propofolu ne utiče na istraživanje arene u kojoj se postavljaju predmeti, ukoliko su životinje prethodno habituirane na istu test arenu (trodnevna habituacija pred test prostorne habituacije).

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.13.



Slika 4.13. Lokomotorna aktivnost pacova u praznoj areni automatski zabeležena na početku svake faze kao indikator stabilnosti prostorne memorije. Životinje su tokom tri uzastupna dana (30 minuta po danu), pred test prepoznavanja novog objekta, habituirane na prazan ogledni kavez. Tokom testa prepoznavanja novog objekta su na početku svake faze izlagane praznoj areni u trajanju od 5 minuta. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

4.12. Ekspresija BDNF, TrkB, Erg-1, CaMKII α i ERK1/2 proteina u dorzalnom hipokampusu peripubertetskih pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji

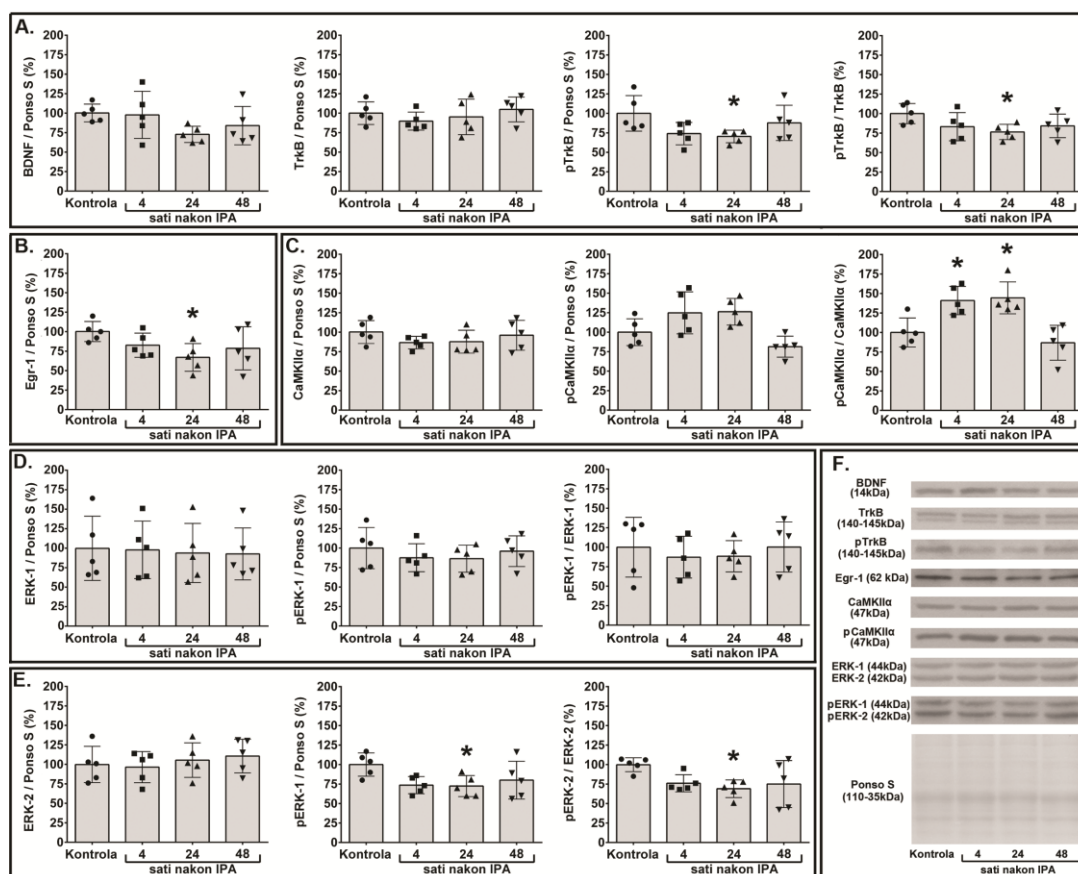
Izlaganje peripubertetskih pacova propofolskoj anesteziji nije statistički značajno uticala na ekspresiju BDNF proteina ni u jednoj vremenskoj tački nakon tretmana (slika 4.14A). Izlaganje propofolskoj anesteziji nije uticalo na ekspresiju ukupne forme TrkB (slika 4.14A, drugi grafik). Međutim, značajno smanjenje nivoa fosforilisane forme TrkB proteina je detektovano 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (slika 4.14A, treći grafik, * $p < 0,05$), a u istoj vremenskoj tački je zabeleženo i smanjenje odnosa fosforilisana / ukupna forma TrkB receptora (slika 4.14A, četvrti grafik, * $p < 0,05$).

Uočeno je statistički značajno smanjenje nivoa Egr-1 proteina u dorzalnom hipokampusu kod peripubertetskih pacova 24 sata nakon izlaganja propofolu (slika 4.14B).

Nisu uočene promene u ekspresiji fosforilisane i ukupne forme CaMKII α , ali je njihov odnos bio značajno povećan 4 i 24 sata nakon tretmana (slika 4.14D, treći grafik, * $p < 0,05$).

U poređenju sa kontrolom izlaganje propofolskoj anesteziji nije značajnije uticalo na ekspresiju ukupne (slika 4.14D, prvi grafik) i fosforilisane forme ERK1 (slika 4.14D, drugi grafik), kao ni na odnos fosforilisana / ukupna forma (slika 4.14D, treći grafik). Ekspresija ukupnog ERK2 proteina se takođe nije menjala nakon tretmana (slika 4.14E, prvi grafik), dok je ekspresija fosforilisane forme bila znatno snižena 24 sata nakon propofolske anestezije (slika 4.14E, drugi grafik, * $p < 0,05$). Nivo fosforilisane forme u odnosu na ukupnu formu ERK2 proteina je takođe bio značajno snižen 24 sata nakon izlaganja anesteziji (slika 4.14E, treći grafik, * $p < 0,05$).

Svi rezultati su ilustrovani reprezentativnim imunoblotovima (slika 4.14F). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.14(A-E).

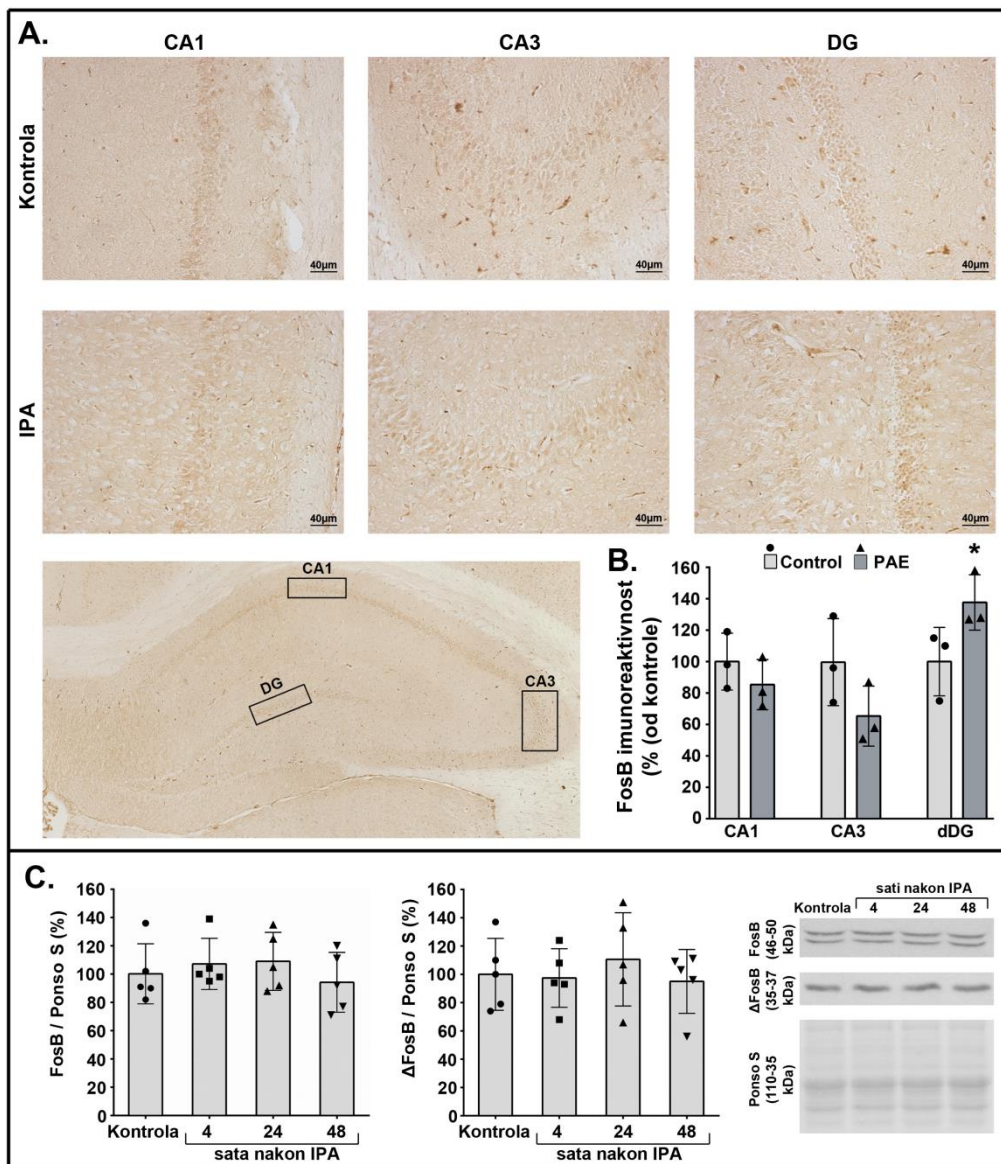


Slika 4.14. Promene u nivou BDNF (A), TrkB (A), Egr-1 (B), CaMKIIα (C), ERK-1 (D) i ERK-2 (E) proteina u dorzalnom hipokampusu peripubertetskih mužjaka pacova 4, 24 i 48 sati nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (IPA). Rezultati su dobijeni Western blot metodom. Relativne vrednosti nivoa proteina su dobijene semikvantitativnom analizom imunoblotova, u odnosu na Ponso S bojenje koje je služilo kao kontrola nanošenja uzorka. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 5 životinja po grupi) u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzoraka (0 sati), koji je arbitrarno označen kao 100%. Za određivanje odnosa između fosforilisane i ukupne forme proteina bile su neophodne dve

membrane sa dva paralelno dobijena gela. Membrane su izložene inkubaciji sa primarnim antitelima za fosforilisanu ili ukupnu formu proteina, a dobijeni signali su kvantifikovani u odnosu na interni standard. Dobijeni podaci su korišćeni za dalje izračunavanje odnosa fosforilisana / ukupna forma proteina. Na panelu F prikazani su reprezentativni blotovi za sve analizirane proteine i membrana obojena Ponso S bojom (interni standard). * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom. Preuzeto iz (Pavkovic i sar., 2018).

4.13. Promene u ekspresiji FosB/ Δ FosB proteina u dorzalnog hipokampusu peripubertetskih mužjaka pacova nakon izlaganja propofolskoj anesteziji

Opšta anestezija indukovana propofolom je izazvala suptilne subregionalno – specifične promene u ekspresiji FosB/ Δ FosB proteina, biohemijskog indikatora neuronske aktivnosti, u okviru sloja piramidalnih ćelija CA1 i CA3 i sloja granularnih ćelija dorzalnog DG-a (slika 4.15). Intenzitet FosB/ Δ FosB imunobojenja u okviru CA1 regiona se nije razlikovao između kontrolne i tretirane grupe (slika 4.15B), dok je izražen trend smanjenja FosB/ Δ FosB imunobojenja u CA3 regionu (slika 4.15B) bio praćen značajno pojačanim imunobojenjem u dorzalnog DG nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (slika 4.15B, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Western blot analizom nisu zabeležene značajne razlike u ekspresiji FosB (slika 4.15C) i Δ FosB proteina (slika 4.15C) u ispitivanom postanestetskom periodu u dorzalnog hipokampusu (koji je u ovoj metodi analiziran u celini). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 2, deo 4.15(B i C).



Slika 4.15. Promene u ekspresiji FosB/ Δ FosB proteina su detektovane nakon imunohistohemijske analize u subregionima hipokampusa. Reprezentativne fotomikrografije CA1, CA3 i dentatnog girusa (DG), kao i fotografija hipokampusa na kojoj je obeležen položaj svakog subregiona obuhvaćen kvantifikacijom (B). Grafički prikaz rezultata dobijenih nakon kvantifikacije u Image J programu. Položaj različitih subregiona hipokampusa u okviru kojih je ispitivana imunoreaktivnost FosB/ Δ FosB proteina kod kontrolne grupe i grupe izložene propofolskoj anesteziji (24 sata od injeciranja) je određen na osnovu koordinata iz atlasa adultnog mozga pacova (-2,6 do -3,6 mm od bregme, Paxinos i Watson, 2005). (C) Ekspresija FosB i Δ FosB proteina u dorzalnog hipokampusu analizirana Western blot metodom; rezultati kvantifikacija su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i dodatno su prikazani reprezentativni blotovi i membrana obojena Ponso S bojom (interni standard). * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu. Skala 40 μ m. Preuzeto iz (Pavkovic i sar., 2018).

Tabela 2. Sumarni prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka, dobijenih parametra i broja korišćenih životinja (n), vezanih za drugu tematsku celinu rada (4.10. – 4.15.). Analizom su obuhvaćene kontrolne i životinje izložene propofolskoj anesteziji (IPA), ispitivane u različitim vremenskim tačkama nakon tretmana (4, 24 i 48 sati).

Slika	4.10. Test prostorne habituacije (n=8 po grupi)				
4.10A Lokomotorna aktivnost	Dvofaktorska ANOVA Prvih 5 minuta IPA: $F_{(1,14)} = 0,011$; $p = 0,917$ vreme: $F_{(2,28)} = 8,214$; $p = 0,002$ IPA x vreme: $F_{(2,28)} = 4,427$; $p = 0,021$ Ukupno vreme (30 minuta) IPA: $F_{(1,14)} = 0,085$; $p = 0,774$ vreme: $F_{(2,28)} = 21,303$; $p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(2,28)} = 4,556$; $p = 0,019$	Tukey HSD		Prvih 5 min.	Ukupno vreme (30 min.)
		IPA vs. Kontrola	1. dan	$p = 1,000$	$p = 0,971$
			2. dan	$p = 0,352$	$p = 0,244$
			3. dan	$p = 0,414$	$p = 0,346$
		Između dana: Kontrola	2. dan vs. 1. dan	$p = 0,566$	$p = 0,091$
			3. dan vs. 1. dan	$p = 0,036$	$p = 0,002$
			2. dan vs. 3. dan	$p = 0,644$	$p = 0,631$
		Između dana: IPA	2. dan vs. 1. dan	$p = 0,009$	$p < 0,001$
			3. dan vs. 1. dan	$p = 0,877$	$p = 0,047$
			3. dan vs. 2. dan	$p = 0,114$	$p = 0,130$
4.10B Stereotipna aktivnost	Dvofaktorska ANOVA Prvih 5 minuta IPA: $F_{(1,14)} = 0,064$; $p = 0,804$ vreme: $F_{(2,28)} = 0,661$; $p = 0,524$ IPA x vreme: $F_{(2,28)} = 1,903$; $p = 0,167$ Ukupno vreme (30 minuta) IPA: $F_{(1,14)} = 0,053$; $p = 0,820$ vreme: $F_{(2,28)} = 2,500$; $p = 0,100$ IPA x vreme: $F_{(2,28)} = 0,921$; $p = 0,409$	post-hoc vrednosti nisu prikazane, zbog toga što analiza ANOVA testom nije ukazala na značajne razlike			
		Tukey HSD		Prvih 5 min.	Ukupno vreme (30 min.)
		IPA vs. Kontrola	1. dan	$p = 1,000$	$p = 0,999$
			2. dan	$p = 0,656$	$p = 0,337$
			3. dan	$p = 0,983$	$p = 0,922$
		Između dana: Kontrola	2. dan vs. 1. dan	$p = 0,048$	$p = 0,049$
			3. dan vs. 1. dan	$p = 0,014$	$p = 0,013$
			3. dan vs. 2. dan	$p = 0,994$	$p = 0,992$
		Između dana: IPA	2. dan vs. 1. dan	$p < 0,001$	$p < 0,001$
			3. dan vs. 1. dan	$p = 0,193$	$p = 0,297$
3. dan vs. 2. dan	$p = 0,038$		$p = 0,015$		
4.10C Vertikalna aktivnost	Dvofaktorska ANOVA Prvih 5 minuta IPA: $F_{(1,14)} = 0,281$; $p = 0,604$ vreme: $F_{(2,28)} = 19,596$; $p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(2,28)} = 3,602$; $p = 0,041$ Ukupno vreme (30 minuta) IPA: $F_{(1,14)} = 0,554$; $p = 0,469$ vreme: $F_{(2,28)} = 19,870$; $p < 0,001$ IPA x vreme: $F_{(2,28)} = 4,384$; $p = 0,022$	Tukey HSD		Prvih 5 min.	Ukupno vreme (30 min.)
		IPA vs. Kontrola	1. dan	$p = 1,000$	$p = 0,999$
			2. dan	$p = 0,656$	$p = 0,337$
			3. dan	$p = 0,983$	$p = 0,922$
		Između dana: Kontrola	2. dan vs. 1. dan	$p = 0,048$	$p = 0,049$
			3. dan vs. 1. dan	$p = 0,014$	$p = 0,013$
			3. dan vs. 2. dan	$p = 0,994$	$p = 0,992$
		Između dana: IPA	2. dan vs. 1. dan	$p < 0,001$	$p < 0,001$
			3. dan vs. 1. dan	$p = 0,193$	$p = 0,297$
			3. dan vs. 2. dan	$p = 0,038$	$p = 0,015$
4.10D Vreme provedeno u centralnim kvadratima	Mann-Whitney U test Prvih 5 minuta Kontrola: $\chi^2(2, N = 8) = 6,276$; $p < 0,043$ IPA: $\chi^2(2, N = 8) = 3,161$; $p < 0,206$ Ukupno vreme (30 minuta) Kontrola: $\chi^2(2, N = 8) = 6,750$; $p < 0,034$ IPA: $\chi^2(2, N = 8) = 0,750$; $p < 0,687$	Mann-Whitney U test		Prvih 5 min.	Ukupno vreme (30 min.)
		IPA vs. Kontrola	1. dan	$p = 0,958$	$p = 0,793$
			2. dan	$p = 0,958$	$p = 0,563$
			3. dan	$p = 0,031$	$p = 0,006$
		Između dana: Kontrola	2. dan vs. 1. dan	$p = 0,327$	$p = 0,575$
			3. dan vs. 1. dan	$p = 0,025$	$p = 0,017$
	3. dan vs. 2. dan		$p = 0,345$	$p = 0,035$	
	Između dana: IPA	2. dan vs. 1. dan	$p = 0,401$	$p = 0,207$	
		3. dan vs. 1. dan	$p = 0,401$	$p = 0,674$	
		3. dan vs. 2. dan	$p = 0,176$	$p = 0,483$	
Friedman test (ponovljena merenja, testiranje kroz dane)	Wilcoxon test		Prvih 5 min.	Ukupno vreme (30 min.)	
4.11. - 4.13. Test prepoznavanja novog objekta (Kontrola n=6, IPA n=7)					
4.11A Vreme provedeno u istaživanju objekata tokom faze familijarizacije	Levi grafik (intervali od 5 minuta)	Mann-Whitney U test (IPA vs. Kontrola)	vrednosti nisu prikazane, zbog toga što analiza nije ukazala na značajne razlike		
		Wilcoxon test	značajnost $p < 0,05$ samo između poslednjih i prvih 5 minuta i kontrolne i IPA grupe		
	Desni grafik (ukupno vreme od 20 minuta)	Mann-Whitney U test (IPA vs. Kontrola)	vrednosti nisu prikazane, zbog toga što analize nisu ukazale na značajne razlike		
		Wilcoxon test			

4.12A Vreme provedeno u istaživanju objekata tokom test faza	Levi grafik (intervali od 5 minuta)	<i>Mann-Whitney U test</i> (IPA vs. Kontrola)	Test faza 1	5 min. $p = 0,253$	10 min. $p = 0,432$	15 min. $p = 0,520$	20 min. $p = 0,617$	
			Test faza 2	$p = 0,668$	$p = 0,830$	$p = 0,617$	$p = 0,199$	
	Desni grafik (ukupno vreme od 20 minuta)	<i>Mann-Whitney U test</i> (IPA vs. Kontrola)	Test faza 1	$p = 0,775$				
			Test faza 2	$p = 0,886$				
		<i>Wilcoxon test</i> (Test faza 2 vs. Test faza 1)	Kontrola	$p = 0,027$				
IPA			$p = 0,043$					
4.12.B Indeks diskriminacije, baziran na vremenu istaživanja tokom test faza	Levi grafik (intervali od 5 minuta)	<i>Mann-Whitney U test</i> (IPA vs. Kontrola)	Test faza 1	5 min. $p = 0,668$	10 min. $p = 0,391$	15 min. $p = 0,133$	20 min. $p = 0,668$	
			Test faza 2	$p = 0,317$	$p = 1,000$	$p = 0,153$	$p = 0,721$	
			<i>One sample t test</i> (vs. chance performance, i.e. $DI = 0,0$)	Test faza 1	Kontrola	$p < 0,001$	$p = 0,156$	$p = 0,082$
		IPA			$p = 0,003$	$p = 0,482$	$p = 0,635$	$p = 0,092$
		Test faza 2		Kontrola	$p = 0,119$	$p = 0,638$	$p = 0,765$	$p = 0,977$
				IPA	$p = 0,037$	$p = 0,519$	$p = 0,158$	$p = 1,000$
	Desni grafik (ukupno vreme od 20) minuta)	<i>Mann-Whitney U test</i> (IPA vs. Kontrola)	Test faza 1	$p = 0,046$				
			Test faza 2	$p = 0,189$				
		<i>Wilcoxon test</i> (Test faza 2 vs. Test faza 1)	Kontrola	$p = 0,028$				
			IPA	$p = 0,866$				
		<i>One sample t test</i> (vs. chance performance, i.e. $DI = 0,0$)	Kontrola	Test faza 1	$p < 0,001$			
				Test faza 2	$p = 0,212$			
IPA	Test faza 1		$p = 0,005$					
	Test faza 2		$p = 0,004$					
4.13 Prostorna habituacija tokom 5 minuta na početku svake faze	<i>Dvofaktorska ANOVA (ponovljena merenja)</i> IPA: $F_{(1, 11)} = 0,017; p = 0,897$ vreme: $F_{(1, 11)} = 1,049; p = 0,367$ IPA x vreme: $F_{(1, 11)} = 0,042; p = 0,959$			post-hoc vrednosti nisu prikazane, zbog toga što analiza ANOVA testom nije ukazala na značajne razlike				

4.14. Western blot (n=5 po grupi)

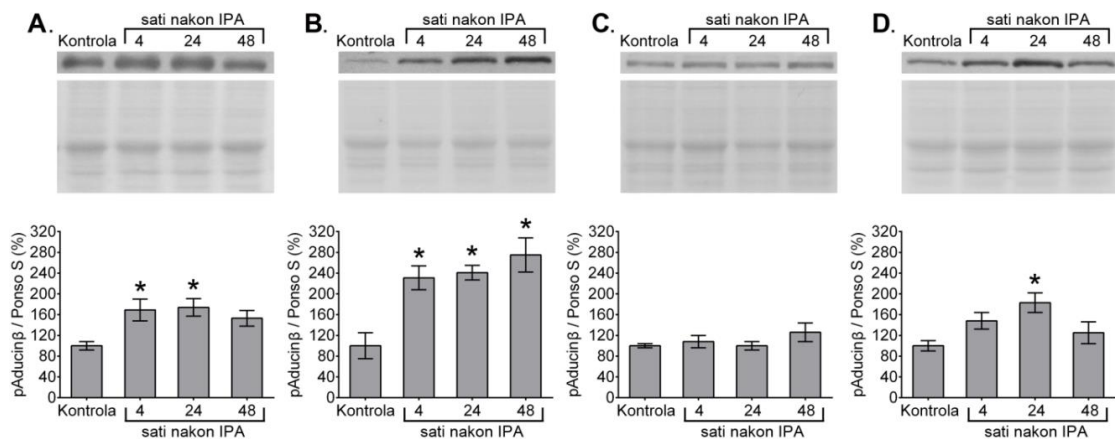
	Statistička analiza	Post hoc test	4 sata nakon IPA	24 sata nakon IPA	48 sati nakon IPA
4.14A. BDNF (prvi grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3, 16)} = 2,864, p = 0,082$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,968$	$p = 0,058$	$p = 0,278$
TrkB (drugi grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3, 16)} = 0,748, p = 0,539$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,664$	$p = 0,937$	$p = 0,936$
pTrkB ^{Y816} (treći grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3, 16)} = 2,887, p = 0,068$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,087$	$p = 0,047$	$p = 0,596$
pTrkB ^{Y816} / TrkB (četvrti grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3, 16)} = 2,438, p = 0,102$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,201$	$p = 0,047$	$p = 0,222$
4.14B. Egr-1	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3, 16)} = 2,481, p = 0,098$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,383$	$p = 0,041$	$p = 0,235$

4.14C. CaMKIIα (prvi grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 0,986, p = 0,424$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,375$	$p = 0,417$	$p = 0,954$
pCaMKIIα^{Thr286} (drugi grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 6,248, p = 0,005$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,142$	$p = 0,113$	$p = 0,322$
pCaMKIIα^{Thr286}/CaMKIIα (treći grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 10,568, p < 0,001$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,013$	$p = 0,008$	$p = 0,607$
4.14D. ERK1 (prvi grafik)	<i>Kruskal-Wallis ANOVA</i> $H(3, N = 20) = 0,428, p = 0,934$	<i>Mann-Whitney U test</i>	$p = 0,754$	$p = 0,464$	$p = 0,754$
pERK1 (drugi grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 0,497, p = 0,689$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,676$	$p = 0,611$	$p = 0,980$
pERK1/ERK1 (treći grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 0,227, p = 0,876$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,873$	$p = 0,895$	$p = 0,895$
4.14E ERK2 (prvi grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 0,404, p = 0,752$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,990$	$p = 0,957$	$p = 0,776$
pERK2 (drugi grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 2,955, p = 0,064$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,057$	$p = 0,047$	$p = 0,179$
pERK2/ERK2 (treći grafik)	<i>jednofaktorska ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 3,034, p = 0,059;$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,116$	$p = 0,033$	$p = 0,100$
4.15. Imunohistohemija (n=3 po grupi)					
4.15B. IHH (n=3 po grupi)			CA1	CA3	DG
Ekspresija FosB/ΔFosB 24 sata nakon IPA	<i>Mann-Whitney U test</i>	IPA vs. Kontrola	$p = 0,275$	$p = 0,074$	$p = 0,049$
4.15C. Western blot (n=5 po grupi)	<i>one-way ANOVA</i>	<i>Post hoc test</i>	4 sata nakon IPA	24 sata nakon IPA	48 sati nakon IPA
FosB (prvi grafik)	$F_{(3,16)} = 0,586, p = 0,632$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,891$	$p = 0,836$	$p = 0,930$
ΔFosB (drugi grafik)	<i>one-way ANOVA</i> $F_{(3,16)} = 0,353, p = 0,787$	<i>Dunnnett test</i>	$p = 0,996$	$p = 0,855$	$p = 0,981$

4.14. Ekspresija proteina Aducin β u medijalnom prefrontalnom korteksu, strijatumu, talamusu i hipokampusu peripubertetskih pacova.

