

# NEUROKEMIJSKA I MOLEKULARNOGENETIČKA PODLOGA PROMJENA U EKSPLORATORNOM PONAŠANJU ŠTAKORA NAKON NEONATALNOG IZLAGANJA HIPOKSIJI

---

**Nikolić, Barbara**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:684485>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Barbara Nikolić

**NEUROKEMIJSKA I MOLEKULARNO-  
GENETIČKA PODLOGA PROMJENA U  
EKSPLORATORNOM PONAŠANJU  
ŠTAKORA NAKON NEONATALNOG  
IZLAGANJA HIPOKSIJI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Barbara Nikolić

**NEUROCHEMICAL AND MOLECULAR-  
GENETIC BACKGROUND OF CHANGES  
IN RAT EXPLORATORY BEHAVIOR  
AFTER  
EXPOSURE TO NEONATAL HYPOXIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022.

Ovaj doktorski rad je dio istraživanja koje je inicirano, osmišljeno, financirano i provedeno u svrhu projektnog cilja „Razvoj novih eksperimentalnih *in vivo* modela“ projekta Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“ (KK.01.1.1.01.0007, voditelja prof.dr.sc. Miloša Judaša) i projekta „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji“ (HRZZ, IP-2019-04-3182, voditeljice prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević), kojih je nositelj Medicinski fakultet, a na kojima je prof.dr.sc. Dubravka Hranilović suradnik.

Uzgoj, selekciju štakora, „in vivo“ pokuse hipoksije, perinatalna biometrijska mjerenja, postnatalni monitoring štakora, test propinjanja u cilindru, test rooting refleksa, test pamćenja lokacija objekta (testovi ponašanja prikazani u prilogu ove doktorske disertacije) provodila je dr.Sara Trnski, dr.vet.med. u Odsjeku za laboratorijske životinje na HIIM, Medicinskog fakulteta, kao i izolaciju moždanih regija za daljnje molekularne i analize ekspresije gena u moždanom tkivu, u okviru projekta HrZZ „Razvoj karijere doktoranda“ (DOK 2018-01-3771) pod mentorstvom prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević i u svrhu realizacije projektnog cilja „Razvoj novih eksperimentalnih *in vivo* modela“ projekta Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“, KK.01.1.1.01.0007 i projekta „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji“ (HRZZ, IP-2019-04-3182).

Svi *in vivo* pokusi i uzorkovanje na životinjama za navedena istraživanja odobreni su 2019. od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (Ur.br. 380-59-10106-19-111/210) i Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (EP231/2019; UP/I-322-01/19.01/75), a sukladno odredbama Zakona o zaštiti životinja (102/17 i 32/19) i Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN55/13; 39/17; 116/119).

Doktorski rad izrađen je pod neposrednim mentorstvom prof.dr.sc. Dubravke Hranilović, u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **INFORMACIJE O MENTORU: Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović**

Dr. sc. Dubravka Hranilović rođena je 14. srpnja 1969. godine u Zagrebu, gdje je pohađala osnovnu i srednju školu. 1988. godine upisuje studij biologije, smjer molekularna biologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je 1993. godine diplomirala, 1996. godine magistrirala, a 2000. godine doktorirala s radom "Struktura i ekspresija gena za serotoninški prijenosnik u uvjetima promijenjene homeostaze serotonina". Od 1994. do 2006. godine radila je, najprije kao znanstvena novakinja, a zatim kao znanstvena suradnica, u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Godine 2006. prelazi na Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu na radno mjesto docentice u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka, 2010. godine na radno mjesto izvanredne profesorice, a 2016. godine na radno mjesto redovite profesorice. U ožujku 2021. izabrana je u znanstveno zvanje znanstvene savjetnice u trajnom zvanju. Vodila je dva domaća i aktivno sudjelovala na šest domaćih i tri međunarodna znanstvena projekta. Suradnica je u Znanstvenom centru izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost. Koautorica je 44 znanstvena rada, jednog poglavlja u znanstvenoj knjizi i devedesetak kongresnih priopćenja. Prema bazi Web of Science, radovi su joj citirani 925 puta, uz h-indeks 16. Godinu dana provela je na poslijedoktorskom usavršavanju na Sveučilištu u Pennsylvaniji, Philadelphia, SAD te bila na šest kraćih znanstvenih boravaka na Sveučilištima u Wuerzburgu i Bonnu, Njemačka. Recenzentica je u brojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim časopisima te je bila članica uredničkog odbora časopisa *Psychiatry Journal* i urednica tematskog broja časopisa *Frontiers in Neuroscience*. Bila je članica znanstvenog odbora pet, a organizacijskog odbora sedam znanstvenih skupova.

Do sada je bila (su)nositeljica kolegija Animalna fiziologija i Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima na preddiplomskom studiju, kolegija Temelji animalne fiziologije, Neurofiziologija i Neurofiziologija i endokrinologija na diplomskom studiju te četiri kolegija na doktorskim studijima Sveučilišta u Zagrebu. Bila je mentorica 29 završnih radova, 22 diplomskih rada i tri doktorske disertacije. Koautorica je tri sveučilišna udžbenika/priručnika. Članica je Hrvatskog biološkog društva, Hrvatskog društva za neuroznanost i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. Više godina sudjelovala je u izvođenju dva stručna tečaja: Metodološki tečajevi u biologiji i medicini i Tečaj osposobljavanja za rad s laboratorijskim životinjama (LabAnim). Na razini Biološkog odsjeka, bila je članica Etičkog povjerenstva za istraživanja na pokusnim životinjama, članica Vijeća doktorskog studija Biologije, pomoćnica pročelnika za poslijediplomske studije i voditeljica doktorskog studija Biologije, predstavnica Odsjeka u Fakultetskom vijeću te predstojnica Zavoda za animalnu fiziologiju. Na razini Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, bila je članica Etičkog povjerenstva, prodekanica za znanost i doktorske studije te u dva mandata prodekanica za nastavu. Na razini Sveučilišta u Zagrebu, bila je članica, zamjenica predsjednika i predsjednica Vijeća prirodoslovnog područja te članica Radne skupine za izradu strategije Sveučilišta u Zagrebu, Povjerenstva za odabir studenata i zaposlenika u programima mobilnosti, Radne skupine za priznavanje ECTS bodova za izvannastavnu aktivnost na Sveučilištu u Zagrebu i Radne skupine za studijske programe.

# ZAHVALA

Ovim putem prvenstveno želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na stručnosti, strpljenju, dobroj organizaciji i iznimnoj poslovnoj etičnosti. Bili ste mi pravi uzor u svome odnosu prema znanstvenom radu, studentima i nastavi. Sretna sam što sam imala priliku imati Vas za mentora jer se vidi da uistinu volite ono što radite i da Vam je stalo do Vaših suradnika i dobrih međuljudskih odnosa!

Hvala prof. dr. sc. Nataši Jovanov Milošević na ljubaznosti i stručnosti u vođenju cijelog ovog projekta, te trudu koji ulaže u razvoj novih ideja i poticanje dobre suradničke atmosfere. Nadam se da će se ovaj projekt razvijati i dalje i donijeti još puno zanimljivih znanstvenih otkrića!

Hvala Sari Trnski, koja je žrtvovala svoje vrijeme i energiju kako bi nam pokusi išli po planu! Drago mi je što imamo tako kvalitetnu suradnju i komunikaciju, a pogotovo što sam, osim suradnice, stekla i dobru prijateljicu!

Hvala svim mojim kolegama sa Zavoda za animalnu fiziologiju na podršci i svim lijepim, zabavnim i nezaboravnim zajedničkim trenucima!

Posebno hvala mojim gospođama Dyani, Idi i Kukolj Marini – s vama dani nikad nisu sivi. Bolje kolegice/prijateljice nisam mogla poželjeti!

Hvala i svim mojim prijateljima koji su me pratili kroz život i bili mi podrška bez obzira na okolnosti!

I na kraju, hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci i ljubavi! Bez vas ne bih bila tu gdje jesam.

## SAŽETAK

### **NEUROKEMIJSKA I MOLEKULARNO-GENETIČKA PODLOGA PROMJENA U EKSPLORATORNOM PONAŠANJU ŠTAKORA NAKON NEONATALNOG IZLAGANJA HIPOKSIJI**

**Barbara Nikolić**

Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Usljed različitih komplikacija tijekom trudnoće i prijevremenog poroda može doći do nastanka hipoksije koja predstavlja rizik za hipoksijsko-ishemijsku ozljedu mozga čije posljedice ovise o vremenu nastanka, jačini i lokalizaciji ozljede. S ciljem razvoja životinjskog modela blage hipoksijske ozljede mozga, Wistar štakore izložili smo akutnoj hipoksiji (8% O<sub>2</sub>, 2h) prvog postnatalnog dana (PND1). U dobi PND30-PND45, štakore smo izložili nizu bihevioralnih testova, a žrtvovanje je izvršeno u dobi PND50 nakon čega su prikupljeni uzorci moždanog debla za određivanje razine katekolamina te talamusa, somatosenzoričkog korteksa i hipokampusu za određivanje diferencijalne genske ekspresije. Rezultati su pokazali kako akutna neonatalna hipoksija uzrokuje promjenu u eksploratornom ponašanju štakora koju prati povišena razina dopamina u moždanom deblu te promjene u ekspresiji dopaminskih receptora u talamusu i somatosenzoričkom korteksu. Hipoksija je uzrokovala i povišenu ekspresiju gena koji sudjeluju u dopaminskoj signalizaciji u talamusu, ekscitaciji i inhibiciji u somatosenzoričkom korteksu te neuromodulaciji prostornog pamćenja u hipokampusu. Pretpostavljamo da u podlozi promijenjenog eksploratornog ponašanja stoji poremećeno somatosenzoričko procesiranje koje nastaje djelovanjem hipoksije izravno na somatosenzorički korteks ili neizravno putem narušene talamo-kortikalne komunikacije i/ili otežano prostorno pamćenje uzrokovano strukturnim promjenama u hipokampusu.

Rad sadrži: 101 stranica, 39 slika, 9 tablica, 182 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski

Ključne riječi: hipoksijska ozljeda mozga, somatosenzoričko procesiranje, prostorno pamćenje

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac

prof. dr. sc. Zdravko Petanjek

## ABSTRACT

### **NEUROCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC BACKGROUND OF CHANGES IN RAT EXPLORATORY BEHAVIOR AFTER EXPOSURE TO NEONATAL HYPOXIA**

**Barbara Nikolić**

Division of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Various complications during pregnancy and preterm birth can lead to hypoxia posing a risk of hypoxic-ischemic brain injury, with consequences depending on the time of onset, severity, and location of the injury. In order to develop an animal model of mild hypoxic brain injury, Wistar rats were exposed to acute hypoxia (8% O<sub>2</sub>, 2h) on the first postnatal day (PND1). The animals were submitted to a battery of behavioral tests at PND30-PND45, and sacrificed at PND50. Brainstem samples were collected to determine catecholamine levels, and thalamus, somatosensory cortex and hippocampus to determine differential gene expression. The results showed that acute neonatal hypoxia caused a change in the exploratory behavior of rats, accompanied by elevated levels of dopamine in the brainstem and increased dopamine receptor gene expression in the thalamus and somatosensory cortex. Hypoxia also caused increased expression of genes involved in: dopamine signaling in the thalamus, excitation and inhibition in the somatosensory cortex, and neuromodulation of spatial memory in the hippocampus. We assume that the observed changes in exploratory behavior may represent a consequence of disturbed somatosensory processing, caused either by the direct effect of hypoxia on the somatosensory cortex or indirect effect through impaired thalamo-cortical communication, and/or the consequence of impaired spatial memory caused by structural changes in the hippocampus.

Ph.D. thesis contains: 101 pages, 39 figures, 9 tables, 182 references, original in Croatian

Key words: hypoxic brain injury, somatosensory processing, spatial memory

Supervisor: Dubravka Hranilović, PhD, Professor

Reviewers: Sofia Ana Blažević, PhD, Assistant Professor

Dubravka Švob Štrac, PhD, Associate Professor

Zdravko Petanjek, PhD, Professor



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hipoteza istraživanja .....	2
1.2. Cilj istraživanja .....	2
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
2.1. Hipoksijsko-ishemijska ozljeda mozga .....	3
2.1.1. Patofiziologija hipoksije-ishemije .....	3
2.1.2. Vremenski razvoj hipoksijsko-ishemijske ozljede .....	6
2.1.3. Uzroci fetalne hipoksije .....	7
2.1.4. Posljedice hipoksijsko-ishemijske ozljede mozga .....	8
2.2. Animalni modeli hipoksijsko-ishemijske ozljede .....	8
2.2.1. Rice-Vannuccijev model i njegove varijacije .....	9
2.2.2. Neinvazivna hipoksija .....	10
2.3. Neurobiološka osnova ponašanja .....	10
2.3.1. Katekolamini .....	11
2.3.1.1. <i>Noradrenalin</i> .....	11
2.3.1.2. <i>Dopamin</i> .....	13
2.3.1.2.1. <i>Dopaminski receptori</i> .....	14
2.3.2. Ekscitacijski i inhibicijski neurotransmitori .....	17
2.3.2.1. <i>GABA receptori</i> .....	17
2.3.2.2. <i>Glutamatni receptori</i> .....	18
2.3.3. Neuropeptidi .....	21
2.3.3.1. <i>VIP</i> .....	21
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1. Materijal .....	23
3.1.1. Životinje .....	23
3.1.2. Uredaji i pribor .....	24
3.1.3. Otopine, kemikalije i kompleti .....	25
3.2. Metode .....	26
3.2.1. Izlaganje neonatalnih štakora uvjetima akutne normobarične hipoksije .....	26
3.2.2. Testovi ponašanja .....	27
3.2.2.1. <i>Test u otvorenom polju</i> .....	27
3.2.2.2. <i>Test na ploči s rupama</i> .....	28
3.2.2.3. <i>Test u T-labirintu</i> .....	28

3.2.2.4. <i>Test društvenog odabira</i> .....	29
3.2.3. Prikupljanje i homogenizacija uzoraka moždanog tkiva.....	30
3.2.4. Mjerenje koncentracije katekolamina.....	31
3.2.5. Izolacija RNA.....	32
3.2.6. Sekvenciranje RNA .....	33
3.2.7. Reverzna transkripcija i provjera uspješnosti metodom PCR.....	33
3.2.8. Kvantitativni PCR.....	35
3.2.9. Statistička obrada rezultata.....	37
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>38</b>
4.1. Masa životinja.....	38
4.1.1. Prirast mase tijekom sazrijevanja .....	38
4.2. Testovi ponašanja .....	39
4.2.1. Test u otvorenom polju .....	39
4.2.1.1. <i>Horizontalno kretanje</i> .....	39
4.2.1.2. <i>Vertikalno kretanje</i> .....	40
4.2.2. Test na ploči s rupama .....	41
4.2.3. Test društvenog odabira .....	41
4.2.4. Test u T-labirintu .....	43
4.2.4.1. <i>Prostorno pamćenje</i> .....	43
4.2.4.2. <i>Gubitak mase tijekom razdoblja posta</i> .....	45
4.3. Koncentracija katekolamina u moždanom deblu.....	46
4.3.1. Određivanje optimalne količine uzorka za mjerenje koncentracije katekolamina metodom ELISA .....	46
4.3.2. Razina dopamina u moždanom deblu .....	48
4.3.3. Razina noradrenalina u moždanom deblu .....	49
4.4. Ekspresija gena dopaminskih D1 i D2 receptora .....	50
4.4.1. Talamus .....	50
4.4.2. Somatosenzorički korteks .....	52
4.4.3. Hipokampus .....	53
4.5. Sekvenciranje RNA .....	54
4.6. Provjera diferencijalne ekspresije odabranih gena metodom qPCR .....	55
4.6.1. Ispitivanje učinkovitosti qPCR reakcija za pojedine početnice i određivanje optimalne količine uzorka za qPCR reakciju .....	55
4.6.2. Talamus .....	56
4.6.2.1. <i>Prkar2a</i> .....	56
4.6.2.2. <i>Ppp1r1b</i> .....	56

4.6.2.3. <i>Ppp1r1c</i> .....	57
4.6.3. Somatosenzorički korteks .....	58
4.6.3.1. <i>Gria2</i> .....	58
4.6.3.2. <i>Grin2a</i> .....	58
4.6.3.3. <i>Grm5</i> .....	59
4.6.3.4. <i>Gabrb2</i> .....	60
4.6.4. Hipokampus .....	61
4.6.4.1. <i>VIP</i> .....	61
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>62</b>
5.1. Promjene u tjelesnoj masi.....	62
5.2. Promjene u ponašanju .....	63
5.3. Promjene u homeostazi dopamina .....	67
5.4. Promjene u ekspresiji gena u ciljnim regijama .....	70
5.4.1. Talamus i dopaminergičke projekcije iz moždanog debla .....	70
5.4.2. Kortikalna aktivnost i somatosenzoričko procesiranje.....	73
5.4.3. Hipokampus i prostorno pamćenje.....	75
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>78</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>80</b>
<b>8. PRILOG .....</b>	<b>93</b>
<b>9. POPIS KRATICA .....</b>	<b>96</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>98</b>

## 1. UVOD

Pravilan razvoj moždanih struktura u prenatalnom i ranom postnatalnom razdoblju ključan je za razvoj motorike, sensorike te viših kognitivnih funkcija kao što su učenje i pamćenje, pažnja, percepcija i donošenje odluka. Jedan od najčešćih poremećaja u tom razdoblju je hipoksija/ishemija, stanje smanjene opskrbe kisikom koje nastaje uslijed različitih komplikacija tijekom trudnoće, a može rezultirati ozljedom mozga, budući da je to tkivo koje je najosjetljivije na nedostatak kisika. Klinički simptomi hipoksijsko-ishemijske (HI) ozljede ovise o vremenu nastanka, jačini i lokalizaciji ozljede, a težina posljedica može varirati od mentalne retardacije, cerebralne paralize i epilepsije do poteškoća u učenju i lakših bihevioralnih poremećaja.

Umjerene i blaže ozljede počinju se očitovati tek u školskoj dobi (Hayes i sur. 2018), a bihevioralni i emocionalni poremećaji koji su zamijećeni kod takve djece obuhvaćaju anksioznost, depresiju, manjak pozornosti, hiperaktivnost, senzoričke poremećaje i poremećaje iz autističnog spektra (van Handel i sur., 2007., Millar i sur., 2017.). Također treba uzeti u obzir da dugoročne fiziološke promjene koje nastanu kao odgovor na hipoksiju mogu kasnije tijekom života pridonijeti razvoju neurodegenerativnih bolesti (Nalivaeva i sur., 2018.). Za bolje razumijevanje procesa nastanka perinatalne hipoksijsko-ishemijske ozljede i njezinih fizioloških, anatomskih i bihevioralnih posljedica, razvijani su različiti animalni modeli koji su uključivali majmune, ovce, svinje, kuniće, zamorce i miševе. Cilj razvoja životinjskih modela je razjasniti mehanizme koji leže u podlozi nastanka i razvoja HI ozljede, te omogućiti prevenciju i pronalazak odgovarajuće terapije u različitim fazama ozljede. Zbog toga je poželjno da model što vjernije imitira etiološku podlogu, histopatološku sliku i funkcionalni ishod (Yager, 2004.). Najčešće korišteni modelni organizam je štakor zbog jednostavnosti uzgoja i rukovanja te mogućnosti provedbe bihevioralnih testiranja. Iako je do sada najzastupljeniji model neonatalne HI ozljede bio invazivni Rice-Vannuccijev (RV) model koji se zasniva na unilateralnoj ligaciji karotide, zadnjih je godina u trendu razvoj hipoksijskog modela štakora (eng. „*hypoxia-only*“), gdje se izostavlja invazivno nefiziološko izazivanje ishemije, a životinja se samo izlaže manjku kisika u hipoksijskoj komori. Takvi modeli imaju potencijal za razvoj i opis blažih ozljeda mozga i lakše rasvjetljavanje biokemijske i molekularne podloge djelovanja same hipoksije na moždano tkivo (Millar i sur., 2017.).

## **1.1. Hipoteza istraživanja**

Blaga akutna neonatalna hipoksija uzrokuje nastanak hipoksijske ozljede mozga s posljedicama u obliku bihevioralnih promjena koje se mogu očitovati u adolescentnoj dobi štakora, uključujući promjene u lokomociji, emocionalnom ponašanju (eksploratornost, anksioznost, socijabilnost) i prostornom učenju. U podlozi uočenih promjena u eksploratornom ponašanju stoji narušena neurokemijska homeostaza, koja se prvenstveno očituje u promjeni koncentracije katekolamina u moždanom deblu, i molekularno-genetičke promjene, koje uključuju ekspresiju gena u regijama mozga odgovornim za senzoričku percepciju i prostorno pamćenje.

## **1.2. Cilj istraživanja**

Opći cilj rada je istražiti neurokemijsku i molekularno-genetičku podlogu promjena u ponašanju štakora nakon neonatalnog izlaganja hipoksiji.

Specifični ciljevi:

1. Usporedbom s kontrolnim životinjama, u tri neovisne skupine hipoksičnih mladunaca štakora (PND33-45) ispitati promjene u lokomociji, anksioznosti i eksploratornom ponašanju (test u otvorenom polju i na ploči s rupama), socijabilnosti (test društvenog odabira) i prostornom učenju (T-labirint).
2. Po završetku testiranja, dijelu životinja iz kontrolnih i hipoksičnih skupina, nakon žrtvovanja, izdvojiti i pohraniti pojedine regije mozga za biokemijska i molekularno-genetička testiranja.
3. Odrediti koncentracije katekolamina (dopamin, noradrenalin) u moždanom deblu.
4. Odrediti razinu ekspresije gena za dopaminske i/ili adrenergične receptore u regijama odgovornim za senzoričku (talamus, somatosenzorički korteks) percepciju i prostorno pamćenje (hipokampus) (qPCR).
5. Potvrditi razliku u ekspresiji odabranih gena, indiciranih RNA sekvenciranjem, pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Real-time PCR, qPCR) i to: a) u talamusu - geni koji sudjeluju u dopaminskoj signalizaciji, b) u somatosenzoričkom korteksu – geni za ekscitacijske i inhibicijske receptore, c) u hipokampusu – gen za neuromodulaciju učenja i pamćenja.

## **2. LITERATURNI PREGLED**

### **2.1. Hipoksijsko-ishemijska ozljeda mozga**

Hipoksijsko-ishemijska (HI) ozljeda mozga, koja se još naziva i hipoksijsko-ishemijskom encefalopatijom (HIE), jedan je od glavnih uzroka smrtnosti novorođenčadi ili pak trajnih neuroloških posljedica u preživjelih. Incidencija HIE iznosi 2.5 na 1000 terminski rođene djece (>37 tjedana gestacije), dok se kod prijevremeno rođene djece (<37 tjedana gestacije) taj broj penje na 5-9 na 1000 rođenih (Graham i sur., 2008., Gopagondanahalli i sur., 2016.). Ovi podaci predstavljaju stanje u razvijenijim zemljama, dok je u nerazvijenim zemljama zbog ograničenog pristupa majčinskoj i neonatalnoj skrbi učestalost veća i do 10 puta (Gillam-Krakauer, 2019.). Rasprostranjenost i težina ozljede ovise o gestacijskoj dobi fetusa, duljini izloženosti te jačini hipoksije-ishemije (Vannucci, 2000.). Novorođenčad kod koje se sumnja na HIE klasificira se prema sustavu Sarnat, koji procjenjuje razinu svijesti, tonus mišića, tetivni refleks i autonomne funkcije te na temelju toga vrši podjelu u tri kategorije: faza I (blaga), faza II (umjerena) i faza III (teška) HIE (Douglas-Escobar, 2015.). Kod teške HIE, smrtnost iznosi 25-50%, a najviše smrti se događa u prvim danima života zbog višestrukog zatajivanja organa. Oko 80% djece koja prežive tešku HIE razvije ozbiljne i dugoročne neurološke komplikacije, dok se kod umjerene HIE taj broj spušta na 30-50%. Napredak u pružanju potpomognutog disanja i bolja intenzivna skrb doveli su do značajno većeg preživljavanja nedonoščadi rođene nakon 23. gestacijskog tjedna, čime se povećao pritisak na društvo zbog učestale pojave invalidnosti i poteškoća kod takve djece.

#### **2.1.1. Patofiziologija hipoksije-ishemije**

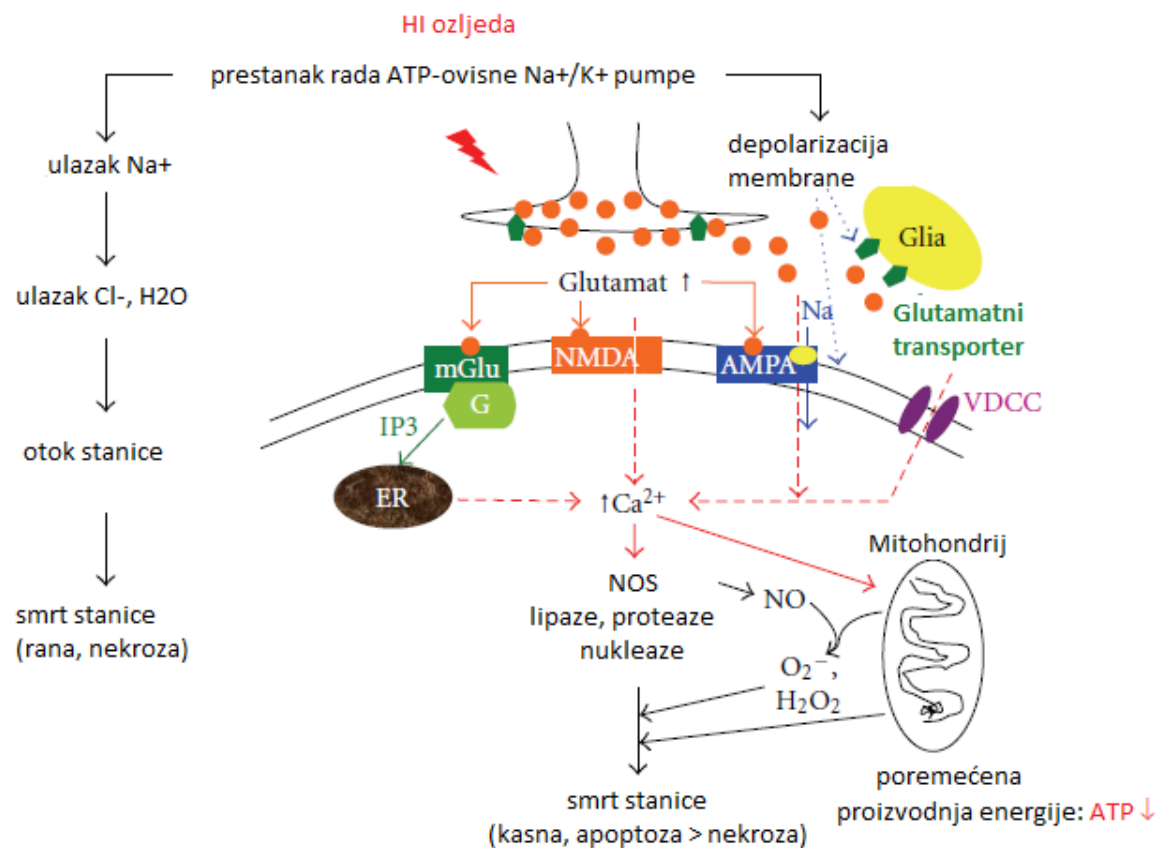
Perinatalna hipoksijsko-ishemijska ozljeda mozga predstavlja značajan problem u neonatalnoj neurologiji. Uzrok takvih ozljeda leži u nedostatku kisika i posljedičnom energetske deficitu, na što je živčano tkivo posebno osjetljivo. Dva glavna mehanizma koja dovode do nedostatka kisika su smanjena koncentracija kisika u krvi (hipoksemija) ili smanjena količina krvi koja perfundira mozak (ishemija). U većini slučajeva perinatalne HIE, hipoksemija ili ishemija nastaju kao rezultat asfiksije koja se definira kao poremećaj u izmjeni respiratornih plinova, kisika i ugljikovog dioksida. Glavno dodatno obilježje asfiksije je hiperkapnija, povećana koncentracija ugljikovog dioksida, koja rezultira drugim metaboličkim (npr. acidoza) i fiziološkim (npr. početno povećanje moždanog protoka krvi) promjenama.

U početnoj fazi asfiksije, karotidni i aortni kemoreceptori detektiraju manjak kisika te pokreću odgovor simpatikusa koji uzrokuje perifernu vazokonstrikciju, te parasimpatikusa koji utječe na nastanak bradikardije, dok istodobno dolazi do vazodilatacije moždanih krvnih žila uslijed nakupljanja adenoizina i dušikovog oksida (Giussani, 2015.). Zbog promjena koje nastanu u fetalnoj cirkulaciji dolazi do povećane raspodjele krvi u mozak, povećanog moždanog protoka i gubitka vaskularne autoregulacije. Povećanje u protoku krvi najviše se očituje u moždanom deblu u kojemu se nalaze vitalni centri, a najmanje u bijeloj tvari mozga. Mehanizam takve heterogene regulacije je zasad nepoznat, ali se pretpostavlja da njime upravljaju endogeni opioidi (Volpe i sur., 2017.). U teškoj i produljenoj asfiksiji, zbog hipoksijski inducirane bradikardije i zatajenja miokarda, dolazi do smanjenja minutnog volumena srca i nastanka sistemske hipotenzije što u konačnici dovodi do smanjenja moždanog protoka krvi. Veliko smanjenje protoka krvi u mozgu zamijećeno je u pokusima na terminskim fetusima majmuna, podvrgnutima teškoj i produljenoj asfiksiji, posebice u parasagitalnim regijama moždanih hemisfera (Reivich i sur., 1972.). Glavni rezultat smanjenog protoka krvi je neodgovarajuća opskrba kisikom koja može uzrokovati nastanak oštećenja u pogođenim moždanim regijama.

Period nakon završetka hipoksijsko-ishemijske epizode, uz pojavu reperfuzije, smatra se najkritičnijim vremenskim okvirom u kojem se događaju mnoge štetne posljedice hipoksije na metabolizam mozga, a kasnije i na samu strukturu. Glavni uzrok je prvenstveno nedostatak energije koji nastaje zbog manjka kisika i glukoze što dovodi do prestanka rada ATP-ovisne  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpe čime započinje kaskada ostalih poremećaja kao što su nakupljanje izvanstaničnih ekscitacijskih aminokiselina (posebice glutamata), povećanje citosolnog kalcija i stvaranje slobodnih radikala. Ekscitotoksičnost glutamata posljedica je depolarizacije membrane i njegovog prekomjernog otpuštanja te nemogućnosti povratnog unosa zbog prestanka rada  $\text{Na}^+$ -ovisnog glutamatnog prijenosnika što uzrokuje nakupljanje glutamata u sinaptičkoj pukotini i prekomjerno podraživanje postsinaptičkih NMDA i AMPA receptora. Aktivacijom tih receptora, dolazi do prekomjernog ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu koji aktivira fosfolipaze, proteaze i nukleaze putem kojih uzrokuje degradaciju lipida, proteina i DNA, a aktivacijom fosfolipaze A2 i ksantin oksidaze potiče stvaranje slobodnih radikala (Lai i Yang, 2011.). Slobodni radikali pokreću lančane reakcije i uzrokuju ireverzibilna biokemijska oštećenja koja dovode do smrti stanica i oštećenja tkiva.

Dva osnovna mehanizma stanične smrti koja uzrokuju odumiranje neurona su nekroza i apoptoza. Nekrozu karakterizira otok, dezintegracija membrane, ruptura stanice i otpuštanje unutarstaničnog sadržaja nakon čega kao posljedica slijede upala i fagocitoza. Proces nekroze

nastaje obično nakon jake, ponekad čak i kratkotrajne ozljede, dok se apoptoza javlja nakon manje intenzivne, dugotrajnije ozljede. Apoptozu, koja se može pojaviti i nakon više sati i dana nakon primarne ozljede, karakterizira kondenzacija i marginacija kromatina, smanjenje stanica, relativno očuvanje staničnih membrana i konačna smrt stanica bez stvaranja upale. Glavni pokretači apoptoze su prekomjerni ulazak kalcija u stanicu i stvaranje reaktivnih kisikovih radikala koji dovode do membranskih perturbacija i pokretanja apoptotskih kaskadnih reakcija (Slika 1.).



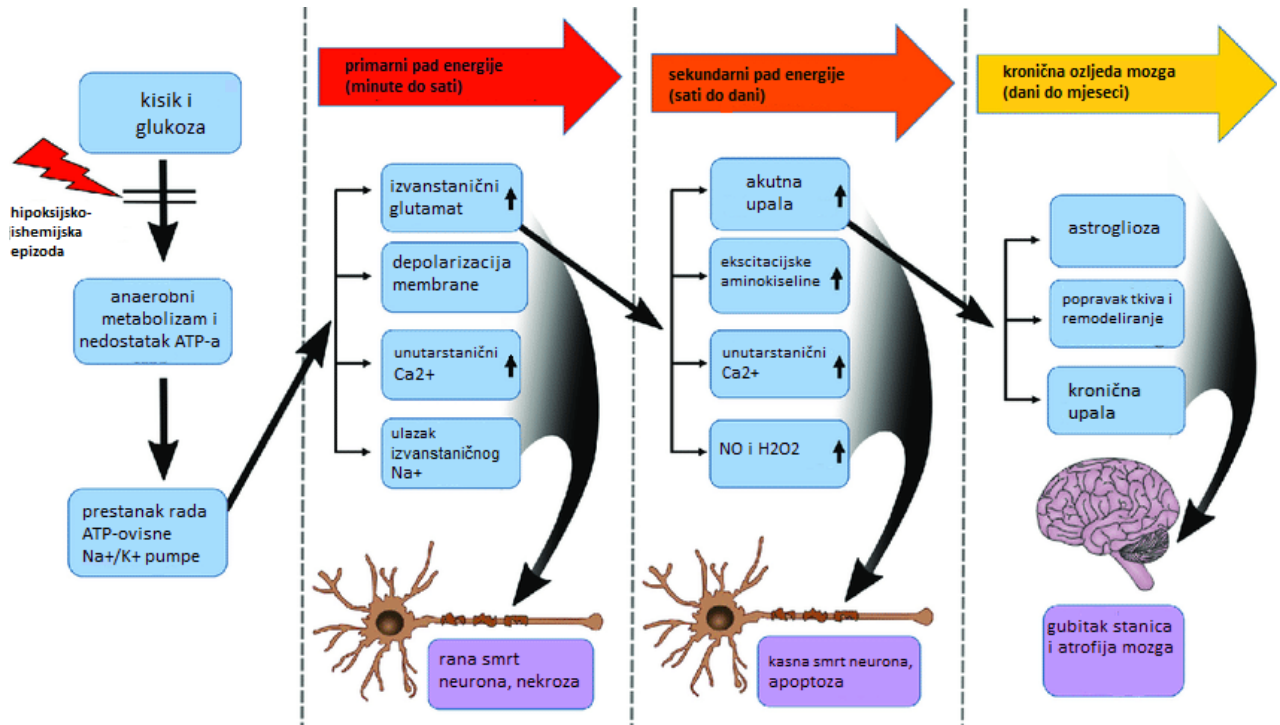
**Slika 1.** Patogeneza hipoksijsko-ishemijske ozljede na staničnoj razini. Mehanizmi stanične smrti (Lai i Yang, 2011.).

Inicijalno smanjenje razine visokoenergetskih fosfata uzrokuje seriju naknadnih poremećaja koja započinje prestankom rada ATP-ovisne Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpe. Ako je ozljeda jaka, akutni rezultat je nagli ulazak natrija kojeg slijede klor i voda što uzrokuje nekrotični otok i lizu stanice. Češću pojavu predstavljaju dugotrajnije, manje teške ozljede, kod kojih dolazi do depolarizacije membrane što uzrokuje izvanstaničnu akumulaciju glutamata, povećani citosolni kalcij i kaskadu događaja koji dovode do odgođene apoptotske smrti stanice.



## 2.1.2. Vremenski razvoj hipoksijsko-ishemijske ozljede

Nastanak oštećenja mozga uzrokovanog hipoksijom ne odvija se samo tijekom same hipoksemije ili ishemije, već je to dugotrajni proces koji se razvija kroz više faza (Slika 2.). Nakon primarnog pada proizvodnje energije uzrokovanog nedostatkom kisika te nastanka početnog oštećenja tkiva, slijedi reperfuzija koja dovodi do trenutnog oporavka razine ATP-a u fazi latencije. Latentna faza predstavlja najvažniji vremenski okvir za terapijsko djelovanje na štetne posljedice hipoksije i sprječavanje širenja ozljede, a traje šest do dvanaest sati od njenog nastanka. Nakon latentne faze, zahvaljujući širenju ekscitotoksičnosti, oksidativnog stresa i upale, dolazi do nastanka sekundarnog pada proizvodnje energije u sekundarnoj fazi koja je obilježena pojavom epileptičnih napadaja, a traje od 12 sati do 3 dana nakon početka ozljede. Tercijarna faza je završna faza ozljede koja može trajati danima ili čak mjesecima, a obilježena je remodeliranjem neuronskih krugova, astrogliozom i pokušajem regeneracije oštećenih područja. Ako se radi o težim ozljedama, u ovoj fazi moguće je poremećeno sazrijevanje i umrežavanje neurona, gubitak trofičke podrške i nastanak kronične upale (Berger i sur., 2017.).



