

STICANJE I POZIVANJE PROSTORNE MEMORIJE KOD POTOMSTVA ŽENKI PACOVA IZLOŽENIH LIPOPOLISAHARIDOM IZAZVANOM ZAPALJENJU TOKOM TRUDNOĆE

Aleksandra Vidojević¹, Aleksandra Živković¹, Anja Santrač², Branka Divović², Miroslav Savić²

¹ Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

² Mentori: Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt e-mail: alex.vidojevic@yahoo.com

Sažetak

Uvod: Animalni modeli pružaju mogućnost ispitivanja veze između zapaljenja kod majki tokom trudnoće i različitih neuropsihijatrijskih poremećaja potomstva, pokazane u epidemiološkim studijama.

Cilj rada: U ovom radu je ispitivano postojanje zapaljenja kod ženki pacova izloženih LPS-u tokom trudnoće i njegov uticaj na oštećenje prostorne memorije potomstva u Morisovom vodenom lavirintu.

Materijal i metode: Gravidne ženke soja Wistar bile su izložene LPS-u ili fiziološkom rastvoru (SAL) 15. i 16. dana gestacije i uzimana im je krv radi određivanja koncentracije TNF- α . Mladunci oba pola (mužjaci – M, ženke – F) podvrgnuti su petodnevnom testu sticanja i jednodnevnom testu pozivanja memorije u dva postnatalna perioda (35 – 39. postnatalnog dana života (P35-39) i P40, odnosno P55-59 i P60). Analizirani su parametri sticanja (latencija i efikasnost putanje do pronalaska platforme i ukupan pređeni put) i pozivanja prostorne memorije (broj ulazaka i efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu).

Rezultati: Utvrđene su povišene koncentracije TNF- α kod majki tretiranih LPS-om. Kod P40 životinja nije bilo značajnih razlika u praćenim bihevioralnim parametrima, kao ni kod P60 ženki. Pokazano je da su pacovi M/LPS/P60 imali statistički značajno manju efikasnost putanje do pronalaska platforme, veći ukupni pređeni put i trend povećanja latencije do pronalaska platforme u odnosu na M/SAL/P60 u testu sticanja memorije, kao i značajno manju efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu u testu pozivanja memorije.

Zaključak: Lipopolisaharidom (LPS) izazvano zapaljenje kod ženki pacova tokom trudnoće utiče na oštećenje prostorne memorije kod potomstva muškog pola u ranom odraslom dobu, što bi moglo poslužiti za razvijanje animalnog modela neurorazvojnih oboljenja.

Ključne reči: lipopolisaharid, prostorna memorija, TNF- α , neurorazvojno oštećenje, zapaljenje u graviditetu

Abstract

Introduction: Animal models enable the investigation of association between maternal inflammation during pregnancy and different neuropsychiatric disorders in offspring, which has been reported in epidemiological studies.

Aim: Investigation of inflammation existence in female rats exposed to LPS during pregnancy and its influence on spatial memory impairment in offspring in Morris water maze.

Material and methods: Pregnant Wistar females were exposed to LPS or saline (SAL) at gestational day 15 and 16 and their blood was taken for TNF- α concentration determination. Rats of both sexes (male – M, female – F) went through five-day memory acquisition and one-day memory retrieval test during two periods (35 – 39 postnatal day (P35-39) and P40; likewise P55-59 and P60). We analyzed memory acquisition (latency and path efficiency to platform finding and total distance travelled) and memory retrieval parameters (number of entries and path efficiency to first entry to the target zone).

Results: We found higher TNF- α concentration present in LPS-treated dams. There were no significant differences for any of the parameters analyzed for P40 animals and P60 females. M/LPS/P60 rats had a significantly decreased path efficiency to platform finding, increased total distance travelled and a trend of increased latency to platform finding, compared to M/SAL/P60 in the memory acquisition test, and a significantly decreased path efficiency to first entry to the target zone in the memory retrieval test.

Conclusion: Lipopolysaccharide (LPS) – induced maternal inflammation during pregnancy leads to spatial memory impairment in male rat offspring in early adulthood, a finding that can be a basis for animal modeling of neurodevelopmental disorders.

Key words: lipopolysaccharide; spatial memory; TNF- α ; neurodevelopmental impairment; inflammation in gravidity