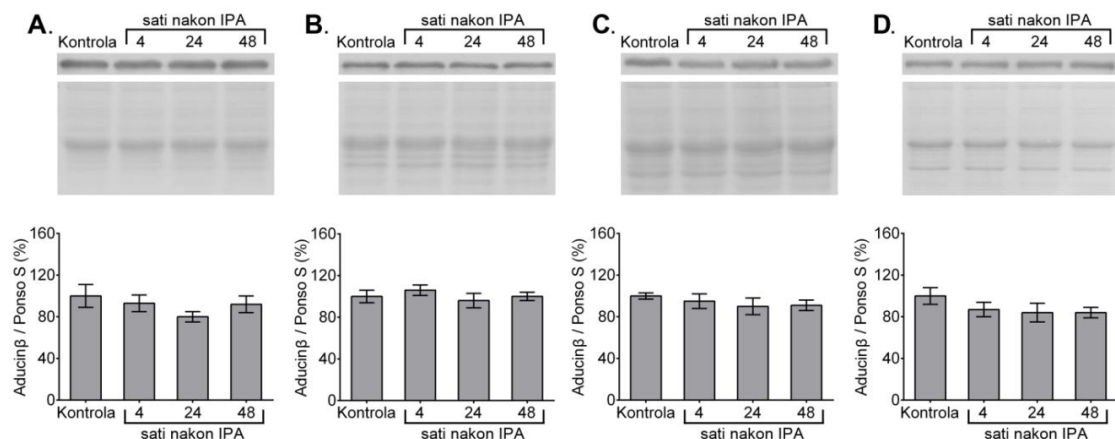
Statistički značajna povećanja u ekspresiji fosforilisane forme Aducin β proteina su detektovana u mPFK-u 4 i 24 sata nakon tretmana (slika 4.16A, * $p < 0,05$), u strijatumu 4, 24 i 48 sati nakon tretmana (slika 4.16B, * $p < 0,05$), u hipokampusu 24 sata nakon tretmana (slika 4.16D, * $p < 0,05$). U talamusu nisu zabeležene statistički značajne promene ni u jednoj analiziranoj vremenskoj tački nakon tretmana propofolom (slika 4.16C).

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 3, deo 4.16(A-D).



Slika 4.16. Ekspresija fosforilisanе forme proteina Aducinβ u korteksu (A), strijatumu (B), talamusu (C) i hipokampusu (D), 4, 24 i 48 sati nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (IPA). Relativne vrednosti nivoa proteina su dobijene semikvantitativnom analizom imunoblotova, u odnosu na Ponso S bojenje koje je služilo kao kontrola nanošenja uzorka. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolu ± standardna greška. Za svaku strukturu je prikazan reprezentativni blot sa trakom koja po težini odgovara Aducinβ proteinu (115 kDa) i internom kontrolom (Ponso S, 110-35 kDa). * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom.

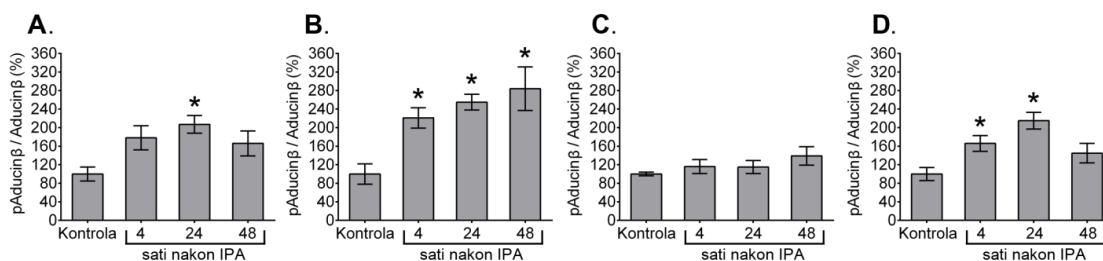
Nije zabeležena statistički značajna razlika u nivou Aducinβ proteina nakon izlaganja propofolu ni u jednoj od ispitivanih struktura (slika 4.17A – korteks, slika 4.17B – strijatum, slika 4.17C – talamus, slika 4.19D – hipokampus). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 3, deo 4.17(A-D).



Slika 4.17. Ekspresija Aducinβ proteina u korteksu (A), strijatumu (B), talamusu (C) i hipokampusu (D), 4, 24 i 48 sati nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (IPA). Relativne vrednosti nivoa proteina su dobijene semikvantitativnom analizom imunoblotova, u odnosu na Ponso S bojenje koje je služilo kao kontrola nanošenja uzorka. Rezultati su izraženi kao procenat (%) promene u odnosu na kontrolu ± standardna greška. Za svaku strukturu je prikazan

reprezentativni blot sa trakom koja po težini odgovara Aducin β proteinu (115 kDa) i internom kontrolom (Ponso S, 110-35 kDa). * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom.

U poređenju sa kontrolnim vrednostima značajno povećanje ekspresije fosforilisane forme Aducin β proteina u odnosu na ukupnu formu ovog proteina je detektovan 4 sata nakon tretmana u mPFC-u (slika 4.18A, * $p < 0,05$), 4, 24 i 48 sati nakon tretmana u strijatumu (slika 4.18B, * $p < 0,05$), 4 i 24 sata nakon tretmana u hipokampusu (slika 4.18D, * $p < 0,05$). U talamusu nisu zabeležene statistički značajne promene ni u jednoj analiziranoj vremenskoj tački nakon tretmana (slika 4.18C). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, je predstavljen u tabeli 3, 4.18(A-D).



Slika 4.18. Relativni odnos između fosforilisane i ukupne forme Aducin β proteina u korteksu (A), strijatumu (B), talamusu (C) i hipokampusu (D), 4, 24 i 48 sati nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (IPA). Za određivanje odnosa između fosforilisane i ukupne forme proteina bile su neophodne dve membrane sa dva paralelno dobijena gela. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima za fosforilisanu ili ukupnu formu proteina, a dobijeni signali su kvantifikovani u odnosu na interni standard. Dobijeni podaci su korišćeni za dalje izračunavanje odnosa fosforilisanu / ukupna forma proteina. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška ($n = 5$ životinja po grupi) u odnosu na optičku gustinu kontrolnog uzorka (0 sati), koji je arbitrarno označen kao 100%. * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom.

Tabela 3. Sumarni prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka, dobijenih parametara i broja korišćenih životinja (n), vezanih za treću tematsku celinu rada (4.16. – 4.18.). Analizom su obuhvaćene kontrolne i životinje izložene propofolskoj anesteziji (IPA), ispitivane u različitim vremenskim tačkama nakon tretmana (4, 24 i 48 sati).

4.16. - 4.18. Western blot (n=5 po grupi)					
Slika	<i>jednofaktorska ANOVA</i>	<i>Post hoc test</i>	4 sata nakon IPA vs. Kontrola	24 sata nakon IPA vs. Kontrola	48 sati nakon IPA vs. Kontrola
4.16A pAdducinβ (Korteks)	$F_{(3, 16)} = 4,577; p = 0,017$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,019$	$p = 0,012$	$p = 0,073$
4.16B pAdducinβ (Strijatum)	$F_{(3, 16)} = 9,987; p < 0,001$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,004$	$p = 0,002$	$p < 0,001$
4.16C pAdducinβ (Talamus)	$F_{(3, 16)} = 1,135; p = 0,365$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,929$	$p = 1,000$	$p = 0,285$
4.16D pAdducinβ (Hipokampus)	$F_{(3, 16)} = 4,172; p = 0,023$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,156$	$p = 0,010$	$p = 0,608$
4.17A Adducinβ (Korteks)	$F_{(3, 16)} = 1,019; p = 0,409$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,897$	$p = 0,243$	$p = 0,847$
4.17B Adducinβ (Strijatum)	$F_{(3, 16)} = 0,454; p = 0,718$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,823$	$p = 0,946$	$p = 1,000$
4.17C Adducinβ (Talamus)	$F_{(3, 16)} = 0,591; p = 0,630$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,881$	$p = 0,498$	$p = 0,599$
4.17D Adducinβ (Hipokampus)	$F_{(3, 16)} = 1,082; p = 0,385$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,513$	$p = 0,310$	$p = 0,313$
4.18A pAducinβ / Aducinβ (Korteks)	$F_{(3, 16)} = 4,114; p = 0,024$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,064$	$p = 0,010$	$p = 0,124$
4.18B pAducinβ / Aducinβ (Strijatum)	$F_{(3, 16)} = 7,573; p = 0,002$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,026$	$p = 0,005$	$p = 0,001$
4.18C pAducinβ / Aducinβ (Talamus)	$F_{(3, 16)} = 1,305; p = 0,307$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,767$	$p = 0,811$	$p = 0,163$
4.18D pAducinβ / Aducinβ (Hipokampus)	$F_{(3, 16)} = 7,248; p = 0,003$	<i>Dunnett test</i>	$p = 0,045$	$p = 0,001$	$p = 0,207$

5. DISKUSIJA

5.1. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva molekulske i promene u ponašanju koje su odlika dejstva adiktivnih supstanci

Poznato je da se tokom adolescencije javlja širok dijapazon bihevioralnih odlika karakterističnih prvenstveno za ovaj period ontogenetskog razvića, među kojima su izraženije preuzimanje rizika, povećana socijalna interakcija i intenzivnije sticanje veština (Spear, 2000). Dok se preuzimanje rizika povezuje sa negativnim ishodom, ovaj vid ponašanja može se povezati sa sticanjem samopouzdanja (Wahlstrom i sar., 2010). U prirodnim uslovima izraženija eksploracija i traženje novine umanjuju mogućnost ukrštanja u srodstvu i podstiču istraživanje udaljenih izvora hrane, skloništa, potencijalnih partnera i drugih resursa koji mogu povećati verovatnoću preživljavanja. U humanoj populaciji sklonost ka rizičnom ponašanju povećava i verovatnoću upotrebe droga, usled povećane osetljivosti adolescentnog dopaminskog sistema na adiktivne supstance (Tirelli i sar., 2003).

Sadašnja saznanja uglavnom naglašavaju neurotoksični potencijal anestetika u ekstremima ontogenetskog razvića, npr. tokom neonatalnog perioda i u kasnijem životnom dobu (Vutskits i Xie, 2016). Shodno tome, rezultati naših prethodnih studija su među prvima ukazali na progresivne apoptotske neurodegenerativne promene i izmene u sinaptičkoj organizaciji u neonatalnom mozgu pacova neposredno nakon izlaganja propofolskoj anesteziji (Pescic i sar., 2009, Milanovic i sar., 2016), koje kasnije tokom peripuberteta dovode do izmenjenog odgovora na psihotropičnu stimulaciju, hiperaktivnosti i kognitivnih poteškoća (Pescic i sar., 2015, Milanovic i sar., 2016). Imajući u vidu da je adiktivni potencijal propofola zabeležen ali slabo istražen, naša studija (Pavkovic i sar., 2017) ističe da izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova: a) u različitim moždanim regionima u ispitivanom vremenskom intervalu nakon tretmana (4-48 sati) utiče na ekspresiju/fosforilaciju signalnih molekula za koje se zna da su uključeni u procese izazvane primenom adiktivnih supstanci; b) ne utiče na motoričku aktivnost u bazalnim uslovima; c) povećava motorički odgovor na d-AMPH i PCP, što ukazuje da ove dve droge i propofol utiču na slične neuralne sisteme uprkos njihovom različitom primarnom mehanizmu delovanja; d) smanjuje bihevioralnu inhibiciju u averzivnoj sredini. U

odsustvu dodatnih farmakoloških manipulacija, svi detektovani efekti se ne uočavaju u 48. satu nakon izlaganja propofolskoj anesteziji.

5.1.1. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva promene u ekspresiji ukupne i fosforilisane forme DARPP-32 i CaMKII α kao i FosB proteina u različitim moždanim regionima 4, 24 i 48 sati nakon tretmana

Za razliku od svih ispitivanih dopaminoceptivnih regiona mozga (mPFK, strijatum i talamus) samo je u talamusu (struktura mozga inervisana dopaminskim neuronima poreklom iz srednjeg mozga i značajna za indukciju, kao i buđenje iz anestezije (Franks, 2008, Langsjo i sar., 2012)) u 4. i 24. satu nakon opšte anestezije izazvane propofolom detektovan značajan porast ekspresije pDARPP-32^{Thr34} proteina, postsinaptičkog markera dopaminske transmisije. Povišen nivo pDARPP-32^{Thr34} proteina ukazuje da je u talamusu 4 i 24 sata nakon opšte anestezije izazvane propofolom kod peripubertetskih pacova povišen nivo sinaptičkog dopamina i da je indukovani signalni put zavisao od aktivnosti D1 receptora. Rezultati ranijih studija na adultnim pacovima ukazuju da propofol zaista može specifično da utiče na dopaminski sistem, i to u regionima mozga kao što je NAc. Pokazano je da subanestetske i anestetske doze propofola u NAc-u povećavaju koncentraciju vanćelijskog/sinaptičkog dopamina (Pain i sar., 2002), da hronična primena neanestetske doze može izazvati povišenu ekspresiju D1 receptora na iRNK (informaciona ribonukleinska kiselina) i proteinskom nivou (Xiong i sar., 2011) i da propofol može da izazove izraženo samoinicijativno unošenje supstance nakon treninga, pri čemu antagonisti D1 receptora, ali ne i D2 receptora, primenjeni sistemski ili unutar regiona NAc-a znatno umanjuju nivo samostalnog unošenja ove supstance (Lian i sar., 2013). Iako u našoj studiji nisu detektovane promene u nivou pDARPP-32^{Thr34} proteina u strijatumu, po prvi put je pokazano da je kod peripubertetskih pacova dopaminska transmisija izmenjena u specifičnim regionima talamusa nakon opšte anestezije indukovane propofolom (Pavkovic i sar., 2017). Detektovan je značajno veći broj pDARPP-32^{Thr34} imunopozitivnih ćelija u okviru srednje linije talamusa (sa akcentom na PVT region), kao i u mediodorzalnom regionu talamusa. Jedra srednje linije, intralaminarna jedra i mediodorzalno jedro talamusa (lat. *nucleus mediodorsalis thalami*; MD) su obeleženi kao značajni dopaminoceptivni regioni talamusa pacova (Garcia-Cabezas i sar., 2009). Ova jedra predstavljaju deo sistema za nagrađivanje zbog gustih neuralnih veza sa PFK-

om i bazalnim ganglijama (strukturama značajnim za regulaciju motivacionog, emocionalnog ponašanja i nagrađivanja) (Dreher i Tremblay, 2009).

Povećana ekspresija pDARPP-32 proteina u talamusu je praćena povećanjem broja FosB imunopozitivnih ćelija takođe u PVT i MD regionima talamusa. Imajući u vidu da je FosB kratkoživeći protein i biohemijski pokazatelj neuronske aktivnosti (Ulery i sar., 2006), ovakav rezultat ukazuje da dolazi do reaktivacije limbičkih jedara talamusa 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji. Treba napomenuti da prema specifikacijama proizvođača korišćeno FosB antitelo prepoznaje kako FosB tako i Δ FosB formu proteina. Western blot metoda je omogućila razlikovanje ove dve forme proteina (FosB se detektuje na 46 – 50 kDa, a Δ FosB na 33 – 37 kDa (Nestler, 2008)), što metodom imunohistohemije nije bilo moguće ostvariti. Metodom Western blota nije dobijen reproducibilan signal za Δ FosB formu proteina (signal nije bio dovoljno intenziteta za adekvatnu detekciju i kvantifikaciju).

Za razliku od povećanog nivoa FosB proteina u talamusu (4 i 24 sata nakon tretmana), detektovan je smanjen nivo FosB proteina u strijatumu 24 sata nakon izlaganja propofolu, što se može tumačiti kao smanjenje neuronske aktivnosti u ovom regionu (značajnom za subjektivni osećaj nagrađivanja i vrednovanje nagrade) u specifičnom vremenskom periodu nakon tretmana. U tom smislu, smanjena neuronska aktivnost u strijatumu nakon akutne primene propofolske anestezije može izazvati umanjeње subjektivnog doživljaja nagrađivanja i zadovoljstva u datoj (poznatoj) sredini (engl. *Reward deficiency paradigm*), usled čega biološki sistem teží ka novim sredinskim stimulusima, senzacionalizmu i/ili upotrebi supstanci (droga) koje ovaj osećaj mogu da omogućé (Blum i sar., 2012). To je u našem eksperimentu i potvrđeno u testovima ponašanja (diskutovano u daljem tekstu).

Dok u talamusu nisu detektovane promene u nivou ukupne i fosforilisane forme CaMKII α proteina, zabeleženo je povećanje ekspresije pCaMKII α , biohemijskog senzora sinaptičke aktivnosti, koji ima značajnu ulogu u memorisanju efekata prouzrokovanih primenom adiktivnih supstanci (Muller i sar., 2016), u mPFC-u 24 sata i u strijatumu 4 i 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji. Zabeležen porast zastupljenosti fosforilisane forme CaMKII α proteina u strijatumu praćen sniženom ekspresijom FosB u ovoj strukturi u našoj studiji (Pavkovic i sar., 2017) je u skladu sa novijim otkrićima koja pokazuju da u strijatumu CaMKII α učestvuje u negativnoj

regulaciji neuronske aktivnosti u odgovoru na sinaptičku aktivnost, tj. da je sinaptička ekscitacija spregnuta sa smanjenjem neuronske aktivnosti (Klug i sar., 2012).

Uprkos povećanoj ekspresiji pCaMKII α nije bilo značajnih promena u odnosu fosforilisane i ukupne forme CaMKII α proteina u mPFK-u i strijatumu, što ukazuje da je ekspresija ukupnog proteina povećana iako to samo po sebi kao promena nije statistički značajno. Ovakav rezultat je u skladu sa literaturnim podacima koji su pokazali da adiktivne supstance mogu izazvati povećanu aktivnost CaMKII α indukcijom ekspresije i/ili fosforilacije ovog proteina (Muller i sar., 2016). Iako nisu detektovane promene u ekspresiji pDARPP-32 proteina u ovim strukturama, uticaj dopaminske transmisije na porast nivoa pCaMKII α proteina u mPFK-u i strijatumu ne treba odbaciti jer povećana fosforilacija CaMKII α proteina može biti rezultat izmenjene aktivnosti D1DR/PKA signalnog puta (Anderson i sar., 2008).

Naša studija (Pavkovic i sar., 2017) je pokazala da izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva regionalno specifične promene u ekspresiji i fosforilaciji DARPP-32, CaMKII α i FosB proteina 4 i 24 sata nakon tretmana, pri čemu se istovremeno detektuju 24 sata nakon injeciranja.

Intralipid je lipidna emulzija često korišćena u parentralnoj ishrani (Hallberg i sar., 1967, Hansen i sar., 1976). U kombinaciji sa propofolom značajno poboljšava farmakokinetiku i sigurnosni profil anestetika (Kanto i Gepts, 1989). Kako bi proverili da li intralipid utiče na ekspresiju ispitivanih proteina pacovi su injecirani sa adekvatnom zapreminom ove emulzije. U odnosu na netretirane kontrolne jedinice, nije zabeležen značajan uticaj ove emulzije ni na jedan od analiziranih proteina, što ukazuje da se efekti na ekspresiju proteina mogu pripisati prvenstveno propofolu.

5.1.2. Izlaganje propofolskoj anesteziji ne menja spontanu lokomotornu aktivnost peripubertetskih pacova

Uprkos strukturno specifičnim biohemijskim promenama detektovanim u različitim vremenskim tačkama nakon izlaganja peripubertetskih pacova propofolskoj anesteziji, nisu detektovane značajne promene spontane lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja (Pavkovic i sar., 2017). Treba naglasiti da izlaganje novoj sredini izaziva aktivaciju VTA, što za posledicu ima stimulaciju mezolimbičke dopaminske transmisije (Legault i Wise, 2001). Pokazano je da se nakon izlaganja novoj sredini nivo vanćelijskog dopamina u NAc-u povećava i, uz postepeno vraćanje na kontrolni nivo,

ostaje povećan 120 minuta i praćen je porastom lokomotorne aktivnosti u prvih 30 minuta (Legault i Wise, 2001). To što u našem eksperimentu nije zabeležena promena u odgovoru na novu sredinu između kontrolne, intralipidom i propofolom tretiranih životinja ne znači da bihevioralna senzitivizacija kod životinja izloženih propofolu ne postoji, već da nova sredina kao stimulus nije dovoljna da se specifičnosti u ponašanju ovih životinja ispolje. U tom smislu potrebna je stimulacija farmakološkim supstancama čiji je efekat znatno jači, što je u našem eksperimentu postignuto primenom d-AMPH-a i PCP-a, koji menjaju neuralnu transmisiju u okviru određenih moždanih puteva, što se ogleda u specifičnom bihevioralnom odgovoru na ove supstance.