Slika 2. Vremenski razvoj hipoksijsko-ishemijske ozljede kroz tri faze (Li i sur., 2017.)

### 2.1.3. Uzroci fetalne hipoksije

Po tipu nastanka fetalne hipoksije razlikujemo preplacentalnu, uteroplacentalnu i postplacentalnu hipoksiju (Kingdom i Kaufmann, 1997.). U preplacentalnoj hipoksiji manjkom kisika pogođeni su i majka i fetus. Glavni uzroci ovakve hipoksije su hipoksični okoliš (npr. velika nadmorska visina), postojeće kardiovaskularne bolesti (npr. zatajenje srca, plućna hipertenzija), infekcije, kronična upala ili anemija majke koji mogu značajno ograničiti oksigenaciju majke i fetusa. Kod uteroplacentalne hipoksije majčina oksigenacija je normalna, ali je poremećena uteroplacentalna cirkulacija. Uzroci tomu mogu biti abnormalna placentacija u ranoj fazi, što je česta dijagnoza u trudnoćama s intrauterinim zastojem u rastu, gestacijska hipertenzija i preeklampsija, ili placentalne vaskularne bolesti u kasnijim fazama trudnoće. U postplacentalnoj hipoksiji samo fetus postaje hipoksičan, zbog smanjenog protoka krvi u uterinoj arteriji (npr. mehanička kompresija, tromboza, ruptura), progresivnog fetalnog zatajenja srca ili nekih genetičkih anomalija (Hutter i sur., 2010.). Po duljini nastanka ozljede, hipoksiju možemo podijeliti na akutnu, koja se javlja u kratkotrajnim epizodama, te kroničnu, koja može potrajati nekoliko tjedana ili čak mjeseci (Tablica 1.)

**Tablica 1.** Uzroci akutne i kronične fetalne hipoksije (Giussani, 2015.).

<b>Akutna fetalna hipoksija</b>	
Kompresija pupčane vrpce Kontraksije miometrija tijekom porođaja Kratki intervali između kontrakcija Abrupcija placente Teško krvarenje prije poroda Višestruka trudnoća Oligohidramnion	
<b>Kronična fetalna hipoksija</b>	
Uteroplacentalna disfunkcija Preeklampsija Gestacijska ili esencijalna hipertenzija Korioamnionitis Polihidramnion Trudnoća na visokoj nadmorskoj visini Pušenje u trudnoći Cijanotična bolest majke Respiratorna bolest majke Ponavljajuća krvarenja prije poroda Anemija majke Gestacijski dijabetes	Pretilost majke Višestruka trudnoća Zloupotreba različitih supstanci u trudnoći Autoimuna bolest majke Trombofilija naslijeđena od majke Dijabetes melitus tipa 1 Malarija majke Majčina bolest srpastih stanica Fetalna strukturna abnormalnost srca ili tahiaritmija

#### **2.1.4. Posljedice hipoksijsko-ishemijske ozljede mozga**

Posljedice i klinički simptomi hipoksijsko-ishemijske ozljede, ovisno o vremenu nastanka, jačini i lokalizaciji, mogu biti raznoliki – od teške mentalne retardacije, cerebralne paralize i epilepsije do minimalne cerebralne disfunkcije i poremećaja ponašanja (Habek i sur., 2000.). Cerebralna paraliza i motoričke smetnje zamijećeni su u slučajevima ozljede bazalnih ganglija i talamusa (Himmelman i sur., 2007.) te kod lokaliziranih periventrikularnih nekrotičkih lezija, popraćenih ventrikulomegalijom, gdje bivaju oštećena motorička vlakna koja prolaze tim regijama. Difuzne promjene s poremećajem mijelinizacije te ozljede sive tvari povezane su s kognitivnim i bihevioralnim poremećajima (Volpe, 2001., Miller i sur., 2005., Gonzalez i Miller, 2006.), a često se počinju očitovati tek u školskoj dobi, posebice ako se radi o umjerenim i blažim ozljedama (Hayes i sur., 2018.). Bihevioralni i emocionalni poremećaji koji su zamijećeni kod takve djece obuhvaćaju anksioznost, depresiju, manjak pozornosti, hiperaktivnost, senzoričke poremećaje i poremećaje iz autističnog spektra (van Handel i sur., 2007., Millar i sur., 2017.). Također, treba uzeti u obzir da čak i suptilne promjene na molekularnoj i epigenetičkoj razini, koje nastanu kao odgovor na hipoksiju, mogu kasnije u životu pridonijeti razvoju neurodegenerativnih bolesti (Nalivaeva i sur., 2018.).

#### **2.2. Animalni modeli hipoksijsko-ishemijske ozljede**

Za bolje razumijevanje procesa nastanka perinatalne hipoksijsko-ishemijske ozljede i njezinih fizioloških, anatomskih i bihevioralnih posljedica, razvijani su različiti animalni modeli koji su uključivali majmune, ovce, svinje, kuniće, zamorce i miševе. Cilj razvoja životinjskih modela je razjasniti mehanizme koji leže u podlozi nastanka i razvoja HI ozljede, te omogućiti prevenciju i pronalazak odgovarajuće terapije u različitim fazama ozljede. Zbog toga je poželjno da model što vjernije imitira etiološku podlogu, histopatološku sliku i funkcionalni ishod (Yager, 2004.). Najčešće korišteni modelni organizam je štakor zbog jednostavnosti uzgoja i rukovanja te mogućnosti provedbe bihevioralnih testiranja. Najpoznatiji dosad razvijeni je Rice-Vannuccijev (RV) model neonatalne HI ozljede koji se zasniva na unilateralnoj ligaciji karotide i izlaganju hipoksiji u hipoksijskoj komori (Rice i sur., 1981.). Ovaj model i njegove varijacije su u velikoj zastupljenosti korišteni u istraživanjima, jer je dugo vladalo mišljenje kako je izazivanje ishemije neophodno kako bi došlo do nastanka ozljede, međutim kasnija su istraživanja pokazala kako i samo izlaganje hipoksiji može uzrokovati blažu do umjerenu ozljedu moždanog tkiva (Zhang i sur., 2013.).

### 2.2.1. Rice-Vannuccijev model i njegove varijacije

U klasičnom RV modelu hipoksija-ishemija se izvodi na štakorima starim 7 dana, čiji je stupanj razvijenosti mozga odgovara terminski zreloom fetusu. Štakori se 7. postnatalnog dana odvajaju od majki te bivaju podvrgnuti operacijskom postupku izazivanja ishemijske putem unilateralne ligacije karotide, nakon čega slijedi izlaganje zraku koji sadrži 8% kisika tijekom 1-3 sata pri 37°C u hipoksijskoj komori (Rice i sur., 1981.).

Ovaj model je pokazao selektivna oštećenja sive tvari putem nekroze neurona u korteksu, hipokampusu, talamusu i bazalnim ganglijima, što dobro oslikava anatomska oštećenja zabilježena u slučajevima srednjih i teških perinatalnih hipoksijsko-ishemijskih ozljeda u čovjeka (Millar i sur., 2017.). Zamijećene fiziološke promjene uključivale su smanjeni srednji sistemski krvni tlak, smanjeni moždani protok krvi, nedostatak unutarstanične glukoze, prateću laktičnu acidozu i gubitak visokoenergetskih fosfata unutar hemisfere ipsilateralno od ligacije karotide (Yager, 2004.). U ovakvim modelima kao kontrola služila je kontralateralna hemisfera mozga, budući da na njoj nisu detektirane anatomske i fiziološke promjene. U nekim istraživanjima dobro su dokumentirane i bihevioralne promjene poput poremećaja u prostornom učenju i pamćenju, motoričkim funkcijama, senzoričkom procesiranju i drugim kognitivnim nedostacima poput hiperaktivnosti i smanjene pozornosti. Iako su određena istraživanja pokazala kontradiktornosti, to može biti rezultat razlike u genetičkoj podlozi soja, težini ozljede i postupcima istraživača (Millar i sur., 2017.). Narednih godina razvijane su različite varijacije RV modela, prilagođavajući način izazivanja ishemijske uvođenjem bilateralne okluzije karotide, mijenjanjem postotka kisika, duljine boravka i temperature u hipoksijskoj komori, te mijenjanjem dobi izlaganja štakora kako bi se bolje imitirala određena stanja poput cerebralne paralize koja obično nastaje u ranijem, prenatalnom razdoblju. Najčešće korišteni sojevi bili su Sprague-Dawley i Wistar štakori. Za procjenu težine i rasprostranjenosti ozljede koristili su se različiti molekularni markeri stupnja maturacije neurona i oligodendrocita, nekroze i apoptoze, te upalni markeri, dok je manji broj istraživača proveo i bihevioralna testiranja usporedno s histološkom analizom (Rumajogee i sur., 2016.). Zbog razlike u postupcima izazivanja HI ozljede i načinima evaluacije, teško je stvoriti univerzalnu sliku HI ozljede, ali zajednička karakteristika svih ovih modela je invazivni postupak izazivanja ishemijske čime nastaje teška do umjerena ozljeda mozga.

### **2.2.2. Neinvazivna hipoksija**

Zadnjih godina u trendu je razvoj neinvazivnog hipoksijskog modela štakora (eng. „*hypoxia-only*“), u kojem se izostavlja invazivno nefiziološko izazivanje ishemije, a životinja se samo izlaže manjku kisika u hipoksijskoj komori. Takvi modeli imaju potencijal za razvoj i opis blažih ozljeda mozga i lakše rasvjetljavanje biokemijske i molekularne podloge djelovanja same hipoksije na moždano tkivo.

Ipak, i u slučaju ovakvih modela ne postoji konsenzus o eksperimentalnom dizajnu počevši od dobi štakora (PND0-PND10) i duljini izlaganja hipoksiji (5 min-3h), do temperature (25-39°C) i sastava zraka u komori (0-10% O<sub>2</sub>). Trenutno ne postoje ni pregledni radovi koji bi saželi sva dosadašnja istraživanja i dali određeni zaključak, osim pregledne tablice u kojoj su Millar i suradnici popisali osnovne podatke o postojećim „*hypoxia-only*“ modelima (Millar i sur., 2017.). Dio istraživača proveo je i bihevioralna testiranja, od kojih neki nisu potvrdili nikakve promjene u ponašanju, dok je dio uočio promjene koje su uključivale hiperaktivnost, povećanu agresiju i povećano ultrazvučno dozivanje. Manji broj istraživača koristio je standardne testove za testiranje prostorne memorije i lokomocije, ali su dobili različite, oprečne rezultate. U većini istraživanja koristili su se posebno modificirani bihevioralni testovi, što otežava njihovu usporedbu s klasičnim modelima. Iz tablice je također vidljivo da su uočene promjene u koncentraciji noradrenalina, dopamina, serotoninina, GABA i glutamata, te promjene u ekspresiji njihovih receptora i prijenosnika u pojedinim regijama mozga, ali je modele teško usporediti zbog različitih ciljeva i uvjeta u provođenju pokusa (Millar i sur., 2017.).

### **2.3. Neurobiološka osnova ponašanja**

Za evaluaciju animalnih modela hipoksije i drugih poremećaja izazvanih genskom ili farmakološkom manipulacijom koriste se bihevioralni testovi kao pokazatelj mogućih poremećaja u ponašanju. Bihevioralnim testovima može se testirati spontano ponašanje, pri čemu je životinja izložena uobičajenoj okolini, te uvjetovano ponašanje životinja. U sklopu testiranja spontanog ponašanja mogu se mjeriti horizontalno i vertikalno kretanje, stupanj anksioznosti, eksploratorno i društveno ponašanje. Testiranje uvjetovanog ponašanja mjeri pojedine vidove učenja i pamćenja kao rezultat habituacije, klasičnog kondicioniranja ili instrumentalnog kondicioniranja pri kojemu se životinju motivira nagradom ili kaznom.

Neurobiološku osnovu ponašanja, koje uključuje percepciju okoline, kognitivne procese i reakciju na podražaje, čine klasični neurotransmitorski sustavi, uz modulaciju neuropeptidnim i nekonvencionalnim neurotransmitorima. Katekolamini su klasični neurotransmitori koji imaju širok utjecaj na ponašanje, posebice dopamin koji sudjeluje u regulaciji motoričkih i limbičkih funkcija, učenju i kogniciji te noradrenalin koji regulira uzbuđenje i pozornost (Nieoullon i Coquerel, 2003.). Neurotransmitori glutamat i GABA prisutni su u cijelom korteksu, gdje stvaraju ekscitacijsko/inhibicijsku ravnotežu i predstavljaju osnovu za senzoričke i kognicijske procese. Oni moduliraju stalnu neuronsku aktivnost (unutarnju aktivnost neurona) i posreduju u živčanim odgovorima izazvanima podražajem (Duncan i sur., 2014.). Brojni neuropeptidi također imaju ulogu u modulaciji različitih oblika ponašanja, uključujući majčinsko i društveno ponašanje te motivaciju i učenje (Borbély i sur., 2013.).

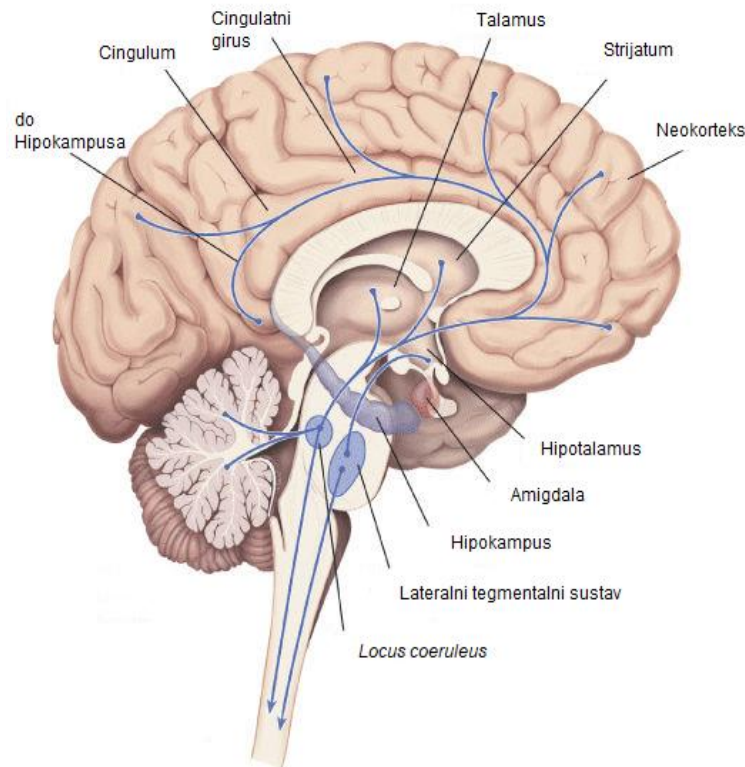
### **2.3.1. Katekolamini**

Dopamin, noradrenalin i adrenalin pripadaju skupini katekolamina, monoamina koje karakterizira katekol, benzenski prsten s dvije hidroksilne skupine (1,2-dihidroksibenzen). Prekursor sinteze katekolamina je aminokiselina L-tirozin, čijom hidroksilacijom putem enzima tirozin hidroksilaze nastaje L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). L-DOPA se potom DOPA dekarboksilazom prevodi u dopamin koji predstavlja završni produkt u dopaminergičkim neuronima, dok se u noradrenergičkim neuronima prevodi u noradrenalin putem enzima  $\beta$ -hidroksilaze. N-metilacijom noradrenalina nastaje adrenalin (Fuller, 1983.). Dopamin i noradrenalin u središnjem živčanom sustavu sisavaca djeluju kao neurotransmitori koji reguliraju različite aspekte ponašanja, dok je uloga adrenalina, osobito zbog njegove vrlo male zastupljenosti u mozgu još uvijek neistražena.

#### **2.3.1.1. Noradrenalin**

Noradrenalin se u mozgu može otpuštati toničnim okidanjem noradrenergičkih neurona kojim utječe na stanje budnosti, pozornost, stres i upalu, ili fazičnim okidanjem kojim povećava neuronsku aktivnost kao odgovor na uzbuđenje, nagradu ili odbojne podražaje. Modulirajući aktivnost u različitim regijama utječe na fokus, pažnju te tako utječe na izvođenje brojnih radnji i zadataka. Noradrenalin također djeluje kao modulator u funkcioniranju radne memorije te u procesima pamćenja koji uključuju konsolidaciju i plastičnost (O'Donnell i sur., 2012.). Tijela noradrenergičkih neurona u mozgu organizirana su u sedam jezgara (A1-A7) koje su smještene u moždanom deblu u kompleksima nazvanim *locus coeruleus* (LC) (A4, A6) i lateralni tegmentalni sustav (LTS) (A1, A2, A3, A5, A7). Neuronima LTS-a pružaju svoje uzlazne

projekcije putem središnjeg tegmentalnog trakta u veliki mozak (posebice u septum i amigdalu), talamus, hipotalamus i moždano deblo, a silazne projekcije putem bulbospinalnog trakta u leđnu moždinu. Neuroni smješteni u LC-u, kao glavni regulatori budnosti, uzbuđenja i formiranja memorije, pružaju svoje projekcije kroz 3 glavna uzlazna puta, od kojih je najvažniji dorzalni snop, u skoro sve regije prednjeg mozga, a također inerviraju i mali mozak, te leđnu moždinu (Slika 3.).



**Slika 3.** Noradrenergičke jezgre i njihove projekcije u mozgu (Wozniak-Kwasniewska, 2013.)

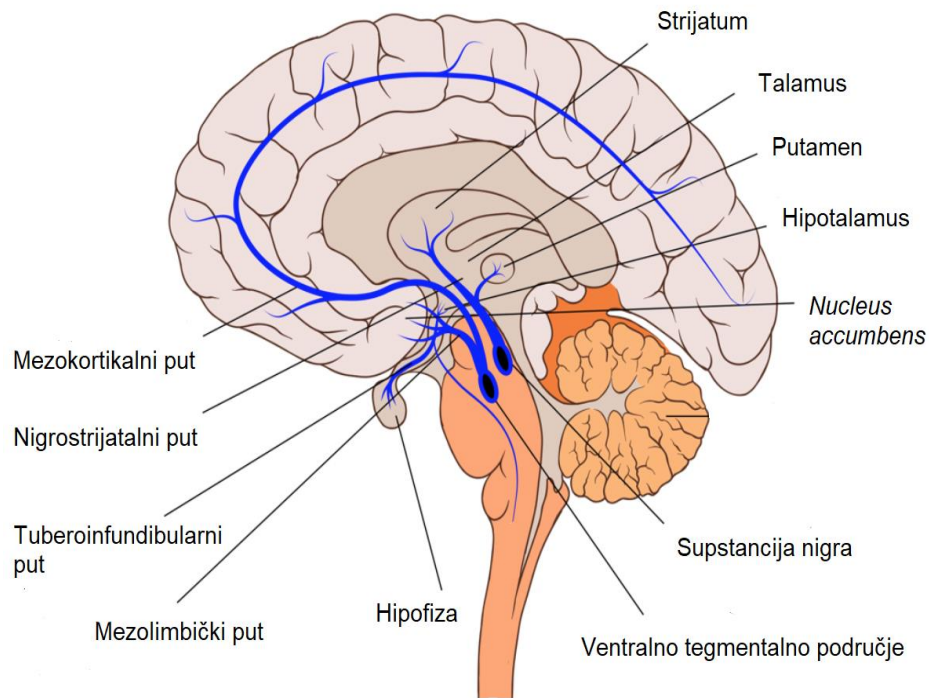
Iako ih je brojčano malo (14 000 – 20 000 stanica u LC-u), noradrenergički neuroni su vrlo razgranati. Smatra se da svaki neuron ima približno 100 000 završetaka, a pojedinačni neuroni obično pružaju projekcije u više različitih regija mozga. Kod mnogih moždanih regija postoji značajno preklapanje u inervaciji neuronima iz LTS-a i LC-a. Ipak, iznimka su frontalni korteks i hipokampus koji su isključivo inervirani neuronima LC-a, te većina subregija hipotalamusa koje su inervirane neuronima LTS-a (osim paraventrikularne i suprahijazmatske jezgre kod kojih postoji preklapanje u inervaciji). Ulazne projekcije u *locus coeruleus* šalju glutamatergički i GABAergički neuroni prefrontalnog korteksa, serotonergički neuroni jezgara rafe, glicinergički neuroni periakveduktalne sive tvari i neuroni lateralnog hipotalamusa koji luče hipokretin (Stanford, 2013.).

### 2.3.1.2. Dopamin

Dopamin je poznat po svojoj važnoj ulozi u kontroli motorike, motivacije i puta nagrade, te endokrinog regulaciji. Također ima ulogu u procesiranju emocionalne percepcije, tj. u prepoznavanju emocionalne značajnosti podražaja, nastanku afektivnog stanja i automatskoj regulaciji emocionalnog odgovora. Dopamin sudjeluje i u procesima učenja i pamćenja putem djelovanja na razvoj sinaptičke plastičnosti. Dopaminska inervacija strijatuma utječe na memorijske procese povezane s ponašanjem usmjerenom k cilju i navikama, dok je inervacija limbičkih regija poput hipokampusa i amigdale uključena u konsolidaciju memorije za motivacijski značajne podražaje (Wise, 2004.).

Moždani dopaminergički sustav sastoji se od skupina neurona koji sintetiziraju dopamin i izlučuju ga na krajevima svojih aksonskih projekcija u različite regije mozga, a dijeli se na četiri glavna puta: nigrostrijatalni, mezolimbički i mezokortikalni, čije su jezgre smještene u srednjem mozgu, te tuberoinfundibularni čije se jezgre nalaze u hipotalamusu. Dopaminergičke jezgre nigrostrijatalnog puta, koji ima ulogu u kontroli motoričkih funkcija i učenju novih motoričkih vještina, nalaze se u *pars compacta* supstancije nigre (SN), a pružaju projekcije vlakana primarno u dorzalni strijatum, sastavljen od od kaudatne jezgre i putamena (Slika 4.). Dopaminergičke jezgre mezolimbičkog i mezokortikalnog puta, koji imaju ulogu u motivacijskim funkcijama, emocijama i sustavu nagrade, nalaze se u ventralnom tegmentalnom području (VTA). Neuronu mezolimbičkog puta pružaju projekcije u nukleus akumbens, olfaktorni tuberkul, septum i amigdalu. Neuronu mezokortikalnog sustava pružaju projekcije u medijalni prefrontalni, cingulatni i peririnalni korteks. Budući da postoji značajno preklapanje između mezokortikalnih i mezolimbičkih dopaminskih neurona, često se govori o mezokortikolimbičkom dopaminskom sustavu (Wise, 2004., Ayano, 2016.). Ventralno tegmentalno područje i supstancija nigra primaju podražaje iz prefrontalnog korteksa, amigdale, subtalamičke jezgre i jezgara u moždanom deblu koje projiciraju kolinergička, serotonergička i noradrenergička vlakna, te strijatuma i paliduma kao dio mreže bazalnih ganglija (Grillner i Mercuri, 2002.). Osim ova četiri opisana dopaminergička puta, dopaminski neuroni iz moždanog debla inerviraju i hipokampus i talamus. Talamus pretežito inerviraju aferentna vlakna iz područja VTA, a u puno manjoj mjeri i iz područja SN. Iako se smatra da je kod štakora dopaminska inervacija prilično slaba, značajno povećanje dopaminergičke inervacije u talamusu primata ukazuje na evolucijsku važnost ovog sustava (Varela, 2014.). Hipokampus je inerviran dopaminergičkim vlaknima iz područja VTA i LC koja imaju ulogu u modulaciji hipokampalne memorije vezane uz novitete (Titulaer i sur., 2021.).





**Slika 4.** Dopaminergičke jezgre i njihove projekcije u mozgu (izvor: Wikipedia)

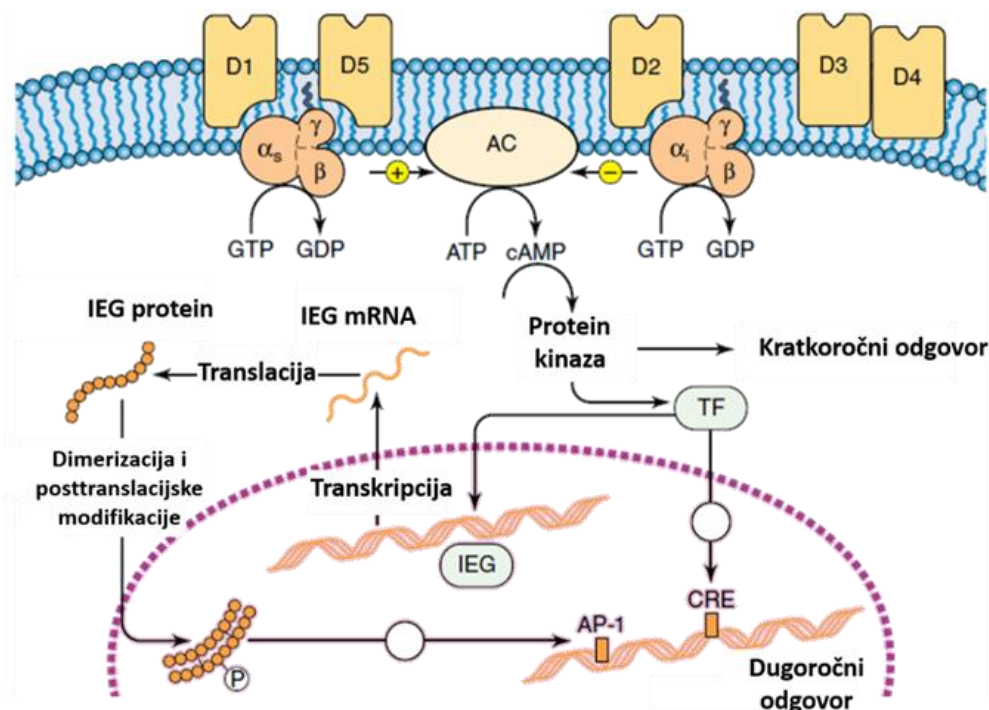
#### 2.3.1.2.1. Dopaminski receptori

Djelovanje dopamina ostvaruje se aktivacijom pet podtipova receptora koji su prema sličnosti građe i signalizacijskog puta podijeljeni u D1 (D1, D5) i D2 (D2, D3, D4) skupinu. Receptori koji pripadaju D1 skupini nalaze se isključivo na postsinaptičkim neuronima gdje aktiviraju  $G\alpha_{s/olf}$  proteine koji aktivacijom adenilat ciklaze stimuliraju produkciju cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i time potiču djelovanje cAMP-ovisne protein kinaze A (PKA). PKA fosforilira dopaminom i cAMP-om regulirani neuronalni fosfoprotein (DARPP-32) na jednom treoninskom ostatku (Thr34) koji u takvom obliku djeluje inhibicijski na protein fosfatazu 1 (PP1) i promiče fosforilaciju proteina (Greengard i sur., 1998., Hu i sur., 2006.). Povećana fosforilacija, koja je rezultat kombinacije aktivacije PKA i inhibicije PP1 regulira aktivnost mnogih receptora, enzima, ionskih kanala i transkripcijskih čimbenika (Neve i sur., 2004.).

Dugoročni učinci D1 signalizacije nastaju fosforilacijom transkripcijskog čimbenika CREB (eng. *cAMP-response element binding protein*) te utjecajem na proteine u MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) signalnom putu koji utječu na ekspresiju mnogih gena (Boyd i Mailman, 2012.) (Slika 5.).

Receptori iz D2 skupine nalaze se na postsinaptičkim i presinaptičkim (dopaminergičkim) neuronima gdje služe kao autoregulatori otpuštanja dopamina. Poseban slučaj predstavljaju D2 receptori koji ovisno o alternativnom prekrajanju mogu postojati u 2 izoforme, D2L (eng. D2 - *Long*) i D2S (eng. D2 - *Short*) s razlikom u 29 aminokiselina. D2L predominira u ekspresiji i nalazi se na postsinaptičkim neuronima, dok D2S ima ulogu presinaptičkog autoreceptora (Usiello i sur., 2000.). D2 skupina receptora aktivira  $G\alpha_{i/o}$  proteine koji inhibiraju adenilat ciklazu, čime sprečavaju stvaranje cAMP-a te tako djeluju suprotno od receptora D1 skupine u regulaciji supstrata nizvodno od cAMP-a, uključujući PKA i DARPP-32. Osim signalizacije putem adenilat ciklaze, D2 receptori putem ostalih podjedinica G proteina djeluju i na druge efektore poput ionskih kanala, fosfolipaza, protein kinaza i receptorskih tirozin-kinaza (Neve i sur., 2004., Boyd i Mailman, 2012.) (Slika 5.).

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da postsinaptički D1 i D2 receptori mogu djelovati sinergijski, unatoč antagonističkom djelovanju preko  $G\alpha$  na signalni put adenilat ciklaze, a pretpostavlja se da se sinergijski učinak odvija preko puteva koji uključuju  $G\beta\gamma$ -ovisnu modulaciju ionskih kanala, inhibiciju  $Na^+/K^+$  ATPaze, i aktivaciju fosfolipaze C (PLC) (Neve, 2010.).



**Slika 5.** Signalni putevi dopaminergičkih receptora (prilagođeno iz Kuhar i sur., 2006.)

U mozgu su najviše eksprimirani D1 receptori, i to vrlo gusto u nigrostrijatalnim, mezokortikalnim i mezolimbičkim područjima kao što su *nucleus accumbens*, strijatum, supstancija nigra, olfaktorni bulbus, amigdala i frontalni korteks, te u nižim razinama u hipokampusu, talamusu, hipotalamusu i malom mozgu. D5 receptori eksprimirani su u niskim razinama u piramidalnim neuronima prefrontalnog korteksa, premotoričkom, cingulatnom i entorinalnom korteksu, supstanciji nigri, hipotalamusu, hipokampusu i dentatnom girusu (Beaulieu i Gainetdinov, 2011.).

Drugi dopaminergički receptori po zastupljenosti u mozgu su D2 receptori s najvećom ekspresijom u strijatumu, *nucleus accumbensu* i olfaktornom tuberkulu, te malo manjom u supstanciji nigri, ventralnom tegmentalnom području, hipotalamusu, korteksu, amigdali i hipokampusu. D3 i D4 receptori imaju ograničeniju rasprostranjenost. Najviše razine ekspresije D3 receptora nađene su u limbičkom području, *nucleus accumbensu* i olfaktornom tuberkulu. Najnižu razinu ekspresije ima D4 receptor, a potvrđena je u frontalnom korteksu, hipokampusu, amigdali, hipotalamusu, globusu palidusu, supstanciji nigri i talamusu. (Ayano, 2016., Beaulieu i Gainetdinov, 2011.)

Aktivacija dopaminskih receptora najviše je proučavana u kontroli motorike, puta nagrade i pamćenja. Lokomotorna aktivnost je primarno kontrolirana D1, D2 i D3 receptorima, gdje aktivacija D1 receptora djeluje umjereno stimulacijski, dok aktivacija D3 receptora djeluje umjereno inhibicijski. Aktivacija D2 autoreceptora smanjuje otpuštanje dopamina pa manja koncentracija dopamina inhibira lokomotornu aktivnost, dok veća koncentracija dopamina, koja je potrebna za aktivaciju postsinaptičkih D2 receptora, stimulira lokomotornu aktivnost. D1 i D2 receptori imaju značajnu ulogu u učenju i pamćenju, posebice u funkcioniranju radne memorije u prefrontalnom korteksu, a uključeni su i u put nagrade i pojačano učenje uslijed izloženosti nagradi (Beaulieu i Gainetdinov, 2011.).

### 2.3.2. Ekscitacijski i inhibicijski neurotransmitori

Ekscitacijski glutamat i inhibicijska gama-aminomaslačna kiselina (GABA) su široko rasprostranjeni i visoko zastupljeni neurotransmitori u mozgu sisavaca. Prekursor sinteze glutamata i GABA-e u neuronima je glutamin. Glutamin se stvara u astrocitima recikliranjem glutamata i GABA-e ili pak nastaje „de novo“, a zatim se prenosi u neurone putem specifičnih prijenosnika te se ondje pretvara u glutamat pomoću glutaminaze aktivirane fosfatom. U GABAergicima dolazi do dekarboksilacije glutamata pomoću enzima glutamat dekarboksilaze (Hampe i sur., 2018.).

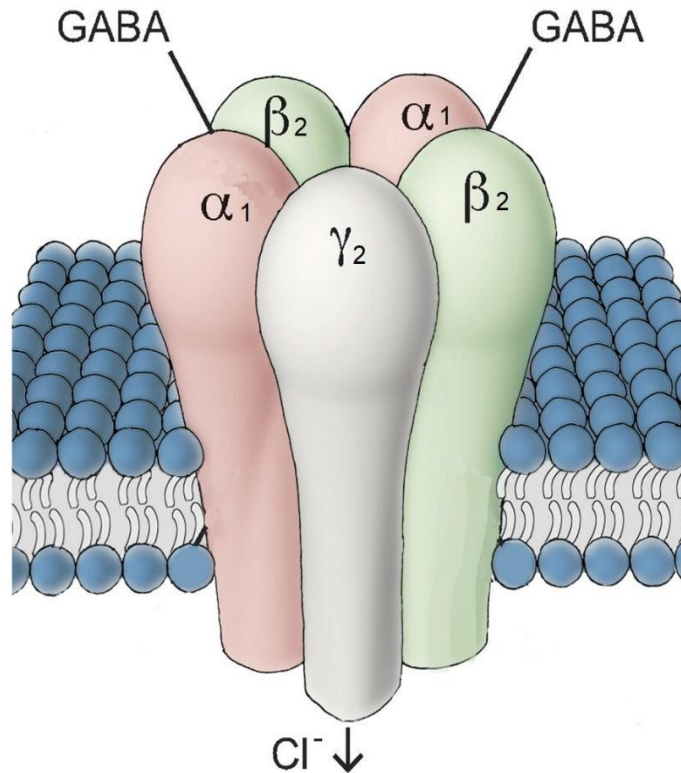
Glutamat i GABA imaju ulogu u svim moždanim funkcijama i kontroliraju ukupnu razinu ekscitacije mozga. Ekscitacijsko/inhibicijska ravnoteža posebno je važna za pravilno procesiranje senzoričkih informacija u somatosenzoričkom korteksu jer je točan trenutak pobude u odnosu na inhibiciju ključan za određivanje smjera selektivnosti neurona. Ravnoteža između povratne ili prethodne inhibicije te ponavljajuće ekscitacije smanjuje slučajnost okidanja i povećava vremensku preciznost somatosenzoričkih neurona (Zhang i Sun, 2011.).

#### 2.3.2.2. GABA receptori

GABA receptori mogu biti ionotropni GABA<sub>A</sub> i metabotropni GABA<sub>B</sub> receptori. GABAergicima signalizacija nije utemeljena samo na pukoj sinaptičkoj inhibiciji, već utječe na uzorke i oscilacije u okidanju neurona koje su vrlo važne za mehanizme ponašanja (Hampe i sur., 2018.). GABA<sub>A</sub> receptori (GABA<sub>A</sub>R) su glavni inhibicijski ionotropni receptori u središnjem živčanom sustavu, građeni u obliku heteropentamera koji omeđuje centralnu poru. Aktiviraju se vezanjem GABA-e čime postaju propusni za ione klorida (Cl<sup>-</sup>), te u manjem dijelu i bikarbonatne ione (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), koji prolaze niz svoj elektrokemijski gradijent djelujući inhibicijski na nastanak akcijskog potencijala u postsinaptičkom neuronu. GABA<sub>A</sub>R može biti građen od šest tipova α podjedinica (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*), tri tipa β podjedinica (*Gabrb1*, *Gabrb2*, *Gabrb3*), tri tipa γ podjedinica (*Gabrg1*, *Gabrg2*, *Gabrg3*), δ (*Gabrd*), ε (*Gabre*), π (*Gabrp*) i θ (*Gabrq*) podjedinice (McKernan i Whiting, 1996.). Najzastupljeniji oblik GABA<sub>A</sub>R sastoji se od α1, β2 i γ2 podjedinice u omjeru 2:2:1 i čini 43% svih GABA<sub>A</sub> receptora u mozgu (Baumann i sur., 2002.) (Slika 6.)