Uvod

U etiologiji većine psihijatrijskih oboljenja, značajnu ulogu ima genetski faktor koji je pod uticajem različitih faktora sredine. Kod psihijatrijskih oboljenja koja dovode do teškog oštećenja mentalnog, a time i celokupnog funkcionisanja osobe, kao što su shizofrenija i autizam, genetski faktor je posebno značajan. Međutim, epidemiološke studije daju ubedljiv dokaz i o postojanju znatnog uticaja faktora sredine, čak i kod najtežih psihijatrijskih oboljenja. Infekcija majke tokom trudnoće, socijalni stres, gladovanje majke u trudnoći, komplikacije akušerske prirode – sve su to u epidemiološkim studijama identifikovani faktori sredine koji pozitivno koreliraju sa razvojem ovih oboljenja [1]. Kako epidemiološke studije omogućavaju identifikaciju uzročnih veza među pojavama bez ulaženja u njihovo objašnjenje, nova saznanja o prirodi psihijatrijskih oboljenja dobijaju se razvijanjem animalnih modela psihijatrijskih bolesti. Analogno faktorima sredine u humanoj populaciji, istraživači su izlagali gravidne ženke eksperimentalnih životinja različitim štetnim agensima. I zaista, mladunci takvih ženki ispoljili su izvesne promene u ponašanju koje se u određenom stepenu mogu povezati sa oboljenjima kod ljudi [2]. Promene u ponašanju pacova su izraženije ukoliko je primarno oštećenje njihovog moždanog razvoja dejstvom štetnog agensa nastupilo u ranim stadijumima prenatalnog moždanog razvoja [3]. Na ovim saznanjima se temelji hipoteza o shizofreniji i autizmu kao o neurorazvojnim oboljenjima.

Najčešće korišćeni alat za proučavanje neurorazvojnih oboljenja je animalni model sistemske prenatalne infekcije [4, 5] koji, u našem slučaju, podrazumeva aplikaciju lipopolisaharida gravidnoj ženki pacova u kritičnom periodu intrauterinog razvoja ploda. Postavlja se ključno pitanje: kako infekcija majke u kritičnom periodu trudnoće može da utiče na razvoj mozga ploda? Većina studija pokazuju da ni sâm infektivni agens niti njegove virulentne komponente nisu odgovorni za oštećenje mozga ploda, već da najverovatnije uzrok leži u izvesnim komponentama imunskog odgovora majke. Najviše studija pokazuje da ključnu ulogu u oštećenju moždanog razvoja ploda imaju citokini sintetisani kao posledica maternalne imunološke aktivacije [6]. Uzimajući ovu hipotezu u obzir, kao i činjenicu da su teška psihijatrijska oboljenja kod ljudi vrlo često praćena kognitivnim propadanjem, definisali smo glavne ciljeve našeg rada: utvrđivanje inflamacije u organizmu gravidnih ženki pacova određivanjem nivoa proinflamatornog citokina TNF- α u plazmi nakon primene odgovarajućeg tretmana, i ispitivanje sticanja i pozivanja prostorne memorije u Morisovom vodenom lavirintu kod njihovog potomstva, u modelu lipopolisaharidom izazvanog ne-

urorazvojnog oštećenja kod pacova, a sve radi pokušaja validacije animalnog modela neurorazvojnih oboljenja. Značaj ovih modela je nesporan i podrazumeva mogućnost suštinskih istraživanja prirode neurorazvojnih oboljenja i, naročito, dobrog prognoziranja terapijske efikasnosti novih tretmana.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su rađeni na albino pacovima Wistar soja. Sve procedure izvršene tokom studije u skladu su sa EEC Direktivom 86/609. Pacovi su držani u standardnim kavezima od pleksiglasa (42 cm \times 26,5 cm \times 18 cm), u grupi od po četiri do šest životinja u kavezu, smeštenih u životinjskom vivarijumu, na konstantnoj temperaturi od $21 \pm 1^\circ\text{C}$, relativnoj vlažnosti vazduha 40-70% i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 6 h do 18 h, intenzitet svetla 120 lx). Uzimanje hrane i česmenske vode bilo je ad libitum. Negovanje životinja i bihevioralna testiranja sprovedeni su tokom svetle faze ciklusa.

Ženke pacova su sparivane u životinjskom vivarijumu, a dan kada je mikroskopiranjem njihovog vaginalnog brisa utvrđeno da je došlo do koitusa, označen je kao nulti dan gestacije, nakon čega su ženke smeštene u pojedinačne kaveze. Posle rođenja, mladunci su ostajali sa svojim majkama sve do 21. dana života, kada su bili razvrstani na mužjake i ženke.

Primena LPS-a i uzimanje krvi gravidnim ženkama

Gravidnim ženkama pacova ($n = 8$ po tretmanu), telesne mase između 300 i 400 g, jednom dnevno je, intraperitonealnim putem, primenjivano 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lipopolisaharida (LPS), komponente ćelijskog zida Gram negativnih bakterija (serotip LPS-a iz bakterije *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma, Nemačka) koji smo rastvorili u fiziološkom rastvoru (LPS grupa), ili 1 ml/kg sterilnog fiziološkog rastvora (SAL grupa), i to 15. i 16. dana gestacije [7] između 10 h i 12 h. Gravidnim ženkama je 15. dana gestacije dva sata nakon tretmana (LPS ili SAL) uzimana krv iz repne vene heparinizovanim „leptir” infuzionim sistemom, koja je potom prenetu u heparinizovane endorfice. Prikupljeni uzorci krvi su centrifugirani 10 minuta na 5000 g i temperaturi od 4°C . Izdvojena krvna plazma je čuvana na temperaturi od -80°C do izvođenja ELISA testa.