5.1.3. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva senzitivizaciju lokomotornog odgovora na d-amfetamin

U cilju karakterizacije stanja aktivnosti dopaminskog sistema anesteziranih pacova testiran je odgovor životinja na psihostimulans d-AMPH, koji kod pacova primenjen u dozi od 1,5 mg/kg primarno povećava nivo dopamina u sinapsama, delujući preko dopaminskog nosača (Vezina, 2004). Inhibicijom preuzimanja neurotransmitera iz sinaptičke pukotine i podsticanjem reverznog transporta dopamina, d-AMPH aktivira dopaminoceptivne regione prednjeg mozga, usled čega podstiče aktivnost mezokortikolimbickog puta koji posreduje u d-AMPH-om indukovanoj hiperlokomociji pri manjim dozama amfetamina, dok više doze ovog psihostimulansa utiču na stereotipnu aktivnost (Creese i Iversen, 1974, Fink i Smith, 1980, Vezina, 2004). Primenom dvoinjekcionog protokola senzitivizacije (Valjent i sar., 2010) pokazali smo da d-AMPH primenjen u dozi od 1,5 mg/kg povećava lokomociju, ali ne i stereotipiju peripubertetskih pacova prethodno podvrgnutim propofolskoj anesteziji (Pavkovic i sar., 2017). U našem istraživanju, d-AMPH izaziva izraženo ali neznačajno povećanje lokomotorne aktivnosti tokom prvih 50 minuta kod pacova koji su 24 sata ranije bili izloženi propofolskoj anesteziji. Međutim statističko značajno povećanje lokomotorne aktivnosti se uočava u narednih 50 minuta (najizraženije od 50. do 80. minuta) nakon injeciranja psihostimulansa. Ovakav rezultat ukazuje na izraženu reaktivaciju i senzitivnost sistema u ovom periodu delovanja d-AMPH-a nakon anestezije izazvane propofolom. Prema tome, naši rezultati ukazuju da izlaganje propofolskoj anesteziji utiče na/stimuliše mezokortikolimbicki dopaminski put koji se projektuje iz VTA, ali ne

i nigrostrijatni put koji se projektuje iz SNC-a (Pavkovic i sar., 2017), na šta je već ukazano u ranijim studijama (Solt i sar., 2014).

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama u kojima je zabeleženo da peripubertetski pacovi imaju karakterističan profil bihevioralne senzitivacije indukovane ovim psihostimulansom u vidu izraženije hiperlokomocije uz skoro potpuno odsustvo stereotipnih aktivnosti, kao i smanjenu osetljivost u testu uslovljavanja mesta (engl. *Place conditioning*) (Tirelli i sar., 2003). Glodari u adolescentnom periodu razvića pokazuju povećanu senzitivaciju na euforijska i pobuđujuća svojstva d-AMPH-a, zajedno sa smanjenom memorijom o njegovim hedonističkim efektima (Tirelli i sar., 2003), a smatra se da isti fenomen postoji i u humanoj populaciji. Zbog toga su promene u sazrevanju neurobihevioralnog sistema koji se nalazi u osnovi motivisanog ponašanja identifikovane kao ključan faktor rizika u etiologiji različitih psihijatrijskih bolesti, uključujući panične napade, shizofreniju, opsesivno-kompulsivne poremećaje i bolesti zavisnosti (Paus i sar., 2008).

Lokomotorna senzitivacija se izaziva stimulacijom VTA (specifično A9 i A10 dopaminskih regiona (Kalivas i Weber, 1988)), dok je ovaj efekat manje primetan ili neprimetan nakon lokalne stimulacije nekih drugih regiona koji su inervisani dopaminskim neuronima (revijski prikaz (Vezina, 2004)). Iako NAc nije neophodan za indukciju lokomotorne senzitivacije izazvane AMPH-om, važan je za njenu ekspresiju (Vezina, 2004). Izlaganje VTA amfetaminu izaziva oslobađanje dopamina u NAc (Pain i sar., 2002), što se u odgovoru na novi unos AMPH pojačava, kao i nagon za dalju upotrebu ove supstance (Vezina, 1993, Vezina, 1996). Uviđa se da je težnja za senzacijom i samoinicijativnoj upotrebi adiktivnih supstanci (kao što su amfetamin i kokain) zasnovana na sličnim procesima u istim regionima mozga (VTA) koji su neophodni za priliv dopamina u NAc (Vezina, 2004). Detaljna i dugogodišnja istraživanja su pokazala da se razvijanje pojačanog nagona za samoinjeciranje adiktivne supstance onemogućava manipulacijama za koje se zna da sprečavaju indukciju lokomotorne senzitivacije i oslobađanje dopamina u NAc (blokiranje D1, NMDA i AMPA receptora pomoću njihovih antagonista). Dok blokiranje aktivnosti D1 receptora u VTA onemogućava AMPH indukovanu lokomotornu senzitivaciju, primena D2 antagonista u ovom regionu mozga ne pokazuje sličan efekat (Bjijou i sar., 1996). Prema tome, povećanje vanćelijskog nivoa dopamina i aktivacija D1 receptora u VTA

imaju važnu ulogu u inicijaciji dugotrajnih neuralnih i bihevioralnih adaptacija kao odgovor na izlaganje adiktivnoj supstanci (Vezina, 2004).

Iako je molekulska osnova fenomena bihevioralne senzitivacije ispitivana uglavnom u strijatumu i NAc-u (Steketee i Kalivas, 2011, Vezina, 2004), neke studije u kojima je izvršena lezija mPFC i PVT regiona ukazuju na značaj navedenih regiona mozga u razvoju ovog fenomena (Steketee i Kalivas, 2011, Kirouac, 2015). PVT region predstavlja region mozga koji posreduje u neurotransmisiji između VTA i NAc-a (Steketee i Kalivas, 2011). Karakterišu ga guste veze sa frontalnim regionom kore velikog mozga, ali najintenzivnije veze se nalaze između PVT i NAc regiona (Kirouac, 2015). Ista studija ukazuje na značaj PVT regiona u regulaciji dopaminske transmisije jer ostvaruje bliske veze sa dopaminskim završecima/terminalima, zahvaljujući čemu električna stimulacija ovog regiona izaziva oslobađanje dopamina u regionu NAc-a. Aktivacija PVT je potvrđena pri jednokratnom izlaganju adiktivnim supstancama (kao što su alkohol, kokain, amfetamin, morfin, kanabinoidi i nikotin). Imajući u vidu da je fosforilacija DARPP-32 na treoninu 34 značajna za fenomen lokomotorne senzitivacije kao i za akutne efekte indukovane jednokratnim izlaganjem adiktivnim supstancama kao što su kokain i morfijum (Valjent i sar., 2010), povišen nivo pDARPP-32^{Thr34} proteina (ali i FosB proteina – indikacija povećane neuronske aktivnosti) u MD i PVT regionu talamusa 24 sata nakon opšte anestezije izazvane propofolom mogao bi doprineti lokomotornoj senzitivaciji indukovanoj d-AMPH-om, koja je zabeležena u našoj studiji, što ipak ostaje da bude razjašnjeno u daljim istraživanjima. Treba naglasiti da doprinos biohemijskih promena u moždanim regionima mimo strijatuma fenomenu bihevioralne senzitivacije nije proučen i skoro sve što se o njihovoj ulozi zna dobijeno je u studijama lezije (Steketee i Kalivas, 2011, Kirouac, 2015).

Smatramo da zabeleženo povećanje d-AMPH-om indukovane lokomotorne aktivnosti može da bude posledica povećane ekspresije pCaMKII α u strijatumu kod pacova izloženih propofolu, zbog toga što CaMKII α interaguje sa DAT-om, promovise amfetaminom indukovani odliv dopamina i ima važnu ulogu u lokomotornoj senzitivaciji (Fog i sar., 2006). Na ovakvu pretpostavku navodi profil krive lokomotorne aktivnosti kroz vreme – u prvih 50 minuta nema statistički značajne razlike između propofolom tretiranih i kontrolnih (fiziološka kontrola, intralipidna kontrola) životinja, već u drugih 50 minuta, kada se očekuje stabilizacija i terminacija odgovora (Pavkovic i

sar., 2017), za šta je najvećim delom odgovoran DAT jer upravo on vraća dopamin u presinaptički završetak, doprinoseći inaktivaciji odgovora posredovanog sinaptički dostupnim dopaminom. Pojačana aktivnost CaMKII α bi za posledicu imala favorizaciju DAT-posredovanog iznošenja dopamina u sinapsu umesto preuzimanja dopamina iz nje (Fog i sar., 2006), što se u našem eksperimentu (Pavkovic i sar., 2017) na vremenski-zavisnoj krivoj d-AMPH-om indukovane lokomotorne aktivnosti prepoznaje kao drugi pik/talas aktivnosti kod propofolu izloženih životinja 24 sata nakon anesteziranja, a što u kontrolnim grupama nije uočeno. Značaj CaMKII α u DAT-posredovanoj regulaciji nivoa sinaptičkog dopamina naglašen je u najnovijim studijama, posebno imajući u vidu istovremeni značaj ove kinaze za nastanak sinaptičkih promena u odgovoru na psihostimulanse (Steinkellner i sar., 2012, Pizzo i sar., 2014).

Aktivnost CaMKII α proteina u VTA, NAc-u i hipokampusu jedan je od najvažnijih faktora za lokomotornu senzitivaciju indukovanu kokainom i AMPH-om, pri čemu je ova senzitivacija odsutna kod miševa koji nemaju CaMKII α (Steinkellner i sar., 2012). Aktivacija CaMKII pojačava fosforilaciju različitih ciljnih proteina, kao što su GluR1 (engl. *Glutamate receptor 1*), NR2B (engl. *NMDA receptor 2B*), DAT, GABA receptor i Δ FosB i promoviše na kontekst zavisan način hiperlokomotorni odgovor na senzaciju (Licata i Pierce, 2003). Treba napomenuti da je povećan nivo pCaMKII α detektovan u strijatumu 4 sata nakon izlaganja propofolu ali bez značajnih promena u lokomotornom odgovoru, što ukazuje da je CaMKII α neophodan ali ne i dovoljan događaj za ekspresiju pojačanog lokomotornog odgovora na AMPH (Pavkovic i sar., 2017). Rezultati naše studije ukazuju da su dodatne biohemijske promene detektovane 24 sata nakon tretmana (pad neuronske aktivnosti u strijatumu (procenjeno na osnovu ekspresije FosB proteina) i porast neuronske aktivnosti u limbičkom talamusu (PVT), kao i porast sinaptičke aktivnosti u regionu mPFK-a) imaju određenu ulogu u ekspresiji bihevioralne senzitivacije u našem modelu. Doprinosi biohemijskih promena u moždanim regionima mimo strijatuma fenomenu bihevioralne senzitivacije nije proučen i skoro sve što se o njihovoj ulozi zna dobijeno je u studijama lezije (Steketee i Kalivas, 2011, Kirouac, 2015).

5.1.4. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova izaziva senzitivaciju lokomotornog odgovora na fenciklidin

Prema literaturi, akutna primena PCP-a (1,0-5,0 mg/kg) indukuje dozno zavisno povećanje lokomotorne aktivnosti, repetitivne pokrete glave, ataksiju i izraženije njuškanje kod glodara (Greenberg i Segal, 1985). Rezultati naše studije su pokazali da životinje koje su primile PCP 24 sata, ali ne i 48 sati nakon opšte propofolske anestezije imaju povećanu lokomotornu aktivnost tokom prvih 60 minuta od injeciranja halucinogena i smanjenu stereotipnu aktivnost tokom prvih 30 minuta od injeciranja halucinogena, bez značajnih promena u vertikalnoj aktivnosti. Ovakav rezultat pokazuje da je nervni sistem senzitiviran propofolom i najosetljiviji na naknadno delovanje PCP-a 24 sata nakon injeciranja anestetika. Statistički značajno povećanje lokomotorne aktivnosti indukovane PCP-om (ali ne i d-AMPH-om) tokom prvih 60 minuta kod grupe životinja anesteziranih propofolom, ukazuje da PCP ima ulogu u inicijalnim fazama, kao i ranim fazama ekspresije bihejvioralne senzitivacije, ali i da se mehanizam ukrštene senzitivacije razlikuje kod PCP-a i AMPH-a (Xu i Domino, 1994). Smanjena stereotipna aktivnost tokom inicijalnih 30 minuta trajanja eksperimenta kod propofolske grupe može se smatrati posledicom izuzetno visoke lokomotorne aktivnosti, koja ometa izvršavanje stereotipne aktivnosti. Dok AMPH svoj efekat ostvaruje uticajem na mezolimbicki put koji obuhvata dopaminske projekcije iz VTA u NAc, PCP deluje kao antagonista NMDA receptora, koji se nalaze u velikoj meri na GABAergičkim interneuronima, stimulišući aktivnost kortiko-talamo-kortikalne transmisije (Santana i sar., 2011). O ulozi strijatuma u PCP indukovanoj hiperlokomociji postoje podeljena mišljenja, mada studije lezije (više u daljem tekstu) ukazuju da ovaj region nije od presudnog značaja, što ne znači da nema određeni doprinos (Jentsch i sar., 1998). Povećana lokomotorna aktivnost kod grupe životinja prethodno tretirane propofolom, a zatim PCP-om, može biti odraz povećanja nivoa pDARPP-32 i FosB proteina nakon anestezije izazvane propofolom, odnosno dopaminske transmisije i neuronske aktivnosti u PVT i MD regionu talamusa koji formiraju guste veze sa mPFK-om. Neuralna osnova hiperlokomotornog odgovora kod glodara usled primene PCP-a u dozi od 5 mg/kg (što je doza korišćena u našem eksperimentu) je dobro proučena kroz studije lezije specifičnih moždanih regiona, prilikom čega je pokazano da za razliku od d-AMPH, za čije je hipermotoričke efekte neophodan intaktan strijatum, PCP ostvaruje svoje

hiperlokomotorne efekte preko PFK-a (Jentsch i sar., 1998). S obzirom da je u našem eksperimentu jedina značajna biohemijaska promena kod propofolske u odnosu na kontrolnu grupu bila povećana ekspresija fosforilisane forme CaMKII α , pretpostavljamo da je upravo ovo povećanje moglo doprineti uočenoj razlici na nivou ponašanja – kao takvo ono bi moglo biti znak da je ekscitatorna sinaptička transmisija u regionu mPFK-a kod propofolske grupe već povećana 24 sata nakon tretmana (o regulaciji ekspresije pCaMKII videti u uvodnom delu, 1.5.2.2.), usled čega je sistem podložniji disinhibiciji koju blokada NMDA receptora izaziva. Ovakva pretpostavka bi takođe značila da se pCaMKII α , kao biohemijaski pokazatelj ekscitatorne sinaptičke transmisije, u mPFK nalazi u postsinapsi glutamatergičkih neurona koji podležu GABA-posredovanoj inhibiciji/disinhibiciji (za razliku od neurona strijatuma gde je prema literaturi (Klug i sar., 2012) ova kinaza u GABAergičkim neuronima), zbog čega je hiperekscitabilnost nakon primene PCP-a izraženija kod propofolske u odnosu na kontrolnu grupu, što ostaje da bude ispitano u daljem radu. Statistički značajna razlika u vertikalnoj aktivnosti, koja je prema mišljenju nekih autora adekvatniji pokazatelj eksploratorne aktivnosti glodara nego njihova lokomocija (Lever i sar., 2006), u našoj studiji nije zabeležena između kontrolne grupe i grupe pacova tretiranih propofolom, što implicira na složenost fenomenologije ponašanja koja nastaje kao rezultat akutnog izlaganja propofolskoj anesteziji. Međutim, razlog zašto nisu detektovane značajnije razlike u vertikalnoj aktivnosti između grupe tretirane propofolom i kontrolne grupe nakon izlaganja fenciklidinu, se može naći i u karakterističnom efektu ovog psihostimulansa na bihevioralnu senzitivaciju. Dok akutna primena PCP-a može izazvati promene lokomotorne i stereotipne aktivnosti, znatno manji efekat (nekad i bez efekta) ima na vertikalnu aktivnost kod glodara (Greenberg i Segal, 1985, Iwamoto, 1986).

Postoje izvesna metodološka pitanja koja se tiču adekvatnog ispitivanja procesa senzitivacije. Naime, unos adiktivne supstance u organizam može da bude voljan (engl. *Self-administered*) ili instruisan od strane drugog lica/eksperimentatora. U realnosti, tj. u humanoj populaciji, konzumacija adiktivnih supstanci je dominantno voljna, dok se u eksperimentalnim uslovima životinje najčešće izlažu tretmanu nevoljno (Steketee i Kalivas, 2011). Mada postoji veliko preklapanje u dobijenim podacima, često se postavlja pitanje da li su eksperimentalni podaci dobijeni na gore opisani način

adekvatan ekvivalent onome što se dešava u humanoj populaciji. U svetlu ove dileme treba napomenuti i izvesne situacije kada se adicija javlja kao sporedni efekat medicinski opravdane primene određenog medikamenta (npr. usled regularne primene opijata u terapiji bola).

5.1.5. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova smanjuje anksiozni odgovor u testu svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta 24 sata nakon tretmana

Iako se pomenuti testovi koriste za procenu anksioznog ponašanja životinja, naučnici se slažu sa činjenicom da ni jedan test ne daje čistu, neospornu meru emocionalnog stanja životinje (Ramos i sar., 2008). Tačnije, testovi anksioznosti ne podržavaju isti psihobiološki fenomen (Ramos, 2008). Stoga naučnici pribegavaju izlaganju eksperimentalnih subjekata većem broju testova kako bi dobili celokupnu i realniju sliku emocionalnog stanja jedinke. Sa druge strane, veći broj testova zadaje i određene probleme. Iako ovi testovi nisu invazivni, tj. previše stresni po životinju, jedna jedinka ne može da prođe više testova zaredom zbog mogućeg efekta prethodnog na trenutni test, tako da je neophodno da prođe određeni vremenski period (od nekoliko dana ili nedelja) između dva testa, kako bi se efekat prethodnog testiranja sveo na minimum (Paylor i sar., 2006). To može predstavljati problem u slučaju kada se proučava tačno određeni vremenski interval nakon stimulusa koji se ispituje (kao što je to slučaj u našem istraživanju). Za realizaciju ovakvih eksperimenata je posebno uključiti veliki broj životinja, što je najčešće u suprotnosti sa etičkim zahtevima.

Da bi broj testiranih životinja bio što manji i u skladu sa etičkim zahtevima, razlike u anksioznom ponašanju u našoj studiji (Pavkovic i sar., 2017) su ispraćene samo između kontrolne i grupe životinja kod koje su uočene značajne promene na molekulskom/biohemijском nivou i u ponašanju, tj. grupe koja je testirana 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji. Životinje izložene propofolskoj anesteziji su pokazale značajne razlike u ispitivanim parametrima testa svetlo/tamne kutije, ali i testa uzdignutog krstastog lavirinta u odnosu na kontrolnu grupu, koje se mogu protumačiti kao smanjeno anksiozno ponašanje peripubertetskih pacova 24 sata nakon opšte anestezije izazvane propofolom. Najpouzdaniji parametar za procenu anksiolitičkog dejstva tretmana predstavlja vreme koje tretirane jedinke u trenutku testiranja provode u osvetljenom odeljku, zbog toga što ovaj parametar daje najkonzistentniji doznno zavisni

odgovor na različite supstance/anksiolitike (Hascoet i Bourin, 1998). Naši rezultati su pokazali da pacovi u peripubertetu anestetizirani propofolom duže borave u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta i osvetljenom odeljku svetlo/tamne kutije. Ovo se proporcionalno odražava na parametar boravka u zatvorenim kracima i tamnom odeljku svetlo/tamne kutije, u kojima je zabeleženo značajno kraće vreme boravka kod propofolske u odnosu na kontrolnu grupu (Pavkovic i sar., 2017). Međutim vreme potrebno da se statistički značajne promene ovih parametara ispolje se razlikuje kod testa svetlo/tamne kutije i testa uzdignutog krstastog lavirinta. U testu svetlo/tamne kutije značajno duže vreme boravka životinja izloženih propofolskoj anesteziji je zabeleženo u svetlom odeljku i kraće u tamnom odeljku kutije nakon ukupnog vremena trajanja eksperimenta od 10 minuta. Analiza podataka na 5 minuta (podaci nisu predstavljeni) u ovom testu je ukazala da propofolom tretirane životinje nešto duže borave u osvetljenom, odnosno kraće u tamnom odeljku i tokom prvih i tokom drugih 5 minuta trajanja eksperimenta, ali statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu i intralipidom tretirane životinje nisu detektovane. Sa druge strane, u testu uzdignutog krstastog lavirinta kod anestetiziranih životinja nisu zabeležene statistički značajne razlike između kontrolne i anestetizirane grupe nakon ukupnog vremena trajanja eksperimenta od 10 minuta (podaci nisu predstavljeni). Međutim, životinje izložene propofolskoj anesteziji su značajno duže boravile u otvorenom, odnosno kraće u zatvorenom kraku tokom drugih 5 minuta trajanja eksperimenta. Isti rezultat je dobijen za parametar koji se odnosi na broj ulazaka u svetli odeljak svetlo/tamne kutije i otvoreni krak uzdignutog krstastog lavirinta.

Nešto drugačiji rezultat je dobijen za parametre: izvirivanje u svetli odeljak, odnosno otvoreni krak i vreme provedeno u regionu otvora između svetlog i tamnog odeljka svetlo/tamne kutije i za vreme boravka u centru uzdignutog krstastog lavirinta. Za ove parametre nije zabeležena značajna razlika između tretirane i kontrolne grupe u testu svetlo/tamne kutije, ali je detektovano značajno duže vreme boravka životinja izloženih propofolu u centralnom regionu uzdignutog krstastog lavirinta tokom drugih pet minuta eksperimenta. Izvirivanje i zadržavanje u regionu otvora svetlo/tamne kutije, odnosno centra uzdignutog krstastog lavirinta omogućavaju životinji da proceni rizik boravka u averzivnoj sredini. Latenca do ulaska u tamni region kod oba testa takođe može predstavljati meru anksioznog ponašanja. Duža latenca do ulaska u tamni region,

može biti rezultat disinhibitorne aktivnosti i smanjenog anksioznog ponašanja, pri čemu životinja intenzivno proučava osvetljenu površinu (Hascoet i Bourin, 1998). U našem istraživanju je u testu svetlo/tamne kutije detektovana duža latenca do ulaska u tamni odeljak u grupi tretiranoj propofolom, što nije slučaj u testu uzdignutog krstastog lavirinta, gde nisu detektovane značajne razlike. Isti rezultat je dobijen za parametar koji se odnosi na broj ulazaka u svetli odeljak i otvoreni krak svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta.

Na osnovu vrednosti parametara: vreme provedeno u svetlom, tamnom kraku i ulazak u svetli iz tamnog kraka, može se zaključiti da tokom prvih pet minuta testa uzdignutog krstastog lavirinta peripubertetski pacovi imaju potrebu za ispitivanjem nove sredine, međutim u narednih pet minuta potpuno prevladava averzija prema otvorenoj sredini. Da takav rezultat nije posledica potpunog gubitka motivacije životinja za ispitivanjem nove sredine tokom narednih pet minuta testa, ukazuju parametri: broj izvirivanja u svetli krak i vreme provedeno u centru, gde se uočava da životinje zadržavaju potrebu za ispitivanjem prostora, iako značajno manje nego tokom prvih pet minuta, ali se nakon procene rizika opredeljuju za boravak u tamnom prostoru koji im daje određenu sigurnost. Anksiolitički efekat propofola se ogleda u smanjenoj bihevioralnoj inhibiciji tokom drugih pet minuta testa, što utiče na aktivno ispitivanje averzivne sredine, koje je podjednako intenziteta kao i tokom prvih pet minuta. Ovakav efekat propofola na peripubertetske pacove je detektovan i u testu svetlo/tamne kutije, sa tom razlikom da je on primećen tek nakon ukupnog trajanja eksperimenta od 10 minuta, što može biti posledica nešto manjeg averzivnog uticaja ograđene osvetljene površine svetlo/tamne kutije u odnosu na otvorenu uzdignutu površinu krstastog lavirinta. Imajući u vidu da je praksa u naučnim istraživanjima da eksperimentalne procedure za procenu anksioznosti životinja traju od 3 do 10 minuta, u najvećem broju studija 5 minuta (Bourin i Hascoet, 2003), mora se voditi računa o dužini trajanja testa kada su u pitanju mlade eksperimentalne životinje i načinu analize dobijenih podataka, naročito imajući u vidu neusaglašene literaturne podatke od kojih neki ukazuju da su juvenilne jedinke manje anksiozne, dok drugi ukazuju da su više anksiozne u odnosu na adultne životinje (Stansfield i Kirstein, 2006, Spear, 2007a, Lynn i Brown, 2009, Lynn i Brown, 2010).