GABA<sub>B</sub> receptori su heterodimeri sastavljeni od GABA<sub>B1</sub> i GABA<sub>B2</sub> podjedinice. GABA<sub>B1</sub> podjedinicu nalazimo u dvije glavne izoforme, 1a i 1b, koje nastaju alternativnim prekrcanjem. GABA<sub>B</sub> receptori povezani su s G<sub>i/o</sub> proteinima čijom aktivacijom inhibiraju adenilat ciklazu i

Ca<sup>2+</sup> kanale ovisne o naponu i potiču aktivaciju K<sup>+</sup> kanala što uzrokuje produljeno smanjenje podražljivosti neurona (Papasergi-Scott i sur., 2020.).



**Slika 6.** Prikaz građe najviše zastupljenog oblika GABA<sub>A</sub> receptora (prilagođeno iz izvora: <https://flipper.diff.org>)

### 2.3.2.3. *Glutamatni receptori*

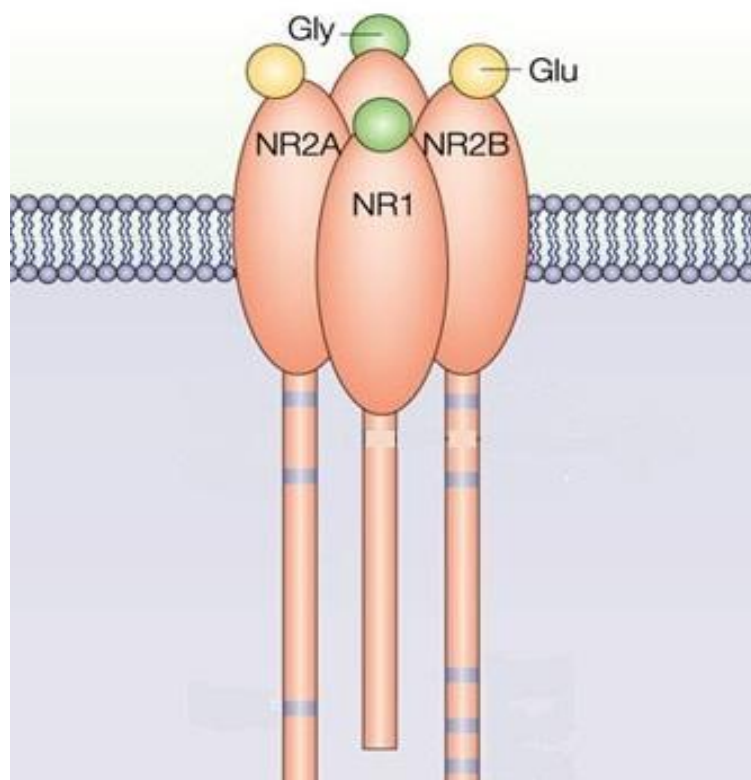
Glutamatni receptori mogu biti ionotropni kationski kanali koji se otvaraju vezanjem glutamata i omogućuju ulazak natrija i drugih kationa te metabotropni receptori povezani s G proteinima. Poznata su tri tipa ionotropnih glutamatnih receptora: AMPA receptori (AMPA, receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline), NMDA receptori (NMDAR, N-metil-D-aspartatni receptor) i kainatni receptori. Također postoje tri skupine metabotropnih glutamatnih receptora (mGluR) koji se razlikuju u alfa podjedinicama G proteina. Skupina I (mGluR1, mGluR5) smještena je postsinaptički i vezana je s G<sub>s</sub> ili G<sub>11</sub> podjedinicama, a aktivacijom potiče ekscitaciju neurona. Skupine II (mGluR2, mGluR3) i III (mGluR4-8) smještene su presinaptički i vezane su s inhibicijskim G<sub>i</sub> ili G<sub>o</sub> podjedinicama koje inhibiraju otpuštanje neurotransmitora.

AMPA pripada ionotropnim glutamatnim transmembranskim receptorima i široko je rasprostranjen u svim regijama mozga. Receptor je tetramernog oblika, a može biti sastavljen od 4 podjedinice kodirane različitim genima. Najčešće je simetričnog oblika i sastoji se od dvije GluR2 (*Gria2*) podjedinice i druge dvije podjedinice koje mogu činiti GluR1 (*Gria1*), GluR3 (*Gria3*) ili GluR4 (*Gria4*) (Mayer, 2005.). Prisutnost post-transkripcijski modificirane GluR2 podjedinice čini ovaj receptor nepropusnim za kalcij, što ga razlikuje od NMDA receptora i potencijalno štiti stanicu od ekscitotoksičnosti (Fernandez-Montoya i sur., 2018., Kim i sur., 2001.). Vezanjem glutamata za AMPAR dolazi do propusnosti kanala za natrij i kalij, a zbog brzog otvaranja i zatvaranja ovaj receptor se smatra glavnim odgovornim za brzi sinaptički prijenos u središnjem živčanom sustavu.

NMDAR je heterotetramerni ionotropni glutamatni receptor. Postoje tri podjedinice koje mogu sačinjavati ovaj receptor: GluN1 (*Grin1*), GluN2 koju kodiraju četiri različita gena *GluN2A* (*Grin2a*), *GluN2B* (*Grin2b*), *GluN2C* (*Grin2c*), *GluN2D* (*Grin2d*) te GluN3 koju kodiraju 2 gena *GluN3A* (*Grin3a*) i *GluN3B* (*Grin3b*). NMDAR najčešće sadrži dvije GluN1 i dvije GluN2 podjedinice (Salussolia i sur., 2011.) (Slika 7.). Prilikom strukturnih istraživanja NMDAR zamijećena je razvojna promjena u kompoziciji GluN2 podjedinica. U prenatalnom periodu primarno je eksprimirana GluN2B podjedinica, dok već tijekom ranog postnatalnog razdoblja njezina ekspresija pada, a raste ekspresija GluN2A podjedinice u mnogim regijama mozga, uključujući talamičke i kortikalne neurone. Zbog tih promjena dolazi do prevladavanja GluN1/GluN2A oblika NMDAR koji stvara brže sinaptičke struje, te brže postiže deaktivaciju i desenzitizaciju (Myers i sur., 2019.). Ipak, sveukupno gledajući, NMDAR se zatvaraju sporije nego ostali glutamatni receptori i zato imaju glavnu ulogu u određivanju duljine trajanja sinaptičke struje. NMDAR se aktivira vezanjem glutamata, no za slobodan protok iona kroz receptorski kanal potrebna je i prethodna depolarizacija neurona kako bi se uklonili ioni magnezija koji se u stanju mirovanja vežu za specifična mjesta na receptoru i onemogućuju prolazak iona. Kada se ostvare oba uvjeta ioni natrija, kalija i kalcija prolaze kroz NMDAR, od njih je najznačajniji kalcij koji utječe na brojne stanične procese i aktivira signalne kaskade koje potiču sinaptičku plastičnost (Furukawa i sur., 2005.).

Metabotropni glutamatni receptor 5 (Grm5, mGluR5) jedan je od osam poznatih glutamatnih metabotropnih receptora. Visoko je eksprimiran u korteksu, amigdali, bazalnim ganglijima, olfaktornoj regiji i hipokampusu (Terbeck, 2015.). Grm5, zajedno uz Grm1, pripada Grupi I metabotropnih glutamatnih receptora koji su vezani uz  $G_{\alpha q}$  proteine i u sinapsi su najčešće izraženi na post- i peri-sinaptičkoj membrani gdje okružuju i reguliraju jezgru brzo-signalizirajućih NMDA receptora, za razliku od Grupe II i III koji su smješteni presinaptički i

imaju glavnu ulogu u kontroli otpuštanja glutamata (Lujan i sur., 1996., Nicoletti i sur., 2011.). Vežanjem glutamata za Grm5 aktivira se signalni put preko G proteina i fosfolipaze C (PLC) potičući unutarstanično oslobađanje kalcija i aktivaciju protein kinaze C (PKC) koja pokreće BDNF-, CREB- i mTOR-signalne puteve. Čimbenici koji utječu na to koji će se signalni put aktivirati još uvijek nisu poznati, ali se pretpostavlja da smjer aktivacije ovisi o tipu stanice i koncentraciji unutarstaničnog kalcija (Matosin i sur., 2015.). Postsinaptički Grm5 su fizički povezani s NMDAR različitim proteinima te biokemijski preko PKC, preko kojih pridonose njihovom djelovanju što daje značaj ulogi Grm5 u neuralnoj plastičnosti, kao i procesima učenja i pamćenja (Cleva i Olive, 2011.). Ipak, 50-90% Grm5 receptora je lokalizirano unutarstanično na vanjskoj i unutarnjoj membrani jezgre te na membranama endoplazmatskog retikuluma. Aktivacija unutarstaničnih Grm5 receptora ima ulogu u regulaciji nuklearnog kalcija, aktivaciji transkripcije i ekspresiji gena uključenih u sinaptičku plastičnost (Jong i sur., 2009.). Osim moduliranja ekscitacijske aktivnosti, postoje dokazi da aktivacija Grm5 utječe i na inhibicijske signalne puteve tako što modulira funkciju GABA<sub>A</sub> receptora povećavajući postsinaptičke GABA struje preko unutarstaničnog kalcija i PKC (Hoffpauir i Gleason, 2002.).



**Slika 7.** Prikaz građe jedne varijante NMDA receptora (prilagođeno iz izvora: <https://jonlieffmd.com>)

### 2.3.3. Neuropeptidi

Neuropeptidi su mali lanci aminokiselina koji se sintetiziraju u neuronima, a svojom signalizacijom pridonose različitim funkcijama i procesima poput rasta, razvoja, metabolizma, reprodukcije i homeostaze (Nässel i Winther, 2010.). Široko su rasprostranjeni i u regijama mozga odgovornima za učenje i pamćenje gdje imaju ulogu u neuromodulaciji procesiranja informacija. Neuropeptidi djeluju preko svojih receptora uzrokujući dugoročne učinke putem aktivacije G proteina i sekundarnih glasnika, a zajedno formiraju kompleksne interakcije s acetilkolinским, glutamatnim, dopaminskim i GABA putevima. Najčešće proučavani neuropeptidi vezani uz memorijske procese su vazoaktivni intestinalni peptid, somatostatin, neuropeptid Y, tahikinini i galanin (Borbély i sur., 2013.).

#### 2.3.3.2. VIP

Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) je peptidna molekula građena od 28 aminokiselina, a ime mu potječe od njegove vazodilatacijske uloge u probavnom sustavu, odakle je i primarno izoliran. U središnjem živčanom sustavu ima ulogu neurotransmitora, neuromodulatora i neurotrofičnog faktora (Borbély i sur., 2013.). VIP svoje učinke ostvaruje preko VPAC1, VPAC2 i PAC1 receptora putem aktivacije Gas i stimulacijom cAMP/PKA signalizacijskog puta (Slika 8.). Neuroprotektivni učinci VIP-a mogu biti izravni, putem stvaranja cAMP-a aktivacijom adenilat ciklaze, i neizravni, putem stimulacije sinteze neurotrofičnih čimbenika i inhibicije stvaranja proinflamatornih medijatora u glija stanicama (Deng i Jin, 2017.).

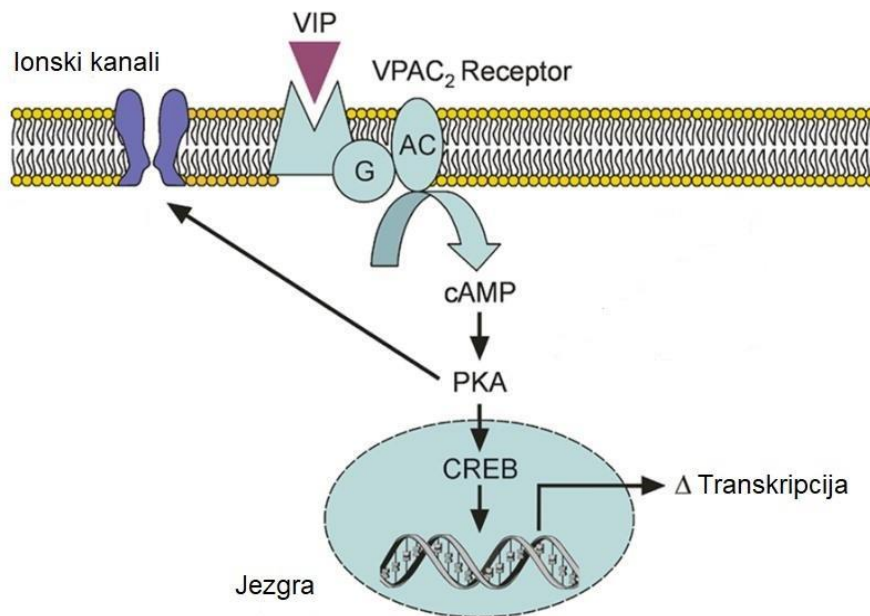
VIP i njegovi receptori najviše su eksprimirani u hipokampusu, korteksu, talamusu i suprahijazmatskoj jezgri hipotalamusa što ukazuje na njegovu ulogu u kognitivnim funkcijama, učenju i cirkadijanom ritmu (Borbély i sur., 2013.).

U hipokampusu je VIP eksprimiran u GABAergičkim interneuronima putem kojih djeluje na druge interneurone preko VPAC1 receptora u kojima povećava GABA struje, te na piramidalne neurone u kojima preko VPAC2 receptora povećava NMDA struje i podražljivost, neovisno o GABA transmisiji (Cunha-Reis i sur., 2004., Yang i sur., 2009.).

Dokazano je kako disinhibicija hipokampalnih piramidalnih neurona igra ključnu ulogu u regulaciji sinaptičke plastičnosti hipokampusa, što leži u podlozi djelovanja VIP-a na prostorno učenje usmjereno ka cilju i motivirano ponašanje u učenju (eng. *goal-directed spatial learning, motivated learning behavior*) (Turi i sur., 2019.). VIP je stoga prepoznat kao važan čimbenik u memorijskim procesima i učenju, koji svoju ulogu ostvaruje modulacijom sinaptičke transmisije i plastičnosti (Cunha-Reis i Caulino-Rocha, 2020.).



Poremećaji ekspresije VIP-a imaju ulogu u poremećajima povezanim s kognitivnom disfunkcijom, poput depresije, epilepsije, autizma, Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti (Borbély i sur., 2013.).



**Slika 8.** Signalni put VIP – VPAC2 receptor (prilagođeno iz Vosko i sur. 2007). Aktivacijom VPAC2 receptora stimulira se AC/PKA signalni put koji u konačnici djeluje na ionske kanale i transkripciju putem CREB-a.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijal**

##### **3.1.1. Životinje**

U istraživanju su se koristili štakori soja Wistar Han (RccHan:WIST), uzgojeni u nastambi Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (Vivarij HIIM-a, HR POK 006), gdje je provedeno izlaganje hipoksiji pod vodstvom prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević. Štakori stari 30 dana starosti štakori su dopremljeni na Zavod za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Štakori su odvojeni po spolu i tretmanu te su po 3-4 životinje smještene u plastične kaveze sa slobodnim pristupom hrani (Standard Diet 4RF 21 GLP certificate, Mucedola, Italija) i vodi. Kavezi su se nalazili u prostoriji smještenoj uz laboratorij za pokuse pri temperaturi ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) i dvanaestosatnom režimu svjetla i tame. Životinje su tijekom boravka u nastambi redovito vagane te im je zabilježena tjelesna masa.

U testovima ponašanja korišteno je ukupno 95 štakora, iz 3 vremenski razmaknuta okota, podijeljenih po spolu i tretmanu. Hipoksična skupina sastojala se od 48 štakora (24 mužjaka, 24 ženke), a kontrolna od 47 štakora (25 ženki, 22 mužjaka). Svi štakori su u adolescentnoj dobi (PND 33-45) podvrgnuti bateriji testova ponašanja. Posljednji okot - 16 hipoksičnih (8 mužjaka, 8 ženki) i 15 kontrolnih (7 mužjaka i 8 ženki) životinja - je nakon testova ponašanja žrtvovan (PND 50) te je njihovo moždano tkivo iskorišteno za biokemijska i molekularno-genetička istraživanja.

Studiju je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu (URBROJ: 251-58-10617-20-161), a provedeno je u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/2017) te Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13).

### 3.1.2. Uređaji i pribor

#### *Testovi ponašanja:*

Otvoreno polje (eng. *Open field*)

Ploča s rupama (eng. *Hole board*)

T-labirint (eng. *T-maze*)

Aparat za test društvenog odabira (eng. *Social choice test*)

Digitalna vaga Kern KB 2000-2N, d = 0,01 g : 2000 g (Kern, Njemačka)

Kamera RYK – 2B93L2/1P (YOKO Technology Corp., Tajvan)

Program EthoVisionXT13 (Noldus Information Technology Inc., Nizozemska)

#### *Molekularna istraživanja:*

Analitička vaga ABS 220-4, d = 0,01 g : 220 g (Kern, Njemačka)

Centrifuga 5415 C (Eppendorf, Austrija)

Centrifuga 5424 R (Eppendorf, Austrija)

Čitač mikroploča Bio-Rad Model 550 (Bio-Rad, SAD)

Digitalna vaga, EG 220-3NM, d = 0,001 g : 220 g (Kern, Njemačka)

Kivete UVette Starter Set (Eppendorrf, Austrija)

Mješalica IKA®KS 130 basic (IKA, Njemačka)

Mikrocentrifuga Quickspin (Clever Scientific, Velika Britanija)

PCR uređaj GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD)

qPCR uređaj AB 7300 (Applied Biosystems, SAD)

qPCR uređaj qTower3 (Analytik Jena, Njemačka)

qPCR program za analizu 7300 System SDS v1.4. software (Applied Biosystems, SAD)

qPCR program za analizu qPCRsoft 4.0 (Analytik Jena, Njemačka)

Ultrazvučni homogenizator, Bandelin electronic UW 2070 s uređajem Bandelin Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Njemačka)

UV-VIS spektrofotometar Libra S22 (Biochrom, Velika Britanija)

Uređaj za elektroforezu Power pac 300, Bio-Rad s kadicom Sub-Cell® GT Basic (Bio-Rad, SAD)

Vortex genius 3 (IKA, Njemačka)

### 3.1.3. Otopine, kemikalije i kompleti

#### *Kemikalije:*

Agaroz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)  
AmpliTaQ DNA polimeraza (250 U, 5 U/ $\mu$ L) (Applied Biosystems, SAD)  
BlueJuice™ pufer za nanošenje na gel (10x) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)  
dNTP Mix (10 mM) (Applied Biosystems, SAD)  
H<sub>2</sub>O bez nukleaza (bez DEPC) (Ambion, SAD)  
Izofluran (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>ClF<sub>5</sub>O; Mr = 184,49 g/mol) (Baxter, SAD)  
MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Applied Biosystems, SAD)  
MuLV reverzna transkriptaza (5000 U, 50 U/ $\mu$ L) (Applied Biosystems, SAD)  
Oligo d(T) 16 početnice (50  $\mu$ M) (Applied Biosystems, SAD)  
qPCR početnice i sonde - Taqman assay (Applied Biosystems, SAD)  
RNazni inhibitor (2000 U, 20 U/ $\mu$ L) (Applied Biosystems, SAD)  
SYBR™ Safe boja za gel (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)  
TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems, SAD)  
TE pufer pH 8.0 (Ambion, SAD)  
10x PCR pufer II (Applied Biosystems, SAD)

#### *Kompleti:*

RNAqueous-4PCR (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)  
3-CAT Research ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka)

#### *Otopine:*

##### Deproteinizacijska otopina:

0,01 N Klorovodična kiselina (HCl), 37 %, p.a. (Gram-Mol, Hrvatska)  
1 mM EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub> X 2H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)  
4 mM Natrijev metabisulfit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)  
dH<sub>2</sub>O

##### 0,5X TBE pufer:

45 mM TRIS baza (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), Mr = 121,14 (Applichem GmbH, Njemačka)  
45 mM Borna kiselina (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), Mr = 61,83 (Gram-Mol, Hrvatska)  
1 mM EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub> X 2H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)  
dH<sub>2</sub>O

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izlaganje neonatalnih štakora uvjetima akutne normobarične hipoksije

Tretman hipoksije izvršen je prema modifikaciji protokola iz rada Zhang i sur. (2013.) na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Prvog postnatalnog dana (PND1) štakori su odvojeni od majke i razvrstani po spolu i tretmanu. Eksperimentalni štakori smješteni su na 2h u grijanu ( $\approx 27^{\circ}\text{C}$ ), normobaričnu hipoksijsku komoru (8%  $\text{O}_2$  u 92%  $\text{N}_2$ ) sa senzorom za kisik, termometrom, higrometrom i apsorbensom za ugljikov dioksid. Kontrolni štakori su istovremeno smješteni u zasebni kavez pri normoksičnim uvjetima (21%  $\text{O}_2$ , 78%  $\text{N}_2$ ), također opremljen termometrom i higrometrom (Slika 9.). Nakon tretmana, eksperimentalni štakori su trajno označeni zarezivanjem distalne falange desnog kažiprsta, a kontrolni lijevog, te su vraćeni u kavez s majkama.



**Slika 9.** Izlaganje štakora hipoksičnim (lijevo) i normoksičnim (desno) uvjetima

### 3.2.2. Testovi ponašanja

Nakon što su dopremljeni na Prirodoslovno-matematički fakultet, štakori su prošli 3 dana prilagodbe na novu nastambu i eksperimentatora, tijekom koje su i označeni povlačenjem crta na repu flomasterom (oznake 1-5 unutar svakog kaveza). Baterija testova ponašanja, koja se sastojala od testova u otvorenom polju, ploči s rupama, T-labirintu i aparatu za društveni odabir, provedena je u adolescentnoj (PND33-PND45) dobi, svakodnevno u razdoblju od 13h do 17h. Nakon testiranja svake životinje, aparatura je očišćena antiseptikom (0,5%-tna otopina neoform® MED F). Test ponašanja u otvorenom polju i test društvenog odabira snimani su kamerom i naknadno analizirani programom EthoVisionXT13.

#### 3.2.2.1. Test u otvorenom polju

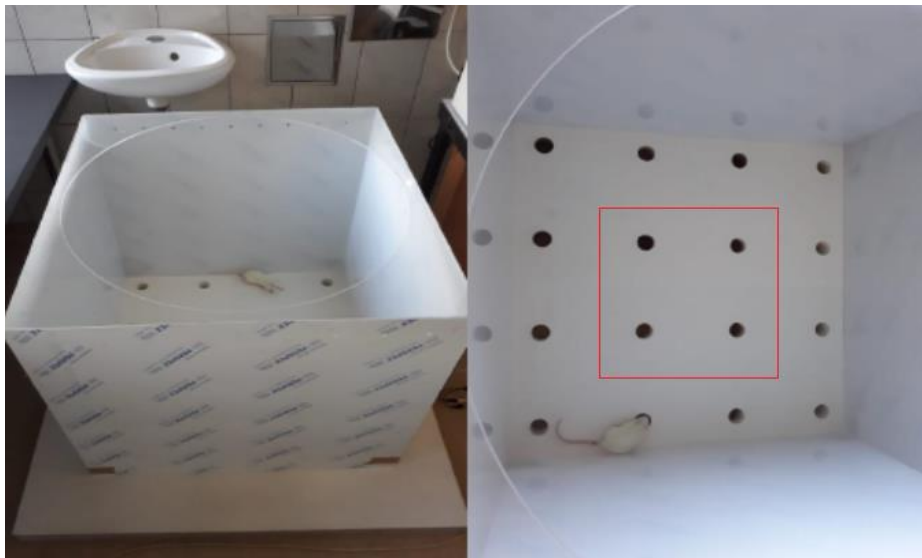
Otvoreno polje čini četvrtasta kutija od neprozirnog pleksiglasa dimenzija 80 cm x 80 cm x 70 cm. Na početku testiranja, svaki štakor je postavljen u središte polja te mu je dopušteno da slobodno istražuje prostor tijekom 5 minuta (Slika 10.). Mjereni parametri bili su: duljina prijeđenog puta (cm) i vrijeme provedeno u kretanju (s) kao pokazatelji lokomocije te broj propinjanja (uspravno tijelo uz odignute prednje šape), kao pokazatelj eksploratornog ponašanja (Hall i Ballachey, 1932.).



**Slika 10.** Test u otvorenom polju

### 3.2.2.2. *Test na ploči s rupama*

Ploča s rupama je četvrtasta kutija od neprozirnog pleksiglasa, dimenzija 80 cm x 80 cm x 70 cm, na čijem se dnu nalazi drvena ploča sa 16 ravnomjerno postavljenih rupa (4 x 4), promjera 4 cm (File i Wardill, 1975.), fiktivno podijeljenih na 4 središnje i 12 rubnih (Slika 11.). Na početku testiranja svaki je štakor postavljen na sredinu ploče nakon čega se tijekom 5 minuta registrirao broj posjećenih rupa. Rupe se smatraju „posjećenima“ ako štakor u njih uroni glavu do iznad razine očiju. Ukupan broj posjećenih rupa smatra se mjerom eksploratornog ponašanja, a postotak posjećenosti središnjih rupa mjerom anksioznog ponašanja.



**Slika 11.** Test na ploči s rupama. Crveni kvadrat označava središnje rupe.

### 3.2.2.3. *Test u T-labirintu*

T-labirint je izrađen od crnog pleksiglasa, središnjeg kraka dimenzija 70 cm x 35 cm x 10 cm i postraničnih krakova dimenzija 55 cm x 35 cm x 10 cm, a koristi se za mjerenje prostornog pamćenja (Olton, 1979.; Slika 12.). Testiranje je započelo nultim danom u kojem su se štakori jednom propustili kroz labirint kako bi se odredio njihov prirodni odabir kraka, nakon čega im se nagrada (hrana) tijekom cijelog testiranja stavljala na suprotni krak labirinta. Tijekom pet konsektivnih dana testiranja svaki je štakor imao 10 pokušaja u nizu, u trajanju od 1 minute, da pronade hranu te se bilježio broj uspješnih pokušaja. Radi veće motivacije, štakorima je 24h prije početka testiranja uklonjena hrana iz kaveza, te su tijekom čitavog testiranja imali pristup hrani samo jedan sat dnevno, nakon odrađenog testa.



**Slika 12.** T-labirint

#### **3.2.2.4. Test društvenog odabira**

Test društvenog odabira korišten je za mjerenje društvenog ponašanja (Crawley, 2004.), a aparatura se sastojala od neprozirnog pleksiglasa dimenzija 90 cm x 90 cm x 50 cm s tri jednaka odjeljka koja su spojena vratima (Slika 13.). U jedan rubni odjeljak postavljen je predmet, a u drugi rubni odjeljak mali kavez s nepoznatim štakorom istog spola i soja. Test je započeo postavljanjem testnog štakora u središnji odjeljak sa zatvorenim vratima, kako bi se prilagodio na novu okolinu tijekom početnih 5 minuta. Nakon toga su otvorena vrata prema rubnim odjeljcima i štakorima je dopušteno da slobodno istražuju predmet i/ili drugog štakora. Vrijeme boravka izvan središnjeg odjeljka ( $s$ ) predstavljalo je mjeru razine anksioznosti, vrijeme u aktivnom istraživanju ( $s$ ) objekta ili štakora predstavljalo je mjeru eksploratornog ponašanja, a postotak vremena provedenog u aktivnom istraživanju jedinke u odnosu na predmet mjeru socijalnosti.





**Slika 13.** Test društvenog odabira

### **3.2.3. Prikupljanje i homogenizacija uzoraka moždanog tkiva**

Skupina adolescentnih štakora žrtvovana je dekapitacijom 50. postnatalnog dana. Životinja je neposredno prije žrtvovanja donesena iz nastambe u laboratorij (preko puta), izvagana i smještena u komoru s inhalacijskim anestetikom izofluranom do pojave jasnih znakova anestezije. Nakon brze dekapitacije, štakoru je uklonjen gornji dio lubanje te je spatulom pažljivo izvađen mozak na komadić aluminijske folije, izvagan i postavljen na zaleđeni blok. Pomoću skalpela i žileta, iz obje hemisfere izdvojeni su somatosenzorički korteks, hipokampus, talamus i moždano deblo, položeni u prethodno izvagane mikroepruvete, brzo izvagani na digitalnoj vagi i pohranjeni u tekući dušik (korteks, hipokampus i talamus) ili u suhi led (moždano deblo).

Mikroepruvete su, jedna po jedna, pincetom izvađene iz posude s tekućim dušikom, u njih je pipetom dodano 12 volumena otopine za lizu te je uslijedila homogenizacija ultrazvučnim homogenizatorom 15-20 sekundi. Nakon svakog uzorka, sonda je očišćena etanolom. Uzorci su pohranjeni pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , do izolacije RNA.

Uzorci moždanog debbla homogenizirani su u 5 volumena deproteinizacijske otopine ultrazvučnim homogenizatorom 10 sekundi te su zamrznuti pri  $-20^{\circ}\text{C}$  do mjerenja koncentracije katekolamina.

### 3.2.4. Mjerenje koncentracije katekolamina

Koncentracije katekolamina u uzorcima moždanog debla određene su enzimskim imunotestom na čvrstoj fazi (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) pomoću komercijalno dostupnog kompleta 3CAT ELISA. Iako ovaj komplet ima mogućnost mjerenja razine 3 katekolamina (adrenalina, noradrenalina i dopamina), zbog vrlo niske koncentracije adrenalina u moždanom deblu te njegove upitne uloge u moždanim funkcijama sisavaca, odlučili smo mjeriti samo razinu dopamina i noradrenalina. Ovaj test zasniva se na kompetitivnoj enzimskoj metodi u kojoj se antigen iz uzorka natječe s referentnim antigenom, pričvršćenim u jažicama mikrotitarske pločice, za vezanje na određenu količinu označenog protutijela. Što je veća koncentracija antigena u uzorku, to će se manje protutijela vezati za referentni antigen u jažicama, te će se proizvesti slabiji signal.

Ekstrakcija katekolamina provedena je u ekstrakcijskoj pločici iz kompleta u koju su dodani standardi, kontrole i uzorci zajedno s 25  $\mu\text{L}$  TE pufera. Pločica je pokrivena adhezivnom folijom i stavljena 60 minuta na miješalicu (600 o/min) pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, jažice su ispražnjene i dva puta isprane s 1 mL pufera za ispiranje, nakon čega je u njih dodano 150  $\mu\text{L}$  acilacijskog pufera i 25  $\mu\text{L}$  acilacijskog reagensa. Pločica je pokrivena adhezivnom folijom i stavljena 20 minuta na miješalicu (600 o/min) pri sobnoj temperaturi. Po završetku miješanja, pločica je dvaput isprana te je u svaku jažicu dodano 200  $\mu\text{L}$  HCl. Pločica je stavljena na miješalicu (600 o/min) 10 minuta, nakon čega je 190  $\mu\text{L}$  standarada, kontrola i uzoraka pipetirano u mikrotitarsku pločicu. U svaku jažicu dodano je po 50  $\mu\text{L}$  enzimske otopine, pločica je stavljena na miješalicu (600 o/min) jednu minutu, te potom u inkubator 2 sata pri 37°C. Nakon inkubacije, standardi, kontrole i uzorci pipetirani su u noradrenalinsku i dopaminsku mikrotitarsku pločicu te je u svaku dodano 50  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg antiseruma. Pločice su miješane 1 minutu i ostavljene 17 h na inkubaciji u hladnjaku pri 4°C. Nakon inkubacije jažice su ispražnjene i četiri puta isprane s 300  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje, nakon čega je u njih dodano 100  $\mu\text{L}$  enzimskog konjugata. Pločica je pokrivena adhezivnom folijom i stavljena na inkubaciju 30 min pri sobnoj temperaturi, uz miješanje na miješalici (600 o/min). Po završetku inkubacije, jažice su ispražnjene i četiri puta isprane s 300  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje, nakon čega je u njih dodano 100  $\mu\text{L}$  supstrata. Pločica je pokrivena adhezivnom folijom te potom omotana aluminijskom folijom kako bi se spriječila izloženost sunčevom svjetlu. Uslijedila je inkubacija od 25 min pri sobnoj temperaturi, uz miješanje na miješalici (600 o/min), nakon koje je dodana otopina za zaustavljanje reakcije. Apsorbancija je izmjerena unutar 10 minuta na čitaču mikroploča (eng. *microplate reader*) pri valnoj duljini 450 nm. Iz

baždarnih pravaca ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracije standarada, određena je koncentracija katekolamina u uzorcima koristeći 4-parametarsku krivulju s nelinearnom regresijom (4PAR) u programu GraphPad Prism 7. Dobivene koncentracije katekolamina (KAT) preračunate su s obzirom na korekcijski faktor (KF), volumen homogenata (H) i masu moždanog debla (MD) te su izražene kao pg katekolamina / mg tkiva.

$$KF = \frac{30 \mu\text{L (volumen dodanih standarada)}}{2 \mu\text{L (volumen dodanog uzorka)}}$$

$$\text{pg KAT} / \text{mg tkiva} = \frac{KF \times KAT \left(\frac{\text{pg}}{\text{mL}}\right) \times H \text{ (mL)}}{MD \text{ (mg)}}$$

### 3.2.5. Izolacija RNA

Homogenizirani uzorci hipokampusa, somatosenzoričkog korteksa i talamusa koristili su se za izolaciju ukupne RNA koja je provedena pomoću komercijalno dostupnog kompleta. Prema uputama iz kompleta, u svaki uzorak dodan je volumen 64% etanola jednak volumenu homogenata. Otopina lizat/etanol je lagano promiješana okretanjem mikroeprevete nakon čega je filtrirana kroz kolonu uz centrifugiranje 1 minutu pri 10 000 x g. Filtrat je potom odbačen, a kolona je isprana jednom sa 700 μL otopine za ispiranje 1, te dva puta s 500 μL otopine za ispiranje 2. Nakon svakog ispiranja slijedilo je centrifugiranje (1 min, 10 000 x g) te odlijevanje filtrata. Isprana kolona je premještena u čistu mikroeprevetu te je na sredinu filtera dodano 50-65 μL zagrijane elucijske otopine (75°C).

Nakon centrifugiranja (1 min, 10 000 x g) kolona je bačena, a eluat je podvrgnut tretmanu DNazom kako bi se uklonila genomska DNA. U svaki eluat dodan je 0,1 volumen 10x DNaznog pufera i 1 μL DNaze I (2 U/μL) nakon čega su eluati inkubirani u termobloku 20 minuta pri 37°C. Nakon inkubacije uslijedila je inaktivacija enzima dodavanjem 0,1 volumena DNaza inaktivacijskog reagensa uz centrifugiranje (1 min, 7 000 x g) kako bi se istaložile njegove čestice. Supernatant je odvojen i prebačen u nove mikroeprevete.

Alikvot otopine RNA (2 μL RNA + 98 μL TE pufera) korišten je za određivanje koncentracije i čistoće uzoraka mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom pri valnoj duljini 260 i 280 nm. Omjer A260/A280 u vrijednostima 1,8 – 2,1 ukazivao je na čistoću izolirane RNA.

Drugi alikvot otopine (2  $\mu$ L) korišten je za provjeru cjelovitosti RNA elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Za pripremu gela korišteno je 60 mL 0,5x TBE pufera, 0,6 g agaroze i 6 uL boje SYBR Safe. Prilikom nanošenja uzoraka na gel, 2  $\mu$ L RNA pomiješano je s 2  $\mu$ L formaldehidne boje za nanošenje koja se nalazila u sklopu kompleta. Elektroforeza se odvijala 30 minuta pri 60V, a gel je vizualiziran i slikan pod UV svjetlom. Dobro vidljive pruge veličine 4,7 i 1,9 kb, u približnom omjeru 2:1, ukazivale su na cjelovitost RNA.

### 3.2.6. Sekvenciranje RNA

Za svaku od izdvojenih moždanih regija, odabrana su po 4 uzorka RNA visoke koncentracije i kvalitete iz hipoksične i kontrolne skupine životinja te su poslana u Novogene (UK) Co., Ltd na sekvenciranje (RNA-Seq) s ciljem uočavanja diferencijalne ekspresije gena potaknute hipoksijom. Postupak se sastojao od kontrole kvalitete RNA, pripreme biblioteke mRNA uz poliA-obogaćivanje, sekvenciranja na uređaju NovaSeq 6000 PE150, poravnanja i standardne bioinformatičke analize diferencijalne ekspresije. Za potrebe ovog doktorskog rada, a u skladu s ciljevima, dobivenu bazu podataka koristili smo samo za odabir gena od interesa čiju smo diferencijalnu ekspresiju provjerili pomoću kvantitativnog PCR-a.