TNF- α esej

Koncentracija TNF- α je izmerena „sendvič” ELISA testom koji je specifičan za pacove, po protokolu do-

bijenim uz kit (Rat TNF alpha ELISA Ready-SET-Go! eBioscience, SAD). Detekcioni opseg testa je 16–2000 pg/ml. Esej je urađen za 6 uzoraka plazmi po tretmanu.

Bihevioralni test - Morisov vodeni lavirint (MVL)

Morisov vodeni lavirint (MVL) je bihevioralni test koji se koristi za ispitivanje, pre svega, prostorne memorije ekperimentalne životinje [8]. Bihevioralno testiranje je sprovedeno tokom svetle faze ciklusa sa početkom u 9 h. Celokupno ponašanje životinje u MVL-u praćeno je digitalnom kamerom postavljenom iznad aparature, a video zapis je obrađen ANY-maze softverom (Stoelting Co. Wood Dale, IL, USA) koji omogućava i izračunavanje vrednosti odabranih parametara. MVL se sastoji od crnog cilindričnog bazena prečnika 200 cm, visine 60 cm i napunjenog vodom do 30 cm i platforme (10 cm × 15 cm) potopljene 2 cm ispod površine vode. Pronalazak platforme od strane životinje okončava proceduru i u tom smislu je bazen lavirint. Temperatura vode je bila $21 \pm 1^\circ\text{C}$ sve vreme tokom eksperimenta. Indirektno osvetljenje sobe je postignuto pomoću belih neonskih lampi koje su postavljene na zidu ispod ravni bazena. Bazena je imaginarno (ANY-maze softverom) podeljen na kvadrante i u severoistočnom kvadrantu je smeštena platforma. Testovi sticanja i pozivanja prostorne memorije u Morisovom vodenom lavirintu su izvođeni po protokolu detaljno opisanom u drugom radu [9]. Pacov je spuštán u jedan od kvadranta bazena, tako da je glavom okrenut ka ivici, nakon čega je plivajući pokušavao da pronađe platformu. Za to je imao četiri pokušaja dnevno i maksimalno 2 min. po pokušaju. Ukoliko je ne bi pronašao u predviđenom vremenu, pacov je manuelno vođen kroz površinu vode do platforme gde je ostavljen nekoliko sekundi, a zatim je postupak ponavljen još tri puta. Ovaj deo eksperimenta je trajao pet dana - 35, 36, 37, 38. i 39. i 55, 56, 57, 58. i 59. postnatalnog dana života pacova (P35, P36, P37, P38 i P39 i P55, P56, P57, P58 i P59), što je trebalo da omogući akviziciju, tj. sticanje prostorne memorije pacova. Šestog dana - 40. ili 60. postnatalnog dana života pacova (P40 ili P60), izvođen je test pozivanja memorije (probe trial), koji podrazume-

va plivanje pacova u trajanju od 60 s, ali ovog puta bez platforme. Na ovaj način je procenjena uspešnost sticanja prostorne memorije pacova.

Statistička analiza

Da bi se eliminisao uticaj legla, testirane su 2 do 3 životinje po leglu i uzimana je njihova srednja vrednost kao vrednost za jedno leglo [10]. Testirana su oba pola, u 7–8 legala po tretmanu, u dva postnatalna perioda. U svim testovima rezultati ispitivanja su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Podaci dobijeni praćenjem izabranih bihevioralnih parametara u testu sticanja prostorne memorije obrađeni su dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem, pri čemu su faktori bili tretman (LPS i SAL) i dan izvođenja eksperimenta (P35, P36, P37, P38, P39 i P55, P56, P57, P58, P59) među jedinkama istog pola. Podaci dobijeni u testu pozivanja memorije obrađeni su Studentovim t-testom, radi procene uticaja tretmana (LPS i SAL) na ispitivane bihevioralne parametre. U svim eksperimentima, razlike na nivou $p < 0,05$ uzimane su kao statistički značajne, dok su razlike $0,1 > p > 0,05$ smatrane trendom. Statistička analiza je sprovedena komercijalnim statističkim softverom Sigma Plot 12 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA).

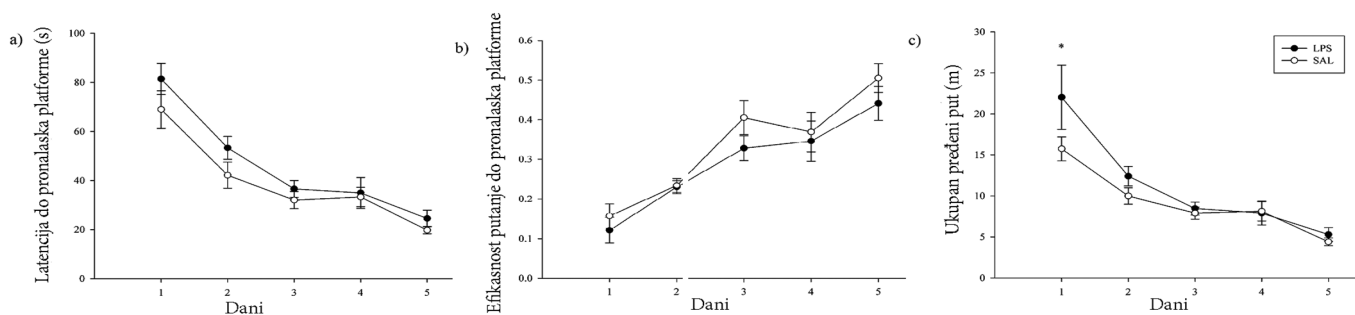
Rezultati

Koncentracija TNF- α u serumu gravidnih ženki

Kod gravidnih ženki koje su tretirane fiziološkim rastvorom, dobijena koncentracija TNF- α je bila ispod nivoa detekcije (detekcioni limit je 16 pg/ml), a kod gravidnih ženki tretiranih LPS-om $42,53 \pm 6,93$ pg/ml (srednja vrednost \pm standardna greška).