Oba korišćena testa se zasnivaju na konfliktu između urođene tendencije glodara da istražuju novu sredinu i urođene tendencije da izbegavaju osvetljenu i otvorenu površinu (Bourin, 1997, Costall i sar., 1989, File, 2001, Bourin i Hascoet, 2003, Sziray i sar., 2010), pri čemu je otvorena i uzdignuta površina krstastog lavirinta ipak averzivnija od osvetljene ali ograđene površine koja u testu svetlo/tamne kutije pacovima daje određenu dozu bezbednosti. Zbog toga detektovane razlike između testova mogu biti rezultat različitih aspekata anksioznog ponašanja koje ovi testovi izazivaju kod životinja.

Svi navedeni testovi anksioznosti baziraju se na lokomotornoj aktivnosti životinja i zavise od iste, tako da hiperaktivnost životinja može da utiče na rezultate dobijene nakon ovih testova. U našem istraživanju nisu detektovane značajne razlike u spontanoj lokomotornoj aktivnosti između propofolske i kontrolne grupe životinja. Prema tome snižena anksioznost detektovana u testu svetlo/tamne kutije i testu uzdignutog krstastog lavirinta 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji nije posledica uticaja ovog anestetika na spontanu lokomotornu aktivnost životinja (Pavkovic i sar., 2017).

Smanjena bihevioralna inhibicija u testovima svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta, koja se obično povezuje sa izraženijim nagonom za senzacionim stimulusom, uz motoričku aktivnost koja je na kontrolnom nivou (koja ukazuje na odsustvo hiperaktivnosti), kao i smanjenom ekspresijom biohemijskih indikatora neuronske/neuralne aktivnosti u strijatumu (FosB u našoj studiji), se može povezati sa paradigmom smanjenog osećaja nagrađivanja (engl. *Reward deficiency paradigm*). Drugim rečima, smanjena aktivnost strijatuma tokom anticipacije/naslućivanja nagrade je odgovorna za traženje sredinskih novina i senzacija (što može da obuhvata i korišćenje psihoaktivnih supstanci/droga) koje bi doprinele vraćanju osećaja nagrađivanja na kontrolni nivo (Steinberg, 2008). Šta više, naša pretpostavka je da povećana neuronska aktivnost u okviru PVT regiona može da doprinese smanjenoj bihevioralnoj inhibiciji u averzivnoj sredini kod propofolskih životinja, jer novija istraživanja ukazuju na negativnu korelaciju između neuronske aktivnosti PVT i simptoma anksioznosti (Barson i Leibowitz, 2015) – u našoj studiji je broj FosB (biohemijski pokazatelj neuronske aktivnosti) pozitivnih ćelija bio veći u PVT-u

životinja izloženih propofolskoj anesteziji, 24 sata nakon tretmana, nego kod kontrolnih (Pavkovic i sar., 2017).

5.2. Izlaganje propofolskoj anesteziji kod peripubertetskih pacova utiče na pozivanje neaverzivne memorije i izaziva promene u ekspresiji molekula koji učestvuju u memorijskom procesu u dorzalnem hipokampusu

Pamćenje događaja i činjenica iz svakodnevnog života je od vitalnog značaja za normalno funkcionisanje organizama. Priroda i karakteristike memorijskih procesa, zajedno sa neuralnim mrežama i biohemijskim/molekulskim parametrima koji učestvuju u regulaciji kognitivnih funkcija i memorijskog procesa, su intenzivno proučavani u kliničkim i eksperimentalnim istraživanjima. Međutim, većina podataka vezanih za proces memorisanja je dobijena na osnovu adultnih modela (Jabes i Nelson, 2015). Iako je poznato da opšti anestetici mogu da izazovu memorijske smetnje nakon operativnih zahvata, koji su kod starijih osoba prepoznati kao klasične amnezije, jako malo se zna na koji način anestetici utiču na memorijski proces kod mladih. Jedan od ciljeva ove teze je bio da se ispita uticaj opšte propofolske anestezije na prethodno formiranu memoriju kod mladih, peripubertetskih pacova kao model-sistemu za period periadolescencije kod ljudi (Pavkovic i sar., 2018). Uticaj propofola na memorijske procese koji se odvijaju u mozgu peripubertetskih pacova je na bihevioralnom nivou analiziran u 24. satu nakon injeciranja, vremenskoj tački u kojoj smo prethodno (Pavkovic i sar., 2017) zabeležili najintenzivnije promene na biohemijskom nivou i u ponašanju životinja nakon izlaganja anesteziji. Korišćeni su neaverzivni memorijski testovi u kojima ponašanje životinja, tj prepoznavanje novine (objekta i prostora) ne podrazumeva i izazivanje promena u emotivnom statusu jedinke. Kako bi približnije razjasnili rezultate bihevioralnih testova, ispitane su promene u dorzalnem hipokampusu na biohemijskom nivou. Ekspresija proteina koji mogu imati uticaj na proces učenja i pamćenja je analizirana 4, 24 i 48 sati nakon opšte propofolske anestezije. Rezultati ove studije (Pavkovic i sar., 2018) ukazuju da izlaganje propofolskoj anesteziji izaziva: a) poteškoće u prisećanju već naučenih informacija, tj. pozivanju (engl. *Retrieval*) memorije 24 sata nakon izlaganja anestetiku, što ometa prepoznavanje novine objekata i prostora i dovodi do neadekvatne rekonsolidacije i neadekvatne memorije o novini 48 sati nakon tretmana; b) promene u ekspresiji

molekula koji su uključeni u procese prisećanja/rekonsolidacije memorije u dorzalnog hipokampusu, 24 sata nakon izlaganja anestetiku.

5.2.1. Izlaganje propofolnoj anesteziji otežava prepoznavanje novine prostora u testu prostorne habituacije

Prostorna habituacija, jedna od najosnovnijih formi neasocijativnog hipokampus zavisnog učenja (Leussis i Bolivar, 2006), je slabo istražena kod peripubertetskih pacova. Habituacija na novu sredinu kod glodara se definiše i kao promena eksploratorne aktivnosti tokom vremena (unutar sesija) i nakon ponovljenih izlaganja sredini (između sesija). Habituacija unutar sesija predstavlja vremenski period jednokratnog izlaganja otvorenom polju tokom koga dolazi do smanjenja aktivnosti glodara, što je posledica familijarizacije sa novom sredinom. Habituaciju između sesija odražava/iskazuje sposobnost životinje da zapamti informacije o novoj sredini, odnosno sposobnost životinje da reaguje na ponovljeno izlaganje otvorenom polju smanjenom eksploratornom/istraživačkom aktivnošću u odnosu na aktivnost koju pokazuje pri prvobitnom izlaganju toj sredini (Leussis i Bolivar, 2006). Prema tome, habituacija unutar sesija predstavlja meru prilagodljivosti životinje na novu sredinu i uključuje komponentu učenja, dok habituacija između sesija predstavlja sposobnost jedinke da memoriše informacije prikupljene tokom prethodne sesije (Muller i sar., 1994). Dugačak, tridesetominutni habituacioni period u okviru sesija, korišćen u našem eksperimentu, je omogućio da se zabeleži tipičan vremenski zavisani profil habituacije kod kontrolnih pacova starih 35 postnatalnih dana (Pavkovic i sar., 2018), a koji je dobro poznat kod adultnih glodara (Leussis i Bolivar, 2006). Karakteriše ga intenzivna motorička aktivnost tokom prvih 5 minuta registracije, praćena smanjenjem aktivnosti u narednom periodu testiranja. Sa druge strane, prostorna habituacija između sesija kod peripubertetskih pacova je ukazala na značajno nižu vertikalnu aktivnost tokom drugog dana testiranja, značajno nižu horizontalnu aktivnost tokom trećeg dana testiranja, ali bez promena stereotipne aktivnosti tokom sva tri dana testiranja. Ovi rezultati naglašavaju postojanje određenih razlika u habituaciji zavisno od perioda razvića u kojoj se jedinka nalazi, jer se kod adultnih pacova Wistar soja nakon petominutne faze inicijalnog istraživanja test arene beleži prostorna habituacija koja se odlikuje značajno nižom horizontalnom i vertikalnom aktivnošću, ukoliko pauza između testiranja iznosi 24 sata (Vianna i sar., 2000, Vianna i sar., 2001). Pored navedenog, naša studija je

pokazala da prostorna habituacija nije uticala na odbojnost od centralne površine otvorenog polja, što se ogleda u proporcionalno manjoj eksploraciji i kraćem vremenu koje su životinje provodile na centralnoj površini svakog narednog dana tokom trodnevnog testiranja.

Životinje izložene propofolskoj anesteziji su pokazale neobičan obrazac aktivnosti u testu prostorne habituacije. Fokus statističke analize podataka dobijenih iz ovog testa je bio na prvih pet minuta eksperimenta jer je tokom ovog perioda najintenzivnije istraživanje novine i sticanje znanja o novoj sredini (Vianna i sar., 2001). Zabeležena je snižena eksploratorna aktivnost propofolske u odnosu na kontrolnu grupu drugog dana testiranja, tj. 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji. Izmenjena vertikalna aktivnost nedvosmisleno ukazuje da propofol može uticati na procese zavisne od hipokampalne aktivnosti, jer vertikalna aktivnost glodara predstavlja jednu od najznačajnijih etoloških mera koje se koriste za procenu hipokampus zavisnog procesa istraživanja, učenja i pamćenja (Lever i sar., 2006). Ovakav bihevioralni ishod ne ukazuje na problem formiranja dugotrajne memorije jer da takav problem postoji eksploratorna aktivnost životinje bi morala biti na identičnom nivou tokom prvog i drugog dana testiranja, što predstavlja potvrdu da sećanje na prethodni susret sa sredinom/prostorom ne postoji (Vianna i sar., 2001). Rezultat našeg istraživanja, u kome se u testu prostorne habituacije drugog dana testiranja smanjuju horizontalna i vertikalna aktivnost propofolske grupe peripubertetskih životinja, dok se trećeg dana povećavaju na nivo inicijalne eksploratorne aktivnosti (Pavkovic i sar., 2018), pokazuje da životinje 24 sata nakon primene anestetika imaju memorisan događaj na susret sa sredinom (koji se desio pre anesteziranja) ali da se ta skladištena memorija neadekvatno poziva/koristi, usled čega procena šta je novo a šta poznato nije adekvatna i delimično poznata sredina se doživljava kao familijarna. Sa metodološke tačke gledišta, smanjena eksploratorna aktivnost (lokomotorna i vertikalna) grupe izložene propofolu tokom drugog dana eksperimenta, praćena povećanom aktivnošću tokom trećeg dana (u odnosu na drugi dan), bi mogla biti posledica pojačane anksioznosti ispitivanih jedinki usled pretretmana, tj. izlaganja propofolu. Naime, prema literaturi (Leussis i Bolivar, 2006) ukoliko je životinja anksiozna, ponovljeno izlaganje istoj sredini može dovesti do povećanja motoričke aktivnosti jer se životinja usled ponovljenog izlaganja sredini postepeno oslobađa straha od nje/novine. Takođe, treba uvek imati u vidu da ponašanje

životinja u novoj sredini zavisi istovremeno od dva kontradiktorna faktora (znatiželja/motivacija za ispitivanjem nove sredine i strah od nove sredine). Analizom podataka dobijenih iz testa otvorenog polja, baziranih na vremenu provedenom u centralnim poljima kaveza, pokazano je da se prirodna averzija na centralnu površinu arene ne menja kod kontrolnih i propofolom tretiranih pacova tokom habituacije. Takođe, rezultati dobijeni u testu svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta ukazuju da propofol ima anksiolitički efekat 24 sata nakon tretmana (kada je drugi dan testa habituacije i sproveden). Ovakav rezultat dodatno potvrđuje da izlaganje propofolskoj anesteziji izaziva memorijske probleme kod peripubertetskih pacova u testu trodnevne prostorne habituacije a ne poteškoće u motoričkom/emocionalnom izvršavanju zadatka (Pavkovic i sar., 2018).

5.2.2. Izlaganje propofolskoj anesteziji otežava prepoznavanje novine objekta u poznatom prostoru

Kako bi dodatno ispitali uticaj opšte anestezije indukovane propofolom na prepoznavanje novine, testirali smo peripubertetske pacove u testu prepoznavanja novog objekta. Test prepoznavanja novog objekta (Ennaceur i Delacour, 1988), je u naučnoj praksi često korišćen za istraživanje promena u epizodičnoj memoriji a bazira se na prirodnom nagonu glodara da istražuju novi objekat zahvaljujući sposobnosti da prepoznaju poznati (familijaran) objekat (više o samom testu je dato u uvodnom delu). Uspešnost testa prepoznavanja novog objekta zavisi od kognitivne sposobnosti jedinke koja je uglavnom proporcionalna starosti jedinke, kao i od dužine retencionog intervala. Retencioni interval predstavlja određeno vreme između faze familijarizacije i test faze, odnosno vreme za koje životinja mora da zadrži sećanje na stari objekat sa kojim je upoznata tokom faze familijarizacije, pre nego što joj se predstavi novi objekat (Silvers i sar., 2007, Reger i sar., 2009, Antunes i Biala, 2012). Dok mlade jedinke starosti 20-23 PND, juvenilne starosti 29-40 PND i adultne 50+ PND mogu da prepoznaju objekat nakon kraćeg retencionog intervala od 0,25 do 1 sata, životinje starosti 20-23 PND imaju problem sa prepoznavanjem objekta nakon retencionog intervala od 24 sata (Reger i sar., 2009). Imajući u vidu da su najznačajnije promene u ponašanju i ispitivanim biohemijskim pokazateljima dopaminske transmisije i sinaptičke i neuronske aktivnosti u našem istraživanju uočeni 24 sata nakon tretmana propofolom (Pavkovic i sar., 2017), kao i da peripubertetske jedinke mogu imati problem sa

prepoznavanjem objekata ukoliko retencioni interval iznosi 48 sati (Reger i sar., 2009), posledice primene propofolske anestezije na dugotrajnu memoriju prepoznavanja su analizirane samo između kontrolne grupe i propofolske grupe testirane 24 sata nakon tretmana.

Protokol za test novog objekta se obavezno sastoji iz faze habituacije (upoznavanje sa sredinom u kojoj će biti predstavljeni objekti), faze familijarizacije (upoznavanje sa dva identična objekta) i test faze (prepoznavanje starog u odnosu na novoprezentovani objekat). U zavisnosti od cilja istraživanja mogu se sprovoditi određene modifikacije prvobitnog protokola, usled čega se ovaj test koristi i za praćenje neofobije, pažnje, smelosti, traženja novine, prostorne memorije, radne memorije i epizodične memorije (revijski prikaz dat u (Blaser i Heyser, 2015)). Zbog toga su eksperimentalni dizajn i validirane procedure neophodne da bi se rezultati dobijeni u testu posmatrali u svetlu promena u memoriji prepoznavanja, a ne nekog drugog aspekta ponašanja.

Modifikacije testa omogućavaju proučavanje različitih aspekata procesa memorisanja i obuhvataju vreme trajanja i broj habituacionih faza, vreme trajanja faze familijarizacije i test faze, kao i retencioni interval između faza (Antunes i Biala, 2012). Npr., kratak retencioni interval (od nekoliko sekundi ili minuta) između faze familijarizacije i test faze omogućava ispitivanje radne memorije kod glodara. Retencioni interval od nekoliko sati omogućava analiziranje kratkotrajne memorije, a od 24 sata i više dugotrajne memorije. Međutim, razlike u karakteristikama objekata koji se koriste, veličini test arene, dužini faza i načinu ocenjivanja aktivnosti su vrlo česte i značajno otežavaju ili čak onemogućavaju upoređivanje podataka između studija dobijenih u različitim laboratorijama, tako da postoji sve veća težnja u naučnoj zajednici za standardizacijom protokola (Cohen i Stackman, 2015).

Dva metodološka pristupa, koja se najčešće sreću u literaturi, u izvođenju testa prepoznavanja novog objekta su (Ainge i sar., 2006):

1. Životinje se postavljaju u test arenu tokom faze familijarizacije gde se zadržavaju dok ne provedu neki definisani vremenski period u istraživanju objekata. Najčešće taj period iznosi 25 – 30 sekundi. Na ovaj način se omogućuje svim životinjama da provedu isto vreme u istraživanju objekata. Međutim, nekim životinjama je potreban kratak vremenski period da ispune definisan vremenski okvir predviđen za

ispitivanje novine i one se brzo uklanjaju iz ekperimentalne arene, dok je drugima potrebno više vremena za ispunjavanje ovog kriterijuma. Prema tome, različitim životinjama je potrebno različito vreme da izvrše ovaj zadatak što može individualno uticati na jačinu formirane memorije (ne postoji tačna procena jačine memorije kod životinja koje brzo prilaze i intenzivno istražuju objekte i kod životinja koje polako i nekontinuirano istražuju objekte i samim tim im treba više vremena da bi postigli efektivnih 30 sekundi istraživanja).

2. Životinje se postavljaju u test arenu (najčešće otvoreno polje) tokom faze familijarizacije sa predmetima i tu se zadržavaju određeni vremenski period. Ovaj period najčešće iznosi 3 – 5 minuta. Problem sa ovakvim pristupom može da bude različito vreme provedeno u ispitivanju objekata kod različitih životinja ili ispitivanih grupa. Očigledno je da različiti nivoi istraživanja objekata mogu da utiču na sticanje familijarnog osećaja za predmete tokom faze familijarizacije, a zatim i na razlike u osećaju familijarnosti između novog i starog objekta tokom test faze. Prema tome, od toga koliko su se životinje upoznale sa predmetima tokom faze familijarizacije zavise razlike u ponašanju u test fazi, tj. u stepenu istraživanja novog u odnosu na stari objekat, što bi trebalo da odražava memoriju prepoznavanja. Odnosno, dobijeni rezultati ne moraju biti odraz problema u prepoznavanju objekata, već nedovoljne familijarizacije sa objektima.

Zbog svega gore navedenog, za svrhe naše studije pribegli smo modifikaciji originalnog protokola za test prepoznavanja novog objekta, što se ogleda kroz: 1) dugotrajne tridesetominutne trodnevne periode habituacije na samu eksperimentalnu arenu, 2) dugotrajnu dvadesetominutnu fazu familijarizacije, koja mladim životinjama dozvoljava spontano istraživanje objekata uz uvažavanje razvojnih karakteristika spontanog ponašanja, 3) dugotrajnu dvadesetominutnu test fazu 1, 4) uvođenje dvadesetominutne test faze 2, koja ima za svrhu testiranje memorijskog potencijala pri izvođenju test faze 1, tj. sposobnosti životinje da tokom upoznavanja novog objekta zaista i memoriše njegove karakteristike i adekvatno rekonsoliduje memoriju, 5) uvođenje petominutnog habituacionog perioda pre svake od tri faze prepoznavanja novog objekta, što je omogućilo procenjivanje eventualnih promena u prostornoj memoriji i što bi moglo da utiče na memorisanje objekta. Takođe, novina u metodološkom pristupu je način analize podataka jer su svi parametri analizirani na 5

minuta, uz dodatno izražavanje ukupne aktivnosti za čitav period registracije u okviru svake faze. Ovakav protokol i način analiziranja podataka (koji do sada nije zabeležen u literaturi) je omogućio povezivanje dobijenih rezultata iz testa prepoznavanja novog objekta sa rezultatima dobijenih u testu prostorne habituacije. Dugotrajna habituacija na test arenu pre tretmana i dugotrajna faza familijarizacije omogućuje da se izostave iz eksperimenta one životinje koje se ekstremno razlikuju od proseka grupe i čije abnormalno ponašanje može uticati na validnost rezultata u testu prepoznavanja novog objekta.

Lokomotorna aktivnost, zabeležena tokom pet minuta pre početka svake faze (koja je služila kao indikator stabilnosti prostorne habituacije), se nije menjala, što predstavlja dokaz da fokus eksploratornih aktivnosti životinja nije bio usmeren ka istraživanju prostora (eksperimentalnog kaveza), već samo ka istraživanju objekata. Na osnovu ukupnog diskriminacionog indeksa tokom faze familijarizacije za ceo period testiranja, može se uočiti da je preferenca za jedan od objekata zanemarljivo mala, iako određena tendencija može da postoji. Dve kontrolne i jedna tretirana životinja su morale biti izostavljene iz analize jer njihov diskriminacioni indeks nije bio u dozvoljenom opsegu (u našoj studiji uslov je bio $DI < -0,2$ i $DI > 0,2$). Ono što je nemoguće uočiti na ukupnom diskriminacionom indeksu je da se preferenca za jedan od predmeta kod životinja može menjati tokom vremena istraživanja, tako da se ovakvo ponašanje može detektovati samo detaljnom analizom parametara u kraćim vremenskim intervalima. Imajući u vidu neizbežne individualne razlike koje mogu uticati na razlike u grupama (formirane po principu slučajnosti), pristupljeno je detaljnoj analizi svih parametara pre i tokom samog eksperimenta kako bi se ustanovila adekvatna uniformnost grupa.

Detekcija novine reprezentuje proces zavisian od pamćenja, jer novi stimulus treba da bude prepoznat kao novi na osnovu poređenja sa prethodno zapamćenim informacijama. Proces prisećanja obuhvata dva različita tipa mnemoničkih informacija. Jedan tip informacija je vezan za familijarnost sa predmetom (u literaturi označen i kao slaba memorija, (Wixted i Squire, 2011)), i obuhvata jednostavne procene o prethodnim aktivnostima, dok je drugi (označen i kao jaka memorija, (Wixted i Squire, 2011)) vezan za detaljno korišćenje memorijskog sadržaja i obuhvata kvalitativni aspekt te aktivnosti. Oba tipa informacija, u zavisnosti od toga da li test procenjuje vizuelne ili nevizuelne attribute memorije, se mogu obrađivati i skladištiti u hipokampusu (Wixted i

Squire, 2011). Literaturni podaci ukazuju da je dorzalni hipokampus od izrazitog značaja za obradu i skladištenje informacija sa prostorno zavisnim kontekstom, dok se kontekst nezavisno prepoznavanje objekata može vršiti pomoću procesa nezavisnih od aktivnosti hipokampusa, tačnije u velikoj meri zavise od aktivnosti peririnalnog regiona kore velikog mozga (Brown i Aggleton, 2001, Lee i sar., 2005, Oliveira i sar., 2010). Prema ovoj hipotezi, familijarnost, odnosno prepoznavanje prethodno uočenog predmeta zavisi od aktivnosti peririnalnog regiona kore velikog mozga, dok prisećanje (rekolekcija), odnosno sećanje na određene detalje tog predmeta zavisi od aktivnosti hipokampusa (Cohen i Stackman, 2015). Uprkos velikom značaju peririnalnog regiona kore velikog mozga u prepoznavanju novog objekta, ne može se isključiti ni značaj hipokampusa u ovom procesu. Objašnjenje nesuglasica u različitim studijama povodom uloge navedenih regiona u prepoznavanju objekata se može naći u činjenici da memorija prepoznavanja može postojati u rasponu od slabe do jake, pri čemu je kodiranje, konsolidacija i prisećenje samo jake memorije zavisna od hipokampalne aktivnosti. Prema ovoj hipotezi (Wixted i Squire, 2011) informacije o predmetima se prikupljaju, obrađuju i skladište u peririnalnom regionu kore velikog mozga do određenog graničnog nivoa. Kada se dosegne neophodna količina informacija, koja se uslovno može meriti intenzivnim istraživanjem objekata u trajanju od 30 i više sekundi, dolazi do njihovog prenošenja u hipokampus, a da bi se ovo desilo smatra se da retencioni interval mora da bude duži od 10 minuta i da pri kraćim retencionim intervalima ovaj proces transfera informacija izostaje (Cohen i Stackman, 2015). Ako granični nivo nije dosegnut, informacije ostaju zavisne od aktivnosti peririnalnog regiona u vidu slabe memorije. Ako je granični nivo dosegnut i retencioni interval adekvatan informacije postaju zavisne od aktivnosti hipokampusa u vidu jake memorije. Što više vremena životinja provede u istraživanju objekata tokom faze familijarizacije, memorija postaje jača i osetljivija na izmenjenu aktivnost hipokampusa, a manje na izmenjenu aktivnost peririnalnog regiona kore velikog mozga.