### 3.2.7. Reverzna transkripcija i provjera uspješnosti metodom PCR

1  $\mu$ g kupne RNA svakog uzorka hipokampusa, somatosenzoričkog korteksa i talamusa prepisano je u cDNA reverznom transkripcijom (eng. *reverse transcription*, RT) pomoću enzima MuLV reverzne transkriptaze i oligo dT početnica u ukupnom volumenu od 20  $\mu$ L slijedeći upute proizvođača (Tablica 2.). Uvjeti reverzne transkripcije prikazani su u Tablici 3. Uspješnost reverzne transkripcije provjerena je metodom lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) pomoću početnica za pozitivnu kontrolu (eng. *positive control primers*) koje dolaze uz komplet za izolaciju RNA. Sastav reakcijske smjese korišten za PCR naveden je u Tablici 4, a uvjeti reakcije u Tablici 5. Prisutnost produkata PCR reakcije provjerena je elektroforezom na 1,5 % gelu. Za pripremu gela korišteno je 60 mL 0,5x TBE pufera, 0,9 g agaroze i 6  $\mu$ L boje SYBR Safe. Prilikom nanošenja uzoraka na gel, 3  $\mu$ L PCR produkta pomiješano je s 3  $\mu$ L 2x BlueJuice pufera za nanošenje. Elektroforeza se odvijala 20 minuta pri 80V, a gel je vizualiziran i slikan pod UV svjetlom. Nakon provjere uspješnosti, cDNA je pohranjena pri -20°C do kasnije upotrebe.

**Tablica 2.** Prikaz korištenih reagensa za reverznu transkripciju u ukupnom volumenu od 20  $\mu\text{L}$ 

Reagensi za reverznu transkripciju (RT)	Početna koncentracija	Završna koncentracija
Oligo d(T) 16 početnice	50 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM
PCR pufer II	10x	1x
mješavina dNTP	10 mM	1 mM
RNazni inhibitor	20 U/ $\mu\text{L}$	1 U/ $\mu\text{L}$
MuLV reverzna transkriptaza	50 U/ $\mu\text{L}$	1,25 U/ $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O (bez RNaza) + RNA (1 $\mu\text{g}$ )	0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

**Tablica 3.** Prikaz uvjeta za RT

Inkubacija	Vežanje početnica	Reverzna transkripcija	Inaktivacija enzima
65°C	25°C	37°C	95°C
5 min	10 min	60 min	5 min

**Tablica 4.** Prikaz korištenih reagensa za PCR za provjeru uspješnosti RT u ukupnom volumenu od 15  $\mu\text{L}$ 

Reagensi za PCR	Početna koncentracija	Završna koncentracija
H <sub>2</sub> O (bez nukleaza)	-	-
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM
PCR pufer II	10x	1x
mješavina dNTP	10 mM	0,8 mM
Početnice za pozitivnu kontrolu	5 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$
AmpliTaq polimeraza	5 U/ $\mu\text{L}$	0,037 U/ $\mu\text{L}$
cDNA	50 ng/ $\mu\text{L}$	5 ng/ $\mu\text{L}$

**Tablica 5.** Prikaz uvjeta PCR reakcije za provjeru uspješnosti RT

Pre-denaturacija	Denaturacija	PCR (35 ciklusa)		Konačno produljivanje lanca
95°C	94°C	Vežanje početnica 55°C	Produljivanje lanca 72°C	72°C
1 min	30 sek	30 sek	30 sek	5 min

### 3.2.8. Kvantitativni PCR

Relativna genska ekspresija određena je metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (eng. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) koristeći komercijalno dostupne Taqman početnice sa fluorescentno obilježenim sondama. Ukupni reakcijski volumen od 20 µL sadržavao je 10 µL master mixa, 1 µL početnica i sonde za endogenu kontrolu (referentni gen) ili gen od interesa, 7 µL vode bez nukleaza i 2 µL cDNA (oko 30 ng po reakciji). Za svaki je uzorak reakcija provedena u triplikatu. Za određivanje relativne ekspresije dopaminskih receptora korišten je uređaj AB 7300 Real-Time PCR System, a rezultati amplifikacije su analizirani pomoću programa 7300 System SDS v1.4.. Za određivanje relativne ekspresije ostalih gena korišten je novonabavljeni uređaj qTower3, a rezultati amplifikacije su analizirani pomoću programa qPCRsoft 4.0. Uvjeti za qPCR reakcije prikazani su u Tablici 6, a popis svih testiranih endogenih kontrola i gena od interesa nalazi se u Tablici 7. Razine cDNA gena od interesa (GOI) normalizirane su prema endogenoj kontroli (GEK, srednja vrijednost dvaju referentnih gena, koja služi za kontrolu početne količine tkiva) i kalibratoru (KAL, uzorak nanesen na sve pločice, koji služi kontroli uvjeta reakcije), te je izračunata relativna razina ekspresije svakog gena pomoću formule:

$$\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{GEK}$$

$$Ct_{GEK} = \frac{Ct_{Actb} + Ct_{Hprt1}}{2}$$

$$\Delta Ct_{NORM} = \Delta Ct - \Delta Ct_{KAL}$$

$$\text{Normalizirana ekspresija ciljnog gena} = 2^{-\Delta Ct_{NORM}} \times 100$$

**Tablica 6.** Prikaz uvjeta qPCR reakcije

Inkubacija	Aktivacija polimeraze	PCR (40 ciklusa)	
50°C	95°C	Denaturacija 95°C	Vežanje početnica / produljivanje lanca 60°C
2 min	10 min	15 sek	60 sek

**Tablica 7.** Endogene kontrole i geni od interesa analizirani qPCR-om

Endogena kontrola (GEK)		Oznaka TaqMan eseja	Boja	Tkivo
<i>Actb</i>	$\beta$ -Aktin	Rn00667869_m1	VIC- MGB_PL	Sva tkiva
<i>Hprt1</i>	Hipoksantin fosforiboziltransferaza 1	Rn01527840_m1	VIC- MGB_PL	Sva tkiva
Gen od interesa (GOI)				
<i>Drd1</i>	Dopaminski receptor D1	Rn03062203_s1	FAM-MGB	Sva tkiva
<i>Drd2</i>	Dopaminski receptor D2	Rn00561126_m1	FAM-MGB	Sva tkiva
<i>Ppp1r1b</i>	Dopaminom i cAMP-om regulirani fosfoprotein Mr 32 000 (DARPP-32)	Rn01452984_m1	FAM-MGB	Talamus
<i>Prkar2a</i>	Podjedinica protein kinaze A (RII $\alpha$ )	Rn00709403_m1	FAM-MGB	Talamus
<i>Ppp1r1c</i>	1C regulatorna podjedinica PP1 / inhibitor 5 PP1 (IPP5)	Rn01513845_m1	FAM-MGB	Talamus
<i>Grin2a</i>	Podjedinica NMDA receptora (GluN2A)	Rn00561341_m1	FAM-MGB	Somatosenzorički korteks
<i>Gria2</i>	Podjedinica AMPA receptora (GluA2)	Rn00568514_m1	FAM-MGB	Somatosenzorički korteks
<i>Grm5</i>	Metabotropni glutamatni receptor 5 (mGluR5)	Rn00566628_m1	FAM-MGB	Somatosenzorički korteks
<i>Gabrb2</i>	$\beta$ 2 podjedinica GABA <sub>A</sub> receptora	Rn00564149_m1	FAM-MGB	Somatosenzorički korteks
<i>VIP</i>	Vazoaktivni intestinalni peptid	Rn01430567_m1	FAM-MGB	Hipokampus

### 3.2.9. Statistička obrada rezultata

Rezultati su statistički obrađeni programima GraphPad InStat 3.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) i JMP 11.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Normalnost raspodjele testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Dvostrukom analizom varijanci (eng. *Two-way ANOVA*), na originalnim ili transformiranim vrijednostima, provjeren je utjecaj tretmana i spola na mjerene varijable. Jednovarijantni split-plot pristup za analizu varijanci ponovljenih mjerenja (eng. *Repeated measures ANOVA*) korišten je za analizu utjecaja hipoksije i dana testiranja na uspješnost učenja u T-labirintu. Post-hoc analiza izvršena je pomoću Tukey-evog testa (eng. *Tukey's honest significance test – HST*). Korelacija mase i uspješnosti u T-labirintu provjerena je Pearsonovim testom. Rezultati u radu su prikazani kao srednja vrijednost (eng. *mean, M*) ± standardna pogreška (eng. *standard error of mean, SEM*). Vrijednosti parametara koje su se razlikovale više od dvije standardne devijacije od prosječne vrijednosti za skupinu (eng. *outliers*) izostavljene su iz statističkih analiza. U slučaju  $p < 0,05$  rezultati su prihvaćeni kao statistički značajni.

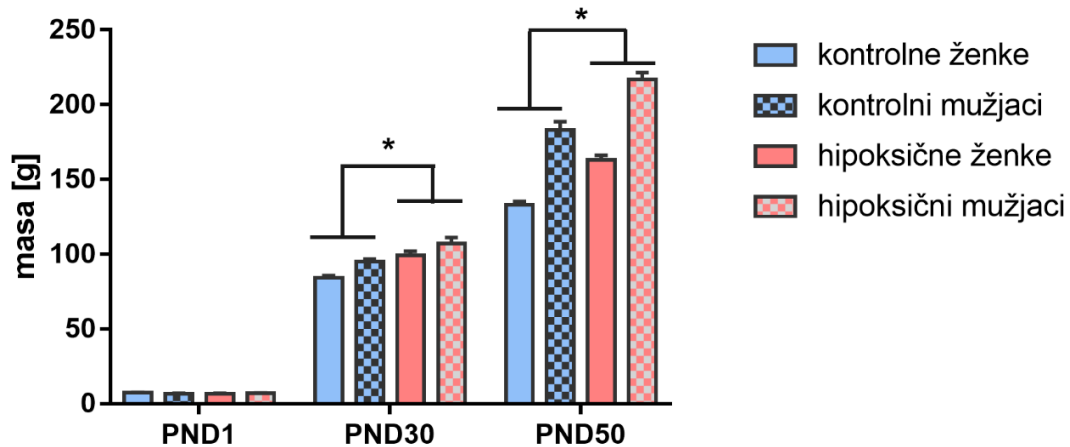


## 4. REZULTATI

### 4.1. Masa životinja

#### 4.1.1. Prirast mase tijekom sazrijevanja

Srednje vrijednosti masa životinja razvrstanih po tretmanu i skupini usporedili smo po okotu (PND1), nakon odvajanja od majke (PND30) i prije žrtvovanja (PND50) (Slika 14.). Dvosmjerna analiza varijance pokazala je da između novorođenih štakora nema razlike u masi ni s obzirom na spol ( $p=0,540$ ), ni s obzirom na dodjeljenost kontrolnoj skupini ili skupini koja će biti podvrgnuta hipoksiji ( $p=0,658$ ). Na masu tridesetog postnatalnog dana značajan utjecaj imali su spol ( $91,8 \pm 2,0$  g ž. vs  $100,8 \pm 2,1$  g m.;  $F=9,58$ ;  $p=0,003$ ) i tretman ( $89,6 \pm 2,0$  g k. vs  $102,9 \pm 2,0$  g h.;  $F=21,25$ ;  $p<0,0001$ ), što je postalo još izraženije pedesetog postnatalnog dana ( $148,0 \pm 2,8$  g ž. vs  $199,6 \pm 2,9$  g m.;  $F=166,69$ ;  $p<0,0001$  i  $57,9 \pm 2,9$  g k. vs  $189,6 \pm 2,8$  h.;  $F=62,77$ ;  $p<0,0001$ ). Interakcija spola i tretmana nije značajno utjecala na tjelesnu masu ( $p=0,148$  za PND1,  $p=0,634$  za PND30 i  $p=0,553$  za PND 50).



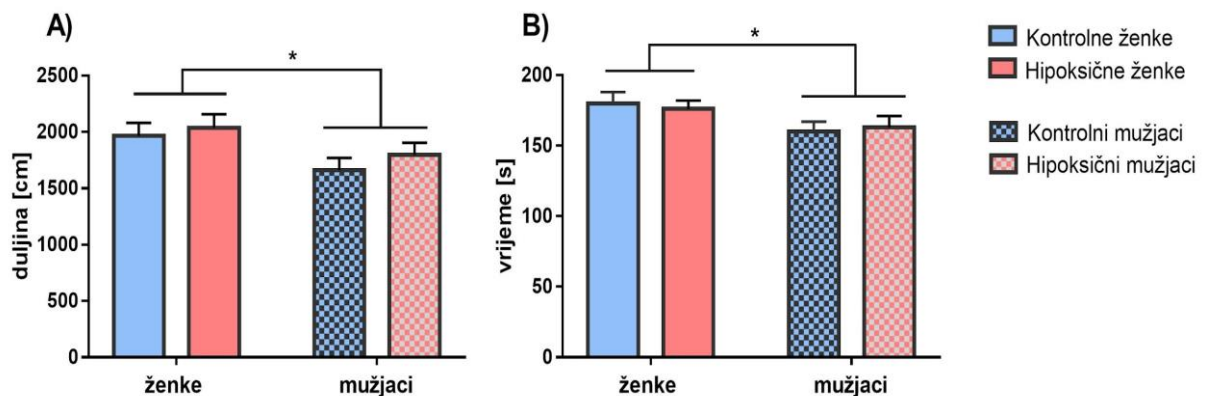
**Slika 14.** Masa kontrolnih i hipoksičnih štakora izmjerena prvog (9 kž, 13 km, 11 hž, 11 hm) tridesetog (18 kž, 16 km, 17 hž, 17 hm) i pedesetog (8 kž, 7 km, 8 hž, 8 hm) postnatalnog dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p<0,001$ , dvosmjerna analiza varijance

## 4.2. Testovi ponašanja

### 4.2.1. Test u otvorenom polju

#### 4.2.1.1. Horizontalno kretanje

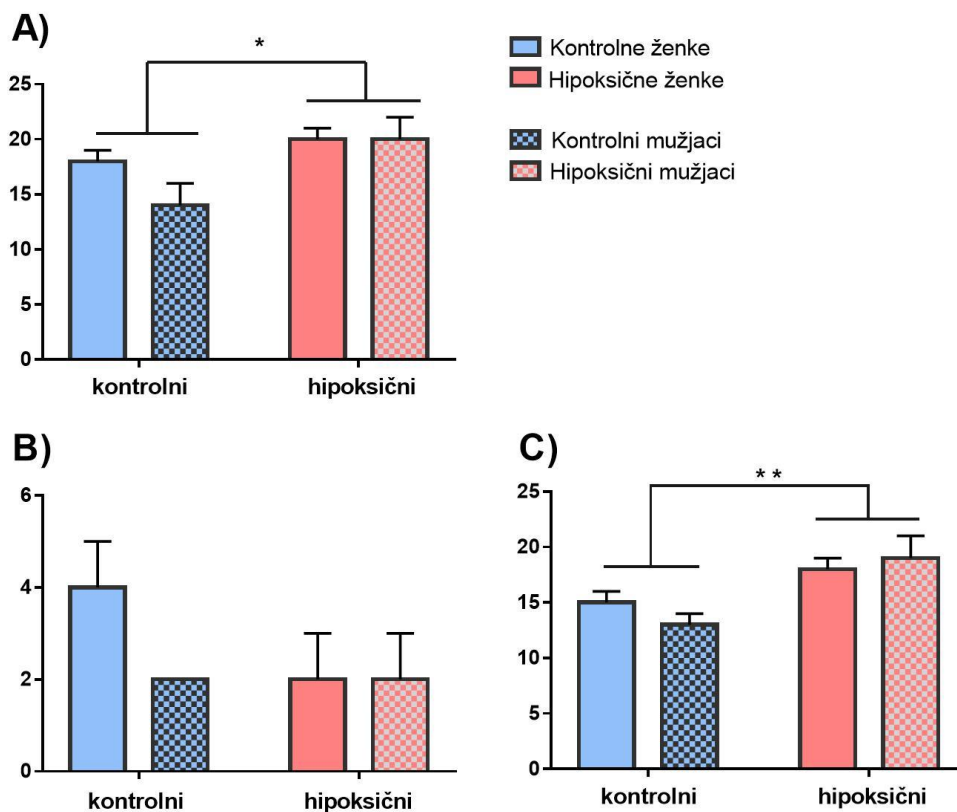
Na Slici 15. su prikazani rezultati testa u otvorenom polju provedenog 33. postnatalnog dana. Lokomotorna aktivnost mjerena je kao prijeđeni put i vrijeme provedeno u pokretu. Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj spola na ukupni prijeđeni put ( $2002 \pm 79$  cm ž. vs  $1729 \pm 82$  cm m.;  $F=5,74$ ;  $p=0,020$ ) i vrijeme provedeno u pokretu ( $178 \pm 5$  s ž. vs  $162 \pm 5$  s m.;  $F=4,96$ ;  $p=0,029$ ). Tretman i interakcija spola i tretmana nisu imali značajan utjecaj na prijeđeni put ( $p=0,365$ ;  $p=0,796$ ) i vrijeme u pokretu ( $p=0,962$ ;  $p=0,655$ ).



**Slika 15.** Horizontalno kretanje kontrolnih (19 ž, 15 m) i hipoksičnih (16 ž, 17 m) štakora u otvorenom polju. A) Prijeđeni put; B) Vrijeme u pokretu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \*  $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance.

#### 4.2.1.2. Vertikalno kretanje

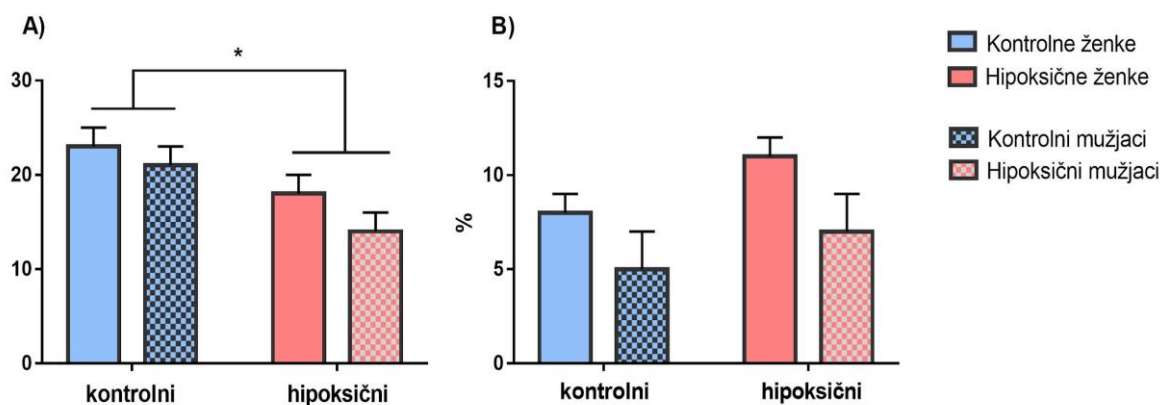
U testu otvorenog polja mjerena je i aktivnost propinjanja (podizanje životinje na stražnje noge). Na slici 16. prikazani su ukupni broj propinjanja, propinjanje bez potpore (na otvorenom prostoru aparata) te propinjanje s potporom (uza zid aparata). Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana na ukupan broj propinjanja ( $16,4 \pm 1,0$  k. vs  $20,4 \pm 1,1$  h.;  $F=7,6$ ;  $p=0,008$ ) i na propinjanje s potporom ( $13,8 \pm 0,9$  k. vs  $18,4 \pm 0,9$  h.;  $F=13,27$ ;  $p=0,0005$ ), dok spol i interakcija spola i tretmana nisu imali značajan utjecaj na ukupan broj propinjanja ( $p=0,166$ ;  $p=0,184$ ) i na propinjanje s potporom ( $p=0,624$ ;  $p=0,389$ ). Na propinjanje bez potpore spol, tretman te interakcija spola tretman nisu imali značajan utjecaj ( $p=0,101$ ;  $p=0,209$ ;  $p=0,438$ ).



**Slika 16.** Vertikalno kretanje kontrolnih (19 ž, 14 m) i hipoksičnih (16 ž, 17 m) štakora u otvorenom polju. A) Ukupni broj propinjanja B) Broj propinjanja bez potpore C) Broj propinjanja s potporom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ , dvosmjerna analiza varijance.

#### 4.2.2. Test na ploči s rupama

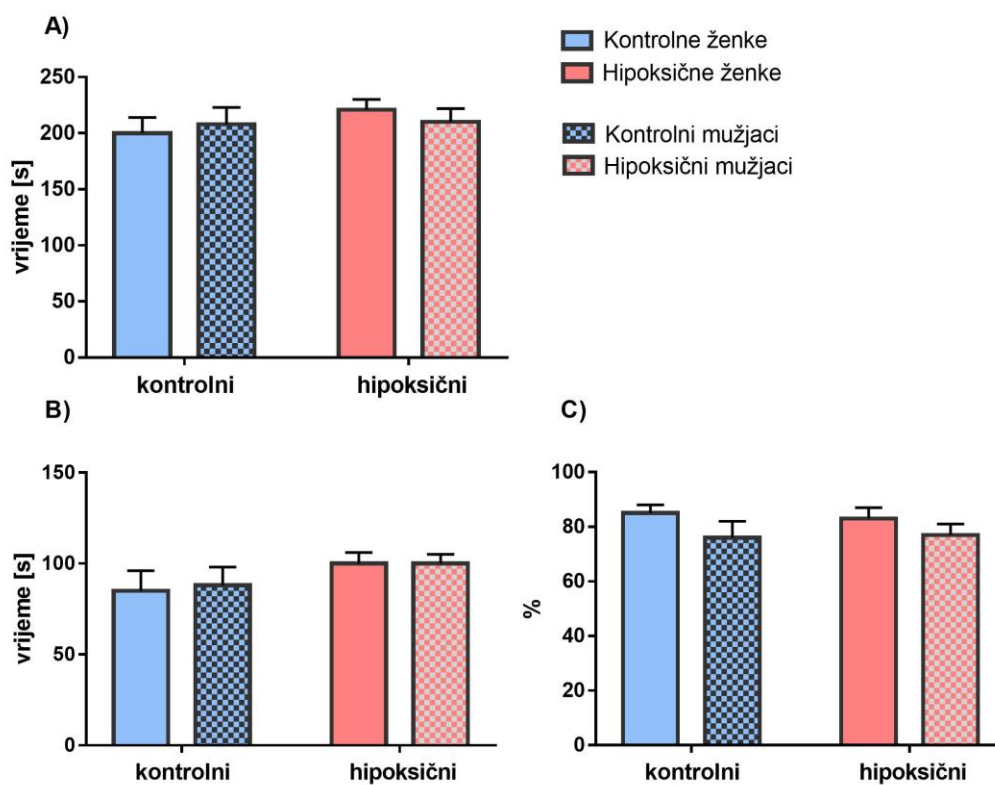
Na slici 17. prikazani su rezultati testa na ploči s rupama provedenog 34. postnatalnog dana. Eksploratorno ponašanje mjereno je kao ukupan broj posjećenih rupa, a anksiozno ponašanje je mjereno kao postotak posjećenosti unutarnjih rupa. Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana na ukupan broj posjećenih rupa ( $22,2 \pm 1,4$  k. vs  $15,9 \pm 1,3$  h.;  $F=10,8$ ;  $p=0,002$ ), dok je na postotak posjećenosti unutarnjih rupa tretman imao tek indikativan utjecaj ( $6,1 \pm 1,2$  k. vs  $9,3 \pm 1,3$  h.;  $F=3,2$ ;  $p=0,077$ ). Spol i interakcija spola i tretmana nisu pokazali značajan utjecaj na ukupan broj posjećenih rupa ( $p=0,152$ ;  $p=0,704$ ), niti na postotak posjećenosti unutarnjih rupa ( $p=0,137$ ;  $p=0,858$ ).



**Slika 17.** Eksploratorno i anksiozno ponašanje kontrolnih i hipoksičnih štakora na ploči s rupama. A) Ukupni broj posjećenih rupa (19 kž, 16 km, 18 hž, 18 hm) B) Postotak posjećenosti unutarnjih rupa (20 kž, 17 km, 17 hž, 16 hm). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,01$ , dvosmjerna analiza varijance.

#### 4.2.3. Test društvenog odabira

Na slici 18. prikazani su rezultati testa društvenog odabira provedenog 44. i 45. postnatalnog dana. Mjereni parametri bili su vrijeme provedeno izvan središnje komore (razina anksioznosti), vrijeme provedeno u aktivnom istraživanju objekta (eksploratorno ponašanje) te postotak vremena aktivnog istraživanja provedenog u istraživanju živog u odnosu na neživi objekt (društvenost). Dvosmjerna analiza varijance nije pokazala značajan utjecaj spola, tretmana i interakcije spola i tretmana na vrijeme provedeno izvan središnje komore ( $p=0,568$ ;  $p=0,165$ ;  $p=0,636$ ), vrijeme u aktivnom istraživanju objekta ( $p=0,846$ ;  $p=0,122$ ;  $p=0,862$ ), niti na postotak vremena istraživanja štakora ( $p=0,107$ ;  $p=0,827$ ;  $p=0,783$ ).



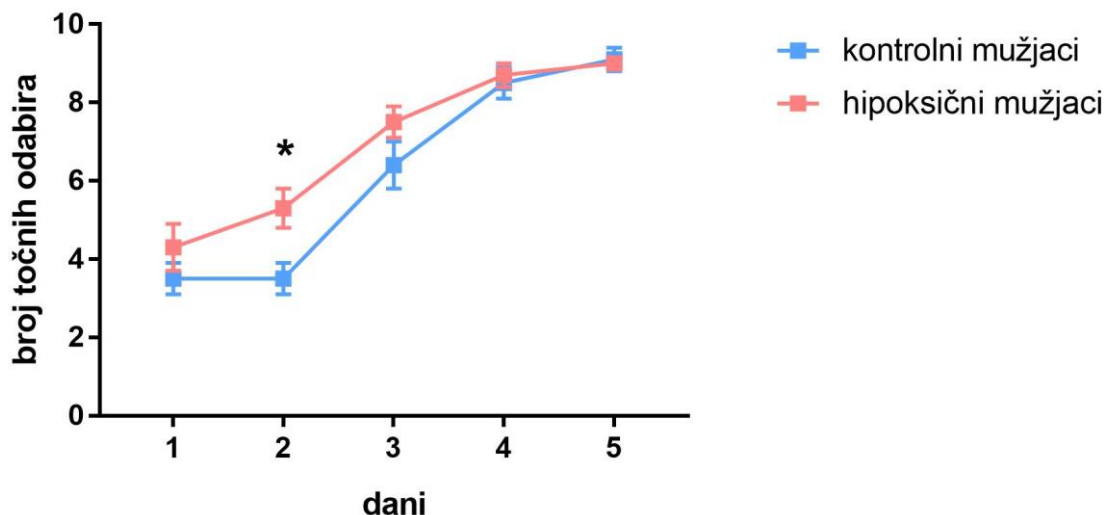
**Slika 18.** Anksiozno, eksploratorno i društveno ponašanje kontrolnih i hipoksičnih štakora u testu društvenog odabira. A) Vrijeme izvan središnje komore (13 kž, 12 km, 17 hž, 16 hm) B) Vrijeme u aktivnom istraživanju (13 kž, 12 km, 17 hž, 15 hm) C) % Vremena aktivnog istraživanja štakora (12 kž, 11 km, 17 hž, 15 hm). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ).

#### 4.2.4. Test u T-labirintu

##### 4.2.4.1. Prostorno pamćenje

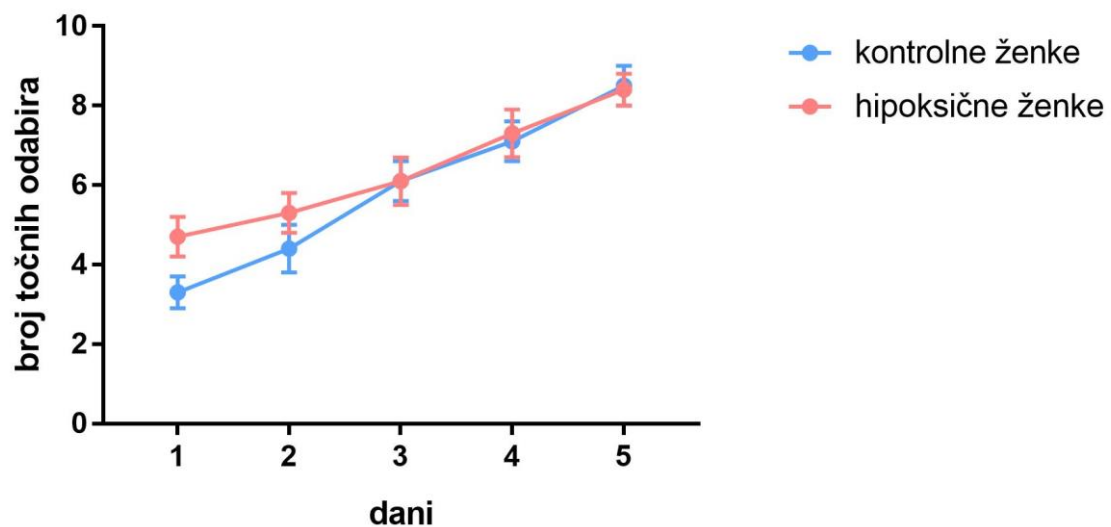
Test u T-labirintu proveden je kroz 5 uzastopnih dana, od 39. do 43. postnatalnog dana. Prostorno pamćenje u ovom testu mjereno je kao svakodnevni zbroj uspješnih pronalazaka nagrade, od 10 mogućih pokušaja. Zbog kompleksnije statističke analize, ovaj smo parametar zasebno analizirali za ženke i mužjake.

Na slici 19. prikazan je prosječan broj točnih odabira u T-labirintu za mužjake kod kojih je analiza varijanci ponovljenih mjerenja pokazala značajan utjecaj tretmana ( $6,39 \pm 0,2$  k. vs  $7,22 \pm 0,2$  h.;  $F=5,78$ ;  $p=0,022$ ) i dana testiranja ( $4,01 \pm 0,3$  1. dana,  $4,53 \pm 0,3$  2. dana,  $7,23 \pm 0,3$  3. dana,  $8,87 \pm 0,3$  4. dana i  $9,38 \pm 0,3$  5. dana;  $F=103,56$ ;  $p<0,0001$ ) pri čemu je statistički značajan napredak uočen 3. dana testiranja u odnosu na 1. i 2. te 4. dana testiranja u odnosu na 3. dan. Utjecaj interakcije tretmana i dana bio je indikativan ( $F=2,097$ ;  $p=0,085$ ), što nam je omogućilo detaljniju analizu uspješnosti štakora iz ove dvije skupine po danima. Iako je broj točnih odabira u hipoksičnoj skupini prvih dana bio veći (2. dana čak i statistički značajno), do kraja testnog razdoblja razlika se posve izgubila.



**Slika 19.** Broj točnih odabira kontrolnih (16) i hipoksičnih (17) mužjaka u T-labirintu tijekom 5 dana testiranja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p<0,05$ , kontrolni vs. hipoksični, post-hoc test nakon analize varijanci ponovljenih mjerenja

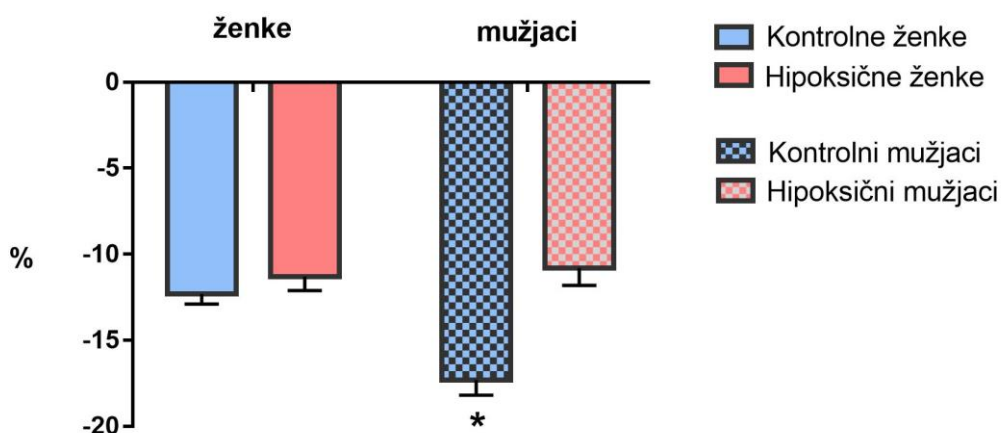
Na slici 20. prikazani su rezultati T-labirinta za ženke. Iako je i ovdje uočen značajan utjecaj vremena na uspješnost odabira ( $4,13 \pm 0,3$  1. dana,  $4,98 \pm 0,3$  2. dana,  $6,38 \pm 0,3$  3. dana,  $7,41 \pm 0,3$  4. dana i  $8,65 \pm 0,3$  5. dana;  $F=57,04$ ;  $p<0,0001$ ), krivulja učenja razlikovala se od one u mužjaka, uz značajno veći broj točnih odabira 3., 4. i 5. dana u odnosu na prethodni. Za razliku od mužjaka, tretman ( $p=0,111$ ) i interakcija tretman\*dan ( $p=0,322$ ) nisu pokazali značajan utjecaj.



**Slika 20.** Broj točnih odabira kontrolnih (18) i hipoksičnih (18) ženki u T-labirintu tijekom 5 dana testiranja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ).

#### 4.2.4.2. Gubitak mase tijekom razdoblja posta

Tijekom provođenja testa u T labirintu životinje su imale pristup hrani samo jedan sat dnevno. Za ovo razdoblje posta izračunat je postotak gubitka mase 5. u odnosu na 0. dan testiranja (Slika 21.). Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj spola ( $11,98 \pm 0,6$  % ž. vs  $14,18 \pm 0,6$  % m.;  $F=7,06$ ;  $p=0,010$ ), tretmana ( $14,98 \pm 0,6$  % k. vs  $11,19 \pm 0,6$  % m.,  $F=20,99$ ;  $p<0,0001$ ), ali i interakcije spola i tretmana ( $12,36 \pm 0,8$  % žk. vs  $11,61 \pm 0,8$  % žh. vs  $17,59 \pm 0,9$  mk. % vs  $10,77 \pm 0,8$  % mh.;  $F=13,49$ ;  $p=0,0005$ ), što nam je omogućilo post-hoc usporedbu svih skupina. Može se uočiti da između kontrolnih i hipoksičnih ženki nema razlike, dok su kontrolni mužjaci izgubili značajno veći postotak mase od hipoksičnih mužjaka. Kod mužjaka je utvrđena značajna negativna korelacija ( $r= -0,430$ ,  $p=0,014$ ) između broja točnih odgovora u T-labirintu i postotka gubitka mase, što može upućivati na različitu motiviranost u testu učenja potaknutog nagradom i donekle objasniti veću uspješnost hipoksičnih mužjaka u početnim danima testiranja.



**Slika 21.** Postotak gubitka tjelesne mase tijekom testiranja u T labirintu (18 kž, 18 hž, 16 km, 17 hm). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p<0,001$ , post-hoc analiza Tukey-evim testom nakon dvosmjerne analize varijance



### 4.3. Koncentracija katekolamina u moždanom deblu

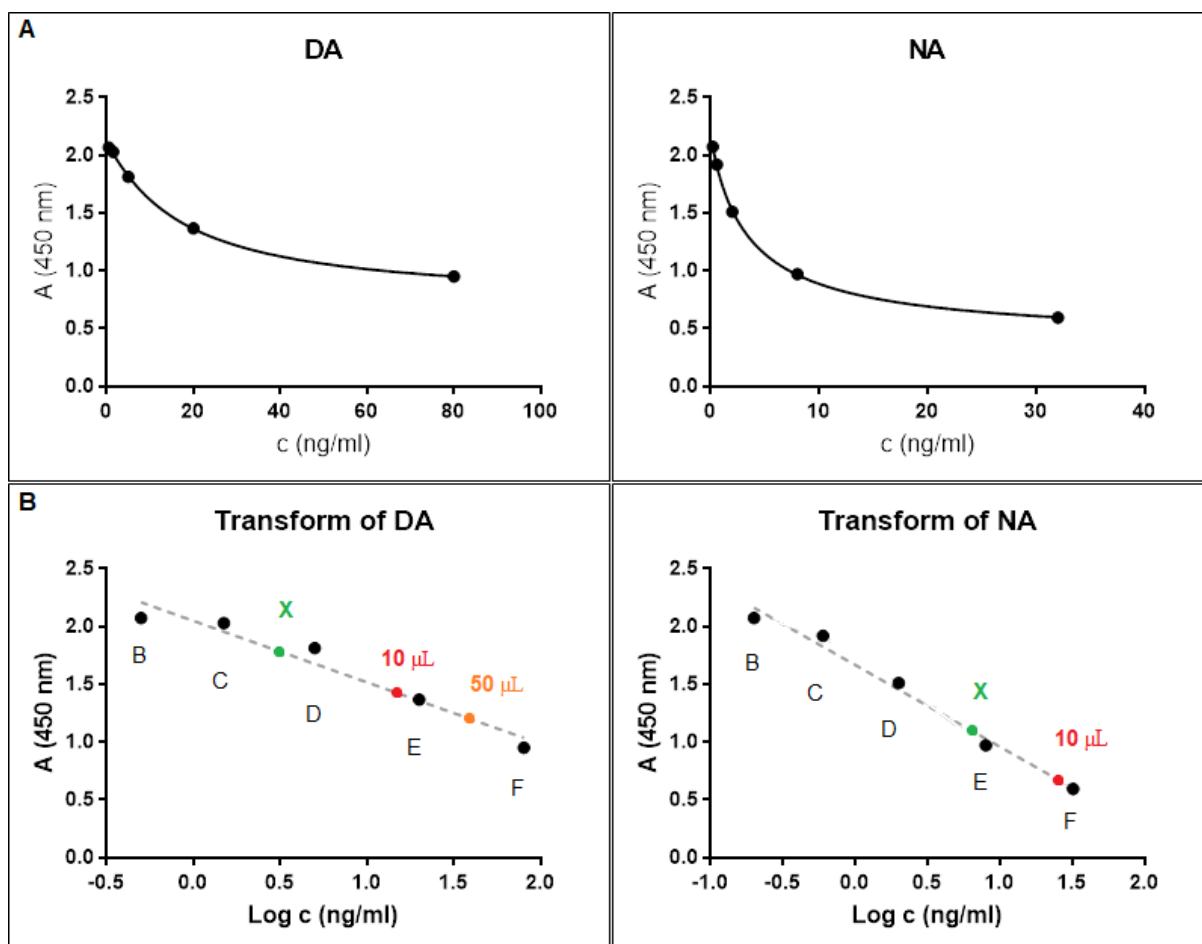
Nakon uočene značajne promjene u nekim aspektima eksploratornog ponašanja i učenja kod životinja izloženih hipoksiji, željeli smo ispitati je li u njihovom moždanom deblu došlo do promjene u koncentracijama katekolamina – neurotransmitora ključnih u regulaciji kretanja, motivacije i odgovora na podražaje iz okoline.