Test sticanja (P35 – 39) i test pozivanja prostorne memorije (P40) u Morisovom vodenom lavirintu.

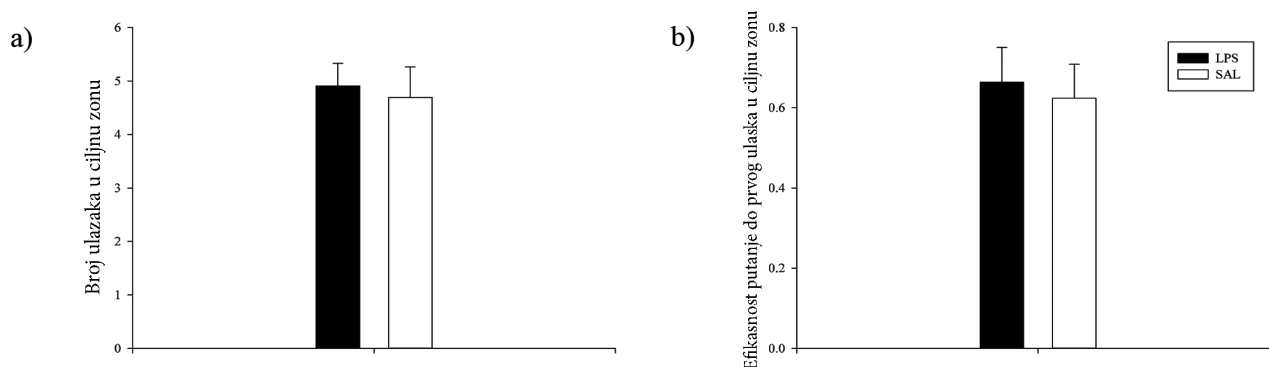
Na **Grafiku 1** prikazan je uticaj tretmana majki (LPS i SAL) na ponašanje potomstva muškog pola u testu sticanja prostorne memorije kroz praćenje tri parametra. Za prvi - latenciju, do pronalaska platforme, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala da faktor tretman nije statistički značajan ($F(1,12) = 2,484$; $p = 0,141$),



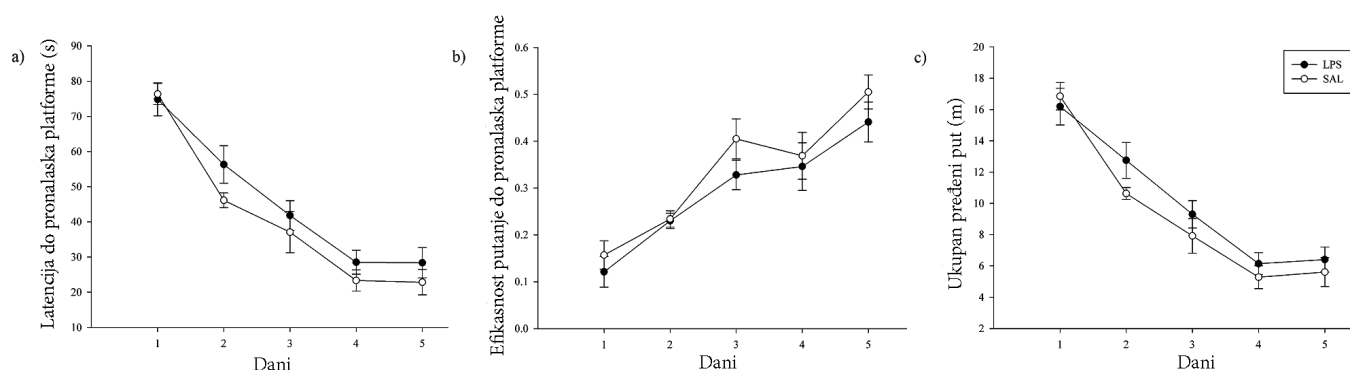
Grafik 1. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) latenciju do pronalaska platforme (s); b) efikasnost putanje do pronalaska platforme; c) ukupan pređeni put (m), tokom pet dana praćenja plivanja mužjaka pacova u testu sticanja prostorne memorije u MVL-u u P35, P36, P37, P38 i P39 * $p < 0.05$

kao ni za drugi parametar - efikasnost putanje do pronalaska platforme ($F(1,12) = 3,101$; $p = 0,104$). Za ukupni pređeni put, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala da je 1. dana testiranja mužjaka faktor tretman dostigao statističku značajnost ($p = 0,007$). Međutim, generalno posmatrano, tokom petodnevnog testiranja mužjaka, pokazan je statistički trend uticaja faktora tretmana ($F(1,12) = 3,764$; $p = 0,076$). Mužjaci LPS grupe su prelazili statistički značajno duži put u odnosu na mužjake kontrolne grupe 1. dana testa i imali isti izražen trend tokom svih 5 dana plivanja.