U našem eksperimentu je upravo modifikacija protokola, koja je obuhvatala dvadesetominutnu fazu familijarizacije, kao i retencioni interval od 24 sata, omogućila životinjama dovoljno vremena da steknu onu količinu informacija o predmetima neophodnu za skladištenje informacija u hipokampus. Ovoj konstataciji doprinosi činjenica da mlade eksperimentalne životinje značajno manje istražuju objekte tokom

poslednjih 5 minuta familijarizacione faze, što je podatak od metodološkog značaja jer ukazuje da je 15-minutni period familijarizacije neophodan da bi se mlade životinje spontano i detaljno upoznale sa objektima.

Rezultati naše studije (Pavkovic i sar., 2018) su pokazali da izlaganje propofolskoj anesteziji nije uticalo na sposobnost prepoznavanja novog objekta na početku test faze 1, tj u prvih 5 minuta testiranja, 24 sata nakon tretmana, što bi moglo da ukazuje na neizmenjenu slabu memoriju (tj, procenu familijarnosti novog u odnosu na stari predmet). Međutim, ukupna preferenca ka novini (koja podrazumeva i korišćenje jake memorije) tokom test faze 1 je bila smanjena kod tretiranih u odnosu na kontrolne životinje. Ovakav rezultat ukazuje da je prisećanje, tj. pozivanje memorije na stare objekte, otežano 24 sata nakon anestezije propofolom i da ažuriranje memorije na stari objekat utiče na istraživanje novog objekta (Ennaceur, 2010). Pored toga, za razliku od kontrolnih, preferenca ka novom objektu je bila prisutna kod grupe izložene propofolskoj anesteziji i narednog dana (48 sati nakon tretmana), što ukazuje da tokom test faze 1 karakteristike novog objekta nisu adekvatno memorisane – nastala je slaba memorija koja se tokom test faze 2 još uvek dopunjuje kod propofolske grupe životinja (Pavkovic i sar., 2018). Nisu detektovane razlike između kontrolne i tretirane grupe u ukupnom vremenu provedenom u istraživanju objekata (ni tokom faze familijarizacije, ni tokom test faza), što ukazuje da otežana sposobnost učenja kod tretirane grupe nije posledica neadekvatne pažnje ili povećane anksioznosti. Značaj dugotrajne faze testiranja za pozitivan ishod učenja u navedenoj modifikovanoj verziji testa prepoznavanja novog objekta je neophodno dodatno ispitati ali izgleda da, makar kod mladih životinja, istraživanje tokom ukupnog dvadesetominutnog perioda (ne samo tokom prvih 5 minuta test faze 1, kada je DI bio značajno iznad nule) specifično doprinosi jačanju memorije (Pavkovic i sar., 2018).

Uticaj propofolske anestezije na preciznost procene novine u testu prostorne habituacije je očigledan na početku test sesije. Sa druge strane u testu prepoznavanja novog objekta izlaganje propofolskoj anesteziji otežava adekvatno formiranje stabilne (neprostorne) memorije, pri čemu je memorija vraćena u aktivno stanje (nakon prisećanja) slaba, a to se uočava tek nakon dužeg trajanja test sesija. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa činjenicom da je prostorna memorija osetljivija na izmenjenu aktivnost hipokampusu od kontekst nezavisne memorije prepoznavanja (Broadbent i sar., 2004).

5.2.3. Izlaganje propofolskoj anesteziji smanjuje ekspresiju fosforilisane forme TrkB receptora u hipokampusu peripubertetskih pacova 24 sata nakon tretmana

Problemi memorisanja informacija 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji u testu prostorne habituacije i testu prepoznavanja novog objekta su praćeni promenama u ekspresiji proteina u dorzalnem hipokampusu, koji su uključeni u procese prisećanja/rekonsolidacije memorije. U našem istraživanju detektovano sniženje nivoa aktivne (fosforilisane) forme TrkB proteina 24 sata nakon propofolske anestezije u dorzalnem hipokampusu je praćeno snažnim trendom (bez statističke značajnosti) smanjenja nivoa BDNF proteina. Iako je prepoznat značaj BDNF i TrkB proteina fosforilisanog na tirozinu 816 u regulaciji nivoa unutarćelijskog Ca^{2+} , procesa LTP-a i formiranju dugotrajne memorije (pogledati u poglavlju 1.7.2.1.), uloga BDNF/TrkB proteina u ranim fazama memorisanja je slabo okarakterisana i dostupni podaci se u najvećoj meri odnose na averzivno učenje. Pokazano je da konsolidacija memorije u testu inhibitornog izbegavanja kod pacova zavisi od aktivnosti BDNF/TrkB signalne kaskade koja je praćena sintezom proteina u hipokampusu (Bambah-Mukku i sar., 2014). Ekspresija BDNF proteina je od značaja za proces konsolidacije memorije, ali ne i rekonsolidacije memorije na averzivni doživljaj, gde Egr-1 ima primarnu ulogu (Lee i sar., 2004). Međutim, aktivnost TrkB proteina u dorzalnem hipokampusu rano nakon učenja je neophodna za formiranje memorije u testu inhibitornog izbegavanja, a blokiranje ovog receptora nakon prisećanja redukuje pamćenje na averzivni događaj, što sugeriše na ulogu TrkB u rekonsolidaciji memorije. Inhibicija BDNF proteina u hipokampusu neposredno pred izlaganje životinja testu inhibitornog izbegavanja anulira učenjem izazvanu indukciju pCREB i pCaMKII proteina uključenih u sinaptičku plastičnost i konsolidaciju memorije (Chen i sar., 2012, Bambah-Mukku i sar., 2014). Pokazano je da CaMKII α -BDNF-CREB zavisni molekularni putevi posredstvom glukokortikoidnih receptora regulišu formiranje dugotrajne memorije (Chen i sar., 2012). Pored toga, BDNF je u hipokampusu neophodan za kasnu fazu dugotrajne potencijacije u kojoj CaMKII α takođe ima važnu ulogu.

Na osnovu iznetih literaturnih podataka, smanjena fosforilacija/aktivnost pTrkB^{Y816} receptora i BDNF proteina u našem istraživanju može da doprinese destabilizaciji memorije 24 sata nakon propofolske anestezije, što se može odraziti na

zabeležene probleme sa prisećanjem u testovima prostorne habituacije i prepoznavanja novog objekta.

5.2.4. Izlaganje propofolskoj anesteziji smanjuje ekspresiju Egr-1 proteina u hipokampusu peripubertetskih pacova 24 sata nakon tretmana

U našoj studiji (Pavkovic i sar., 2018) smanjen nivo ekspresije pTrkB^{Y816} 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji u dorzalnom hipokampusu je bio praćen smanjenom ekspresijom Egr-1 proteina, što je u skladu sa literaturom jer se zna da je Egr-1 ekspresija pod direktnom/indirektnom kontrolom pTrkB^{Y816} (Minichiello i sar., 2002). Egr-1, uvršćen u porodicu gena neposrednog ranog odgovora, je uključen u razne aspekte pamćenja, međutim najvažniju ulogu ima u održavanju prikupljenih informacija u memorijskom sistemu tokom vremenskog perioda od 24 sata (Jones i sar., 2001) i rekonsolidaciji memorije prepoznavanja nakon prisećanja (Bozon i sar., 2003). Ovakva uloga Egr-1 proteina u procesima pamćenja je procenjena na osnovu rezultata dobijenih na genetički modifikovanim miševima, gde je delimično ili potpuno umanjena aktivnost Egr-1. Pokazano je da gubitak aktivnosti Egr-1 u hipokampusu redukuje kasnu dugotrajnu potencijaciju (L-LTP) kao i formiranje dugotrajne memorije nakon testova vezanih za navigaciju u prostoru, preferencu hrane i prepoznavanje objekata (Jones i sar., 2001). Iako Egr-1, prema nekim istraživanjima, ima ulogu prvenstveno u rekonsolidaciji određenih tipova memorije (Lee i sar., 2004), ima indikacija da pored uloge u rekonsolidaciji može imati ulogu i u konsolidaciji memorije, jer su Egr-1 genetički izmenjeni miševi onemogućeni da konsoliduju informacije o prostornoj lokaciji i karakteristikama objekata (Bozon i sar., 2003).

U našem istraživanju peripubertetski pacovi 24 sata nakon izlaganja propofolu nisu imali problema sa inicijalnim prepoznavanjem novog objekta. To je u skladu sa literaturnim podacima dobijenim na genetički modifikovanim miševima kod kojih izmenjena funkcija Egr-1 može da bude prevaziđena u uslovima produženog izlaganja objektima (Besnard i sar., 2013), kao što je slučaj u našem istraživanju, pri čemu inaktivacija Egr-1 ne utiče na prisećanje. To navodi na zaključak da Egr-1 nije od presudnog značaja za proces prepoznavanja novog objekta. Međutim konsolidovana i stabilna memorija tokom prisećanja postaje labilna nakon kratke reaktivacije, i miševi kod kojih je smanjena aktivnost Egr-1 ne mogu da rekonsoliduju memoriju na objekte i prostor (Davis i sar., 2010, Besnard i sar., 2013).

Dugo nakon formiranja dugotrajne memorije hipokampus ostaje aktivan, pri čemu se smatra da kasniji talasi ekspresije Egr-1 imaju važnu ulogu u održavanju memorijskog otiska tokom vremena (Katche i sar., 2012). Upravo ovi odloženi talasi ekspresije gena ranog odgovora mogu biti deo molekulskih mehanizama značajnih za održavanje memorije. Imajući u vidu da Egr-1 kontroliše ekspresiju gena kasnog odgovora, kao i da je očuvanje memorije povezano sa remodelovanjem sinapsi i dendritskih trnova i formiranjem novih sinaptičkih veza, kasna Egr-1 zavisna transkripcija može biti neophodna za ekspresiju efektorskih gena čiji su proteinski produkti od značaja za proces sinaptičkog remodelovanja i održavanje formirane dugotrajne memorije (Katche i sar., 2012). Ovoj konstataciji doprinose istraživanja koja ukazuju na važnost Egr-1 u kontroli kaskada proteina koji regulišu proces degradacije proteina (James i sar., 2006).

Pored navedenog, kasna faza konsolidacije, zavisana od ekspresije i sinteze BDNF proteina u dorzalnem hipokampusu, je važna za održavanje skadištene memorije (Bekinschtein i sar., 2007). Podatak da je aktivacija kinaze ERK 1/2 deo ushodne kaskade koja učestvuje u regulaciji Egr-1 ekspresije, pri čemu je kasna aktivacija ERK 1/2 indukovana BDNF-om u hipokampusu, ukazuje na važnost Egr-1 proteina u održavanju memorijskog otiska tokom vremena. Mora se još jednom naglasiti da su problemi u memorisanju zavisni od aktivnosti Egr-1 opisani na genetički modifikovanim životinjama u kojima je aktivnost ovog gena potpuno ili delimično utišana. Ovakvi modeli ne mogu dati jasnu sliku o procesima zavisnim od Egr-1 kada su u pitanju zdrave, genetički nemodifikovane (engl. *Wild type*) životinje jer je teško sa sigurnošću utvrditi na koji način organizam kompenzuje nedostatak aktivnosti gena izazvan veštačkim manipulacijama i kako se to odražava na promene u ponašanju. U „*wild type*“ životinjama aktivnost određenog gena izazvana određenim stimulusom zavisi od fine regulacije ushodnih i nishodnih signalnih puteva koji utiču na ekspresiju tog gena. Naša studija (Pavkovic i sar., 2018) po prvi put ukazuje da su problemi u memorijskom procesu, odnosno prisećanju starih i usvajanju novih informacija 24 sata nakon injeciranja propofola, kod peripubertetskih pacova praćeni smanjenom ekspresijom Egr-1 proteina u dorzalnem hipokampusu.

5.2.5. Izlaganje propofolskoj anesteziji povećava nivo fosforilisane forme CaMKII α u hipokampusu peripubertetskih pacova 24 sata nakon tretmana

Iako prisećanje ne zavisi direktno od ekspresije CaMKII, izmenjena aktivnost ovog proteina/kinaze može imati važnu ulogu u destabilizaciji memorije nakon procesa prisećanja (Vigil i sar., 2017). Šta više, nekonzistentnost u aktivnosti CaMKII može da doprinese formiranju nestabilne memorije (Wang i sar., 2008). Studije na genetički modifikovanim životinjama su pokazale da prolazna povećana aktivnost CaMKII tokom procesa prisećanja može izazvati gubitak memorije koja se vraća u aktivno stanje tokom prisećanja (Cao i sar., 2008). Sa druge strane, pokazano je da je autofosforilacija treonina na poziciji 286 u aminokiselinskoj sekvenci CaMKII α u okviru dorzalnog hipokampusa nakon prisećanja zavisna od aktivnosti CaMK2N1, endogenog inhibitora CaMKII, odnosno da je ovaj inhibitor neophodan za održavanje dugotrajne memorije nakon prisećanja (Vigil i sar., 2017). Saglasno ovim činjenicama, značajan porast aktivnosti CaMKII, koja se ogleda u povišenom nivou fosforilisane u odnosu na ukupnu formu ovog proteina, što je detektovano u našem istraživanju 24 sata nakon tretmana propofolom (Pavkovic i sar., 2018), može da doprinese destabilizaciji stare memorije tokom prisećanja i da oslabi konsolidaciju novostečene (drugog dana testiranja). Navedeno je takođe u saglasnosti sa ponašanjem životinja 48 sati nakon propofolske anestezije (treći dan testiranja) kada je zabeležena visoka eksploratorna/istraživačka aktivnost u testu prostorne habituacije, ali i evidentna preferenca ka novom objektu u testu prepoznavanja novog objekta.

Jako malo se zna na koji način CaMKII reguliše proces dugotrajnog pamćenja, konsolidacije i rekonsolidacije memorije nakon prisećanja. CaMKII je od ključne važnosti za regulaciju dugotrajne potencijacije i sinaptičke plastičnosti (Davis i Laroche, 2006). Ovaj protein je značajan i u procesu regulacije sinteze i degradacije proteina, procesa koji su opisani kao ključni za stabilizaciju dugotrajne memorije (Jarome i Helmstetter, 2014). Prema tome, povećana aktivnost CaMKII tokom prisećanja se može smatrati neželjenim događajem u pogledu stabilnosti reaktivirane memorije jer može da utiče na različite biohemijske puteve koji pospešuju degradaciju sinaptičkih proteina, favorizujući destabilizaciju memorije i ometajući postojanost a samim tim i adekvatno korišćenje već usvojenih informacija (Cao i sar., 2008).

5.2.6. Izlaganje propofolskoj anesteziji smanjuje ekspresiju fosforilisane forme Erk2 proteina u hipokampusu peripubertetskih pacova nakon tretmana

MAP kinaze (MAPK/ERK) imaju značajnu ulogu u procesu konsolidacije različitih tipova dugotrajne memorije. One su poznate kao glavni efektorski regulatori genske ekspresije u odgovoru na neuronsku/neuralnu aktivaciju (Davis i sar., 2010, Sweatt, 2001). Poznato je da u neavertivnim testovima, kao što je test prepoznavanja novog objekta, istraživanje objekata odnosno novine izaziva fosforilaciju MAPK/ERK proteina (Kelly i sar., 2003). Takođe je poznato da ERK može da reguliše transkripciju Egr-1 koji je neophodan za rekonsolidaciju, ali i konsolidaciju informacija o objektima, kao i položaju objekata u prostoru (Jones i sar., 2001). Smatra se da ERK ima značajnu ulogu tokom prisećanja, Egr-1 u rekonsolidaciji, a da je MAPK/ERK-CREB-Egr-1 signalna kaskada od ključne važnosti za konsolidaciju i stabilizaciju dugotrajne memorije prepoznavanja (Davis i Laroche, 2006).

U našem istraživanju (Pavkovic i sar., 2018) je detektovano smanjenje nivoa pERK2 proteina, koji je selektivniji za procese učenja kod sisara od ERK1 proteina (Giovannini, 2006). Literaturni podaci pokazuju da je detekcija novine u testu prostorne habituacije takođe povezana sa brзом i reverzibilnom aktivacijom ERK1/2 proteina (Vianna i sar., 2000). Za hipokampus zavisno učenje sposobnost adekvatnog prisećanja je proporcionalna aktivnosti ERK1/2 u periodu testiranja (Szapiro i sar., 2000). Prema tome, može se pretpostaviti da je smanjena ekspresija fosforilisane forme ERK2 proteina tokom memorijskog testiranja u našem eksperimentu doprinela neadekvatnoj proceni prostorne novine kod grupe tretirane propofolom (Pavkovic i sar., 2018). U testu prepoznavanja novog objekta nije ometeno inicijalno prepoznavanje novog objekta, što je generalno u skladu sa hipotezom da je dorzalni hipokampus (tj. dentatni girus) presudan za prepoznavanje novine prostora ali ne i objekta (Broadbent i sar., 2004, Lee i sar., 2005, Hunsaker i sar., 2008).

5.2.7. Izlaganje propofolskoj anesteziji povećava FosB/ Δ FosB imunoreaktivnost u granularnim ćelijama dorzalnog dentatnog girusa 24 sata nakon tretmana

Kako bi procenili da li aktivacija, odnosno ekspresija navedenih proteina (koji su deo signalnog puta između jedra i sinapsi) utiče na neuronsku aktivnost u okviru definisanih subregiona hipokampusa, ispitivali smo da li tretman propofolom utiče na ekspresiju FosB/ Δ FosB proteina u CA1, CA3 i regionu dentatnog girusa nakon tretmana

(Pavkovic i sar., 2018). Iako nisu zabeležene značajne razlike u zastupljenosti FosB proteina na nivou celog dorzalnog hipokampusa (pokazano Western blot metodom), detektovana je povećana FosB/ Δ FosB imunoreaktivnost u granularnim ćelijama dorzalnog dentatnog girusa i smanjena (bez statističke značajnosti) imunoreaktivnost u piramidalnim neuronima CA3 regiona, 24 sata nakon izlaganja propofolskoj anesteziji, kada su u testovima ponašanja uočene memorijske poteškoće.

Dorzalni dentatni girus je od izuzetnog značaja za procesuiranje prostornih informacija i detekciju prostornih novina, što je od presudnog značaja za memoriju prepoznavanja (Lee i sar., 2005, Hunsaker i sar., 2008). Granularne ćelije DG-a kontrolišu aktivnost piramidalnih neurona CA3 regiona putem monosinaptičke ekscitacije i disinaptičke inhibicije (Mori i sar., 2004, Prince i sar., 2016). Aksoni granularnih ćelija, označeni kao mahovinasta vlakna (engl. *Mossy fibers*) ekscitiraju 10 puta više GABA-ergičkih interneurona u *stratum lucidum*-u nego piramidalnih ćelija u CA3 (Prince i sar., 2016). S obzirom da je disinaptička inhibicija dominantnija, povećana aktivnost glutamatergičkih granularnih ćelija DG-a ima za posledicu smanjenje aktivnosti pre nego stimulaciju piramidalnih neurona CA3 regiona, što je u našoj studiji i pokazano (posredstvom ekspresije FosB/ Δ FosB), mada ovaj efekat u CA3 regionu nije dostigao statističku značajnost. Pored toga, niska aktivnost granularnih ćelija dentatnog girusa je jedan od preduslova za uspešno razdvajanje signala koji dolaze u hipokampus, što predstavlja proces neophodan za adekvatno procesuiranje informacija i procenu prostorne novine (Deng i sar., 2010). Shodno navedenom, rezultati naših istraživanja ukazuju da povećana aktivnost granularnih neurona dorzalnog dentatnog girusa ometa adekvatnu procenu novine prostora, tj. šta je familijarno a šta ne u testu prostorne habituacije (ali ne u testu prepoznavanja novog objekta) i remeti normalnu aktivnost neuralnih mreža u hipokampusu (Pavkovic i sar., 2018). Novija istraživanja takođe pokazuju da prekomerna ekspresija FosB/ Δ FosB proteina u hipokampusu izaziva probleme tokom učenja i pamćenja slične onima detektovanim nakon smanjene ekspresije ovog proteina, što se objašnjava gubitkom novih informacija zbog poremećenih odnosa signala i šuma (engl. *Signal-to-noise ratio*) izazvanog prekomernom aktivnošću neurona u trenutku priliva novih informacija (Eagle i sar., 2015).

5.3. Izlaganje propofolskoj anesteziji povećava nivo fosforilisane forme Aducinβ proteina u medijalnom prefrontalnom korteksu, talamusu, strijatumu i hipokampusu peripubertetskih pacova

Poznato je da opšta anestezija može da izazove promene u precizno podešenom ekvilibrijumu ekscitatorne i inhibitorne neurotransmisije, što kasnije može da izazove dugotrajne promene na sinaptičkim kontaktima koji su u procesu formiranja, ali i na već formiranim sinaptičkim vezama (Pearn i sar., 2012, Yu i sar., 2013, Sitdikova i sar., 2014). Morfometrijske analize ukazuju da propofol izaziva gubitak ekscitatornih i inhibitornih sinapsi, menja presinaptičku mitohondrijalnu morfogenezu, menja gustinu i morfologiju dendritskih nastavaka, dužinu dendrita i obrazac grananja (Vutskits i sar., 2005, Lunardi i sar., 2015). Veruje se da je neadekvatno formiranje sinapsi u osnovi različitih neuralnih poremećaja koji nastaju tokom razvića (Briner i sar., 2011, Sprung i sar., 2012.). Sve je veći broj kliničkih studija koje ukazuju da su mnogobrojni neurološki poremećaji (npr. mentalna retardacija, Alchajmerova bolest) praćeni izmenama u morfologiji trnova i broju sinapsi (Vutskits, 2012, Schaefers i Teuchert-Noodt, 2016.).

Najveći broj eksperimentalno dobijenih podataka o uticaju propofolske anestezije na sinaptičku plastičnost je zabeležen tokom ranog perioda razvića. Prethodni rezultati studija naše laboratorije u velikoj meri doprinose ovim saznanjima. Pokazano je da izlaganje propofolskoj anesteziji tokom neonatalnog perioda izaziva značajne promene u ekspresiji pre-, tran- i postsinaptičkih molekula, što se u funkcionalnom smislu odražava na izmenjen bihevioralni odgovor u kasnijem (adolescentnom i adultnom) periodu (Pestic i sar., 2015, Milanovic i sar., 2017). Međutim, jako malo se zna da li i kako primena propofola (jednog od najčešće korišćenih anestetika u kliničkoj praksi) u periodu adolescencije (periodu razvića sa izraženim promenama u sinaptičkoj reorganizaciji i transmisiji) utiče na sinaptičku plastičnost.