#### 4.3.1. Određivanje optimalne količine uzorka za mjerenje koncentracije katekolamina metodom ELISA

S obzirom da se u ovom kompletu ELISA početni koraci mjerenja koncentracije dopamina i noradrenalina odvijaju na istom alikvotu uzorka, ključno je bilo odrediti optimalnu početnu količinu uzorka u kojem će se, u pouzdanom rasponu vrijednosti, moći izmjeriti koncentracija oba katekolamina. U tu su svrhu izmjerene koncentracije dopamina i noradrenalina u tri različite početne količine homogenata (10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L i 150  $\mu$ L) dobivenog miješanjem alikvota svih uzoraka (engl. *pool*), usporedno s nekoliko razrjeđenja standarada poznate koncentracije, priloženih u kompletu. Očitavanjem apsorbancija standarada pri 450 nm, konstruiran je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracija standarada, pomoću kojeg su određene nepoznate koncentracije dopamina i noradrenalina u homogenatima, te je provjereno nalaze li se u okviru raspona standarada. Dobiveni rezultati prikazani su broječno u Tablici 8., te grafički na Slici 22.

**Tablica 8.** Prikaz apsorbancija (A), transformiranih koncentracija (Log c) i koncentracija (c) standarada (B-F) prema kojima su izrađene baždarne krivulje i izračunata koncentracija dopamina (DA) i noradrenalina (NA) u 10, 50 i 150  $\mu$ L homogenata. Za vrijednosti apsorbancija koje su se nalazile izvan raspona standarada nisu izračunati Log c i c.

	DA			NA		
	A (450 nm)	Log c	c (ng/mL)	A (450 nm)	Log c	c (ng/mL)
STDB	2,074	-0,301	0,5	2,073	-0,699	0,2
STDC	2,031	0,176	1,5	1,919	-0,222	0,6
STD D	1,814	0,699	5	1,512	0,301	2
STDE	1,367	1,301	20	0,972	0,903	8
STDF	0,950	1,903	80	0,595	1,505	32
10 $\mu$ l	1,489	1,155	14,30	0,610	1,474	29,78
50 $\mu$ l	1,099	1,641	43,77	0,358	-	-
150 $\mu$ l	0,717	-	-	0,262	-	-

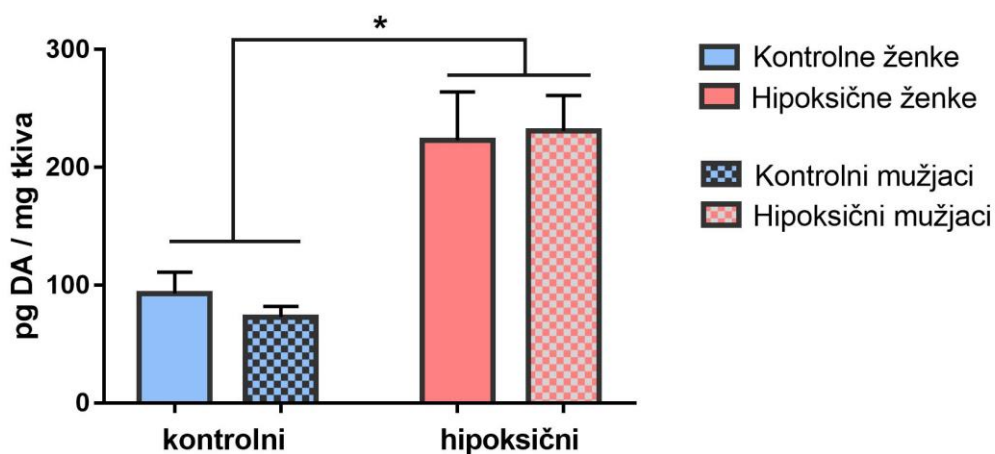


**Slika 22.** Prikaz standardnih krivulja (A) i transformiranih logaritamskih krivulja (B) za dopamin (DA) i noradrenalin (NA). Crvenim, narančastim i zelenim kružićem su označene vrijednosti koncentracija homogenata koje se nalaze unutar raspona vrijednosti standardne krivulje, a s X je označena koncentracija odabrane početne količine homogenata.

Kod odabira optimalne koncentracije uzoraka, cilj nam je bio odabrati vrijednost koja se nalazila u linearnom dijelu standardne krivulje, tj. između standarda C i E. Taj smo kriterij uspješno postići peterostrukim smanjenjem najmanje početne količine homogenata pa smo za usporedbu koncentracija dopamina i noradrenalina u uzorcima koristili početni volumen homogenata od 2  $\mu\text{L}$ .

### 4.3.2. Razina dopamina u moždanom deblu

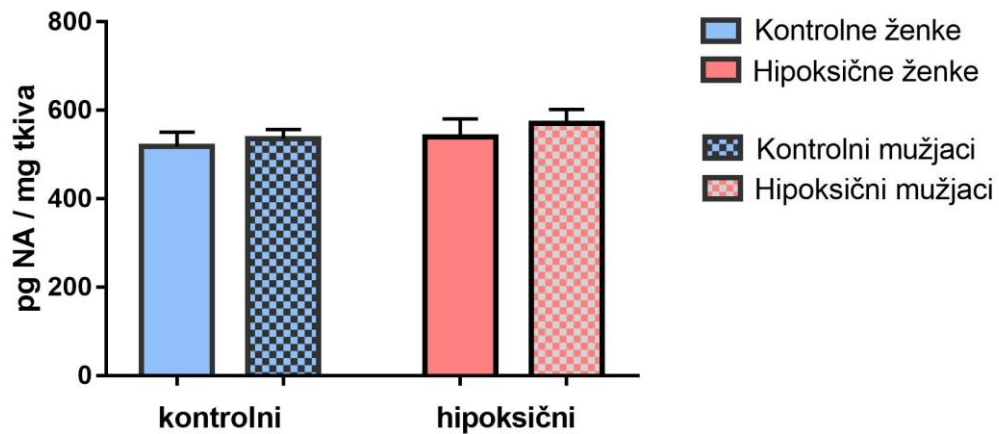
Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $82,8 \pm 20,4$  pg/mg k. vs  $226,9 \pm 19,7$  pg/mg h.;  $F=25,793$ ;  $p<0,0001$ ) na razinu dopamina u moždanom deblu, dok spol ( $p=0,827$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,635$ ) nisu imali značajan utjecaj (Slika 23.).



**Slika 23.** Razina dopamina (pg/mg tkiva) u moždanom deblu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 8 m) štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p<0,0001$ , dvosmjerna analiza varijance

### 4.3.3. Razina noradrenalina u moždanom deblu

Dvosmjerna analiza varijance nije pokazala značajan utjecaj tretmana ( $p=0,391$ ), spola ( $p=0,462$ ) ni interakcije spola i tretmana ( $p=0,850$ ) na razinu noradrenalina u moždanom deblu (Slika 24.).



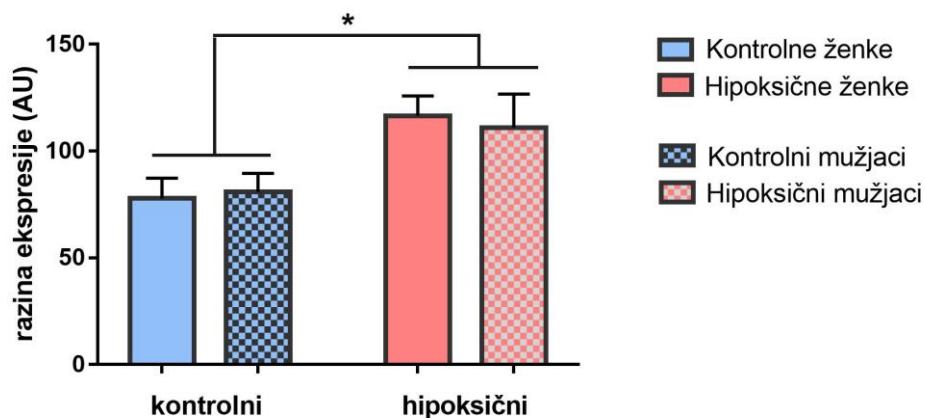
**Slika 24.** Razina noradrenalina (pg/mg tkiva) u moždanom deblu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 8 m) štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ).

## 4.4. Ekspresija gena dopaminskih D1 i D2 receptora

Kako bismo proniknuli u moguću povezanost opaženih razlika u ponašanju sa značajno povišenom koncentracijom dopamina u moždanom deblu, sljedeći korak bio je ispitati razinu ekspresije dopaminskih receptora u regijama mozga koje posreduju prostorno učenje (hipokampus) i somatosenzoričko procesiranje (talamus – somatosenzorički korteks).

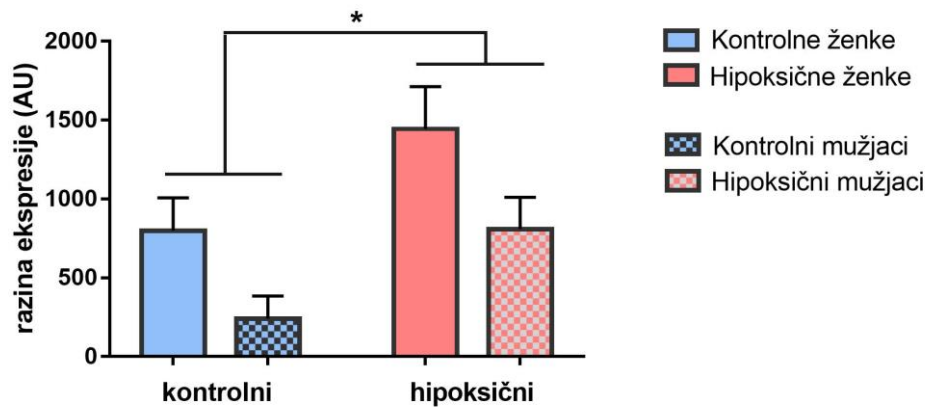
### 4.4.1. Talamus

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $79,28 \pm 9,0$  AU k. vs  $113,87 \pm 8,7$  AU h.;  $F=7,589$ ;  $p=0,011$ ), dok spol ( $p=0,918$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,726$ ) nisu imali značajan utjecaj na ekspresiju gena dopaminskog D1 receptora u talamusu.



**Slika 25.** Relativna ekspresija *Drd1* u talamusu kontrolnih (7 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 7 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance

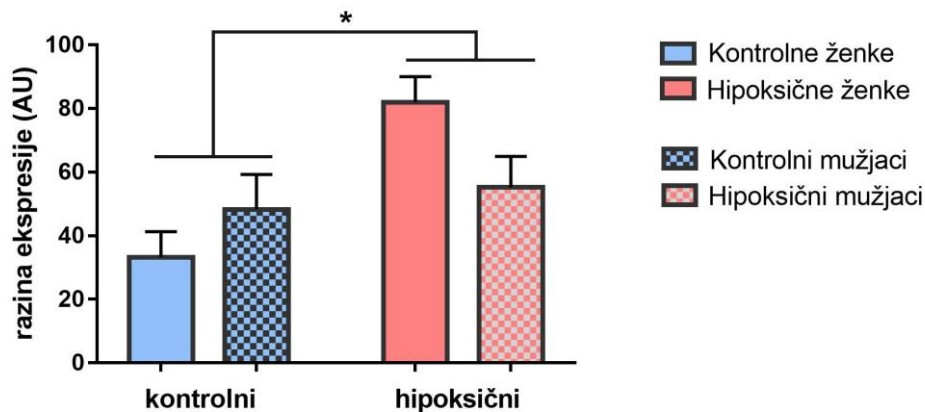
Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $519,57 \pm 178,5$  AU k. vs  $1126,62 \pm 173,3$  AU h.;  $F=7,44$ ;  $p=0,012$ ), ali i spola ( $1121,82 \pm 178,5$  AU ž. vs  $524,37 \pm 173,3$  AU m.;  $F=6,95$ ;  $p=0,015$ ) na ekspresiju gena dopaminskog D2 receptora u talamusu. Interakcija spola i tretmana ( $p=0,257$ ) nije pokazala značajan utjecaj.



**Slika 26.** Relativna ekspresija *Drd2* u talamusu kontrolnih (7 ž, 6 m) i hipoksičnih (6 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance

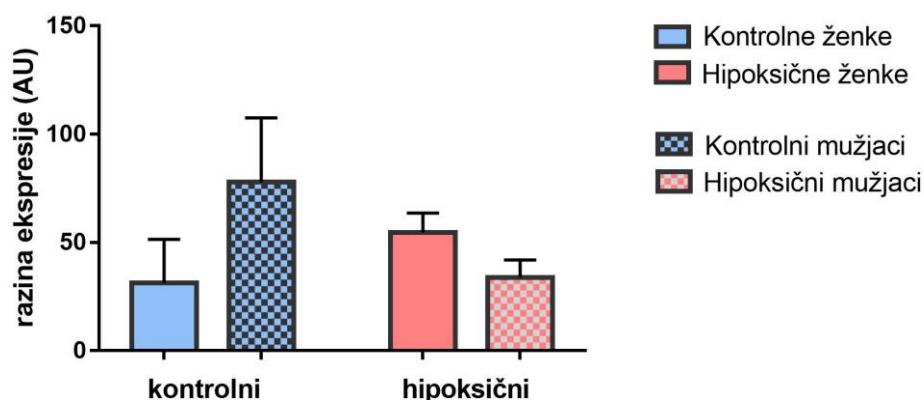
#### 4.4.2. Somatosenzorički korteks

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $40,83 \pm 8,1$  AU k. vs  $66,71 \pm 7,5$  AU h.;  $F=5,55$ ;  $p=0,028$ ), dok spol ( $p=0,933$ ) i interakcija spola i tretmana nisu imali značajan utjecaj ( $p=0,213$ ) na ekspresiju gena dopaminskog D1 receptora u somatosenzoričkom korteksu.



**Slika 27.** Relativna ekspresija *Drd1* u somatosenzoričkom korteksu kontrolnih (6 ž, 6 m) i hipoksičnih (7 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance

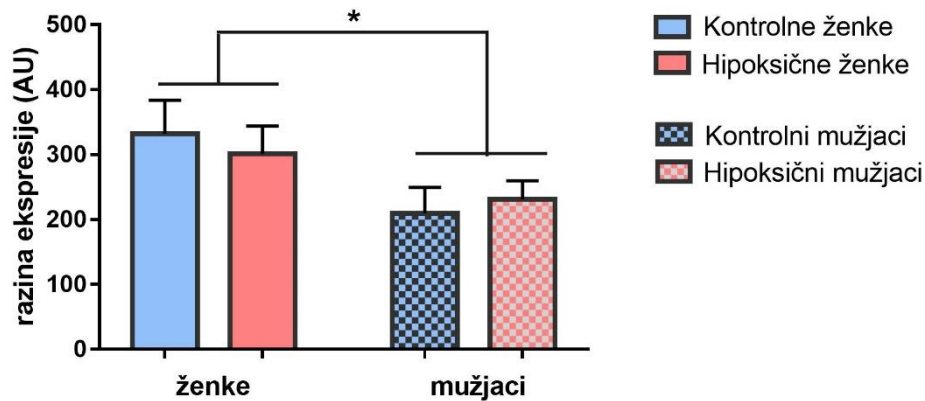
Dvosmjerna analiza varijance nije pokazala značajan utjecaj tretmana ( $p=0,127$ ), spola ( $p=0,307$ ) niti interakcije spola i tretmana ( $p=0,124$ ) na ekspresiju gena dopaminskog D2 receptora u somatosenzoričkom korteksu.



**Slika 28.** Relativna ekspresija *Drd2* u somatosenzoričkom korteksu kontrolnih (5 ž, 7 m) i hipoksičnih (6 ž, 7 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ).

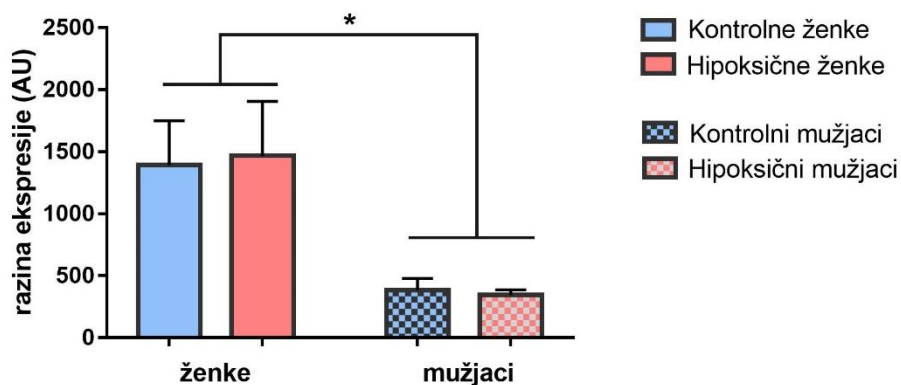
### 4.4.3. Hipokampus

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj spola ( $316,49 \pm 30,7$  AU ž. vs  $220,28 \pm 31,7$  AU m.;  $F=4,74$ ;  $p=0,039$ ), dok tretman ( $p=0,914$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,562$ ) nisu imali značajan utjecaj na ekspresiju gena dopaminskog D1 receptora u hipokampusu (Slika 29.).



**Slika 29.** Relativna ekspresija *Drd1* u hipokampusu kontrolnih (7 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 7 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj spola ( $1430,37 \pm 225,6$  AU ž. vs  $364,75 \pm 251,7$  AU m.;  $F=9,51$ ;  $p=0,005$ ), dok tretman ( $p=0,820$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,499$ ) nisu imali značajan utjecaj na ekspresiju gena dopaminskog D2 receptora u hipokampusu.



**Slika 30.** Relativna ekspresija *Drd2* u hipokampusu kontrolnih (7 ž, 6 m) i hipoksičnih (8 ž, 6 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance



## 4.5. Sekvenciranje RNA

Za potrebe cijelog projekta određena je diferencijalna ekspresija gena u tkivima talamusa, somatosenzoričkog korteksa i hipokampusa. Nakon korekcije za višestruko testiranje u tkivu talamusa značajno promijenjenu diferencijalnu ekspresiju imalo je ukupno 178 gena (123 povišenu, 55 smanjenu). U tkivu somatosenzoričkog korteksa značajno promijenjenu diferencijalnu ekspresiju imalo je ukupno 2468 gena (1094 povišenu, 1374 smanjenu). U tkivu hipokampusa značajno promijenjenu diferencijalnu ekspresiju imalo je ukupno 17 gena (6 povišenu, 11 smanjenu).

Za potrebe ovog doktorata u svakom tkivu odabrali smo gene kojima smo pokušali detaljnije objasniti dosad opažene promjene u ponašanju i dopaminskoj homeostazi: 1. u talamusu gene vezane uz regulaciju putem dopaminskih receptora (“nizvodne gene”), 2. u somatosenzoričkom korteksu gene koji kodiraju za receptore uključene u somatosenzoričko procesiranje, 3. u hipokampusu gene vezane uz prostorno učenje. Njihovu razliku u ekspresiji smo ciljano provjerili qPCR-om na svim uzorcima.

## 4.6. Provjera diferencijalne ekspresije odabranih gena metodom qPCR

### 4.6.1. Ispitivanje učinkovitosti qPCR reakcija za pojedine početnice i određivanje optimalne količine uzorka za qPCR reakciju

Učinkovitost svake qPCR reakcije ovisi o duljini, sekundarnoj strukturi te sadržaju GC baza amplikona te koncentraciji reagensa i kvaliteti enzima. Razina učinkovitosti izračunava se pomoću vrijednosti nagiba kalibracijskog pravca ( $Učinkovitost = 10^{(-1/nagib\ pravca)} - 1$ ). Prihvatljive vrijednosti učinkovitosti protežu se između 90% i 110%, što pokazuje da se ciljana sekvenca udvostručuje u svakom replikacijskom ciklusu.

S ciljem ispitivanja učinkovitosti reakcija za pojedine početnice i određivanja optimalne količine uzorka za qPCR reakciju, grupirani su alikvoti cDNA kontrolnih i hipoksičnih životinja (eng. *pool*) te je njihova početna koncentracija od 50 ng/μL razrijeđena na 15 ng/μL. Korištene količine cDNA u *pool*-u za izradu kalibracijskih krivulja za određivanje učinkovitosti bile su redom 105 ng, 21 ng, 4,2 ng, 0,84 ng (serija peterostrukih razrjeđenja). Učinkovitosti reakcija za sve testirane početnice nalazile su se u rasponu prihvatljivih vrijednosti i prikazane su u Tablici 9. Kao optimalna količina uzorka za qPCR reakciju određena je količina od 30 ng cDNA (2 μL razrijeđenog uzorka).

**Tablica 9.** Učinkovitost qPCR reakcija za pojedine početnice. U tablici su prikazane vrijednosti korelacijskog koeficijenta ( $R^2$ ) i nagiba pravca iz koje je izračunata učinkovitost izražena u postotcima.

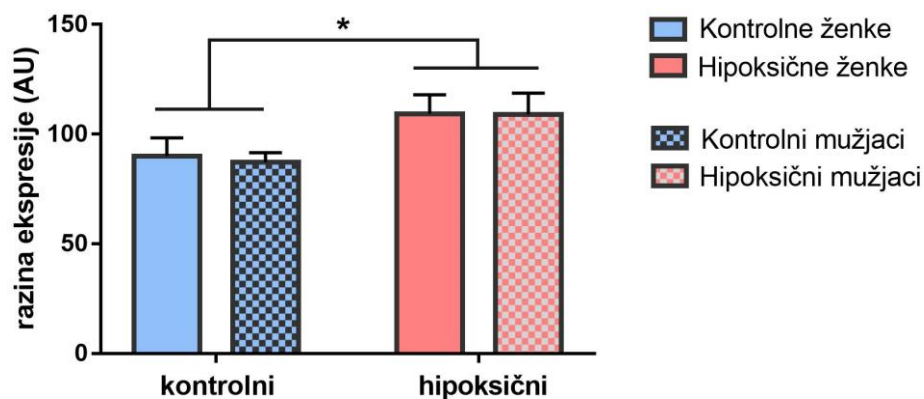
Početnice	$R^2$	Nagib pravca	Učinkovitost (%)
<i>Actb</i>	0,99	-3,59	90
<i>Hprt1</i>	0,99	-3,52	92
<i>Drd1</i>	0,99	-3,54	92
<i>Drd2</i>	0,99	-3,39	97
<i>Ppp1r1b</i>	0,97	-3,6	90
<i>Prkar2a</i>	0,97	-3,32	100
<i>Ppp1r1c</i>	0,96	-3,24	103
<i>Gria2</i>	0,94	-3,56	91
<i>Grin2a</i>	0,99	-3,59	90
<i>Grm5</i>	0,97	-3,54	92
<i>Gabrb2</i>	0,99	-3,47	94
<i>VIP</i>	0,99	-3,43	96

#### 4.6.2. Talamus

Moguću promjenu dopaminske aktivnosti u talamusu željeli smo dodatno provjeriti mjerenjem ekspresije gena za proteine koji se nalaze „nizvodno“ od dopaminskih receptora, tj. putem kojih dopamin ostvaruje svoj učinak na regulaciju i ekspresiju staničnih proteina, a to su *Ppp1r1b* - gen za DARPP-32, *Prkar2a* - gen za podjedinicu protein kinaze A (PKA) i *Ppp1r1c* - gen za inhibicijsku podjedinicu protein fosfataze 1 (PP1).

##### 4.6.2.1. *Prkar2a*

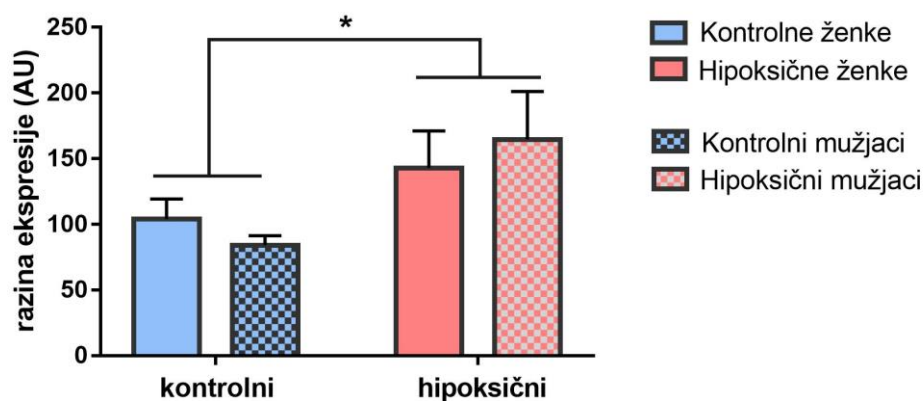
Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $88,57 \pm 5,9$  AU k. vs  $109,12 \pm 5,7$  AU h.;  $F=6,17$ ;  $p=0,019$ ), dok spol ( $p=0,852$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,876$ ) nisu imali značajan utjecaj na ekspresiju *Prkar2a* u talamusu.



**Slika 31.** Relativna ekspresija *Prkar2a* u talamusu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance

##### 4.6.2.2. *Ppp1r1b*

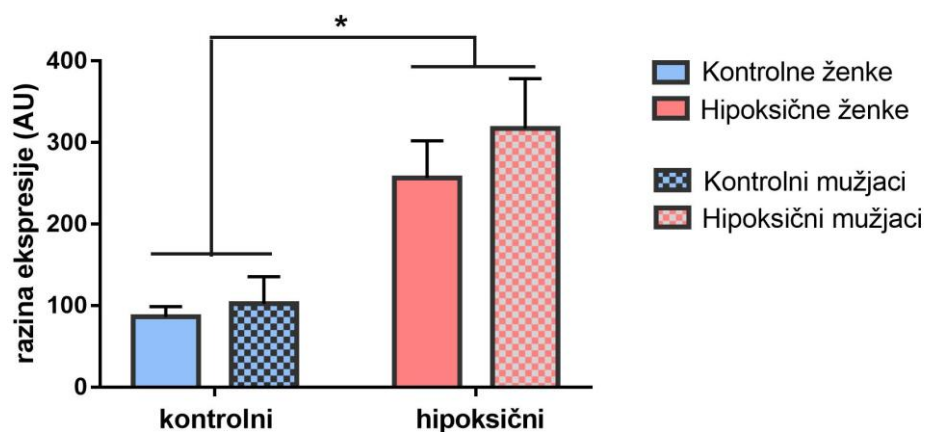
Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $94,00 \pm 18,2$  AU k. vs  $153,87 \pm 17,6$  AU h.;  $F=5,56$ ;  $p=0,026$ ), dok spol ( $p=0,973$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,418$ ) nisu imali značajan utjecaj na ekspresiju *Ppp1r1b* u talamusu.



**Slika 32.** Relativna ekspresija *Ppp1r1b* u talamusu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška (M±SEM). \* $p < 0,05$ , dvosmjerna analiza varijance

#### 4.6.2.3. *Ppp1r1c*

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $94,20 \pm 31,0$  AU k. vs  $286,94 \pm 29,9$  AU h.;  $F=20,01$ ;  $p=0,0001$ ), dok spol ( $p=0,382$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,612$ ) nisu imali značajan utjecaj na ekspresiju *Ppp1r1c* u talamusu.



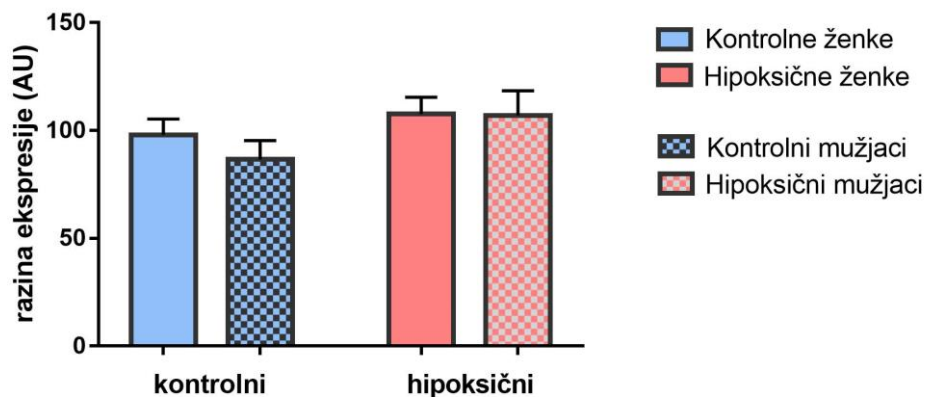
**Slika 33.** Relativna ekspresija *Ppp1r1c* u talamusu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška (M±SEM). \* $p < 0,001$ , dvosmjerna analiza varijance

### 4.6.3. Somatosenzorički korteks

RNA-Seq je pokazao promjenu ekspresije velikog broja gena koji kodiraju za receptore ekscitacijskih i inhibicijskih neurotransmitora. Mi smo odabrali 4, za koje je u literaturi pokazano da sudjeluju u somatosenzoričkom procesiranju: *Gria2* - gen za podjedinicu 2 AMPA receptora, *Grin2a* - gen za podjedinicu 2a NMDA receptora, *Gabrb2* - gen za podjedinicu  $\beta 2$  GABA<sub>A</sub> receptora i *Grm5* - gen za metabotropni glutamatni receptor 5 (Lo i sur., 2013., Barnes i sur., 2015., Fernandez-Montoya i sur., 2018.).

#### 4.6.3.1. *Gria2*

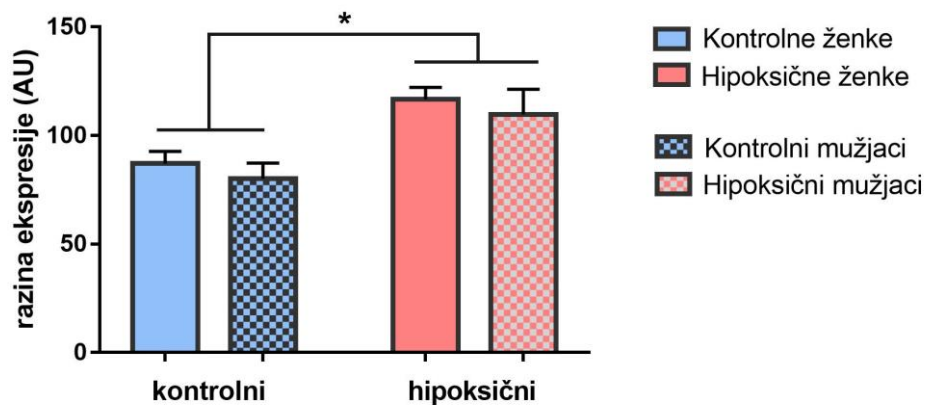
Dvosmjerna analiza varijance nije pokazala značajan utjecaj spola ( $p=0,571$ ), tretmana ( $p=0,529$ ) niti interakcije spola i tretmana ( $p=0,112$ ) na ekspresiju *Gria2* u somatosenzoričkom korteksu.



**Slika 34.** Relativna ekspresija *Gria2* u somatosenzoričkom korteksu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (7 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ).

#### 4.6.3.2. *Grin2a*

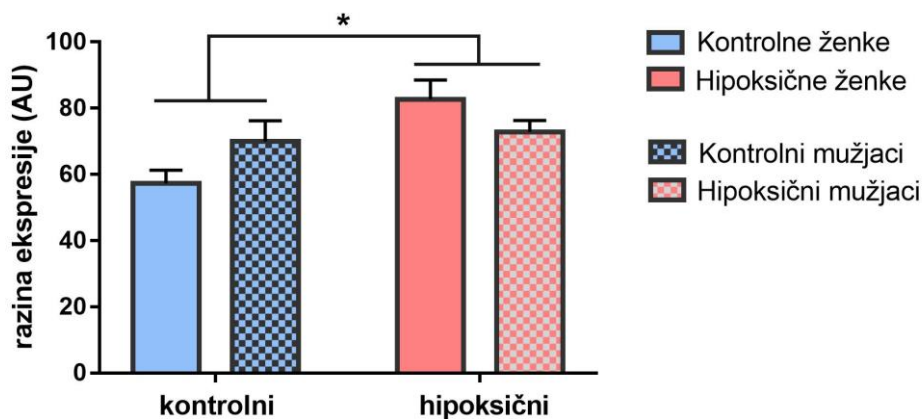
Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $83,62 \pm 5,8$  AU k. vs  $113,24 \pm 5,8$  AU h.;  $F=13,04$ ;  $p=0,001$ ) na ekspresiju *Grin2a* u somatosenzoričkom korteksu, dok spol ( $p=0,405$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,998$ ) nisu imali značajan utjecaj.



**Slika 35.** Relativna ekspresija *Grin2a* u somatosenzoričkom korteksu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (7 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,01$ , dvosmjerna analiza varijance

#### 4.6.3.3. *Grm5*

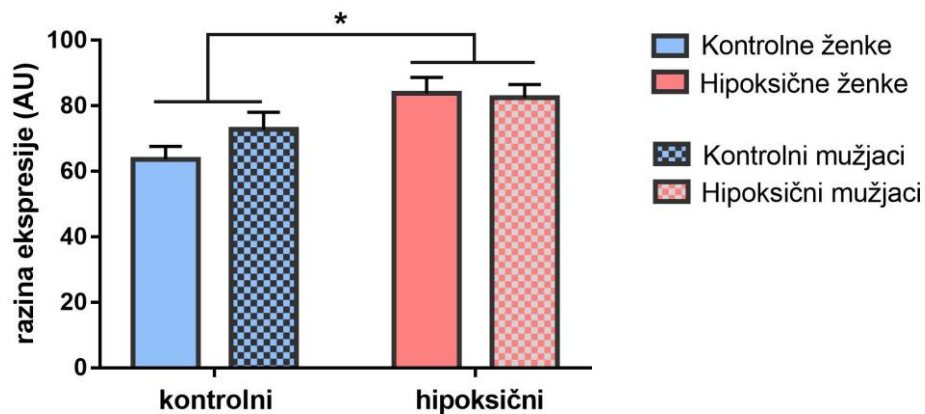
Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $63,63 \pm 3,6$  AU k. vs  $77,81 \pm 3,6$  AU h.;  $F=7,76$ ;  $p=0,010$ ) i interakcije spola i tretmana ( $F=4,87$ ;  $p=0,036$ ) na ekspresiju *Grm5* u somatosenzoričkom korteksu, dok spol ( $p=0,780$ ) nije imao značajan utjecaj.



**Slika 36.** Relativna ekspresija *Grm5* u somatosenzoričkom korteksu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (7 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,01$ , dvosmjerna analiza varijance

#### 4.6.3.4. *Gabrb2*

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $68,28 \pm 3,3$  AU k. vs  $83,09 \pm 3,3$  AU h.;  $F=9,91$ ;  $p=0,004$ ) na ekspresiju *Gabrb2* u somatosenzoričkom korteksu, dok spol ( $p=0,418$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,279$ ) nisu imali značajan utjecaj.