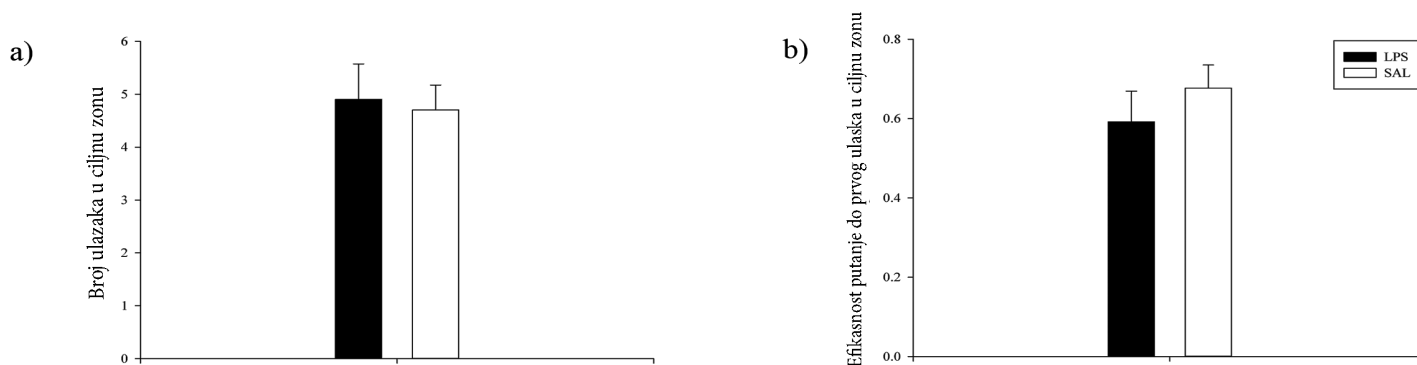
Na **Grafiku 2** prikazan je uticaj tretmana majki na ponašanje potomstva muškog pola u testu pozivanja memorije, kroz praćenje dva parametra: broj ulazaka u ciljnu zonu i efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu



Grafik 2. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) broj ulazaka u ciljnu zonu; b) efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu, kod mužjaka u testu pozivanja memorije u MVL-u u P40



Grafik 3. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) latenciju do pronalaska platforme (s); b) efikasnost putanje do pronalaska platforme; c) ukupan pređeni put (m) tokom pet dana praćenja plivanja ženki pacova u testu sticanja prostorne memorije u MVL-u u P35, P36, P37, P38 i P39



Grafik 4. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) broj ulazaka u ciljnu zonu; b) efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu, kod ženki u testu pozivanja memorije u MVL-u u P40

$t = -0,887$; $p = 0,391$ za efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu.

Ujedno je praćen i parametar prosečna brzina plivanja u testu sticanja memorije (nije prikazano na slici). Za oba pola je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika između tretmana ($F(1,12) = 0,0266$; $p = 0,873$ za mužjake; $F(1,13) = 0,0169$; $p = 0,899$ za ženke).

Test sticanja (P55 – 59) i test pozivanja prostorne memorije (P60) u Morisovom vodenom lavirintu

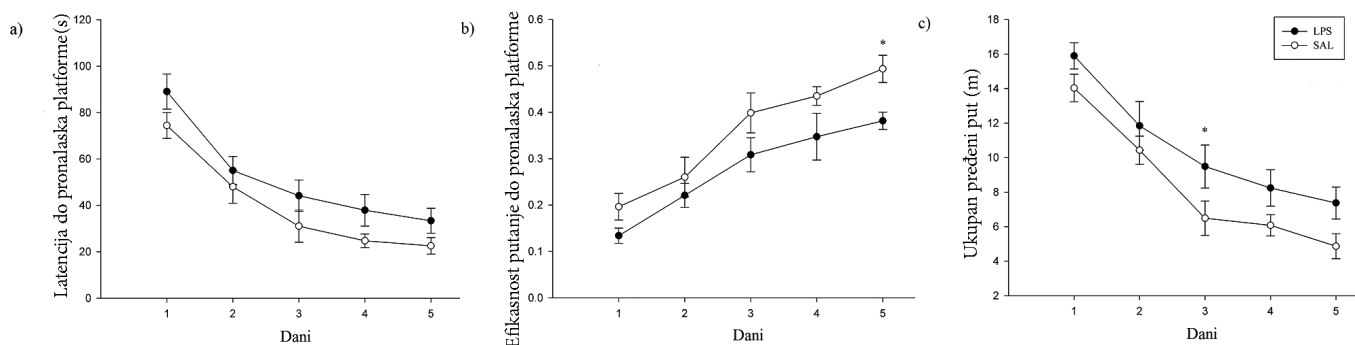
Na **Grafiku 5** prikazan je uticaj tretmana majki (LPS i SAL) na ponašanje potomstva muškog pola u testu sticanja prostorne memorije kroz tri parametra. Za prvi, latenciju do pronalaska platforme, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala da se uticaj faktora tretman može smatrati statističkim trendom ($F(1,14) = 4,566$; $p = 0,051$). Za drugi, efikasnost putanje do pronalaska platforme i treći, ukupni pređeni put, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala da je faktor tretman statistički značajan ($F(1,14) = 8,246$; $p = 0,012$ i $F(1,14) = 6,200$; $p = 0,026$) posmatrano za svih pet dana testa. Posmatrajući svaki dan pojedinačno, statistički značajna