Rezultati naše studije su po prvi put pokazali da izlaganje peripubertetskih pacova propofolskoj anesteziji izaziva povećanje u ekspresiji fosforilisane forme Aducinβ proteina u mPFC-u, strijatumu i hipokampusu, dok u talamusu nisu zabeležene značajne promene. Imajući u vidu da aducini kontrolišu polimerizaciju aktina, ovakav rezultat ukazuje da su sve ispitivane strukture (izuzev talamusa) podložne izraženim sinaptičkim modifikacijama i reorganizaciji nakon propofolske anestezije. Prema

literaturnim podacima, povećan nivo fosforilacije Aducin β proteina može biti posledica povećane aktivnosti PKC, koja fosforilacijom MARCKS regiona (uz interakciju ovog regiona sa Ca²⁺/CaM) favorizuje destabilizaciju aktinskih filamenata (pogledati poglavlje 1.8.). Oskudni literaturni podaci ukazuju da propofol zaista može da aktivira PKC (Hemmings i Adamo, 1994, Wickley i sar., 2006, Wickley i sar., 2009). Pored toga je pokazano da propofol izaziva reorganizaciju aktina u pacovskim neuronima i ćelijama gljive gajenih u kulturi (Jensen i sar., 1994). Retrakcija neurita, koja je zabeležena nakon izlaganja propofolu, je upravo zavisna od stabilnosti kompleksa aktin i miozin II (Turina i sar., 2008). Ove promene u reorganizaciji aktina nakon primene propofola su povezane sa promenom u koncentraciji unutarćelijskog Ca²⁺, jer nisu detektovane kad se koncentracija Ca²⁺ vratila na bazalni nivo (Jensen i sar., 1994). Zanimljivo je da je ekspresija aktivne/fosforilisane forme CaMKII α proteina (CaMKII α se aktivira fosforilacijom nakon porasta nivoa unutarćelijskog Ca²⁺ (Daft i sar., 2013)) u našem istraživanju povećana u svim strukturama gde je zabeležen visok nivo fosforilisane forme Aducin β proteina (mPFK-u, strijatumu i hipokampusu, ali ne u talamusu). CaMKII ima dvostruku ulogu u ekscitatornoj sinaptičkoj plastičnosti: signalnu ulogu tokom prolaznih perioda povećanja neuralne aktivnosti i strukturnu ulogu tokom bazalnog nivoa neuralne aktivnosti (Okamoto i sar., 2009). Prema ovim autorima u bazalnim uslovima β subjedinica CaMKII proteina pomoću regiona koji ne poseduje α subjedinica vezuje aktinske filamente i održava stabilnost citoskeleta trnova. Povećan nivo Ca²⁺ inicira kinaznu aktivnost CaMKII, njenu autofosforilaciju i oslobađanje od aktinskih filamenata što omogućuje: a) kinazi da fosforiliše druge signalne i vezujuće proteine, b) prolaznu fleksibilnost aktinskom citoskeletu i remodelovanje dendritskih trnova. Treba imati u vidu da fosforilacija jedne subjedinice može izazvati brzu fosforilaciju i aktivnost drugih subjedinica (Okamoto i sar., 2009), ali i da CaMKII α , prema novijim istraživanjima, može takođe da vezuje filamentozni aktin (F-aktin), ali sa tri puta manjim afinitetom nego CaMKII β (Khan i sar., 2016). Imajući u vidu da je povećana ekspresija fosforilisane forme Aducin β proteina praćena povećanom ekspresijom pCaMKII α proteina u istim regionima mozga, a da aducin svojim MARCKS regionom može interagovati sa Ca²⁺/CaM, zajednička aktivnost ova dva proteina mogla bi da doprinese destabilizaciji i reorganizaciji sinapsi u mPFK-u, strijatumu i hipokampusu, što se dalje manifestuje kroz funkcionalne promene. Poznato

je da kokain, primenjen akutno, može privremeno povećati fosforilaciju aducin proteina u strijatumu i NAc-u, dok farmakološka istraživanja ukazuju da je ovaj proces zavisao od signalnih procesa koji se odvijaju preko D1 receptora i aktivacije PKC (Lavaur i sar., 2009). U našem istraživanju je upravo u strijatumu zabeležen najizraženiji porast nivoa fosforilisane forme aducin proteina. Fosforilacija aducina remeti stabilnost citoskeleta postsinapse jer omogućava polimerizaciju aktina i formiranje novih sinaptičkih kontakata, a kasnija defosforilacija aducina izaziva ponovno povezivanje ovog proteina sa aktinskom mrežom i stabilizaciju novonastalih sinaptičkih kontakata. Ovakva uloga aducina je u saglasnosti sa istraživanjima dobijenim na miševima kod kojih gubitak Aducina β izaziva posredne i dugotrajne posledice na sinaptičku plastičnost u hipokampusu i poteškoće u prostornom učenju (Rabenstein i sar., 2005, Lavaur i sar., 2009). Naša buduća istraživanja će biti usmerena ka ispitivanju drugih molekula uključenih u organizaciju i funkcionisanje sinapsi, kako bi dobili jasniju sliku o uticaju opšte propofolske anestezije tokom periadolescentnog perioda na sinaptičku plastičnost.

ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim zadacima istraživanja ove doktorske disertacije, zaključci se mogu izložiti kroz tri celine.

1. Primena propofolske anestezije kod juvenilnih/peripubertetskih pacova izaziva prolazne promene na molekulskom nivou u različitim moždanim regionima, kao i promene u ponašanju, koje su već opisane nakon primene supstanci sa zavisničkim/adiktivnim potencijalom. To se ogleda kroz:

a) promene u ekspresiji fosforilisane/aktivirane forme DARPP-32 proteina (pokazatelja postsinaptičke dopaminske signalizacije) u talamusu, 4 i 24 sata nakon tretmana, što je praćeno povećanom ekspresijom FosB/ Δ FosB proteina, biohemijskog pokazatelja neuronske aktivnosti. Promene su lokalizovane u paraventrikularnom talamičkom jedru, za koga se zna da se aktivira prirodnim stimulusima sa nagrađujućim efektom kao i drogama koje izazivaju zavisnost;

b) povećanje ekspresije fosforilisane forme CaMKII α , biohemijskog senzora sinaptičke aktivnosti za koje se zna da ima važnu ulogu u pamćenju prethodnog izlaganja adiktivnim supstancama, u strijatumu i medijalnom prefrontalnom regionu kore velikog mozga 24 sata nakon tretmana;

c) smanjen intenzitet anksioznog ponašanja (procenjeno na osnovu rezultata u testu svetlo/tamne kutije i uzdignutog krstastog lavirinta) 24 sata nakon tretmana, kada je uočen i pad u ekspresiji FosB proteina u strijatumu, što se može tumačiti kao traženje senzacija usled smanjene aktivnosti moždanog regiona značajnog za osećaj zadovoljstva;

d) pojačan motorički odgovor na d-amfetamin i fenciklidin 24 sata nakon tretmana (ukrštena senzitivizacija), kao potvrda da bez obzira na različite primarne mehanizme dejstva propofol i dve korišćene droge koriste iste neuronske puteve za ostvarivanje psihomotoričkih efekata.

2. Primena propofolske anestezije kod juvenilnih/peripubertetskih pacova utiče na neaverzivnu memoriju i izaziva prolazne promene u ekspresiji molekula značajnih za memorijski proces u dorzalnom hipokampusu, 24 sata nakon tretmana. To se ogleda kroz:

a) poteškoće u pozivanju memorije i prepoznavanju novine, kao i memorisanju novih informacija, u testovima prostorne habituacije i prepoznavanja novog objekta;

b) povećanu ekspresiju FosB/ Δ FosB proteina, biohemijskog pokazatelja neuronske aktivnosti, u dorzalnog regionu dentatnog girusa u periodu memorijskog testiranja, što može da doprinese otežanom prepoznavanju novine;

c) promene u ekspresiji molekula koji učestvuju u pozivanju i rekonsolidaciji epizodične memorije (BDNF/TrkB, Egr-1, ERK1/2, CaMKII α), u dorzalnog hipokampusu u periodu memorijskog testiranja.

3. Primena propofolske anestezije kod juvenilnih/peripubertetskih pacova izaziva prolazne promene u ekspresiji fosforilisane forme A β proteina u medijalnom prefrontalnom regionu kore velikog mozga, strijatumu i hipokampusu (ali ne i talamusu), što ukazuje na destabilizaciju citoskeleta i sinaptičku reorganizaciju.

Gledano u celini, rezultati ove studije su ukazali da bolje razumevanje bioloških posledica primene propofola u juvenilnom/pubertetskom uzrastu može doprineti sagledavanju starosno zavisnih zdravstvenih rizika tretmana, koji su do sada intenzivno istraživani samo u ekstremima životne dobi, tj. u ranoj postnatalnoj i kasnoj životnoj fazi.

LITERATURA

- ADEMBRI, C., VENTURI, L. & PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. 2007. Neuroprotective effects of propofol in acute cerebral injury. *CNS Drug Rev*, 13, 333-51.
- AINGE, J. A., HERON-MAXWELL, C., THEOFILAS, P., WRIGHT, P., DE HOZ, L. & WOOD, E. R. 2006. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behav Brain Res*, 167, 183-95.
- ALKIRE, M. T., HUDETZ, A. G. & TONONI, G. 2008. Consciousness and anesthesia. *Science*, 322, 876-80.
- ALVES, H. N., DA SILVA, A. L., OLSSON, I. A., ORDEN, J. M. & ANTUNES, L. M. 2010. Anesthesia with intraperitoneal propofol, medetomidine, and fentanyl in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 49, 454-9.
- ANDERSEN, S. L., DUMONT, N. L. & TEICHER, M. H. 1997. Developmental differences in dopamine synthesis inhibition by (+/-)-7-OH-DPAT. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 356, 173-81.
- ANDERSEN, S. L., THOMPSON, A. P., KRENZEL, E. & TEICHER, M. H. 2002. Pubertal changes in gonadal hormones do not underlie adolescent dopamine receptor overproduction. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 683-91.
- ANDERSON, S. M., FAMOUS, K. R., SADRI-VAKILI, G., KUMARESAN, V., SCHMIDT, H. D., BASS, C. E., TERWILLIGER, E. F., CHA, J. H. & PIERCE, R. C. 2008. CaMKII: a biochemical bridge linking accumbens dopamine and glutamate systems in cocaine seeking. *Nat Neurosci*, 11, 344-53.
- ANTUNES, M. & BIALA, G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 13, 93-110.
- ARAIN, M., HAQUE, M., JOHAL, L., MATHUR, P., NEL, W., RAIS, A., SANDHU, R. & SHARMA, S. 2013. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatry Dis Treat*, 9, 449-61.
- ARIAS-CARRION, O., STAMELOU, M., MURILLO-RODRIGUEZ, E., MENENDEZ-GONZALEZ, M. & POPPEL, E. 2010. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med*, 3, 24.
- ASKITOPOULOU, H., RAMOUTSAKI, I. A. & KONSOLAKI, E. 2000. Analgesia and anesthesia: etymology and literary history of related Greek words. *Anesth Analg*, 91, 486-91.
- ATKINS, C. M. 2011. Decoding hippocampal signaling deficits after traumatic brain injury. *Transl Stroke Res*, 2, 546-55.
- BAMBAH-MUKKU, D., TRAVAGLIA, A., CHEN, D. Y., POLLONINI, G. & ALBERINI, C. M. 2014. A positive autoregulatory BDNF feedback loop via C/EBPbeta mediates hippocampal memory consolidation. *J Neurosci*, 34, 12547-59.
- BARSON, J. R. & LEIBOWITZ, S. F. 2015. GABA-induced inactivation of dorsal midline thalamic subregions has distinct effects on emotional behaviors. *Neurosci Lett*, 609, 92-6.
- BEAULIEU, J. M., ESPINOZA, S. & GAINETDINOV, R. R. 2015. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol*, 172, 1-23.
- BEAULIEU, J. M. & GAINETDINOV, R. R. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 63, 182-217.

- BEDNAREK, E. & CARONI, P. 2011. beta-Adducin is required for stable assembly of new synapses and improved memory upon environmental enrichment. *Neuron*, 69, 1132-46.
- BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., IGAZ, L. M., BEVILAQUA, L. R., IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53, 261-77.
- BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. 2008. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist*, 14, 147-56.
- BENNETT, V., GARDNER, K. & STEINER, J. P. 1988. Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directed assembly at the spectrin-actin junction. *J Biol Chem*, 263, 5860-9.
- BESNARD, A., CABOCHE, J. & LAROCHE, S. 2013. Recall and reconsolidation of contextual fear memory: differential control by ERK and Zif268 expression dosage. *PLoS One*, 8, e72006.
- BI, G. & POO, M. 2001. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annu Rev Neurosci*, 24, 139-66.
- BJIJOU, Y., STINUS, L., LE MOAL, M. & CADOR, M. 1996. Evidence for selective involvement of dopamine D1 receptors of the ventral tegmental area in the behavioral sensitization induced by intra-ventral tegmental area injections of D-amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, 277, 1177-87.
- BJORKLUND, A. & DUNNETT, S. B. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, 30, 194-202.
- BLASER, R. & HEYSER, C. 2015. Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Front Behav Neurosci*, 9, 183.
- BLUM, K., GARDNER, E., OSCAR-BERMAN, M. & GOLD, M. 2012. "Liking" and "wanting" linked to Reward Deficiency Syndrome (RDS): hypothesizing differential responsivity in brain reward circuitry. *Curr Pharm Des*, 18, 113-8.
- BOLY, M., SETH, A. K., WILKE, M., INGMUNDSON, P., BAARS, B., LAUREYS, S., EDELMAN, D. B. & TSUCHIYA, N. 2013. Consciousness in humans and non-human animals: recent advances and future directions. *Front Psychol*, 4, 625.
- BOURGEOIS, J. P., GOLDMAN-RAKIC, P. S. & RAKIC, P. 1994. Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. *Cereb Cortex*, 4, 78-96.
- BOURIN, M. 1997. Animal models of anxiety: are they suitable for predicting drug action in humans? *Pol J Pharmacol*, 49, 79-84.
- BOURIN, M. & HASCOET, M. 2003. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*, 463, 55-65.
- BOZON, B., DAVIS, S. & LAROCHE, S. 2003. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron*, 40, 695-701.
- BRECHMANN, T., MAIER, C., KAISLER, M., VOLLERT, J., SCHMIEGEL, W., PAK, S., SCHERBAUM, N., RIST, F. & RIPHAUS, A. 2017. Propofol sedation during gastrointestinal endoscopy arouses euphoria in a large subset of patients *United European Gastroenterology Journal*, 6, 536-546.
- BRIGGS, L. P., CLARKE, R. S. & WATKINS, J. 1982. An adverse reaction to the administration of disopropfol (Diprivan). *Anaesthesia*, 37, 1099-101.

- BRINER, A., NIKONENKO, I., DE ROO, M., DAYER, A., MULLER, D. & VUTSKITS, L. 2011. Developmental Stage-dependent persistent impact of propofol anesthesia on dendritic spines in the rat medial prefrontal cortex. *Anesthesiology*, 115, 282-93.
- BROADBENT, N. J., SQUIRE, L. R. & CLARK, R. E. 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14515-20.
- BROWN, E. N., LYDIC, R. & SCHIFF, N. D. 2010. General anesthesia, sleep, and coma. *N Engl J Med*, 363, 2638-50.
- BROWN, M. W. & AGGLETON, J. P. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci*, 2, 51-61.
- BURBACHER, T. M. & GRANT, K. S. 2012. Measuring infant memory: Utility of the visual paired-comparison test paradigm for studies in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicol Teratol*, 34, 473-80.
- BURKE, A. R. & MICZEK, K. A. 2014. Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)*, 231, 1557-80.
- CALIPARI, E. S. & FERRIS, M. J. 2013. Amphetamine mechanisms and actions at the dopamine terminal revisited. *J Neurosci*, 33, 8923-5.
- CAMPAGNA, J. A., MILLER, K. W. & FORMAN, S. A. 2003. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med*, 348, 2110-24.
- CAO, X., WANG, H., MEI, B., AN, S., YIN, L., WANG, L. P. & TSIEN, J. Z. 2008. Inducible and selective erasure of memories in the mouse brain via chemical-genetic manipulation. *Neuron*, 60, 353-66.
- CASEY, B. J., GETZ, S. & GALVAN, A. 2008. The adolescent brain. *Dev Rev*, 28, 62-77.
- CHANG, P., WARREN, D., JOUBERT, G. & RIEDER, M. 2003. Use of propofol sedation in the paediatric emergency department. *Paediatr Child Health*, 8, 511-2.
- CHEMALI, J. J., VAN DORT, C. J., BROWN, E. N. & SOLT, K. 2012. Active emergence from propofol general anesthesia is induced by methylphenidate. *Anesthesiology*, 116, 998-1005.
- CHEN, D. Y., BAMBAH-MUKKU, D., POLLONINI, G. & ALBERINI, C. M. 2012. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKIIalpha-BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat Neurosci*, 15, 1707-14.
- CHEN, J., KELZ, M. B., HOPE, B. T., NAKABEPPU, Y. & NESTLER, E. J. 1997. Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci*, 17, 4933-41.
- CHEN, J., NYE, H. E., KELZ, M. B., HIROI, N., NAKABEPPU, Y., HOPE, B. T. & NESTLER, E. J. 1995. Regulation of delta FosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments. *Mol Pharmacol*, 48, 880-9.
- CHIAO, S. & ZUO, Z. 2014. A double-edged sword: volatile anesthetic effects on the neonatal brain. *Brain Sci*, 4, 273-94.
- CHIDAMBARAN, V., COSTANDI, A. & D'MELLO, A. 2015. Propofol: a review of its role in pediatric anesthesia and sedation. *CNS Drugs*, 29, 543-63.
- COHEN, S. J. & STACKMAN, R. W., JR. 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res*, 285, 105-17.

- COLLINS, G. G. 1988. Effects of the anaesthetic 2,6-diisopropylphenol on synaptic transmission in the rat olfactory cortex slice. *Br J Pharmacol*, 95, 939-49.
- COSTALL, B., JONES, B. J., KELLY, M. E., NAYLOR, R. J. & TOMKINS, D. M. 1989. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 32, 777-85.
- COULTRAP, S. J., BUARD, I., KULBE, J. R., DELL'ACQUA, M. L. & BAYER, K. U. 2010. CaMKII autonomy is substrate-dependent and further stimulated by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem*, 285, 17930-7.
- CREESE, I. & IVERSEN, S. D. 1974. The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behavior in the rat. *Psychopharmacologia*, 39, 345-57.
- CREWS, F., HE, J. & HODGE, C. 2007. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 86, 189-99.
- CUNHA, C., BRAMBILLA, R. & THOMAS, K. L. 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*, 3, 1.
- CURTIS, A. C. 2015. Defining Adolescence. *Journal of Adolescent and Family Health*, 7, article 2.
- DAFT, P. G., YUAN, K., WARRAM, J. M., KLEIN, M. J., SIEGAL, G. P. & ZAYZAFON, M. 2013. Alpha-CaMKII plays a critical role in determining the aggressive behavior of human osteosarcoma. *Mol Cancer Res*, 11, 349-59.
- DAHLSTROEM, A. & FUXE, K. 1964. Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*, SUPPL 232:1-55.
- DAHLSTROM, A. & FUXE, K. 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20, 398-9.
- DAVIS, S. & LAROCHE, S. 2006. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav*, 5 Suppl 2, 61-72.
- DAVIS, S., RENAUDINEAU, S., POIRIER, R., POU CET, B., SAVE, E. & LAROCHE, S. 2010. The formation and stability of recognition memory: what happens upon recall? *Front Behav Neurosci*, 4, 177.
- DENG, W., AIMONE, J. B. & GAGE, F. H. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, 11, 339-50.
- DEPUE, R. A. & COLLINS, P. F. 1999. Neurobiology of the structure of personality: dopamine, facilitation of incentive motivation, and extraversion. *Behav Brain Sci*, 22, 491-517; discussion 518-69.
- DITTMER, A. & DITTMER, J. 2006. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*, 27, 2844-5.
- DREHER, J. C., KOHN, P., KOLACHANA, B., WEINBERGER, D. R. & BERMAN, K. F. 2009. Variation in dopamine genes influences responsivity of the human reward system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 617-22.
- DREHER, J. C. & TREMBLAY, L. 2009. Handbook of Reward and Decision Making. *Elsevier*.
- EAGLE, A. L., GAJEWSKI, P. A., YANG, M., KECHNER, M. E., AL MASRAF, B. S., KENNEDY, P. J., WANG, H., MAZEI-ROBISON, M. S. & ROBISON, A.

- J. 2015. Experience-Dependent Induction of Hippocampal DeltaFosB Controls Learning. *J Neurosci*, 35, 13773-83.
- EARLEY, P. H. & FINVER, T. 2013. Addiction to propofol: a study of 22 treatment cases. *J Addict Med*, 7, 169-76.
- ENNACEUR, A. 2010. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*, 215, 244-54.
- ENNACEUR, A. & DELACOUR, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, 31, 47-59.
- ERNST, M. & LUCIANA, M. 2015. Neuroimaging of the dopamine/reward system in adolescent drug use. *CNS Spectr*, 20, 427-41.
- FAGAN, J. F., 3RD 1970. Memory in the infant. *J Exp Child Psychol*, 9, 217-26.
- FAGAN, J. F., 3RD 1971. Infants' recognition memory for a series of visual stimuli. *J Exp Child Psychol*, 11, 244-50.
- FAGAN, J. F., 3RD 1990. The paired-comparison paradigm and infant intelligence. *Ann N Y Acad Sci*, 608, 337-57; discussion 358-64.
- FAGAN, J. F. & DETTERMAN, D. K. 1992. The Fagan test of infant intelligence: A technical summary. *Journal of Applied Developmental Psychology*, 13, 173-193.
- FANTZ, R. L. 1958. Pattern vision in young infants. *The Psychological Record*, 8, 43-47.
- FANTZ, R. L. 1964. Visual Experience in Infants: Decreased Attention to Familiar Patterns Relative to Novel Ones. *Science*, 146, 668-70.
- FASSOULAKI, A. 2011. Is propofol an analgesic? *Eur J Anaesthesiol*, 28, 481-2.
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, R., NAVARRO, V. M., BARREIRO, M. L., VIGO, E. M., TOVAR, S., SIROTKIN, A. V., CASANUEVA, F. F., AGUILAR, E., DIEGUEZ, C., PINILLA, L. & TENA-SEMPERE, M. 2005. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology*, 146, 3018-25.
- FILE, S. E. 2001. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, 125, 151-7.
- FINK, J. S. & SMITH, G. P. 1980. Relationships between selective denervation of dopamine terminal fields in the anterior forebrain and behavioral responses to amphetamine and apomorphine. *Brain Res*, 201, 107-27.
- FISSET, P., PAUS, T., DALOZE, T., PLOURDE, G., MEURET, P., BONHOMME, V., HAJJ-ALI, N., BACKMAN, S. B. & EVANS, A. C. 1999. Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study. *J Neurosci*, 19, 5506-13.
- FLORIN, S. M., KUCZENSKI, R. & SEGAL, D. S. 1992. Amphetamine-induced changes in behavior and caudate extracellular acetylcholine. *Brain Res*, 581, 53-8.
- FOG, J. U., KHOSHBOUEI, H., HOLY, M., OWENS, W. A., VAEGTER, C. B., SEN, N., NIKANDROVA, Y., BOWTON, E., MCMAHON, D. G., COLBRAN, R. J., DAWS, L. C., SITTE, H. H., JAVITCH, J. A., GALLI, A. & GETHER, U. 2006. Calmodulin kinase II interacts with the dopamine transporter C terminus to regulate amphetamine-induced reverse transport. *Neuron*, 51, 417-29.
- FONTÁN-LOZANO, A., ROMERO-GRANADOS, R., PÉREZ-VILLEGAS, E. & CARRION, A. 2011. Transcription factors CREB and NFκB: Involvement in synaptic plasticity and memory formation. *Bentham Publishers*.

- FOURIEZOS, G., HANSSON, P. & WISE, R. A. 1978. Neuroleptic-induced attenuation of brain stimulation reward in rats. *J Comp Physiol Psychol*, 92, 661-71.
- FRANKLAND, P. W., O'BRIEN, C., OHNO, M., KIRKWOOD, A. & SILVA, A. J. 2001. Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature*, 411, 309-13.
- FRANKS, N. P. 2008. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*, 9, 370-86.
- FREDRIKSSON, A., PONTEN, E., GORDH, T. & ERIKSSON, P. 2007. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology*, 107, 427-36.
- GAJEWSKI, P. A., TURECKI, G. & ROBISON, A. J. 2016. Differential Expression of FosB Proteins and Potential Target Genes in Select Brain Regions of Addiction and Depression Patients. *PLoS One*, 11, e0160355.
- GAN, T. J., GLASS, P. S., HOWELL, S. T., CANADA, A. T., GRANT, A. P. & GINSBERG, B. 1997. Determination of plasma concentrations of propofol associated with 50% reduction in postoperative nausea. *Anesthesiology*, 87, 779-84.
- GARCIA-CABEZAS, M. A., MARTINEZ-SANCHEZ, P., SANCHEZ-GONZALEZ, M. A., GARZON, M. & CAVADA, C. 2009. Dopamine innervation in the thalamus: monkey versus rat. *Cereb Cortex*, 19, 424-34.
- GARCIA, P. S., KOLESKY, S. E. & JENKINS, A. 2010. General anesthetic actions on GABA(A) receptors. *Curr Neuropharmacol*, 8, 2-9.
- GAWANDE, A., DENNO, D. W., TRUOG, R. D. & WAISEL, D. 2008. Physicians and execution--highlights from a discussion of lethal injection. *N Engl J Med*, 358, 448-51.
- GIEDD, J. N. 2004. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 77-85.
- GIEDD, J. N., BLUMENTHAL, J., JEFFRIES, N. O., CASTELLANOS, F. X., LIU, H., ZIJDENBOS, A., PAUS, T., EVANS, A. C. & RAPOPORT, J. L. 1999. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci*, 2, 861-3.
- GIEDD, J. N., KESHAVAN, M. & PAUS, T. 2008. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci*, 9, 947-57.
- GIESE, K. P. & MIZUNO, K. 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem*, 20, 540-52.
- GILRON, I. & CODERRE, T. J. 1996. Preemptive analgesic effects of steroid anesthesia with alphaxalone in the rat formalin test. Evidence for differential GABA(A) Receptor modulation in persistent nociception. *Anesthesiology*, 84, 572-9.
- GIOVANNINI, M. G. 2006. The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev Neurosci*, 17, 619-34.
- GNEGY, M. E., HEWLETT, G. H., YEE, S. L. & WELSH, M. J. 1991. Alterations in calmodulin content and localization in areas of rat brain after repeated intermittent amphetamine. *Brain Res*, 562, 6-12.