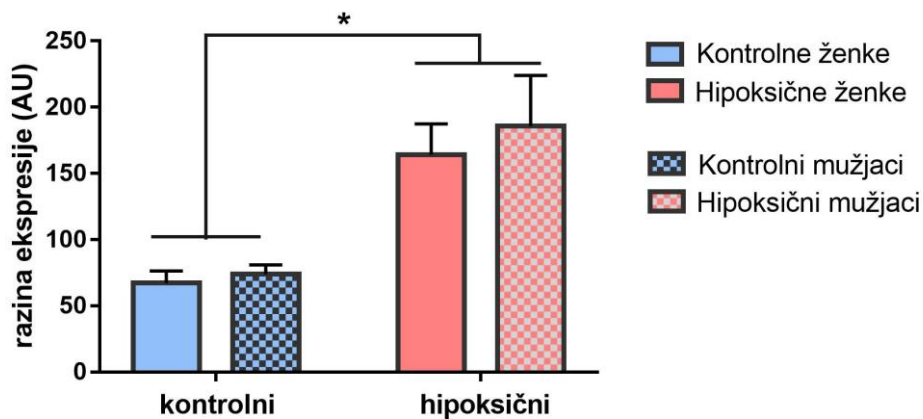
**Slika 37.** Relativna ekspresija *Gabrb2* u somatosenzoričkom korteksu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (7 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,01$ , dvosmjerna analiza varijance

#### 4.6.4. Hipokampus

Kako nismo uočili razliku u ekspresiji dopaminskih receptora u hipokampusu, pretpostavljamo da povišena razina dopamina u moždanom deblu nije imala značajniji utjecaj na ovo tkivo. Međutim, u popisu diferencijalno eksprimiranih gena uočili smo gen za vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), koji u SŽS-u djeluje kao neuropeptidni neurotransmitor i ima ulogu u učenju motiviranom nagradom.

##### 4.6.4.1. VIP

Dvosmjerna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj tretmana ( $70,55 \pm 17,2$  AU k. vs  $174,94 \pm 16,6$  AU h.;  $F=18,99$ ;  $p=0,0002$ ), dok spol ( $p=0,561$ ) i interakcija spola i tretmana ( $p=0,756$ ) nisu imali značajan utjecaj na ekspresiju gena *VIP* u hipokampusu.



**Slika 38.** Relativna ekspresija gena *VIP* u hipokampusu kontrolnih (8 ž, 7 m) i hipoksičnih (8 ž, 8 m) štakora. Rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,001$ , dvosmjerna analiza varijance



## 5. RASPRAVA

Posljedice blage prenatalne hipoksije mogu doprinijeti kasnijem razvoju neuroloških i neuropsihijatrijskih poremećaja, no često se ne uočavaju pri rođenju, nego tek u adolescenciji u vidu poremećaja ponašanja. Stoga je uočavanje ranih bihevioralnih promjena i rasvjetljavanje njihove molekularne podloge ključno za pravovremenu intervenciju i ublažavanje dugoročnih posljedica. Opisani model izlaganja štakora blagoj akutnoj hipoksiji u neonatalnoj dobi, pokazao je fiziološke i bihevioralne promjene u podlozi kojih stoji narušena neurokemijska homeostaza i promijenjena ekspresija brojnih gena.

### 5.1. Promjene u tjelesnoj masi

Prije samog tretmana hipoksije usporedili smo tjelesnu masu štakora iz skupine koja će biti podvrgnuta hipoksiji i skupine koja će služiti kao kontrolna i pokazali da između njih nije bilo početne razlike u masi. Međutim, hipoksične životinje imale su značajno veću tjelesnu masu u razdoblju sisanja (PND30) i u razdoblju slobodnog hranjenja (PND50) (Slika 14.). Ove razlike mogu biti rezultat veće motiviranosti za hranjenjem (intenzivniji doživljaj nagrade), promjene u regulaciji osjećaja gladi/sitosti ili promjene u razini metabolizma. Iako bez daljnjih istraživanja ne možemo zaključiti koja je od navedenih mogućnosti uzrok uočenih razlika, na prvospomenutu mogućnost ukazuje izrazito povišena razina dopamina u moždanom deblu, neurotransmitora koji posreduje osjet nagrade i motivaciju. U ostalim modelima neonatalne hipoksije ili hipoksije/ishemije u kojima se pratila masa, rezultati su većinom ukazivali na smanjenu masu hipoksičnih životinja u odnosu na kontrolu (Fan i sur., 2005., Lubics i sur., 2005.). Slotkin i sur. (1986.) su štakore soja Sprague-Dawley (S-D) izlagali akutnoj hipoksiji (7% O<sub>2</sub>, 2h) 1. i 8. postnatalnog dana te su uz redovito praćenje mase do PND30 uočili značajno smanjene vrijednosti u hipoksičnoj grupi. Slične uvjete hipoksije (8% O<sub>2</sub>, 2h) koristili su Sukhanova i sur. (2018.) na Wistar štakorima 2. postnatalnog dana, ali su u njihovom slučaju samo ženke imale nižu tjelesnu masu (mjereno do PND18), dok se mužjaci nisu značajno razlikovali od kontrole. Također, u slučaju izlaganja neonatalnih štakora kroničnoj hipoksiji (12% O<sub>2</sub>, 7 dana) pokazana je značajno smanjena masa hipoksične grupe koja je ostala prisutna čak i pet tjedana nakon povratka u normoksične uvjete (Raff i sur., 2000.). Povećanje mase primijetili su jedino Vargas i sur. (2017.) i to kod odraslih hipoksičnih mužjaka nakon izlaganja kroničnoj prenatalnoj hipoksiji (od 15. do 19. gestacijskog dana). Do povećanja mase je došlo zbog povećanog unosa hrane od 4. do 7. postnatalnog tjedna. Diskrepancija u rezultatima može biti posljedica korištenja različitih sojeva, uvjeta hipoksije i dana izlaganja hipoksiji.

## 5.2. Promjene u ponašanju

Istraživanje novog prostora u sebi sadrži tri komponente: lokomotornu aktivnost, eksploratornu aktivnost i anksioznost u vidu tigmotaksije. Testom u otvorenom polju testirali smo spontanu lokomotornu aktivnost (horizontalno gibanje) te propinjanje, koje u sebi sadrži aspekte spontane lokomotorne aktivnosti (vertikalno gibanje) i eksploratornog ponašanja, koje pak uključuje somatosenzoričku spoznaju prostora, prostorno pamćenje i pozornost (eng. *vigilance*). Eksploratorno ponašanje i razinu anksioznosti provjerili smo i testom na ploči s rupama. Propinjanje (eng. *rearing*) je pokret koji podrazumijeva stajanje na stražnjim nogama, uz podizanje prednjih udova s tla, a obično traje samo nekoliko sekundi. Klasificira se kao eksploratorno ponašanje, a smatra se da pripada fazi pretraživanja kada se životinja kreće po okolišu pokušavajući prikupiti relevantne podražaje. Pretpostavlja se da propinjanje štakora u testu otvorenog polja služi za prikupljanje informacija te percepciju i pamćenje prostora, budući da pogled s više točke daje prednost u pamćenju prostornih odnosa, što se posebno odnosi na znanje o udaljenim znakovima i granicama okoliša. Zbog toga je u nekim okolnostima propinjanje korisnije od horizontalne lokomocije u određivanju i ažuriranju prostornih informacija (Lever i sur., 2006.) U propinjanju bez oslonca, životinja može prikupljati vizualne, olfaktorne (njušenje zračnih struja od udaljenih izvora) ili auditorne informacije, dok u propinjanju uz oslanjanje na neku površinu (npr. zid arene u otvorenom polju) životinja prikuplja somatosenzoričke informacije. Ipak, postoji rasprava oko glavne motivacije koja pokreće propinjanje zato što ono može predstavljati istraživanje okoliša iz znatiželje ili pokušaj pronalaska izlaza iz arene (pokušaj bijega). Učestalost propinjanja ovisi o percepciji sigurnosti okoliša, a manje je učestalo u vrlo sigurnom/poznatom okolišu te u vrlo opasnom okolišu. Pretpostavlja se da je u tom slučaju hipokampus kontrolni centar koji inhibira ili potiče eksploratorno ponašanje i povećano propinjanje, ovisno o procjeni potrebe za stjecanjem novih informacija (Gray i McNaughton, 2003.).

Spolna razlika u razini kretanja u našem slučaju pokazana je povećanom lokomotornom aktivnosti ženki u odnosu na mužjake (Slika 15.), što je već davno utvrđeno biheviornalnim testiranjima u mladoj i odrasloj dobi sa zaključkom kako kod mužjaka brže dolazi do habituacije na novi okoliš, dok se ženke više kreću zbog potrage za partnerom (Valle, 1970., Bond i DiGiusto, 1977., Hyde i Jerussi, 1983.). Naši rezultati pokazuju da hipoksija nije utjecala na razinu spontane lokomotorne aktivnosti, kako horizontalne (Slika 15.), tako i vertikalne (pokazano kasnijim testom propinjanja u cilindru, u kojem nije bilo razlike između skupina, Slika P1.), pa pretpostavljamo da se kod povećanog propinjanja u testu otvorenog polja radi o

promjenama u eksploratornom ponašanju (Slika 16.). Promijenjeno eksploratorno ponašanje pokazuje i test na ploči s rupama i to bez značajnih promjena u razini anksioznosti, tj. tigmotaksiji (Slika 17.). Zaključujemo da je hipoksija utjecala na istraživanje novog prostora samo u aspektu eksploratornog ponašanja, u čijoj podlozi stoji poremećeno somatosenzoričko procesiranje (kasnije pokazano kao smanjeni odgovor na podraživanje brkova, tzv. *rooting refleks*, Slika P2.) i/ili otežano prostorno pamćenje (kasnije pokazano kao značajno slabiji rezultat u testu prostornog pamćenja lokacije objekta, Slika P3.).

Dosadašnja istraživanja davala su oprečne rezultate u pogledu lokomocije i eksploracije, što je i očekivano s obzirom na različite uvjete provođenja pokusa, posebice zbog razlike u starosti pokusnih štakora i duljini izlaganja hipoksiji. Većina istraživanja u kojima su se koristile neinvazivne metode temeljila su se na anoksiji, tj. izlaganju štakora uvjetima sa 0% O<sub>2</sub>. Shimomura i Ohta (1988.) su štakore soja Wistar (PND4) izlagali anoksiji 10 minuta te su u testu u otvorenom polju uočili povećano kretanje u dobi od 28 dana, bez značajne promjene u propinjanju i defekaciji. Ipak, ta se promjena nije zadržala do 56. dana starosti kada je ponovno proveden test. Dell' Anna i sur. (1991.) su također u svojem istraživanju uočili prolaznu promjenu u razini lokomocije. Oni su štakore soja Wistar (PND0) izlagali anoksičnim uvjetima 25 minuta te su testom u otvorenom polju, kojeg su provodili svakog petog dana od 5. do 60. postnatalnog dana, proučavali lokomociju, propinjanje i njuškanje životinja. Prolazno povećanje u razini lokomocije anoksičnih štakora zamijećeno je u periodu PND25 do PND40. Anoksične životinje pokazale su i značajno promijenjenu eksploraciju u vidu povećanog njuškanja (PND20-PND45) te propinjanja (PND25-PND45). Ovi podaci su u skladu s rezultatima Speisera i sur. (1991.) koji su pokazali da kod njuškanja i propinjanja dolazi do većih promjena nego u slučaju lokomocije nakon neonatalne anoksije, a zaključak Dell' Anne i sur. (1991.) da neonatalna anoksija više utječe na eksploratorne nego lokomotorne mehanizme kao što smo i mi pokazali. Bihevioralno ispitivanje posljedica anoksije proveli su i Rogalska i sur. (2004.), s razlikom da su njihovi štakori prilikom izlaganja bili stari 2 dana, a prolazno razdoblje hiperaktivnosti zamijećeno je u razdoblju PND5 do PND30. Istraživanje najbližnje našem proveli su Ordyan i sur. (2017.) koji su štakore soja Wistar (PND2) izlagali hipoksičnim uvjetima sa 7,6–7,8% O<sub>2</sub> tijekom jednog sata, pri temperaturi 21,3–23°C. Lokomotornu aktivnost i anksioznost ispitivali su testom u otvorenom polju svakodnevno u periodu od PND16 do PND19. Povećanu lokomotornu aktivnost i povećanu eksploratornu aktivnost u obliku propinjanja zamijetili su tijekom PND17 i PND19 u hipoksičnih štakora u odnosu na kontrolu, dok kod anksioznosti nije bilo značajnih razlika među skupinama. U slučaju invazivne

hipoksijsko-ishemijske ozljede koje su proveli na štakorima soja Sprague Dawley (PND7) izlagajući ih 2h 8% O<sub>2</sub> nakon ligacije karotide, Arteaga i sur. (2015.) nisu zamijetili značajne dugotrajne motoričke promjene niti promjene u anksioznosti, dok su u slučaju testa na ploči s rupama uočili značajno povećanje frekvencije posjećivanja rupa (eng. *head-dipping*). U slučajevima 19-tominutne perinatalne asfiksije nakon okota carskim rezom u biheavioralnom testiranju u mladoj dobi (PND30) općenita lokomocija nije bila promijenjena, a propinjanje je bilo smanjeno, dok su u odrasloj dobi (PND90) bili smanjeni i lokomocija i propinjanje sa zaključkom da štakori pokazuju manje motivacije za istraživanje novog prostora. Povećano njegovanje (eng. *grooming*) istraživači su protumačili kao povećanu razinu anksioznosti, iako u testu povišenog plus labirinta (eng. *elevated plus maze*) nije bilo razlike u posjećivanju otvorenog kraka labirinta kao pokazatelja promjene u razini anksioznosti, a u testu otvorenog polja nije postojala razlika u tigmotaksiji (Herrera i sur., 2018., Galeano i sur., 2011.).

U testu socijalnog ponašanja promatrali smo razinu anksioznosti, istraživanje novog objekta i socijabilnost (Slika 18.) i niti jedna od tih komponenti nije bila promijenjena izlaganjem hipoksiji u našim uvjetima. Literaturni podaci govore da su određeni aspekti socijalnog ponašanja pokazali podložnost promjeni u slučajevima akutne neonatalne anoksije. Izlaganje Wistar štakora anoksiji 30 minuta prvog postnatalnog dana rezultiralo je smanjenim vremenom poticanja na igru i njegovanja drugih štakora (PND15), što ukazuje na smanjenu potrebu za fizičkim kontaktom. Kod anoksičnih mužjaka je zamijećeno povećano vrijeme u proučavanju objekta te smanjena habituacija na objekt, za razliku od kontrole (Laviola i sur., 2004.). Nakazawa i Tang (2006.) su i kod odraslih štakora (PND100) primijetili dugoročne promjene u socijabilnosti u obliku povećane agresivnosti. I u slučaju perinatalne asfiksije pokazano je smanjeno vrijeme poticanja na igru u dobi PND30, iako ponašanje u igri, ukupni kontakti i istraživanje drugog štakora nisu pokazali značajne razlike među skupinama (Vázquez-Borsetti i sur., 2019.). Istraživanja na invazivnim hipoksijsko-ishemijskim modelima također su pokazala promjene u socijabilnosti. Driscoll i sur. (2018.) su tek rođene S-D štakore izložili hipoksiji-ishemiji s 10% O<sub>2</sub> tijekom 3 minute te ih u dobi PND30 testirali u testu društvenog izbjegavanja u kojem su mjerili latenciju približavanja meti, broj ulazaka u zonu interakcije i vrijeme u zoni interakcije. HI skupina provela je značajno manje vremena u zoni interakcije ako je bio prisutan drugi štakor (meta), te je imala veću latenciju ulaska u zonu interakcije. U slučaju klasične HI (PND7) tretirani štakori nisu pokazivali preferenciju prema odjeljku s konspecifičnim štakorom u odnosu na prazni odjeljak, za razliku od kontrolnih štakora u dobi PND28 (Ji i sur., 2015.). Niti sama 60-tominutna ishemija na Wistar štakorima (PND12) nije

izazvala promjene u društvenom ponašanju u dobi PND22 (frekvencija, trajanje i latencija u kontaktu, igri, njegovanju) (Tejkalová i sur., 2007.). Moguće je da su hipoksijski uvjeti u našem istraživanju bili preblagi za izazivanje mjerljivih promjena u socijalnosti.

Već u samom početku istraživanja neonatalne hipoksije ispitivala se paradigma o njenom djelovanju na kognitivne procese i učenje. Tako su Young i sur. (1986.) testirali sposobnost učenja S-D štakora izloženih neonatalnoj HI (PND7, 8% O<sub>2</sub>, 4h) u Morrisovom vodenom labirintu (eng. *Morris water maze*) i testu izbjegavanja šoka (eng. *shock avoidance task*) u dobi PND30. U Morrisovom labirintu hipoksičnim životinjama trebalo je dvostruko duže vrijeme za svladavanje zadatka, ali su u testu izbjegavanja šoka pokazale značajno brže učenje u odnosu na kontrole pa su istraživači zaključili da HI ozljeda smanjuje vrsno-specifični „refleks smrzavanja“ koji karakteriziraju grčenje i nepokretljivost u trenucima stresa. Sličan pokus proveli su Balduini i sur. (2000.) kada su štakore izložene neonatalnoj hipoksiji (PND7, 8%O<sub>2</sub>, 3h) testirali u T labirintu (PND40), Morrisovom vodenom labirintu (PND50) i testu pasivnog izbjegavanja (PND70). Hipoksični štakori imali su značajno poremećeno učenje u T labirintu i Morrisovom vodenom labirintu, dok u testu pasivnog izbjegavanja nije bilo razlike od kontrolne skupine što sugerira da je radna memorija, ali ne i retencija, osjetljiva na neonatalno ishemijsko oštećenje. Yao i sur. potvrdili su deficite u memoriji HI štakora i pri kraćoj dvosatnoj hipoksiji. Pri izazivanju HI ozljede u mlađoj dobi (PND3, 6% O<sub>2</sub>, 2,5h) također su uočeni deficiti u prostornoj kognitivnoj funkciji u Morrisovom vodenom labirintu u dobi PND42 (Huang i sur., 2009.). Takada i sur. (2015.) su kod Wistar štakora izloženih neonatalnoj anoksiji (PND1, 25 min) uočili značajnu promjenu u prostornom pamćenju u dobi PND60, u vidu povećane latencije i duljine puta pri pronalasku platforme u Morrisovom vodenom labirintu. Neinvazivni model koristili su Raveendran i Skaria (2013.) kada su štakore soja Wistar (PND4) izlagali neonatalnoj hipoksiji (2,6% O<sub>2</sub>, 30 min) te ih testirali u Morrisovom vodenom labirintu u dobi PND30. Hipoksični štakori pokazali su povećanu latenciju bijega i smanjeno vrijeme provedeno u području platforme što je dokazalo poremećeno prostorno pamćenje. Rezultati prostornog učenja u T labirintu dobiveni u našem istraživanju su bili donekle začuđujući s obzirom na značajno veći prosječni broj točnih odabira kod hipoksičnih mužjaka u odnosu na kontrolne (Slika 19.). Međutim, pogled na krivulju učenja otkriva znatno uspješniji broj točnih odabira kod hipoksične skupine u prva dva dana testiranja, dok se daljnja dinamika učenja uopće ne razlikuje između skupina.

Pretpostavljamo da kod hipoksičnih životinja postoji pojačana motivacija za nagradom, koja na neki način kompenzira mogući nedostatak u prostornom učenju. Tome u prilog govore 2

pokazatelja: 1) značajno manji gubitak tjelesne mase hipoksičnih mužjaka u odnosu na kontrolne mužjake tijekom testiranja kad je pristup hrani bio ograničen, koji ukazuje na veću motiviranost za hranjenje (Slika 21.) i 2) slabiji rezultat u naknadno provedenom testu pamćenja lokacije objekta (eng. *object location memory test*, Slika P3.) koji nije uključivao motivaciju nagradom.

### 5.3. Promjene u homeostazi dopamina

Kako bismo provjerili što je u podlozi opaženih promjena u eksploratornom ponašanju i prostornom učenju, odredili smo razinu katekolamina u moždanom deblu: dopamina koji je vezan uz motivaciju i noradrenalina koji je vezan uz pozornost. Kako se razina anksioznosti i socijalnosti nisu razlikovale, serotonin, koji prvenstveno stoji u podlozi ovih aspekata ponašanja, nismo razmatrali. Dok se koncentracije noradrenalina nisu razlikovale (Slika 24.), hipoksične životinje su imale 3x veću koncentraciju dopamina od kontrolnih (Slika 23.), što ukazuje da bi akutno izlaganje hipoksiji moglo dovesti do dugotrajnog poremećaja u homeostazi dopamina.

Siedler i Slotkin (1990.) su ispitivali dugoročni učinak neonatalne hipoksije (7% O<sub>2</sub>, 2h) na katekolaminski sustav u području srednjeg mozga i moždanog debla, korteksa i malog mozga S-D štakora. Prilikom izlaganja hipoksiji životinje su bile dobi PND1, a od PND7 do PND42 ispitivala se koncentracija dopamina i noradrenalina te razina njihovog metabolizma (eng. *turnover*). Hipoksija je uzrokovala dugoročno povećan sadržaj i metabolizam dopamina u području srednjeg mozga i moždanog debla, dok je za noradrenergički sustav bilo značajno samo povećanje metabolizma noradrenalina u istoj regiji. U drugim regijama nije bilo promjene u sadržaju i metabolizmu katekolamina što ukazuje na selektivno djelovanje hipoksije zbog regionalnih metaboličkih razlika. Povećana razina dopamina pokazana istraživanjem Siedlera i Slotkina (1990.) u skladu je s našim rezultatima, a ide i u prilog istraživanju Thiela i sur. (1999.) koji su pokazali povećanu razinu dopamina u Wistar štakora s povećanom tendencijom propinjanja (eng. *higher rearing activity*, HRA). Kao nastavak karakterizacije HRA štakora Pawlak i Schwarting (2002.) proveli su test novog objekta (eng. *novel object test*) kojim su pokazali povećanu eksploraciju novog objekta i drugačije procesiranje noviteta od štakora s niskom tendencijom propinjanja, što je također poveznica s našim nalazima koji upućuju na moguću povezanost povećane razine dopamina uz povećano propinjanje i eksploraciju. U modelu neonatalne asfiksije Chen i sur. (1995.) objavili su značajno povećanje broja

dopaminergičkih neurona, mjereno imunohistokemijski putem povećane koncentracije tirozin hidrosilaze, u supstanciji nigri i ventralnom tegmentalnom području štakora starih 4 tjedna. Hedner i sur. (1979.) proveli su istraživanje učinka neonatalne anoksije (PND1, 0% O<sub>2</sub>, 20 min) i neonatalne hipoksije (PND1, 6% O<sub>2</sub>, 4,5h) na razinu dopamina, noradrenalina i njihovih prekursora u sveukupnom mozgu S-D štakora u dobi PND28. Iako neonatalna anoksija i hipoksija nisu utjecale na razinu neurotransmitora, hipoksija je imala značajan utjecaj na smanjenu aktivnost enzima tirozin-hidrosilaze u hipoksičnoj skupini koja je pokazatelj funkcionalne zrelosti katekolaminskog puta. Učinak neonatalne anoksije (PND2, 0% O<sub>2</sub>, 25 min) na koncentraciju dopamina i njegovih metabolita u korteksu, hipokampusu, strijatumu i malom mozgu Wistar štakora u dobi PND7-PND60 proučavali su i Dell'Anna i sur. (1993.) te su dokazali promjenu u metabolizmu dopamina. Iako koncentracija dopamina nije bila značajno promijenjena niti u jednoj regiji, razine njegovih metabolita bile su promijenjene u korteksu i strijatumu.

Osim izvještaja o povećanim razinama dopamina ili njegovog metabolizma, postoje i suprotni nalazi koji su vjerojatno rezultat starije dobi u kojoj je hipoksija izazvana. Jedan od takvih primjera je istraživanje Hadjiconstantinoua i sur. (1990.) koji su u slučaju neonatalne HI ozljede dokazali smanjenu razinu dopamina u području frontalnog korteksa i hipokampusu u štakora starih 3 tjedna.

Budući da je dopaminergički sustav uključen u patofiziologiju shizofrenije i poremećaja pažnje, za koje se smatra da imaju svoj začetak već u prenatalnom razvoju mozga, njegove potencijalne promjene proučavane su i na *post-mortem* humanim uzorcima pre/perinatalne hipoksije. Pokazano je kako perinatalna hipoksija, ovisno o svojoj jačini i trajanju, različito utječe na stanične i molekularne mehanizme. U slučaju akutne ozljede, pokazana je povećana razina tirozin hidrosilaze u području SN i VTA, a zanimljivo je kako su slični nalazi uz povećanu *in vivo* sintezu dopamina zabilježeni i u pacijenata sa shizofrenijom (Howes i sur., 2013.). U novorođenčadi s produljenom hipoksijom u području SN i VTA uočeno je smanjenje razine tirozin hidrosilaze (Pagida i sur., 2013.). Ovi nalazi upućuju na dopaminsku disfunkciju kao jednu od posljedica perinatalne hipoksije, što u slučaju preživljenja u kasnijoj životnoj dobi može biti preduvjet za razvoj neuroloških i psihijatrijskih poremećaja povezanih s dopaminom (Giannopoulou i sur., 2018.).

Nakon dobivenih rezultata o promijenjenoj razini dopamina u moždanom deblu, provjerili smo i dovodi li njezino povišenje do promjene u dopaminskoj transmisiji u ciljnim regijama uključenima u modulaciju somatosenzoričkog procesiranja (talamus-somatosenzorički korteks)

i prostornog učenja (hipokampus) mjerenjem razine ekspresije *Drd1* i *Drd2* u navedenim regijama. Povećana ekspresija *Drd1* i *Drd2* opažena je u talamusu (Slika 25., Slika 26.), a povećana ekspresija *Drd1* u somatosenzoričkom korteksu hipoksičnih životinja (Slika 27.), što ukazuje na činjenicu da bi povišena koncentracija dopamina u moždanom deblu mogla barem djelomično stajati u podlozi opaženih promjena u ponašanju uzrokovanih hipoksijom. Ekspresija *Drd1* i *Drd2* u hipokampusu hipoksičnih životinja nije bila promijenjena (Slika 29., Slika 30.), što upućuje na to da je hipoksija djelovala na hipokampus putem mehanizama neovisnih o dopaminu.

U dosadašnjim istraživanjima na štakorskim modelima, razina dopaminskih receptora ispitivala se većinom na proteinskoj razini autoradiografijom i metodom *Western blot* u regiji bazalnih ganglija budući da je naglasak bio na istraživanju modela motoričkih poremećaja kao jednog od glavnih obilježja cerebralne paralize. Tako su Filloux i sur. (1996.) nakon izazivanja invazivne HI ozljede (PND7) opazili trajno smanjenje DRD2 u području kaudatne jezgre i putamena u dobi PND80. Zouakia i sur. (1997.) su pak na području strijatuma uočili samo prolaznu promjenu u razini DRD2 koja je bila smanjena u dobi PND21, ali se vratila na normalnu razinu u dobi PND70. U oba istraživanja nije uočena dugoročna promjena u razini DRD1. El-Khodor i Booksa (2001.) u svom istraživanju perinatalne asfiksije (carski rez + anoksija) nisu potvrdili nikakvu promjenu u razini dopaminskih receptora u štakora starih 4 mjeseca u području strijatuma i olfaktornih tuberkula. Razinu DRD1 i DRD2 u prefrontalnom korteksu štakora izloženih neonatalnoj HI (PND7) ispitali su Miguel i sur. (2019.). U dobi PND40 *Western blot* analizom utvrđena je smanjena razina DRD2. U našem istraživanju nismo uočili smanjenje mRNA ekspresije *Drd2*, ali ove podatke svakako ne možemo izravno uspoređivati jer se radi o različitoj dobi izazivanja hipoksije, različitoj razini provjere ekspresije *Drd2* i različitoj regiji korteksa.

Malo je istraživanja koja su pokušala povezati ekspresiju dopaminskih receptora i perinatalnu hipoksiju u ljudi. Na *post-mortem* uzorcima mozga terminski rođene djece koja su umrla od posljedice HIE pronađena je smanjena razina DRD2 u korteksu i bazalnim ganglijima, dok se razina DRD1 nije značajno razlikovala (Kaewsuk i sur., 2009.). U istraživanju koje je provedeno na *post-mortem* uzorcima nedonoščadi, također je dokazana smanjena razina DRD2 u bazalnim ganglijima (Meng i sur., 1998.). U istraživanju provedenom na devetogodišnjacima koji su bili izloženi hipoksiji u pre/perinatalnom periodu pokazana je specifična uloga polimorfizma *DRD2* na donošenje odluka i eksternalizirane simptome. Kod djece nosioca A1 alela pokazano je povećano eksternalizirano ponašanje (nedovoljna kontrola, impulzivnost,



hiperaktivnost, nepažnja, agresivnost), dok je kod djece homozigota, za A2 alel bila smanjena spremnost za potraživanjem nagrade u uvjetima maksimalne neizvjesnosti. Ovakvi rezultati upućuju na važan utjecaj hipoksije na neuralni razvoj kroz različite biološke putove ovisno o genotipu *DRD2* te daju uvid u razvoj individualnih razlika u ponašanju i donošenju odluka (White i sur., 2019.).

Naši se rezultati ne poklapaju sa dosadašnjim predominantnim rezultatima snižene ekspresije dopaminskih receptora, što može biti posljedica regionalne specifičnosti ekspresije receptora ili se, s druge strane, može raditi i o povećanom broju neurona u ispitivanim regijama, bez promjene razine ekspresije u pojedinom neuronu, što bi također rezultiralo povećanom količinom mRNA za dopaminske receptore u hipoksičnih u odnosu na kontrolne životinje. Zbog toga bi u budućnosti trebali provjeriti eventualne anatomske i histološke strukturne promjene, kao i ekspresiju receptora na razini proteina u talamusu i somatosenzoričkom korteksu.

## **5.4. Promjene u ekspresiji gena u ciljnim regijama**

### **5.4.1. Talamus i dopaminergičke projekcije iz moždanog debla**

Talamus je regija koja provodi sve senzoričke informacije (osim mirisa) od periferije do korteksa i hipokampusa, u koje pruža svoje ekscitacijske glutamatergičke projekcije. Ima vrlo značajnu ulogu u filtriranju i organiziranju senzoričkih informacija, a talamokortikalni krugovi važni su u održavanju funkcionalne interakcije između različitih kortikalnih područja (Halassa i Kastner, 2017.). Provođenje informacija kroz talamus podložno je modulaciji ovisno o bihevioralnim zahtjevima, a jedan od važnih talamičkih modulatora je i dopamin (Sánchez-González i sur., 2005.). Poremećena dopaminska modulacija talamusa primijećena je i u slučajevima shizofrenije, bolesti koju obilježava poremećeno senzoričko procesiranje na temelju čega su Lisman i sur. (2010.) stvorili teoriju kako je aktivnost talamusa kritična za stvaranje poremećenih oscilacija delta valova u korteksu (Moghaddam, 2010.).

S obzirom da talamus prima dopaminergičke projekcije iz moždanog debla te da je u tkivu talamusa uočena promijenjena ekspresija oba dopaminska receptora, pretpostavljamo da u podlozi talamičkih promjena stoji promijenjena dopaminska transmisija. Zato smo metodom qPCR analizirali ekspresiju gena za proteine nizvodno od vezanja dopamina za receptor –

*Prkar2a* (za podjedinicu PKA), *Ppp1r1b* (za DARPP-32) i *Ppp1r1c* (za IPP5) – i potvrdili njihovu pojačanu ekspresiju (Slika 31., Slika 32., Slika 33.).

Regulatorna podjedinica 1B protein fosfataze 1 (*Ppp1r1b*) ili DARPP-32 ima ključnu ulogu u integraciji učinaka dopamina i drugih neurotransmitera na podražljivost neurona. Većina istraživanja DARPP-32 temelji se na srednjim bodljikavim neuronima strijatuma (eng. *medium spiny neurons*, MSN) koji se dijele na D1-tip i D2-tip, ovisno o prisutnosti D1 i D2 dopaminskih receptora. Kod oba tipa DARPP-32 je pronađen u somi, dendritima i aksonskim završecima, a dokazano je i njegovo djelovanje u signalnom putu nakon aktivacije dopaminskih receptora (Greengard i sur., 1998.). Djelovanje dopamina na DRD1 potiče fosforiliranje DARPP32 koji tada promiče fosforilaciju i stanje aktivnosti različitih ionskih kanala, uključujući i Na<sup>+</sup> i Ca<sup>+</sup> kanale, NMDA-R1 glutamatnog receptora i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazne ionske pumpe (Greengard i sur., 1998., Hu i sur., 2006.). Djelovanje dopamina na D2 receptor i glutamata na NMDA receptor ima obrnuti učinak na stanje fosforilacije DARPP-32 djelujući na stimulaciju kalcineurina (PP-2B), fosfataze koja defosforilira Thr34 i time inhibira PKA/DARPP-32 signalizaciju (Nishi i Shuto, 2017.). Na takav način DARPP-32 omogućuje koordiniranu kontrolu stanja fosforilacije različitih fizioloških efektoru i regulaciju funkcionalnog stanja neurona (Greengard i sur., 1998.). Osim na ionske kanale i receptore, DARPP-32 može imati utjecaj i na transkripciju gena jer djeluje na PP1 u jezgri i utječe na signalne putove uključene u regulaciju kromatina, poput fosforilacije histona H3 na Ser10 (Stipanovich i sur., 2008., Yger i Girault, 2011.). Također je pokazano kako DARPP-32 međudjeluje s tra2-beta1 čimbenikom koji ima ulogu u regulaciji alternativnog prekrajanja, što sugerira i moguću ulogu DARPP-32 u tom procesu (Benderska i sur., 2010.). Sve navedeno utječe na dugoročne promjene u sinaptičkoj plastičnosti i u konačnici i na kontrolu ponašanja (Walaas i sur., 2011.). Zbog svoje uloge u integraciji dopaminergičkih, serotonergičkih i glutamatergičkih signala u neuronima koji primaju dopaminsku signalizaciju, DARPP-32 predstavlja važan čimbenik koji može utjecati na patofiziologiju neuropsihijatrijskih poremećaja (Walaas i sur., 2011.). Dosadašnji rezultati istraživanja na animalnim modelima i humanim uzorcima *post-mortem* govore u prilog tome da promjene DARPP-32, bilo da se radi o promjeni ekspresije mRNA, promjeni razine proteina ili pak promjeni stanja fosforilacije, pridonose disregulaciji dopamina u neuropsihijatrijskim poremećajima te mogu biti podloga bihevioralnim abnormalnostima (Nishi i Shuto, 2017.).

Inhibitor 5 protein fosfataze 1 (IPP5 / 1C regulatorna podjedinica protein fosfataze 1, *Ppp1r1c*) jedna je od nekoliko inhibicijskih podjedinica protein fosfataze 1 (PP1), a s DARPP-32 dijeli konzerviranu regiju od 50 aminokiselinskih ostataka. PP1 pripada skupini serin/treonin

fosfataza koje uklanjaju fosfatnu skupinu sa serinskih i treoninskih ostataka proteina uključenih u različite neuronske procese, poput kontrole genske ekspresije, prekrajanja mRNA, sinteze proteina, regulacije membranskih receptora i kanala, napredovanja staničnog ciklusa i apoptoze (Yger i Girault, 2011., Munton i sur., 2004.). Svaka PP1 sadrži katalitičku i bar jednu od regulatornih podjedinica koje imaju ulogu u staničnoj kompartmentalizaciji, specifičnosti za supstrat i finom podešavanju aktivnosti fosfataze (Virshup i Shenolikar, 2009.). Regulatorna podjedinica često se koristi kao širi pojam koji obuhvaća podjedinice koje imaju ulogu regulatora koji utječe na specifične interakcije proteina i na taj način sužava odabir supstrata te inhibicijske podjedinice koje inhibiraju aktivnost PP1, poput inhibitora-2, DARPP-32 i PHI-1 (Virshup i Shenolikar, 2009., Eto i sur., 1991.). U početku je IPP5 bio istraživan *in vitro* kao potencijalni induktor apoptoze i inhibitor rasta humanih tumorskih stanica, a kasnije je proučavana i njegova uloga u primarnim senzoričkim neuronima te je dokazano kako IPP5 inhibira rast neurita u ganglijskim stanicama dorzalnog korijena putem inhibicije PP1 i održavanja TGF- $\beta$ /Smad signalnog puta (Zeng i sur., 2009., Zeng i sur., 2012., Han i sur., 2013.). Ipak, njegova specifična uloga u drugim moždanim regijama zasada još nije razjašnjena.