razlika postoji 5. dana ($p = 0,023$) za efikasnost putanje do pronalaska platforme i 3. dana ($p = 0,038$) za ukupni pređeni put. U celini je pokazano da su mužjaci LPS grupe ispoljili trend dužeg plivanja do pronalaska platforme, statistički značajno manje efikasno pronalazili platformu i prelazili duži put u odnosu na mužjake kontrolne grupe.

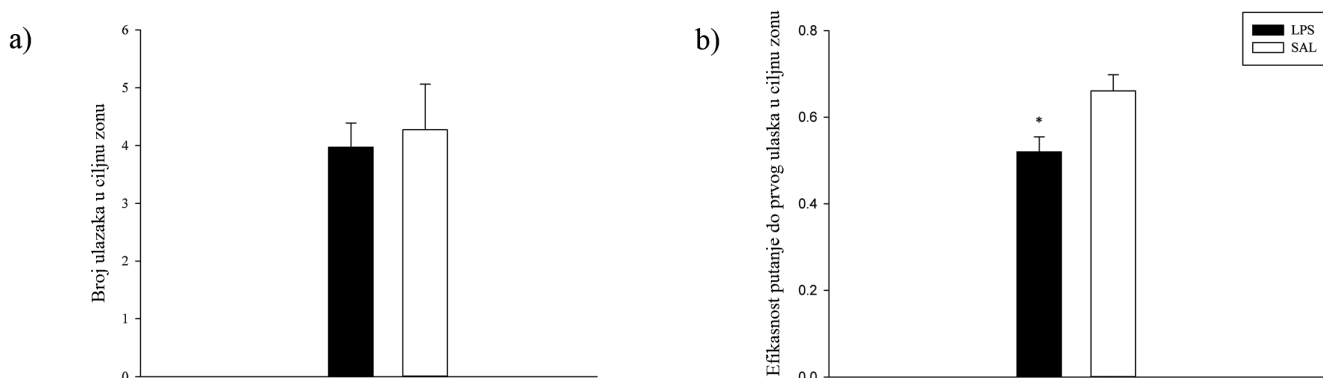
Na **Grafiku 6** prikazan je uticaj tretmana majki na ponašanje potomstva muškog pola u testu pozivanja memorije, kroz praćenje dva parametra: broj ulazaka u ciljnu zonu i efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu. Studentovim t-testom je pokazano da je faktor tretman statistički značajan za prvi parametar ($p = -2,770$, $t = 0,015$), za razliku od drugog ($p = 0,741$; $t = -0,337$). Mužjaci LPS grupe su statistički značajno manje puta ulazili u ciljnu zonu u odnosu na mužjake kontrolne grupe.

Diskusija

Koncentracija TNF- α u serumu gravidnih ženki



Grafik 5. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) latenciju do pronalaska platforme (s); b) efikasnost putanje do pronalaska platforme; c) ukupan pređeni put (m) tokom pet dana praćenja plivanja mužjaka pacova u testu sticanja prostorne memorije u MVL-u u P55, P56, P57, P58 i P59 * $p < 0,05$



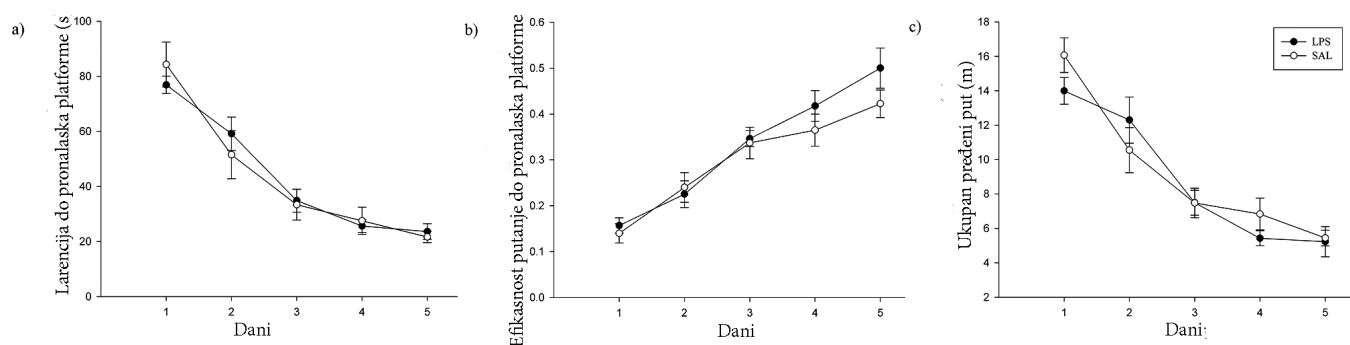
Grafik 6. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) broj ulazaka u ciljnu zonu; b) efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu, kod mužjaka u testu pozivanja memorije u MVL-u u P60 * $p < 0,05$