- GOTO, T., MAROTA, J. J. & CROSBY, G. 1994. Pentobarbitone, but not propofol, produces pre-emptive analgesia in the rat formalin model. *Br J Anaesth*, 72, 662-7.
- GRAEVEN, D. B. 1978. Patterns of phencyclidine use. *NIDA Res Monogr*, 176-82.
- GRASSHOFF, C. & GILLESSEN, T. 2005. Effects of propofol on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium increase in cultured rat cerebrocortical neurons. *Eur J Anaesthesiol*, 22, 467-70.
- GREENBERG, B. D. & SEGAL, D. S. 1985. Acute and chronic behavioral interactions between phencyclidine (PCP) and amphetamine: evidence for a dopaminergic role in some PCP-induced behaviors. *Pharmacol Biochem Behav*, 23, 99-105.
- GUTHRIE, E. W. 2006. General anesthesia in pediatric patients. *U.S. Pharmacist*, 8, HS15–HS27.
- HALLBERG, D., HOLM, I., OBEL, A. L., SCHUBERTH, O. & WRETLIND, A. 1967. Fat emulsion for complete intravenous nutrition. *Postgrad Med*, 42, A149-52.
- HAN, D., JIN, J., FANG, H. & XU, G. 2015. Long-term action of propofol on cognitive function and hippocampal neuroapoptosis in neonatal rats. *Int J Clin Exp Med*, 8, 10696-704.
- HANSEN, L. M., HARDIE, B. S. & HIDALGO, J. 1976. Fat emulsion for intravenous administration: clinical experience with intralipid 10%. *Ann Surg*, 184, 80-8.
- HARIRI, A. R. 2009. The neurobiology of individual differences in complex behavioral traits. *Annu Rev Neurosci*, 32, 225-47.
- HASCOET, M. & BOURIN, M. 1998. A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 60, 645-53.
- HEBB, D. 1949. *The Organization of Behavior*. Wiley.
- HEMMINGS, H. C., JR. & ADAMO, A. I. 1994. Effects of halothane and propofol on purified brain protein kinase C activation. *Anesthesiology*, 81, 147-55.
- HENSCHEL, O., GIPSON, K. E. & BORDEY, A. 2008. GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7, 211-24.
- HEWER, C. L. 1937. The Stages and Signs of General Anaesthesia. *Br Med J*, 2, 274-6.
- HIROI, N., BROWN, J. R., HAILE, C. N., YE, H., GREENBERG, M. E. & NESTLER, E. J. 1997. FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10397-402.
- HU, F. Y., HANNA, G. M., HAN, W., MARDINI, F., THOMAS, S. A., WYNER, A. J. & KELZ, M. B. 2012. Hypnotic hypersensitivity to volatile anesthetics and dexmedetomidine in dopamine beta-hydroxylase knockout mice. *Anesthesiology*, 117, 1006-17.
- HUNSAKER, M. R., ROSENBERG, J. S. & KESNER, R. P. 2008. The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, 18, 1064-73.
- HUTTENLOCHER, P. R. 1979. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*, 163, 195-205.
- IKEMOTO, S. 2010. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev*, 35, 129-50.
- IRIFUNE, M., TAKARADA, T., SHIMIZU, Y., ENDO, C., KATAYAMA, S., DOHI, T. & KAWAHARA, M. 2003. Propofol-induced anesthesia in mice is mediated

- by gamma-aminobutyric acid-A and excitatory amino acid receptors. *Anesth Analg*, 97, 424-9, table of contents.
- IWAMOTO, E. T. 1986. Comparison of the pharmacologic effects of N-allylnormetazocine and phencyclidine: sensitization, cross-sensitization, and opioid antagonist activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 89, 221-9.
- JABES, A. & NELSON, C. A. 2015. 20 years after “The ontogeny of human memory: A cognitive neuroscience perspective,” where are we? *International Journal of Behavioral Development*, 39, 1-11.
- JAMES, A. B., CONWAY, A. M. & MORRIS, B. J. 2006. Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1). *J Neurosci*, 26, 1624-34.
- JAROME, T. J., FERRARA, N. C., KWAPIS, J. L. & HELMSTETTER, F. J. 2016. CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval. *Neurobiol Learn Mem*, 128, 103-9.
- JAROME, T. J. & HELMSTETTER, F. J. 2014. Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Front Mol Neurosci*, 7, 61.
- JENSEN, A. G., LINDROTH, M., SJOLANDER, A. & EINTREI, C. 1994. Propofol induces changes in the cytosolic free calcium concentration and the cytoskeletal organization of cultured human glial cells and primary embryonic rat brain cells. *Anesthesiology*, 81, 1220-9.
- JENTSCH, J. D. & ROTH, R. H. 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20, 201-25.
- JENTSCH, J. D., TRAN, A., TAYLOR, J. R. & ROTH, R. H. 1998. Prefrontal cortical involvement in phencyclidine-induced activation of the mesolimbic dopamine system: behavioral and neurochemical evidence. *Psychopharmacology (Berl)*, 138, 89-95.
- JEVTOVIC-TODOROVIC, V. 2016. General Anesthetics and Neurotoxicity: How Much Do We Know? *Anesthesiol Clin*, 34, 439-51.
- JONES, M. W., ERRINGTON, M. L., FRENCH, P. J., FINE, A., BLISS, T. V., GAREL, S., CHARNAY, P., BOZON, B., LAROCHE, S. & DAVIS, S. 2001. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci*, 4, 289-96.
- JUNG, Y., MULHOLLAND, P. J., WISEMAN, S. L., CHANDLER, L. J. & PICCIOTTO, M. R. 2013. Constitutive knockout of the membrane cytoskeleton protein beta adducin decreases mushroom spine density in the nucleus accumbens but does not prevent spine remodeling in response to cocaine. *Eur J Neurosci*, 37, 1-9.
- KALIVAS, P. W. & STEWART, J. 1991. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev*, 16, 223-44.
- KALIVAS, P. W. & WEBER, B. 1988. Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, 245, 1095-102.
- KALSBECK, A., VOORN, P., BUIJS, R. M., POOL, C. W. & UYLINGS, H. B. 1988. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol*, 269, 58-72.
- KANTO, J. & GEPTS, E. 1989. Pharmacokinetic implications for the clinical use of propofol. *Clin Pharmacokinet*, 17, 308-26.

- KATCHE, C., GOLDIN, A., GONZALEZ, C., BEKINSCHTEIN, P. & MEDINA, J. H. 2012. Maintenance of long-term memory storage is dependent on late posttraining Egr-1 expression. *Neurobiol Learn Mem*, 98, 220-7.
- KELLY, A., LAROCHE, S. & DAVIS, S. 2003. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci*, 23, 5354-60.
- KHAN, S., CONTE, I., CARTER, T., BAYER, K. U. & MOLLOY, J. E. 2016. Multiple CaMKII Binding Modes to the Actin Cytoskeleton Revealed by Single-Molecule Imaging. *Biophys J*, 111, 395-408.
- KIROUAC, G. J. 2015. Placing the paraventricular nucleus of the thalamus within the brain circuits that control behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 56, 315-29.
- KLUG, J. R., MATHUR, B. N., KASH, T. L., WANG, H. D., MATTHEWS, R. T., ROBISON, A. J., ANDERSON, M. E., DEUTCH, A. Y., LOVINGER, D. M., COLBRAN, R. J. & WINDER, D. G. 2012. Genetic inhibition of CaMKII in dorsal striatal medium spiny neurons reduces functional excitatory synapses and enhances intrinsic excitability. *PLoS One*, 7, e45323.
- KOZINN, J., MAO, L., ARORA, A., YANG, L., FIBUCH, E. E. & WANG, J. Q. 2006. Inhibition of glutamatergic activation of extracellular signal-regulated protein kinases in hippocampal neurons by the intravenous anesthetic propofol. *Anesthesiology*, 105, 1182-91.
- KUCZENSKI, R. 1986. Dose response for amphetamine-induced changes in dopamine levels in push-pull perfusates of rat striatum. *J Neurochem*, 46, 1605-11.
- KUCZENSKI, R. & SEGAL, D. 1989. Concomitant characterization of behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. *J Neurosci*, 9, 2051-65.
- KUHLMAN, P. A., HUGHES, C. A., BENNETT, V. & FOWLER, V. M. 1996. A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem*, 271, 7986-91.
- LANGSJO, J. W., ALKIRE, M. T., KASKINORO, K., HAYAMA, H., MAKSIMOW, A., KAISTI, K. K., AALTO, S., AANTAA, R., JAASKELAINEN, S. K., REVONSUO, A. & SCHEININ, H. 2012. Returning from oblivion: imaging the neural core of consciousness. *J Neurosci*, 32, 4935-43.
- LAVAUUR, J., MINEUR, Y. S. & PICCIOTTO, M. R. 2009. The membrane cytoskeletal protein adducin is phosphorylated by protein kinase C in D1 neurons of the nucleus accumbens and dorsal striatum following cocaine administration. *J Neurochem*, 111, 1129-37.
- LE MOAL, M. & SIMON, H. 1991. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev*, 71, 155-234.
- LEE, I., HUNSAKER, M. R. & KESNER, R. P. 2005. The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty. *Behav Neurosci*, 119, 145-53.
- LEE, J. L. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*, 11, 1264-6.
- LEE, J. L., EVERITT, B. J. & THOMAS, K. L. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, 304, 839-43.
- LEGAULT, M. & WISE, R. A. 2001. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and

- glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci*, 13, 819-28.
- LEUNG, L. S., PETROPOULOS, S., SHEN, B., LUO, T., HERRICK, I., RAJAKUMAR, N. & MA, J. 2011. Lesion of cholinergic neurons in nucleus basalis enhances response to general anesthetics. *Exp Neurol*, 228, 259-69.
- LEUSSIS, M. P. & BOLIVAR, V. J. 2006. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, 30, 1045-64.
- LEVER, C., BURTON, S. & O'KEEFE, J. 2006. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci*, 17, 111-33.
- LI, R. & SHEN, Y. 2013. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci*, 92, 747-51.
- LIAN, Q., WANG, B., ZHOU, W., JIN, S., XU, L., HUANG, Q., LAI, M., LU, K., TANG, L., ZHU, H., LIN, H., ZHANG, F., CAO, H., LI, J., CHEN, J. F. & GE, R. S. 2013. Self-administration of propofol is mediated by dopamine D1 receptors in nucleus accumbens in rats. *Neuroscience*, 231, 373-83.
- LICATA, S. C. & PIERCE, R. C. 2003. The roles of calcium/calmodulin-dependent and Ras/mitogen-activated protein kinases in the development of psychostimulant-induced behavioral sensitization. *J Neurochem*, 85, 14-22.
- LIN, J. W., SUGIMORI, M., LLINAS, R. R., MCGUINNESS, T. L. & GREENGARD, P. 1990. Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8257-61.
- LODGE, D. & MERCIER, M. S. 2015. Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. *Br J Pharmacol*, 172, 4254-76.
- LONZE, B. E. & GINTY, D. D. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35, 605-23.
- LUBY, E. D., GOTTLIEB, J. S., COHEN, B. D., ROSENBAUM, G. & DOMINO, E. F. 1962. Model psychoses and schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 119, 61-7.
- LUNARDI, N., OKLOPCIC, A., PRILLAMAN, M., ERISIR, A. & JEVTOVIC-TODOROVIC, V. 2015. Early Exposure to General Anesthesia Disrupts Spatial Organization of Presynaptic Vesicles in Nerve Terminals of the Developing Rat Subiculum. *Mol Neurobiol*, 52, 942-51.
- LUO, T. & LEUNG, L. S. 2011. Involvement of tuberomamillary histaminergic neurons in isoflurane anesthesia. *Anesthesiology*, 115, 36-43.
- LUSCHER, C. & MALENKA, R. C. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- LYNN, D. A. & BROWN, G. R. 2009. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*). *Dev Psychobiol*, 51, 513-20.
- LYNN, D. A. & BROWN, G. R. 2010. The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Dev Psychobiol*, 52, 731-9.
- MANIKANDAN, S. 2010. Data transformation. *J Pharmacol Pharmacother*, 1, 126-7.
- MARIK, P. E. 2004. Propofol: therapeutic indications and side-effects. *Curr Pharm Des*, 10, 3639-49.
- MARKRAM, H., TOLEDO-RODRIGUEZ, M., WANG, Y., GUPTA, A., SILBERBERG, G. & WU, C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*, 5, 793-807.

- MATSUOKA, Y., HUGHES, C. A. & BENNETT, V. 1996. Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *J Biol Chem*, 271, 25157-66.
- MATSUOKA, Y., LI, X. & BENNETT, V. 1998. Adducin is an in vivo substrate for protein kinase C: phosphorylation in the MARCKS-related domain inhibits activity in promoting spectrin-actin complexes and occurs in many cells, including dendritic spines of neurons. *J Cell Biol*, 142, 485-97.
- MATSUOKA, Y., LI, X. & BENNETT, V. 2000. Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 57, 884-95.
- MCCUTCHEON, J. E., CONRAD, K. L., CARR, S. B., FORD, K. A., MCGEHEE, D. S. & MARINELLI, M. 2012. Dopamine neurons in the ventral tegmental area fire faster in adolescent rats than in adults. *J Neurophysiol*, 108, 1620-30.
- MCDONALD, J. H. 2009. Handbook of Biological Statistics. *Sparky House Publishing*.
- MELTZER, H. Y. & STAHL, S. M. 1976. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull*, 2, 19-76.
- MERRILL, A. W., BARTER, L. S., RUDOLPH, U., EGER, E. I., 2ND, ANTOGNINI, J. F., CARSTENS, M. I. & CARSTENS, E. 2006. Propofol's effects on nociceptive behavior and spinal c-fos expression after intraplantar formalin injection in mice with a mutation in the gamma-aminobutyric acid-type(A) receptor beta3 subunit. *Anesth Analg*, 103, 478-83, table of contents.
- MILANOVIC, D., PESIC, V., LONCAREVIC-VASILJKOVIC, N., AVRAMOVIC, V., TESIC, V., JEVTOVIC-TODOROVIC, V., KANAZIR, S. & RUZDIJIC, S. 2017. Neonatal Propofol Anesthesia Changes Expression of Synaptic Plasticity Proteins and Increases Stereotypic and Anxyolytic Behavior in Adult Rats. *Neurotox Res*, 32, 247-263.
- MILANOVIC, D., PESIC, V., LONCAREVIC-VASILJKOVIC, N., PAVKOVIC, Z., POPIC, J., KANAZIR, S., JEVTOVIC-TODOROVIC, V. & RUZDIJIC, S. 2016. The Fas Ligand/Fas Death Receptor Pathways Contribute to Propofol-Induced Apoptosis and Neuroinflammation in the Brain of Neonatal Rats. *Neurotox Res*, 30, 434-52.
- MILANOVIC, D., PESIC, V., POPIC, J., TANIC, N., KANAZIR, S., JEVTOVIC-TODOROVIC, V. & RUZDIJIC, S. 2014. Propofol anesthesia induces proapoptotic tumor necrosis factor-alpha and pro-nerve growth factor signaling and prosurvival Akt and XIAP expression in neonatal rat brain. *J Neurosci Res*, 92, 1362-73.
- MILANOVIC, D., POPIC, J., PESIC, V., LONCAREVIC-VASILJKOVIC, N., KANAZIR, S., JEVTOVIC-TODOROVIC, V. & RUZDIJIC, S. 2010. Regional and temporal profiles of calpain and caspase-3 activities in postnatal rat brain following repeated propofol administration. *Dev Neurosci*, 32, 288-301.
- MILLAR, K., BOWMAN, A. W., BURNS, D., MCLAUGHLIN, P., MOORES, T., MORTON, N. S., MUSIELLO, T., WALLACE, E., WRAY, A. & WELBURY, R. R. 2014. Children's cognitive recovery after day-case general anesthesia: a randomized trial of propofol or isoflurane for dental procedures. *Pediatr Anesth*, 24, 201-7.
- MILLER, R. R. & MATZEL, L. D. 2006. Retrieval failure versus memory loss in experimental amnesia: definitions and processes. *Learn Mem*, 13, 491-7.
- MINICHELLO, L. 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*, 10, 850-60.

- MINICHELLO, L., CALELLA, A. M., MEDINA, D. L., BONHOEFFER, T., KLEIN, R. & KORTE, M. 2002. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36, 121-37.
- MISHKIN, M. & MURRAY, E. A. 1994. Stimulus recognition. *Curr Opin Neurobiol*, 4, 200-6.
- MORI, M., ABEGG, M. H., GAHWILER, B. H. & GERBER, U. 2004. A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature*, 431, 453-6.
- MULLER, C. P., QUEDNOW, B. B., LOURDUSAMY, A., KORNHUBER, J., SCHUMANN, G. & GIESE, K. P. 2016. CaM Kinases: From Memories to Addiction. *Trends Pharmacol Sci*, 37, 153-166.
- MULLER, U., CRISTINA, N., LI, Z. W., WOLFER, D. P., LIPP, H. P., RULICKE, T., BRANDNER, S., AGUZZI, A. & WEISSMANN, C. 1994. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell*, 79, 755-65.
- MURAT, I., BILLARD, V., VERNONIS, J., ZAOUTER, M., MARSOL, P., SOURON, R. & FARINOTTI, R. 1996. Pharmacokinetics of propofol after a single dose in children aged 1-3 years with minor burns. Comparison of three data analysis approaches. *Anesthesiology*, 84, 526-32.
- MURDOCH, J. A. & KENNY, G. N. 1999. Patient-maintained propofol sedation as premedication in day-case surgery: assessment of a target-controlled system. *Br J Anaesth*, 82, 429-31.
- NELSON, L. E., GUO, T. Z., LU, J., SAPER, C. B., FRANKS, N. P. & MAZE, M. 2002. The sedative component of anesthesia is mediated by GABA(A) receptors in an endogenous sleep pathway. *Nat Neurosci*, 5, 979-84.
- NELSON, L. E., LU, J., GUO, T., SAPER, C. B., FRANKS, N. P. & MAZE, M. 2003. The alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine converges on an endogenous sleep-promoting pathway to exert its sedative effects. *Anesthesiology*, 98, 428-36.
- NESTLER, E. J. 2008. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363, 3245-55.
- NGUYEN, H. T., LI, K. Y., DAGRACA, R. L., DELPHIN, E., XIONG, M. & YE, J. H. 2009. Behavior and cellular evidence for propofol-induced hypnosis involving brain glycine receptors. *Anesthesiology*, 110, 326-32.
- NISHI, A., BIBB, J. A., SNYDER, G. L., HIGASHI, H., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2000. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12840-5.
- NISHI, A., KUROIWA, M. & SHUTO, T. 2011. Mechanisms for the modulation of dopamine d(1) receptor signaling in striatal neurons. *Front Neuroanat*, 5, 43.
- O'KEEFE, J. & NADEL, L. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press.
- OKAMOTO, K., BOSCH, M. & HAYASHI, Y. 2009. The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology (Bethesda)*, 24, 357-66.
- OKANO, H., HIRANO, T. & BALABAN, E. 2000. Learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12403-4.

- OLIVEIRA, A. M., HAWK, J. D., ABEL, T. & HAVEKES, R. 2010. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learn Mem*, 17, 155-60.
- PAIN, L., GOBAILLE, S., SCHLEEF, C., AUNIS, D. & OBERLING, P. 2002. In vivo dopamine measurements in the nucleus accumbens after nonanesthetic and anesthetic doses of propofol in rats. *Anesth Analg*, 95, 915-9, table of contents.
- PAULSON, P. E., CAMP, D. M. & ROBINSON, T. E. 1991. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 103, 480-92.
- PAUS, T., KESHAVAN, M. & GIEDD, J. N. 2008. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci*, 9, 947-57.
- PAVKOVIC, Z., MILANOVIC, D., RUZDIJIC, S., KANAZIR, S. & PESIC, V. 2018. The influence of propofol anesthesia exposure on non-aversive memory retrieval and the expression of molecules involved in memory process in the dorsal hippocampus in peripubertal rats. *Pediatr Anesth*, 28, 537-546
- PAVKOVIC, Z., SMILJANIC, K., KANAZIR, S., MILANOVIC, D., PESIC, V. & RUZDIJIC, S. 2017. Brain molecular changes and behavioral alterations induced by propofol anesthesia exposure in peripubertal rats. *Pediatr Anesth*, 27, 962-972.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. 2005. The Rat Brain - In Stereotaxic Coordinates. *Elsevier Academic Press*.
- PAYLOR, R., SPENCER, C. M., YUVA-PAYLOR, L. A. & PIEKE-DAHL, S. 2006. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol Behav*, 87, 95-102.
- PEARN, M. L., HU, Y., NIESMAN, I. R., PATEL, H. H., DRUMMOND, J. C., ROTH, D. M., AKASSOGLU, K., PATEL, P. M. & HEAD, B. P. 2012. Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation. *Anesthesiology*, 116, 352-61.
- PESIC, V., MILANOVIC, D., POPIC, J., SMILJANIC, K., TESIC, V., KANAZIR, S., JEVTOVIC-TODOROVIC, V. & RUZDIJIC, S. 2015. Neonatal propofol anesthesia modifies activity-dependent processes and induces transient hyperlocomotor response to d-amphetamine during adolescence in rats. *Int J Dev Neurosci*, 47, 266-77.
- PESIC, V., MILANOVIC, D., TANIC, N., POPIC, J., KANAZIR, S., JEVTOVIC-TODOROVIC, V. & RUZDIJIC, S. 2009. Potential mechanism of cell death in the developing rat brain induced by propofol anesthesia. *Int J Dev Neurosci*, 27, 279-87.
- PIAZZA, P. V., MACCARI, S., DEMINIERE, J. M., LE MOAL, M., MORMEDE, P. & SIMON, H. 1991. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2088-92.
- PICKERING, C., CHAU, P. P., SODERPALM, B. & ERICSON, M. 2010. Ethanol and phencyclidine interact with respect to nucleus accumbens dopamine release: differential effects of administration order and pretreatment protocol. *Front Behav Neurosci*, 4, 32.
- PIZZO, A. B., KARAM, C. S., ZHANG, Y., MA, C. L., MCCABE, B. D. & JAVITCH, J. A. 2014. Amphetamine-induced behavior requires CaMKII-dependent dopamine transporter phosphorylation. *Mol Psychiatry*, 19, 279-81.