Protein kinaza A (PKA) je kinaza ovisna o razinama cikličkog adenozin monofosfata (cAMP). Kao neaktivni holoenzim sastoji se od dvije regulatorne i dvije katalitičke podjedinice. Katalitičke podjedinice mogu biti kodirane s tri gena (*Prkaca*, *Prkacb*, *Prkacg*) i njihova glavna uloga nakon aktivacije enzima je fosforilacija serinskih i treoninskih ostataka različitih supstrata, čime mijenjaju njihovu aktivnost. Regulatorne podjedinice PKA mogu se podijeliti na RI (*Prkar1a*, *Prkar1b*) i RII (*Prkar2a*, *Prkar2b*) tip prema unutarstaničnoj lokalizaciji enzima (Massa i sur., 1991., Taylor i sur., 2005.). Tip RI se nalazi slobodan u citosolu, dok se regulatorne podjedinice tipa II vežu za usidravajuće proteine u staničnoj, jezgrinoj i mitohondrijskoj vanjskoj membrani, te za mikrotubule. cAMP-ovisna regulatorna podjedinica protein-kinaze tipa II-alfa (*Prkar2a*, RII $\alpha$ ) ubikvitarno je eksprimirana i ima ulogu u usmjeravanju PKA prema različitim staničnim odjeljcima putem povezivanja s proteinima sidrenja A kinaze (AKAP) čime se omogućuje prostorna i vremenska regulacija PKA, smještanjem u blizinu aktivirajućih elemenata poput G proteina i transmembranskih receptora, te pojedinih supstrata kao što su ionski kanali, komponente citoskeleta i citoplazmatski enzimi (Tasken i sur., 1998.). Specifično usidrenje RII $\alpha$  pokazano je kao neophodno za cAMP-ovisnu modulaciju nekih ionskih kanala, poput AMPA i kainatnih kanala u hipokampusu te kalcijevih kanala u skeletnim mišićima (Rosenmund i sur., 1994., Johnson i sur., 1994.).

Budući da dopaminski receptori ostvaruju svoje djelovanje preko signalizacije koja uključuje PKA, DARPP-32 i IPP5, povećana ekspresija ovih signalnih molekula ukazuje na hiperaktivnost sveukupnog dopaminskog puta. Iako Drd1 i Drd2 imaju suprotan učinak na navedeni signalizacijski put, konačni rezultat djelovanja dopamina ovisi o regionalnoj raspodjeli dopaminskih receptora u talamusu. Stoga pretpostavljamo kako u određenim dijelovima talamusa hiperdopaminergija u kombinaciji s pojačanom ekspresijom *Drd1- PKA - DARPP-32-IPP5* djeluje u smjeru inhibicije PP1 i stanja povećane fosforilacije, što može stvoriti podlogu za povećanu glutamatnu neurotransmisiju, promijenjenu aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpe i neravnotežu u talamo-kortikalnoj komunikaciji. Također, promjena u dopaminskom putu može uzrokovati i dugoročne promjene u ekspresiji različitih gena putem povećane fosforilacije transkripcijskih čimbenika (Neve i sur., 2004.).

Uz dosad navedene rezultate, u talamusu je RNA-Seq ukazao i na promjene u genima za navođenje aksona, aksonalni transport, provođenje signala i adheziju stanica, što je moglo dovesti do poremećenog razvoja talamo-kortikalnih projekcija i poremećaja u organizaciji bačvastog polja u doba razvoja somatosenzoričkog korteksa (izlaganje hipoksiji se odvijalo prije formiranja bačvi) i/ili do poremećene neurotransmisije u sinapsama između talamičkih i kortikalnih neurona, a što je moglo utjecati na senzoričko procesiranje.

#### **5.4.2. Kortikalna aktivnost i somatosenzoričko procesiranje**

Somatosenzorički korteks je regija mozga koja prima i procesira senzoričke informacije poput dodira, temperature i boli te potom koristi te informacije kako bi započeo važne pokrete kao odgovor na određenu situaciju. Za funkcioniranje somatosenzoričkog korteksa važna je ravnoteža ekscitacijskih glutamatnih i inhibicijskih GABA receptora. Elektrofiziološka istraživanja pokazala su kako je u glutamatergičkim sinapsama vrlo važan omjer NMDA i AMPA receptora jer o njemu ovisi sposobnost stanice za integraciju i procesiranje dolaznih informacija (Thomas i sur., 2001., Counotte i sur., 2014.). Promjena omjera NMDA/AMPA receptora povećava histeretička svojstva membrane, što zauzvrat drastično mijenja izlazni odgovor stanice kao odgovor na oscilatorne ulazne informacije (Wolf i sur., 2005.). Povećanje ovog omjera može igrati ulogu u promicanju jednog bihevioralnog puta u odnosu na druge, što se može povezati s bolestima poput shizofrenije i ovisnosti. Za stvaranje specifičnih oštro podešenih izlaznih informacija vrlo je važna inhibicija GABAergičkim interneuronima, koja u somatosenzoričkom korteksu djeluje nespecifično kako bi pojačala kontrast između slabih i jakih ekscitacijskih dolaznih signala. Također, aktivna inhibicija može biti neophodna za

sprječavanje epileptičke neravnoteže u aktivnosti ekscitacijskih kortikalnih krugova (McCasland i Hibbard, 1997.). Također, NMDAR, AMPAR i Grm5 koji se nalaze na postsinaptičkim neuronima 4. sloja somatosenzoričkog korteksa imaju važnu ulogu za pravilnu formaciju bačvastih polja u glodavaca, putem aktivacije Ac1-cAMP-PKA i signalnih puteva Ras-GAP-MAPK koji utječu na ekspresiju proteina odgovornih za agregaciju neurona u zidove bačvi i orijentaciju dendrita u njihovo središte. Stoga, promijenjena ekspresija ovih receptora tijekom razvoja mozga može biti uzrok anatomskih nepravilnosti u strukturi somatosenzoričkog korteksa i posljedičnoj abnormalnosti u njegovom funkcioniranju (Li i Crair, 2011.).

U korteksu je RNA-Seq ukazao na značajne promjene u genima vezanim uz komponente izvanstaničnog matriksa, aktivnosti ionskih kanala i sinaptičku transmisiju. U kontekstu somatosenzoričkog procesiranja, odabrali smo gene koji kodiraju za ključne podjedinice glutamatnih i GABA receptora. Dok značajnu promjenu u ekspresiji *Gria2* - gena za podjedinicu AMPA receptora nismo potvrdili, pokazali smo da je u korteksu hipoksičnih životinja došlo do povećanja ekspresije *Grin2A* - gena za podjedinicu NMDA receptora, *Gabrb2* - gena za podjedinicu GABA<sub>A</sub> receptora, kao i *Grm5* - gena za metabotropni glutamatni receptor (Slika 34., Slika 35., Slika 36., Slika 37.). Promjenom u genskoj ekspresiji navedenih podjedinica pretpostavljamo da je došlo do promjene u sinaptičkom sadržaju samih receptora, što je moglo utjecati na efikasnost somatosenzoričkog procesiranja.

Nažalost, u literaturi ne postoje podaci o ekspresiji gena za ionotropne glutamatne receptore kod animalnih modela hipoksije u somatosenzoričkom korteksu, nego samo u hipokampusu gdje je mahom smanjena. Chen i sur. (2007.) pokazali su kako smanjenje u proteinskoj ekspresiji NMDAR podjedinica u hipokampusu štakora izloženih hipoksiji 10. postnatalnog dana može biti povezano s dugoročno poremećenim prostornim učenjem i pamćenjem. Wei i sur. (2015.) konstruirali su sličan pokus u kojemu su hipoksiji izložili trudne štakorice od 4. do 21. gestacijskog dana te su njihove potomke podvrgnuli bihevioralnom testiranju u adolescentnoj dobi. Kao rezultat dobili su poremećeno učenje i pamćenje koje se očitovalo duljom latencijom bijega i manjom preplivanom udaljenosti u Morrisovom vodenom labirintu te manjom frekvencijom prijelaza ciljanih područja u retencijskom testu. Ispitivanjem ekspresije gena za podjedinice NMDAR otkriveno je značajno smanjenje *GluN1*, *GluN2A* i *GluN2B* (*Grin2b*) u hipokampusu hipoksičnih štakora, kao i nekih komponenata Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta. Wei i sur. (2015.) u konačnici su zaključili kako prenatalna hipoksija može poremetiti NMDAR-Wnt-katenin signalizaciju i time utjecati na nastanak bihevioralnih poremećaja. U slučaju prolazne globalne ishemije pokazana je smanjena ekspresija mRNA

*GluR2* podjedinice u hipokampusu što predstavlja mogući uzrok povećane permeabilnosti AMPA kanala za ulazak  $Ca^{2+}$  koji pridonosi odgođenoj neurodegeneraciji (Kwak i Weiss, 2006.).

Pokusi na životinjama pokazali su da *Gabrb2* knock-out i heterozigotni miševi pokazuju lokomotornu hiperaktivnost, stereotipiju, poremećaje u socijalnosti, deficite prostorne i radne memorije, smanjenu depresiju i anksioznost i povećanu podložnost epileptičnim napadima, no ne postoje podaci o promijenjenoj ekspresiji gena nakon izlaganja hipoksiji (Yeung i sur., 2018.). Genetički polimorfizmi ili promjene u genskoj ekspresiji podjedinica  $GABA_A$ R mogu biti povezane s razvojem neuropsihijatrijskih poremećaja u ljudi (Zhang i sur., 2020., Tsang i sur., 2013.).

Istraživanja na miševima s inaktiviranim *Grm5* genom pokazala su povećanu lokomotivnu kao odgovor na novo okruženje, ali nije bilo promjene u senzomotorici, anksioznosti i društvenim interakcijama (Jew i sur., 2014.). Tretman štakora antagonistima *Grm5* receptora pokazao je anksiolitički odgovor putem smanjenog smrzavanja u testu kondicioniranog straha, povećanog prihvatanja šoka i kažnjavanja te povećane društvene interakcije, a u slučaju ovisnosti, smanjenjem uzimanja adiktivne supstance (Swanson i sur., 2005.). Budući da signalni putevi koje aktivira *Grm5* imaju ulogu u transkripciji (CREB, mTOR), preživljavanju, rastu i diferencijaciji neurona (BDNF), te staničnom rastu i sintezi proteina (mTOR), ovaj receptor na mnogo načina može utjecati na regulaciju funkcije neurona te zbog toga poremećaji njegove funkcionalnosti mogu imati doprinos u različitim patološkim stanjima. Dosadašnjim istraživanjima potvrđena je uloga *Grm5* signalnih puteva u shizofreniji, depresivnom poremećaju, bipolarnom poremećaju, Alzheimerovoj bolesti i sindromima boli (Matosin i sur., 2015.).

Buduće imunohistokemijske analize trebale bi nam dati uvid u regionalno specifičnu promjenu ekspresije navedenih receptora na proteinskoj razini.

#### **5.4.3. Hipokampus i prostorno pamćenje**

U hipokampusu je RNA-Seq pokazao promjenu u ekspresiji velike grupe gena izvanstaničnog matriksa. Ova spoznaja, zajedno s našim opažanjem da nema razlike u ekspresiji dopaminskih receptora upućuje da bi poremećaj prostornog učenja mogao biti uzrokovan strukturnim promjenama u hipokampusu u smislu kapaciteta za sinaptičku plastičnost koja je ključna u procesu učenja i pamćenja.

Od pojedinačnih promijenjenih gena, za nas je bio interesantan *VIP* za koji je pokazano da sudjeluje u učenju povezanim s nagradom te smo njegovu ekspresiju provjerili qPCR-om. Doista, u hipoksičnih životinja pokazana je značajno viša ekspresija ovog gena (Slika 38.), što bi se moglo povezati s boljom izvedbom u prvim danima testiranja. Alternativno, pojačana motivacija za pronalazak nagrade mogla je biti povezana s pojačanom aktivnošću mezolimbickog puta dopamina u hipoksičnih životinja, kao posljedica povećane razine dopamina u srednjem mozgu.

Iako je uloga *VIP*-a i njegovih receptora već odavno povezana s modulacijom učenja, rezultati koji govore o njegovom učinku oprečni su. Flood i sur. (1990.) su nakon injekcije *VIP*-a u rostralni dio hipokampusa zaključili kako *VIP* remeti memorijsku retenciju i uzrokuje amneziju u testu s elektrošokovima u T-labirintu („*left-right footshock avoidance task in a T-maze*“). Učinak *VIP*-a uočen je u slučaju ubrizgavanja neposredno nakon treninga, dok injekcija nakon 24h nije imala nikakav učinak pa je zaključeno kako on modulira procese učenja u kratkom vremenskom periodu (Flood i sur., 1990.). *VIP* je također uzrokovao amneziju u testu pasivnog i aktivnog izbjegavanja (Cottrell i sur., 1984., Takashima i sur., 1993.). Itoh i sur. (1994.) su pokazali kako *VIP* uzrokuje kašnjenje u sposobnosti učenja i poremećaj u prostornom pamćenju u Morrisovom vodenom labirintu nakon njegove intracerebroventrikularne primjene.

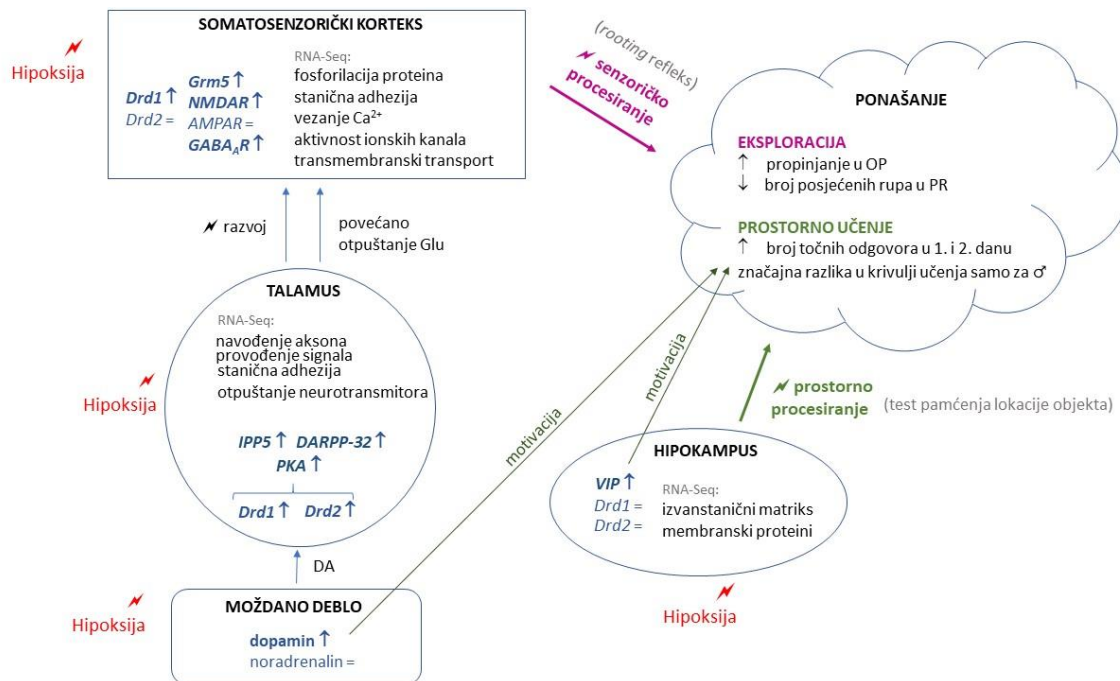
Ipak, postoje i rezultati koji upućuju na pozitivnu ulogu *VIP*-a u stjecanju i zadržavanju memorije. Glowa i sur. (1992.) su uočili kako antagonist *VIP*-a uzrokuje poremećeno učenje u Morrisovom vodenom labirintu, što upućuje kako *VIP* može poboljšati prostorno pamćenje. Pozitivni učinci *VIP*-a zamijećeni su i u obliku smanjenja prostornih kognitivnih deficita. Jedna doza intracerebroventrikularne, subkutane ili intraperitonealne injekcije *VIP*-a spriječila je smanjenje u broju točnih odgovora u radijalnom labirintu nakon amnezije izazvane skopolaminom (Yamaguchi i Kobayashi, 1994.). Tome u prilog govore i optogenetičke manipulacije *VIP+* interneuronima i kompjutersko modeliranje koji su pokazali kako je *VIP+* disinhibicija nužna za prostorno učenje usmjereno ka cilju i reorganizaciju dinamike piramidalnih neurona u hipokampusu, što igra veliku ulogu u prostornom učenju (Turi i sur., 2019.). Osim farmakoloških metoda, provodila su se istraživanja i na transgeničnim životinjama. *VIP*-deficijentni miševi imali su normalnu sposobnost početnog učenja i prisjećanja naučenog 24h nakon treninga, ali su pokazali smanjenu mogućnost prisjećanja strahom uvjetovanog ponašanja 48h sati nakon treninga (Chaudhury i sur., 2008.). U miševa s 20% redukcijom u moždanoj ekspresiji *VIP*-a, uočeni su poremećaji u učenju, uključujući zaostajanje u stjecanju pamćenja (Gozes i sur., 1996.). Naši podaci također govore u prilog

potencijalnom pozitivnom djelovanju VIP-a na početnu fazu prostornog učenja stimuliranog nagradom (Slika 19., Slika 38.). Osim nabrojanih uloga u prostornom pamćenju i retenciji, VIP ima sposobnost antiapoptotskog, antiinflamatornog i neuroprotektivnog djelovanja. VIP promiče preživljenje neurona putem djelovanja na glija stanice u kojima potiče sekreciju neurotrofičnih čimbenika i inhibira sekreciju proinflamatornih medijatora. Budući da su VPAC receptori vezani uglavnom uz G $\alpha$ s protein, VIP svoje neuroprotektivne učinke provodi preko signalne molekule cAMP. Hipoksija/ishemija može potaknuti smanjenje ekspresije VIP receptora i smanjiti VIP-ovisnu cAMP signalizaciju (Yang i sur., 2010.). Ako je to slučaj i u ovom istraživanju, onda možemo zaključiti kako je povećanje ekspresije VIP-a mogući kompenzacijski neuroprotektivni odgovor na ozljedu u neonatalnoj dobi koji se dugoročno zadržao.



## 6. ZAKLJUČAK

Pretpostavljamo da je akutno neonatalno izlaganje hipoksiji dovelo do neposrednih i/ili kompenzatornih promjena u ekspresiji mnogih gena u brojnim moždanim regijama, koje su se zadržale i u doba adolescencije štakora i koje vjerojatno stoje u podlozi opaženih promjena u ponašanju (Slika 39.).



**Slika 39.** Prikaz zaključne pretpostavke djelovanja akutne neonatalne hipoksije na moždano deblo, talamus, somatosenzorički korteks i hipokampus te posljedične promjene u ponašanju. (Kraticе: DA – dopamin, Glu – glutamat, OP – Test u otvorenom polju, PR - Test na ploči s rupama. Nazivi NMDAR, AMPAR, GABA<sub>A</sub>R i PKA odnose se redom na podjedinice *Grin2a*, *Gria2*, *Gabrb2* i *Prkar2a*.)

U ovom istraživanju smo, kao jednu od istaknutih posljedica hipoksije, uočili hiperdopaminergiju, u vidu povećane koncentracije dopamina u moždanom deblo i pojačane ekspresije gena za proteine uključene u dopaminsku transmisiju u jednoj od njegovih ciljnih regija – talamusu.

Djelovanje hipoksije, izravno na talamus ili neizravno putem dopaminskog sustava iz moždanog debla, potaknulo je pojačanu ekspresiju gena čiji produkti sudjeluju u navođenju talamo-kortikalnih aksona, staničnoj adheziji, oslobađanju neurotransmitora i signalnoj transdukciji, što je moglo dovesti ili do poremećaja u strukturalnoj organizaciji

somatosenzoričkog korteksa (koja se odvija u razdoblju nakon izlaganja hipoksiji) i/ili do pojačanog otpuštanja glutamata u sinapse s kortikalnim neuronima.

Djelovanje hipoksije izravno na somatosenzorički korteks ili neizravno putem narušene talamo-kortikalne komunikacije, dovelo je do povišene ekspresije gena čiji produkti sudjeluju u transmembranskom transportu, aktivnosti ionskih kanala, vezanju  $\text{Ca}^{2+}$  iona i fosforilaciji proteina, uključujući i ključne podjedinice glutamatnih i GABA receptora koji posreduju somatosenzoričko procesiranje.

S druge strane, čini se da je djelovanje hipoksije na hipokampus bilo izravno, bez posredovanja dopaminom, te je prvenstveno dovelo do značajne promjene u ekspresiji niza proteina izvanstaničnog matriksa što je moglo uvelike narušiti potencijal za sinaptičku plastičnost.

Možemo zaključiti da se otežano somatosenzoričko procesiranje, uzrokovano strukturnim i/ili neurokemijskim promjenama u somatosenzoričkom korteksu, i narušeno prostorno procesiranje, uzrokovano strukturnim promjenama u hipokampusu, manifestira u vidu značajnih promjena u eksploratornom ponašanju i narušenom prostornom učenju, koje se, u slučaju vezivanja uz nagradu, kompenzira pojačanom motivacijom posredovanom dopaminom i VIP-om.

Daljnja istraživanja usmjerena su na strukturnu karakterizaciju ovih moždanih regija kao važnu kariku u povezivanju dugoročnih molekularnih (promjena genskoj ekspresiji) i funkcionalnih (promjena u ponašanju) poremećaja izazvanih akutnom neonatalnom hipoksijom.

## 7. LITERATURA

Agrawal J, Ludwig B, Roy B, Dwivedi Y (2019) Chronic Testosterone Increases Impulsivity and Influences the Transcriptional Activity of the Alpha-2A Adrenergic Receptor Signaling Pathway in Rat Brain. *Molecular Neurobiology* 56: 4061-4071

Arteaga O, Revuelta M, Urigüen L, Álvarez A, Montalvo H, Hilario E (2015) Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *PLoS ONE* 10(11): e0142424.

Ayano G (2016) Dopamine: Receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: Review of literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment* 2(2): 1-4

Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M (2000) Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research* 859(2): 318-325

Barnes SA, Pinto-Duarte A, Kappe A, Zembrzycki A, Metzler A, Mukamel EA, Lucero J, Wang X, Sejnowski TJ, Markou A, Behrens MM (2015) Disruption of mGluR5 in parvalbumin-positive interneurons induces core features of neurodevelopmental disorders. *Molecular Psychiatry* 20(10): 1161-1172

Baumann SW, Baur R, Sigel E (2002) Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. *Journal of Biological Chemistry* 277:46020–46025.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews* 63: 182-217

Benderska N, Becker K, Girault JA, Becker CM, Andreadis A, Stamm S (2010) DARPP-32 binds to tra2-beta1 and influences alternative splicing. *Biochimica and biophysica acta* 1799(5-6):448-53

Berger HR, Brekke E, Widerøe M, Morken TS (2017) Neuroprotective Treatments after Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury Evaluated with Magnetic Resonance Spectroscopy. *Developmental Neuroscience* 39: 36-48

Bond N, DiGiusto E (1977) Open-field behavior as a function of age, sex and repeated trials. *Psychological Reports* 41: 571-574

Borbély E, Scheich B, Helyes Z (2013) Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides* 47: 439–450

Boyd KN, Mailman RB (2012): Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. *Handbook of Experimental Pharmacology* 212: 53-86

Brooks-Kayal AR, Pritchett DB (1993) Developmental changes in human gamma-aminobutyric acidA receptor subunit composition. *Annals of Neurology*. 34:687–693.

Chakravarthy VS, Joseph D, Bapi RS (2010) What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biological Cybernetics* 103: 237-253

- Chen Y, SO O'gren, B Bjelke, P Bolme, P Eneroth, J Gross, F Loidl, M Herrera-Marschitz, K Andersson (1995) Nicotine treatment counteracts perinatal asphyxia-induced changes in the mesostriatal/limbic dopamine systems and in motor behaviour in the four-week-old male rat. *Neuroscience* 68: 531–538
- Chen WF, Chang H, Wong CS, Huang, LT, Yang CH, Yang SN (2007) Impaired expression of postsynaptic density proteins in the hippocampal CA1 region of rats following perinatal hypoxia. *Experimental Neurology* 204(1): 400–410.
- Cleva RM, Olive MF (2011) Positive allosteric modulators of type 5 metabotropic glutamate receptors (mGluR5) and their therapeutic potential for the treatment of CNS disorders. *Molecules* 16: 2097–2106
- Chaudhury D, Loh DH, Dragich JM, Hagopian A, Colwell CS (2008) Select cognitive deficits in vasoactive intestinal peptide deficient mice. *BMC Neuroscience* 9:63
- Cottrell GA, Veldkuis ND, Rostene RW, de Klset ER (1984) Behavioral actions of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Neuropeptides (Edinburgh)* 4: 332-341
- Counotte DS, Schiefer C, Shaham Y, O'Donnell P (2014) Time-dependent decreases in nucleus accumbens AMPA/NMDA ratio and incubation of sucrose craving in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 231(8): 1675-1684
- Crawley (2004) Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 10: 248–258
- Davidson JO, Dean JM, Fraser M, Wassink G, Andelius TC, Dhillon SK, Bennet L, Gunn AJ (2018) Perinatal brain injury: mechanisms and therapeutic approaches. *Frontiers In Bioscience* 23: 2204-2226
- Dell'Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R (1991) Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behavioural Braht Research* 45: 125-134
- Dell'Anna ME, Luthman J, Lindqvist E, Olson L (1993) Development of monoamine systems after neonatal anoxia in rats. *Brain Research Bulletin* 32(2): 159-170
- Douglas-Escobar M, Weiss MD (2015) Hypoxic-ischemic encephalopathy. A review for the clinician. *JAMA Pediatrics* 169(4): 397-403
- Driscoll DJO', Felice VD, Kenny LC, Boylan GB, O'Keefe GW (2018) Mild prenatal hypoxia-ischemia leads to social deficits and central and peripheral inflammation in exposed offspring. *Brain, Behavior and Immunity* 69: 418-427
- Duncan NW, Wiebking C, Northoff G (2014) Associations of regional GABA and glutamate with intrinsic and extrinsic neural activity in humans—A review of multimodal imaging studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 47: 36–52
- El-Khodori B, Boksa P (2001) Caesarean section birth produces long term changes in dopamine D1 receptors and in stress-induced regulation of D3 and D4 receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* 25(3): 423-439

- Elsworth JD, Roth RH (1997) Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: Relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 144: 4-9
- Eto M, Karginov A, Brautigan DL (1999) A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry* 38: 16952–16957
- Fan L, Lin S, Pang Y, Lei M, Zhang F, Rhodes PG, Cai Z (2005) Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behavioural Brain Research* 165: 80–90
- Fernandez-Montoya J, Avendano C, Negredo P (2018) The glutamatergic system in primary somatosensory neurons and its involvement in sensory input-dependent plasticity. *International Journal of Molecular Sciences* 19(69)
- File SE, Wardill AG (1975) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacology*. 44: 53–59
- Filloux FM, Adair J, Narang N (1996) The temporal evolution of striatal dopamine receptor binding and mRNA expression following hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Research. Developmental Brain Research* 94(1): 81-91
- Flood JF, Garland JS, Morley JE (1990) Vasoactive intestinal peptide (VIP): an amnesic neuropeptide. *Peptides* 11(5): 933-938
- Fuller RW (1983) The brain's three catecholamines. *Trends in Pharmacological Sciences* 4: 394-397
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*. 438(7065): 185–192.
- Galeano P, Blanco Calvo E, Madureira de Oliveira D, Cuenya L, Kamenetzky GV, Mustaca AE, Barreto GE, Giraldez-Alvarez LD, Milei J, Capani F (2011) Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29(6): 609-19
- Giannopoulou I, Pagida MA, Briana DD, Panayotacopoulou MT (2018) Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. *Hormones* 17(1):25-32
- Gillam-Krakauer M, Gowen Jr CW. Birth Asphyxia. [Updated 2018 Dec 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430782/>
- Giussani DA (2016) The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological mechanisms. *The Journal of Physiology* 594.5: 1215-1230
- Glowa JR, Panlilio LV, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Hill JM (1992) Learning impairment following intracerebral administration of the HIV envelope protein gp120 or a VIP antagonist. *Brain Research* 570(1-2): 49-53
- Gold SM, Blum K, Oscar-Berman M, Braverman ER (2014) Low dopamine function in attention deficit/hyperactivity disorder: Should genotyping signify early diagnosis in children? *Postgraduate Medicine* 126(1): 153-177

- Gonzalez FF, Miller SP (2006) Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 91: F454–F459
- Gopagondanahalli KR, Li J, Fahey MC, Hunt RW, Jenkin G, Miller SL, Malhotra A (2016) Preterm Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *Frontiers in Pediatrics* 4: 114.
- Gozes I, Bardea A, Reshef A, Zamostiano R, Zhukovsky S, Rubinraut S, Fridkin M, Brenneman DE (1996) Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 93(1): 427-432
- Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE (2008) A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 199(6): 587–595
- Gray JA, McNaughton N (2003) *The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. NY: Oxford University Press
- Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen PB, Fienberg A, Nishi A (1998) The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Research Reviews* 26(2-3): 274-284
- Grillner P, Mercuri NB (2002) Intrinsic membrane properties, and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. *Behavioral brain research* 130: 149-169
- Habek D, Hodek B, Herman R, Čerkez Habek J (2000) Fetalna hipoksija – etiologija i patofiziologija hipoksičnih oštećenja. *Liječnički vjesnik* 122:82-89
- Hadjiconstantinou M, Yates AJ, Neff NH (1990) Hypoxia-induced neurotransmitter deficits in neonatal rats are partially corrected by exogenous GM1 ganglioside. *Journal of Neurochemistry* 55(3): 864-869
- Halassa MM, Kastner S (2017) Thalamic functions in distributed cognitive control. *Nature Neuroscience*. 20: 1669–1679
- Hall CS, Ballachey EL (1932) *A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology*. University of California Publications in Psychology. 6: 1–12
- Han QJ, Gao NN, Ma GQ, Zhang ZN, Yu WH, Pan J, Wang Q, Zhang X, Bao L (2013) IPP5 inhibits neurite growth in primary sensory neurons by maintaining TGF- $\beta$ /Smad signaling. *Journal of Cell Science* 126: 542-553
- Hampe CS, Mitoma H, Manto M (2018) GABA and Glutamate: Their transmitter role in the CNS and pancreatic islets. *New Developments in Neurotransmission Research (InTech Open)*
- Hayes BC, Doherty E, Grehan A, Madigan C, McGarvey C, Mulvany S, King MD (2018) Neurodevelopmental outcome in survivors of hypoxic ischemic encephalopathy without cerebral palsy. *European journal of pediatrics* 177(1): 19-32.
- Hedner T, Lundborg P, Engel J (1979) Brain biochemical and behavioral changes in 4 weeks old rats after neonatal oxygen deprivation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 10(5): 647-650

- Herrera MI, Udovin LD, Toro-Urrego N, Kusnier CF, Luaces JP, Capani F (2018) Palmitoylethanolamide Ameliorates Hippocampal Damage and Behavioral Dysfunction After Perinatal Asphyxia in the Immature Rat Brain. *Frontiers in Neuroscience* 12:145.
- Himmelman K, Hagberg G, Wiklund LM, Eek MN, Uvebrant P (2007) Dyskinetic cerebral palsy: a population-based study of children born between 1991 and 1998. *Developmental Medicine & Child Neurology* 49: 246–251
- Hoffpauir BK, Gleason EL (2002) Activation of mGluR5 modulates GABAA receptor function in retinal amacrine cells. *Journal of Neurophysiology* 88: 1766–1776
- Howes OD, Williams M, Ibrahim K et al (2013) Midbrain dopamine function in schizophrenia and depression: a post-mortem and positron emission tomographic imaging study. *Brain* 136: 3242– 3251
- Hu X, Rea HC, Wiktorowicz JE, Perez-Polo JR (2006) Proteomic analysis of hypoxia/ischemia-induced alteration of cortical development and dopamine neurotransmission in neonatal rat. *Journal of Proteome Research* 5(9): 2396–2404
- Huang Z, Liu J, Cheung PY, Chen C (2009) Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Research* 1301: 100-109
- Hutter D, Kingdom J, Jaeggi E (2010) Causes and mechanisms of intrauterine hypoxia and its impact on the fetal cardiovascular system: a review. *International Journal of Pediatrics* Volume 2010
- Hyde JF, Jerussi TP (1983) Sexual Dimorphism in Rats with Respect to Locomotor Activity and Circling Behavior. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 18: 725-729
- Itoh S, Takashima A, Morimoto T (1994) Impaired spatial learning by vasoactive intestinal peptide in Morris water maze task in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 72(1): 25-29
- Jew CP, Wu CS, Sun H, Zhu J, Huang JY, Yu D, Justice NJ, Lu HC (2013) mGluR5 ablation in cortical glutamatergic neurons increases novelty-induced locomotion. *PLoS One* 8: e70415
- Ji G, Liu M, Zhao XF, Liu XY, Guo QL, Guan ZF, Zhou HG, Guo JC (2015) NF-κB Signaling is Involved in the Effects of Intranasally Engrafted Human Neural Stem Cells on Neurofunctional Improvements in Neonatal Rat Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *CNS Neuroscience & Therapeutics* (12): 926-935
- Johnson BD, Scheuer T, Catterall WA (1994) Voltage-dependent potentiation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in skeletal muscle cells requires anchored cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 11492-11496
- Jong YJI, Kumar V, O'Malley KL (2009) Intracellular metabotropic glutamate receptor (mGluR5) activates signaling cascades distinct from cell surface counterparts. *Journal of Biological Chemistry* 284: 35827–35838.
- Jong YJI, Sergin I, Purgert CA, O'Malley KL (2014) Location-dependent Signaling of the Group 1 Metabotropic Glutamate Receptor, mGlu5. *Molecular Pharmacology* mol.114.094763.