Na **Grafiku 7** prikazan je uticaj tretmana majki (LPS i SAL) na ponašanje potomstva ženskog pola u testu sticanja prostorne memorije. Nije pokazana statistički značajna razlika između tretmana ni za jedan od tri parametra ($F(1,14) = 0,0049$; $p = 0,945$ za latenciju do pronalaska platforme, $F(1,14) = 1,067$; $p = 0,319$ za efikasnost putanje do pronalaska platforme i $F(1,14) = 0,232$, $p = 0,637$ za ukupni pređeni put).

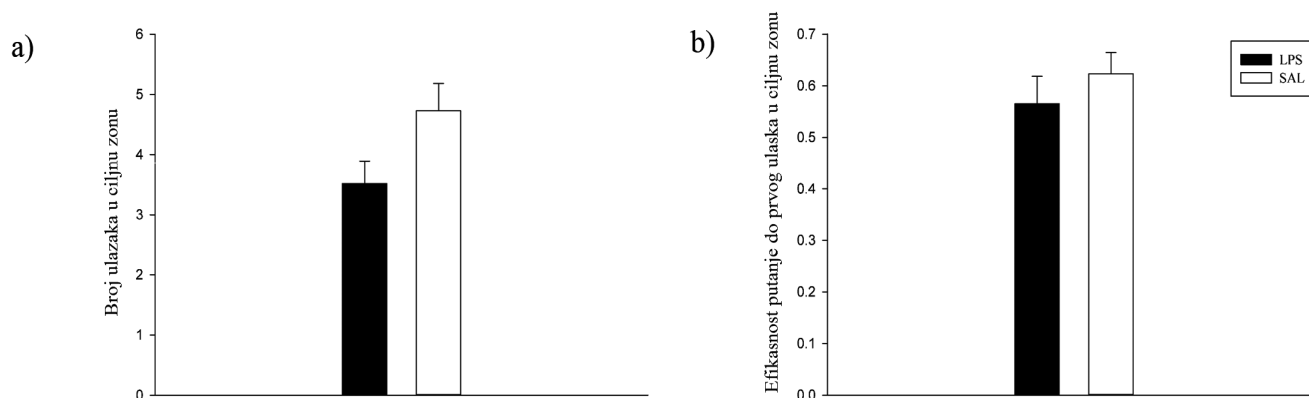
U testu pozivanja memorije, uticaj tretmana majki na ponašanje ženskog potomstva (**Grafik 8**) kroz praćenje broja ulazaka u ciljnu zonu smatra se statističkim

trendom ($t = -2,066$; $p = 0,0579$), dok za efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu ovaj uticaj nije statistički značajan ($t = -0,862$; $p = 0,403$). Ženke LPS grupe su pokazale trend manjeg broja ulazaka u ciljnu zonu u odnosu na ženke kontrolne grupe.

Ujedno je praćen i parametar prosečna brzina plivanja u testu sticanja memorije (nije prikazano na slici). Za oba pola je pokazano da ne postoji statistička značajna razlika ($F(1,14) = 0,380$; $p = 0,548$ za mužjake, $F(1,14) = 1,143$; $p = 0,303$ za ženke).



Grafik 7. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) latenciju do pronalaska platforme (s); b) efikasnost putanje do pronalaska platforme; c) ukupan pređeni put (m) tokom pet dana praćenja plivanja ženki pacova u testu sticanja prostorne memorije u MVL-u u P55, P56, P57, P58 i P59



Grafik 8. Uticaj prenatalne izloženosti efektima LPS-a ili fiziološkog rastvora (SAL) na: a) broj ulazaka u ciljnu zonu; b) efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu, kod ženki u testu pozivanja memorije u MVL-u u P60

U plazmi gravidnih ženki koje su tretirane LPS-om 15. dana gestacije, utvrđene su povišene koncentracije proinflatornog citokina TNF- α dva sata nakon primene LPS-a, što pokazuje da je došlo do aktivacije sistemskog zapaljenjskog procesa.

Test sticanja (P35 – 39) i test pozivanja prostorne memorije (P40) u Morisovom vodenom lavirintu

U testu sticanja prostorne memorije pokazano je da postoje razlike između tretmana za parametar ukupni

pređeni put - statistička značajnost je dostignuta 1. dana, dok je, uzimajući u obzir svih 5 dana izvođenja eksperimenta, postignut statistički trend. Mužjaci LPS grupe su prelazili duži put u odnosu na mužjake kontrolne grupe. Za ostale praćene parametre u oba testa kod mužjaka, kao i za sve praćene parametre u oba testa kod ženki nije pokazano da postoje razlike između tretmana. Predočeni nalazi ukazuju da, zaključno sa 40. danom života, pacovi LPS grupe oba pola ne ispoljavaju promene u ponašanju koje ukazuju na oštećenje njihove prostorne memorije.