- PLATEL, A. & PORSOLT, R. D. 1982. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology (Berl)*, 78, 346-52.
- POPIC, J., PESIC, V., MILANOVIC, D., LONCAREVIC-VASILJKOVIC, N., SMILJANIC, K., KANAZIR, S. & RUZDIJIC, S. 2015. Induction of TNF-alpha signaling cascade in neonatal rat brain during propofol anesthesia. *Int J Dev Neurosci*, 44, 22-32.
- POPIC, J., PESIC, V., MILANOVIC, D., TODOROVIC, S., KANAZIR, S., JEVTOVIC-TODOROVIC, V. & RUZDIJIC, S. 2012. Propofol-induced changes in neurotrophic signaling in the developing nervous system in vivo. *PLoS One*, 7, e34396.
- PORRO, F., ROSATO-SIRI, M., LEONE, E., COSTESSI, L., IACONCIG, A., TONGIORGI, E. & MURO, A. F. 2010. beta-adducin (Add2) KO mice show synaptic plasticity, motor coordination and behavioral deficits accompanied by changes in the expression and phosphorylation levels of the alpha- and gamma-adducin subunits. *Genes Brain Behav*, 9, 84-96.
- POZO, K. & GODA, Y. 2010. Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 66, 337-51.
- PRINCE, L. Y., BACON, T. J., TIGARET, C. M. & MELLOR, J. R. 2016. Neuromodulation of the Feedforward Dentate Gyrus-CA3 Microcircuit. *Front Synaptic Neurosci*, 8, 32.
- PRYOR, K. O., ROOT, J. C., MEHTA, M., STERN, E., PAN, H., VESELIS, R. A. & SILBERSWEIG, D. A. 2015. Effect of propofol on the medial temporal lobe emotional memory system: a functional magnetic resonance imaging study in human subjects. *Br J Anaesth*, 115 Suppl 1, i104-i113.
- QUILLFELDT, J. A. 2016. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. *Springer*.
- QURAIISHI, S. A., GIRDHARRY, T. D., XU, S. G. & ORKIN, F. K. 2007. Prolonged retrograde amnesia following sedation with propofol in a 12-year-old boy. *Pediatr Anesth*, 17, 375-9.
- RABENSTEIN, R. L., ADDY, N. A., CALDARONE, B. J., ASAKA, Y., GRUENBAUM, L. M., PETERS, L. L., GILLIGAN, D. M., FITZSIMONDS, R. M. & PICCIOTTO, M. R. 2005. Impaired synaptic plasticity and learning in mice lacking beta-adducin, an actin-regulating protein. *J Neurosci*, 25, 2138-45.
- RAJMOHAN, V. & MOHANDAS, E. 2007. The limbic system. *Indian J Psychiatry*, 49, 132-9.
- RAKIC, P., BOURGEOIS, J. P. & GOLDMAN-RAKIC, P. S. 1994. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Prog Brain Res*, 102, 227-43.
- RAMOS, A. 2008. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci*, 29, 493-8.
- RAMOS, A., PEREIRA, E., MARTINS, G. C., WEHRMEISTER, T. D. & IZIDIO, G. S. 2008. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav Brain Res*, 193, 277-88.
- RAZALI, N. M. & WAH, Y. B. 2011. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anserson-Darling tests. *J Stat Model Anal*, 22, 21-33.

- REGER, M. L., HOVDA, D. A. & GIZA, C. C. 2009. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Dev Psychobiol*, 51, 672-8.
- RICH, J. B., YASTER, M. & BRANDT, J. 1999. Anterograde and retrograde memory in children anesthetized with propofol. *J Clin Exp Neuropsychol*, 21, 535-46.
- RIRIE, D. G., RIRIE, K. L., SETHNA, N. F. & FOX, L. 1997. Unexpected interaction of methylphenidate (Ritalin) with anaesthetic agents. *Pediatr Anesth*, 7, 69-72.
- ROBINSON, T. E. & BECKER, J. B. 1986. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res*, 396, 157-98.
- ROBISON, A. J. & NESTLER, E. J. 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci*, 12, 623-37.
- ROMERO-CALVO, I., OCON, B., MARTINEZ-MOYA, P., SUAREZ, M. D., ZARZUELO, A., MARTINEZ-AUGUSTIN, O. & DE MEDINA, F. S. 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 401, 318-20.
- ROSE, S. A., FELDMAN, J. F. & JANKOWSKI, J. J. 2003. The building blocks of cognition. *J Pediatr*, 143, S54-61.
- RUDY, J. W. 2008. Destroying memories to strengthen them. *Nat Neurosci*, 11, 1241-2.
- RUSSO, S. J. & NESTLER, E. J. 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*, 14, 609-25.
- SAALMANN, Y. B. 2014. Intralaminar and medial thalamic influence on cortical synchrony, information transmission and cognition. *Front Syst Neurosci*, 8, 83.
- SALGADO, S. & KAPLITT, M. G. 2015. The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotact Funct Neurosurg*, 93, 75-93.
- SANDERSON, D. J. & BANNERMAN, D. M. 2012. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. *Hippocampus*, 22, 981-94.
- SANNA, E., MASCIA, M. P., KLEIN, R. L., WHITING, P. J., BIGGIO, G. & HARRIS, R. A. 1995. Actions of the general anesthetic propofol on recombinant human GABAA receptors: influence of receptor subunits. *J Pharmacol Exp Ther*, 274, 353-60.
- SANTANA, N., TROYANO-RODRIGUEZ, E., MENGOD, G., CELADA, P. & ARTIGAS, F. 2011. Activation of thalamocortical networks by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist phencyclidine: reversal by clozapine. *Biol Psychiatry*, 69, 918-27.
- SATOH, Y., ENDO, S., IKEDA, T., YAMADA, K., ITO, M., KUROKI, M., HIRAMOTO, T., IMAMURA, O., KOBAYASHI, Y., WATANABE, Y., ITOHARA, S. & TAKISHIMA, K. 2007. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. *J Neurosci*, 27, 10765-76.
- SCHAEFERS, A. T. & TEUCHERT-NOODT, G. 2016. Developmental neuroplasticity and the origin of neurodegenerative diseases. *World J Biol Psychiatry*, 17, 587-599.
- SCHNEIDER, M. 2013. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res*, 354, 99-106.
- SCHULTZ, W. 2010. Subjective neuronal coding of reward: temporal value discounting and risk. *Eur J Neurosci*, 31, 2124-35.

- SEIDEN, L. S., SABOL, K. E. & RICAURTE, G. A. 1993. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33, 639-77.
- SHARP, T., ZETTERSTROM, T., LJUNGBERG, T. & UNGERSTEDT, U. 1987. A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res*, 401, 322-30.
- SHORE, R. 1997. Rethinking the Brain: New Insights Into Early Development. *Families and Work Institute*.
- SILVA, A. J., STEVENS, C. F., TONEGAWA, S. & WANG, Y. 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257, 201-6.
- SILVERS, J. M., HARROD, S. B., MACTUTUS, C. F. & BOOZE, R. M. 2007. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *J Neurosci Methods*, 166, 99-103.
- SITDIKOVA, G., ZAKHAROV, A., JANACKOVA, S., GERASIMOVA, E., LEBEDEVA, J., INACIO, A. R., ZAYNUTDINOVA, D., MINLEBAEV, M., HOLMES, G. L. & KHAZIPOV, R. 2014. Isoflurane suppresses early cortical activity. *Ann Clin Transl Neurol*, 1, 15-26.
- SMITH, I., MONK, T. G., WHITE, P. F. & DING, Y. 1994. Propofol infusion during regional anesthesia: sedative, amnestic, and anxiolytic properties. *Anesth Analg*, 79, 313-9.
- SOLT, K., COTTEN, J. F., CIMENSER, A., WONG, K. F., CHEMALI, J. J. & BROWN, E. N. 2011. Methylphenidate actively induces emergence from general anesthesia. *Anesthesiology*, 115, 791-803.
- SOLT, K., VAN DORT, C. J., CHEMALI, J. J., TAYLOR, N. E., KENNY, J. D. & BROWN, E. N. 2014. Electrical stimulation of the ventral tegmental area induces reanimation from general anesthesia. *Anesthesiology*, 121, 311-9.
- SOWELL, E. R., PETERSON, B. S., THOMPSON, P. M., WELCOME, S. E., HENKENIUS, A. L. & TOGA, A. W. 2003. Mapping cortical change across the human life span. *Nat Neurosci*, 6, 309-15.
- SPEAR, L. P. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*, 24, 417-63.
- SPEAR, L. P. 2004. Adolescent brain development and animal models. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 23-6.
- SPEAR, L.P. 2007a. The developing brain and adolescent-typical behavior patterns: An evolutionary approach. In ROMER, D. & WALKER, E. F. *Adolescent psychopathology and the developing brain: Integrating brain and prevention science*. New York, NY, US: Oxford University Press.
- SPEAR, L. P. 2007b. Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations. *Neurotoxicol Teratol*, 29, 1-9.
- SPIJKER, S. 2011. Dissection of rodent brain regions. *Springer*.
- SPRUNG, J., FLICK, R. P., KATUSIC, S. K., COLLIGAN, R. C., BARBARESI, W. J., BOJANIC, K., WELCH, T. L., OLSON, M. D., HANSON, A. C., SCHROEDER, D. R., WILDER, R. T. & WARNER, D. O. 2012. Attention-deficit/hyperactivity disorder after early exposure to procedures requiring general anesthesia. *Mayo Clin Proc*, 87, 120-9.
- STANSFIELD, K. H. & KIRSTEIN, C. L. 2006. Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Dev Psychobiol*, 48, 10-5.

- STEINBERG, L. 2008. A Social Neuroscience Perspective on Adolescent Risk-Taking. *Dev Rev*, 28, 78-106.
- STEINKELLNER, T., YANG, J. W., MONTGOMERY, T. R., CHEN, W. Q., WINKLER, M. T., SUCIC, S., LUBEC, G., FREISSMUTH, M., ELGERSMA, Y., SITTE, H. H. & KUDLACEK, O. 2012. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha (alphaCaMKII) controls the activity of the dopamine transporter: implications for Angelman syndrome. *J Biol Chem*, 287, 29627-35.
- STEKETEE, J. D. & KALIVAS, P. W. 2011. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev*, 63, 348-65.
- STEVENS, R. J. & LITTLETON, J. T. 2011. Synaptic growth: dancing with adducin. *Curr Biol*, 21, R402-5.
- STRANGE, B. A., WITTER, M. P., LEIN, E. S. & MOSER, E. I. 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*, 15, 655-69.
- SULZER, D. 2011. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron*, 69, 628-49.
- SVENNINGSSON, P., NISHI, A., FISONE, G., GIRAULT, J. A., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2004. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 269-96.
- SWEATT, J. D. 2001. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*, 76, 1-10.
- SWEATT, J. D. 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 311-7.
- SWULIUS, M. T. & WAXHAM, M. N. 2008. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2637-57.
- SZAPIRO, G., GALANTE, J. M., BARROS, D. M., LEVI DE STEIN, M., VIANNA, M. R., IZQUIERDO, L. A., IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. 2002. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochem Res*, 27, 1491-8.
- SZAPIRO, G., IZQUIERDO, L. A., ALONSO, M., BARROS, D., PARATCHA, G., ARDENGHI, P., PEREIRA, P., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. 2000. Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99, 1-5.
- SZIRAY, N., KUKI, Z., NAGY, K. M., MARKO, B., KOMPAGNE, H. & LEVAY, G. 2010. Effects of single and simultaneous lesions of serotonergic and noradrenergic pathways on open-space and bright-space anxiety-like behavior in two animal models. *Behav Brain Res*, 209, 93-8.
- TAI, S. K., MA, J. & LEUNG, L. S. 2014. Medial septal cholinergic neurons modulate isoflurane anesthesia. *Anesthesiology*, 120, 392-402.
- TARAZI, F. I. & BALDESSARINI, R. J. 2000. Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. *Int J Dev Neurosci*, 18, 29-37.
- TARAZI, F. I., TOMASINI, E. C. & BALDESSARINI, R. J. 1998. Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. *Neurosci Lett*, 254, 21-4.

- TAYLOR, N. E., CHEMALI, J. J., BROWN, E. N. & SOLT, K. 2013. Activation of D1 dopamine receptors induces emergence from isoflurane general anesthesia. *Anesthesiology*, 118, 30-9.
- THOMPSON, S. A. & WAFFORD, K. 2001. Mechanism of action of general anaesthetics--new information from molecular pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 1, 78-83.
- TIRELLI, E., LAVIOLA, G. & ADRIANI, W. 2003. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 163-78.
- TRAPANI, G., ALTOMARE, C., LISO, G., SANNA, E. & BIGGIO, G. 2000. Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery. *Curr Med Chem*, 7, 249-71.
- TRONSON, N. C. & TAYLOR, J. R. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*, 8, 262-75.
- TURINA, D., LOITTO, V. M., BJORNSTROM, K., SUNDQVIST, T. & EINTREI, C. 2008. Propofol causes neurite retraction in neurones. *Br J Anaesth*, 101, 374-9.
- ULERY-REYNOLDS, P. G., CASTILLO, M. A., VIALOU, V., RUSSO, S. J. & NESTLER, E. J. 2009. Phosphorylation of DeltaFosB mediates its stability in vivo. *Neuroscience*, 158, 369-72.
- ULERY, P. G., RUDENKO, G. & NESTLER, E. J. 2006. Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation. *J Neurosci*, 26, 5131-42.
- VALJENT, E., BERTRAN-GONZALEZ, J., AUBIER, B., GREENGARD, P., HERVE, D. & GIRAULT, J. A. 2010. Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology*, 35, 401-15.
- VAN HOFF, S. L., O'NEILL, E. S., COHEN, L. C. & COLLINS, B. A. 2015. Does a prophylactic dose of propofol reduce emergence agitation in children receiving anesthesia? A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Anesth*, 25, 668-76.
- VASILEV, V., VESKOV, R., JANAC, B., RAKIC, L. & STOJILJKOVIC, M. 2003. Age-related differences in MK-801- and amphetamine-induced locomotor and stereotypic activities of rats. *Neurobiol Aging*, 24, 715-23.
- VELLY, L. J., REY, M. F., BRUDER, N. J., GOUVITSOS, F. A., WITJAS, T., REGIS, J. M., PERAGUT, J. C. & GOUIN, F. M. 2007. Differential dynamic of action on cortical and subcortical structures of anesthetic agents during induction of anesthesia. *Anesthesiology*, 107, 202-12.
- VESELIS, R. A., PRYOR, K. O., REINSEL, R. A., LI, Y., MEHTA, M. & JOHNSON, R., JR. 2009. Propofol and midazolam inhibit conscious memory processes very soon after encoding: an event-related potential study of familiarity and recollection in volunteers. *Anesthesiology*, 110, 295-312.
- VESELIS, R. A., REINSEL, R. A., BEATTIE, B. J., MAWLAWI, O. R., FESHCHENKO, V. A., DIRESTA, G. R., LARSON, S. M. & BLASBERG, R. G. 1997. Midazolam changes cerebral blood flow in discrete brain regions: an H2(15)O positron emission tomography study. *Anesthesiology*, 87, 1106-17.
- VESELIS, R. A., REINSEL, R. A., FESHCHENKO, V. A. & JOHNSON, R., JR. 2004. Information loss over time defines the memory defect of propofol: a comparative response with thiopental and dexmedetomidine. *Anesthesiology*, 101, 831-41.

- VEYRAC, A., BESNARD, A., CABOCHE, J., DAVIS, S. & LAROCHE, S. 2014. The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 122, 89-129.
- VEZINA, P. 1993. Amphetamine injected into the ventral tegmental area sensitizes the nucleus accumbens dopaminergic response to systemic amphetamine: an in vivo microdialysis study in the rat. *Brain Res*, 605, 332-7.
- VEZINA, P. 1996. D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, 16, 2411-20.
- VEZINA, P. 2004. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 827-39.
- VIANNA, M. R., ALONSO, M., VIOLA, H., QUEVEDO, J., DE PARIS, F., FURMAN, M., DE STEIN, M. L., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*, 7, 333-40.
- VIANNA, M. R., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M., DE SOUZA, M. M., RODRIGUES, C., SANT'ANNA, M. K., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. 2001. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Braz J Med Biol Res*, 34, 233-40.
- VIGIL, F. A., MIZUNO, K., LUCCHESI, W., VALLS-COMAMALA, V. & GIESE, K. P. 2017. Prevention of long-term memory loss after retrieval by an endogenous CaMKII inhibitor. *Sci Rep*, 7, 4040.
- VILLABLANCA, J. R., SCHMANKE, T. D., LEKHT, V. & CRUTCHER, H. A. 2000. The growth of the feline brain from late fetal into adult life. I. A morphometric study of the neocortex and white matter. *Brain Res Dev Brain Res*, 122, 11-20.
- VUTSKITS, L. 2012. General anesthesia: a gateway to modulate synapse formation and neural plasticity? *Anesth Analg*, 115, 1174-82.
- VUTSKITS, L. 2018. General Anesthetics to Treat Major Depressive Disorder: Clinical Relevance and Underlying Mechanisms. *Anesth Analg*, 126, 208-216.
- VUTSKITS, L., GASCON, E., TASSONYI, E. & KISS, J. Z. 2005. Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter in vitro dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons. *Anesthesiology*, 102, 970-6.
- VUTSKITS, L. & XIE, Z. 2016. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance. *Nat Rev Neurosci*, 17, 705-717.
- WAGNER, A. R. 1981. SOP : a model of automatic memory processing in animal behavior. In: SPEAR, N. E., MILLER, R. R. & BINGHAMTON SYMPOSIUM ON MEMORY MECHANISMS IN ANIMAL, B. *Information processing in animals, memory mechanisms*. Hillsdale, N.J.: Lawrence Erlbaum Associates.
- WAHLSTROM, D., COLLINS, P., WHITE, T. & LUCIANA, M. 2010. Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: behavioral implications and issues in assessment. *Brain Cogn*, 72, 146-59.
- WANG, H., FENG, R., PHILLIP WANG, L., LI, F., CAO, X. & TSIEN, J. Z. 2008. CaMKII activation state underlies synaptic labile phase of LTP and short-term memory formation. *Curr Biol*, 18, 1546-54.

- WATABE-UCHIDA, M., ZHU, L., OGAWA, S. K., VAMANRAO, A. & UCHIDA, N. 2012. Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 74, 858-73.
- WAYMAN, G. A., IMPEY, S., MARKS, D., SANHEYOSHI, T., GRANT, W. F., DERKACH, V. & SODERLING, T. R. 2006. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron*, 50, 897-909.
- WAYMAN, G. A., LEE, Y. S., TOKUMITSU, H., SILVA, A. J. & SODERLING, T. R. 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, 59, 914-31.
- WICKLEY, P. J., DING, X., MURRAY, P. A. & DAMRON, D. S. 2006. Propofol-induced activation of protein kinase C isoforms in adult rat ventricular myocytes. *Anesthesiology*, 104, 970-7.
- WICKLEY, P. J., YUGE, R., MARTIN, B. A., MEYER, J. S. & DAMRON, D. S. 2009. Propofol activates and allosterically modulates recombinant protein kinase C epsilon. *Anesthesiology*, 111, 36-43.
- WILSON, C., CANNING, P. & CARAVATI, E. M. 2010. The abuse potential of propofol. *Clin Toxicol (Phila)*, 48, 165-70.
- WINWOOD, M. A. & JAGO, R. H. 1993. Anxiety levels following anaesthesia for day-case surgery. A comparison of state anxiety levels following induction of anaesthesia with propofol or thiopentone. *Anaesthesia*, 48, 581-4.
- WIXTED, J. T. & SQUIRE, L. R. 2011. The medial temporal lobe and the attributes of memory. *Trends Cogn Sci*, 15, 210-7.
- XIONG, M., LI, J., YE, J. H. & ZHANG, C. 2011. Upregulation of DeltaFosB by propofol in rat nucleus accumbens. *Anesth Analg*, 113, 259-64.
- XU, T., YU, X., PERLIK, A. J., TOBIN, W. F., ZWEIG, J. A., TENNANT, K., JONES, T. & ZUO, Y. 2009. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, 462, 915-9.
- XU, X. & DOMINO, E. F. 1994. Phencyclidine-induced behavioral sensitization. *Pharmacol Biochem Behav*, 47, 603-8.
- YETNIKOFF, L., LAVEZZI, H. N., REICHARD, R. A. & ZAHM, D. S. 2014. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience*, 282, 23-48.
- YIN, J., WANG, S. L. & LIU, X. B. 2014. The effects of general anaesthesia on memory in children: a comparison between propofol and sevoflurane. *Anaesthesia*, 69, 118-23.
- YON, J. H., DANIEL-JOHNSON, J., CARTER, L. B. & JEVTOVIC-TODOROVIC, V. 2005. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience*, 135, 815-27.
- YU, D., JIANG, Y., GAO, J., LIU, B. & CHEN, P. 2013. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. *Neurosci Lett*, 534, 41-6.
- YUTSUDO, N., KAMADA, T., KAJITANI, K., NOMARU, H., KATOOGI, A., OHNISHI, Y. H., OHNISHI, Y. N., TAKASE, K., SAKUMI, K., SHIGETO, H. & NAKABEPPU, Y. 2013. fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology*, 38, 895-906.

- ZECHARIA, A. Y., NELSON, L. E., GENT, T. C., SCHUMACHER, M., JURD, R., RUDOLPH, U., BRICKLEY, S. G., MAZE, M. & FRANKS, N. P. 2009. The involvement of hypothalamic sleep pathways in general anesthesia: testing the hypothesis using the GABAA receptor beta3N265M knock-in mouse. *J Neurosci*, 29, 2177-87.
- ZECHARIA, A. Y., YU, X., GOTZ, T., YE, Z., CARR, D. R., WULFF, P., BETTLER, B., VYSSOTSKI, A. L., BRICKLEY, S. G., FRANKS, N. P. & WISDEN, W. 2012. GABAergic inhibition of histaminergic neurons regulates active waking but not the sleep-wake switch or propofol-induced loss of consciousness. *J Neurosci*, 32, 13062-75.
- ZHANG, H., WANG, W., GAO, W., GE, Y., ZHANG, J., WU, S. & XU, L. 2009. Effect of propofol on the levels of neurotransmitters in normal human brain: a magnetic resonance spectroscopy study. *Neurosci Lett*, 467, 247-51.
- ZHOU, X., WANG, Y., ZHANG, C., WANG, M., ZHANG, M., YU, L. & YAN, M. 2015. The Role of Dopaminergic VTA Neurons in General Anesthesia. *PLoS One*, 10, e0138187.

Biografija

Željko Z. Pavković je rođen 20.10.1986. godine u Beogradu. Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu je upisao 2005. godine na smeru Biologija, a završio 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,56. Diplomski rad pod naslovom „Naselje Odonata u priobalju Beograda tokom letnjeg perioda 2010. godine: dinamizam i stanišne preferencije najčešćih vrsta“ uradio je na Katedri za ekologiju i geografiju životinja. Nakon uspešne odbrane diplomskog rada sa ocenom 10 i šestomesečnog rada u OŠ „Radoje Domanović“ u Beogradu, 2011. godine upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija eukariota. Iste godine se zapošljava u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, gde je angažovan na Projektu osnovnih istraživanja pod nazivom: „Proučavanje signalnih puteva i epigenetičkih mehanizama uključenih u kontrolu ekspresije humanih SOX gena: dalje rasvetljavanje njihove uloge u određivanju sudbine i diferencijacije ćelija“ (173051). Krajem 2012. godine se zapošljava u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“, učestvuje u realizaciji projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije“ (broj 173056), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživač-saradnik stiče 2015. godine, u koje je reizabran 2018. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradio je pod mentorstvom dr Vesne Pešić, naučnog savetnika Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“, u okviru Projekta 173056, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Član je Društva za neuronauke Srbije (DNS) i Federacije evropskih društava za neuronauke (FENS).

Željko Z. Pavković je do sada objavio 7 radova u međunarodnim časopisima od kojih je na 2 prvi autori i ima 9 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Жељко Павковић _____

Број индекса _____ Б3008/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Ефекти анестезије индуковане пропофолом на синаптичку пластичност,
активност допаминског система и понашање јувенилних пацова**

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

Потпис аутора

У Београду, _____ 15.06.2018. _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Жељко Павковић

Број индекса М3008/2011

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Ефекти анестезије индуковане пропофолом на синаптичку
пластичност, активност допаминског система и понашање јувенилних пацова

Ментор др Весна Пешић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 15.06.2018.

Изјава о коришћењу

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

**Ефекти анестезије индуковане пропофолом на синаптичку пластичност,
активност допаминског система и понашање јувенилних пацова**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CCBY)
2. Ауторство – некомерцијално (CCBY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CCBY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CCBY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CCBY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CCBY-SA)

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

Потпис аутора

У Београду, 15.06.2018.

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

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

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

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

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

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