- Kaewsuk S, Tannenberg RK, Kuo SW, Björkman ST, Govitrapong P, Stadlin A, Dodd PR (2009) Regional expression of dopamine D1 and D2 receptor proteins in the cerebral cortex of asphyxiated newborn infants. *Journal of Child Neurology* 24(2):183-93
- Kim DY, Kim SH, Choi HB, Min C, Gwag BJ (2001) High abundance of GluR1 mRNA and reduced Q/R editing of GluR2 mRNA in individual NADPH-diaphorase neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 17(6): 1025–33
- Kingdom JCP, Kaufmann P (1997) Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 18: 613–621
- Kuhar JM, Minneman K, Muly EC (2006) Catecholamines. U: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (ur.) *Basic Neurochemistry*. Elsevier Academic Press, London, UK; 211-226
- Kwak S, Weiss JH (2006) Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Current Opinion in Neurobiology* 16: 281-287
- Lai M, Yang S (2011) Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*
- LaLumiere RT (2014) Dopamine and memory. U: Identification of Neural Markers Accompanying Memory, Elsevier Inc.
- Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W (1992) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *Journal of Neurosci* 12:1063–1076
- Laviola G, Adriani W, Rea M, Aloe L, Alleva E (2004) Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology* 175(2): 196-205
- Lever C, Burton S, O'Keefe (2006) Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the Neurosciences* 17: 111-133
- Li B, Concepcion K, Meng X, Zhang L (2017) Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury, *Progress in Neurobiology* 159: 50-68
- Li H, Crair MC (2011) How do barrels form in somatosensory cortex? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1225: 119-129
- Lisman JE, Pi HJ, Zhang Y, Otmakhova NA (2010) A thalamo-hippocampal-ventral tegmental area loop may produce the positive feedback that underlies the psychotic break in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 68(1): 17-24
- Lo FS, Akkentli F, Tsytsarev V, Erzurumlu RS (2013) Functional significance of cortical NMDA receptors in somatosensory information processing. *Journal of Neurophysiology* 110: 2627-2636
- London E, Wester JC, Bloyd M, Bettencourt S, McBain CJ, Stratakis CA (2020) Loss of habenular Prkar2a reduces hedonic eating and increases exercise motivation. *JCI Insight* 5(23): e141670



- Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I (2005) Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury, *Behavioural Brain Research* 157: 157–165.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JDB, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 8: 1488-1500
- Malenka RC, Nestler EJ, Hyman SE (2009) *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. 2nd ed. McGraw-Hill Medical, New York
- Marinho V, Oliveira T, Bandeira J, Pinto GR, Gomes A, Lima V, et al. (2018) Genetic influence alters the brain synchronism in perception and timing. *Journal of Biomedical Science*. 25(1): 61.
- Massa JS, Walker PS, Moser DR, Fellows RE, Maurer RA (1991) Fetal development and neuronal/glial cell specificity of cAMP-dependent protein kinase subunit mRNAs in rat brain. *Developmental Neuroscience* 13: 47-53
- Matosin N, Fernandez-Enright F, Lum JS, Newell KA (2015) Shifting towards a model of mGluR5 dysregulation in schizophrenia: consequences for future schizophrenia treatment, *Neuropharmacology*
- Mayer ML (2005) Glutamate receptor ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* 15 (3): 282–8.
- McCasland JS, Hibbard LS (1997) GABAergic neurons in barrel cortex show strong, whisker-dependent metabolic activation during normal behavior. *Journal of Neuroscience* 17(14): 5509-5527
- McKernan RM, Whiting PJ (1996) Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends in Neurosciences*. 19(4): 139–43.
- Meng SZ, Isumi H, Takashima S (1998) Neuropathological characteristics and alteration of the dopamine D2 receptor in hypoxic-ischemic basal ganglia necrosis. *Brain Development* 20: 98–104
- Miguel PM, Deniz BF, Confortim HD, Bronauth LP, de Oliveira BC, Alves MB, Silveira PP, Pereira LO (2019) Methylphenidate administration reverts attentional inflexibility in adolescent rats submitted to a model of neonatal hypoxia-ischemia: Predictive validity for ADHD study. *Experimental Neurology* 315: 88-99
- Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z (2017) Neonatal hypoxia ischaemia: Mechanisms, models, and therapeutic challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:1–36
- Miller SP, Ramaswamy V, Michelson D, Barkovich AJ, Holshouser B, Wycliffe N, et al. (2005) Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. *The Journal of Pediatrics* 146: 453–460
- Moghaddam B. (2010). Dopamine in the thalamus: a hotbed for psychosis? *Biological psychiatry* 68(1): 3–4

- Munton RP, Vizi S, Mansuy IM (2004) The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Letters* 567(1): 121-128
- Myers SJ, Yuan H, Kang JQ, Kuan Tan FC, Traynelis SF, Low CM (2019) Distinct roles of GRIN2A and GRIN2B variants in neurological conditions [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 2019, 8(F1000 Faculty Rev):1940
- Nakazawa M, Tang AC (2006) Adult aggression during an initial social encounter: effects of neonatal anoxia and relation to juvenile open-field activity. *Neuroscience Letters* 408(2):119-123
- Nalivaeva NN, Turner AJ, Zhuravin IA (2018) Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience* 12:825
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 24(3): 165-205
- Neve KA (2010) *The Dopamine Receptors*, Second Edition. Humana Press, New York, USA
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP (2011) Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60: 1017-1041
- Nieoullon A, Coquerel A (2003) Dopamine: a key regulator to adapt action, emotion, motivation and cognition. *Current Opinions in Neurology* 16:S3–9.
- Nishi A, Shuto T (2017) Potential for targeting dopamine/ DARPP-32 signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21(3): 259-272
- O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M (2012) Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochemical Research* 37: 2496-2512
- Olton DS (1979) Mazes, maps, and memory. *American Psychologist* 34: 583-596
- Ordyan NE, Akulova VK, Mironova VI, Otellin VA (2017) Behavior Disorders Caused by Perinatal Hypoxia in Juvenile Rats and Their Correction with GABA Derivative. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 164(2): 118-122
- Pagida MA, Konstantinidou AE, Tsekoura E, Mangoura D, Patsouris E, Panayotacopoulou MT (2013) Vulnerability of the mesencephalic dopaminergic neurons of the human neonate to prolonged perinatal hypoxia: an immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase expression in autopsy material. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 72: 337–350
- Papasergi-Scott MM, Robertson MJ, Seven AB, Panova O, Mathiesen JM, Skiniotis G (2020) Structures of metabotropic GABAB receptor. *Nature* 584: 310–314
- Pawlak CR, Schwarting RK (2002) Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73(3): 679-687

- Persohn E, Malherbe P, Richards JG (1992) Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABAA receptor subunits in the rat CNS. *Journal of Comparative Neurology* 326 (2): 193-216.
- Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, Lane R (2003) Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Society of Biological Psychiatry* 54: 504-514
- Raff H, Bruder ED, Jankowski BM, Colman RJ (2001) Effect of Neonatal Hypoxia on Leptin, Insulin, Growth Hormone and Body Composition in the Rat. *Hormone and Metabolic Research* 33: 151-155
- Raveendran AT, Skaria PC (2013) Learning and cognitive deficits in hypoxic neonatal rats intensified by BAX mediated apoptosis: protective role of glucose, oxygen, and epinephrine. *International Journal of Neuroscience* 123(2): 80-88
- Reivich M, Brann AW Jr, Shapiro HM, et al. (1972) Regional cerebral blood flow during prolonged partial asphyxia. U: Meyer JS, Reivich M, Lechner H, et al., eds. *Research on the Cerebral Circulation*. Springfield: Thomas 216
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology* 9(2):131-41
- Robbins TW, Arnsten AF (2009) The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annual Review of Neuroscience* 32: 267-287
- Rogalska J, Caputa M, Wentowska K, Nowakowska A (2004) Stress-induced behaviour in juvenile rats: effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron. *Behavioural Brain Research* 154(2): 321-329
- Rosenmund C, Carr DW, Bergeson SE, Nilaver G, Scott JD, Westbrook GL (1994) Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons. *Nature* 368: 853-856
- Rumajogee P, Bregman T, Miller SP, Yager JY, Fehlings MG (2016) Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. *Frontiers in Neurology*. 7:57
- Salgado-Pineda P, Delaveau P, Blin O, Nieoullon A (2005) Dopaminergic contribution to the regulation of emotional perception. *Clinical Neuropharmacology* 28: 228-237
- Salussolia CL, Prodromou ML, Borker P, Wollmuth LP (2011) Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*. 31(31): 11295-11304.
- Sánchez-González MA, García-Cabezas MA, Rico B, Cavada C (2005) The primate thalamus is a key target for brain dopamine. *Journal of Neuroscience* 25(26): 6076-6083
- Schultz W (2015) Neuronal reward and decision signals: from theories to data. *Physiological Reviews* 95: 853-951
- Seidler FJ, Slotkin TA (1990) Effects of acute hypoxia on neonatal rat brain: regionally selective, long-term alterations in catecholamine levels and turnover. *Brain Research Bulletin* 24(2): 157-161
- Shimomura C, Ohta H (1988) Behavioral abnormalities and seizure susceptibility in rat after neonatal anoxia. *Brain Development* 10: 160-163

- Slotkin TA, Cowdery TS, Orband L, Pachman S, Whitmore WL (1986) Effects of Neonatal Hypoxia on Brain Development in the Rat: Immediate and Long-Term Biochemical Alterations in Discrete Regions. *Brain Research* 374:63-74
- Speiser Z, Uziel J, Defrin-Assa R, Gitter S, Urca G (1991) Different behavioral deficits are induced by anoxia/hypoxia in neonatal and senescent rats: blockade by MK-801. *Behavioural Brain Research* 42: 181– 186
- Stanford SC (2013) Adrenaline and Noradrenaline: Introduction. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
- Stipanovich A, Valjent E, Matamales M, Nishi A, Ahn JH, Maroteaux M, Bertran-Gonzales J, Brami-Cherrier K, Enslen H, Corbille AG, Filhol O, Nairn AC, Greengard P, Herve D, Girault JA (2008) A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 453(7197):879-84
- Sukhanova IA, Sebentsova EA, Khukhareva DD, Manchenko DM, Glazovab NY, Vishnyakova PA, Inozemtseva LS, Dolotov OV, Vysokikh MY, Levitskaya NG (2018) Gender-dependent changes in physical development, BDNF content and GSH redox system in a model of acute neonatal hypoxia in rats. *Behavioural Brain Research* 350: 87-98
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P (2004) DARPP-32: An Integrator of Neurotransmission. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44: 269-296
- Swanson CJ, Bures M, Johnson MP, Linden AM, Monn JA, Schoepp DD (2005) Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4: 131–144
- Takada SH, Dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF, Cruz-Rizzolo RJ, Kihara AH, Xavier GF, Watanabe IS, Nogueira MI (2015) Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience* 284: 247-2
- Takashima A, Maeda Y, Itoh S (1993) Vasoactive intestinal peptide (VIP) causes memory impairment in passive avoidance responding of the rat. *Peptides* 14(5): 1067-71
- Tasken K, Naylor SL, Solberg R, Jahnsen T (1998) Mapping of the Gene Encoding the Regulatory Subunit RII<sub>β</sub> of cAMP-Dependent Protein Kinase (Locus PRKAR2A) to Human Chromosome Region 3p21.3–p21.2. *Genomics* 50: 378-381
- Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, Anand GS (2005) Dynamics of signaling by PKA. *Biochimica and Biophysica Acta* 1754: 25–37
- Tejkalová H, Kaiser M, Klaschka J, Stastný F (2007) Does neonatal brain ischemia induce schizophrenia-like behavior in young adult rats? *Physiological Research* (6): 815-823
- Terbeck S, Akkus F, Chesterman LP, Hasler G (2015) The role of metabotropic glutamate receptor 5 in the pathogenesis of mood disorders and addiction: combining preclinical evidence with human Positron Emission Tomography (PET) studies. *Frontiers in Neuroscience* 9:86

- Thiel CM, Müller CP, Huston JP, Schwarting RK (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 93(1): 243-251
- Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC (2001) Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nature Neuroscience* 4(12): 1217-1223
- Titulaer J, Björkholm C, Feltmann K, Malmlöf T, Mishra D, Bengtsson Gonzales C, Schilström B and Konradsson-Geuken Å (2021) The Importance of Ventral Hippocampal Dopamine and Norepinephrine in Recognition Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 15:667244.
- Tsang SY, Zhong S, Mei L, Chen J, Ng SK, Pun FW, et al. (2013) Social cognitive role of schizophrenia candidate gene GABRB2. *Plos One*. 8(4): e62322.
- Usiello A, Baik JH, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408: 199-203
- Valle FP (1970) Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *American Journal of Psychology* 83: 103-111
- van Handel M, Swaab H, De Vries LS, Jongmans MJ (2007) Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *European Journal of Pediatrics* 166(7):645-654.
- Vannucci RC (2000) Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology* 17(3): 113-20.
- Vargas VE, Gurung S, Grant B, Hyatt K, Singleton K, Myers SM, et al. (2017) Gestational hypoxia disrupts the neonatal leptin surge and programs hyperphagia and obesity in male offspring in the Sprague-Dawley rat. *PLoS ONE* 12 (9): e0185272
- Varela C (2014) Thalamic neuromodulation and its implications for executive networks. *Frontiers in Neural Circuits* 8(69): 1-22
- Vázquez-Borsetti P, Peña E, Rojo Y, Acuña A, Loidl FC (2019) Deep hypothermia reverses behavioral and histological alterations in a rat model of perinatal asphyxia. *Journal of Comparative Neurology* 527(2): 362-371
- Virshup DM, Shenolikar S (2009) From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. *Molecular Cell* 33: 537-545
- Volpe JJ (2001) Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatric Research* 50(5): 553-62
- Volpe J, Inder T, Darras B, de Vries L, du Plessis A, Neil J, Perlman J (2017) *Volpe's neurology of the newborn*. 6th edition. Elsevier
- Vosko AM, Schroeder A, Loh DH, Colwell CS (2007) Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. *General and comparative endocrinology* 152(2-3): 165–175
- Walaas SI, Hemmings Jr. HC, Greengard P, Nairn AC (2011) Beyond the dopamine receptor: regulation and roles of serine/threonine protein phosphatases. *Frontiers in Neuroanatomy* 5(50)

- Wayment HK, Schenk JO, Sorg BA (2001) Characterization of extracellular dopamine clearance in the medial prefrontal cortex: role of monoamine uptake and monoamine oxidase inhibition. *Journal of Neuroscience* 21(1): 35-44
- Wei B, Li L, He A, Zhang Y, Sun M, Xu Z (2016) Hippocampal NMDAR-Wnt-Catenin signaling disrupted with cognitive deficits in adolescent offspring exposed to prenatal hypoxia. *Brain Research* 1631: 157-164
- White R, Gatzke-Kopp LM, Ryan PJ, Lydon-Staley DM (2019) The association between perinatal hypoxia exposure and externalizing symptoms and children's decision making in conditions of uncertainty is moderated by DRD2 genotype. *Developmental Psychobiology* 61(1): 56-68
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 1-12
- Wolf JA, Moyer JT, Lazarewicz MT, Contreras D, Benoit-Marand M, O'Donnell P, Finkel LH (2005) NMDA/AMPA ratio impacts state transitions and entrainment to oscillations in a computational model of the nucleus accumbens medium spiny projection neuron. *Journal of Neuroscience* 25(40): 9080-9095
- Wozniak-Kwasniewska A (2013) Optimisation of repetitive transcranial magnetic stimulation using electroencephalographic measurements in patients suffering from mood disorders. *Human health and pathology*. Université de Grenoble
- Yager JY (2004) Animal Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn. *Seminars in Pediatric Neurology* 11(1):31–46.
- Yamaguchi Y, Kobayashi H (1994) Effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on scopolamine-induced amnesia in the rat. *Neuropeptides* 26(3): 153-158
- Yang K, Lei G, Jackson MF, Macdonald JF (2010) The involvement of PACAP/VIP system in the synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Molecular Neuroscience* 42(3): 319-326
- Yao D, Zhang W, He X, Wang J, Jiang K, Zhao Z (2016) Establishment and identification of a hypoxia-ischemia brain damage model in neonatal rats. *Biomedical reports* 4(4): 437–443
- Yeung RK, Xiang ZH, Tsang SY, Li R, Ho TY, Li Q, et al. (2018). Gabrb2-knockout mice displayed schizophrenia-like and comorbid phenotypes with interneuron-astrocyte-microglia dysregulation. *Translational Psychiatry*. 8(1): 128.
- Yger M, Girault JA (2011) DARPP-32, jack of all trades... master of which? *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5(56)
- Young RS, Kolonich J, Woods CL, Yagel SK (1986) Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* 17(6): 1313-131659
- Zanelli SA, Stanley DP, Kaufmann DA (2018) What are the long-term sequelae and mortality rate for hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE)? [www.medscape.com](http://www.medscape.com)
- Zeng Q, Huang Y, Zeng L, Lan X, Huang Y, He S, Zhang H (2009) Effect of IPP5, a novel inhibitor of PP1, on apoptosis and the underlying mechanisms involved. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 54: 231-238

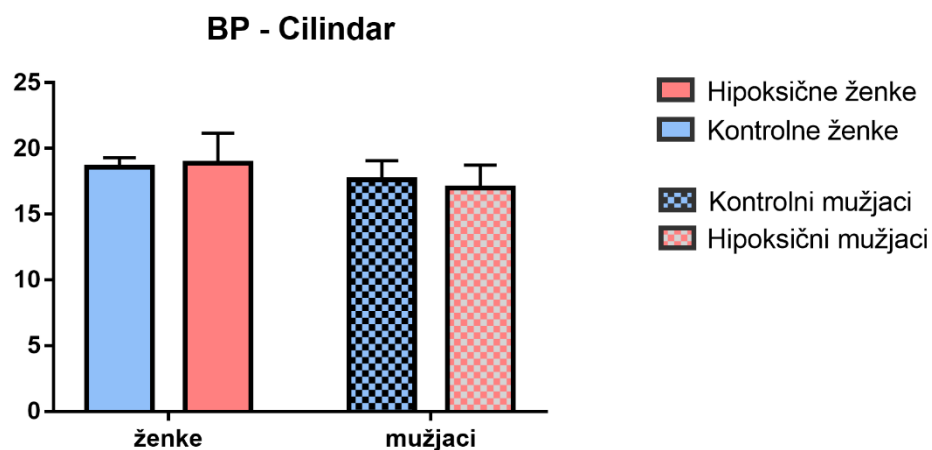
- Zeng Q, Huang Y, Zeng L, Huang Y, Cai D, Zhang H (2012) IPP5, a novel inhibitor of protein phosphatase 1, suppresses tumor growth and progression of cervical carcinoma cells by inducing G2/M arrest. *Cancer Genetics* 205: 442-452
- Zhang Q, Ding Y, Yao Y, Yu Y, Yang L, Cui H (2013) Creating rat model for hypoxic brain damage in neonates by oxygen deprivation. *PLoS ONE* 8(12): 1–14.
- Zhang Q, Long Q, Ott J (2014) AprioriGWAS, a new pattern mining strategy for detecting genetic variants associated with disease through interaction effects. *PLOS Computational Biology*. 10(6): e1003627.
- Zhang Q, Zhang X, Song S, Wang S, Wang X, Yu H, et al. (2020) The association of GABRB2 SNPs with cognitive function in schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 270(4): 443–449
- Zhang Z, Sun QQ (2011) The Balance Between Excitation And Inhibition And Functional Sensory Processing In The Somatosensory Cortex. *International Review of Neurobiology* 97: 305-333
- Zouakia A, Guilloteau D, Zimmer L, Besnard JC, Chalon S (1997) Evolution of dopamine receptors in the rat after neonatal hypoxia-ischemia: autoradiographic studies. *Life Sciences* 60(2): 151-162

## 8. PRILOG

Naknadno provedeni bihevioralni testovi u sklopu projekta: “Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji” (IP-2019-04-3128).

### Test propinjanja u cilindru

Test propinjanja u cilindru mjeri spontanu vertikalnu lokomotornu aktivnost u malom prostoru, u kojem je otklonjenja eksploratorna komponenta propinjanja. U testu koji je proveden u dobi PND37 dvosmjerna analiza varijance nije pokazala značajne razlike u spolu, tretmanu i interakciji spola i tretmana (Slika P1.).

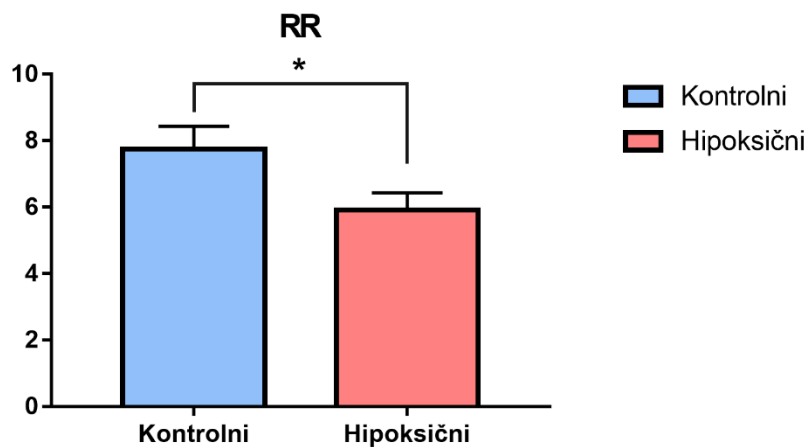


**Slika P1.** Broj propinjanja (BP) kontrolnih i hipoksičnih štakora u cilindru. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ).



## **Rooting refleks**

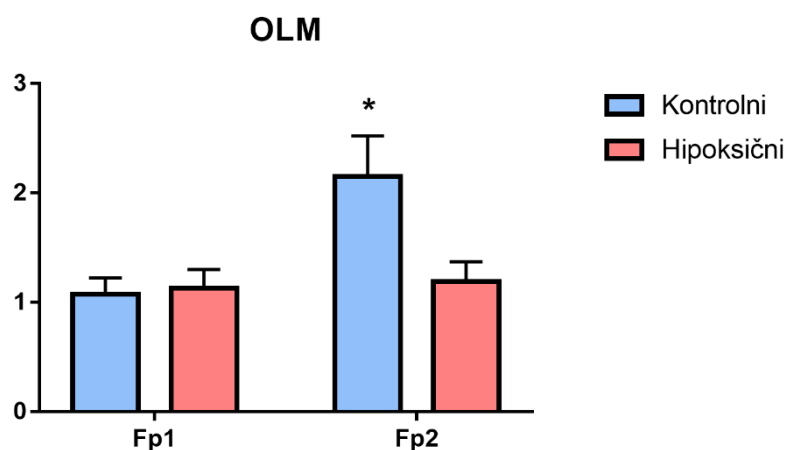
*Rooting* refleks test zasniva se na bilateralnoj stimulaciji područja lica nakon čega se promatra refleksni odgovor mladunaca u obliku puzanja naprijed s guranjem glave prema podražaju. Reakcija se boduje s 2 boda (puzanje prema podražaju), 1 bod (guranje glave prema podražaju bez puzanja) ili 0 bodova (nema reakcije na podražaj). Na slici P2. prikazan je ukupni rezultat testa *Rooting* refleks kao zbroj bodova dobivenih tijekom 12 uzastopnih dana testiranja. Studentov t-test pokazao je značajan utjecaj tretmana, što ukazuje da hipoksični štakori imaju deficit u somatosenzoričkom procesiranju koji se očituje kao smanjeni odgovor na podraživanje brkova.



**Slika P2.** Ukupni rezultat u *Rooting* refleks (RR) testu (0-2 boda po danu) dobiven tijekom 12 uzastopnih dana (P2-P14). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,05$ , Studentov t-test

## Test pamćenja lokacije objekta

Test pamćenja lokacije objekta (eng. *object location memory test*, OLM) ispituje prostorno pamćenje, a temelji se na spontanoj sklonosti glodavaca, koji su prethodno bili izloženi dvama identičnim objektima, da kasnije dulje istražuju objekt postavljen na novu lokaciju, nego što istražuju nepomaknuti objekt. Test je proveden u dobi PND38-PND40, a sastojao se od tri faze testiranja: 1. Habitucija na prostor (5 min), 2. Prvi dan testiranja (10 min) 3. Drugi dan testiranja (10 min). Prvog dana testiranja dva identična objekta A i B postavljena su u različite kuteve otvorenog polja te je mjerena frekvencija ulaska u zonu objekta B i frekvencija ulaska u zonu objekta A (omjer dobivenih vrijednosti označen je kao Fp1). Drugog dana je objekt B premješten na novu lokaciju (drugi kut otvorenog polja) te je opet mjerena frekvencija ulaska u zonu oba objekta (omjer dobivenih vrijednosti označen je kao Fp2) (Slika P3.). Trosmjerna analiza varijanci pokazala je značajan utjecaj interakcije tretmana i lokacije ( $p=0.009$ ), kao posljedicu povećanog interesa kontrolnih, ali ne i hipoksičnih životinja za novu lokaciju, što ukazuje na deficite u prostornom pamćenju hipoksičnih štakora.



**Slika P3.** Rezultati OLM testa prikazani kao frekvencija ulaska u zonu objekta B / frekvencija ulaska u zonu objekta A (Fp). Fp1 prikazuje vrijednosti prvog dana testiranja pri početnom položaju objekata. Fp2 prikazuje vrijednosti drugog dana testiranja, nakon što je objekt B premješten na novu lokaciju. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). \* $p < 0,01$ , post-hoc analiza Tukey-evim nakon što je trosmjerna analiza varijanci pokazala značajan utjecaj interakcije tretmana i lokacije

## 9. POPIS KRATICA

Kratika	Značenje
<i>Actb</i>	Gen za $\beta$ -Aktin
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina
AMPAR	AMPA receptor
cAMP	Ciklički adenzin monofosfat
DA	Dopamin
DARPP-32	Dopaminom i cAMP-om regulirani neuronalni fosfoprotein, Mr 32 kDa
DRD1	Dopaminski receptor D1 ( <i>Drd1</i> - štakorski gen; <i>DRD1</i> - ljudski gen)
DRD2	Dopaminski receptor D2 ( <i>Drd2</i> - štakorski gen; <i>DRD2</i> - ljudski gen)
GABA	Gama-aminomaslačna kiselina
GABA <sub>A</sub> R	GABA-A receptor
<i>Gabrb2</i>	Gen za podjedinicu beta 2 GABA <sub>A</sub> R
GEK	Gen za endogenu kontrolu
Glu	Glutamat
GOI	Gen od interesa
<i>Gria2</i>	Gen za podjedinicu 2 AMPAR
<i>Grin2a</i>	Gen za podjedinicu 2a NMDAR
<i>Grm5</i>	Gen za metabotropni glutamatni receptor 5
HI	Hipoksijsko-ishemijska ozljeda
HIE	Hipoksijsko-ishemijska encefalopatija
<i>Hprt1</i>	Gen za hipoksantin fosforiboziltransferazu 1
HRA	povećana tendencija propinjanja (eng. <i>higher rearing activity</i> )
IPP5	Inhibitor 5 protein fosfataze 1
LTS	Lateralni tegmentalni sustav
LC	<i>Locus coeruleus</i>
NA	Noradrenalin
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMDAR	NMDA receptor
PND	Postnatalni dan
PKA	Protein kinaza A
PKC	Protein kinaza C

PLC	Fosfolipaza C
PP1	Protein fosfataza 1
<i>Ppp1r1b</i>	Gen za DARPP-32
<i>Ppp1r1c</i>	Gen za IPP5
<i>Prkar2a</i>	Gen za podjedinicu PKA
qPCR	Kvantitativna polimerazna lančana reakcija
RT	Reverzna transkripcija
RV	Rice-Vanucci
S-D	Sprague-Dawley
SN	Supstancija nigra
VIP	Vazoaktivni intestinalni peptid ( <i>VIP</i> - gen za vazoaktivni intestinalni peptid)
VPAC	Vazoaktivni intestinalni polipeptidni receptor
VTA	Ventralno tegmentalno področje

## 10. ŽIVOTOPIS

Barbara Nikolić rođena je 7. prosinca 1991. godine u Zagrebu. U Osijeku je pohađala Osnovnu školu Ivana Filipovića i prirodoslovno-matematičku III. Gimnaziju Osijek. Nakon završetka srednje škole, 2010. godine upisuje preddiplomski studij Biologije na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomski studij Eksperimentalne biologije (modul fiziologija i imunobiologija) upisuje 2013. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme diplomskog studija odraduje tromjesečnu IAESTE praksu na Max Planck Institutu za biofizikalnu kemiju, u Laboratoriju za gensku ekspresiju i signalizaciju u Göttingenu u Njemačkoj. Diplomu magistricе eksperimentalne biologije stječe 2016. godine obranom diplomskog rada pod nazivom „Polimorfizam gena za serotoninški receptor 5-HT<sub>6</sub> i demencija“, a iste godine počinje raditi kao asistent na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a, gdje vodi vježbe iz Animalne fiziologije, Fiziologije čovjeka, Neurofiziologije te Neurofiziologije i endokrinologije. Bila je neposredni voditelj 2 diplomska rada. Suradnica je na HRZZ projektima „Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninški sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina“ i „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji“. Do sada je objavila 4 znanstvena rada i 25 kongresnih priopćenja. Pohađala je tečajeve i radionice (Elsevier AuthorWorkshop, Biopac seminar, Radionica o ishodima učenja), te bila uključena u popularizacijske aktivnosti (Dan i noć na PMF-u).

### Radovi u časopisima:

Trnski S, **Nikolic B**, Ilic K, Drlje M, Bobic-Rasonja M, Darmopil S, Petanjek Z, Hranilovic D, Jovanov-Milosevic N (2022) The signature of moderate perinatal hypoxia on cortical organization and behavior: Altered PNN-parvalbumin interneuron connectivity of the cingulate circuitries. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10:810980

Blazevic SA, Glogoski M, **Nikolic B**, Hews DK, Lisicic D, Hranilovic D (2020) Differences in cautiousness between mainland and island *Podarcis siculus* populations are paralleled by differences in brain noradrenaline/adrenaline concentrations. *Physiology & behavior* 224

**Nikolic B**, Josic P, Buric D, Tkalec M, Lisicic D, Blazevic SA, Hranilovic D (2019) Coexisting lacertid lizard species *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis* differ in dopamine brain concentrations. *Journal of comparative physiology A* 205: 451-456

Blažević SA, Šoltić D, **Nikolić B**, Ilić K, Jovanov Milošević N, Hranilović D (2018) Perinatal Exposure of Rats to 5-Hydroxytryptophan Affects Midbrain Serotonin Homeostasis. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research* 2: 1-9

## Sažeci sa skupova:

**Barbara Nikolić**, Sara Trnski, Valentina Runko, Dubravka Hranilović, Nataša Jovanov Milošević (2021) Increased motivation during learning task and VIP expression in rats exposed to mild neonatal hypoxia. 23rd EMBL PhD Symposium: The Big Picture: Zooming into Life Heidelberg, Njemačka

Bečeheli, Ivona; Horvatiček, Marina; Perić, Maja; **Nikolić, Barbara**; Klasić, Marija; Hranilović, Dubravka; Ivanišević, Marina; Desoye, Gernot; Štefulj, Jasminka (2021) Sex-specific interrelation between glucose levels and SLC6A4 gene methylation in maternal and fetal blood. EMBO | EMBL Symposium: Metabolism meets epigenetics, Heidelberg, Njemačka

Trnski, Sara; **Nikolić, Barbara**; Ilić, Katarina; Drlje, Matea; Bobić-Rasonja, Mihaela; Darmopil, Sanja; Petanjek, Zdravko; Hranilović, Dubravka; Jovanov-Milošević, Nataša (2021) Lifelong changes after perinatal moderate hypoxia: increased number of interneurons and perineuronal nets in the cingulate cortex of the adult rat. Abstract book 8th Croatian Neuroscience Congress: 99, Zagreb: Croatian Society for Neuroscience

**Nikolić, Barbara**; Trnski, Sara; Košić, Kristina; Hranilović, Dubravka; Jovanov Milošević, Nataša (2021) Long-term changes of Drd1 and Drd2 gene expression in a rat model of mild neonatal normobaric hypoxia. // ENCODS 2021 - Book of abstracts: P5A08 , Glasgow, UK

**Barbara Nikolić**, Sara Trnski, Kristina Košić, Dubravka Hranilović, Nataša Jovanov Milošević (2020) Increased rearing and brainstem dopamine levels in a rat model of mild neonatal normobaric hypoxia. FENS 2020 - Virtual Forum, Glasgow, UK

Trnski, S; Ilić, K; **Nikolić, B**; Darmopil, S; Petanjek, Z; Hranilović, D; Jovanov Milošević, N (2020) Lifelong changes in cingulate cortex and learning behavior after moderate perinatal hypoxia in the rat. FENS 2020 Virtual Forum, Glasgow, Škotska

**Barbara Nikolić**, Sara Trnski, Matea Krizman, Nataša Jovanov Milošević, Dubravka Hranilović (2019) Consequences of neonatal normobaric hypoxia on rat behavior. FENS Regional Meeting - Connecting (Brain) Regions, Beograd, Srbija

Trnski, Sara; Ilić, Katarina; **Nikolić, Barbara**; Habek, Nikola; Hranilović, Dubravka; Jovanov Milošević, Nataša (2019) Changes of perineuronal nets morphology, hyperactive behavior and cognitive deficits in mild perinatal hypoxic brain lesion in rats. 7th Croatian Neuroscience Congress, Zadar, Hrvatska

Trnski, Sara; Ilić, Katarina; **Nikolić, Barbara**; Habek, Nikola; Hranilović, Dubravka; Jovanov Milošević, Nataša (2019) A non – invasive rat model of perinatal mild hypoxic brain damage. 14th FELASA Congress, Prag, Češka

Trnski, Sara; Ilić, Katarina; **Nikolić, Barbara**; Habek, Nikola; Hranilović, Dubravka; Jovanov Milošević, Nataša (2019) Lifelong changes in perineuronal nets and the learning behavior in

rats after mild perinatal hypoxic brain lesion. 7th Conference of the Mediterranean Neuroscience Society, Marrakech, Maroko

**Nikolić, Barbara**; Trnski, Sara; Kološnjaj, Ivona; Stipan, Monika; Hranilović, Dubravka; Jovanov Milošević, Nataša (2019) Effects of neonatal normobaric hypoxia on rat behavior at young and adult age. 7th Croatian Neuroscience Congress - Book of abstracts: 107, Zadar, Hrvatska

Blažević, Sofia Ana; Glogoški, Marko; **Nikolić, Barbara**; Tkalec, Mirta; Hranilović, Dubravka; Lisičić, Duje (2019) Neurochemical correlates of competitive exclusion in reptiles: the role of dopamine in the brains of two species of lizard - *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis*. Fens Regional Meeting 2019, Book of Abstracts: 557, Beograd: Serbian Neuroscience Society

Štefulj, Jasminka; Horvatiček, Marina; Perić, Maja; Baković, Petra; Čičin-Šain, Lipa; Klasić, Marija; **Nikolić, Barbara**; Hranilović, Dubravka; Anđelinović, Maja; Matijaš, Marijana et al. (2019) Prenatal Programming of Altered Serotonin Functioning: Maternal Gestational Diabetes, Obesity and Emotional Stress as Potential Risk Factors. 2nd International Scientific Conference Brain and Mind: Promoting Individual and Community Well-Being. Book of abstract:97-98, Zagreb: Hrvatsko

Kukolj, Marina; Oršolić, Nada; Odeh, Dyana; **Nikolić, Barbara**; Langer Horvat, Lea; Šimić, Goran; Gračan, Romana; Zrinščak, Ivana; Orct, Tatjana; Šoštarić, Branko et al. (2019) Modulacija crijevnog mikrobioma kvercetinom u štakorskomu modelu alzheimerove bolesti. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a: 15, Zagreb

Hranilović, Dubravka; Blažević, Sofia Ana; **Nikolić, Barbara**; Glogoški, Marko; Hews, Diana; Lisičić, Duje (2019) Differences in monoaminergic profile accompany differences in predator-induced stress behavior between mainland and island populations of lizard *Podarcis siculus*. Fens Regional Meeting 2019, Book of Abstracts: 559, Beograd: Serbian Neuroscience Society

Kukolj, Marina; Langer Horvat, Lea; Šimić, Goran; Šoštarić, Brank; Branović Čakanić, Karmen; Vlahović, Dunja; Gračan, Romana; Zrinščak, Ivana; **Nikolić, Barbara**; Odeh, Dyana; Oršolić, Nada (2019) Cerebellum in Alzheimer's disease: quercetin as a potential therapeutic. Book of Abstracts 7th Croatian Neuroscience Congress, Zagreb

**Barbara Nikolić**, Paula Josić, Davorka Burić, Mirta Tkalec, Duje Lisičić, Dubravka Hranilović, Sofia Ana Blažević (2018) Usporedba razine monoamina u mozgu gušterica *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti. Zbornik sažetaka - 13. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem: 289-290, Poreč, Hrvatska

Sofia Blažević, **Barbara Nikolić**, Marko Glogoški, Duje Lisičić, Dubravka Hranilović (2018) Lizard as a potential behavioral model: comparison of exploratory behavior and brain catecholamine levels between Italian wall lizard and Wistar rat. Book of abstracts - Laboratory animals in scientific research, 3rd Congress of Croatian Laboratory Animal Science

Association (CroLASA) and 2nd joint CroLASA and Society for Laboratory Animals of Slovenia (SLAS) Congress with international participation, Zagreb, Hrvatska

**Barbara Nikolić**, Dora Peršić, Sofia Ana Blažević, Dubravka Hranilović (2018) Development of HPLC method for serotonin, dopamine and noradrenaline determination in rat brain tissue samples. Knjiga sažetaka - Studentski kongres neuroznanosti - NeuRi2018, Rijeka i Rab, Hrvatska

Trnski, Sara; Ilić, Katarina; **Nikolić, Barbara**; Orešković, Darko; Habek, Nikola; Hranilović, Dubravka; Jovanov - Milošević, Nataša (2018) The perinatal mild hypoxic brain lesion in rats causes changes in perineuronal nets morphology and impaired learning behavior. Controlling Neuronal Plasticity - developmental disorders and repair, Prag, Češka

Trnski, Sara; Ilić, Katarina; **Nikolić, Barbara**; Orešković, Darko; Habek, Nikola; Hranilović, Dubravka; Jovanov Milošević, Nataša (2018) A new non – invasive model of perinatal mild hypoxic brain lesion causes lifelong changes of perineuronal nets and learning behavior in rats. Nikola Škreb Symposium: "New platforms in developmental biology - towards the clinical application", Zagreb, Hrvatska

Trnski, Sara; Ilić, Katarina; **Nikolić, Barbara**; Habek, Nikola; Hranilović, Dubravka; Milošević Jovanov, Nataša (2018) A non-invasive rat model of perinatal hypoxic brain lesion. 3. znanstveno-stručni simpozij Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama i 2. zajednički skup CroLASA-e i SLAS-a s međunarodnim sudjelovanjem „Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima“, Zagreb, Hrvatska

Odeh, Dyana; **Nikolić, Barbara**; Mataković, Maja; Lesar, Nikola; Kukolj, Marina; Balta, Vedran; Karač, Ivo; Oršolić, Nada (2017) Oxidative stress and inflammation caused by n- hexyl salicylate in mouse skin: the effectiveness of flavonoids. Annual meeting of the Croatian Immunological Society with EFSIS on tour: 59, Zagreb, Hrvatska

**Nikolić, Barbara**; Šoltić, Darija; Blažević, Sofia Ana; Jovanov Milošević, Nataša; Hranilović, Dubravka (2017) Perinatal exposure to 5-hydroxytryptophan induces reduction of 5HT concentration in the midbrain 5HT neurons of adult rats. Book of Abstracts "The 6th Croatian Neuroscience Congress with International Participation": 94, Osijek, Hrvatska

Ledinski, Maja; Oršolić, Nada; Kukolj, Marina; Odeh, Dyana; Mojzeš, Anamarija; Uroić, Ksenija; Leboš Pavunc, Andreja; Pamučar, Biljana; **Nikolić, Barbara**; Mateševac, Josipa et al. (2017) Analysis of intestine microbiome in the alzheimer's disease rat model. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society with EFIS on Tour : 40, Zagreb