Test sticanja (P55 – 59) i test pozivanja prostorne memorije (P60) u Morisovom vodenom lavirintu

U testu sticanja prostorne memorije pokazan je trend da mužjacima LPS grupe treba više vremena da pronađu platformu u odnosu na kontrolnu grupu. Dodatno, mužjaci LPS grupe su prelazili duži put i imali manju efikasnost puta do pronalaska platforme u odnosu na mužjake kontrolne grupe. U testu pozivanja prostorne memorije, nije pokazana statistički značajna razlika između tretmana kod mužjaka za broj ulazaka u ciljnu zonu, dok za efikasnost putanje do prvog ulaska u ciljnu zonu jeste, što znači da mužjaci LPS grupe manje efikasno pronalaze platformu u odnosu na mužjake kontrolne grupe. U testovima sticanja i pozivanja prostorne memorije nisu pokazane razlike između tretmana za sve posmatrane parametre kod pacova ženskog pola, osim za broj ulazaka u ciljnu zonu u testu pozivanja memorije, koji se smatra statističkim trendom. Predočeni nalazi ukazuju da, počevši od 55, pa zaključno sa 60. danom života, pacovi LPS grupe muškog pola ispoljavaju promene u ponašanju koje se mogu povezati sa oštećenjem njihove prostorne memorije – mužjaci LPS grupe sporije uče da, prostorno se orijentišući, pronađu izlaz iz MVL-a i slabije pamte naučeno u odnosu na mužjake kontrolne grupe. U oba izvođena testa, životinje obe grupe i oba pola imale su konstantnu brzinu plivanja, što je utvrđeno praćenjem parametra prosečna brzina plivanja. Konstantna brzina plivanja ukazuje da životinje nemaju lokomotorne deficite i da je ponašanje u testu isključivo rezultat njihovog kognitivnog statusa, što omogućuje pravilno tumačenje drugih praćenih parametara.

Na osnovu sprovedenog bihevioralnog istraživanja i enzimskog imunotesta, može se pretpostaviti da je inflamacija, koja nastaje kao posledica izloženosti gravidne ženke LPS-u, povezana sa oštećenjem prostorne memorije kod potomstva muškog pola, i to 60. dana njihovog postnatalnog života. Kognitivni deficiti su vrlo česti, ako ne i univerzalni pratioci neurorazvojnih oboljenja, tako da nalazi dobijeni u ovom istraživanju potkrepljuju opravdanost koncepta razvijanja animalnih modela neurorazvojnih oboljenja. Međutim, razvijanje specifičnog animalnog modela, u prvom redu shizofrenije ili autizma, jeste izuzetno složen zadatak. U sprovedenom istraživanju, mužjaci pacova su ispoljili kognitivne deficite 60. postnatalnog dana što, uslovno rečeno, odgovara periodu ranog odraslog doba kod ljudi, dok 40. postnatalnog dana koji odgovara periodu rane adolescencije, ovakve promene ponašanja nisu ispoljene. To znači da bi dobi-

jeni animalni model neurorazvojnog oboljenja mogao marginalno bolje da imitira patologiju karakterističnu za shizofreniju, nego za neko drugo neuropsihijatrijsko oboljenje, jer se shizofrenija manifestuje u svom punom i pravom obliku u ranom odraslom dobu kod ljudi. Međutim, nije moguće vršiti generalizacije ovog tipa na osnovu samo jednog aspekta ponašanja i bez dalje adekvatne validacije animalnog modela.

Reference

1. Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010;90(3):285-326.
2. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun.* 2010;24(6):881-97.
3. Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist.* 2007;13(3):241-56.
4. Harvey L, Boksa P. Prenatal and postnatal animal models of immune activation: relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Dev Neurobiol.* 2012;72(10):1335-48.
5. Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res.* 2009;204(2):313-21.
6. Ning H, Wang H, Zhao L, Zhang C, Li XY, Chen YH, et al. Maternally-administered lipopolysaccharide (LPS) increases tumor necrosis factor alpha in fetal liver and fetal brain: its suppression by low-dose LPS pretreatment. *Toxicol Lett.* 2008;176(1):13-9.
7. Cui K, Luheshi GN, Boksa P. Effects of endogenous glucocorticoid secretion on the interleukin-6 response to bacterial endotoxin in pregnant and non-pregnant rats. *J Endocrinol.* 2011;209(1):95-103.
8. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1(2):848-58.
9. Milić M, Timić T, Joksimović S, Biawat P, Rallapalli S, Divljaković J, et al. PWZ-029, an inverse agonist selective for α_5 GABA A receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res.* 2013;241:206-13.
10. Lasic SE, Essioux L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci.* 2013;14:37.